

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2016

Bc. Martin Überall



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SOLUBILIZACE V SONOGRAFICKÝCH SYSTÉMECH

SOLUBILIZATION IN SONOGRAPHIC SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martin Überall

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0995/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Martin Überall	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Tereza Pilgrová	

Název diplomové práce:

Solubilizace v sonografických systémech

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na solubilizaci různých typů látek v mikrobublinách pro sonografické aplikace.
2. Návrh vhodných experimentů pro ověření postupů solubilizace v systémech založených na komerčním výrobku SonoVue(R).
3. Pomocí fluorescenčních sond, jako modelových solubilizačních látek, stanovit schopnost solubilizace daných systémů a využití v jejich vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie.
4. Na základě výsledků zhodnotit zvolený postup solubilizace daném systému a jeho využitelnost z hlediska terapie a/nebo diagnostiky.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Martin Überall
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V diplomové práci byly pomocí metody UV-VIS spektrofotometrie studovány solubilizační schopnosti fosfolipidů, z nichž je tvořen komerční přípravek SonoVue[®] využívající se v ultrasonografii, a poté samotných mikrobublin stejného složení jako má SonoVue[®], připravených různými způsoby v naší laboratoři. Byla zjišťována koncentrace látek solubilizovaných uvnitř zmíněných systémů. Prvním studovaným fosfolipidem byl dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný a druhým distearoylfosfatidylcholin. Mikrobubliny byly připraveny z těchto dvou fosfolipidů s přidavkem polyethylenglykolu a kyseliny palmitové dle přípravku SonoVue[®]. Solubilizační schopnosti byly zkoumány pomocí hydrofobních solutů Sudan Red G, Oil Red O, 4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium jodidu a Nilské červeně. Tyto látky byly vybrány z důvodu získání modelového systému solubilizovaných léčiv, popřípadě jiných účinných látek, které jsou taktéž hydrofobního charakteru. Solubilizace jednotlivých solutů byla zkoumána v mírně polárním prostředí fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl).

Dále byla provedena vizualizace námi připravených mikrobublin pomocí optické a fluorescenční mikroskopie. 4-Di-2-Asp nebyla vhodná fluorescenční sonda k vizualizaci mikrobublin. Velikost námi připravených mikrobublin odpovídala velikosti mikrobublin komerčního přípravku SonoVue[®].

Bylo zjištěno, že koncentrace solubilizovaných hydrofobních solutů uvnitř lipozomů fosfolipidů odpovídá řádově desítkám až stovkám mikromolů na litr. S rostoucí koncentrací fosfolipidů roste koncentrace solubilizovaných solutů. Výsledky získané během této práce mohou být využity k dalším experimentům a výzkumu v oblasti zaměřené na solubilizaci léčiv v mikrobublinách, kontrastních látkách, které jsou využívány v ultrasonografii.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ultrasonografie, solubilizace, mikrobubliny, cílená distribuce léčiv, SonoVue[®]

ABSTRACT

The aim of this thesis was to determine the solubilizing capacity of microbubbles based on SonoVue[®], and phospholipids SonoVue[®] is made of, by using the UV-VIS spectrophotometry. The concentrations of solubilized substances within these systems was further determined. In particular, the properties of natrium dipalmitoylphosphatidylglycerole and distearoylphosphatidylcholine were investigated. The microbubbles were produced using these phospholipids with the addition of polyethyleneglycol and palmitic acid. The solubilizing capacity was determined using hydrophobic solutes Sudan Red G, Oil Red O, 4-Di-2-Asp and Nile Red in order to obtain a model system of solubilized drugs or other hydrophobic substances. The behavior of solutes in phospholipids and our prepared microbubbles were examined in a moderately polar medium – physiological saline solution (0.15 M NaCl).

The vizualization of prepared microbubbles was performed using optical and fluorescence microscopy. 4-Di-2-Asp, as a fluorescence probe, was not suitable for microbubble vizualization. The size of microbubbles that were produced during the experiment was almost the same as the size of microbubbles of commercially made SonoVue[®].

The concentration of solubilized hydrophobic solutes inside the liposomes of phospholipids ranged from tens to hundreds of micromoles per liter. With increasing concentration of phospholipids the concentration of solubilized solutes also increased. The results of this experiment can be used for further research focused on the solubilization of drugs in microbubbles, and contrast agents which are used in ultrasonography.

KEYWORDS

Ultrasonography, solubilization, microbubbles, target drug delivery, SonoVue[®]

ÜBERALL, M. *Solubilizace v sonografických systémech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 62 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Tereze Pilgrové za trpělivost, vstřícnost a cenné rady. Dále své rodině a přítelkyni za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Ultrasonografie.....	9
2.1.1	Historie	9
2.1.2	Fyzikální princip ultrazvuku	10
2.1.3	Akustické vlastnosti krve	12
2.1.4	Terapeutické využití	12
2.1.5	Ultrazvukové snímkování	12
2.1.6	Dopplerovská sonografie.....	12
2.1.7	Vlastnosti ultrazvuku.....	13
2.2	Mikrobubliny.....	14
2.2.1	Příprava mikrobublin.....	16
2.2.2	Solubilizace mikrobublin	20
2.2.3	SonoVue®	21
2.3	Fixační média	22
2.4	UV-VIS molekulová absorpční spektrometrie	23
2.4.1	Absorbance	24
2.4.2	Lambert-Beerův zákon	24
2.4.3	Absorpční křivky.....	25
2.5	Fluorescenční mikroskopie	25
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1	Použité chemikálie	31
4.2	Přístroje a zařízení	33
4.3	Příprava zásobních roztoků	33
4.3.1	Zásobní roztoky hydrofobních solutů	33
4.3.2	Zásobní roztok DPPG.Na a DSPC	34
4.3.3	Námi připravené mikrobubliny na bázi SonoVue®	34
4.4	Příprava vzorků	34
4.4.1	Vzorky k zjištění molárních absorpčních koeficientů solutů	34
4.4.2	Vzorky pro výpočet koncentrace solubilizovaných solutů	34
4.4.3	Vzorky pro fluorescenční mikroskopii.....	35
4.5	Metoda měření.....	35
4.5.1	UV-VIS Spektrofotometrie	35
4.5.2	Optická mikroskopie	35
4.5.3	Fluorescenční korelační spektroskopie	35
4.6	Standardní vyhodnocení dat	36
4.6.1	Zjištění molárního absorpčního koeficientu solutů ve fosfolipidech a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®	36
4.6.2	Zjištění koncentrace solutů uvnitř fosfolipidů a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®	36

5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1	Vizualizace námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® pomocí optického mikroskopu.....	37
5.1.1	Vizualizace námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® pomocí fluorescenční spektroskopie	38
5.2	Molární absorpční koeficienty solutů ve fosfolipidech a v mikrobublinách na bázi SonoVue®	43
5.2.1	Dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný.....	43
5.2.2	Distearoylfosfatidylcholin.....	43
5.2.3	Mikrobubliny na bázi SonoVue®	43
5.3	Koncentrace solutů solubilizovaných ve fosfolipidech a v mikrobublinách na bázi SonoVue®	44
5.3.1	Solubilizační schopnosti DPPG.Na a DSPC	44
5.3.2	Solubilizační schopnosti námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue®	47
6	ZÁVĚR.....	50
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	52
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	57
8.1	Seznam zkratk	57
8.2	Seznam symbolů	57
9	PŘÍLOHY.....	58
9.1	Solubilizační schopnosti dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodného	58
9.2	Solubilizační schopnosti distearoylfosfatidylcholinu.....	58
9.3	Solubilizační schopnosti námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue®	59
9.4	Přístroje	61

1 ÚVOD

Co jsou to mikrobubliny, k čemu se využívají a k čemu by se daly využívat? Jakou roli hraje schopnost látek solubilizovat jiné látky, jak se toho dá využít v medicínských aplikacích? Které typy látek mohou být solubilizovány v mikrobublinách? Na tyto otázky odpoví právě tato diplomová práce.

V mé bakalářské práci jsme řešili solubilizační schopnosti vybraných třech tenzidů a sójového lecitinu jako modelových vzorků a okrajově solubilizační schopnosti komerčního přípravku SonoVue[®], který se používá jako kontrastní látka v ultrasonografii v podobě mikrobublin plněných plynem, fluoridem sírovým. V diplomové práci se již zabýváme podrobněji přípravkem SonoVue[®], jehož složení je nám již známé.

Diplomová práce je zaměřena na solubilizační schopnosti fosfolipidů, z nichž je složen přípravek SonoVue[®] a následně samotného systému SonoVue, který jsme si připravili v laboratoři. Testovali jsme také různé metody a způsoby přípravy vlastního SonoVue[®]. Solubilizační schopnosti jsme studovali ve fyziologickém roztoku pomocí čtyř hydrofobních solutů, z nichž dva byly zvoleny tak, aby se daly využít k vizualizaci mikrobublin pomocí fluorescenční mikroskopie.

Medicínský výzkum se zabývá především potenciálními nosiči léčiv a cílenou distribucí léčiv. Kontrastní látka SonoVue[®], která je schopna tvořit mikrobubliny, by mohla být využita jako nosičový systém, na který by bylo možné navázat léčivo, cytostatika, DNA, popřípadě některé vitamíny. Navázání těchto látek je možné buď na povrch struktury mikrobublin, nebo začleněním (solubilizací) přímo do vnitřní struktury. Nosiče léčiv by měly obecně umožnit prodlouženou cirkulaci účinných látek v krevním řečišti, řízenou aktivaci a selektivní účinek zaměřený na cílovou tkáň a tím tak omezit nežádoucí účinky terapií. Dále by měly zajistit rozpustnost ve vodě původně nerozpustným aktivním látkám nebo potlačit odolnost cílové tkáně k léčivu. Existuje celá řada typů nosičových systémů, největší pozornost se však věnuje nosičům cytostatik a to především z důvodu častého výskytu a závažnosti nádorových onemocnění, která mají dodnes malou účinnost léčby.

Cílem práce bylo provést rešerši na téma solubilizace různých typů látek v mikrobublinách pro sonografické aplikace, navrhnout vhodné experimenty pro ověření postupů solubilizace v systémech založených na komerčním výrobku SonoVue[®] a poté pomocí fluorescenčních sond, jako modelových solubilizačních látek, stanovit schopnost solubilizace daných systémů a využití v jejich vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie. Na závěr bylo cílem zhodnotit zvolený postup solubilizace v daném systému a jeho využitelnost z hlediska terapie a/nebo diagnostiky.

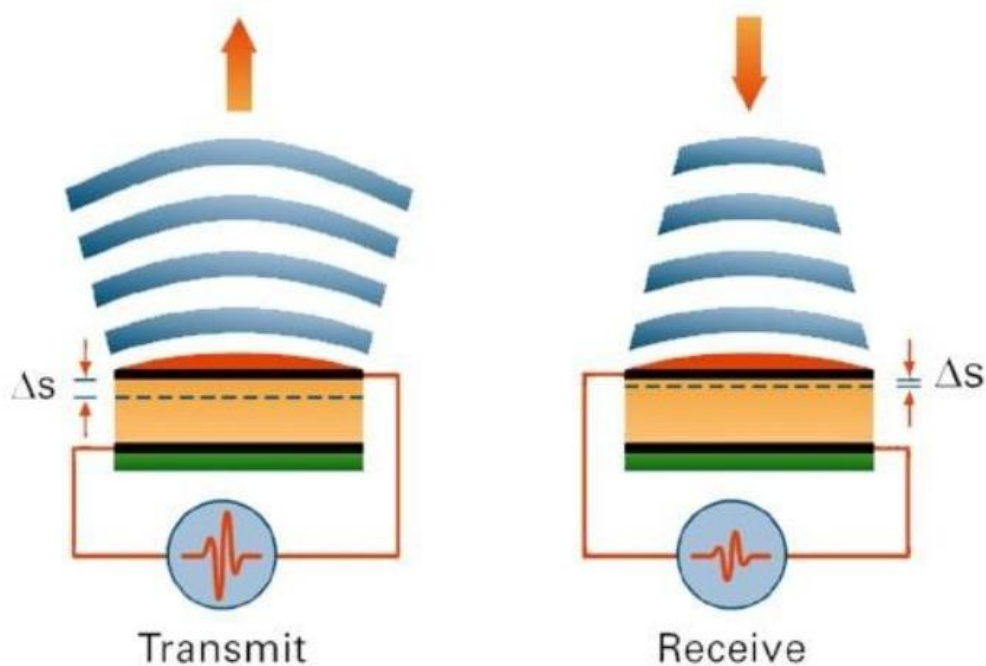
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ultrasonografie

2.1.1 Historie

Ultrasonografie je v dnešní době nejrozšířenější a nejsnáze dostupná moderní diagnostická zobrazovací technika. V diagnostickém postupu patří k prvnímu kroku při vyšetřeních [1]. Je zajímavá z hlediska pohodlí, bezpečnosti a nízkých nákladů. Tato diagnostická zobrazovací technika je neinvazivní [2].

Ultrazvukové snímkování se ve vědě začalo používat během konce 19. století s objevením piezoelektrického efektu, konkrétně v roce 1877 dcerou Marie Curie-Skłodowské, Iréne Joliet Curie [3]. Samotná technologie byla vyvíjena roku 1910 [4] jako námořní nástroj pro navigaci a komunikaci. Využití energie ultrazvuku k chemickým reakcím nebo chemickým procesům bylo zahájeno v roce 1927. Piezoelektrický efekt je tzv. srdcem ultrazvukového systému. Piezoelektrický efekt zajišťuje speciální krystalický materiál většinou z křemene (převodník, měnič), který vykazuje různé zajímavé jevy, jako je vytápění, emulgace, atomizace, aglomerace, disperze, krystalizace, urychlení chemických reakcí, rozrušení buněk, atd. [5]. Tento převodník převádí energii mezi dvěma formami - elektrickou a akustickou. Přeměna elektrické energie na akustickou se nazývá „transmit“, čili vysílání. Zvukové vlny jsou generovány působením elektrického napětí na krystal, který transdukuje elektrický impuls mechanickou deformací, čímž se vytváří vlnoplochy. Zvukové vlny procházejí tělem, než se setkají s reflektory, což jsou v tomto případě tkáň, krev, kosti, atd. Odražené zvukové vlny se v podobě „ozvěň“ vrátí zpět do převodníku, kde jsou převedeny zpátky na elektrickou energii. Tento proces se nazývá „receive“ neboli „obdržení“ (Obr. 1).

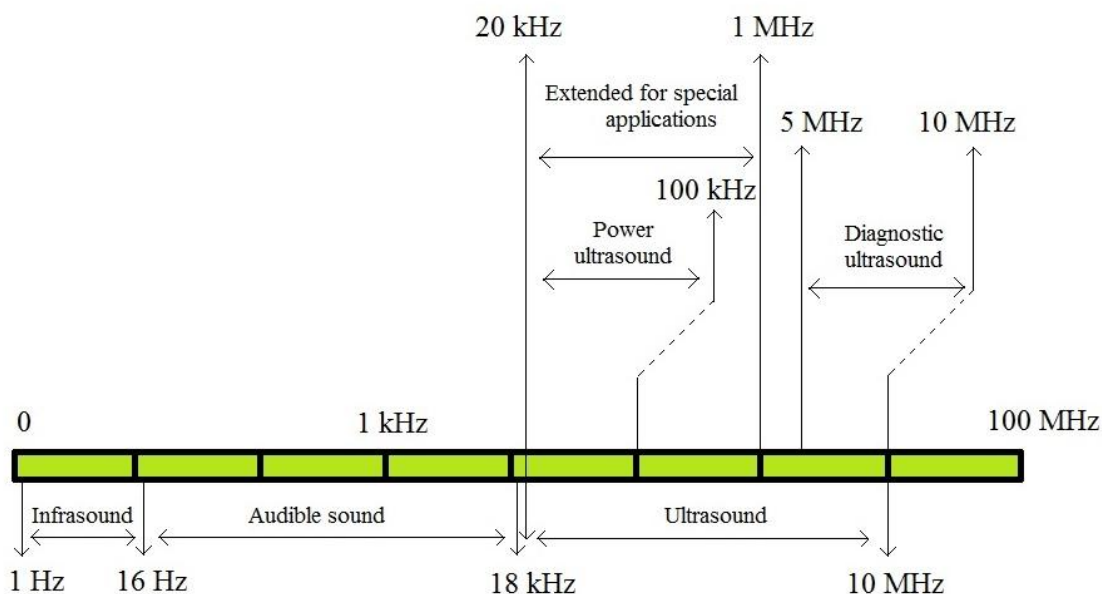


Obr. 1: Transmit – přeměna elektrické energie na akustickou. Receive – proces, kdy se odražené zvukové vlny vrací zpět do převodníku, kde jsou převedeny zpátky na energii elektrickou [5]

Význam objevu procesu změny elektrické energie na akustickou je takový, že se vzniklými obrazovými snímky je možné manipulovat pomocí elektronických obvodů, které se dají relativně jednoduše navrhnout a sestavit. Výzkum používání piezoelektrického efektu, nejen pro potřeby vojenské, pokračoval do 20. století, kdy byl poprvé tento efekt prakticky využit v druhé světové válce. V tomto časovém horizontu udělali též pokrok i vývojáři ultrazvuku v lékařství. První známá aplikace ultrazvuku v medicíně detekovala posuny střední linie mozku v režimu bez zobrazování. Dva rakouští bratři, Karl (neurolog) a Friedrich (fyzik) Dussikové, přenášeli zvukové vlny přes pacientovu hlavu, kde na jedné straně hlavy umístili vysílač a na druhou stranu přijímač. Byl detekován generovaný zvuk [3]. Vývoj ultrazvukového zobrazování pokračoval stálým tempem přes rok 1970, kdy byly vyvinuty první real-time skenery. Tyto zařízení napomohly k pokrokům v elektronice, které umožnily rozvoj digitálních skenovacích převodníků [6]. V dnešní době již existují přenosné ultrazvuky.

2.1.2 Fyzikální princip ultrazvuku

Ultrazvukem se rozumí mechanické kmity, jejichž frekvence je vyšší než horní frekvenční mez slyšitelnosti lidského ucha, tedy vyšší než 20 kHz. Kmítočtový rozsah nižší než 16 Hz připadá na infrazvuk. Pro diagnostické účely se však v medicíně používá vysokých frekvencí v oblasti řádově 5–10 MHz [7]. Podrobnosti o frekvenčním rozsahu ultrazvukových vln lze vyčíst z Obr. 2.



Obr. 2: Frekvenční rozsah zvukových vln. 1–16 Hz infrazvuk; 16–18 kHz slyšitelný zvuk; vyšší než 18 kHz ultrazvuk [7]

Ultrazvukové kmity se v prostředí šíří formou vlnění. V měkkých tkáních a v tekutinách lidského těla se šíří formou vlnění podélného (longitudinálního), naopak příčným (transverzálním) vlněním se ultrazvuk šíří v kostech. U podélného vlnění kmitají částice ve směru šíření vlny, zatímco u příčného ve směru kolmém na směr šíření vlny. Zdrojem ultrazvukových kmitů pro diagnostické účely jsou převážně elektricky buzené piezoelektrické měniče. Každé prostředí, ať už se jedná o živé či neživé, je z hlediska akustického

charakterizováno několika parametry. Nejdůležitějšími z nich jsou fázová rychlost, tedy rychlost šíření ultrazvuku daným prostředím, akustická impedance a útlum. Diagnostická informace je získána zachycením, zpracováním a zobrazením ultrazvukových signálů, odražených od daných tkáňových rozhraní [8].

Útlum je zeslabení intenzity ultrazvukové vlny, která se vyjadřuje pomocí koeficientu zeslabení v jednotkách $\text{dB}\cdot\text{cm}^{-1}$ [4]. Množství akustické energie odražené na akustickém rozhraní odpovídá rozdílu akustických impedancí tkání, tvořících toto rozhraní. Útlum je závislý na kmitočtu ultrazvukových kmitů a hraje důležitou roli při volbě zobrazovací frekvence [8].

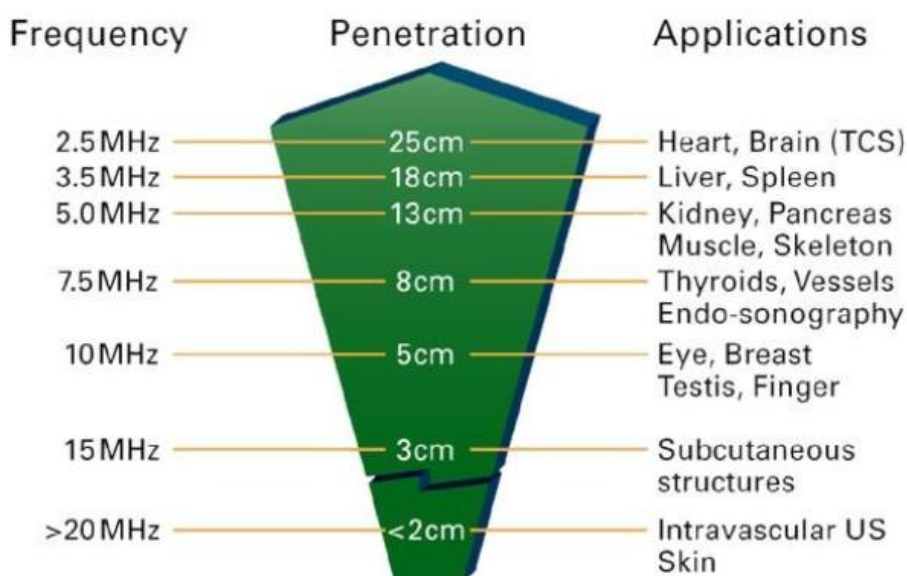
Fázová rychlost zvukových vln je závislá na vlastnostech prostředí, kterým se šíří. Na rychlosti šíření vln pak závisí vlnová délka a kmitočet.

Akustická impedance se dá vyjádřit vzorcem (1), kde c je rychlost šíření vlny v daném prostředí a ρ je hustota prostředí. Jednotkou je pak $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. V Tab. 1 můžeme vidět přehled základních akustických parametrů vybraných tkání. Hloubka průniku je též závislá na zvolené frekvenci (Obr. 3) [9].

$$Z = c \cdot \rho \quad (1)$$

Tab. 1: Základní akustické parametry vybraných tkání [10]

Tkáň	c [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	ρ [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]	Z [$10^6 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	α při 1 MHz [$\text{dB}\cdot\text{cm}^{-1}$]
sval	1580	1041	1,645	0,57
tuk	1430	928	1,327	0,60
mozek	1562	1035	1,617	0,58
kost	3198	1990	6,364	3,54
srdce	1554	1060	1,647	0,52
játra	1578	1050	1,657	0,45
slezina	1567	1054	1,652	0,40
krev	1584	1060	1,679	0,14



Obr. 3: Hloubka penetrace při určité hodnotě frekvence [9]

2.1.3 Akustické vlastnosti krve

Krev je nehomogenní kapalina. Tvoří ji suspenze krevních buněk v krevní plazmě. V 1 mm³ krve se nachází přibližně 5 milionů červených krvinek, 8 tisíc bílých krvinek a 350 tisíc krevních destiček. Červené krvinky můžeme považovat za součást krve, která je zodpovědná za interakci s ultrazvukem a to díky jejich hojnému počtu [11].

2.1.4 Terapeutické využití

V léčbě pomocí ultrazvuku se používá nejčastěji ultrazvuk s frekvencí v řádu MHz a intenzitou 0,5–3 W·cm⁻² při době expozice 10 minut. Zařízení se skládá ze zdroje vysokofrekvenčního napětí (oscilátor) a ozařovací hlavice, ve které se nachází piezoelektrický měnič. Kovovou membránou uzavřená hlavice se pak přikládá na ozvučovaná místa potřená parafinovým olejem. Olej se používá k tomu, aby mezi kůží a hlavicí nebyla vrstva vzduchu.

Léčebné účinky tkví v hloubkovém tepelném účinku, v tišení bolesti přímými i nepřímými mechanismy, ve spasmolytickém účinku (uvolnění dlouhotrvajícího lokálního zvýšení svalového napětí), v tlumivém účinku na přenos nervových vzruchů (relaxace) a ve zvýšení místního krevního oběhu.

Mechanických kmitů s vysokou frekvencí se také používá v zubním lékařství k odstraňování zubního kamene pomocí magnetostrikčního generátoru. Amplituda kmitů je velmi nízká, pohybuje se v řádech setin milimetrů [12].

2.1.5 Ultrazvukové snímkování

Ultrazvuk tedy poskytuje obraz měkkých tkání, jejich strukturu, pohyblivost a průtok krve v reálném čase. Výsledný obraz může být zobrazený standardně ve 2D, pokročilé metody umožňují i prostorové zobrazení 3D, případně prostorové zobrazení v reálném čase 4D, záleží na konkrétním typu ultrazvuku. Ultrazvuk nevyžaduje stínění či různá bezpečnostní opatření, na rozdíl od srovnatelných metod, nevyžaduje ani ozáření pacienta vysokoenergetickým či ionizovaným zářením. V současnosti nejsou známa žádná rizika nebo vedlejší účinky ultrazvukových vyšetření [2]. Ultrazvukové vlny jsou odraženy plynným prostředím, metoda tedy není vhodná pro zobrazování střev, kde se častěji využívá počítačová tomografie. Obtížně také pronikají kostmi, na jejichž zobrazení je vhodnější využít rentgen.

Ultrazvuk byl dříve uplatňován jako nástroj pro tepelnou ablaci nádorů. V dnešní době se využívá jeho netermálních jevů, zvláště v medicínských aplikacích pro cílenou distribuci léčiv [13].

Snímky z ultrazvuku obvykle nemají ostrý kontrast, protože zobrazovanou oblast zastíňují některé tkáně. To je krajně nežádoucí, a proto se tento problém řeší pomocí ultrazvukových kontrastních látek pro lékařské ultrazvukové zobrazování. Kontrastní látky jsou tvořeny různými materiály. Různé druhy kontrastních látek mohou mít odlišné složení a každá může pracovat na jiném principu.

Ultrazvuk může zvýšit účinky transdermální distribuce léčiv, protinádorových léčiv a účinky v genové terapii [13].

2.1.6 Dopplerovská sonografie

Dopplerovská sonografie umožňuje sledovat rychlost a směr pohybu krve v krevním řečišti. Využívá se ke sledování poruch v krevním řečišti – blokad (sraženiny), zúžení cév, vrozených malformací. Existují dva typy dopplerovské sonografie. První typ se nazývá Color

Doppler – převádí informaci o rychlosti a směru toku krve do barevné mapy. Druhý typ nese název Power Doppler – neumožňuje sledovat směr toku krve, poskytuje ale lepší rozlišovací schopnost při popisu toku krve, zvláště uvnitř jednotlivých orgánů.

Frekvence vlny vyslané pohybujícím se objektem [14, 15] je vyjádřena vztahem

$$f_e = f_0 \left(1 \pm \frac{v}{c} \right) \quad (2)$$

kde f_e je frekvence pozorované vlny, f_0 frekvence vlny generované, v je relativní rychlost pohybu zdroje ve směru k přijímači a c je rychlost šíření vlny. Při odrazu od pohybujícího se objektu dochází ke změně frekvence odrážející se vlny

$$f_e = f_0 \left(1 \pm 2 \frac{v \cdot \cos \varphi}{c} \right) \quad (3)$$

kde f_e je frekvence odražené vlny, f_0 frekvence vlny dopadající, v je rychlost pohybu překážky a c je rychlost šíření vlny. Rozdíl mezi frekvencí vyslané a přijaté vlny nazýváme Dopplerova frekvence

$$f_D = f_e - f_0 = \left(\pm 2 f_0 \frac{v \cdot \cos \varphi}{c} \right) \quad (4)$$

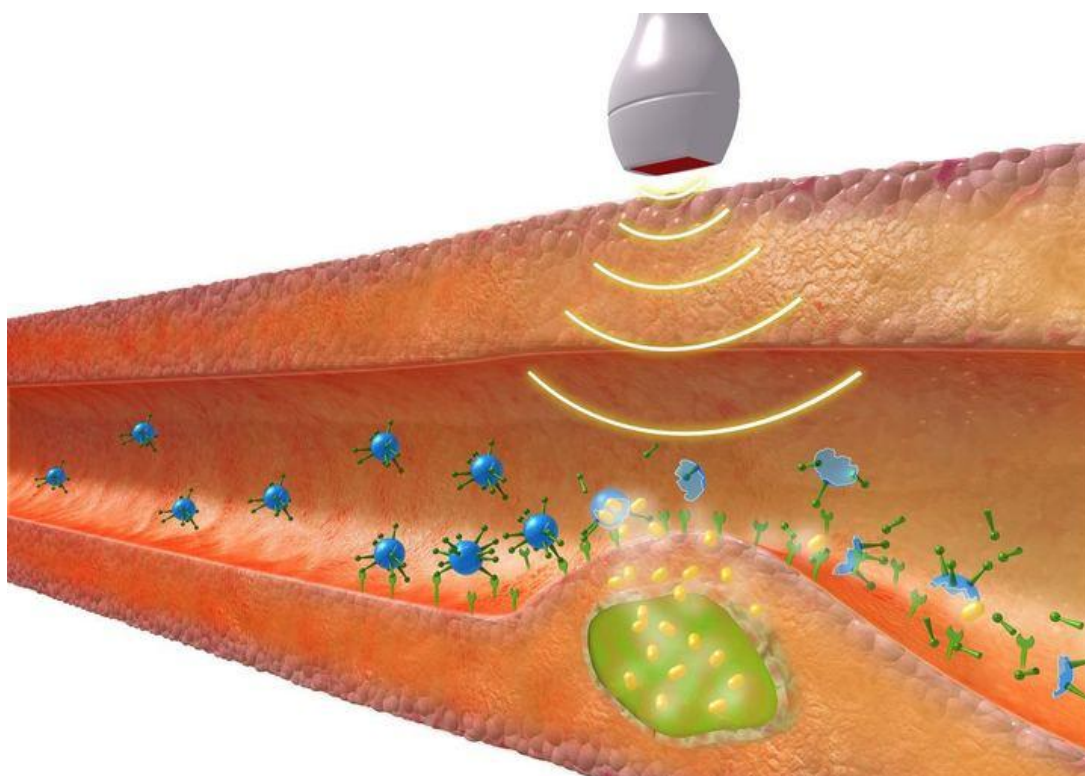
, přičemž rychlost pohybujícího se objektu je potom

$$v = \pm f_D \cdot \frac{c}{2 f_0 \cos \varphi} \quad (5)$$

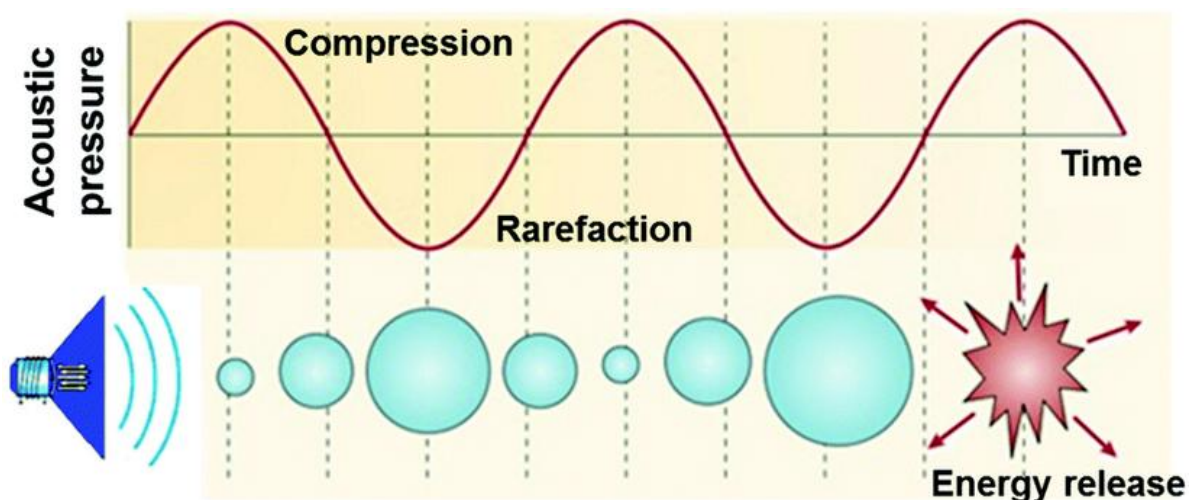
2.1.7 Vlastnosti ultrazvuku

Působením ultrazvuku se mohou látky dostávat do různých tkání, sraženin či do kůže. Ultrazvuk může mít přímý vliv na membrány, tím se myslí změna propustnosti membrán nebo absorpce léčiv do buněk, popř. tkání. Vlivy ultrazvuku můžeme dělit na primární, které jsou způsobeny mechanickými složkami ultrazvukového pole, a sekundární, způsobené jinými druhy energie, ve které se mechanická energie v průběhu absorpce transformovala (tepelná, chemická, elektrická energie). Pokud je kritériem způsob interakce, pak je možné mluvit o působení přímém, což je vyvolané účinnými faktory během aplikace ultrazvuku, a nepřímém, zprostředkovaném fyzikálně-chemickými změnami prostředí [16].

Studie prokázaly, že se použitím vysokofrekvenčních ultrazvukových vln v kombinaci s kontrastními látkami může zvýšit intracelulární dodávání léků do buněk a tkání. Působením ultrazvuku se mikrobubliny kontrastních látek střídavě smršťují a rozšiřují v průběhu jednotlivých fází střídání vyšších a nižších tlaků ultrazvukových vln. Mikrobubliny tedy oscilují a předpokládá se, že hrají významnou roli při uvolňování a absorpci léčiv (Obr. 4) [17]. Mikroproudění vytváří silné vířivé proudy v médiu, k těm také přispívá difúze uvolněného plynu mikrobublin. Ty rychle zvyšují svůj objem díky vyšším frekvencím ultrazvuku a vyšším tlakům, vzápětí kolabují a dělí se na fragmenty. Tyto jevy jsou často doprovázeny vznikem nárazových vln v okolním prostředí a říká se jim kavitace (Obr. 5).



Obr. 4: Uvolnění léčiva působením ultrazvuku [17]



Obr. 5: Akustická kavitace vyvolaná ultrazvukem [7].

2.2 Mikrobubliny

Kolem roku 1968 se datuje objevení mikrobublin, které jsou použitelné pro sonografii [18]. První údaje o použití mikrobublin jako kontrastních látek pro účel zlepšení kvality ultrazvukového signálu se datují od 60. let 20. století [19]. Tímto tématem zabýval Dr. Raymond Gramiak, který působil na Rochesterské univerzitě v USA. Začal tvorbou echografických jednotek připojených na osciloskop, aby demonstroval obrazy v ultrazvukovém B-modu a M-modu. Získaná data porovnal s echokardiografickými nálezy z klinické praxe od kardiologů. Jeho spolupráce s kolegy z elektrotechniky vedla k použití

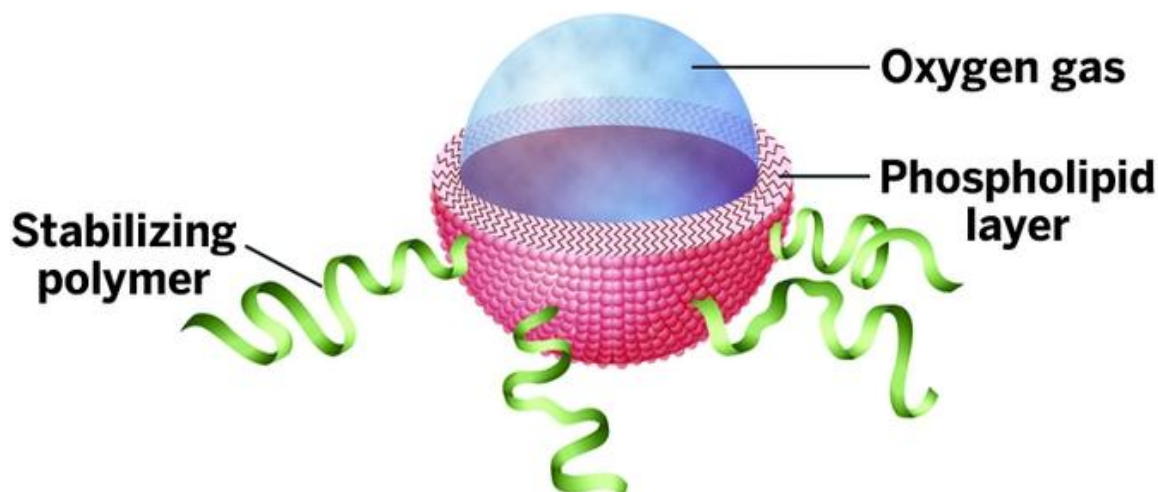
počítačů pro tvorbu a analýzu ultrazvukových snímků. Propagoval mikrobubliny jako ultrasonografické kontrastní látky pro kardiologické vyšetření.

Mikrobubliny jsou komplexy, které jsou svou velikostí poměrně malé. Jejich velikost je obvykle srovnatelná s velikostí červených krvinek, které mají v průměru kolem 1–10 μm , ale mohou dosahovat i menších rozměrů a to desítek až stovek nanometrů. Samozřejmě musí také být, aby byly biodegradabilní a biokompatibilní. Strukturu mikrobublin můžeme vidět na Obr. 6. Skládá se z pouzdra, jehož chemické složení bývá různé, a z kulovitých dutin plněných plynem. Mikrobubliny jsou po zavedení do cévního systému v prostředí lidského těla méně odolné a méně stabilní vůči biologickým tekutinám, zvláště při použití jako kontrastní látky či nosiče léčiv. Stabilita mikrobublin nejvíce závisí na okolním prostředí. Hlavní faktory, které ovlivňují stabilitu mikrobublin, jsou teplota a tlak. Zvýšený tlak, který se vyskytuje zejména v srdci a v cévách při srdeční systole, představuje vyšší požadavky na stabilitu mikrobublin. Nesmí být také opomenuta koncentrace rozpuštěných plynů, které mají vysoké povrchové napětí a koncentrační gradient na rozhraní kapalina-plyn. Důležitou roli také hraje složení plynu uvnitř mikrobubliny a jeho rozpustnost [20]. Podle plynu nacházejícího se uvnitř a stability v krevním řečišti lze vývoj mikrobublin jako kontrastních látek rozdělit do třech generací [21].

První generace mikrobublin obsahovala uvnitř své struktury obyčejný vzduch. Vzduch má ale jednu nevýhodu a to takovou, že jeho rozpustnost v krvi je poněkud vysoká, tudíž docházelo k jeho rychlému odfiltrování plicemi. To se velmi odráží v životnosti mikrobublin v krvi, která je díky vzduchu pouze několik sekund. Přidáním povrchově aktivní látky, která se naváže na povrch mikrobubliny, lze tuto dobu prodloužit. Zástupcem této první skupiny je protřepaný fyziologický roztok, Albunex[®], Levovist[®] či Sonazoid[®] [22, 23].

Druhá generace používá plyny s těžšími molekulami, které většinou obsahují prvek fluor. Jedná se především o perfluorované uhlovodíky nebo fluorid sírový. Použitím těchto plynů místo vzduchu se předpokládá delší doba života mikrobubliny v krevním oběhu, doba však nepřevyšuje 5 minut. Tyto plyny mají nižší rozpustnost v krvi a zvyšují odrazivost ultrazvukových vln. Mikrobubliny jsou tak stabilnější při vyšším tlaku. Využitím povrchově aktivních látek opět dochází k prodloužení životnosti, stability mikrobublin a také ke snížení jejich velikosti. Příkladem mikrobublin druhé generace jsou komerční přípravky jako je SonoVue[®], Optison[®], SonoGen[®] [22, 23].

Třetí generace mikrobublin používá fyziologicky inertní a málo rozpustné plyny, což zajišťuje životnost mikrobublin v krevním řečišti vyšší než 5 minut. Lze je využít k zobrazení téměř všech orgánů lidského těla, které jsou pomocí ultrazvuku zobrazitelné. Zároveň by mohly spolu s některými zástupci z druhé generace sloužit jako přenašeče léčiv. Příkladem mikrobublin třetí generace je např. přípravek EchoGen[®] [22, 23].



Obr. 6: Struktura mikrobubliny, kde je ke stabilizaci použit polymer [24]

Menších rozměrů mikrobublin je tedy především docíleno změnou chemického složení pouzdra mikrobublin navázáním vhodného komponentu (polymery, lipidy, surfaktanty) a právě použitím méně rozpustných plynů. Některé vlastnosti plynů, které se používají k výrobě mikrobublin a emulzí, jsou znázorněny v Tab. 2.

Tab. 2: Některé fyzikální vlastnosti plynů používaných pro výrobu mikrobublin [20]

Název sloučeniny	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	Teplota varu [°C]	Rozpustnost ve vodě
Dusík (N ₂)	28	-195,79	mírně / zředka
Fluorid sírový (SF ₆)	147,07	-82,7	mírně / zředka
Perfluoroethan (C ₂ F ₆)	138,01	-78,1	-
Perfluoropropan (C ₃ F ₈)	188,02	-36,7	nerozpustný
Perfluorobutan (C ₄ F ₁₀)	238,04	-2	nerozpustný
Perfluoropentan (C ₅ F ₁₂)	288,05	29	nerozpustný
Perfluorohexan (C ₆ F ₁₄)	338,06	59–60	nerozpustný
Perfluoroacetyl bromid (C ₈ F ₁₇ Br)	499	143	nerozpustný

2.2.1 Příprava mikrobublin

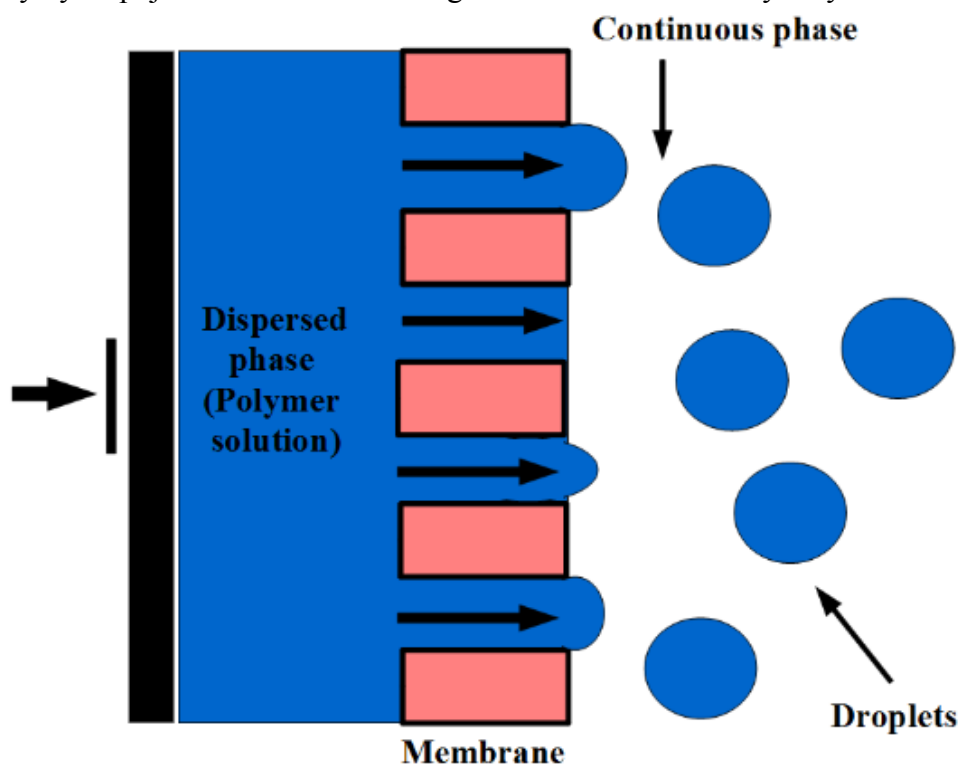
První zapouzdřené mikrobubliny byly připraveny provzdušňováním vzorku pacientovy krve, přičemž jde stále o nejjednodušší a běžně používanou metodu pro přípravu mikrobublin. Dnes se k přípravě mikrobublin používá buď mechanická třepačka, ultrazvuk s nízkou frekvencí a vysokou intenzitou, koaxiální elektrohydrodynamická atomizace (CEHDA), mikrofluidní zařízení (T-junction), emulgace při vysoké smykové rychlosti nebo membránová emulgace.

Při sonifikaci se sonifikuje směs lipidů suspendovaných v roztoku, který obsahuje špatně rozpustný plyn potřebný pro bublinové jádro. Při tomto způsobu přípravy vznikají mikrobubliny se středním průměrem mezi 1–5 μm a koncentrací přibližně 100–1000 bublin na 1 ml. Možností je také vzorky hydratovat a zahřívát umístěním do lázně po dobu 1,5 hodiny, dokud se nerozptýlí všechny agregáty a roztok nebude mléčný. Lze také použít

techniku, kdy se míchá lipozomální disperze při 4500 kmitech za minutu po dobu 20 sekund za použití přístroje CapMixTM (zubní amalgamátor) a přifukuje se potřebný plyn. Při sonifikaci a míchání nám nevznikají mikrobubliny s definovanou velikostí, velikost se může pohybovat od stovek nanometrů po desítky mikrometrů [25].

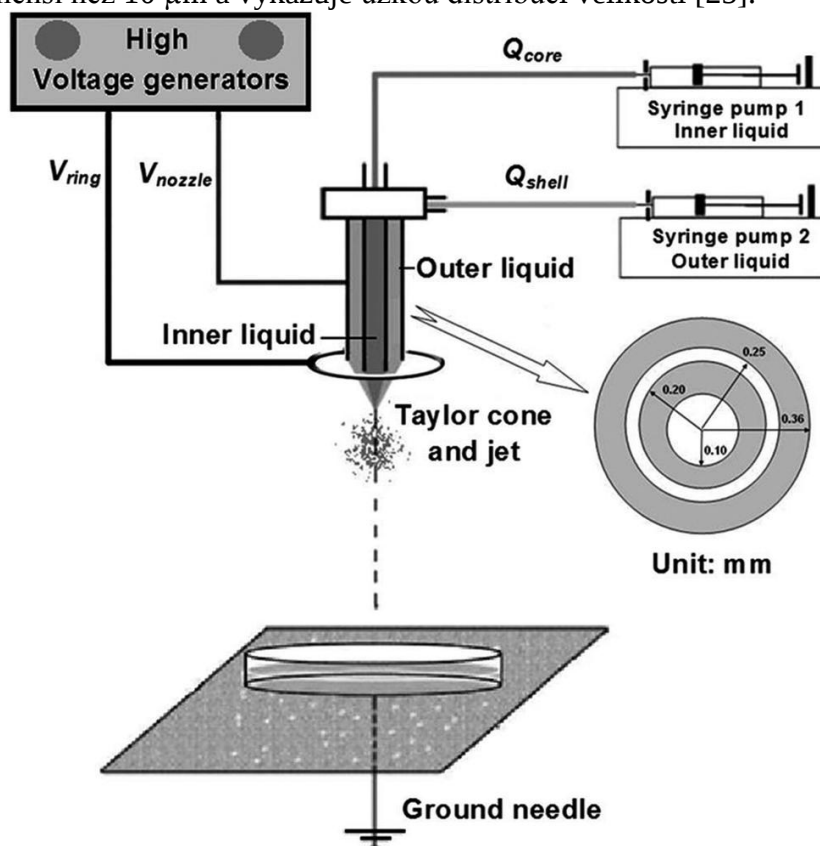
Emulgace za vysoké smykové rychlosti je metoda používaná především k výrobě mikrobublin potažených vybraným polymerem. Nejprve se polymer za stálého míchání rozpustí ve vhodném rozpouštědle na vodnou suspenzi při vysoké smykové rychlosti s použitím jiné tekutiny, která je nemísitelná jak s polymerem, tak s vodou a slouží jako stabilizátor. Biologicky odbouratelné polymery, které se nejčastěji k tomuto účelu používají, jsou kopolymery polyethylenglykolu. Následně se organické rozpouštědlo odpaří. Mikrobubliny se promyjí třikrát deionizovanou vodou a poté se oddělí pomocí centrifugace. Značný vliv na cílené dodání léčiva hraje složení a morfologie mikrobublin, protože uvolňování účinných látek závisí na velikosti, rychlosti degradace a vnitřní struktuře, včetně pórovitosti. Velikost výsledných mikrobublin závisí na velikosti kapiček původně přítomné emulze a na koncentraci polymeru v těchto kapičkách. Tato metoda přípravy je vhodná pro mnoho proteinů, včetně některých protilátek a enzymů, které mohou být aktivovány zvýšenou teplotou nebo působením ultrazvuku [25].

Membránová emulgace (Obr. 7) je alternativní způsob ultrazvuku a smykového míchání. Emulze se vyrábí protlačením složek přes porézní membránu, někdy i opakovaně. Tato metoda může být použita k produkci monodisperzních kapiček kapaliny, které jsou následně zpracovány za vzniku mikrobublin. Další možnost je vytvořit mikrobubliny přímo za použití plynu jako dispergované fáze. Metoda tedy nabízí větší kontrolu nad velikostí mikrobublin. Ideální by bylo spojení membránové emulgace s ultrazvukem a smykovým mícháním [25].



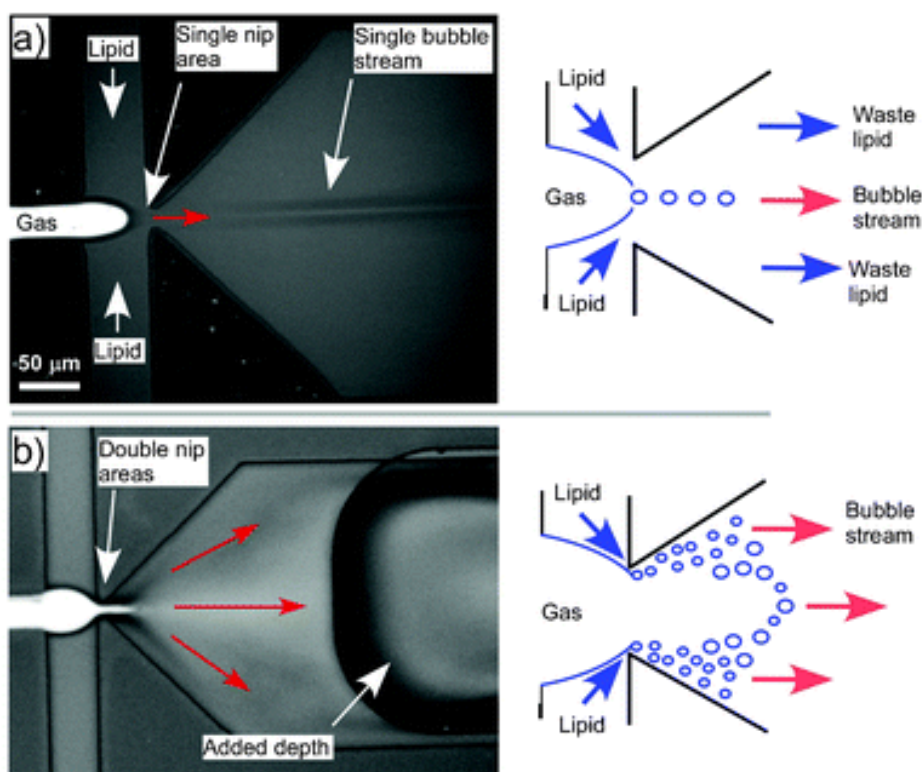
Obr. 7: Schéma mikrobublin produkovaných membránovou emulgací [25]

V koaxiálním elektrohydrodynamickém rozprašování (CEHDA) jsou přes dvě koncentricky umístěné kapilární jehly, které jsou vystaveny elektrickému potenciálu, čerpány dva různé materiály (Obr. 8). K vytvoření mikrobublin se čerpá přes vnitřní jehlu plyn, zatímco přes vnější jehly je čerpána kapalina. Elektrohydrodynamické rozprašování má k dispozici tři režimy: odkapávání, soukání a probublávání. Tyto režimy jsou ovlivněny vlastnostmi kapalin jako je povrchové napětí, viskozita, elektrická vodivost, hustota, relativní permitivita a parametry procesu jako je průtoková rychlost a aplikované napětí. První, kdo použil tuto metodu k přípravě mikrobublin byl Farook a spol. [26] Připravili suspenzi mikrobublin glycerol-vzduch v režimu probublávání a oznámili, že velikost mikrobublin v suspenzi je v průměru menší než 10 μm a vykazuje úzkou distribuci velikosti [25].



Obr. 8: Příprava mikrobublin pomocí koaxiální elektrohydrodynamické atomizace [27]

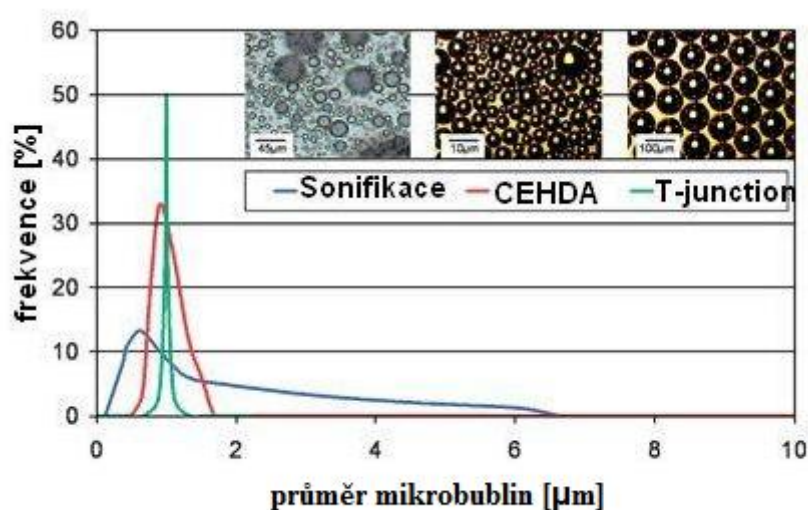
Pomocí mikrofluidního zařízení (T-junction) lze také připravit mikrobubliny (Obr. 9). Používají se buď měkké litografické techniky, nebo mechanicky smontované celky, které se skládají z pevných kapilár v polymerním bloku uspořádaných do tvaru T-křižovatky. Mikrofluidní zařízení spojuje proudy plynu a kapaliny tryskou o šířce několika mikrometrů. Poté dochází ke snížení tlaku. T-křižovatka je použita z důvodu své jednoduchosti a vysoké účinnosti pro výrobu monodisperzních mikrobublin. Mikrobubliny jsou generovány v jediném kroku, čili jedno zařízení může být využito k výrobě mikrobublin s různou velikostí na základě následujících parametrů: řízení průtoku kapaliny, tlaku vzduchu, viskozita kapalné fáze. Tento způsob přípravy vytváří monodisperzní mikrobubliny, bohužel však na úkor jejich nízkého počtu [25].



Obr. 9: Mikrofluidní zařízení: a) Příprava monodisperzních bublin v režimu znázorňující jednotnou lisovací oblast v trysce zařízení, b) Tvorba mikrobublin (polydisperzních) při vyšší rychlosti označujících tvorbu hned po proudu od trysky [25].

Další možností je příprava mikrobublin pomocí mikrospreje, který dokáže vytvořit vysoké koncentrace mikrobublin klinicky významnějších ve srovnání s tradičními monodisperzními mikrobublinami. Koncentrace mikrobublin produkovaných mikrosprejem může dosahovat až 10^{10} mikrobublin v 1 ml fyziologického roztoku [28].

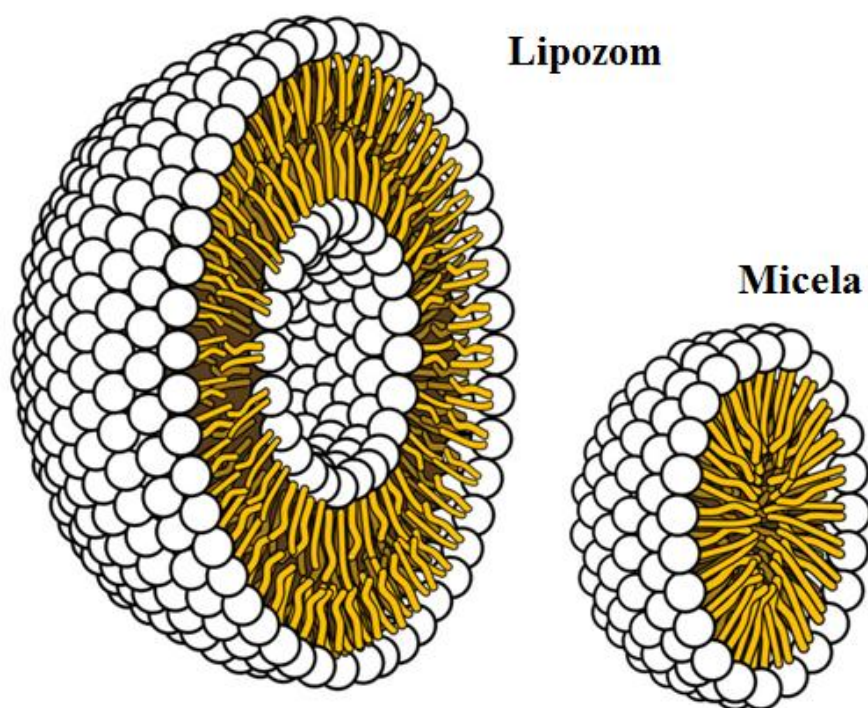
Různé způsoby přípravy mikrobublin pak ovlivňují výslednou distribuci velikosti mikrobublin (Obr. 10) [19].



Obr. 10: Srovnání velikostí částic mikrobublin připravených za použití ultrazvuku, koaxiální elektrohydrodynamické atomizace (CEHDA) a mikrofluidního zařízení (T-junction) [19]

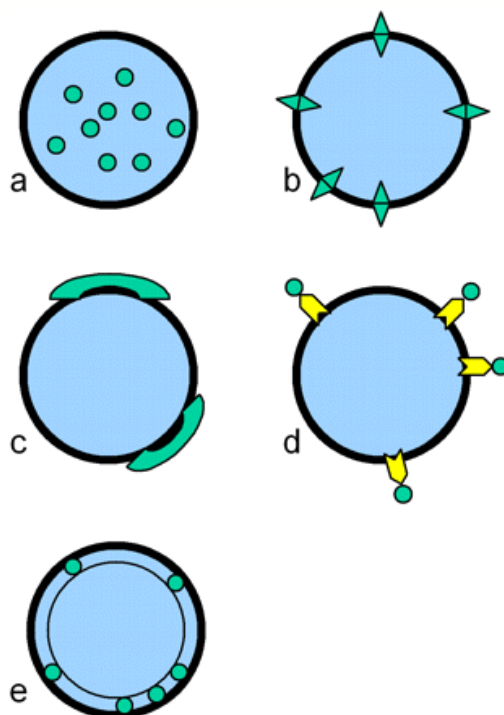
2.2.2 Solubilizace mikrobublin

Jednou z významných vlastností mikrobublin je schopnost solubilizovat určité látky. Souvisí s jejich strukturou, která se velice podobá struktuře micelárních koloidů nebo lipozomů, jen s tím rozdílem, že uvnitř takových struktur se nenachází plyn. Zda bude mít mikrobublina strukturu micely či strukturu lipozomu záleží na použitých chemických látkách, z nichž je vytvořena. Na Obr. 11 můžeme pro srovnání vidět strukturu lipozomu a micely. Solubilizace znamená schopnost rozpustit i takové látky, které jsou jinak v čistém disperzním prostředí velmi málo rozpustné nebo téměř nerozpustné. Solubilizace je tedy proces, kdy jsou solubilizované látky začleňovány do struktury mikrobublin [29].



Obr. 11: Rozdíl mezi strukturou lipozomu a micely [30]

Mechanismus solubilizace se mění podle molekulární struktury rozpouštěné látky. Mikrobubliny jsou schopny solubilizovat tělu prospěšné látky, jako jsou různá léčiva či vitamíny. Na mikrobubliny lze také připojit látky s magnetickými vlastnostmi, popř. plazmidy DNA. Připojení látek k mikrobublinám může být provedeno několika způsoby. Prvním možným způsobem je připojení k povrchu mikrobublin nekovalentními vazbami (Van der Waalsovy, elektrostatické, hydrofobní) nebo za pomoci ligandů. Pokud je povrch mikrobubliny pozitivně nabitý, lze na něj navázat fragmenty DNA. Další možností je navázat látku přímo do obalu mikrobubliny. Na Obr. 12 můžeme vidět různé způsoby napojení aktivních látek na mikrobubliny, způsob napojení je ovlivněn povahou samotné aktivní látky [31].



Obr. 12: Začlenění aktivních látek na/do mikrobublin: a) aktivní látky jsou solubilizovány uvnitř mikrobublin; b) začlenění aktivních látek do obalu mikrobubliny; c) napojení aktivních látek na obal mikrobubliny pomocí nekovalentních interakcí; d) připojení pomocí ligandů; e) začlenění do jedné z více vrstev mikrobubliny [31]

2.2.3 SonoVue®

SonoVue® je kontrastní látka druhé generace používaná v medicíně pro ultrazvukové zobrazení cév a tkání. Jedná se o disperzi obsahující miliony malých mikrobublin. SonoVue® se skládá ze dvou fosfolipidů, z nichž první je distearoylfosfatidylcholin a druhý dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný, dále pak polyethylenglykolu a kyseliny palmitové, kdy všechny tyto látky jsou rozpuštěné ve fyziologickém roztoku (0,15M roztok NaCl). Přesné složení lyofilizovaného prášku v SonoVue®, který se má posléze rozpustit ve fyziologickém roztoku, můžeme vidět na Obr. 13 [32]. SonoVue® zlepšuje echogenitu krve, využívá se v echokardiografii na diagnostické vyšetření srdce (koronární arteriálním onemocnění) a k měření rychlosti průtoku krve.

Ingredients		Marketed Formulation
Active ingredient: SF ₆		25 mg sufficient quantity to 1 atmosphere
Other ingredients: PEG, molecular weight 4000 DSPC DPPG.Na Palmitic acid		24.56 mg 0.19 mg 0.19 mg 0.04 mg
<i>Data source: Individual clinical study report</i>		

Obr. 13: Přesné složení SonoVue® [32]

Jedná se o prášek výše popsaného složení pro přípravu injekční disperze s rozpouštědlem (Obr. 14). Po rozpuštění dle pokynů obsahuje 1 ml výsledné disperze 8 μ l fluoridu sírového v mikrobublinách. SonoVue® zvyšuje přesnost při detekci nebo vyloučení abnormalit mozkových tepen a extrakraniálního průběhu karotidy nebo periferních tepen tak, že zlepšuje koeficient signál-šum Dopplerovského vyšetření. Dále zvyšuje kvalitu znázornění průtoku krve při Dopplerovském vyšetření a délku klinicky užitečného zvýšení signálu při vyšetření portální žíly. Zlepšuje také zobrazení cévního systému jaterních a prsních lézí během Dopplerovské sonografie, což vede k přesnější charakterizaci lézí.



Obr. 14: Komerční přípravek SonoVue® [33]

Kontrastní látky druhé generace používané v současné době se stabilitou několika minut hodnotí kromě velkých cév uzliny i její mikrovaskularizaci. V České republice a evropských zemích je pro toto použití schválená a registrovaná právě látka SonoVue® (Bracco Imaging SpA, Milan, Italy), u které jsou mikrobubliny plněné hexafluoridem sírovým. V několika málo publikovaných studiích s použitím této kontrastní látky byla dokumentována odlišná perfuze uzlin postižených benigním procesem od nádorově postižených uzlin. Celková přesnost metody byla 80–92,8 % ve srovnání s 55–78% přesností konvenční ultrasonografie a dopplerovského vyšetření bez použití kontrastní látky [34, 35].

2.3 Fixační média

Použití fixačního média je klíčový krok k tomu, abychom vůbec mohli mikrobubliny efektivně měřit a znázornit. Měřit je samozřejmě možné i bez jejich fixace, může však docházet k nechtěným procesům jako je vzlínání mikrobublin apod. Tímto způsobem se těmto nežádoucím procesům můžeme vyhnout. Fixace též slouží k potenciální ochraně před možným rozpadem mikrobubliny, ukončuje téměř všechny biologické pochody, zvyšuje mechanickou stabilitu a zároveň uchovává přirozený tvar mikrobubliny.

Existují různé typy fixace a to mechanická (membrány, kryometody), chemická (ethanol, formaldehyd), elektromagnetická (elektrostaticky nabitá sklíčka) a fixace změnou teploty.

Fixační média umožňují pozastavení mikrobublin a jejich měření v tzv. „stop flow“ módu. Jako fixační médium se využívá například želatina nebo polylysin. Hojně se také využívá zalití syntetickou pryskyřicí. Lze také využít agar či směs glycerolu a vody v poměru 20:80 a další. Níže následují příklady různých fixačních médií pro využití v měření fluorescenčních vlastností vzorku. Většina zmíněných příkladů je založena z větší části na bázi glycerolu.

Prvním příkladem je použití PPD-glycerol. Použití parafenyldiaminu je vhodné pouze v případě, že hodnota pH je nižší než 8,0, v jiném případě bychom viděli pouze vyblednutí a pozadí. Pro udržení pH vyššího než 8,0 se využívá fosfátový pufr, tedy směs 0,1 až 0,01% p-fenyldiamin; 50–70% glycerol v PBS; 50% glycerol v 20mM fosfátovém pufru (pH 8,5). Meta-fenyldiamin reaguje v přítomnosti slabé kyseliny za vzniku žluto-fluoreskující bazofilní skvrny. Tomuto jevu je třeba se vyhnout [36].

Dalším příkladem je použití směsi 2,5% roztoku DABCA, 10% roztoku polyvinylalkoholu (PVA), 5% roztoku glycerolu a 25mM tris pufru ((tris(hydroxymethyl)aminometan)) o pH 8,7. Vzhledem k tomu, že směs při kontaktu se vzduchem degraduje, bychom směs neměli znovu zamrazovat. Po rozmrazení směsi by se měla ihned použít, přebytek zlikvidovat [37].

V neposlední řadě lze také využít NPG-Glycerol, který se připravuje smícháním 2% n-propyl-galát, 49% fosfátový pufr a 49% glycerol, kde by měla mít výsledná směs hodnotu pH = 7,4.

Dále je možné použít směs DABCO-Glycerol: 1% roztok DABCA v 90% roztoku glycerolu, to vše ve fosfátovém pufru. Možné jsou i jiné varianty přípravy a to změnou poměrů zastoupených látek a změnou koncentrací [36].

2.4 UV-VIS molekulová absorpční spektrometrie

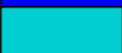
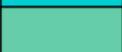
V molekulární absorpční spektrofotometrii je měřeno množství absorbovaného ultrafialového (UV) nebo viditelného (VIS) záření zředěnými roztoky molekul (v rozsahu 200 až 800 nm). Tato metoda zjišťuje, do jaké míry, a při kterých vlnových délkách roztok světlo pohlcuje. To samozřejmě závisí na struktuře sloučeniny [38].

Principem spektrofotometrie je interakce mezi elektrony umístěnými ve vazebných případně nevazebných orbitalech molekuly s fotony UV-VIS záření. Energie tohoto záření excituje elektrony v těchto orbitalech do vyšší energetické hladiny, přičemž dojde k absorpci určitého množství záření o konkrétní energii a tedy i o konkrétní vlnové délce. Absorbují se vždy ta část elektromagnetického záření, která svou energií odpovídá přechodu elektronu ze základní hladiny na excitovanou hladinu. Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra. Elektronové absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce. Fotony záření z ultrafialové a viditelné oblasti elektromagnetického spektra jsou dostatečně energetické, aby excitovaly elektronové stavy a tím spíše i vibrační a rotační stavy molekuly. Výsledné absorpční spektrum látky je pásové, protože při jeho registraci jednotlivé diskrétní přechody zpravidla splývají. Pouze při měření v plynné fázi lze v absorpčním spektru rozlišit jemnou vibrační a někdy i rotační strukturu a v roztocích rozpouštědel dostaneme soubory širších pásů, protože molekuly sledované látky již nejsou izolovány, ale solvatovány rozpouštědlem, které ruší jejich volnou rotaci a ovlivňuje i vibraci molekuly látky. Vnitřní energie molekul je dána

součtem tří druhů energií, a to elektronové, vibrační, rotační. Hodnoty těchto energií nabývají jen určitých diskrétních hodnot, které odpovídají hladinám energie. Mezi základní a excitovanou elektronovou hladinou je velký rozdíl ($10^2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), menší rozdíl energií je mezi vibračními hladinami a nejmenší mezi rotačními ($10^{-2} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) [39].

V Tab. 3 můžeme vidět vlnové délky elektromagnetického záření ve viditelné oblasti spektra a jim příslušející komplementární barviva [40].

Tab. 3: Vlnové délky elektromagnetického záření ve viditelné oblasti a jim příslušející komplementární barva [40]

Absorbovaná vlnová délka [nm]	Barva látky	
400 – 435	žlutozelená	
435 – 480	žlutá	
480 – 490	oranžová	
490 – 500	červená	
500 – 560	purpurová	
560 – 580	fialová	
580 – 595	modrá	
595 – 605	zelenomodrá	
605 – 670	modrozelená	

2.4.1 Absorbance

Pokud na kyvetu obsahující roztok absorbující látky dopadá zářivý tok Φ_0 , pak prošlý zářivý tok Φ poklesne na nižší hodnotu. Pokles je zapříčiněn odražením, rozptýlením a absorpcí světla.

Absorbance je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance (dole). Pokud roztok neabsorbuje žádné záření, je hodnota absorbance nulová, hodnota transmittance je naopak jednotková.

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (6)$$

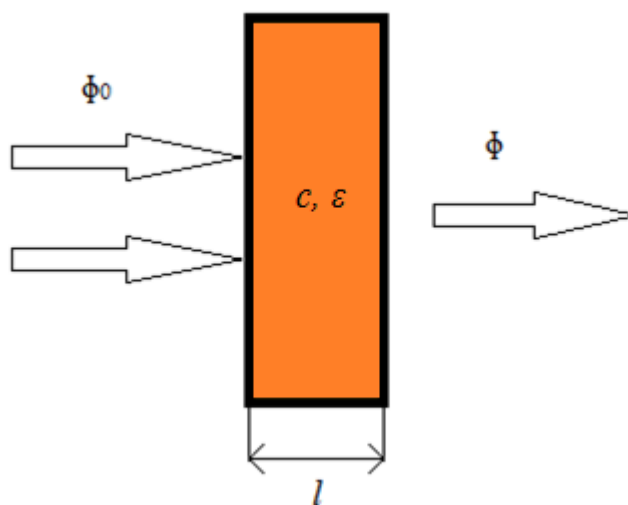
2.4.2 Lambert-Beerův zákon

Absorbance roztoku je přímo úměrná koncentraci absorbující látky ve vzorku a tloušťce absorbující vrstvy (dole). Tato závislost se nazývá Lambert-Beerův zákon. Lze ho zapsat ve tvaru

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon_\lambda \quad (7)$$

kde c představuje látkovou koncentraci, l je tloušťka vrstvy a ε_λ je molární extinkční koeficient (Obr. 15). Extinkční koeficient je veličina charakteristická pro danou absorbující látku v daném prostředí a závisí na vlnové délce, při které je prováděno měření. Pokud je v roztoku více složek, které absorbují světlo, výsledná hodnota absorbance je dána součtem jednotlivých absorbancí [41].

Lambert-Beerův zákon je limitním zákonem, jelikož platí pouze za určitých podmínek. Platí pro zředěné roztoky do koncentrací přibližně 10^{-2} M, pro monochromatické záření a pro roztoky obsahující jen jednu složku schopnou absorbovat záření [42].



Obr. 15: Znázornění absorpce při průchodu záření kyvetou se vzorkem

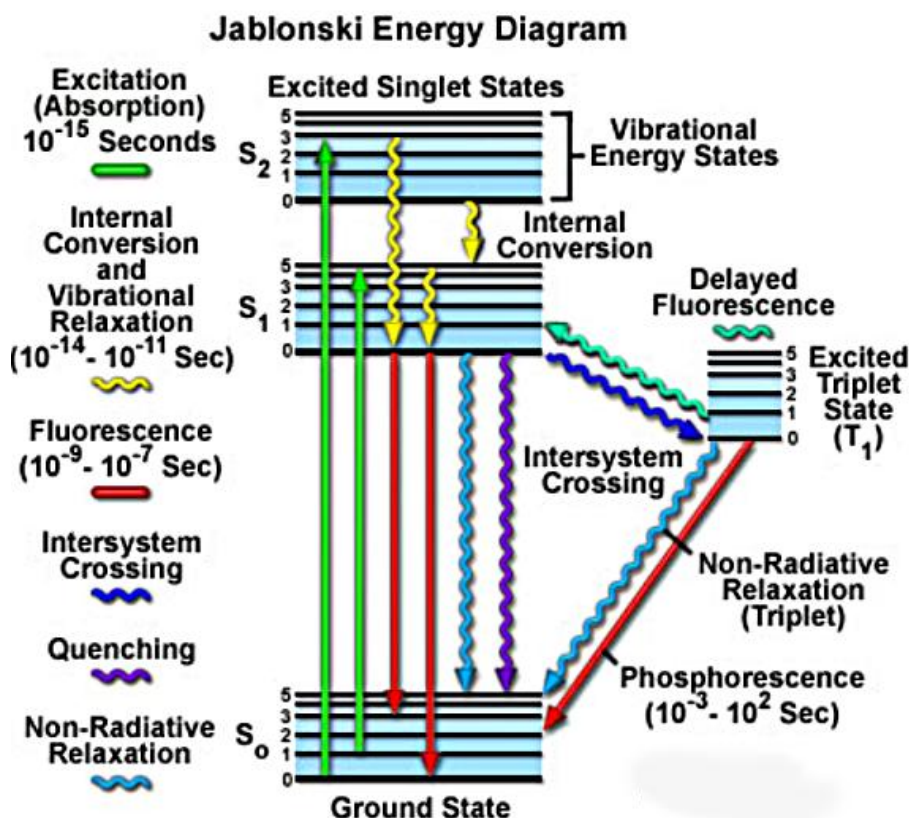
2.4.3 Absorpční křivky

Závislost absorbance na vlnové délce je znázorněna absorpční křivkou, která je kvalitativní charakteristikou látky či směsi látek. Absorpční křivky jsou ovlivňovány různými faktory. Prvním faktorem je teplota, jejíž vliv je patrný především ve zředěných roztocích, dále například iontová síla roztoku, díky které může být změněn tvar absorpční křivky. Působením rozpouštědla někdy dochází k bathochromnímu nebo hypsochromnímu efektu. U bathochromního efektu dochází k posunu vlnové délky absorpčního signálu směrem k větším vlnovým délkám a u hypsochromního efektu dochází k posunu opačným směrem. Vliv na absorpční spektra mají též tenzidy. Jejich přítomnost v roztoku způsobuje posun $\lambda_{\max}$ a vzrůst molárního extinkčního koeficientu [43].

2.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence se využívá ve většině nově vyvinutých technik. Fluorescenční mikroskopie je mocný nástroj ve výzkumu nejen v biologii, ale i v mnoha dalších vědeckých oborech. Fluorescenční technika má množství výhod. Kromě vědeckých výhod, studium fluorescenčních obrazů může někdy poskytnout nový pohled na skutečnost, jenž je obvykle pozorovateli skrytá. Standardní součástí fluorescenční mikroskopie je využití softwaru pro obrazovou analýzu, který umožňuje zpracovávat obrazový výstup kvantitativním i kvalitativním způsobem.

Pokud se na prvky sledovaného preparátu naváže chemicky nebo alespoň adsorbuje látka schopná fluorescence (fluorochrom), zvýrazní se dané prvky preparátu. Fluorescenci molekul můžeme schematicky ilustrovat na Jablonského diagramu (Obr. 16). Energie absorbovaného světla excituje elektrony do vyšších energetických hladin a přebytečné energie se může molekula zbavit vyzářením světelného kvanta.



Obr. 16: Jablonskiho diagram k vysvětlení luminiscence

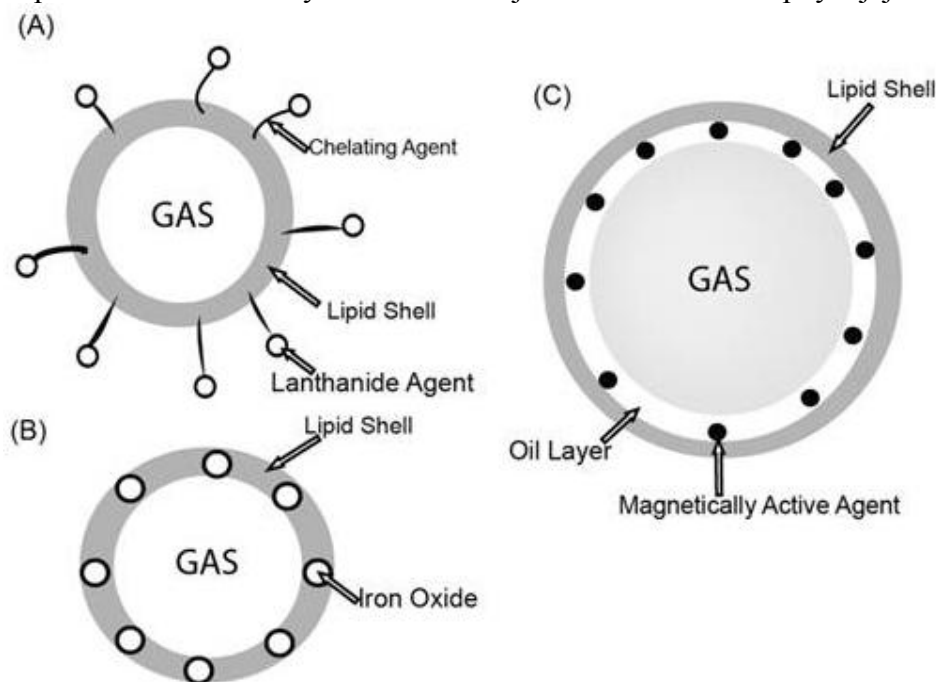
Pro fluorescenční zobrazení je potřeba fluorescenční barvivo (fluorofor, fluorochrom), což je látka schopná po ozáření světlem určité vlnové délky část světelné energie absorbovat a uvolňovat světlo o delší vlnové délce. Struktury obsahující fluorochromy září v obraze fluorescenčního mikroskopu v různých barvách na temném pozadí. Dále světelný zdroj, který musí emitovat dostatečně intenzivní záření v ultrafialové a viditelné oblasti. Nejčastěji se používají vysokotlaké rtuťové výbojky, xenonové výbojky a halogenové žárovky. Nedílnou součástí je soustava filtrů seřazených do speciální „filtrvé kostky“, kde excitační filtr propouští pouze světlo, které je potřebné k excitaci fluorochromu, ostatní světlo pohlcuje. Další filtr – dichroické zrcadlo – slouží k oddělení excitačního a fluorescenčního (emitovaného) světla. Umístí-li se do optické dráhy v úhlu 45° , kratší vlnové délky odráží a delší jím prochází. Jeho hlavní předností je velká efektivita oddělení excitačního a fluorescenčního světla. Poslední filtr – bariérový – propouští pouze fluorescenční světlo, čímž poskytuje černé pozadí k fluorescenčnímu obrazu. Navíc umožňuje z fluorescenčního spektra nechat projít pouze jeho část. Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluorochromu je základem úspěšného pozorování fluorescenčním mikroskopem. Fluorescenční mikroskopie je velmi cenným nástrojem při studiu buněk a buněčných částí mikroorganismů. Použitím vhodných fluorochromů je možné rozlišit jednotlivé buněčné prvky a také rozlišit živé a mrtvé buňky [44].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Geis a spol. se ve svém článku [45] zaměřují na aktuální studie in vivo a terapeutické přístupy destrukce mikrobublin pomocí ultrazvuku. Při rozbití mikrobubliny ultrazvukem dochází v její bezprostřední blízkosti ke zvýšení permeability buněčné membrány, což umožňuje průnik současně podávaných bioaktivních látek. Nelineární kmity vyvolané intenzivním průtokem kapaliny kolem mikrobublin kontrastních látek se nazývají mikroproudění [46].

Ultrazvukové techniky s použitím mikrobublin také vedly k rozvoji řady nových aplikací na hodnocení průchodnosti cév pacientů po mrtvici. Perfuze, sonotrombolýza, molekulární zobrazování a genová terapie jsou některé z nedávných pokroků v diagnostickém a terapeutickém řízení cerebrovaskulárních onemocnění s použitím mikrobublin a ultrazvukových technik [47].

Salvatore a spol. ve svém článku [48] diskutují všechny nedávné pokroky v kontrastním ultrazvukovém zobrazování. Pomocí mikrobublin, v kombinaci s trombolytickými léčivými, a ultrazvuku provedli poprvé u lidí monitoring ischemické choroby srdeční a real-time mozkovou perfuzi. Mikrobubliny taktéž umožňují vizualizaci krční tepny a jejich defektů.

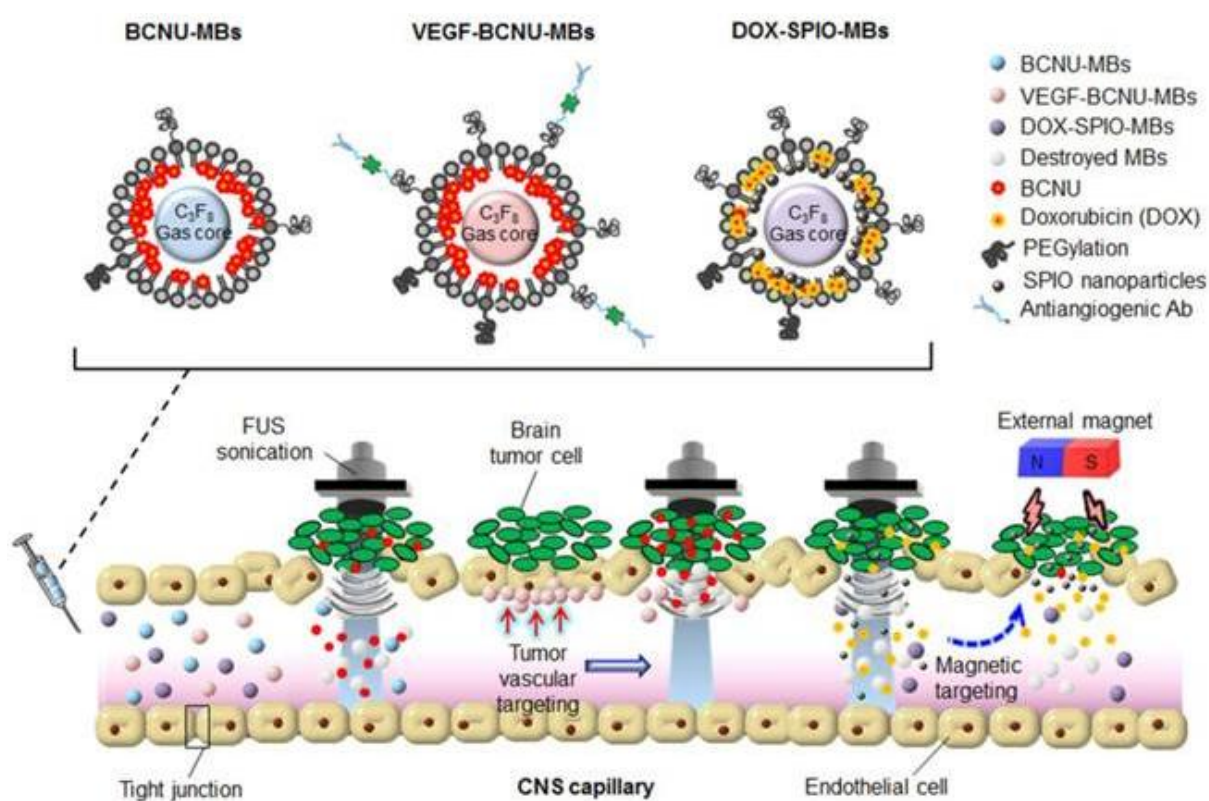


Obr. 17: Schéma různých magnetických mikrobublin. (A) magnetické nanočástice jsou připojeny k plášti povrchu mikrobublin; (B) nanočástice oxidu železitého jsou zakotveny v plášti mikrobublin; (C) magnetické nanočástice jsou uloženy v olejové vrstvě mikrobublin [49]

Xiaowei Cai a spol. ve své práci představují mikrobubliny s inkorporovanými magnetickými nanočásticemi, které mohou specificky pronikat do tkání díky jejich relativně malé velikosti (Obr. 17). Zapouzdřením magnetických nanočástic se může zvýšit stabilita mikrobublin, které byly takto vytvořeny a zkoumány. Destrukce mikrobublin a uvolnění látek na požadovaném místě je řízena pomocí ultrazvuku. Takto vytvořené magnetické

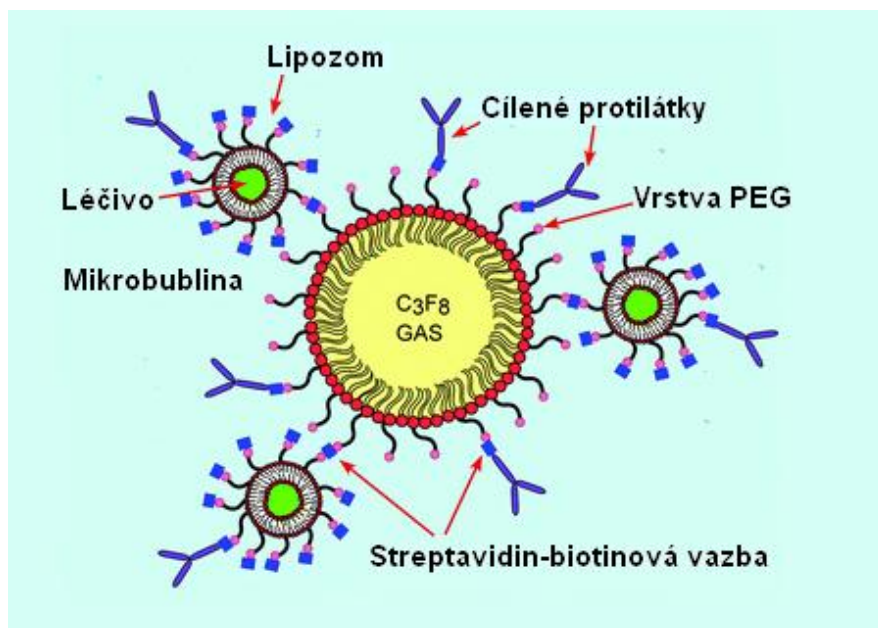
mikrobubliny by mohly být v budoucnosti využity v diagnostických a terapeutických oblastech [49].

Maligní gliom je jedním z nejnáročnějších onemocnění centrálního nervového systému, které je obvykle spojené s vysokou mírou recidivy a mortality. Současné chirurgické postupy v kombinaci s radiací nebo chemoterapií nestačily na řízení progresu nádoru nebo zlepšení přežití pacienta s maligním gliomem. Hao-Li Liu a spol. použili multifunkční mikrobubliny ke zvýšení propustnosti krevních tkání při podávání léků (Obr. 18). Mikrobubliny působením ultrazvuku usnadnily propustnost léčiv mezi CNS a krví a dočasně zpřístupnily průnik hematoencefalickou bariérou. Mikrobubliny tedy mají potenciál pro zlepšení cíleného dodání různých druhů terapeutických činidel do mozkových nádorů. V článku lze též najít aktuální přehled preklinických studií, které prokazují, že použitím ultrazvuku a mikrobublin lze usnadnit léčbu nádorů v mozku [50].



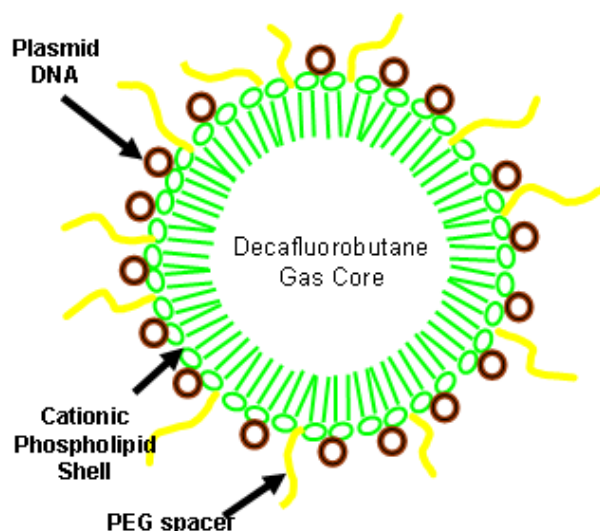
Obr. 18: Použití ultrazvuku a mikrobublin s navázaným léčivem k zaměření nádoru na mozku [49].

Sally A. Peyman a spol. ve svém článku představují mikrobubliny vytvořené pomocí mikrofluidního zařízení, které měly velikost 1–2 μm , na které navázali při přípravě během jednoho kroku lipozomy naplněné kvantovými tečkami (QDS) značené fluoresceinem o velikosti 100–200 nm (Obr. 19) [51].



Obr. 19: Schéma mikrobubliny stabilizované vrstvou polyethylenglykolu. Na povrchu mikrobubliny jsou navázány cílené protilátky a lipozomy s enkapsulovaným léčivem značeným fluoresceinem. Napojení lipozomu je zprostředkováno streptavidin-biotinovou vazbou [51]

Phillips LC, Klibanov AL a spol. se ve svém článku zabývají bezpečnostními riziky spojenými s použitím nitrožilních tělísek s navázanými léčivy v tepatnickém vyšetření během angioplastiky. Využívají zde interakci mikrobublin s ultrazvukem. Smyslem jejich práce bylo zjistit, zda by mohl nitrocévní ultrazvukový katetr zprostředkovat plazmidovou DNA pomocí mikrobublin (Obr. 20) přes stěnu prasečí věnčité tepny během balónkové angioplastiky [52].



Obr. 20: Schéma mikrobubliny, stabilizované polyethylenglykolem, s pozitivně nabitou skořápkou, na kterou je navázána plazmidová DNA [52]

Z mikrobublin, s návázanými plazmidy DNA vystavených působení ultrazvuku v modifikovaném ultrazvukovém katetru, byl během angioplastiky významně exprimován transgen. Katetr prošel při balónkové angioplastice levou přední sestupnou věnčitou tepnou prasete a poté následovala injekce s mikrobublinami v místě angioplastiky. Po 3 dnech pozorovali přibližně 6,5krát zvýšení exprese transgenu v tepnách, kde byly použity terapeutické mikrobubliny, oproti tepnám bez použití těchto mikrobublin. Výsledky studie ukazují, že spojením nictocévního katetru a terapeutických mikrobublin dochází ke zvýšení genové transfekce ve stěnách cévy in vivo. Tato technologie může být použita jak k cílení léčiv, tak v genové terapii ke snížení restenózy cév (obnovení stenózy po angioplastice) [52].

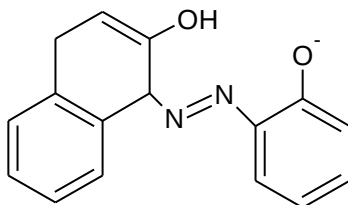
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Barviva (sondy)

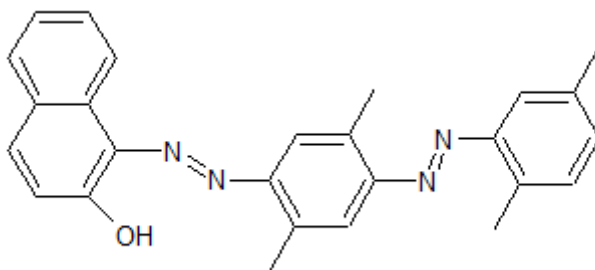
Sudánová červeň (Sudan Red G)

CAS: 1229-55-6, Fluka, šarže 17373



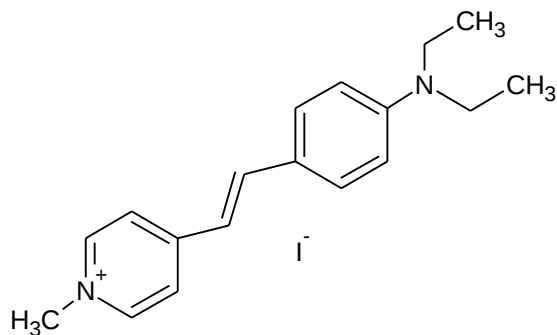
Olejová červeň (Oil Red O)

Sigma Aldrich, CAS: 1320-06-5, Sigma, šarže 1000759015



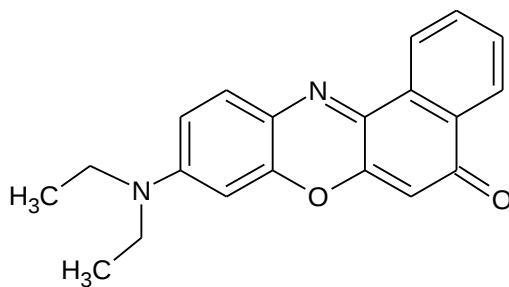
4-Di-2-Asp (4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium jodid)

Sigma Aldrich, CAS: 4203-22-3, Sigma, šarže 108511015



Nilská červeň (Nile Red)

Sigma Aldrich, CAS: 7385-67-3, Sigma, šarže 19123-10MG



Distearoylphosphatidylcholin

CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@H](COP(=O)([O-])OCC[N+](C)(C)C)C(=O)OCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCC(=O)O[C@H](COP(=O)([O-])OC(O)O)OC(=O)OCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCC

BRACCO, 25 mg lyofilizovaného prášku + 5 ml fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl), (Makrogol 4000, distearoylfosfatidylcholin, dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný, kyselina palmitová), šarže 11A029G

$$\text{H}-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\right]_n-\text{OH}$$
CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O

Glycerol

OCC(O)CO

Chloroform

CAS: 67-66-3, Sigma-Aldrich, for
UV-spectroscopy, šarže: PP/2008/05926/0

Lachner s.r.o., CAS: 7647-14-5, čistota
99,5 %, šarže 30453

32

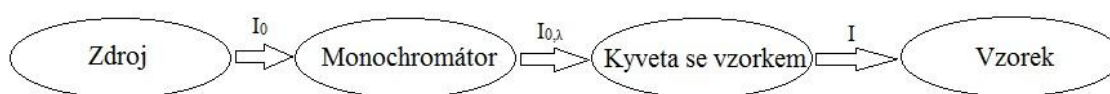
4.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy	Denver instrument
Automatické pipety	Biohit, Finnpipette, Vitrum
Magnetické míchadlo	Heidolph MR Hei-Standard
Třepačka	MS2 Minishaker
Odstředivá centrifuga	Rotofix 32
UV-VIS spektrofotometr	Cary Probe 50, Varian

Tab. 4: Údaje o spektrofotometru Cary Probe 50, Varian

Zdroj záření	xenonová pulzní lampa
Monochromátory	Czerny-Turner 0,25 m
Rozmezí λ	190 – 1100 nm
Opakovatelnost λ	$\pm 0,1$ nm
Maximální rychlost skenu	24 000 nm/min
Detektor	2 křemíkové diody

UV-VIS spektrofotometr je zařízení, které je používáno pro měření elektronových absorpčních spekter. Cary Probe 50 je spektrofotometr s jednopaprskovým uspořádáním skládající se ze zdroje záření, monochromátoru (získání záření o určité vlnové délce), kyvety se vzorkem a detektoru (Obr. 21).



Obr. 21: Schéma jednopaprskového UV-VIS spektrofotometru Cary probe 50

Optický mikroskop	Nikon Eclipse Ci
Fluorescenční mikroskop	Olympus IX71

Invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX71 je světelný mikroskop umožňující detekci a pozorování fluoreskujících látek ve vzorku. Existuje již konfokální, dvoufotonový a superrezoluční mikroskop. Používá dostatečně silný zdroj světla.

Zdroj záření – laser o vlnové délce 467 nm, frekvenci 40 MHz. Dichroické zrcadlo 470/635 nm. Longpass filtr 488 (pro obrázky).

4.3 Příprava zásobních roztoků

4.3.1 Zásobní roztoky hydrofobních solutů

Koncentrace zásobních roztoků SRG a ORO v chloroformu byla zvolena na $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace zásobních roztoků 4-Di-2-Asp a NR v chloroformu byla zvolena na $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Sypké látky byly rozpuštěny v chloroformu a roztoky byly v odměrných baňkách doplněny na přesný objem a řádně promíchány. Skladovány byly poté po celou dobu v lednici.

4.3.2 Zásobní roztok DPPG.Na a DSPC

Do zásobní lahvičky bylo naváženo požadované množství fosfolipidu. Toto množství bylo rozpuštěno v 0,5 ml chloroformu. Po odpaření chloroformu bylo do zásobní lahvičky pipetováno takové množství fyziologického roztoku (0,15 M roztok NaCl), aby výsledná koncentrace fosfolipidu v zásobním roztoku byla $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Poté byl roztok sonifikován při 50 °C, dokud nebyl čirý, tedy přibližně 30–60 minut.

Stejný postup byl proveden u zásobních roztoků fosfolipidu o koncentracích 500, 100, 50 a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Zásobní roztoky byly skladovány v zásobních lahvích při laboratorní teplotě.

4.3.3 Námi připravené mikrobubliny na bázi SonoVue®

Do zásobní lahvičky bylo naváženo potřebné množství obou fosfolipidů, kyseliny palmitové a polyethylenglykolu. Toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu, který byl následně odpařen. Poté bylo přidáno 80 ml fyziologického roztoku tak, aby roztok splňoval požadavky komerčně dostupného přípravku SonoVue®. Celkový objem roztoků nemohl být menší než 80 ml kvůli možnosti navážení fosfolipidů a kyseliny palmitové na analytických vahách. Roztok byl poté sonifikován při 50 °C přibližně 30–60 minut.

4.4 Příprava vzorků

4.4.1 Vzorky k zjištění molárních absorpčních koeficientů solutů

Ze zásobního roztoku SRG a ORO v chloroformu bylo pipetováno 4, 5, 10 a 15 μl do suchých čistých vialek. Konečná koncentrace SRG a ORO v 10 ml vzorku tedy činila $0,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Ze zásobního roztoku 4-Di-2-Asp a NR v chloroformu bylo pipetováno 10, 30, 50 a 80 μl do suchých čistých vialek. Konečná koncentrace 4-Di-2-Asp a NR v 10 ml vzorku tedy činila $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z vialek byl v digestoři odpařen veškerý chloroform. Poté bylo přidáno 10 ml ze zásobního roztoku $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ DPPG.Na sodného ke každé koncentraci solutů. Do dalších vialek se zvolenými koncentračními řadami solutů bylo přidáno 10 ml ze zásobního roztoku $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ DSPC. Z každé ze čtyř vybraných koncentrací solutů s fosfolipidem byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky. U každého vzorku byla změřena absorbance potřebná pro výpočet molárního absorpčního koeficientu.

Pro zjištění molárního absorpčního koeficientu solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® byly vzorky připraveny obdobně jako vzorky s fosfolipidy. Koncentrační řady solutů byly stejné, avšak s tím rozdílem, že celkový objem roztoku nebyl 10, ale 80 ml kvůli zmíněnému problému. Z každé ze čtyř vybraných koncentrací solutů byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky.

Před vlastním měřením byly vzorky centrifugovány po dobu deseti minut při otáčkách 4 000 za minutu.

4.4.2 Vzorky pro výpočet koncentrace solubilizovaných solutů

Do prázdných čistých vialek bylo vsypáno malé množství barviva (SRG, ORO, 4-Di-2-Asp a NR). Poté bylo naváženo potřebné množství DSPC a DPPG.Na, aby výsledné koncentrace každého z nich v 10 ml roztoku byly 10, 50, 100, 500 a $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. V dalším kroku bylo

přidáno 1 ml chloroformu a po jeho odpaření bylo přidáno 10 ml fyziologického roztoku a vzorky byly umístěny na ultrazvuk po dobu přibližně 30–60 minut. Od každé koncentrace fosfolipidu byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky. Vzorky byly ponechány do dalšího dne na třepačce.

Podobně byly připraveny vzorky k přípravě mikrobublin na bázi SonoVue[®]. Do zásobních lahviček bylo vsypáno malé množství solutu a naváženo potřebné množství fosfolipidů, kyseliny palmitové a polyethylenglykolu. Toto bylo následně rozpuštěno přidáním 1 ml chloroformu. Po odpaření bylo přidáno 80 ml fyziologického roztoku a vzorky byly sonifikovány přibližně 30–60 minut.

Od každé koncentrace fosfolipidu s příslušným solutem byly připraveny tři vzorky kvůli zajištění alespoň minimální statistiky. Od každého vzorku mikrobublin na bázi SonoVue[®] se solutem byly připraveny taktéž tři vzorky. Všechny vzorky byly ponechány do dalšího dne na třepačce.

Před vlastním měřením byly vzorky centrifugovány po dobu deseti minut při otáčkách 40 000 za minutu.

4.4.3 Vzorky pro fluorescenční mikroskopii

K tomuto účelu byly použity vzorky námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue[®] s 4-Di-2-Asp a NR, protože z vybraných čtyř solutů právě tyto dva vykazují fluorescenci.

4.5 Metoda měření

4.5.1 UV-VIS Spektrofotometrie

Ve všech případech byly vialky zavíčkované a před vlastním měřením ponechány protřepávat do dalšího dne. Příští den byly sejmuty z třepačky a bylo provedeno jejich měření na UV-VIS spektrofotometru VARIAN Cary 50 Probe. Měření bylo prováděno za laboratorní teploty.

U vzorků byla měřena absorbance. U všech používaných solutů byl rozsah vlnových délek zvolen od 400 nm do 600 nm. Jako slepý vzorek (blank) byl zvolen příslušný fosfolipid nebo námi připravené vzorky na bázi SonoVue[®] ve fyziologickém roztoku bez rozpuštěného solutu. Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

4.5.2 Optická mikroskopie

Vzorky námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue[®] byly před vlastním měřením na optickém mikroskopu řádně protřepány, aby v roztoku došlo k utvoření požadovaných mikrobublin, které jsme chtěli sledovat. Měření bylo prováděno na optickém mikroskopu Nikon Eclipse Ci-L za laboratorní teploty.

4.5.3 Fluorescenční korelační spektroskopie

Vzorky námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue[®] byly před vlastním měřením na fluorescenčním mikroskopu řádně protřepány, aby v roztoku došlo k utvoření požadovaných mikrobublin, které jsme chtěli sledovat. Měření bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu Olympus IX71 za laboratorní teploty.

4.6 Standardní vyhodnocení dat

4.6.1 Zjištění molárního absorpčního koeficientu solutů ve fosfolipidech a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®

Byla vybrána hodnota absorbance při požadované vlnové délce $\lambda_{\max}$ u každého z vybraných solutů. Pomocí Lambert-Beerova zákona byl početně zjištěn molární absorpční koeficient příslušného solutu ve fosfolipidech a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® jako podíl absorbance a hodnoty předem zvolené koncentrace barviva.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Rightarrow \varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (8)$$

Vypočtené absorpční koeficienty u každé koncentrace byly zprůměrovány ze tří měření a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka.

4.6.2 Zjištění koncentrace solutů uvnitř fosfolipidů a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®

U namíchaných vzorků byla měřena absorbance. Byla vybrána nejvyšší hodnota absorbance ve zvoleném rozsahu vlnových délek podle $\lambda_{\max}$ u každého solutu. Některé vzorky byly příliš koncentrované, hodnota absorbance byla vyšší než 1,5, a proto musely být zředěny. Ředění se pak odrazilo ve výpočtu koncentrace. Pomocí Lambert-Beerova zákona a vypočtených molárních absorpčních koeficientů solutů byla zjištěna koncentrace solutů solubilizovaných uvnitř fosfolipidů a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®.

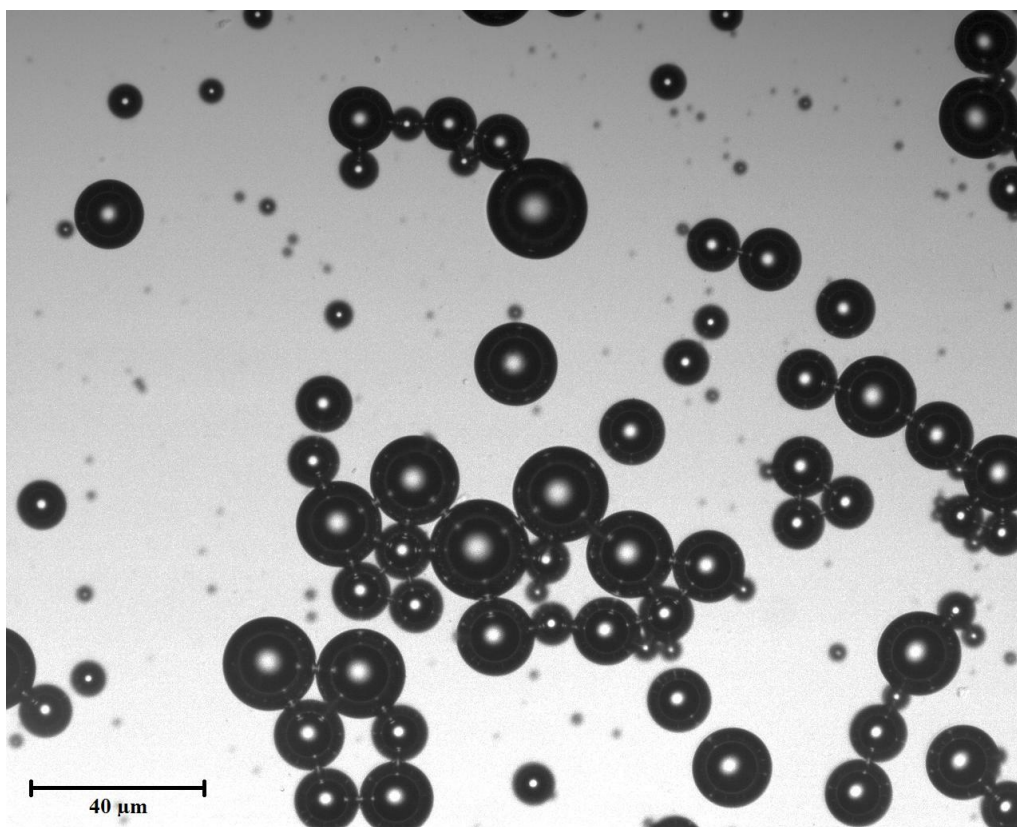
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (9)$$

Vypočtené koncentrace solutů byly zprůměrovány vždy ze tří vzorků a byla zjištěna jejich směrodatná odchylka.

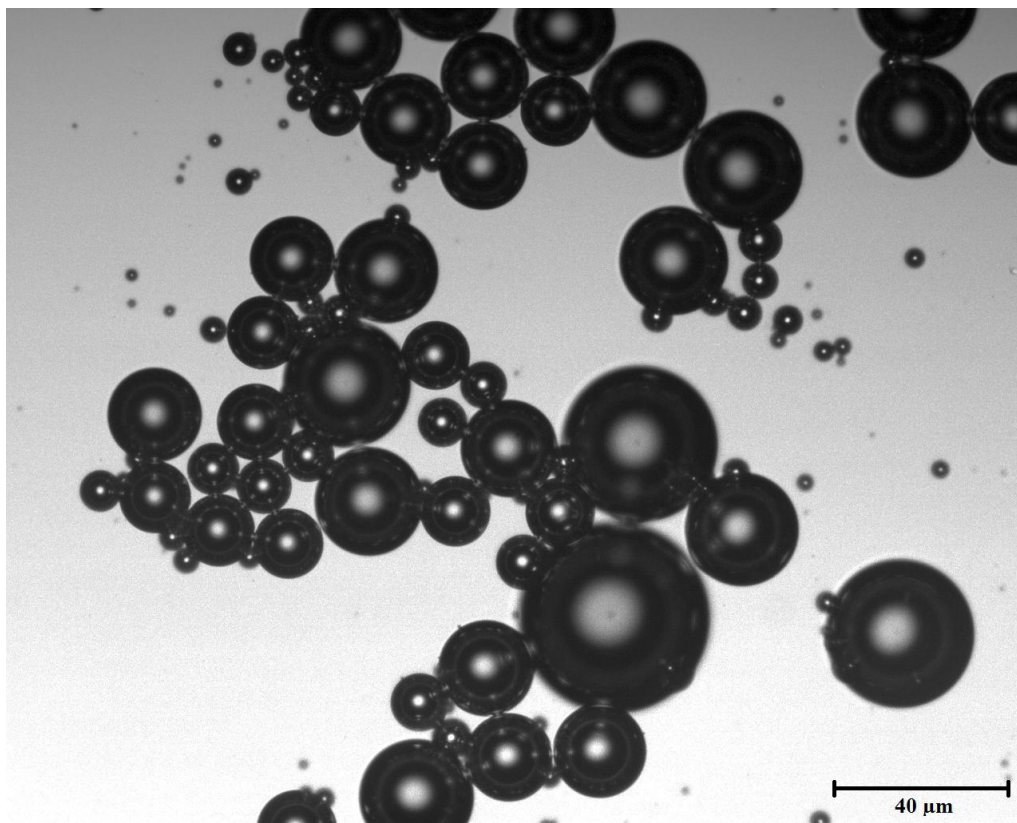
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vizualizace námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® pomocí optického mikroskopu

Na Obr. 22 a Obr. 23 můžeme vidět vizualizaci dvou vzorků námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® pomocí optického mikroskopu Nikon Eclipse Ci. Pracovali jsme se čtyřicetinasobným zvětšením. Na obrázcích lze vidět, jak mikrobubliny drží ve shlucích pospolu, což je pravděpodobně způsobeno hydrofobními interakcemi mezi jednotlivými mikrobulinami. Velikost mikrobublin se pohybuje v řádech jednotek až desítek mikrometrů. Při bližším zkoumání mikrobublin můžeme vidět rozhraní mezi fosfolipidovou vrstvou a stabilizační vrstvou polyethylenglykolu. Jde také vidět, jak jsou k sobě mikrobubliny připojeny. Lze tedy říci, že námi připravené mikrobubliny velikostí a tvarem odpovídají mikrobublinám komerčního přípravku SonoVue®.



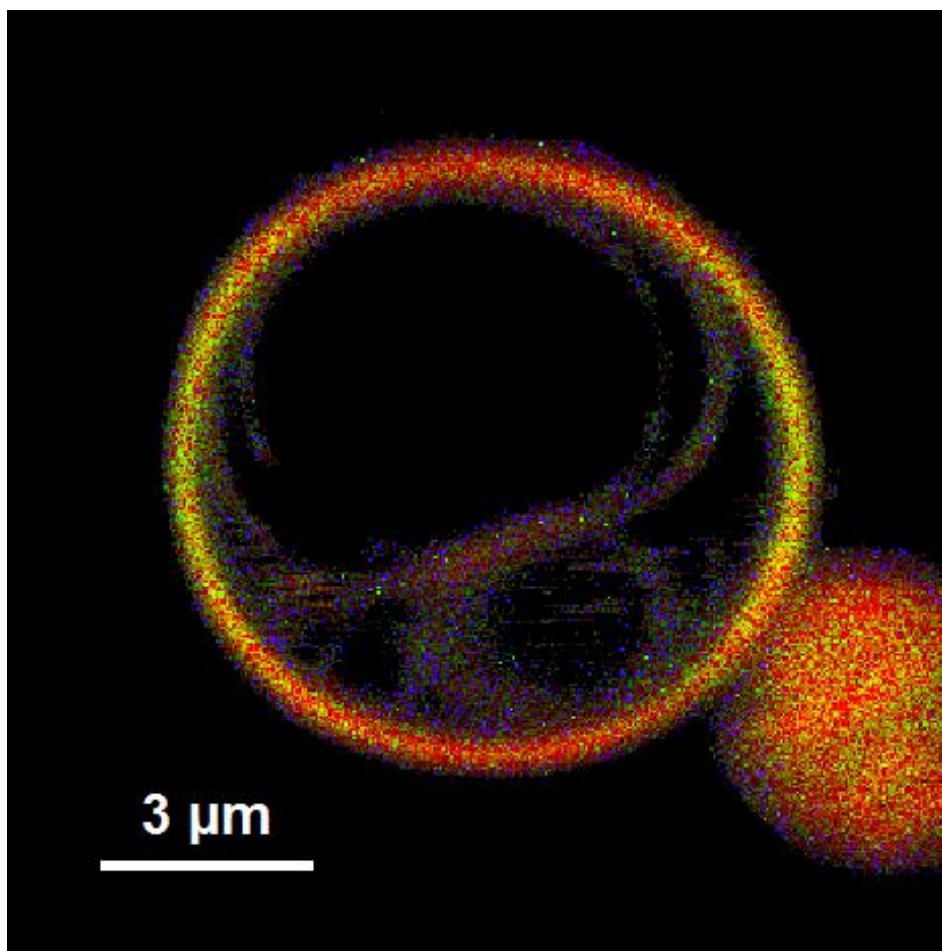
Obr. 22: Námi připravené mikrobubliny stejného složení jako má přípravek SonoVue®. Lze vidět interakce mezi jednotlivými mikrobublinami a rozhraní mezi vrstvou fosfolipidu a vrstvou PEG



Obr. 23: Snímek námi připravených mikrobublin stejného složení jako má přípravek SonoVue®

5.1.1 Vizualizace námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® pomocí fluorescenční spektroskopie

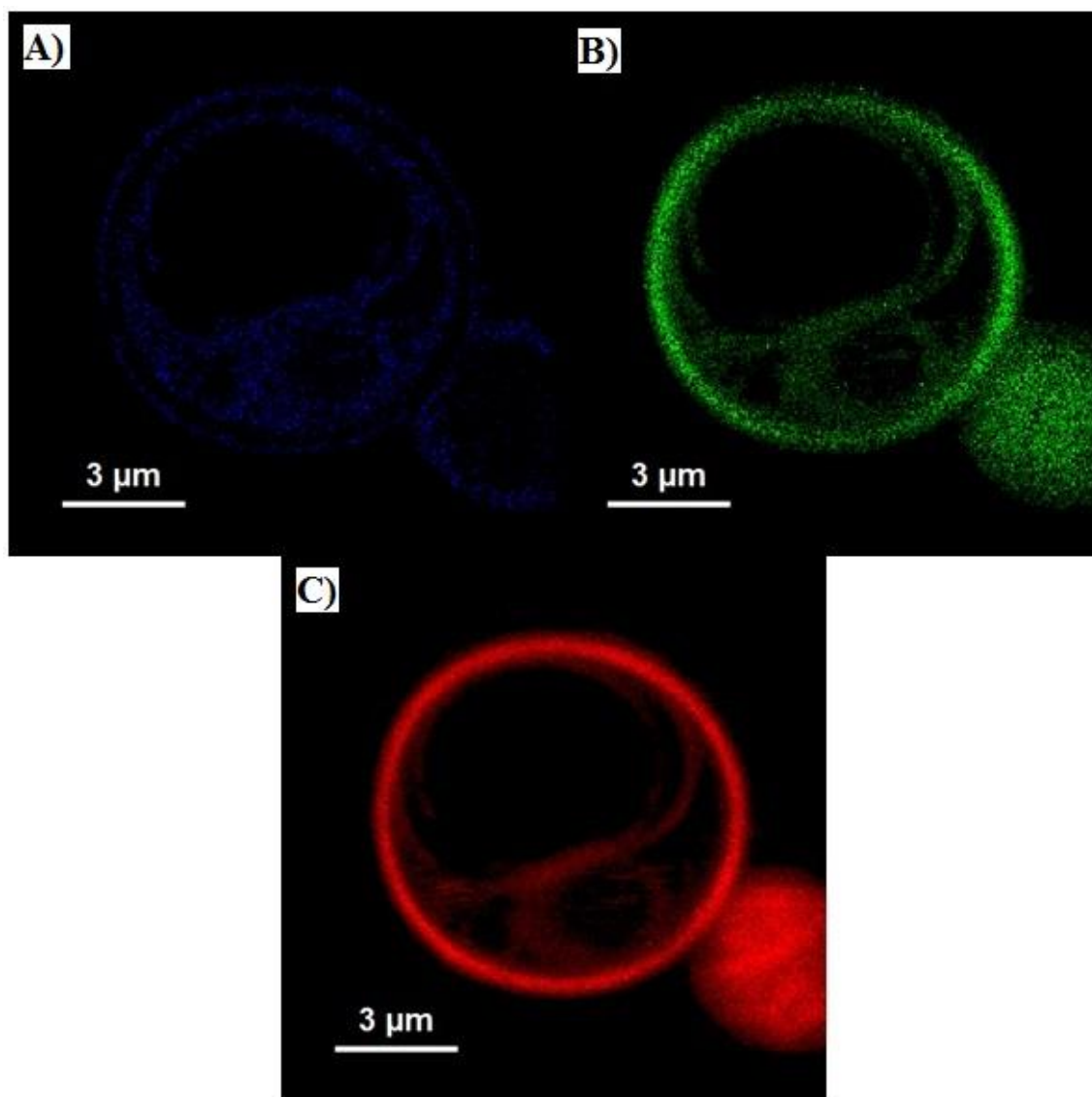
K vizualizaci námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue® byl využit invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX71. Zkoumány byly vzorky mikrobublin se sondami 4-Di-2-Asp a NR fixované glycerolem. Zjistili jsme, že sonda 4-Di-2-Asp bohužel není vhodná k vizualizaci mikrobublin, protože se hojně solubilizovala v polárním prostředí. NR byla lepší volbou a podařilo se nám mikrobubliny vizualizovat. Na Obr. 24 můžeme vidět vizualizaci mikrobubliny na bázi SonoVue® pomocí tří barev (RGB), kdy každá barva znázorňuje jinou dobu života excitovaného stavu NR, celkem byly tři.



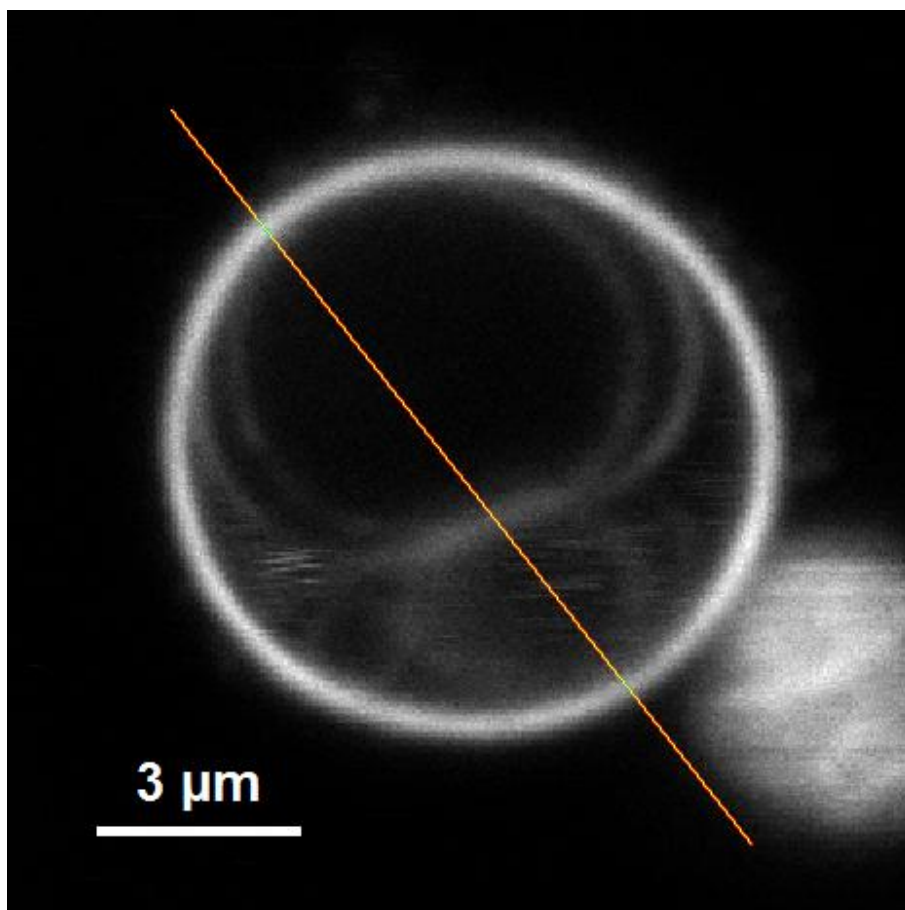
Obr. 24: RGB vizualizace mikrobubliny na bázi SonoVue® s NR

Na Obr. 25 můžeme vidět jednotlivé doby života excitovaného stavu NR znázorněné třemi barvami. První doba života NR cca 1 ns znázorněna na obrázku modrou barvou (A) nám ukazuje polární prostor kolem mikrobubliny, kam se malá část NR solubilizovala. Druhá doba života cca 3-3,5 ns je znázorněna zelenou barvou (B) a ukazuje nám, že se část sondy solubilizovala v polární struktuře mikrobubliny a část v nepolární. Třetí doba života cca 6 ns znázorněná červenou barvou (C) má intenzitu největší a ukazuje nám nepolární část mikrobubliny, kam se solubilizovala největší část fluorescenční sondy NR. Na Obr. 26 je vidět intenzitní obrázek s naznačeným vykreslením intenzitního profilu, jak je uvedeno na Obr. 27. Z tohoto profilu, jakož i ze samotného obrázku lze vidět, že bubliny mají multilamelární strukturu, a tedy více místa pro solubilizaci nepolárních či amfifilních látek, což u klasické optické mikroskopie není pozorovatelné. Anizotropní obrázek (Obr. 28) pak naznačuje, že molekuly jsou ve velmi rigidním prostředí, kde je potlačena rotace molekuly. To odpovídá předpokladu monomolekulární vrstvy, kde je prostor, kde může být fluorescenční sonda umístěna, velmi omezený. Na Obr. 29 je pak histogram, generovaný vyhodnocovacím softwarem SymphoTime64®, který určuje rozložení četnosti jednotlivých anizotropií. Protože systém, především díky své multilamelaritě, bude komplikovaný z hlediska membránových struktur (různé zakřivení), je i distribuce anizotropie poměrně široká. Její průměrná hodnota, 0,31, pak svědčí o znemožněné rotační difúzi a blíží

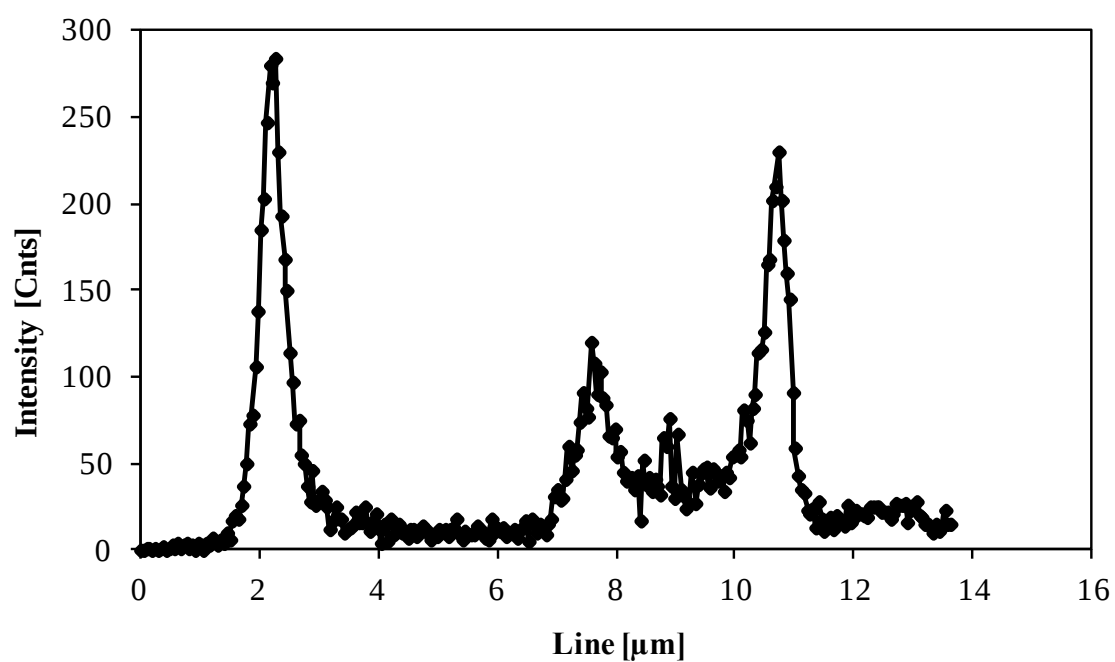
se maximálně dosažitelné hodnotě anizotropie 0,4, dané kvantově mechanickým výpočtem [54].



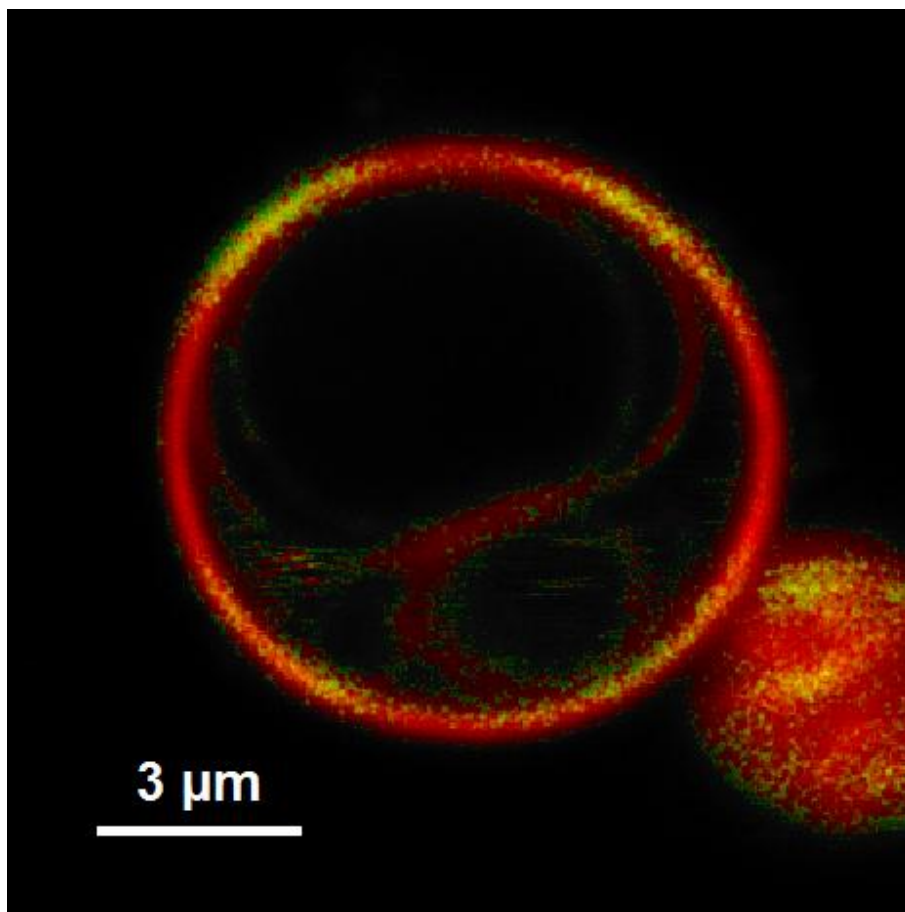
Obr. 25: Znáznornění jednotlivých dob života excitovaného stavu NR. První doba života NR cca 1 ns znázorněna modrou barvou (A) nám ukazuje polární prostor kolem mikrobubliny, kam se malá část NR solubilizovala. Druhá doba života cca 3-3,5 ns je znázorněna zelenou barvou (B) a ukazuje nám, že se část sondy solubilizovala v polární struktuře mikrobubliny a část v nepolární. Třetí doba života cca 6 ns znázorněná červenou barvou (C) má intenzitu největší a ukazuje nám nepolární část mikrobubliny, kam se solubilizovala největší část fluorescenční sondy NR



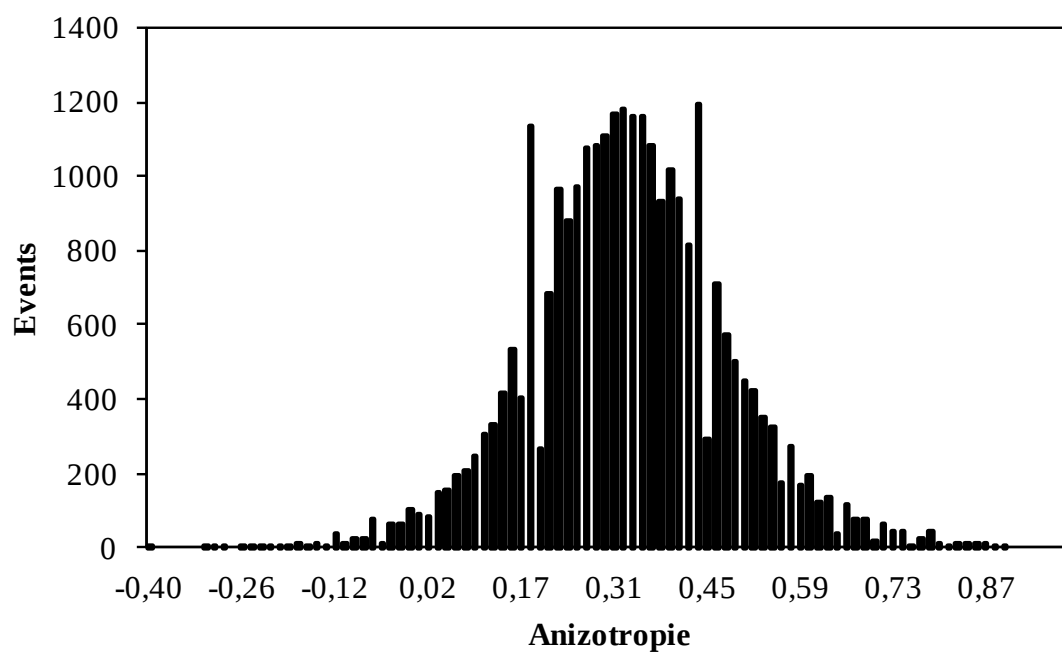
Obr. 26: Řez námi připraveným vzorkem mikrobublin na bázi SonoVue®



Obr. 27: Vykreslení intenzitního profilu k Obr. 26



Obr. 28: Snímek z fluorescenční anizotropie



Obr. 29: Histogram určující rozložení četnosti jednotlivých anizotropií (k Obr. 28)

5.2 Molární absorpční koeficienty solutů ve fosfolipidech a v mikrobublinách na bázi SonoVue®

5.2.1 Dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný

Koncentrace DPPG.Na byla zvolena $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, tím jsme zajistili, že veškeré hydrofobní soluty naší zvolené koncentrační řady byly zcela solubilizovány uvnitř lipozomů a my tak mohli změřit na UV-VIS spektrofotometru potřebnou absorbanci solutů. Vzorky byly měřeny v momentě, kdy nebyla okem pozorovatelná přítomnost nerozpuštěné látky. Z absorpčního maxima při 518 nm pro SRG, 521 nm pro ORO, 488 nm pro 4-Di-2-Asp a 549 nm pro NR byla odečtena hodnota absorbance a poté byl stanoven molární absorpční koeficient. SRG má hodnotu koeficientu $7\,156 \pm 23 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ORO $10\,815 \pm 62 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 4-Di-2-Asp $36\,205 \pm 256 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a NR $26\,069 \pm 539 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ v DPPG.Na.

Při měření 4-Di-2-Asp byl problém u koncentrace 0,001 mM, kde hodnota absorbance byla nižší než 0,1. Z toho důvodu nebyla vypočtená hodnota koeficientu pro tuto koncentraci zařazena do výsledného průměru.

Molární extinkční koeficienty jsou výsledkem průměru vypočteného vždy ze tří proměřovaných vzorků a to platí i pro všechny následující případy.

5.2.2 Distearoylfosfatidylcholin

Koncentrace DSPC byla zvolena $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ stejně jako u DPPG.Na. K výpočtu byly použity absorpční maxima jednotlivých solutů. SRG má hodnotu absorpčního koeficientu $7\,523 \pm 50 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ORO $8\,261 \pm 137 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 4-Di-2-Asp $46\,317 \pm 499 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a NR $11\,904 \pm 64 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ v DSPC.

Při měření 4-Di-2-Asp byl opět problém u koncentrace 0,001 mM, kde hodnota absorbance byla nižší než 0,1. Z toho důvodu nebyla vypočtená hodnota koeficientu pro tuto koncentraci zařazena do výsledného průměru. Výpočty byly provedeny opět z absorpčních maxim vlnových délek jednotlivých solutů stejně jako u DPPG.Na i dále u mikrobublin. Absorpční maximum se výrazně neměnilo.

Molární extinkční koeficienty jsou výsledkem průměru vypočteného vždy ze tří proměřovaných vzorků a to i pro všechny následující případy.

5.2.3 Mikrobubliny na bázi SonoVue®

Molární absorpční koeficient SRG byl stanoven na hodnotu $17\,560 \pm 208 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, koeficient ORO na $18\,606 \pm 72 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 4-Di-2-Asp na $38\,606 \pm 112 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a NR na hodnotu $3\,954 \pm 96 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ v mikrobublinách na bázi SonoVue®.

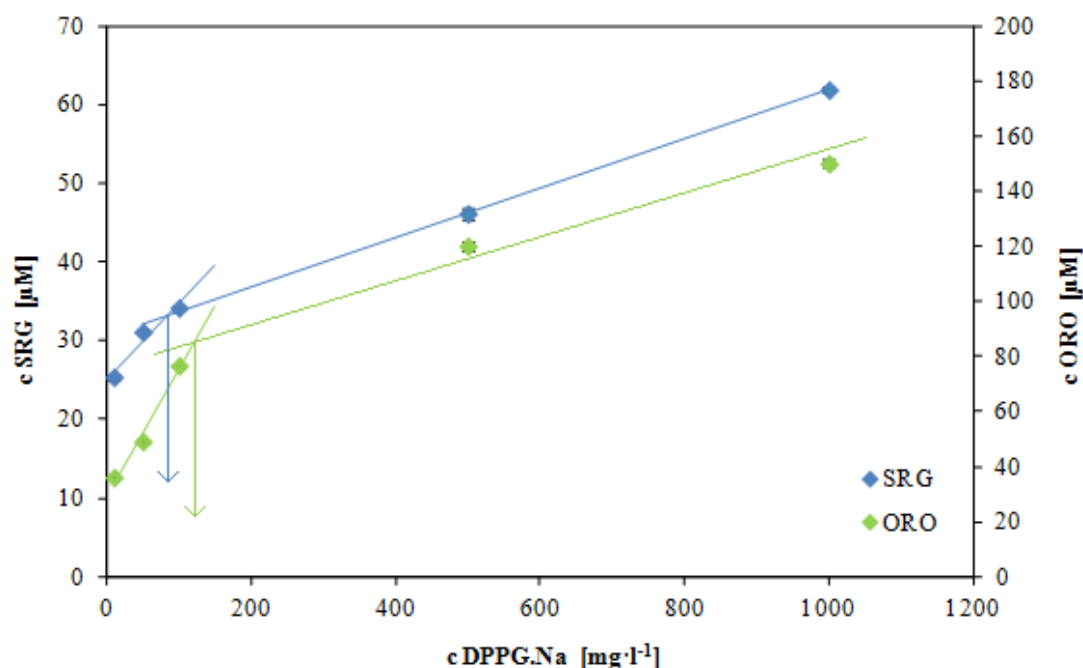
Vypočtené molární absorpční koeficienty solutů byly použity pro výpočet koncentrace ve fosfolipidech a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® pomocí rovnice (nahore).

Molární absorpční koeficienty jsou poměrně nízké ve srovnání s hodnotami koeficientů solutů v rozpouštědlech [55, 56, 57]. Možným vysvětlením může být lokalizace chromoforu a jeho interakce s lipidy.

5.3 Koncentrace solutů solubilizovaných ve fosfolipidech a v mikrobublinách na bázi SonoVue®

5.3.1 Solubilizační schopnosti DPPG.Na a DSPC

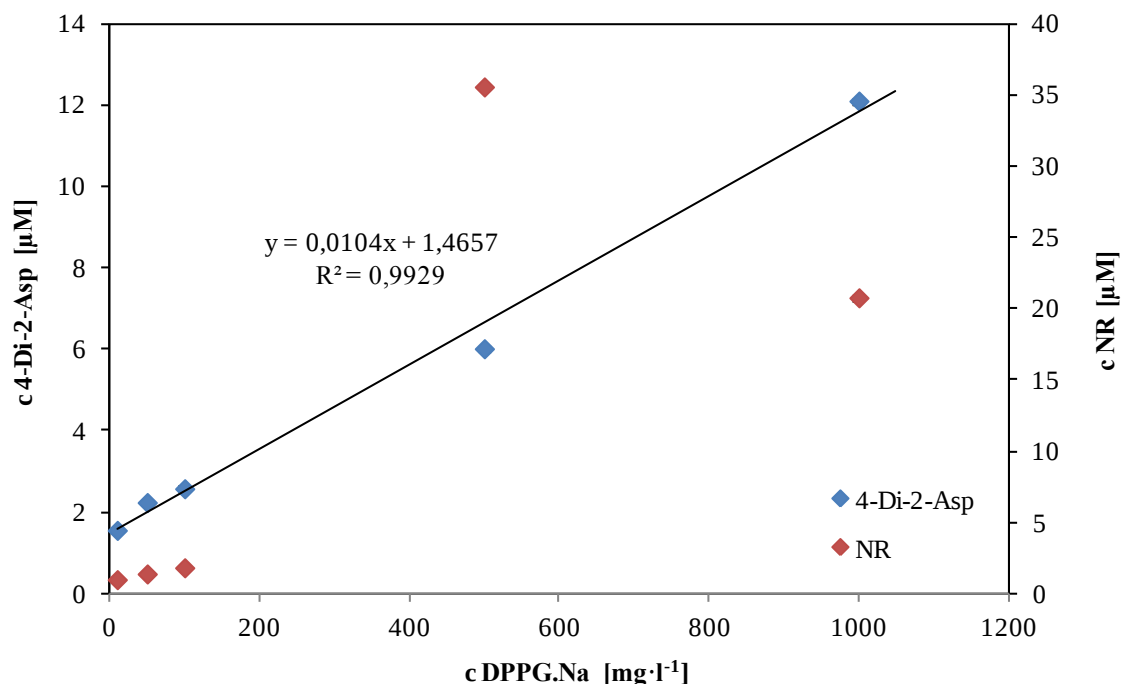
Obr. 30, Obr. 31, Obr. 32 a Obr. 33 zobrazují závislost koncentrací hydrofobních solutů na koncentraci fosfolipidů v prostředí fyziologického roztoku. Koncentrace ORO a NR je vždy vynesena na vedlejší osu kvůli lepší přehlednosti a orientaci v grafech. U všech hodnot koncentrací solutů jsou vyneseny chybové úsečky.



Obr. 30: Koncentrace solubilizovaného Sudanu Red G a Oil Red O v dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodném

Obr. 30 zobrazuje koncentraci SRG a ORO v DPPG.Na. Koncentrace SRG i ORO je rostoucí s rostoucí koncentrací DPPG.Na. Hodnota solubilizovaného SRG při koncentraci DPPG.Na $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ je zatížena chybou, protože hodnota absorbance roztoku byla nižší než 0,1, avšak do grafu jsme tuto hodnotu zařadili. Stejný problém byl u ORO v DPPG.Na u koncentrací 10 a $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kdy hodnoty absorbance taktéž nedosahovaly 0,1. Některé množství barviva se ale v systémech solubilizovalo, avšak v budoucnu s těmito hodnotami počítat nelze. Hodnoty byly proloženy dvěma přímkami. Závislost vykazovala zlomový trend, kdy změna trendu byla identifikována jako průsečík dvou přímek. Změna trendu může souviset se změnou struktury fosfolipidických částic nebo může být funkcí i samotného barviva, kdy rozsáhlé hydrofobní molekuly mohou způsobovat indukci agregace a měnit strukturu lipidických agregátů. U prvních třech hodnot koncentrací ORO v DPPG.Na můžeme vidět prudší nárůst, který by se mohl považovat za lineárně rostoucí. Koncentrace SRG v $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku DPPG.Na byla $61,90 \mu\text{M}$. Koncentrace ORO v $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku DPPG.Na byla $150,08 \mu\text{M}$. Oproti SRG se ORO solubilizoval v DPPG.Na více a to i přesto, že je bis-diazo molekula ORO větší než diazo molekula SRG. Možným vysvětlením by také

mohlo být to, že spolu mohly molekuly SRG navzájem reagovat a vytvořit tak větší strukturu než samotné molekuly ORO a z tohoto důvodu se pak hůře solubilizovaly v DPPG.Na.



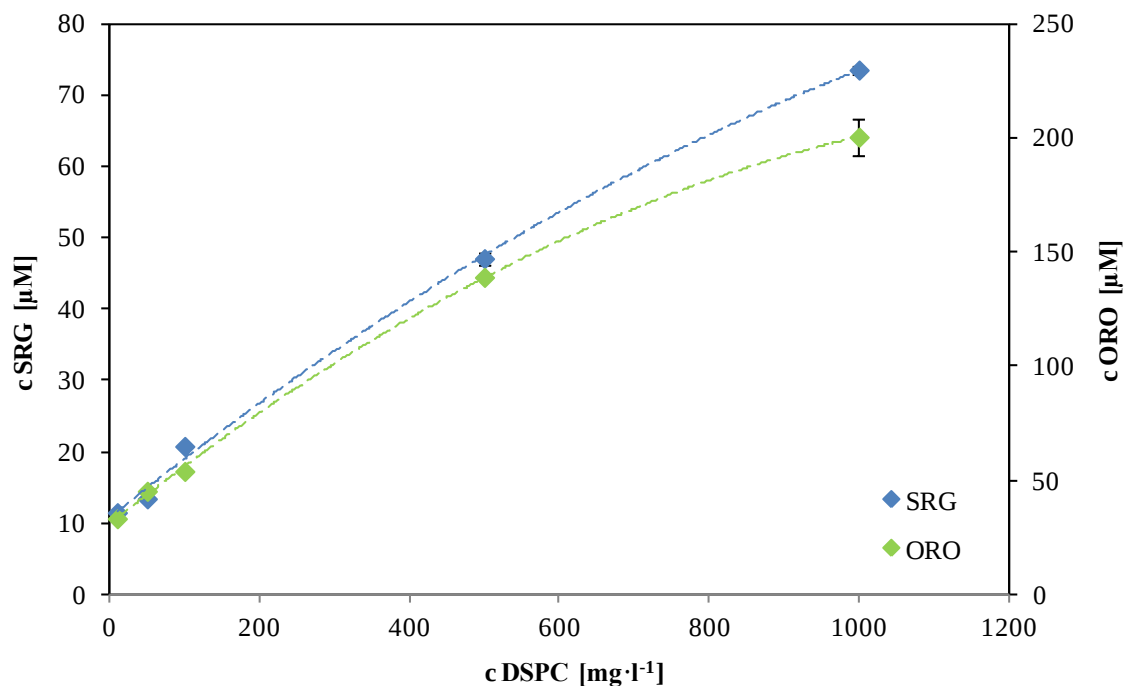
Obr. 31: Koncentrace solubilizovaného 4-Di-2-Asp a Nilské červeně v dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodném

Obr. 31 zobrazuje koncentraci 4-Di-2-Asp a NR v DPPG.Na. Hodnoty koncentrací 4-Di-2-Asp v DPPG.Na vykazují rostoucí charakter, proto byly data proloženy přímkou, kde můžeme vidět hodnotu korelačního koeficientu R^2 rovnu 0,9929. Koncentrace 4-Di-2-Asp v 1000 mg·l⁻¹ roztoku DPPG.Na byla 12,11 μM. U vzorků s NR byl rostoucí trend porušen. S prvními třemi hodnotami koncentrací DPPG.Na pozvolna rostla koncentrace solubilizované NR, i když se hodnota absorbance pohybovala pod hranicí 0,1. Při koncentraci 500 mg·l⁻¹ DPPG.Na došlo k náhlému nárůstu, kdy se NR v DPPG.Na solubilizovala nejvíce. Hodnota koncentrace činila 35,58 μM. Při koncentraci 1000 mg·l⁻¹ DPPG.Na došlo k poklesu koncentrace téměř na polovinu. Tento jev by mohl být způsoben nasycením, saturací lipozomů DPPG.Na molekulami NR.

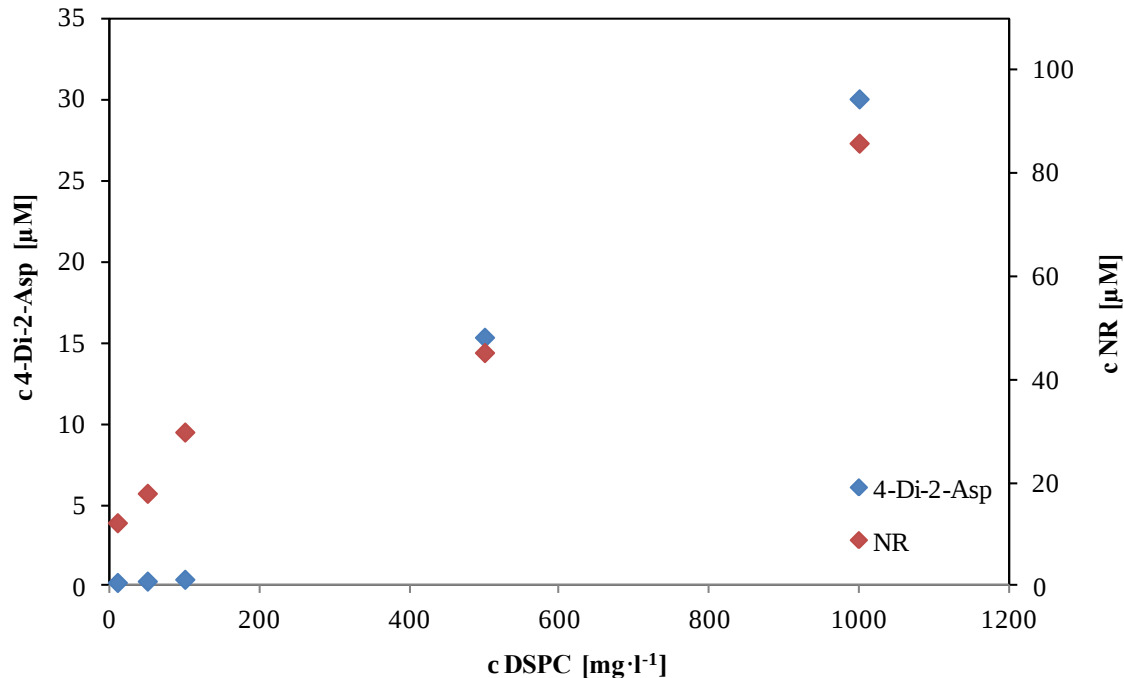
Na Obr. 32 můžeme vidět závislost koncentrace solubilizovaného SRG a ORO na koncentraci DSPC. Koncentrace SRG i ORO má rostoucí trend s rostoucí koncentrací DSPC, stejně jako v případě DPPG.Na. Nejlépe by rostoucímu trendu vyhovoval polynom druhého řádu, který by mohl být uspokojivý pro aproximaci v daném koncentračním rozsahu. Koncentrace SRG v 1000 mg·l⁻¹ roztoku DSPC byla 73,54 μM. Koncentrace ORO v 1000 mg·l⁻¹ roztoku DSPC byla 200,44 μM. Oproti SRG se ORO opět solubilizovalo více. Možným vysvětlením je vzájemná reakce molekul SRG ve větší molekuly, které se pak hůře solubilizují v DSPC.

Při srovnání samotných dvou fosfolipidů můžeme zjistit, že DSPC v sobě solubilizuje jak více SRG, tak i ORO (Tab. 6). DSPC je nejspíše schopné tvořit více lipozomů, do kterých

se můžou barviva solubilizovat. U vzorků se SRG to nemusí být patrné hned na první pohled, avšak u vzorků s ORO si toho nemůžeme nepovšimnout.



Obr. 32: Koncentrace solubilizovaného SRG a ORO v distearoylfosfatidylcholinu



Obr. 33: Koncentrace solubilizovaného 4-Di-2-Asp a Nílské červeně v distearoylfosfatidylcholinu

Na Obr. 33 můžeme sledovat závislost koncentrace solubilizovaného 4-Di-2-Asp a NR na koncentraci DSPC. U vzorků 4-Di-2-Asp jsou první tři hodnoty koncentrací velmi nízké, protože se barvivo solubilizovalo velmi málo a absorbance se pohybovala v hodnotách

pod 0,1. Koncentrace solubilizovaného 4-Di-2-Asp v $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku DSPC byla $30,04 \text{ } \mu\text{M}$. U vzorků s NR můžeme vidět rostoucí trend, kdy u prvních třech vzorků je růst intenzivnější a s dalšími dvěma pak pozvolnější. Tyto hodnoty ale nemají jednoduchý trend, což může souviset s interakcemi těchto složitých molekul. NR se solubilizovala lépe v nižších koncentracích DSPC. Koncentrace solubilizovaného NR v $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku DSPC byla $85,24 \text{ } \mu\text{M}$.

Ve srovnání DPPG.Na a DSPC lze opět vidět, že se solubilizovalo větší množství 4-Di-2-Asp i NR právě v DSPC, stejně jako u vzorků se SRG a ORO. V SonoVue[®] pak DSPC může nejspíše plnit o něco větší roli v solubilizaci účinných látek, avšak téměř vždy závisí na struktuře látky, kterou chceme v systému solubilizovat.

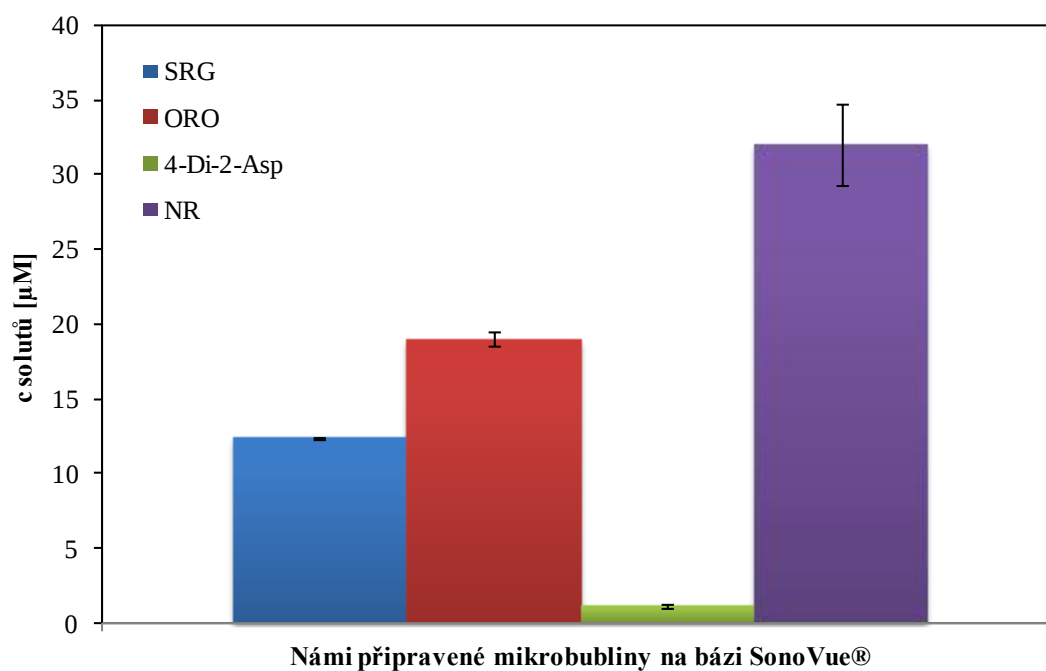
V DPPG.Na i v DSPC se nejvíce solubilizoval ORO a nejméně 4-Di-2-Asp, přičemž v DSPC se solubilovalo vždy větší množství solutů než v DPPG.Na. Lze tedy říci, že DSPC má vyšší hodnotu solubilizační kapacity než DPPG.Na.

Jak bylo řečeno, záleží víceméně na struktuře solubilizované látky. ORO se rozpouští víceméně v nepolárním prostředí a je schopna tvořit v polárním prostředí agregáty. SRG a 4-Di-2-Asp se rozpouští i v polárním prostředí. NR má zvláštní chování, protože se rozpouští více v nepolárním prostředí, ale není vhodná pro UV-VIS spektrofotometrii. K fluorescenční mikroskopii ale vhodná je.

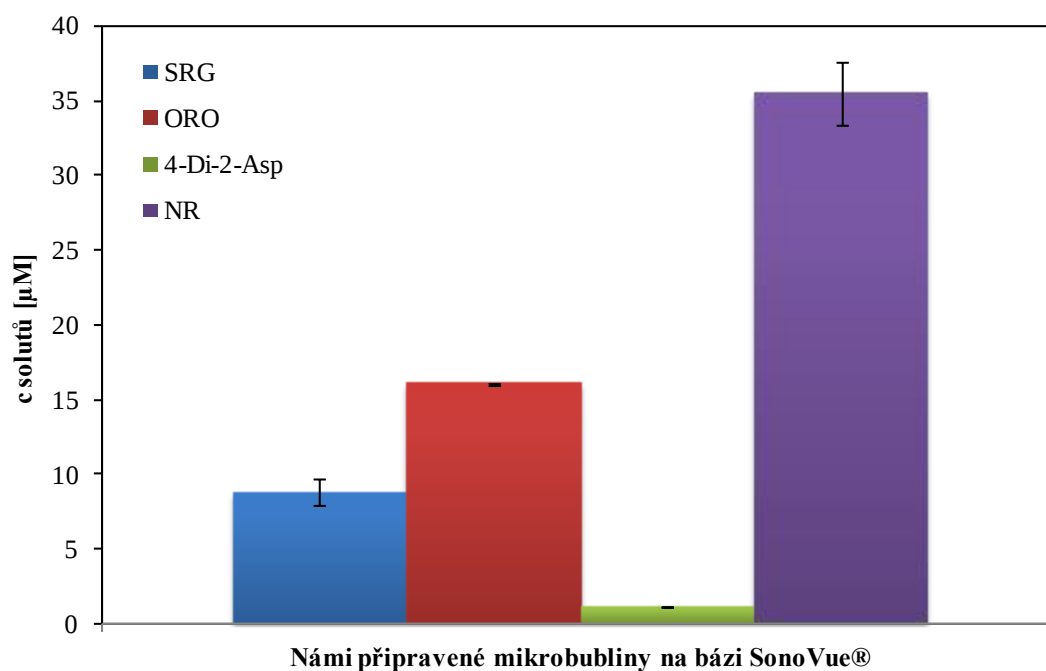
5.3.2 Solubilizační schopnosti námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue[®]

Na Obr. 34, Obr. 35 a Obr. 36 můžeme sledovat koncentraci solubilizovaných solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue[®]. Zajímalo nás, zda-li se bude měnit koncentrace za určitý časový interval, proto jsme také vzorky proměřovali po 48 a 72 hodinách. Námi připravené mikrobubliny na bázi SonoVue[®] se skládají z výše studovaných fosfolipidů, polyethylenglykolu a kyseliny palmitové. Koncentrace dipalmitoyl-fosfatidylglycerolu sodného i distearoyl-fosfatidylcholinu v mikrobublinách na bázi SonoVue[®] odpovídá hodnotě cca $30 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Polyethylenglykol je v mikrobublinách zastoupen asi v 130krát větším množství oproti fosfolipidům jako stabilizátor fosfolipidové vrstvy.

Obr. 34 znázorňuje koncentraci solubilizovaných solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue[®], která byla měřena hned druhý den po přípravě vzorků. Jak můžeme vidět v grafu, nejvíce se v mikrobublinách solubilizovala NR, naopak nejméně 4-Di-2-Asp. Koncentrace SRG v mikrobublinách na bázi SonoVue[®] po 24 hodinách činila $12,38 \pm 0,90 \text{ } \mu\text{M}$. Koncentrace ORO v mikrobublinách na bázi SonoVue[®] po 24 hodinách byla $18,99 \pm 0,46 \text{ } \mu\text{M}$, koncentrace 4-Di-2-Asp byla vypočtena na $1,09 \pm 0,13 \text{ } \mu\text{M}$ a koncentrace NR činila $32,04 \pm 2,71 \text{ } \mu\text{M}$. Pokud bychom měli porovnat hodnoty solubilizovaných koncentrací solutů v komerčním přípravku SonoVue[®] z bakalářské práce, kdy jsme používali taktéž SRG a ORO, s hodnotami naměřenými v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue[®], tak můžeme říci, že se SRG solubilizovalo více v komerčním přípravku SonoVue[®] po 24 hodinách. Naopak ORO se po 24 hodinách v komerčním přípravku takřka nesolubilizoval.



Obr. 34: Koncentrace solubilizovaných solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®, měřeno po 24 hodinách na třepačce

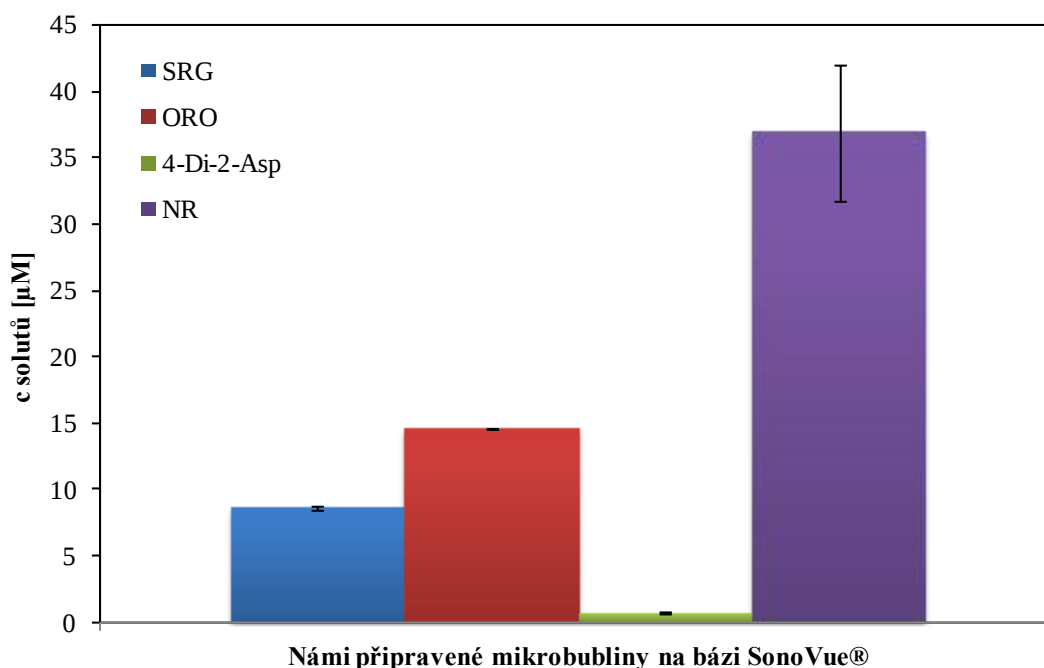


Obr. 35: Koncentrace solubilizovaných solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®, měřeno po 48 hodinách na třepačce

Obr. 35 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®, která byla měřena 48 hodin po přípravě vzorků, kdy byly

vzorky umístěny na třepačce. Oproti prvnímu měření po 24 hodinách můžeme vidět, že u SRG došlo k poklesu koncentrace přibližně o jednu třetinu, k poklesu koncentrace došlo také i u ORO. V případě 4-Di-2-Asp nemůžeme s jistotou říci, zda došlo k poklesu či nárůstu, protože hodnoty jsou vypočtené z hodnot absorbance, která byla bohužel nižší než 0,1. Koncentrace SRG v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® po 48 hodinách činila $8,76 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Koncentrace ORO v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® po 48 hodinách byla $16,05 \pm 0,10 \mu\text{M}$, koncentrace 4-Di-2-Asp byla vypočtena na $1,14 \pm 0,05 \mu\text{M}$ a koncentrace NR činila $35,50 \pm 2,16 \mu\text{M}$.

Obr. 36 zobrazuje koncentraci solutů solubilizovaných v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®, která byla měřena 72 hodin po přípravě vzorků. Oproti druhému měření po 48 hodinách můžeme vidět, že u SRG došlo k mírnému poklesu koncentrace, ale v rámci chyby vzhledem k chybovým úsečkám to nemusí být jednoznačné. Při měření koncentrace SRG v komerčním přípravku SonoVue® v bakalářské práci došlo po třech dnech také k poklesu více jak o dvě třetiny, avšak vzhledem k chybovým úsečkám se dalo též usoudit, že se koncentrace téměř neliší. Koncentrace ORO také klesla, mohlo by to být způsobeno zpětným uvolňováním barviva z mikrobublin zpět do roztoku během třepání. Z chybových úseček ve vzorcích s NR můžeme taktéž říci, že se koncentrace během třech dnů na třepačce téměř nemění. Koncentrace SRG v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® po 72 hodinách byla $8,59 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Koncentrace ORO v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue® po 72 hodinách byla $14,57 \pm 0,05 \mu\text{M}$, koncentrace 4-Di-2-Asp byla vypočtena na $0,73 \pm 0,09 \mu\text{M}$ a koncentrace NR činila $36,92 \pm 5,11 \mu\text{M}$. Grafy se vzájemným porovnáním koncentrací jednotlivých solutů v čase lze najít v příloze.



Obr. 36: Koncentrace solubilizovaných solutů v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®, měřeno po 72 hodinách na třepačce

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo studovat solubilizaci v sonografických systémech, shromáždit literární poznatky na solubilizaci různých typů látek v mikrobublinách, dále navrhnout vhodné experimenty pro ověření postupů solubilizace v systémech založených na komerčním výrobku SonoVue®. Pomocí fluorescenčních sond, jako modelových solubilizačních látek, stanovit schopnost solubilizace daných systémů a využití v jejich vizualizaci pomocí fluorescenční mikroskopie.

Vzorky námi připravených mikrobublin s 4-Di-2-Asp a NR byly vizualizovány pomocí optické a fluorescenční mikroskopie. Velikost námi připravených mikrobublin se pohybovala v řádech jednotek až desítek mikrometrů, na snímcích z optického mikroskopu lze vidět rozhraní mezi fosfolipidovou vrstvou a vrstvou polyethylenglykolu a případné hydrofobní interakce mezi jednotlivými mikrobublinami. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, do kterých míst se v mikrobublině vážou zmíněné dvě fluorescenční sondy. Sonda 4-Di-2-Asp bohužel nebyla správnou volbou kvůli značné afinitě k polárnímu i nepolárnímu prostředí, a proto byla k vizualizaci použita Nílská červeně. Bylo zjištěno, že převážná část Nílské červeně se solubilizovala v nepolární vrstvě mikrobublin, což bylo žádoucí.

Solubilizace v sonografických systémech byla zkoumána pomocí UV-VIS spektrofotometrie s využitím solutů Sudanu Red G, Oil Red O, 4-Di-2-Asp a Nílské červeně. Byly blíže studovány dva fosfolipidy, z nichž je s dalšími substancemi vyrobena kontrastní látka pro ultrasonografii s komerčním názvem SonoVue®. Prvním zkoumaným fosfolipidem byl dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný a druhým distearoylfosfatidylcholin. Dále byly studovány mikrobubliny stejného složení jako má komerční přípravek SonoVue®, které jsme si připravili v naší laboratoři.

Nejprve byla zjišťována hodnota molárních absorpčních koeficientů solutů v každém ze zmíněných fosfolipidů a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®. Systémy byly studovány v prostředí fyziologického roztoku (roztok NaCl o koncentraci 0,15 M). Vzorky byly namíchány tak, aby byla koncentrace fosfolipidů konstantní, a aby bylo dosaženo rostoucí koncentrace solutů. Při vlastním měření byl sledován růst hodnot absorbancí s rostoucí koncentrací hydrofobních solutů. Z hodnot absorbancí při vlnové délce $\lambda_{\max}$ byly vypočítány molární absorpční koeficienty solutů jako průměr ze tří měření a byla zjištěna směrodatná odchylka.

V další části byly studovány solubilizační schopnosti zmíněných systémů a to tak, že byla zjišťována koncentrace solutů solubilizovaných uvnitř lipozomů fosfolipidů a v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®. Vzorky byly namíchány tak, že koncentrace fosfolipidů měla rostoucí charakter, koncentrace námi připravených mikrobublin byla ve všech vzorcích stejná. Do každého vzorku bylo přidáno nadbytečné množství solutu. Výsledné koncentrace solubilizovaných solutů v každém systému jsou průměrem vždy ze tří měření. V obou zmíněných fosfolipidech se nejvíce solubilizoval Oil Red O a nejméně 4-Di-2-Asp. V dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodném došlo při vyšších koncentracích k supersaturaci lipozomů Nílskou červení, jinak můžeme říci, že s rostoucí koncentrací fosfolipidů roste koncentrace solubilizovaných solutů. Můžeme z dat také vyčíst, že distearoylfosfatidylcholin má lepší solubilizační schopnosti oproti druhému fosfolipidu.

Při zkoumání solubilizačních schopností námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue[®] se při prvním měření, po 24 hodinách, uvnitř mikrobublin solubilizovalo nejvíce Oil Red O a nejméně 4-Di-2-Asp, kdy hodnoty koncentrací 4-Di-2-Asp jsou vypočteny z absorbancí s hodnotou menší než 0,1. Po 48 hodinách došlo k poklesu koncentrace solubilizovaného Sudanu Red G a Oil Red O. Po 72 hodinách už nemůžeme díky chybovým úsečkám říci, zda došlo k poklesu koncentrace Sudanu Red G v námi připravených mikrobublinách. U Nilské červeně se také nedá k říci, zda došlo nárůstu či úbytku koncentrace během třech dní, protože chybové úsečky ukazují, že může nastat jak první, tak i druhá situace. Ve srovnání s bakalářskou prací, kdy byl solubilizován v komerčním přípravku SonoVue[®] SRG a ORO, můžeme konstatovat, že SRG se solubilizovalo více v komerčním výrobku, zatímco ORO v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue[®].

Závěrem lze konstatovat, že cíle diplomové práce byly splněny. Práce poskytla základní přehled o solubilizačních schopnostech námi připravených mikrobublin stejného složení jako má komerční přípravek SonoVue[®] a fosfolipidů, z kterých je tvořeno. Byly provedeny experimenty pro ověření postupů solubilizace v systémech založených na komerčním výrobku SonoVue[®]. Získané výsledky mohou být využity k dalším experimentům či výzkumu v oblasti zaměřené na solubilizaci léčiv v kontrastních látkách.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Beňačka, J.: *Atlas farebnej sonografie* [online]. 2000 [cit. 2016-02-16]. ISSN 1210-7883. Dostupné z: http://arl4.library.sk/arl-sllk/sk/detail-sllk_un_cat-r000864-Benacka-J-Atlas-farebnej-sonografie/
- [2] PRAGER, R. W., et al. Three-dimensional ultrasound imaging. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2010, 224.2: 193-223
- [3] B. H. Kevles, *Naked to the Bone: Medical Imaging in the Twentieth Century*. Addison-Wesley, Reading Massachusetts (1998).
- [4] Wood EW, Loomis AL. The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity. *Philos Mag* 1927;4(22):417–36
- [5] Somiya, Shigeyuki. (2013). *Handbook of Advanced Ceramics - Materials, Applications, Processing, and Properties* (2nd Edition) - 11.1.8.1.1 *Definition and Brief History of Ultrasound*. Elsevier. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BWUDRC/handbook-advanced-ceramics/definition-brief-history>
- [6] Kim, Yongmin Horii, Steven C.. (2000). *Handbook of Medical Imaging*, Volume 3 - Display and PACS - 6.1 Introduction. SPIE. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00875HE1/handbook-medical-imaging/extended-field-introduction>
- [7] CHENG, Xinfeng, Min ZHANG, Baoguo XU, Benu ADHIKARI a Jincal SUN. The principles of ultrasound and its application in freezing related processes of food materials: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2015, 27, 576-585 [cit. 2016-02-21]. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.04.015. ISSN 13504177.
- [8] HRAZDIRA, Ivo. *Stručné repetitorium ultrasonografie*. První. Praha: Audioscan, 2003. 112 s. 107/50.
- [9] OATES, C. *Cardiovascular Haemodynamics and Doppler Waveforms Explained*. New York : Cambridge University Press, 2008. ISBN 978-0-521-73473-8.
- [10] GONÇALVES, Idalina, Carla SILVA a Artur CAVACO-PAULO. Ultrasound enhanced laccase applications. *Green Chem* [online]. 2015, 17(3), 1362-1374 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1039/C4GC02221A. ISSN 1463-9262.
- [11] GONÇALVES, Idalina, Carla SILVA a Artur CAVACO-PAULO. Ultrasound enhanced laccase applications. *Royal society of chemistry* [online]. 2014, 2015(17), 1362-1374 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1039/C4GC02221A. ISBN 10.1039/C4GC02221A.
- [12] BENEŠ, Jiří, Daniel JIRÁK a František VÍTEK. *Základy lékařské fyziky*. 4. vydání. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2645-1.
- [13] LIU, Yiyao; MIYOSHI, Hirokazu; NAKAMURA, Michihiro. Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. *Journal of controlled release*, 2006, 114.1: 89-99

- [14] ZUNA, Ivan a Lubomír POUŠEK. *Úvod do zobrazovacích metod v lékařské diagnostice I*. Vyd. 2. V Praze: Nakladatelství ČVUT, 2000. ISBN 978-80-01-03779-9.
- [15] FERDA, Jiří. *Základy zobrazovacích metod*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-164-3
- [16] LIU, Yiyao; MIYOSHI, Hirokazu; NAKAMURA, Michihiro. Encapsulated ultrasound microbubbles: therapeutic application in drug/gene delivery. *Journal of controlled release*, 2006, 114.1: 89-99.
- [17] Aktuálně.cz. *Aktuálně.cz* [online]. 2009 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://zpravy.aktualne.cz/mikrobubliny/r~i:photo:254509/>
- [18] ARAMANOU, Marianna, et al. Genesis of ultrasonic microbubbles: a quick historical overview. *Current pharmaceutical design*, 2012, 18.15: 2115-2117
- [19] AZMIN, Mehrdad, et al. How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles. *Current pharmaceutical design*, 2012, 18.15: 2118-2134.
- [20] UNGER, Evan C., et al. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Advanced drug delivery reviews*, 2004, 56.9: 1291-1314
- [21] PRAGER, R. W., et al. Three-dimensional ultrasound imaging. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2010, 224.2: 193-223
- [22] Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *PubMed* [online]. 2004, č. 5, s. 245-256 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219539>
- [23] Microbubbles as Ultrasound Triggered Drug Carriers. *PubMed* [online]. 2008, č. 98, 1935–1961 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18979536>
- [24] KHEIR, J. N., L. A. SCHARP, M. A. BORDEN, et al. Oxygen Gas-Filled Microparticles Provide Intravenous Oxygen Delivery. *Science Translational Medicine* [online]. 2012, 4(140), 140ra88-140ra88 [cit. 2016-02-24]. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003679. ISSN 1946-6234.
- [25] LUKÁČ, Róbert. *Micro and Nanoparticles as Drug Carriers: Surface-Modified Microbubbles Used as Ultrasound Contrast Agents and Drug Carriers* [online]. Brno, 2014 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/271136/prif_d/Robert_Lukac.pdf. Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [26] AHMAD, Z, H.B ZHANG, U FAROOK, M EDIRISINGHE, E STRIDE a P COLOMBO. Generation of multilayered structures for biomedical applications using a novel tri-needle coaxial device and electrohydrodynamic flow. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2008, 5(27), 1255-1261 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1098/rsif.2008.0247. ISSN 1742-5689.
- [27] ZHAO, Dapeng, Lei LEI, Shuo WANG a Hemin NIE. Understanding cell homing-based tissue regeneration from the perspective of materials. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2015, 3(37), 7319-7333 [cit. 2016-03-02]. DOI: 10.1039/C5TB01188D. ISSN 2050-750x.
- [28] PEYMAN, Sally A., Radwa H. ABOU-SALEH, et. al. Expanding 3D geometry for enhanced on-chip microbubble production and single step formation of liposome modified microbubbles. *Lab on a Chip*. 2012, vol. 12, issue 21, s. 4544-4552. DOI: 10.1039/C2LC40634A.

- [29] Bartovská, L., Šišková, M.: *Micela (asociativní)* [online]. [cit. 2008-8-3]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [30] GONÇALVES, Idalina, Carla SILVA a Artur CAVACO-PAULO. Ultrasound enhanced laccase applications. *Royal society of chemistry* [online]. 2014, **2015**(17), 1362-1374 [cit. 2016-04-27]. DOI: 10.1039/C4GC02221A. ISBN 10.1039/C4GC02221A.
- [31] GAMSU, Gordon. RSNA index to imaging literature: an index of 34r journals-diagnostic radiology, nuclear medicine, ultrasound, magnetic resonance imaging, and radiation therapy [online]. *Oak Brook: Radiological Society of North America*, [195-?] [cit. 2016-02-24]. ISBN 0033-8419. Dostupné z: <http://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiol.2283032523>
- [32] SonoVue. *European medicines agency: Science medicines health* [online]. London: EMA, 2016 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000303/human_med_001059.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
- [33] SONOVUE®. *All-Biz Ltd and licensors* [online]. 2010–2016 [cit. 2016-02-25]. Dostupné z: <http://madrid-md.all.biz/sonovue-g3330#.Vs6qtOajGfM>
- [34] Rubaltelli L, Khadivi Y, Tregnaghi A, et al. Evaluation of lymph node perfusion using continuous mode harmonic ultrasonography with a second-generation contrast agent. *J Ultrasound Med* 2004; 23: 829–836
- [35] Yu M, Liu Q, Song HP, et al. Clinical application of contrast-enhanced ultrasonography in diagnosis of superficial lymphadenopathy. *J Ultrasound Med* 2010; 29: 735–740
- [36] JOHNSON, G.D., R.S. DAVIDSON, K.C. MCNAMEE, G. RUSSELL, D. GOODWIN a E.J. HOLBOROW. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1982, **55**(2), 231-242 [cit. 2016-03-03]. DOI: 10.1016/0022-1759(82)90035-7. ISSN 00221759.
- [37] Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A. Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(3):305-312
- [38] OLIVA, B. L. , BARRON, A. R.: *Basics of UV-Visible Spectroscopy* [online]. 2010 [cit. 2014-03-30]. Dostupné z: <http://cnx.org/content/m34525/latest/>
- [39] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [40] MALÁ, Michaela. *Solubilizační vlastnosti komplexů hyaluronan - tenzid*. Brno, 2014. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [41] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [42] SINICA, A.: *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra* [online]. 2010, [cit. 2014-04-8]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf

- [43] SOMMER, L.: *Analytická spektrometrie I.* 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 173 s.
- [44] Fluorescenční mikroskopie. *Chempoint* [online]. Brno: Vědci pro průmysl a praxi, 2016 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>
- [45] Geis NA, Katus HA, and Bekeredjian R. Microbubbles as a vehicle for gene and drug delivery: Current clinical implications and future perspectives. *Curr Pharm Design* 2012; 18(15): 2166-83
- [46] WU, Junru; NYBORG, Wesley L. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced drug delivery reviews*, 2008, 60.10: 1103-1116
- [47] Meairs S, Kern R, and Alonso A. Why and how do microbubbles enhance the effectiveness of diagnostic and therapeutic interventions in cerebrovascular disease? *Curr Pharm Design* 2012; 18(15): 2223-35
- [48] Salvatore V, Borghi A, and Piscaglia F. Contrast-enhanced ultrasound for liver imaging: recent advances. *Curr Pharm Design* 2012; 18(15): 2236-52.
- [49] CAI, Xiaowei, Fang YANG a Ning GU. Applications of Magnetic Microbubbles for Theranostics. *Theranostics* [online]. 2012, 2(1), 103-112 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.7150/thno.3464. ISSN 1838-7640.
- [50] LIU, Hao-Li, Ching-Hsiang FAN, Chien-Yu TING a Chih-Kuang YEH. Combining Microbubbles and Ultrasound for Drug Delivery to Brain Tumors: Current Progress and Overview. *Theranostics* [online]. 2014, 4(4), 432-444 [cit. 2016-03-06]. DOI: 10.7150/thno.8074. ISSN 1838-7640.
- [51] PEYMAN, Sally A., Radwa H. ABOU-SALEH, James R. MCLAUGHLAN, et al. Expanding 3D geometry for enhanced on-chip microbubble production and single step formation of liposome modified microbubbles. *Lab on a Chip* [online]. 2012, 12(21), 4544- [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1039/c2lc40634a. ISSN 1473-0197.
- [52] PHILLIPS, Linsey C., Alexander L. KLIBANOV, Douglas K. BOWLES, Michael RAGOSTA, John A. HOSSACK a Brian R. WAMHOFF. Focused in vivo Delivery of Plasmid DNA to the Porcine Vascular Wall via Intravascular Ultrasound Destruction of Microbubbles. *Journal of Vascular Research* [online]. 2010, 47(3), 270-274 [cit. 2016-03-07]. DOI: 10.1159/000258905. ISSN 1423-0135.
- [53] KAUEROVÁ, Zuzana, Róbert LUKÁČ, Pavel KOHOUT, Josef MAŠEK, Štěpán KOUDELKA, Jana PLOCKOVÁ, Marta VAŠÍČKOVÁ, Michal VLAŠÍN a Jaroslav TURÁNEK. A prototype 'Infucon' device for continuous infusion of microbubbles in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, 441(1-2): 92-98 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.12.026. ISSN 03785173.
- [54] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Baltimore, Maryland: Springer, 2006. ISBN 9780387463124.

- [55] SAXENA, Roopali, Sandeep SHRIVASTAVA, Sourav HALDAR, Andrey S. KLYMCHENKO a Amitabha CHATTOPADHYAY. Location, dynamics and solvent relaxation of a Nile red-based phase-sensitive fluorescent membrane probe. *Elsevier* [online]. 2014, **2014**(183) [cit. 2016-05-03]. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2014.04.007. ISBN 10.1016/j.chemphyslip.2014.04.007.
- [56] SABNIS, R. W. *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*. USA: John Wiley & Sons, 2015. ISBN 1119007097, 9781119007098.
- [57] PALANUWECH, J., R. POTINENI, R.F. ROBERTS, and J.N. COUPLAND, *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 55-62.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam zkratek

zkratka	význam
DPPG.Na	Dipalmitoylfosfatidylglycerol sodný
DSPC	Distearoylfosfatidylcholin
PEG	Polyethylenglykol
SRG	Sudan Red G
ORO	Oil Red O
4-Di-2-Asp	4-(4-Diethylaminostyryl)-1-methylpyridinium jodid
NR	Nilská červeň
NaCl	Chlorid sodný
PPD	Parafenylendiamin
PVA	Polyvinylalkohol
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
MOWIOL	Polyvinylalkohol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminometan
RGB	Red, Green, Blue

8.2 Seznam symbolů

symbol	význam
A	absorbance
ϵ	molární absorpční koeficient
c	koncentrace
mM	$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$
μM	$\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
l	tloušťka absorbující vrstvy
λ	vlnová délka
ϕ	zářivý tok
ρ	hustota prostředí
f_e	frekvence pozorované vlny
f_0	frekvence vlny generované
f_D	Dopplerova frekvence
v	relativní rychlost
c	rychlost šíření vlny

9 PŘÍLOHY

9.1 Solubilizační schopnosti dipalmitoylfosfatidylglycerolu sodného

Tab. 5: Koncentrace solubilizovaných solutů v DPPG.Na

c DPPG.Na [mg.l ⁻¹]	c SRG [μM]	odchylka [μM]	c ORO [μM]	odchylka [μM]
10	25,41	0,35	36,16	0,43
50	31,14	0,25	49,22	0,36
100	34,20	0,16	76,74	0,41
500	46,16	0,66	120,16	1,62
1 000	61,90	0,37	150,08	1,48
c DPPG.Na [mg.l ⁻¹]	c DiAsp [μM]	odchylka [μM]	c NR [μM]	odchylka [μM]
10	1,56	0,05	1,00	0,02
50	2,24	0,05	1,40	0,02
100	2,58	0,09	1,83	0,08
500	6,02	0,09	35,58	0,18
1 000	12,11	0,07	20,78	0,10

9.2 Solubilizační schopnosti distearoylfosfatidylcholinu

Tab. 6: Koncentrace solubilizovaných solutů v DSPC

c DSPC [mg.l ⁻¹]	c SRG [μM]	odchylka [μM]	c ORO [μM]	odchylka [μM]
10	11,49	0,28	33,27	0,10
50	13,44	0,06	45,28	0,27
100	20,78	0,12	53,98	0,08
500	47,10	0,91	139,01	0,59
1 000	73,54	0,62	200,44	7,72
c DSPC [mg.l ⁻¹]	c DiAsp [μM]	odchylka [μM]	c NR [μM]	odchylka [μM]
10	0,24	0,06	12,32	0,08
50	0,32	0,05	18,01	0,17
100	0,43	0,07	29,89	0,09
500	15,35	0,12	45,28	0,11
1 000	30,04	0,11	85,24	0,11

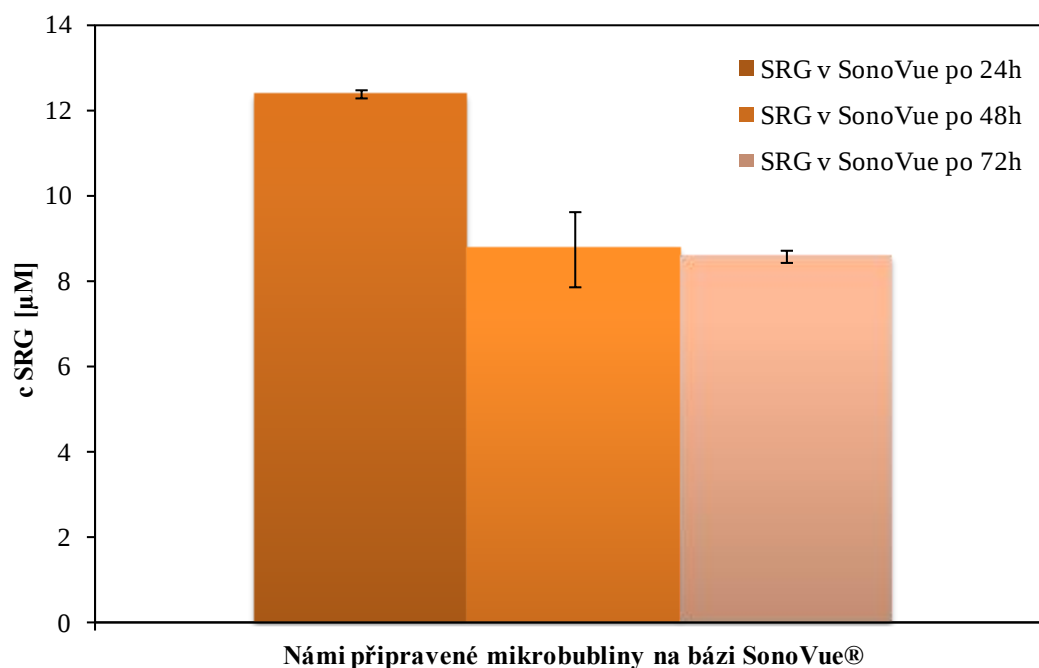
9.3 Solubilizční schopnosti námi připravených mikrobublin na bázi SonoVue®

Tab. 7: Koncentrace solubilizovaného SRG a ORO v námi připravených mikrobublinách po 24, 48 a 72 hodinách

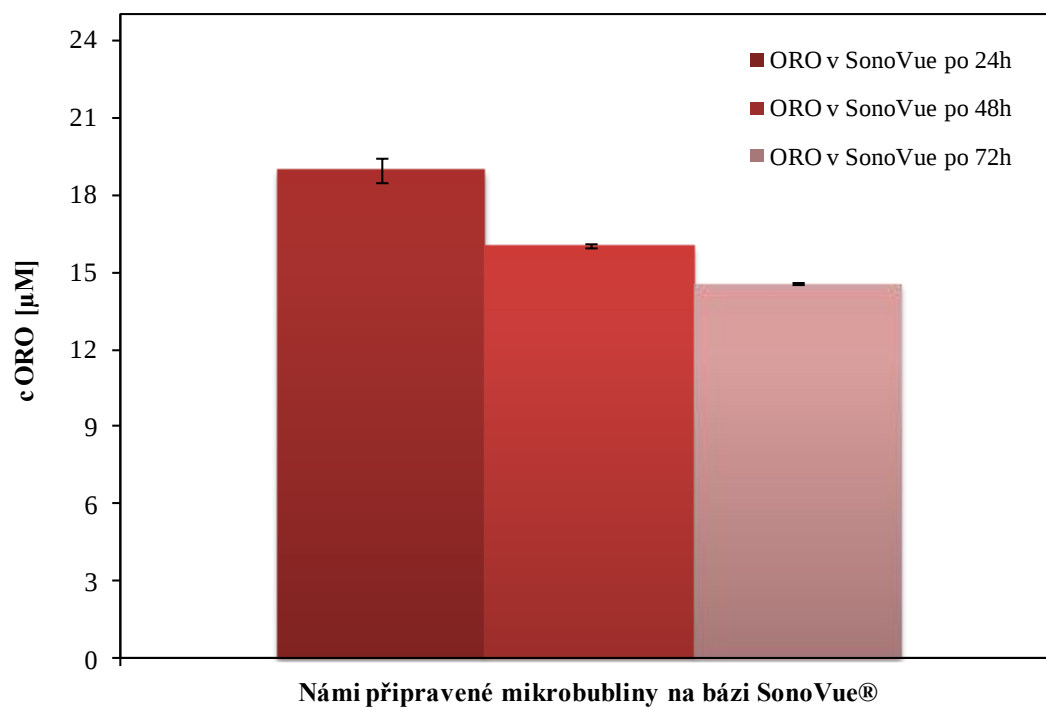
Koncentrace solutů	c SRG [μM]	odchylka [μM]	c ORO [μM]	odchylka [μM]
v SonoVue po 24h	12,38	0,90	18,99	0,46
v SonoVue po 48h	8,76	0,09	16,05	0,10
v SonoVue po 72h	8,59	0,15	14,57	0,05

Tab. 8: Koncentrace solubilizovaného 4-Di-2-Asp a NR v námi připravených mikrobublinách po 24, 48 a 72 hodinách

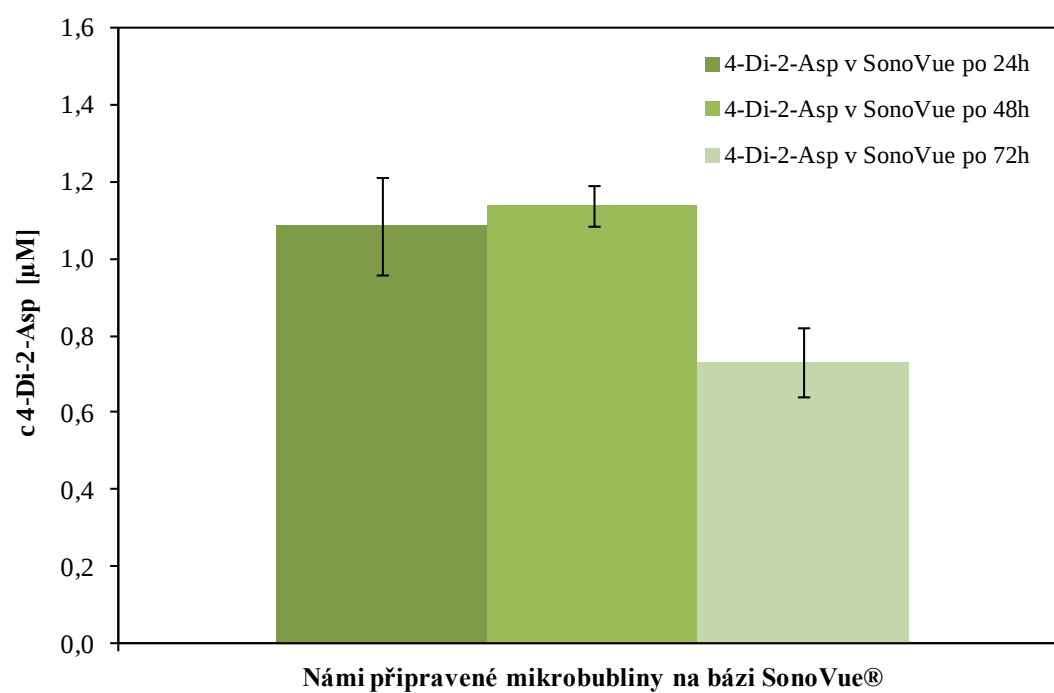
Koncentrace solutů	c DiAsp [μM]	odchylka [μM]	c NR [μM]	odchylka [μM]
v SonoVue po 24h	1,09	0,13	32,04	2,71
v SonoVue po 48h	1,14	0,05	35,50	2,16
v SonoVue po 72h	0,73	0,09	36,92	5,11



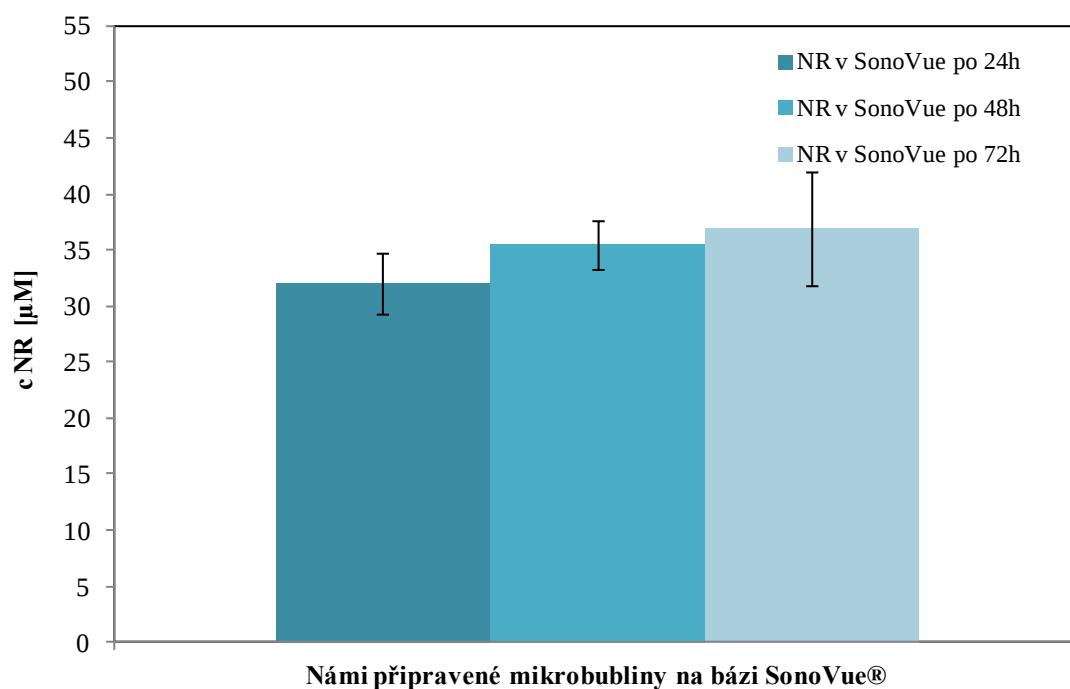
Obr. 37: Koncentrace SRG v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®



Obr. 38: Koncentrace ORO v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®



Obr. 39: Koncentrace 4-Di-2-Asp v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®



Obr. 40: Koncentrace NR v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®

9.4 Přístroje

Obr. 41: Koncentrace NR v námi připravených mikrobublinách na bázi SonoVue®



Obr. 42: Invertovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX71



Obr. 43: Optický mikroskop Nikon Eclipse Ci



Obr. 44: UV-VIS spektrofotometr Cary 50 Probe, Varian