

UNIVERZITA KARLOVA

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vývoj materiálu pro ultrazvukový mozkový
fantom na bázi agaru**

Development of material for agar-based ultrasound brain
phantom

Hradec Králové 2022

Petra Řehořková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Petra Řehořková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Monice Smékalové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, ochotu, trpělivost a v neposlední řadě za čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi MUDr. Michaelovi Bartošovi za jeho cenné připomínky, ochotu a čas. Poděkování patří i Mgr. Jaromíru Vachutkovi, Ph.D. za změření akustických parametrů.

Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	7
3	Zadání	8
4	Úvod.....	9
5	Teoretická část	11
5.1	Fantomy.....	11
5.1.1	Ultrazvukové fantomy	11
5.1.2	Materiály napodobující tkáň (TMM).....	12
5.1.3	Příklady komerčně dostupných ultrazvukových fantomů	17
5.2	Hydrogely.....	18
5.2.1	Polymerní hydrogely.....	19
5.2.2	Klasifikace polymerních hydrogelů.....	19
5.2.3	Fyzikálně zesíťované hydrogely	20
5.2.4	Chemicky zesíťované hydrogely	21
5.2.5	Synereze.....	23
5.2.6	Glycerol	23
5.3	Agar.....	24
5.3.1	Struktura.....	25
5.3.2	Extrakce	25
5.3.3	Mechanismus gelace	26
5.3.4	Fyzikální vlastnosti	27
5.4	Ultrazvuk.....	27
5.4.1	Zdroj.....	28
5.4.2	Šíření.....	28
5.4.3	Vlnový odpor (akustická impedance).....	30
5.4.4	Odraz a lom.....	30
5.4.5	Rozptyl.....	31
5.4.6	Útlum ultrazvukové energie.....	32
5.4.7	Základní charakteristika ultrazvukových obrazů	32
6	Experimentální část.....	35
6.1	Použité chemikálie	35

6.2	Použité přístroje	35
6.3	Použité metody	35
6.3.1	Příprava aqua conservans (konzervační voda).....	35
6.3.2	Obecný postup přípravy agarového gelu	36
6.3.3	Příprava vzorků pro měření reologických vlastností AG	36
6.3.4	Ztráta vody z AG	37
6.3.5	Příprava AG s částicemi Al ₂ O ₃ a SiC	39
6.3.6	Příprava AG s různým obsahem glycerolu	43
6.3.7	Akustické vlastnosti AG	44
7	Výsledky a diskuze	45
7.1	Ztráta vody z AG.....	46
7.2	Akustické vlastnosti AG	51
7.2.1	Rychlost šíření ultrazvuku	51
7.2.2	Analýza ultrasonogramů	54
7.2.3	Koeficient útlumu	67
8	Závěr	72
9	Literatura.....	74

1 Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Michael Bartoš

Posluchač: Petra Řehořková

Název diplomové práce: Vývoj materiálu pro ultrazvukový mozkový fantom na bázi agaru

Tato diplomová práce se zabývá vývojem materiálu pro ultrazvukový fantom na bázi agaru, který by pomáhal k osvojení zručnosti a zkušeností způsobem přibližujícím se reálné operaci. Cílem je formulace a optimalizace postupu přípravy agarového hydrogelu, hodnocení jeho akustických vlastností a ztráty vody během skladování.

Byla nalezena závislost mezi množstvím odpařené vody při skladování (4 týdny při teplotě 37 °C) a obsahem glycerolu, který přímo úměrně zpomaluje ztrátu vody ze vzorků. Na základě výsledků bylo pro měření akustických vlastností vybráno složení agarového gelu (AG) s 1 % agaru a 60 % glycerolu. Během tohoto experimentu také byla potvrzena mikrobiální stabilita AG.

Byly evaluovány výsledky měření akustických parametrů, a to konkrétně rychlosti šíření ultrazvuku, koeficientu útlumu a echogenity vzorků v závislosti na obsahu rozptylových částic Al_2O_3 a SiC. Ukázalo se, že každý typ částic ovlivňuje jiným způsobem stupeň šedi a koeficient útlumu a volbou množství částic lze regulovat akustické vlastnosti AG. Fantom se tak může skládat z oblastí s různým obsahem částic, čímž se od sebe odliší jednotlivé struktury mozku a tumoru na ultrasonogramu. Bylo také zjištěno, že rychlost šíření ultrazvuku vykazuje lineární závislost na obsaženém množství glycerolu.

2 Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Mentor: Mgr. Monika Smékalová, Ph.D.

Consultant: MUDr. Michael Bartoš

Student: Petra Řehořková

Title of Thesis: Development of material for agar-based ultrasound brain phantom

This thesis is concerned with the development of a material for an agar-based ultrasound phantom that would provide skill acquisition and experience in a manner approximating real surgery. The aim is to formulate and optimize the agar hydrogel preparation procedure, evaluate its acoustic properties and water loss during storage.

A dependence was found between the amount of water evaporated during storage (4 weeks at 37 °C) and the glycerol content, which slows down the water loss from the samples in direct proportion. Based on the results, an agar gel (AG) formulation with 1% agar and 60% glycerol was selected for the acoustic properties measurements. During this experiment the microbial stability of AG was confirmed.

The results of acoustic parameters measurements were evaluated, namely, speed of the ultrasound, attenuation coefficient and echogenicity of the samples as a function of content of scattering particles Al_2O_3 and SiC. It was shown that each type of particles affects grayscale value and attenuation coefficient in a different way and by choosing the amount of particles the acoustic properties of AG can be controlled. Therefore, the phantom can consist of regions with different particle content, allowing the different structures of the brain and tumor to be distinguished from each other on the ultrasonogram. It has also been found that the propagation speed of ultrasound shows a linear dependence on the amount of glycerol contained.

3 Zadání

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit optimální složení materiálu pro ultrazvukový fantom mozku na bázi agaru a hodnocení jeho akustických vlastností. Fantom bude používán pro nácvik ultrazvukem navigované operace tumoru mozku.

Postup práce lze rozdělit do následujících dílčích bodů:

- 1) Studium literatury týkající se ultrazvukových fantomů, hydrogelů a akustických parametrů ultrazvuku
- 2) Optimalizace přípravy agarového gelu bez a s částicemi Al_2O_3 a SiC
- 3) Provedení a vyhodnocení experimentu ztráty vody během skladování agarového gelu
- 4) Volba složení agarového gelu pro další experimenty na základě předchozích zjištění
- 5) Hodnocení akustických parametrů agarových gelů s částicemi (echogenita, koeficient útlumu, rychlost šíření ultrazvuku)

4 Úvod

Fantomy mají důležitou úlohu v mnoha disciplínách, tato práce se zaměřuje na vývoj materiálu pro fantomy, které budou využívány k získání operačních dovedností při excizi tumoru. Operace nádorů mozku je komplikovaným zákrokem, před kterým se zobrazovacími technikami vytváří mapa operačního pole. Během operace dochází k tzv. „posunu mozku“, což je nesourodá deformace vznikající po kraniotomii. Nezahrnutí tohoto jevu by znamenalo ztrátu přesnosti.¹ Pro navigaci v operačním poli se používá ultrazvuk. Nácvik tohoto postupu je nezbytný pro získání praktických zkušeností a zručnosti.

Mozek vykazuje nelineární elastické a mechanické charakteristiky, například tuhost mozkové tkáně není konstantní veličinou. Prevost et al. provedli jako experiment popisující rozdíl v dynamických mechanických vlastnostech prasečí mozkové tkáně *in vivo*, *in situ* a *in vitro*. Zaznamenali tužší odezvu *in situ* (obnažená mozková kůra mrtvého prasete, ponechána v lebce v původní konfiguraci) než *in vivo* (anestezované prasečí subjekty).^{2,3} Je to vysvětlováno interakcí cerebrospinální tekutiny s mozkovou tkání a zároveň i samotné viskoelastické vlastnosti mozkové tkáně.¹ Použití hydrogelu má tu výhodu, že po mechanické a senzorké stránce dobře mimikuje mozek a v závislosti na jeho složení je možné měnit i výslednou tuhost. V tomto případě bude použit agar jako hlavní složka vyvíjeného materiálu pro mozkový fantom. Je to surovina přírodního původu, která má mnoho aplikací. Zároveň je i jedním z nejdéle používaných materiálů k výrobě fantomů.⁴

Vyvíjený fantom se bude skládat z několika částí odpovídajících skutečné struktuře mozku. Tyto části se budou odlévat do forem zvlášť a výsledný fantom vznikne až po jejich propojení. Do fantomu bude také zahrnuta i část mimikující tumor. Ta bude během nácviku vyoperována pomocí ultrazvukové navigace. Fantom bude sloužit jako jednorázová nácviková pomůcka, proto je důležité, aby fantom nebyl finančně zvlášť náročný.

Porovnání testovaných gelů na základě zvolených reologických charakteristik a teplotní stabilitu gelů ve své diplomové práci rozebírala Marie Schneiderová.⁵ Náš výzkum spočíval v optimalizaci složení a přípravy gelového materiálu pro fantom

a v hodnocení akustických parametrů. Testům byly podrobeny hydrogely, které se lišily koncentrací agaru, množstvím částic a glycerolu.

5 Teoretická část

5.1 Fantomy

Fantom lze definovat jako model neobsahující lidskou tkáň, který se používá nejčastěji při výzkumu či výuce.⁶ Fantomy jsou nedílnou součástí hodnocení bezpečnosti přístrojů a jejich kalibrace. Dále se využívají při nácviku operačních a vyšetřovacích dovedností.⁷

Po lékařích je vyžadován určitý stupeň praktických dovedností, který by měli během studia získat. Přímá výuka na pacientech není ve všech případech vždy tou nejvhodnější variantou už proto, že bezpečnost pacientů je vždy kladena na první místo. Získání praktické zkušenosti je nutností, a právě kvůli tomu je vhodné využít fantomy, které vytváří simulační a kontrolované prostředí. Fantom nedokáže zcela nahradit taktilní či strukturní rysy lidské tkáně, obstojně je však dokáže napodobit. Jejich aplikace je ve výuce nenahraditelná, zvláště když přihlédneme k ostatním možnostem praktického nácviku. Využívají se buď zvířecí modely, které jsou anatomicky nepřesné, nebo kadávery (mrtvá těla), u nichž je problematická etická stránka věci a jejich prezervace. Dále mohou být využity simulátory virtuální reality, které jsou drahé, a jejich aplikace je omezená na méně invazivní laparoskopické zákroky.⁸

5.1.1 Ultrazvukové fantomy

Ultrazvukové fantomy můžeme rozdělit na dva typy. První napodobuje akustické vlastnosti tkáně, čehož může být využito při kvalitativním hodnocení diagnostických ultrazvukových zobrazovacích zařízení, nebo ke studiu interakce zvuku s tkání. Druhý typ fantomu, konstrukčně jednodušší, se využívá k nácviku biopsie kontrolovanou ultrazvukem.⁹

Ultrazvukové fantomy jsou jak komerčně dostupné, tak je možnost si určité typy připravit v laboratorních podmínkách. Výhodou připravených fantomů je, že mohou mít definované akustické vlastnosti a rozměry, které mohou být přizpůsobeny dle požadavků.¹⁰ Komerční fantomy mají oproti připravovaným standardní složení. Některé firmy však nabízí zakázkovou výrobu fantomů na základě potřeb zákazníka. Náklady na pořízení komerčně dostupného fantomu se pohybují okolo desítek až

stovek tisíců korun.^{11–13} Právě proto se upřednostňují pouze při neinvazivní výuce a ke kalibraci ultrazvukových zařízení.¹⁰

5.1.2 Materiály napodobující tkáň (TMM)

Fantomy se skládají z materiálů mimikujících tkáně (tzv. TMM = tissue mimicking materials). Mohou mít homogenní (např. tuk) nebo heterogenní (např. játra) charakter. Fantomy, které napodobují orgány nebo celé orgánové systémy, se označují jako antropomorfní.⁴

Tyto materiály mají akustické a reologické vlastnosti, které napodobují charakteristiky lidských tkání. Ideální TMM by měly být stabilní, jak z hlediska struktury, tak z hlediska mikrobiální nezávadnosti, a bezpečné (netoxické). Důležitou roli hraje i finanční stránka a dostupnost materiálu na trhu.¹⁴

V rámci akustických charakteristik musí materiál splňovat parametry, díky kterým se zformuje náležitý ultrazvukový obraz. Jednak je to rychlost, s jakou se vlnění šíří daným materiálem (hodnota závislá na teplotě), dále pak koeficienty útlumu a rozptylu vlnění.¹⁵

Níže jsou uvedeny vybrané materiály, které se používají k výrobě fantomů mimikujících různé tkáně.

- **Voda**

Nezákladnějším a nejjednodušším TMM je voda. Rychlost šíření zvuku v čisté vodě se dá zvýšit tak, aby mimikovala lidskou tkáň ($1540 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) přidáním 7,4 % ethanolu.¹⁶ Oproti měkké tkáni má 270krát nižší hodnotu atenuace ($0,002 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{MHz}^{-1}$). Voda se jako TMM nejčastěji využívá ve formě spojitého hydrofilního média v hydrogelech.⁴

Ve svém tekutém stavu se voda používá jako materiál napodobující krev. J. Boote a J. A. Zagzebski zkonstruovali fantom mimikující tkáň a krev k hodnocení dopplerovské ultrasonografie. Tkáň byla konstruována z hydrogelu, v němž byl homogenně rozptýlen grafitový prášek kvůli přizpůsobení akustického útlumu. Skrz tkáň byly vedeny latexové hadičky místo cév, ve kterých proudila tekutina, složená z vody, glycerolu a polystyrenových mikrokuliček. Odplyněná voda a glycerol byly

navzájem v takovém poměru, aby byla výsledná hustota kapaliny $1,043 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a zabránilo se tak sedimentaci mikrokuliček. Ty zde plnily funkci dosažení stejného zpětného rozptylu jako krev. Rychlost šíření zvuku v této kapalině dosahovala $1\,546 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ a koeficient útlumu měl hodnotu $0,1 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$ při 1 MHz .¹⁷

- **Polyakrylamid (PAA)**

PAA je polymer, lineární nebo zesíťovaný, jehož základní strukturní jednotku tvoří akrylamid (prop-2-enamid). Velkou nevýhodou tohoto materiálu je, že akrylamid je neurotoxická a potenciálně karcinogenní surovina. Již vytvořený polymer není toxický, ale za určitých okolních podmínek může docházet k jeho depolymeraci a k nežádoucímu výskytu volného monomeru.¹⁸ PAA hydrogel může být použit jako náhrada měkkých tkání při výrobě ultrazvukového fantomu. Ze všech materiálů se používá kvůli svým zdravotním rizikům nejméně.¹⁹ R. Cao a kol. porovnávali různě koncentrovaný agar s $1 \text{ \% Al}_2\text{O}_3$, PAA, PAA s $2 \text{ \% Al}_2\text{O}_3$ a silikonem pro výrobu ultrazvukových fantomů napodobujících kancerózní tkáň prostaty. PAA s částicemi Al_2O_3 byl i přes svou toxicitu díky svým elastickým vlastnostem vyhodnocen jako nejvhodnější materiál. Průměrná hodnota Youngova modulu karcinomu prostaty se pohybuje v rozmezí $58,0$ až $90,5 \text{ kPa}$. Největší shodu vykazovala směs PAA s $2 \text{ \% Al}_2\text{O}_3$ s hodnotou $104,3 \pm 5,6 \text{ kPa}$. Akustickým vlastnostem vyhovoval nejen PAA, ale i ostatní materiály, proto o aplikaci rozhodovaly jen elastické vlastnosti. Další výhodou hydrogelu z PAA je jeho rychlá příprava, za cca 15 minut vzniká *in situ* pevný gel.²⁰

- **Polyvinylalkohol (PVA)**

PVA je netoxický syntetický polymer, z něhož se fantomy připravují jako alternativní náhrada k tradičním materiálům (želatina, agar). PVA je snadno rozpustný ve vodě a pomocí techniky zvané „freeze and thaw“ lze z vodného roztoku PVA vytvořit gel. Vlivem zmrazování a rozmrazování dojde k zesítní, a tím se vytvoří pevný hydrogel. Výhodou takto připraveného materiálu je, že můžeme přizpůsobit akustické vlastnosti dvěma způsoby – přidávkem částic nebo právě počtem těchto zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů. Klasický PVA hydrogel (nepřipravený cyklickým zamrazováním) má nižší hodnoty atenuace a zpětného rozptylu než např. lidský mozek.²¹ S. Taghizadehovi a kol. se podařilo díky této speciální přípravě hydrogelu

a přídavku mastku sladit hodnoty atenuace, zpětného rozptylu a rychlosti zvuku a vytvořit ultrazvukový PVA fantom, který věrně mimikuje mozkovou tkáň. Další výhodou těchto fantomů je ta, že jejich příprava nepředstavuje potenciální zdravotní riziko. Suroviny potřebné k výrobě nejsou toxické (na rozdíl od PAA). Hydrogel z PVA je stabilní při dlouhodobém skladování při laboratorní teplotě. Při uchování v destilované vodě si udrží své jakostní znaky až po dobu jednoho roku. Nevýhodou je dlouho trvající příprava, jedna zmrazovací fáze trvá 12 h a pro dosažení optimálních akustických vlastností je jejich potřeba aplikovat hned několik.²¹

- **Želatina**

Želatina je živočišná bílkovina, která se získává alkalickou či kyselou hydrolyzou z kolagenu. Komerčně využívané zdroje kolagenu jsou vepřové či hovězí kůže, šlachy a kosti. Želatina má amfoterní charakter, což znamená, že se může ve vodném roztoku v závislosti na jeho pH chovat jako zásada nebo jako kyselina. Želatina vytváří reverzibilní hydrogely. Při jejich přípravě je důležitý mezikrok bobtnání želatiny, při kterém se jednotlivé částice hydratují a oddělí. Nabobtnalá želatina se při následném zahřívání (do 60 °C) lépe a rychleji rozpustí. Během chladnutí se z koloidní disperze vytváří pevný hydrogel, jelikož dochází ke změně konformace molekul z neuspořádaných klubek do šroubovic spojených vodíkovými můstky. Želatina má jako přírodní materiál značně variabilní charakteristiky, což znamená, že může vytvářet i různě pevné gely.²² Její gelační vlastnosti se dají kvantitativně vyjádřit pomocí tzv. bloom hodnoty. Ta odpovídá síle, která je potřebná k průniku specifického válečku do hloubky 12,7 mm testovaného 6,67% gelu, který byl po přípravě 16 h chlazen při teplotě 10 °C. Čím je bloom hodnota vyšší, tím je vyšší i bod tání a tuhnutí želatiny. Vysokobloomová želatina má navíc neutrálnější chuť a světlejší barvu.²³

Želatina patří k prvním TMM, které se začaly využívat pro ultrazvukové fantomy. Výhodou je její nízká cena a snadná příprava želatinových hydrogelů.²² Přídavkem dalších substancí pak můžou být vlastnosti výsledného hydrogelu upraveny. Například nemodifikovaná želatina má nevýhodu, že poskytuje tepelně nestabilní gely. Řešením je přidání síťovacích činidel (např. formaldehyd, glutaraldehyd), které vytváří chemické intramolekulární nebo intermolekulární vazby, což zvyšuje strukturní stabilitu gelu.²⁴ Zesíťovaná želatina má vyšší teplotu tání a je mechanicky odolnější –

její Youngův modul dosahuje vyšších hodnot.²⁵ Další limitací tohoto materiálu je náchylnost k bakteriální a plísňové kontaminaci, čemuž se dá předejít přidáním konzervačních látek.²⁶

E. L. Madsen a kol. roku 1978 publikovali práci, ve které využili želatinu jako TMM pro výrobu abdominálních antropomorfních fantomů. Modifikace želatiny spočívala v přidání alkoholu a grafitového prášku, díky kterým mohly být přizpůsobovány akustické charakteristiky fantomu. Různými koncentracemi n-propanolu bylo při pokojové teplotě možné dosáhnout rychlostí zvuku od 1 520 do 1 650 m·s⁻¹. Koeficient útlumu se v závislosti na koncentraci grafitu pohyboval v rozmezí 0,2 až 1,5 dB·cm při frekvenci 1 MHz. Jako konzervační látka byla použita kyselina p-metylbenzoová a p-propylbenzoová.²⁶

- **Agar**

Agar je stejně jako želatina levný materiál, který se používá k přípravě výukových modelů, na kterých si studenti zdravotnických oborů mohou vyzkoušet vybrané úkony, např. zavedení intravenózního katetru nebo paracentézu. Výhodou je, že se do nich dají zakomponovat i další struktury k vytvoření komplexnějšího modelu. Např. při současném použití netradičních materiálů jako je latexový balonek může model sloužit k simulaci např. thorakocentézy, což je zákrok sloužící k odstranění tekutiny nebo vzduchu z pleurálního prostoru. Agar má oproti želatině nespornou výhodu v tom, že je teplotně stabilnější. Agarové modely lze skladovat při pokojové teplotě. Je ale důležité zamezit přístupu vzduchu, aby nevyschly. Další výhodou je opakované použití agarového hydrogelu. Je možné ho roztavit a znovu použít, gelující vlastnosti agaru (narozdíl od želatiny) nejsou znehodnoceny.²⁷

V normách Mezinárodní elektrotechnické komise (IEC) můžeme nalézt standardní recept TMM agaru, který se používá při posuzování bezpečnosti a vlastností ultrazvukových diagnostických a terapeutických zařízení. Jeho poměrné složení je následující: glycerol (11,21 %), deionizovaná voda (82,95 %), benzalkonium chlorid (0,47 %), SiC (0,53 %), 0,3 μm Al₂O₃ (0,88 %), 3,0 μm Al₂O₃ (0,94 %) a agar (3,08 %). Je doporučováno ho skladovat v uzavřené nádobě ve směsi vody (88,1 %) a glycerolu (11,9 %) při teplotě 18 až 25 °C.²⁸ Benzalkonium chlorid slouží k zajištění mikrobiální stability. Částice Al₂O₃ a SiC a glycerol slouží k variaci akustických

vlastností. Dle standardu jsou ideální hodnoty TMM následující: rychlost zvuku $1\,540\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, útlum $0,5\text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{MHz}^{-1}$ a hustota $1\,050\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$.^{10,28} Ultrazvukové vlastnosti jsou závislé na teplotě, rychlost zvuku má tendenci se zvyšující se teplotou růst a útlum naopak zase klesat.⁴ Další proměnná, na které závisí akustické vlastnosti tohoto TMM, je proces přípravy, který je v normách IEC nejednoznačně definován. R. Souza a kol. proto vytvořili standardní operační postup pro přípravu, aby byla zajištěna reprodukovatelnost receptury. Vymezili zejména proces zahřívání a homogenizace.¹⁰

- **Gellanová guma**

Gellanová guma je polysacharid vznikající fermentačním procesem bakterií *Sphingomonas paucimobilis*. Primární strukturu tvoří tetrasacharidová jednotka skládající se z glukosy, kyseliny glukuronové a rhamnosy v poměru 2:1:1. Výhodou gellanové gumy je, že se díky výrobnímu postupu dá produkovat v konzistentní kvalitě bez větších odchylek. Oproti agaru nebo želatině je jí potřeba menší množství k přípravě hydrogelu se stejnou elasticitou. Pevný gel vytváří gellanová guma už v 0,05% koncentraci a zároveň může vytvářet i hydrogely s vylepšenými charakteristikami. Po přidání jednomocných nebo dvoumocných iontů do roztoku gellanové gumy dochází k formaci pevnějších a teplotně stabilnějších gelů, protože vznikají mezi jejími dvoušroubovicemi tzv. spojovací zóny z iontových můstků.²⁹

Cortela a kol. použili gellanovou gumu jako TMM pro hodnocení terapeutického ultrazvuku s vysokou intenzitou (tzv. HITU). Hypertermie je jednou z léčebných variant aplikujících se u benigních či maligních lokalizovaných nádorů. Před uvedením HITU do klinické praxe je nutné ověřit jeho bezpečnost a účinnost. Za tímto účelem byl vytvořen fantom z gellanové gumy, do kterého byly přidány další komponenty (sorban draselný, propan-1-ol, skleněné kuličky a termochromický prášek) z důvodu dosažení akustických a termických vlastností nádorové tkáně. Výhodou tohoto TMM je dlouhá životnost a nízké výrobní náklady. Zároveň je možné jeho opakované použití, což z něj dělá výhodnější TMM oproti např. želatině.³⁰

5.1.3 Příklady komerčně dostupných ultrazvukových fantomů

- **Blue Phantom™**

Blue Phantom™ je produktová řada ultrazvukových tréninkových fantomů, které vyrábí společnost CAE Healthcare. Portfolio Blue fantom™ obsahuje velkou škálu výukových modelů sloužící k nácviku v oborech jako je např. anestezie, kardiologie, pediatrie, pneumologie či gynekologie. Vizuální realističnost fantomů je různorodá, záleží na konkrétním typu modelu, může však dosáhnout i vysokého stupně věrohodnosti. Blue phantom™ modely jsou vyrobeny z tzv. Simulex™ tkáně, která napodobuje akustické vlastnosti lidské tkáně. Zároveň má jednu specifickou vlastnost a to, že je samozacelující, po vpichu jehly v materiálu nezůstává její viditelná dráha.¹² Schofer a kol. provedli studii, která hodnotila ultrazvukový fantom cévy (Blue Phantom 2 Vessel Original Ultrasound Training Model) jež se používá k simulaci zajištění cévního přístupu. Předmětem hodnocení byl akustický přenos, kvalita obrazu a celková integrita po opakovaném použití fantomu. Bylo zjištěno, že model disponuje skvělou odolností, po 1 000 vpiších jehlou do plochy 1 cm² byla zachována integrita a kvalita ultrazvukového obrazu. S ohledem na celou délku cévy a výsledky hodnocení je finální životnost fantomu odhadována na 25 000 vpichů.³¹

- **Zerdine®**

Společnost CIRS (Computerized Imaging Reference Systems, Inc.) vyrábí tkáňové ekvivalenty se širokým využitím. Nabízí nejen hotové fantomy, ale i možnost individuálně navržených pro speciální aplikace. Základem většiny ultrazvukových fantomů je hydrogel Zerdine®. Jedná se o univerzální materiál, který může být dále přizpůsobován k dosažení potřebných akustických, mechanických či tepelných vlastností. Dle potřeby můžou mít následující specifikace: rychlost zvuku 1 480 až 1 650 m·s⁻¹, koeficient útlumu 0,1–1,5 dB·cm⁻¹·MHz⁻¹, Youngův modul 3 až 200 kPa.¹³

Fantom vyrobený z hydrogelu Zerdine® nemusí být uchováván při nízkých teplotách. Další jeho výhodou je elasticita, protože se při použití vyššího tlaku při manipulaci nepoškodí. Zerdine® může být vytvrzován ve vrstvách, což z něj dělá ideální materiál pro tvorbu komplexních fantomů. Jeho nevýhoda spočívá v tom, že pokud není

správně skladován, může teoreticky dojít i k jeho vysychání, protože se jedná o hydrogel. Životnost těchto fantomů je tedy závislá na uchování ve speciálních pouzdrech.¹³

- **HE Gel™**

Společnost Sun Nuclear nabízí ultrazvukové fantomy sloužící k výuce a k hodnocení kvality ultrazvukových systémů. Matrix těchto fantomů tvoří patentovaný HE Gel™, který poskytuje vysoce kvalitní a reprodukovatelné snímky. Stabilita materiálu umožňuje testování různých snímačů a systémů ve frekvenčním rozsahu 2–18 MHz. Materiál poskytuje nelineární závislost útlumu na hodnotě frekvence. Bod tání HE Gel™ je více než 100 °C a rychlost šíření zvuku 1 540 m·s⁻¹.¹¹

5.2 Hydrogely

Hydrogely jsou bikoherentní soustavy tvořené hydrofilním médiem (zejména vodou nebo vodným roztokem alkoholů) a gelotvornými látkami, které vnější hydrofilní prostředí imobilizují a vytvoří typickou gelovou strukturu. Gelotvorné látky mohou být např. polymery, tenzidy nebo i pevné částice.³² Minimální koncentrace, která je potřebná pro tvorbu gelu, je odvozená od vlastností a struktury gelotvorné látky.³³ Obecně jsou gely schopny pojmout velké množství hydrofilního média oproti suché hmotnosti.³⁴ Pro gely je typický plastický tok, který nastává po překonání určité hodnoty posuvného napětí tzv. meze toku.³³

Hydrogel na bázi polymerů se může vytvořit pouze za předpokladu, že se polymerní síť, vytvořená kovalentními vazbami či fyzikálními interakcemi, nebude rozpouštět v hydrofilním médiu.³⁵ Celkový objem vody obsažené v hydrogelu se dělí na primárně a sekundárně vázanou vodu a na tzv. „volnou vodu“. Primární voda nejdříve hydratuje hydrofilní skupiny. Díky tomu dojde k obnažení hydrofobních skupin polymeru, které hydratuje tzv. sekundárně vázaná voda. Poté, co nastane prvotní interakce mezi hydrofilními a hydrofobními částmi polymeru a vodou, tak dochází k absorpci vody, která je založená na osmotickém principu, až do dosažení rovnovážného stavu. Tato dodatečně absorbovaná voda, která vyplňuje prostor mezi řetězci, se nazývá „volná voda“.³⁵

V rámci určení rovnovážného stavu a kinetiky absorpce hrají roli strukturní charakteristiky polymeru, ať už je to chemická povaha funkčních skupin, molekulová hmotnost polymerních řetězců nebo stupeň jeho zesíťování. K vnějším ovlivňujícím parametrům patří teplota a tlak prostředí, typ rozpouštědla a jeho pH a iontová síla.³⁶

5.2.1 Polymerní hydrogely

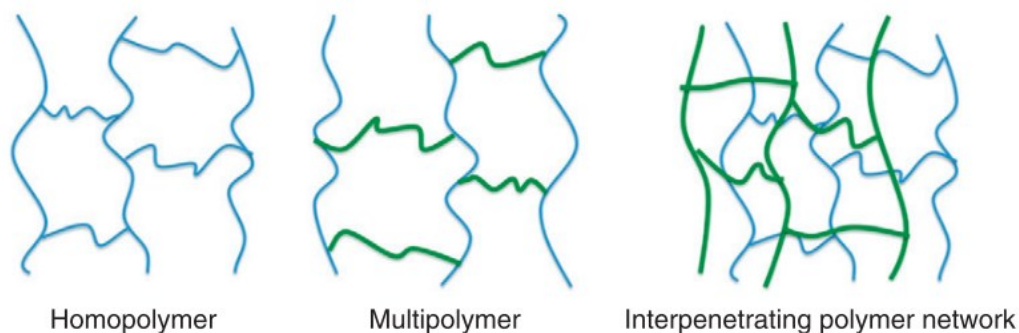
Polymerní hydrogely mohou být přírodního, syntetického nebo hybridního původu. Přírodní polymery mají nejčastěji strukturu proteinů nebo polysacharidů. Příklady bílkovinných materiálů jsou želatina a kolagen. Polysacharidový hydrogel může být vytvořen např. z agaru, alginátu, chitosanu nebo kyseliny hyaluronové.³⁶ Poslední dobou jsou přírodní materiály nahrazovány syntetickými kvůli jejich výhodnějším vlastnostem – mohou poskytovat hydrogely s vyšší životností a pevností.³⁷ Oproti přírodním hydrogelům mají tu výhodu, že jsou jejich vlastnosti lépe přizpůsobitelné a lze získávat šarže s nižší variabilitou. Jejich nevýhoda tkví v použití reaktantů, které mohou být obsaženy v gelové síti v nezreagovaném stavu. Důležitým krokem je tedy čištění finálních syntetických hydrogelů. Příklady syntetických polymerů jsou PVA, PAA, polyetylenglykoly (PEG), apod. Hybridními gely jsou takové gely, které vznikají kombinací přírodních a syntetických polymerů.³⁶

5.2.2 Klasifikace polymerních hydrogelů

Hydrogely se na základě struktury polymerů na dělí na homopolymerní, kopolymerní a na složené z interpenetrujících polymerních sítí (viz obrázek č. 1).³⁴

- Homopolymerní hydrogely jsou složeny z jednoho typu monomerních jednotek. Stupeň zesíťování je určován druhem polymerizace, stejně tak jako charakteristikou monomeru.³⁴
- Kopolymerní hydrogely se skládají z minimálně dvou druhů monomerů. Kopolymerní řetězec může mít střídavé, náhodné, blokové nebo roubované uspořádání.³⁴
- Hydrogely z interpenetrujících polymerních sítí (IPN) jsou tvořeny minimálně dvěma individuálními sítěmi polymerů.³⁴ Navzájem jsou spojeny pouze fyzikálními interakcemi, nedochází mezi nimi ke vzniku kovalentních vazeb.³⁶

Pokud je jednou ze složek nezesítnění polymer, tak se toto uspořádání označuje jako semi-IPN.³⁴



Obr. č. 1: Klasifikace hydrogelů podle struktury.³⁶

Hydrogely lze dále rozdělit dle typu jejich vzniku do dvou kategorií, a to na fyzikálně a chemicky zesítněné. Chemicky zesíťované hydrogely neboli chemické hydrogely mají mezi polymerními řetězci pevné kovalentní vazby formující polymerní síť. Fyzikálně zesíťované hydrogely neboli fyzikální hydrogely vznikají díky dočasnému propojení. Může se jednat o mechanické propletení polymerů nebo může přímo mezi polymery docházet k fyzikálním interakcím (např. iontové interakce nebo vodíkové vazby).^{34,37} Zesíťované hydrogely mají lepší mechanické vlastnosti jako je tuhost, pevnost v tahu a vyšší odolnost proti deformaci. Zvyšuje se i stabilita vůči vyšším teplotám a chemické či enzymatické degradaci.³⁸

5.2.3 Fyzikálně zesíťované hydrogely

Hydrogely, které jsou tvořeny fyzikálně vznikající polymerní sítí, se mohou také označovat jako reverzibilní, protože je lze snadno převést zpět na sol, např. dodáním tepelné energie. Díky faktu, že se při jejich výrobě nepoužívají síťovací činidla, která jsou často toxická, je tento typ hydrogelu populární pro širokou škálu aplikací.³⁹

Metody přípravy fyzikálně zesíťovaných hydrogelů jsou např. zahřátí a ochlazení, zmrazování a rozmrazování (Freeze-Thaw cycle), iontová interakce a tvorba vodíkových můstků, tepelně indukovaná agregace (zrání) a tvorba stereokomplexů.

- **Zahřátí a ochlazení**

Při vyšších teplotách ve vodné disperzi zaujímají řetězce určitých polymerů tvar náhodného klubka. Při ochlazování roztoků dochází k jejich strukturnímu uspořádání do šroubovic, které se dále pomocí vodíkových můstků sdružují a tím vytváří tzv. „spojovací zóny“. Typickým příkladem je agar a želatina. Rozdíl mezi nimi spočívá v typu vytvořené šroubovice, agar vytváří dvoušroubovice, želatina trojšroubovice.⁴⁰ Rozdílná je i max. teplota, na kterou je vhodné směs při přípravě zahřát, u želatiny je výrazně nižší (cca 60 °C) z důvodu její bílkovinné struktury.²²

- **Iontová interakce**

K tvorbě nerozpustné polymerní sítě může docházet díky iontovým interakcím po přidání dvojmocných či trojmocných iontů.⁴¹ Jako příklad ionotropního gelu lze uvést alginát – lineární polysacharid jehož monomerními jednotkami jsou kyseliny D-manuronová a L-guluronová. Mezi vápenatými kationty a karboxylovými skupinami alginátu vzniká iontová vazba. Její charakteristické uspořádání se označuje jako „Egg – Box“ model.⁴²

- **Vodíkové můstky**

Typickým příkladem je karboxymethylcelulosa (CMC), která vytváří fyzikální hydrogel prostřednictvím vodíkových můstků. K zesílení dochází během dispergace sodné soli CMC ve zředěném roztoku kyseliny chlorovodíkové. V principu jde o obnovení karboxylové funkční skupiny CMC, které nastane po nahrazení sodíku vodíkem pocházejícím z kyselého roztoku.³⁹ Mezi karboxyly se poté tvoří vodíkové můstky, což zapříčiňuje snížení rozpustnosti CMC v médiu a vznik hydrogelu.⁴³

5.2.4 Chemicky zesíťované hydrogely

V chemicky zesíťovaných hydrogelech jsou polymery vázány kovalentními vazbami. Tento typ hydrogelů se také označuje jako ireverzibilní, protože vznikající síť je mechanicky pevná a k jejímu rozpuštění může dojít až po rozštěpení kovalentních vazeb.^{34,39} Ovlivněna může být struktura, mechanická pevnost, biokompatibilita a biodegradabilita výsledného gelu.^{37,38}

Kovalentní vazba mezi polymery může vznikat díky reakcím funkčních skupin (např. OH, COOH a NH₂) polymerů se síťovacími činidly, jako je např. glutaraldehyd, dihydrazid kyseliny adipové, epichlorhydrin, atd.⁴¹ To, za jakých podmínek bude reakce probíhat, závisí také na reaktivitě funkčních skupin. Např. polymer s hydroxylovou funkční skupinou (agar) může být zesíťován síťovadlem (na bázi aldehydu) při nastavení drastických podmínek (nízké pH, vysoká teplota). Oproti tomu polymer obsahující aminovou funkční skupinou (želatina) lze zesíťovat se stejným síťovadlem při výrazně mírnějších podmínkách, protože vznikají takzvané Schiffovy báze.⁴⁴

Příkladem chemického síťování mohou být kompozitní hydrogely vzniklé chemickým a radiačním robováním a enzymatickým nebo radiačním síťováním.

- **Enzymatické síťování**

Tato technika využívá enzymy coby síťovací činidla. Samotné síťování je rychlé (cca až 20 minut) a nejčastěji jsou využívány enzymy jako transglutamináza, tyrozináza, lisyloxidáza, fosfatáza nebo peroxidáza. Předností této metody je absence toxických síťovadel, což je výhodné pro hydrogely k použití v tkáňovém inženýrství.³⁸ J. J. Sperinde a kol. publikovali práci, kde demonstrují tvorbu hydrogelové sítě zesíťováním substituovaného PEG s polypeptidem obsahujícího lysin působením přirozeného tkáňového enzymu transglutaminázy. Tento enzym katalyzuje vznik amidové vazby mezi polymery reakcí mezi γ -karboxamidovou skupinou modifikovaného PEG a mezi aminoskupinou lysinu. Velkou výhodou tohoto procesu je, že gelace probíhá za mírných podmínek.⁴⁵

- **Radiační síťování**

Radiační síťování probíhá po vystavení polymeru zdroji záření (gama, beta záření nebo rentgenovému záření), při němž dochází k tvorbě polymerních volných radikálů. Tato metoda je velmi používaná, protože se při ní nemusí do reakční směsi přidávat další chemické látky, aby bylo dosaženo zesíťování. Záření může působit přímo tj. homolytické štěpení vazby polymeru nebo nepřímo skrze radiolýzu vody, jejíž

produkty mohou interagovat s polymery za vzniku makroradikálů.⁴¹ Jejich rekombinací pak vzniká nová polymerní síť.⁴⁴

5.2.5 Synerese

Synerese je projev nestability gelů. Při jejich stárnutí dochází k vyloučení vody na povrch, protože se síťovitá struktura gelu smršťuje. K tomuto jevu dochází, i když je gel skladován bez přístupu vzduchu v uzavřené nádobě. Základním faktorem, který má vliv na syneresi, je koncentrace gelovací látky. Gely s koncentrací pod 1 % vyloučí větší množství vody než ty s vyšší koncentrací. To souvisí i s pevností gelu, čím vyšší je, tím menší synerese nastává. Synerese se naopak zvyšuje při působení vnějšího tlaku na gel.⁴⁶

5.2.6 Glycerol

Glycerol neboli propan-1,2,3-triol je vícesytný alkohol s charakteristickými fyzikálními vlastnostmi.⁴⁷ Je cennou surovinou pro mnoho odvětví (humektant, rozpouštědlo, plastifikátor, mazivo, atd). Je stabilní při běžných skladovacích podmínkách.⁴⁸

Glycerol je součástí živočišných a rostlinných tuků a olejů. Vyšší výtěžek poskytují oleje a tuky s kratšími uhlíkovými zbytky (do 14 uhlíků). Glycerol můžeme nalézt i v buněčné struktuře ve formě lecitinu a cefalinu.⁴⁹ Synteticky se glycerol vyrábí z propylenu. Nejvíce průmyslově využívaná syntéza je přes meziprodukty allylchlorid a epichlorhydrin.⁴⁸

Glycerol je bezbarvá sladká viskózní kapalina bez zápachu, omezeně rozpustná v acetonu, diethyletheru a dioxanu a téměř nerozpustná je v uhlovodících, v alkoholech s dlouhým řetězcem, mastných olejích a halogenovaných rozpouštědlech (chloroform).⁴⁷ Díky třem hydroxylovým skupinám je glycerol hygroskopický a rozpustný ve vodě a v jednoduchých alkoholech.⁴⁹ Glycerol je díky fyzikálním vlastnostem používán při výrobě hydrogelových fantomů ze tří hlavních důvodů. Jednak ke stabilizaci hydrogelů jako ochranu před vysycháním.^{36,49} Dále je to z důvodu úpravy akustických vlastností.⁵⁰ Třetím důvodem je plastifikační funkce ovlivňující mechanické vlastnosti gelů, která zvyšuje jejich plasticitu a poddajnost.⁵¹

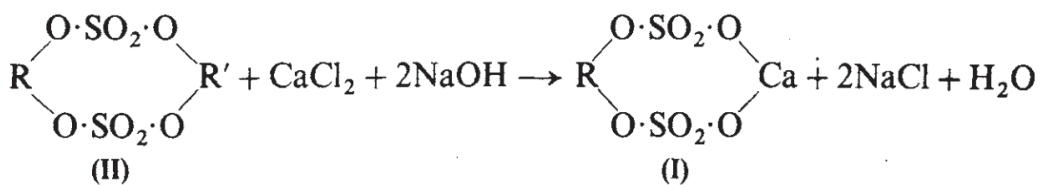
5.3 Agar

Agar je směs polysacharidů získávaná z červených řas. Mezi hlavní zdroje agaru patří řasy z čeledí *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Pterocladaceae* a *Gelidiellaceae* (obrázek č. 2).⁵² Agar je komerčně dostupný ve formě jemného prášku, vloček, vláken nebo tyčinek. Využití agaru je široké, používá se např. jako živné médium pro bakterie a rostliny, dále pak v potravinářství a ve farmacii.⁵³



Obr. č. 2: Červené řasy z čeledi *Gracilariaceae*, (a) *G. changii*, (b) *G. salicornia*, (c) *G. edultis*.⁵²

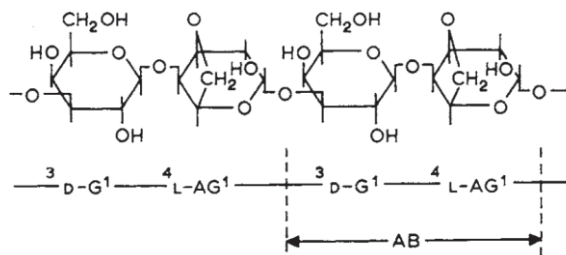
Vzhledem k proměnlivým faktorům (druh, místo a období sběru, podmínky extrakce a zpracování) se u agarových extraktů vyskytují různé obsahy 3,6-anhydro-L-galaktózy a rozmanité velikosti molekul. Tyto faktory mohou vést k odchylkám v gelačních vlastnostech agaru. Při konstantní koncentraci agaru mohou vznikat různě pevné gely.⁵⁴ Surový polysacharid získaný z červených mořských řas obsahuje méně než 50 % 3,6-anhydro-L-galaktózy a pro zvýšení výtěžku se používá alkalická předúprava.⁵⁵ Před mechanickým čištěním a samotnou extrakcí se řasy ponoří do 85 °C lázně s hydroxidem sodným. Koncentrace hydroxidu a doba, po jakou jsou řasy v lázni ponechány, jsou variabilní dle druhu a tuhosti řasy. Při této předúpravě se z agaroidního prekurzoru obsahujícího sulfát získá substituční reakcí (viz obrázek č. 3) volný řetězec agarosy. Tento sulfát se označuje jako agarosa sulfát nebo agaropektin.⁴⁶



Obr. č. 3: Reakční schéma alkalické úpravy agaropektinu, kdy R a R' jsou polysacharidové řetězce agaru.⁴⁶

5.3.1 Struktura

Agar se skládá ze dvou skupin polysacharidů – z agarosy, neutrálního polysacharidu, a z agaropektinu, což je zjednodušený termín pro ionický polysacharid obsahující kyselé funkční skupiny. Větší procentuální podíl v agaru tvoří agarosa, která na rozdíl od agaropektinu zodpovídá za gelační vlastnosti.⁵³ Základní strukturální jednotku všech agarových polysacharidů tvoří disacharid agarobiosa (obrázek č. 4), neboli 4-O-β-D-galaktopyranosyl-3,6-anhydro-α-L-galaktopyranosa.⁵⁶ Struktura agaropektinu je složitější než struktura agarosy a je méně známá. Skládá se z různého procenta esterových sulfátů, kyseliny D-glukuronové a malého množství kyseliny pyrohroznové. Celkový obsah síranů závisí na zdroji agaru, je proměnlivý.⁵³



Obr. č. 4: Základní strukturální jednotka agaru (AB=agarobiosa).⁴⁶

5.3.2 Extrakce

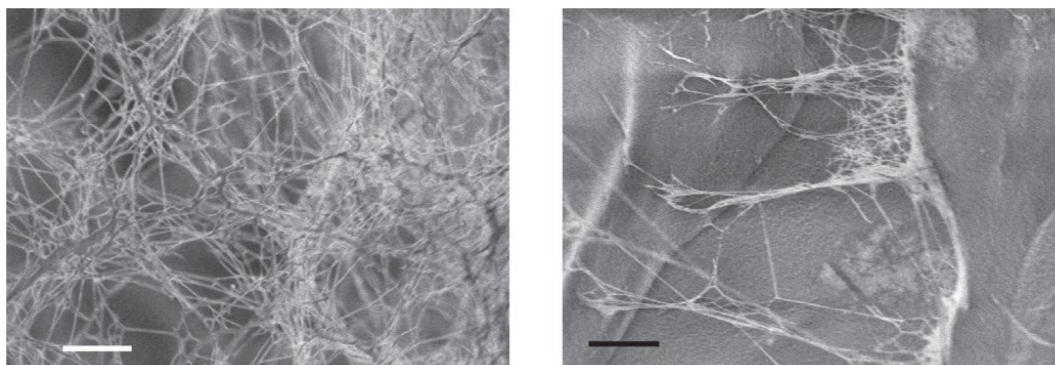
Při tradičním způsobu extrakce agaru se nejprve řasy mechanicky očistí od písku a epifytů. Poté se již očištěné řasy vloží do 15 až 20násobku vroucí vody, přičemž jako první jsou vkládány tužší rostliny. Pro zvýšení extrakčního výtěžku je přidávána kyselina sírová nebo octová. Optimální pH prostředí je 5–6. Řasy jsou v lázni

ponechány při konstantní teplotě 80 °C 8–9 h. Během této fáze je možné přidat k odbarvení a bělení agaru chlornan vápenatý nebo disiřičitan sodný. Získaný extrakt je ještě za horka zfiltrován a poté je nechán v nádobě, aby vychladl a zgelovatěl. Agarový gel je poté zmražen a následně rozmražen. Při zmražení se polymerní síť agarového gelu smršťuje směrem do středu a na povrchu tak zůstává led jako samostatná fáze, která obsahuje desetkrát více rozpustných solí, cukrů a jednodušších gum než kolik jich zadržuje agarová síť. Zmražení agaru tedy představuje další způsob purifikace produktu. Posledním krokem je sušení agaru, kdy je již získán finální produkt. Červené řasy, ze kterých byl extrahován agar, jsou následně recyklovány, protože mohou být použity více než jednou.⁵³

V rámci moderní industriální doby jsou k základnímu schématu získávání agaru (extrakce, zmrazení, rozmrazení, sušení) aplikovány další nebo modifikovány stávající kroky pro dosažení vyšší výtěžnosti. Jako příklad je možno uvést mletí řas, protiproudou a kaskádovitou vícenásobnou extrakci, sprejové sušení agaru, předsušení gelu mechanickým lisováním vody či vysokotlakou extrakci. Extrakce za zvýšeného tlaku nejen zvyšuje výtěžnost agaru, ale i zkracuje samotný proces extrakce na celkový čas 2–4 h.⁵⁷

5.3.3 Mechanismus gelace

Agar může tvořit reverzibilní fyzikální hydrogely díky své agarosové složce. Ta má při teplotě cca 100 °C strukturu neuspořádaného klubka a je homogenně distribuována v celém objemu disperze. Po ochlazení pod teplotu tuhnutí vzniká z disperze gel, díky uspořádání molekul agarosy do dvoušroubovice. Tři ekvatoriální H-atomy na 3,6-anhydro- α -L-galaktózových zbytcích formují prostřednictvím vodíkových můstků a sterických efektů dvoušroubovici.⁴⁶ Hydroxylové skupiny agarosy vytváří vodíkové můstky i mezi dvoušroubovicemi navzájem.⁵⁸ Utvoří se tím tzv. spojovací zóny, které stabilizují dvoušroubovice a vzniká trojrozměrná síť vyššího řádu (viz obrázek č. 5).⁵³



Obr. č. 5: SEM snímky agarového gelu při teplotě 20 °C (vlevo) a 45 °C (vpravo). Na snímku vlevo je zachycena již zcela vytvořená síťová struktura gelu.⁵⁸

5.3.4 Fyzikální vlastnosti

Agar je rozpustný pouze ve vroucí vodě. K rychlejšímu rozpuštění je doporučováno nechat agar nabobtnat ve studené vodě. Při použití agaru ve formě tyčinek nebo vloček by mělo být bobtnání delší (ideálně přes noc), při použití práškovitého agaru stačí kratší časový úsek, alespoň 5–10 minut.⁴⁶ Za předpokladu stejné koncentrace gelu je jeho pevnost ukazatelem kvality použitého agaru. Minimální koncentrace agaru k vytvoření samonosného tvaru je 0,1 %. Čím vyšší koncentrace agaru, tím pevnější a tužší gel. Během přípravy gelu je třeba se vyvarovat rychlému ochlazení roztoku a přemísťování nádob s horkým roztokem. Je to z toho důvodu, aby nedošlo k narušení gelace a tvorby sítě, což by mohlo vést k nižší pevnosti agarového gelu.^{46,59}

Teplota tání a tuhnutí agarového gelu je závislá veličina hned na několika faktorech. Teplota tuhnutí (teplota gelace) se zvyšuje se zvyšující se koncentrací agaru a pohybuje se mezi 30 až 40 °C. Teplota tání agarového gelu je zhruba 95 °C a platí, že čím vyšší teplota tání, tím vyšší pevnost gelu. U gelů o nižší koncentraci platí vztah, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje i teplota tání. Tato úměra pak přestává platit u gelů s vyšší koncentrací agaru. Skutečný bod tání agaru závisí také na typu a zdroji řas. Akustické vlastnosti agarových gelů jsou velmi podobné jako u vody i přesto, že jsou to pevné látky.⁵³

5.4 Ultrazvuk

Ultrazvuk může být popsán jako mechanické kmity o frekvenci vyšší než je horní frekvenční mez slyšitelnosti lidského ucha, tj. vyšší než 20 kHz.⁶⁰ Pro diagnostické

účely se používá vysokofrekvenční ultrazvuk v rozmezí 2–40 MHz. Frekvence v rádech GHz mohou být též označovány jako tzv. „hyperzvuk“.⁶¹

5.4.1 Zdroj

Zdrojů ultrazvukových vln je mnoho. V lékařství je však nejdůležitější piezoelektrický jev, který je využíván při konstrukci všech ultrazvukových diagnostických přístrojů.⁶² Jejich základem je sonda obsahující zabudovaný jeden či více krystalů (tzv. měnič) a má současně dvě funkce – zdroj a detektor ultrazvuku. Piezoelektrický jev se totiž dělí na přímý, který slouží k detekci ultrazvukových vln, a nepřímý, který se využívá jako zdroj ultrazvukových vln. Přímý piezoelektrický jev je děj, během kterého vzniká na povrchu krystalu elektrický náboj v důsledku jeho mechanického namáhání. V krystalové mřížce dochází k posunu kladných a záporných iontů a velikost takto generovaného napětí je přímo úměrné deformaci krystalu. Nepřímý piezoelektrický jev se liší od přímého tím, že se krystal deformuje po tom, co na něj působí vnější elektrické pole. Čím vyšší je napětí, tím je i větší deformace krystalu.⁶¹ Po přivedení střídavého proudu se začne krystal periodicky deformovat (kmitat) a stane se tak zdrojem mechanického a ultrazvukového vlnění.⁶²

Jako příklad piezoelektrik lze uvést přirozené (křemen, turmalín, Seignettova sůl) či uměle vyrobené krystaly (niobát olova). Dále se může používat i tzv. piezokeramika (bariumtitanátová a zirkonátová), která se vyrábí lisováním do libovolného tvaru a následným vypalováním v peci.⁶¹ Aby piezokeramika získala své piezoelektrické vlastnosti, je nezbytné, aby byla polarizována. Toho je dosaženo v intenzivním elektrickém poli.⁶³ Curieho teplota (C_T) je kritickým parametrem pro všechny piezoelektrika, jelikož po zahřátí právě nad tuto teplotu mohou své piezoelektrické vlastnosti ztratit. Tato teplota je specifická pro každou látku, např. C_T křemenu je přibližně 576 °C, zirkonátová keramika asi 320 °C.⁶¹ Depolarizaci, tj. ztrátu piezoelektrických vlastností, může vyvolat nejen teplota, ale i další faktory, jako je mechanické namáhání nebo stárnutí piezoelementů.⁶³

5.4.2 Šíření

K šíření ultrazvukových kmitů od svého zdroje dochází v pružném prostředí (pevné, kapalné, plynné), ve kterém částice kmitají kolem své stabilní rovnovážné polohy.

Tímto procesem tedy vzniká elastická vlna, což je mechanická deformace, při níž dochází ke střídavému zhušťování a zředování částic. Základním principem šíření vlnění je to, že není spojeno s přenosem těchto částic (tzv. lineární aproximace). Pokud by však docházelo k přemístění částic v prostředí (při použití extrémních intenzit ultrazvuků), tak jsou tyto procesy popsány v rámci nelineární akustiky.⁶³ Podle směru, jakým částice prostředím kmitají, rozdělujeme vlnění na příčné (transversální) nebo podélné (longitudinální). V plynném, kapalném i pevném skupenství se ultrazvuk může šířit podélně, což znamená, že částice se pohybují ve směru shodném jako se šíří vlna. Při příčném vlnění kmitají částice kolmo na směr šíření ultrazvukového vlnění, k čemuž může docházet na rozdíl od příčného vlnění pouze v pevných látkách.⁶¹ Při šíření ultrazvuku v lidském těle dochází k příčnému šíření pouze v kostech. V tekutinách a měkkých tkáních se vlnění šíří podélně.⁶⁰

Rychlost šíření čela ultrazvukové vlny je charakteristickou fyzikální veličinou závislou na vlastnostech i teplotě prostředí (viz tabulka č. 1), kde se vlnění šíří.⁶³

Tabulka č. 1: Rychlosti šíření ultrazvuku (c) ve vybraných prostředích (převzato, upraveno).⁶³

$c \text{ (m}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$					
$t \text{ (}^\circ\text{C)}$	vzduch	voda	mozkomíšní mok	krev	mozek
15	340	1 470	1 480	1 488	1 510
20	343	1 483	1 493	1 502	1 524
25	346	1 496	1 506	1 515	1 538
30	349	1 508	1 520	1 529	1 552
35	352	1 521	1 533	1 543	1 566
40	355	1 547	1 547	1 557	1 579

Rychlost šíření podélných vln c v homogenním prostředí, jejíž rozměry kolmé na směr šíření jsou ohraničeny, je závislá na elasticitě E (Youngův model pružnosti) a hustotě ρ :

$$c = \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad [1]$$

Lidské tkáně mají nehomogenní vrstevnatou strukturu, což má vliv na rychlost šíření vlnění. Na rozhraní dvou odlišných prostředí se totiž uplatňuje odraz, lom, popř. rozptyl vlnění.⁶⁴ Nejrychleji se vlnění šíří v tuhých tkáních (např. kostech $3\,800\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), o něco pomaleji v tekutinách a biologických tkáních a nejpomaleji v plynech (viz tabulka č. 1). Ultrazvukové diagnostické přístroje jsou s ohledem na jejich účel kalibrovány na rychlost šíření vlnění $1\,540\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.⁶²

5.4.3 Vlnový odpor (akustická impedance)

Akustická impedance Z (jednotka $\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$) je veličina, která charakterizuje prostředí, jímž se ultrazvuková vlna šíří. Má vliv na odraz a přestup vln na rozhraní dvou prostředí. Akustická impedance je vyjádřena vztahem⁶⁵:

$$Z = \rho \cdot c \quad [2]$$

V tabulce č. 2 je uvedeno několik příkladů akustických impedancí lidských tkání.

Tabulka č. 2: Akustické impedance (Z) a hustoty (ρ) vybraných lidských tkání (převzato, upraveno).⁶⁵

Médium	ρ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Z ($\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$)
krev	$1,06 \cdot 10^3$	$1,66 \cdot 10^6$
ledviny	$1,04 \cdot 10^3$	$1,62 \cdot 10^6$
mozek	$1,03 \cdot 10^3$	$1,66 \cdot 10^6$

5.4.4 Odraz a lom

Ultrazvukové vlnění se v homogenním prostředí šíří přímočaře. V případě, že paprsek ultrazvuku dopadne kolmo na rozhraní dvou prostředí o různých akustických impedancích, dojde k tomu, že jeho větší část projde do druhého prostředí a menší se zase odrazí zpět ke svému zdroji.⁶³

Poměr amplitudy odražené ultrazvukové vlny k amplitudě vlny před dopadem na rozhraní, od kterého se vlna odráží, se označuje jako amplitudový reflexní koeficient r_a . Ten může být stanoven následujícím vztahem.

$$r_a = \frac{(Z_1 - Z_2)}{(Z_1 + Z_2)} \quad [3]$$

Kromě koeficientu r_a se používá také tzv. intenzitní reflexní koeficient r_i , který je dán vztahem:

$$r_i = \left\{ \frac{(Z_1 - Z_2)}{(Z_1 + Z_2)} \right\}^2 \quad [4]$$

Tato rovnice definuje poměr reflektované intenzity vlny k její intenzitě před dopadem na rozhraní.⁶⁵

K lomu dochází, pokud ultrazvukový paprsek nedopadá na rozhraní dvou prostředí kolmo, ale pod úhlem α . Jsou-li rychlosti šíření vln shodné v obou prostředích, je možné stanovit úhel lomu β dle Snellova zákona.

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{c_1}{c_2} \quad [5]$$

Lom ultrazvukové vlny na hranici mezi orgány je nežádoucí, vede totiž ke vzniku rušivých obrazových artefaktů.⁶²

5.4.5 Rozptyl

O tom, jestli se ultrazvuková vlna odrazí nebo nastane její lom, rozhoduje úhel dopadu na rozhraní. K těmto jevům však dochází, pouze pokud jsou rozměry rozhraní podstatně větší, než je vlnová délka dopadajících ultrazvukových vln. Pokud tomu tak není, dochází k jinému úkazu, a to k tzv. disperzi neboli rozptylu.⁶² Rozptyl vln nastává v prostředí, ve kterém jsou rozptýleny částice, jejichž rozměry jsou srovnatelné s vlnovou délkou ultrazvukové vlny. Tyto malé částice absorbují část ultrazvukové energie a znovu ji generují do všech směrů. Dá se říci, že každá částice vytváří takové sférické pole.⁶⁵

Vlnová délka diagnostického ultrazvuku je rovna zhruba 100 μm , což velikostně odpovídá strukturnímu uspořádání v parenchymatické tkáni. Pronikající ultrazvukové

vlny se zde rozptýlí, což má za následek typickou, hrubě zrnitou texturu ultrazvukových snímků.⁶²

5.4.6 Útlum ultrazvukové energie

Útlum neboli atenuace ultrazvukové energie je proces, při kterém je vibrační energie vlny transformována na jiné formy energie během průchodu vyšetřovaným prostředím. Pojem absorpce zahrnuje pouze energii, která byla při šíření přeměna na energii tepelnou. Útlum tedy vyjadřuje celkovou energetickou ztrátu ultrazvukového pole, včetně absorpce.⁶⁵

Intenzita ultrazvuku I exponenciálně klesá se vzdáleností ve směru šíření. Intenzita I_x je intenzita ve vzdálenosti x od čela ultrazvukového zdroje a lze ji vyjádřit rovnicí:

$$I_x = I_0 \cdot e^{-2\alpha x}, \quad [6]$$

kde α je koeficient útlumu, který je vyjádřen poklesem intenzity v dB při průchodu 1 cm vrstvy tkáně. V tabulce č. 3 jsou uvedeny hodnoty tohoto koeficientu pro některé druhy lidských tkání. I_0 je intenzita ultrazvukové vlny na začátku, před vstupem do prostředí.⁶³

Tabulka č. 3: Koeficient útlumu (α) ve vybraných tkáních (převzato, upraveno).⁶⁵

Tkáň	α (dB·cm ⁻¹)
lebeční kost	13–14
kůže	3,4
svaly	1,1–1,3
mozek	0,9
tuk	0,5–0,6
krev	0,17

5.4.7 Základní charakteristika ultrazvukových obrazů

Ultrazvukové obrazy (ultrasonogramy) poskytují diagnostické informace o části těla, které je podrobena ultrazvukovému vyšetření. Na obrazovce je důležité odlišit tzv. skutečné obrazy od artefaktů, což jsou obrazce, které orientací ani vzdáleností

neodpovídají žádné fyziologické struktuře. Mohou být považovány na falešně pozitivní nález patologického útvaru.⁶⁶

Čím vyšší je frekvence ultrazvuku, tím je lepší jeho rozlišovací schopnost. Problém představuje atenuace tkání, jelikož vyšší frekvence ultrazvuku jsou tkáněmi tlumeny a rozptylovány více než frekvence nižší. Pro vyšetření hlubších struktur je tedy dobré použít sondy s nižší frekvencí, které mají sice nižší rozlišovací schopnost, ale vyšší dosah. Je tomu tak proto, že je u nich menší pravděpodobnost útlumu ultrazvuku při průchodu blíže uložených oblastí.⁶⁷

Jednotlivé tkáňové struktury se dají evaluovat na základě stupňů jejich odrazivosti – echogenity. Echogenita vyjadřuje schopnost materiálu vytvořit ultrazvukový obraz. Udává míru odrazu vlnění a určuje tím stupeň jasů ultrazvukového obrazu. To znamená, že čím bude odraz vyšší, tím bude obraz jasnější.⁶¹ Echogenita je přizpůsobitelná, lze ji zvýšit přidáním částic jako je např. karbid křemíku, oxid hlinitý nebo škrob, které jsou do směsi fantomu přimíchávány před zgelovatěním. Je důležité, aby částice byly homogenně distribuovány a aby nedocházelo k jejich sedimentaci.⁹ Intenzita echogenity je určována stupni jasů obrazového bodu (pixelu). Anechogenní oblast je bezodrazová oblast bez jasů (černé pixely) charakteristická pro obsah cyst, které se na obrazu jeví jako elipsovité nebo kulovité útvary. Uvnitř cysty nevzniká odraz, protože v tekutině nejsou žádná akustická rozhraní. Typické pro obraz za cystou je jeho akustické zesílení, tzv. efekt zadní stěny, které vzniká následkem nízké atenuace při průchodu ultrazvukového vlnění tekutým obsahem a odrazem od zakřivené zadní stěny. Akustického zesílení může být využito pro vytvoření akustického okna, které vytvoří prostor pro zobrazení hlubších struktur. Například plný močový měchýř vytváří akustické okno pro vyšetření pánevní oblasti.⁶¹

Dalším typem obrazců, které mohou vznikat uvnitř velkých cyst, v blízkosti přední i zadní stěny, jsou artefakty – tzv. reverberace, vznikající opakovanými odrazy, které mohou imitovat neexistující vnitřní strukturu. Jsou to echa, která nastávají při přechodu ultrazvuku mezi rozhraními (paralelně uspořádané) s velmi odlišnou akustickou impedancí. Dochází ke zpoždění odraženého ultrazvuku při návratu do vyšetřovací sondy a ve výsledném obrazu se to může jevit jako zdvojení nebo dokonce ztrojení obrazu. Reverberace nevznikají pouze v cystách, můžeme je pozorovat

i v dalších tkáňových strukturách (např. reverberace může zakrýt tkáň ležící za vrstvou plynu ve střevech).^{66,67}

Hyperechogenní struktury vykazují silné odrazy ultrazvukového vlnění, což je na obrazu viditelné jasnými/bílými pixely. Tyto útvary, kterými ultrazvuk neprochází a většina se odrazí, vytvářejí tzv. akustický stín a zakrývají tkáň ležící za nimi. Příkladem mohou být kosti – žebra, která vrhají akustický stín za tkáň za nimi a pro jejich zobrazení je nutné je vyšetřovat šikmo skrze mezižeberní prostor. Hypoechogenní struktury jsou zase typické tím, že formují slabé odrazy, které jsou zobrazeny jako tmavé/šedé pixely (např. měkké tkáň). Izoechoenní struktury jsou ty, které mají stejnou echogenitu jako jejich okolí.⁶¹

6 Experimentální část

6.1 Použité chemikálie

- Agar (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.)
- Oxid hlinitý 3 μm (Buehler)
- Oxid hlinitý 0,3 μm (Buehler)
- Karbid křemíku, zrnitost F-600 (Buehler)
- Glycerol 85% (Míča a Harašta s.r.o.)
- Methylparaben, 99+% (Sigma Aldrich)
- Propylparaben, 99+% (Sigma Aldrich)
- Čištěná voda, čištěná systémem Milli-Q RG (Millipore)

6.2 Použité přístroje

- Laboratorní váhy, $d = 0,001$ g (Kern, Německo)
- Předvážky, $d = 1$ g (Kern, Německo)
- Laboratorní sušárna (Mettler, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Super (Bandelin, Německo)
- Laboratorní hřídelová míchačka Eurostar (IKA, Německo)
- Míchačka magnetická s ohřevem (Heidolph, Německo)
- Jednoplátkový elektrický ohříváč (Tristar, Nizozemsko)
- Ultrazvukový diagnostický systém Sonix RP (Ultrasonix Medical Corporation, Kanada) s lineární sondou L14-5/38 (SN: TRA1.0-SL00.012)
- Echoskop Phywe (PHYWE Systeme GmbH a Co.KG, Německo, SN: 171800584473), se dvěma hlavicemi (SN: 10152/194787 a 10152/194788)
- Digitální posuvné měřítko YATO YT-7201 (TOYA S.A., Polsko)

6.3 Použité metody

6.3.1 Příprava aqua conservans (konzervační voda)

Konzervační voda (KV) byla připravena dle ČL 2017.⁶⁸ Vzhledem k velké spotřebě byla připravována opakovaně, a to vždy v objemu 2 l. Nejdříve byly naváženy parabeny – methylparaben 1,34 g a propylparaben 0,66 g. Přibližně 1 999 ml čištěné vody bylo odměřeno v odměrném válci a nalito do předem zvažované kádinky, která byla

poté umístěna na jednoplotýnkový vaříč a přivedena k varu. Poté byly do vařící vody přidány navážky parabenů. Po rozpuštění byl var ukončen. Později, když roztok vychladl, byla doplněna odpařená voda, aby se celková hmotnost rovnala 2 000 g. Finálním krokem byla filtrace KV.

6.3.2 Obecný postup přípravy agarového gelu

V rámci tohoto experimentu byly připraveny různé koncentrační řady AG s rozdílnými komponenty. Základní schéma však zůstávalo neměnné.

Do kádinky byl postupně navážen agarový prášek, KV a případně i glycerol. Vzniklá suspenze agarového prášku byla na magnetické míchačce s ohřevem za stálého míchání přivedena k varu. Při míchání bylo důležité, aby otáčky nebyly příliš vysoké, z důvodu tvoření pěny.

Disperze se nechala za stálého míchání 5 minut vařit, aby mohl polysacharidový řetězec agarosy zaujmout tvar neuspořádaného klubka.⁴⁶

Po ukončení varu se doplnila KV do finální hmotnosti vzorku. Poté se disperze ještě promíchala, aby byla přidaná KV rovnoměrně distribuována do celého objemu. Takto připravený vzorek byl ponechán, aby při laboratorní teplotě vychladl.

Během toho nebylo s kádinkami se vzorky nijak manipulováno, aby byl zajištěn správný mechanismus gelace agaru, tj. vytvoření prostorové sítě z dvoušroubovic.⁵³

V závislosti na množství AG se doba tuhnutí pohybovala mezi 20 a 30 minutami. Doba tuhnutí byla stanovována pouze orientačně, jelikož tuhnutí gelu je postupný proces.

Vzorky byly přikryty Parafilmem kvůli ochraně před vysycháním hydrogelu a kontaminací nečistotami. Vzorky byly skladovány v lednici při teplotě 5 až 10 °C.

6.3.3 Příprava vzorků pro měření reologických vlastností AG

Pro měření reologických parametrů byly připraveny vzorky AG s glycerolem a bez glycerolu o celkové hmotnosti 100 g se složením uvedeným v tabulce č. 4. Měření těchto 12 vzorků bylo provedeno v rámci experimentální části diplomové práce

s názvem *Reologické vlastnosti gelů agaru pro mozkový ultrazvukový fantom*.⁵ Autorkou této práce je Mgr. Marie Schneiderová, která pracovala pod vedením PharmDr. Evy Šnejdrové, Ph.D. na katedře Farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK v HK.

Tabulka č. 4: Složení vzorků pro měření reologických vlastností AG.

č. vzorku	agar (% w/w)	KV (% w/w)	glycerol 85% (g/100 g)
1	0,2	99,8	–
2	0,5	99,5	–
3	1,0	99,0	–
4	1,5	98,5	–
5	2,0	98,0	–
6	2,5	97,5	–
7	0,5	88,3	11,2
8	1,0	87,8	11,2
9	1,5	87,3	11,2
10	2,0	86,8	11,2
11	2,5	86,3	11,2
12	3,0	85,8	11,2

6.3.4 Ztráta vody z AG

Byly připraveny 3 řady vzorků o obsahu agaru 1,00 %, 0,75 % a 0,50 % (w/w). V každé řadě byla použita různá množství glycerolu (85% glycerol, 0 až 80 g/100 g). Celková hmotnost vzorku byla 300 g.

Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly všechny vzorky zváženy a umístěny do laboratorní sušárny vytemperované na 37 °C. V pravidelném intervalu 1 týdně byly vzorky váženy a hodnoty zaznamenávány. Celková doba záznamu byla 4 týdny. Experiment byl opakován třikrát.

Tabulka č. 5: Vzorky s obsahem 1,00 % agaru (w/w).

č. vzorku	glycerol 85% (g/100g)	glycerol (g)	agar (g)	KV (g)
1	0	0	3,00	297
2	20	60	3,00	237
3	40	120	3,00	177
4	60	180	3,00	117
5	80	240	3,00	57

Tabulka č. 6: Vzorky s obsahem 0,75 % agaru (w/w).

č. vzorku	glycerol 85% (g/100g)	glycerol (g)	agar (g)	KV (g)
1	0	0	2,25	297,75
2	20	60	2,25	237,75
3	40	120	2,25	177,75
4	60	180	2,25	117,75
5	80	240	2,25	57,75

Tabulka č. 7: Vzorky s obsahem 0,50 % agaru (w/w).

č. vzorku	glycerol 85% (g/100g)	glycerol (g)	agar (g)	KV (g)
1	0	0	1,50	298,5
2	20	60	1,50	238,5
3	40	120	1,50	178,5
4	60	180	1,50	118,5
5	80	240	1,50	58,5

6.3.5 Příprava AG s částicemi Al₂O₃ a SiC

Přidání částic Al₂O₃ a SiC do AG bylo žádoucí k modifikaci echogenity. Byly proto připraveny vzorky s různými koncentracemi částic (i bez nich – pro porovnání) pro měření akustických parametrů. Pro dostatečně dlouhou dobu průchodu ultrazvukového impulsu vzorkem bylo nutné připravit vzorky větších rozměrů. Byly proto použity odlévací formy s nepřilnavým povrchem a kulatým dnem o průměru 12 cm a výšce 10 cm. Forma se skládala ze dvou částí – odnímatelného dna a obvodové části se sponou.

Byly připravovány vždy dva vzorky o stejném složení s hmotností 1 000 g a 600 g. Vzhledem k vysoké hmotnosti již nebyly dostatečné laboratorní váhy proto vážení surovin probíhalo na předvážkách. Laboratorní váhy s přesností 3 desetinných míst byly využity pouze pro vážení agarového prášku a částic. K ohřevu byl použit jednoplotýnkový elektrický vařič a k míchání laboratorní míchačka s hřídelí.

Při přípravě agarové disperze bylo použito vždy o 200 ml KV méně. Tento objem KV byl využit při přípravě suspenze z částic. Do suché kádinky o objemu 250 ml byly přidány navážky částic a poté k nim byla přidána KV. Pro usnadnění smáčení byla využita ultrazvuková lázeň. Skleněnou tyčinkou byla suspenze v lázni pravidelně promíchávána po dobu 10 minut.

Po ukončení 5minutového varu agarové disperze byl odstraněn vařič a kádinka s horkým gelem byla ponořena do chladicí lázně. Během chlazení byl AG stále promícháván laboratorní míchačkou. Po dosažení 40 °C byla kádinka vyjmuta z lázně a poté do ní byla kvantitativně přidána připravená suspenze částic s KV. Kádinka s AG se poté zvažila a byla doplněna KV, která se odpařila během varu. Nakonec se vzorek ještě míchal do dosažení teploty 35 °C. V tomto okamžiku byl AG s částicemi vylit do připravených forem. Pokud by teplota klesla ještě pod 32 °C, gel by se už nedal vylít, protože by byl příliš tuhý. Při odlévání AG do formy při vyšších teplotách, kdy ještě není vytvořena gelová trojrozměrná síť, by částice sedimentovaly a vzorky by se již nedaly použít k měření akustických parametrů.

Vzorky se nechaly ještě při laboratorní teplotě cca 30 minut tuhnout. Poté byly přikryty dvojitou vrstvou alobalu a umístěny do chladničky a po 24 hodinách byly vzorky vyjmuty z formy, zabaleny do HDPE sáčku, a nakonec zabaleny do alobalu a vráceny do chladničky. Tyto opatření byla nutná z důvodu vysychání vzorků, což by mohlo nežádoucně ovlivnit akustické parametry.

Vzorky měly stejné základní složení agarového gelu, tj. 1 % agaru a 60 % glycerolu (85% glycerol g/100 g). Jednotlivé vzorky obsahovaly všechny 3 druhy částic, z čehož byl vždy jeden druh částic v různém procentuálním zastoupení (viz tabulky č. 9 a 10). Množství částic uvedené v IEC normě²⁸ odpovídá 100 % částic v připravovaných AG (viz tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Zastoupení částic v AG uvedené v receptuře hydrogelu dle normy IEC 60601-2-37.²⁸

SiC (% w/w)	0,3 μm Al ₂ O ₃ (% w/w)	3 μm Al ₂ O ₃ (% w/w)
0,53	0,88	0,94

K hodnocení ultrasonogramů a měření rychlosti šíření ultrazvuku byly využity vzorky popsané v tabulce č. 9 a 11. Hodnota koeficientů útlumu byla získána použitím vzorků uvedených tabulce č. 10 a 11.

Tabulka č. 9: Vzorky s obsahem 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic – 1 druh byl různém procentuální zastoupení.

č. vzorku	SiC (%)	0,3 μm Al_2O_3 (%)	3 μm Al_2O_3 (%)
1	0	100	100
2	25	100	100
3	50	100	100
4	100	100	100
5	200	100	100
6	100	0	100
7	100	25	100
8	100	50	100
9	100	100	100
10	100	200	100
11	100	100	0
12	100	100	25
13	100	100	50
14	100	100	100
15	100	100	200

Tabulka č. 10: Vzorky s obsahem 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic – 1 druh byl různém procentuální zastoupení.

č. vzorku	SiC (%)	0,3 μm Al_2O_3 (%)	3 μm Al_2O_3 (%)
1	0	100	100
2	50	100	100
3	100	100	100
4	200	100	100
5	400	100	100
6	100	0	100
7	100	50	100
8	100	100	100
9	100	200	100
10	100	400	100
11	100	100	0
12	100	100	50
13	100	100	100
14	100	100	200
15	100	100	400

Dále byly připravovány vzorky AG s jedním druhem částic, viz tabulka č 11, (0,3 μm Al_2O_3 / 3 μm Al_2O_3 / SiC) v řadě (od 0 do 400 %). Složení vzorků bylo opět 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w).

Tabulka č. 11: Vzorky s obsahem 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 1 druhem částic.

vzorek č.	SiC (%)	0,3 μm Al_2O_3 (%)	3 μm Al_2O_3 (%)
1	0	0	0
2	50	0	0
3	100	0	0
4	200	0	0
5	400	0	0
6	0	0	0
7	0	50	0
8	0	100	0
9	0	200	0
10	0	400	0
11	0	0	0
12	0	0	50
13	0	0	100
14	0	0	200
15	0	0	400

6.3.6 Příprava AG s různým obsahem glycerolu

Byly připraveny vzorky AG o hmotnosti 1 000 g a 600 g. Vzorky obsahovaly 1 % agaru (w/w) a variabilní množství glycerolu (tabulka č. 12). Byly použity pro měření závislosti rychlosti šíření ultrazvukového vlnění na množství obsaženého glycerolu.

Tabulka č. 12: *Vzorky obsahující 1 % agaru (w/w) a glycerol (0 až 60 g 85% glycerolu/100 g).*

č. vzorku	glycerol 85% (g/100g)
1	0
2	10
3	20
4	40
5	60

6.3.7 Akustické vlastnosti AG

Akustické parametry byly změřeny Mgr. Jaromírem Vachutkou, Ph.D. z Ústavu lékařské biofyziky LF UPOL v Olomouci.

Tvar vzorků byl válcovitý o průměru 115 mm. Výška válců byla variabilní, pokud měl vzorek na svém povrchu pěnu, musela být tato příslušná část odkrojena. Pěna by snižovala přesnost provedených měření.

Analýza ultrazvukových snímků

Ultrazvukové obrazy jednotlivých vzorků byly získány prostřednictvím ultrazvukového diagnostického systému Sonix RP. Lineární sonda byla nastavena do režimu pro všeobecné vyšetření při frekvenci 10 MHz, hloubce zobrazení 4 cm a jedním fokusem umístěným do hloubky 2 cm. Pro analýzu snímku byla vybrána část obrazu odpovídající hloubce od 1 do 3 cm. Byl vyhodnocen průměrný stupeň šedi (PSŠ).

Měření rychlosti šíření ultrazvuku a koeficientu útlumu

Rychlost šíření ultrazvuku byla stanovena transmisní metodou. Byla porovnána doba průchodu ultrazvukového impulsu dvěma vzorky stejného složení o různých výškách. Výška jednotlivých vzorků byla měřena digitálním posuvným měřítkem. Koeficient útlumu byl stanoven porovnáním amplitud ultrazvukového impulsu po průchodu

dvěma vzorky stejného složení o různých výškách. Pro obě měření byl využit echoskop Phywe se dvěma ultrazvukovými hlavicemi s frekvencí 2 MHz.

7 Výsledky a diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zformulovat složení ultrazvukové fantomu mozku, čehož bylo dosaženo s pomocí komplexních charakteristik AG s částicemi a glycerolem. Byla vyhodnocena rychlost šíření ultrazvuku ve vzorku, echogenita a útlum pro získání odpovídajícího ultrazvukového obrazu mozkové tkáně. Zároveň bylo vyhodnoceno množství glycerolu, hodnocením ztráty vody v čase, které bude přidáváno.

Níže jsou shrnuty výsledky, které jsou uvedeny v diplomové práci řešitelky M. Schneiderové⁵, které vymezily prvotní charakteristiky receptury fantomu.

V uvedené práci⁵ bylo potvrzeno elastické chování AG a udány hodnoty viskoelastických modulů. Dále byla ověřena teplotní stabilita AG a v neposlední řadě i nutnost přídavku glycerolu.⁵ Především tato poslední informace je podstatným bodem, od kterého bylo možné odvíjet experiment vyhodnocení vhodného přídavku glycerolu.

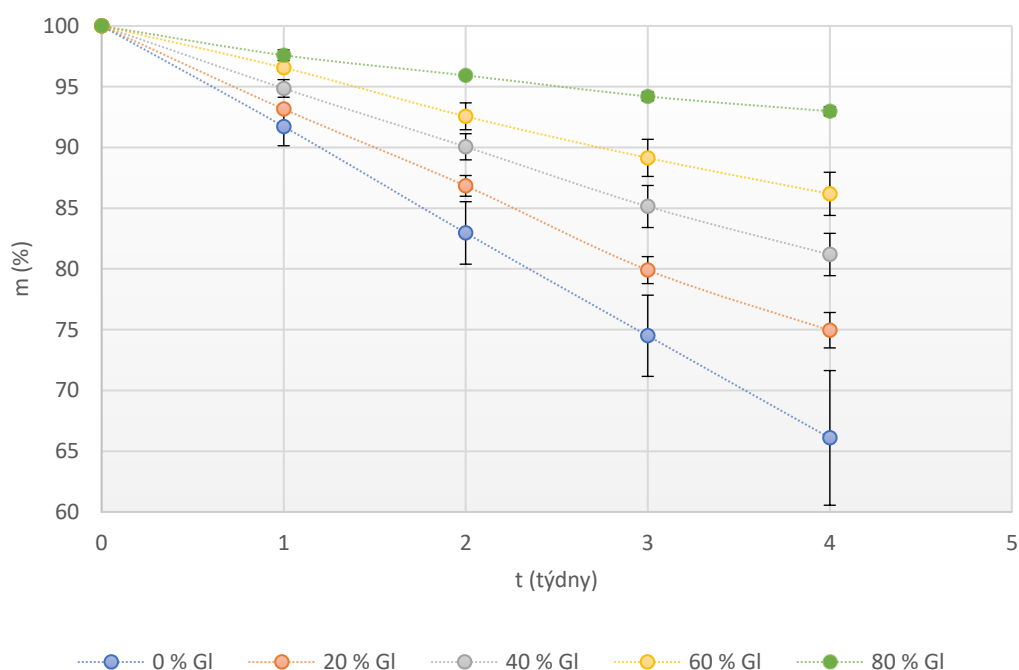
Vzorky pro měření reologických vlastností byly testovány v SW r-Space reometru Kinexus. Byl proveden oscilační test při konstantní teplotě 37 °C a test sledující teplotní stabilitu AG v teplotním pásmu 20 a 40 °C. Dle získaných hodnot viskoelastických modulů (elastický G' a viskózní G'') vyplynulo, že je AG elastickou pevnou látkou. Celkové chování materiálu vyjádřené komplexním modulem (G^*), značilo, že se tuhost AG zvyšovala se zvyšující se koncentrací agaru. Vzorky AG bez glycerolu měly v porovnání se vzorky obsahujícími glycerol nižší hodnoty komplexních modulů a byly tedy méně tuhé. Zároveň byla i potvrzena plastifikační funkce glycerolu, jelikož vzorky s přídavkem glycerolu měly sníženou mez toku. Dále měly vzorky obsahující glycerol oproti vzorkům bez glycerolu vyšší hodnoty fázového úhlu, tj. viskóznější chování. Vzorky s glycerolem vykazovaly z praktického hlediska lepší tvárnost a ohebnost. Co se týče teplotní stability, byly AG v daném v teplotním rozmezí (20 °C a 40 °C) stabilní. Se zvyšující se teplotou došlo ke snížení

komplexního modulu (tuhosti) AG. Při celkovém hodnocení bylo pro pokračování v experimentu doporučeno pracovat se vzorky obsahující glycerol a vyšší koncentrace agarů.⁵

7.1 Ztráta vody z AG

Vzhledem k zamýšlenému použití bylo nutné, aby byl hydrogel stabilní a aby během skladování nedocházelo k přílišnému vysychání. To by mohlo ovlivnit nejen senzorické, ale i akustické parametry.⁶⁹ Byla proto kvantifikována ztráta vody během skladování. Cílem tohoto experimentu bylo vybrání neoptimálnějšího poměru agarů a glycerolu.

Při přípravě vzorků byla použita KV z důvodu zamezení množení mikroorganismů. V rámci experimentu byla zároveň i ověřena účinnost tohoto opatření, jelikož skladovací teplota 37 °C je z hlediska inkubačních podmínek ideální pro množení mikroorganismů. Ani jeden vzorek nevykazoval mikrobiální invazi po ukončení tohoto experimentu (4 týdny). KV bude proto zvolena jako médium ve finálním hydrogelovém materiálu pro mozkový fantom.

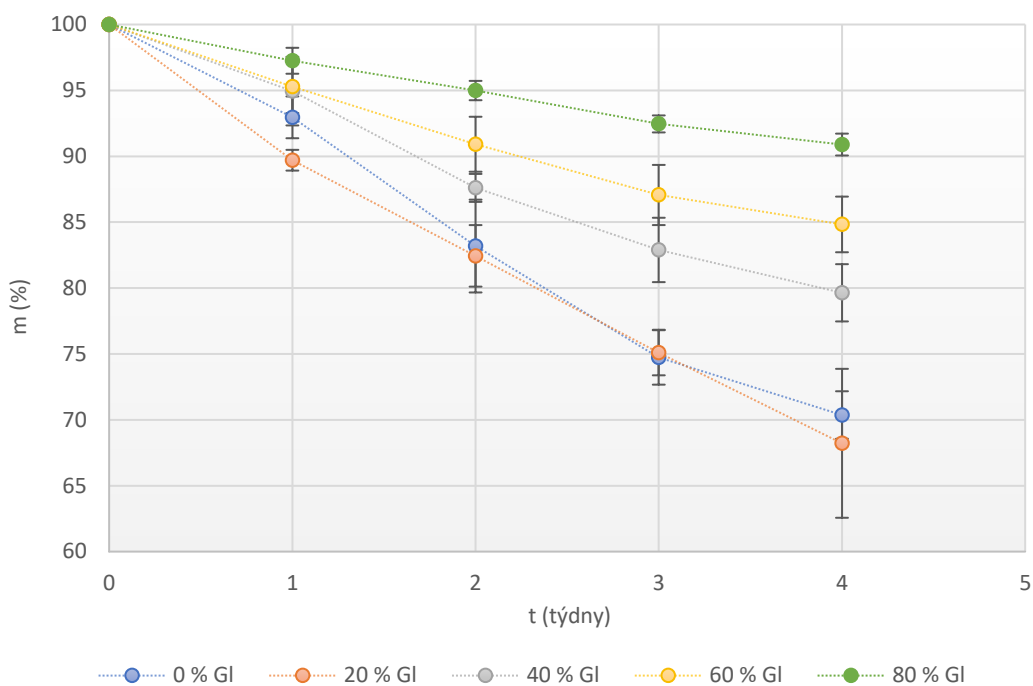


Obr. č. 6: Graf závislosti hmotnosti (m) vzorku obsahujícího 1,00 % agaru (w/w) a různé množství 85% glycerolu (0 až 80 %, w/w) na čase (t).

Na obrázku č. 6 je zobrazena závislosti hmotnosti vzorků 1% AG na čase, která se během 4týdenního uskladnění v laboratorní sušárně (při teplotě 37 °C) měnila vlivem odpařování vody z AG. Vzorky se lišily obsahem glycerolu (0 až 80 %, w/w).

U všech pěti vzorků můžeme pozorovat očekávaný trend poklesu hmotností. Vzorek neobsahující glycerol vykázal po 4 týdnech největší ztrátu vody, a to 43,80 %. Čím více glycerolu vzorek obsahoval, tím menší byl jeho hmotností úbytek. Toto pozorování potvrzuje i práce Jun-Feng Su a kol. o sorpci a propustnosti vody filmů složených ze sojového proteinové izolátu, PVA a glycerolu.⁷⁰ Nejmenší ztrátu vody, a to 8,43 %, nastala u vzorku obsahující 80 % glycerolu (w/w).

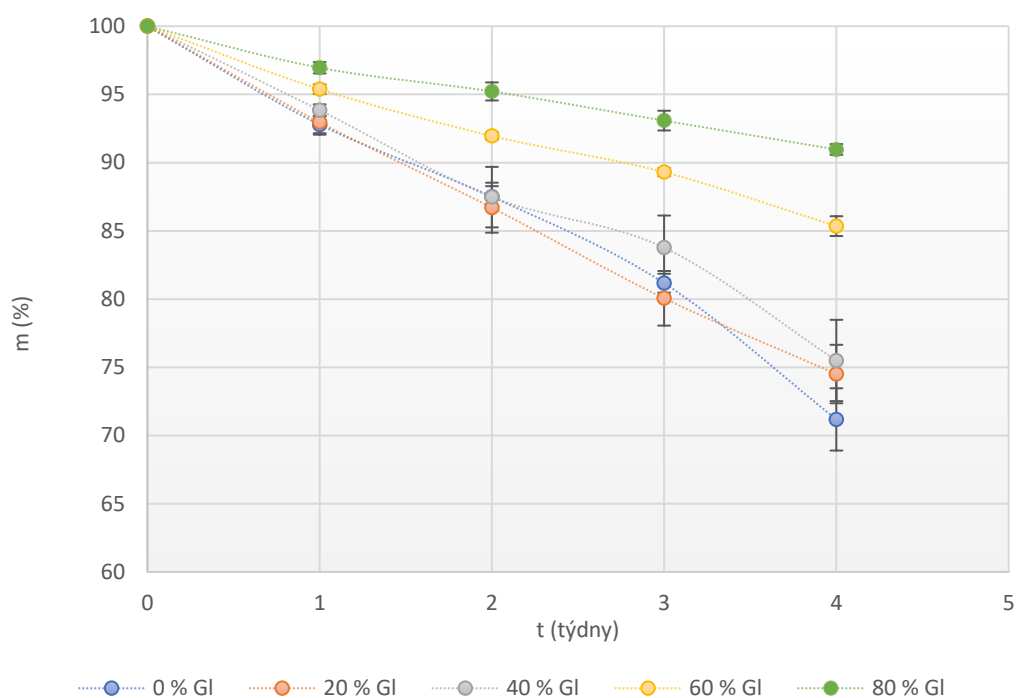
Senzorická evaluace vzorků probíhala vždy během vážení. Povrch vzorků 1 až 3 byl při ukončení experimentu suchý a byla patrná změna jeho objemu.



Obr. č. 7: Graf závislosti hmotnosti (m) vzorku obsahujícího 0,75 % agaru (w/w) a různé množství 85% glycerolu (0 až 80 %, w/w) na čase (t).

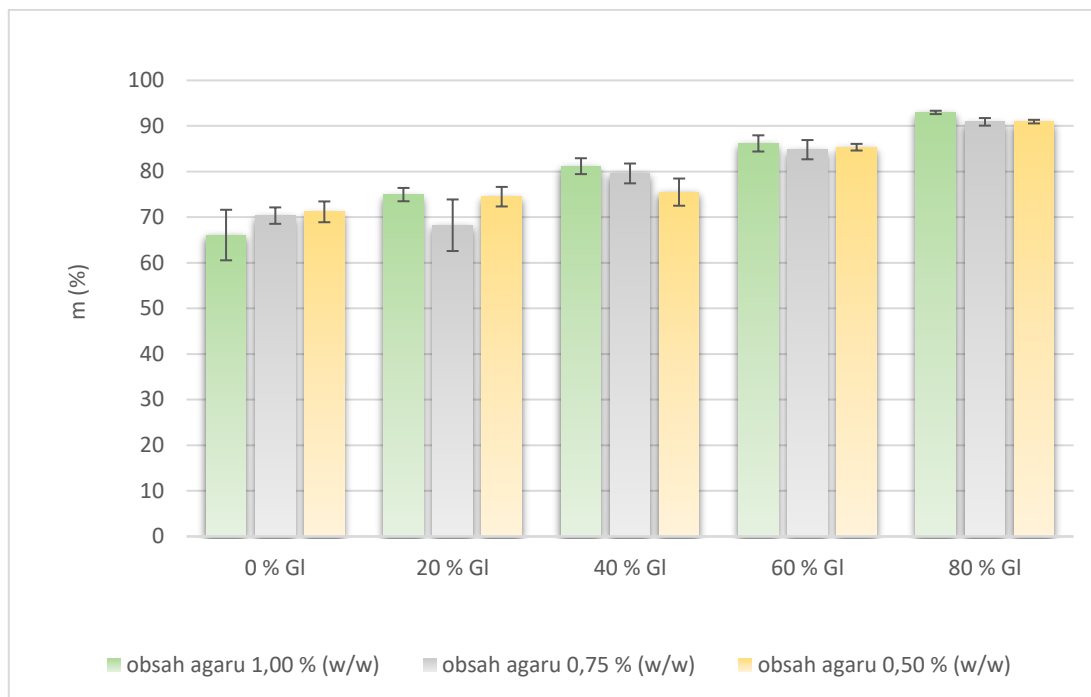
Z grafu (viz obrázek č. 7), který zobrazuje ztrátu vody u vzorků obsahující 0,75 % agaru (w/w) vyplývají podobné trendy, jako můžeme pozorovat na obrázku č. 6. U vzorku s 0 % glycerolu byla konečná evaporace vody po 4 týdnech nižší tj. 29,65 %, než u vzorku s 20 % glycerolu, kde byla 31,76 %. U dalších vzorků byla již opět pozorována očekávaná tendence poklesu hmotnosti v závislosti na množství glycerolu.

Při konečném sensorickém hodnocení měly vzorky č. 1, 2 a 3 i v tomto případě viditelně menší objem než na počátku měření.



Obr. č. 8: Graf závislosti hmotnosti (m) vzorku obsahujícího 0,50 % agaru (w/w) a různé množství 85% glycerolu (0 až 80 %, w/w) na čase (t).

Na obrázku č. 8 je zobrazen graf závislosti evaporace vody na obsahu glycerolu v 0,5% AG. Vzorky s 0, 20 a 40 % glycerolu vykazovaly po prvních 3 týdnech vážení nepatrné rozdíly v množství evaporované vody. Až při finálním vážení se evaporace vyrovnala do předpokládaného výsledku, tj. čím více glycerolu obsaženého, tím menší ztráta vody. U vzorku s 0 % glycerolu byla celková ztráta vody oproti výchozímu stavu 28,82 %, u vzorku s 20 % glycerolu 25,50 % a u vzorku se 40 % glycerolu 24,50 %. Nižší evaporace proběhla u vzorku s 60 %, tj. změna hmotnosti o 14,65 % při porovnání s výchozím stavem, a u vzorku s 80 % glycerolu 9,04 %.



Obr. č. 9: Porovnání hmotnosti (m) vzorků obsahující 0,50, 0,75 a 1,00 % (w/w) agaru a různé množství 85% glycerolu (0 až 80 %, w/w) po 4 týdnech.

Na obrázku č. 9 můžeme vidět porovnání celkové ztráty vody při konečném vážení po 4 týdnech, lze vidět, že obsah glycerolu má vliv na množství odpařené vody. K obdobnému závěru došli ve své práci i R. Wang a kol., kteří se věnovali evaporaci vody z PVA hydrogelů plastifikovaných glycerolem a kaprolaktamem.⁷¹ Nejmenší ztráty vykazovaly vzorky obsahující 80 g 85% glycerolu ve 100 g a rozdíl je mezi nimi nepatrný, ale vzorek s 1,00 % agaru vykazuje nejnižší ztrátu odpařené vody (7,02 %).

Po přihlédnutí k výsledkům z reologie⁵, kdy se potvrdila plastifikace glycerolem a vzhledem k výsledkům ztráty vody, kdy při nejvyšším obsahu glycerolu se u vzorku nejméně snižuje hmotnost, jsme vybrali pro měření akustických vlastností vzorky s obsahem 60 % glycerolu. Při zvýšené teplotě (37 °C) vzorky s nejvyšším testovaným obsahem glycerolu přešly do tekutého skupenství. Co se týče hodnocení množství agaru, vzorky s obsahem agaru 0,50 a 0,75 % byly příliš měkké, pod vlivem gravitace neudržely stálý tvar. Při manipulaci se snadno porušila jejich struktura. Proto byly pro další experimenty vyloučeny. Z těchto důvodů bylo pro následující testování akustických parametrů vybráno složení AG s 1 % agaru a obsahem glycerolu nižším, tedy 60 g 85% glycerolu / 100 g.

7.2 Akustické vlastnosti AG

Vhodné akustické vlastnosti jsou stěžejní vzhledem k aplikaci vyvíjeného fantomu. Pro přizpůsobení těchto vlastností se používají nejrůznější částice a přísady.

Tento experiment vycházel z normy IEC 60601-2-37²⁸, která definuje standardní TMM. 100 % SiC odpovídá 0,53 g/100 g, 100 % 0,3 μm Al_2O_3 je 0,88 g/100 g a 3 μm Al_2O_3 je 0,94 g/100 g. Ve vyvíjeném fantomu byly použity stejné druhy částic jako v IEC normě, ale v různém množství, aby mohly být evaluovány vhodné akustické parametry pro ultrazvukový fantom mozku.

7.2.1 Rychlost šíření ultrazvuku

Tabulka č. 13: Rychlost šíření ultrazvuku 15 vzorků se složením 1 % agar (w/w) a 60 % glycerol (85% glycerol, w/w) obsahující 3 druhy částic.

vzorek	c ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
0 % SiC	1 756
25 % SiC	1 752
50 % SiC	1 767
100 % SiC	1 745
200 % SiC	1 761
0 % 0,3 μm Al_2O_3	1 760
25 % 0,3 μm Al_2O_3	1 780
50 % 0,3 μm Al_2O_3	1 780
100 % 0,3 μm Al_2O_3	1 745
200 % 0,3 μm Al_2O_3	1 770
0 % 3 μm Al_2O_3	1 779
25 % 3 μm Al_2O_3	1 738
50 % 3 μm Al_2O_3	1 753
100 % 3 μm Al_2O_3	1 745
200 % 3 μm Al_2O_3	1 766

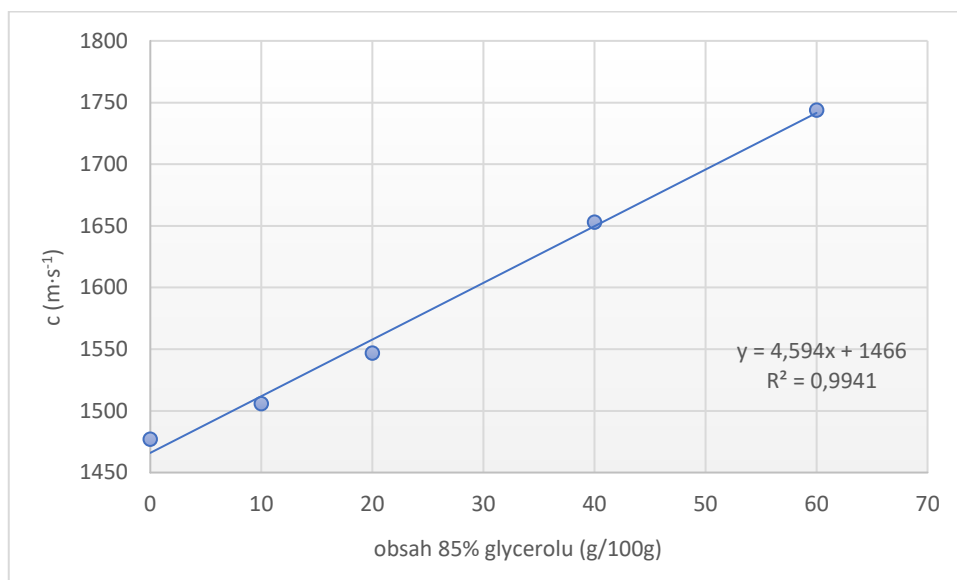
V tabulce č. 13 jsou výsledky měření rychlosti, kterou se šířily ultrazvukové vlny v 15 vzorcích, kdy jejich složení bylo 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w). Byly obsaženy všechny 3 druhy částic, ale vždy 1 typ částic byl v různém procentuálním zastoupení (od 0 do 200 %). Dle získaných výsledků lze konstatovat, že rychlost se výrazně nemění vzhledem ke koncentraci částic.

Tabulka č. 14: Rychlost šíření ultrazvuku 15 vzorků se složením 1 % agar (w/w) a 60 % glycerol (85% glycerol, w/w) obsahující 1 druh částí.

vzorek	c (m·s ⁻¹)
0 % SiC	1 753
50 % SiC	1 748
100 % SiC	1 746
200 % SiC	1 750
400 % SiC	1 757
0 % 0,3 μm Al ₂ O ₃	1 753
50 % 0,3 μm Al ₂ O ₃	1 760
100 % 0,3 μm Al ₂ O ₃	1 740
200 % 0,3 μm Al ₂ O ₃	1 760
400 % 0,3 μm Al ₂ O ₃	1 752
0 % 3 μm Al ₂ O ₃	1 753
50 % 3 μm Al ₂ O ₃	1 731
100 % 3 μm Al ₂ O ₃	1 744
200 % 3 μm Al ₂ O ₃	1 752
400 % 3 μm Al ₂ O ₃	1 751

Dále byla změřena rychlost šíření ultrazvuku v 15 vzorcích (viz tabulka č. 14) se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w). Oproti předchozím vzorkům (tabulka 13) byl obsažen pouze 1 typ částic v různém procentuálním zastoupení (od 0 do 400 %). Byly přidány vzorky se 400 % částic kvůli hodnocení, jestli se výrazněji nezvýší či nesníží rychlost šíření ultrazvuku. Nebylo tomu tak,

a u těchto vzorků lze říci, že se rychlost nápadně nemění v závislosti na koncentraci či druhu částic.



Obr. č. 10: Graf závislosti rychlosti šíření ultrazvuku (c) na množství obsaženého 85% glycerolu (0 až 60 g na 100 g).

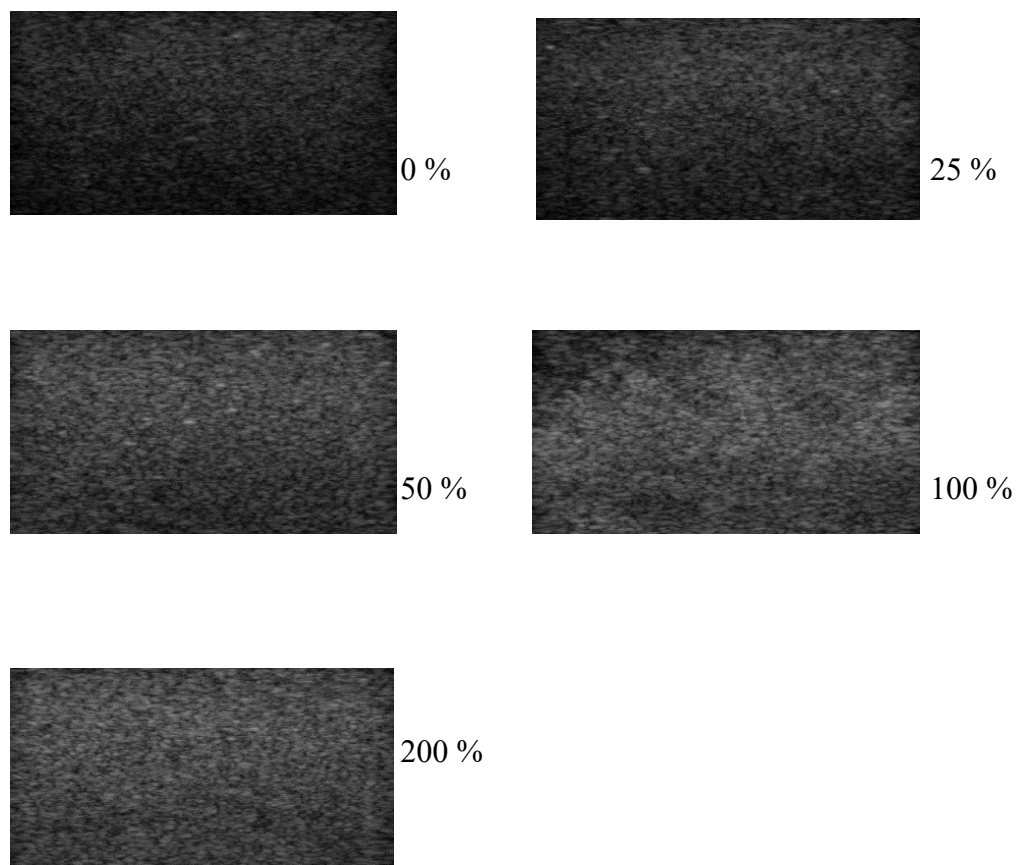
Byla také změřena rychlost šíření ultrazvuku ve vzorcích bez částic, které obsahovaly různé množství glycerolu. Z grafu na obrázku č. 10 jasně vyplývá lineární závislost mezi rychlostí a obsahem glycerolu, tzn. že čím více glycerolu vzorek obsahuje, tím rychleji se v něm ultrazvuk šíří.

Ke stejnému závěru dospěli i L. Cabrelli a kol., kteří vyvinuli ultrazvukový fantom na bázi syntetického polymeru styren-ethylen/butylen-styren, minerálního oleje a glycerolu, který ovlivňoval nejen rychlost šíření ultrazvuku ale i útlum a zpětný rozptyl.⁵⁰

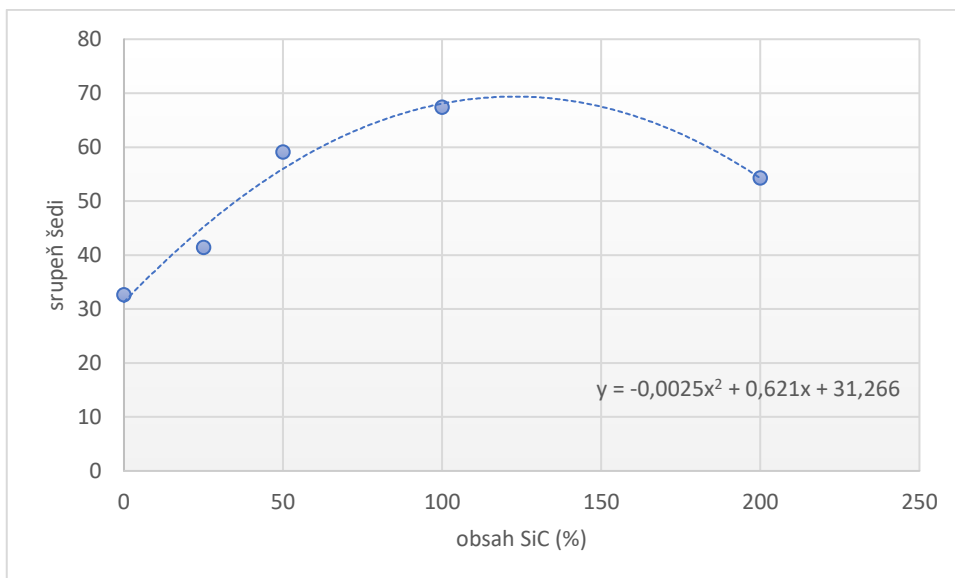
Rychlost šíření ultrazvukových vln je veličina závislá přímo úměrně na teplotě.⁷² Proto měření probíhalo při laboratorní teplotě (25 °C). Dle literatury je průměrná rychlost šíření ultrazvuku v mozku 1 538 m·s⁻¹ při 25 °C.⁶³ Těchto hodnot nedosahoval ani jeden z 30 vzorků s částicemi z důvodu vysokého obsahu glycerolu (60 g glycerolu 85% na 100 g). Nakonec se tedy ukázalo, že by bylo lepší použít glycerolu méně než 60 %, aby se výsledná rychlost šíření ultrazvuku přiblížila té v mozku. Úbytku objemu

by tedy mělo být zabráněno změnou podmínek skladování, nikoli množstvím glycerolu.

7.2.2 Analýza ultrasonogramů



Obr. č. 11: Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s rozdílným množstvím SiC (0, 25, 50, 100 a 200 %).

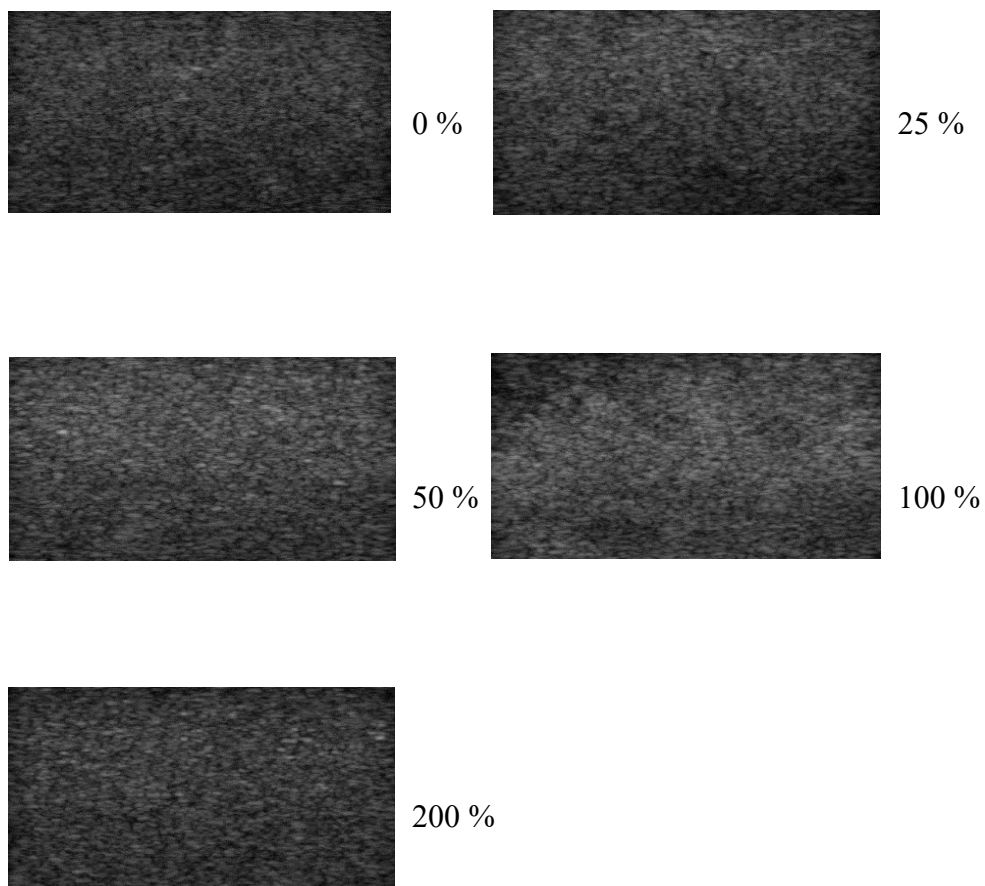


Obr. č. 12: Graf závislosti PSS AG s 3 druhy částic na různém množství SiC (100 % odpovídá 0,53 g/100 g).

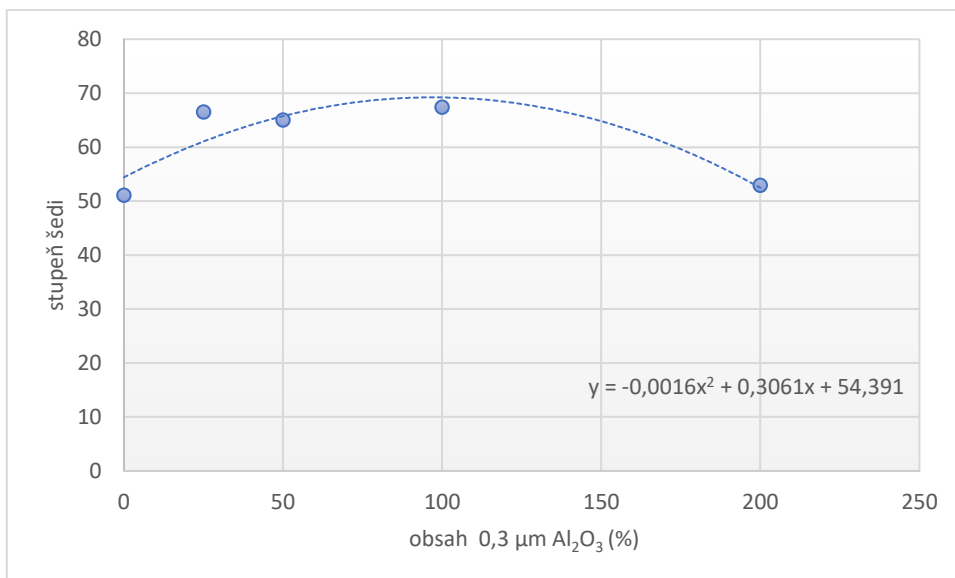
Na obrázku č. 11 lze vidět ultrazvukové obrazy (tzv. ultrasonogramy) se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) pořízené ultrazvukovým diagnostickým systémem Sonix RP. Jejich odlišnosti jsou dány různým stupněm echogenity – odrazivosti. Zvýšená odrazivost se na obrazu projeví jako oblast s jasnějšími pixely, tj. dochází k růstu stupňů šedi. Pro grafické znázornění (obrázek č. 12) výsledků byly vybrány hodnoty průměrných stupňů šedi (PSS), které reprezentují úhrnné chování vzorků.

Výše uvedené vzorky obsahují všechny 3 druhy částic, ale liší se obsahem SiC (0 až 200 %, kde 100 % je 0,53 g/100 g).

Na obrázku č. 12 je znázorněna závislost mezi změnou PSS na obsahu SiC. Od obsahu 0 až 100 % SiC se zvyšuje PSS, ultrazvukové obrazy mají jasnější pixely. U 200 % SiC nastává pokles PSS oproti 100 % SiC a to z 67,4 na 54,3. Pravděpodobným vysvětlením může být, že od jistého obsahu částic již začíná převažovat atenuace nad zpětným rozptylem, což se projeví ve snížení šedosti.

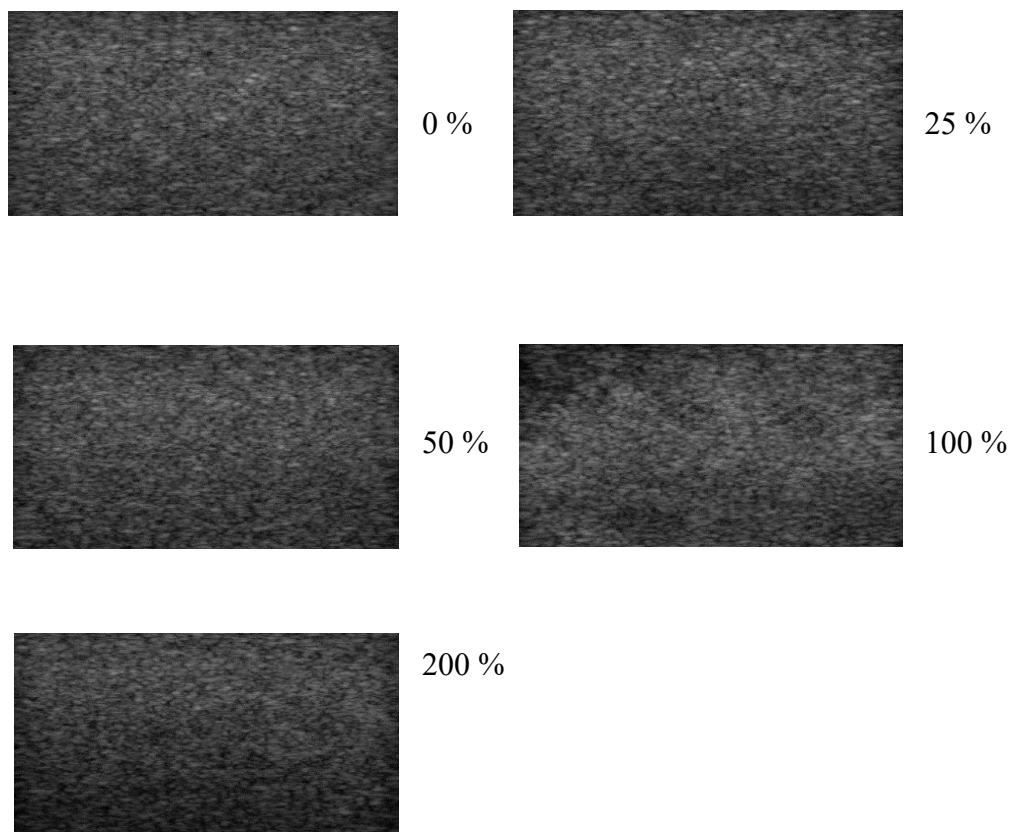


Obr. č. 13: Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s rozdílným množstvím 0,3 μm Al_2O_3 (0, 25, 50, 100 a 200 %).

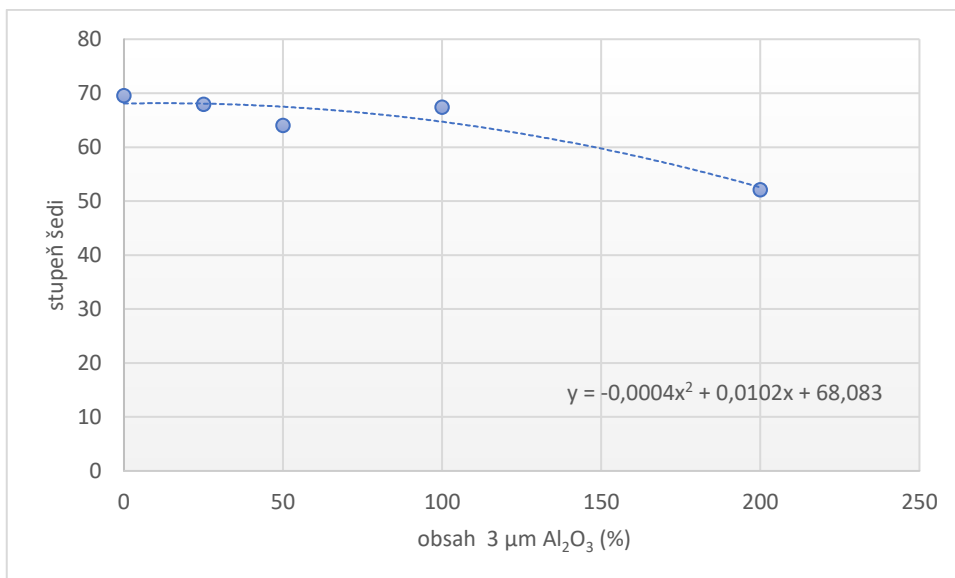


Obr. č. 14: Graf závislosti PSS AG s 3 druhy částic na různém množství 0,3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,88 g/100 g).

Na obrázku č. 13 jsou ultrasonogramy vzorků (se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w)) lišící se množství 0,3 μm Al₂O₃ (kdy 100 % je 0,88 g/100 g). Mění se odrazivost vyúsťuje v rozličnou šedost obrazů. Na grafu (obrázek č. 14) můžeme vidět závislost PSS na obsahu 0,3 μm Al₂O₃. I v tomto případě je zde rostoucí závislost PSS na obsahu částic, a to až do obsahu 100 %. Vychýlený bod od této závislosti projevuje vzorek s 25 % 0,3 μm Al₂O₃ s hodnotou PSS 66,5. 200% obsah částic se i v tomto případě projevuje prudkým snížením echogenity. Na rozdíl od vzorků z předešlého grafu se jedná o pokles z 67,4 na 52,9, tj. na hodnotu PSS podobnou vzorku s 0% obsahem 0,3 μm Al₂O₃.

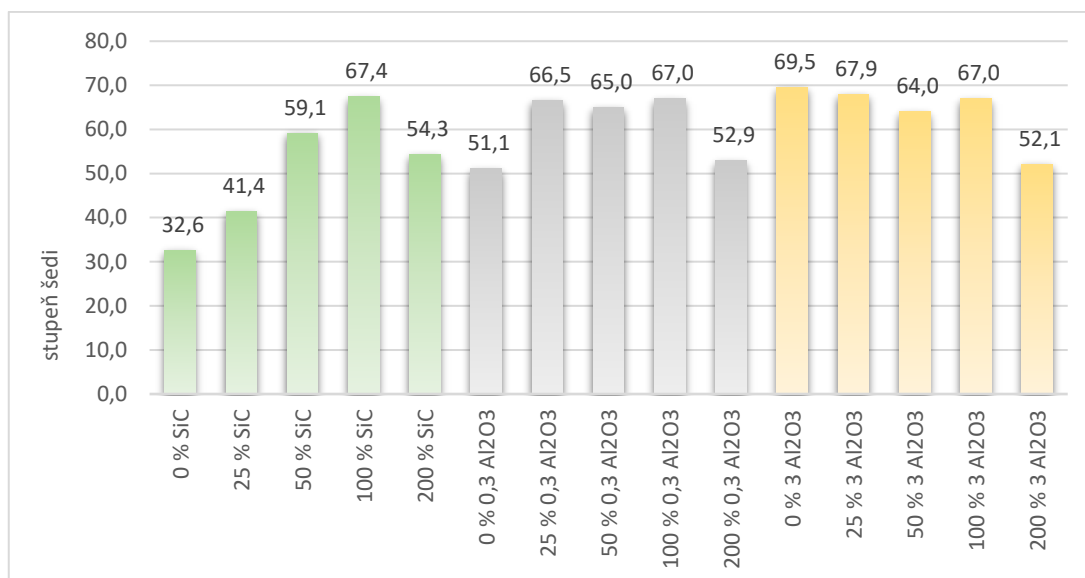


Obr. č. 15: Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s rozdílným množstvím $3 \mu m Al_2O_3$ (0, 25, 50, 100 a 200 %).



Obr. č. 16: Graf závislosti PSS AG s 3 druhy částic na různém množství 3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,94 g/100 g).

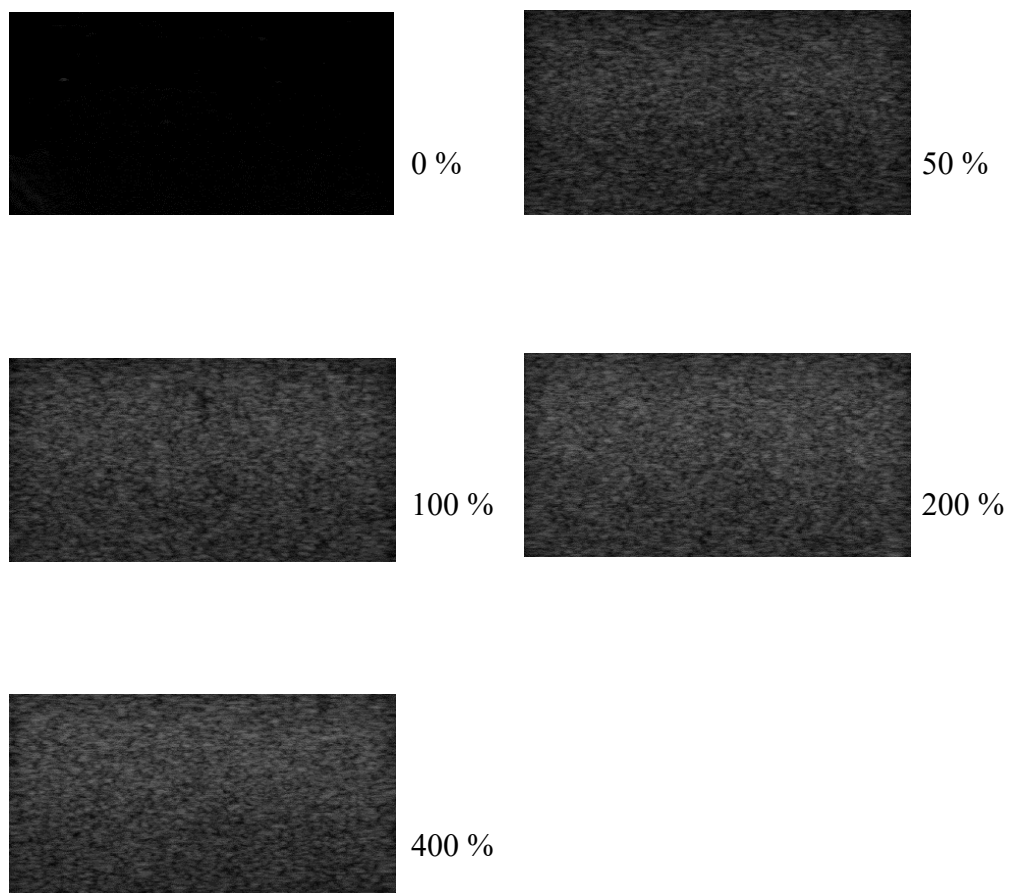
Na obrázku č. 15 můžeme vidět ultrazvukové obrazy vzorků (se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w)) s rozdílným množstvím 3 μm Al₂O₃ (kdy 100 % je 0,94 g/100 g). Graficky vyhodnocená závislost PSS na obsahu 3 μm Al₂O₃ je na obrázku č. 16. Tyto vzorky vykazují klesající trend PSS, tj. echogenita klesá se zvyšujícím se obsahem 3 μm Al₂O₃.



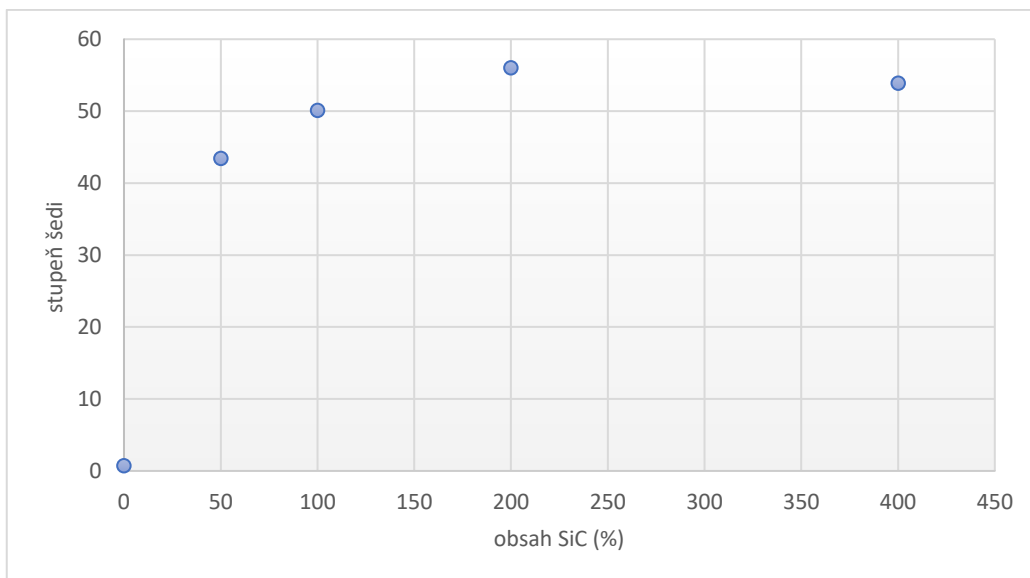
Obr. č. 17: Přehled PSŠ vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s rozdílným množstvím 1 typu částic (0–200 % SiC, 0,3 μm Al₂O₃, 3 μm Al₂O₃).

Při porovnání PSŠ všech vzorků (obrázek č. 17) je patrné, že částice SiC zvyšují echogenitu více než částice Al₂O₃. Rozměry obou druhů částic Al₂O₃ jsou menší než použité částice SiC, což může být vysvětlením tohoto pozorování. Vzorek s 0 % SiC, obsahuje pouze 0,3 μm a 3 μm Al₂O₃, a má nejnižší hodnotu PSŠ. Oproti tomu vzorek s 0 % 3 μm Al₂O₃, vykazuje nejvyšší PSŠ. Při porovnání vzorků obsahujících 200 % částic má nejvyšší echogenitu vzorek s 200 % SiC.

Podobné výsledky obsahovala i práce Liu a kol. Pracovali s AG s nanočásticemi (konkrétně křemíkové a polystyrenové) a dospěli k závěru, že jas obrazu, tj. PSŠ, se zvyšuje se zvyšující se koncentrací a velikostí částic.⁷³



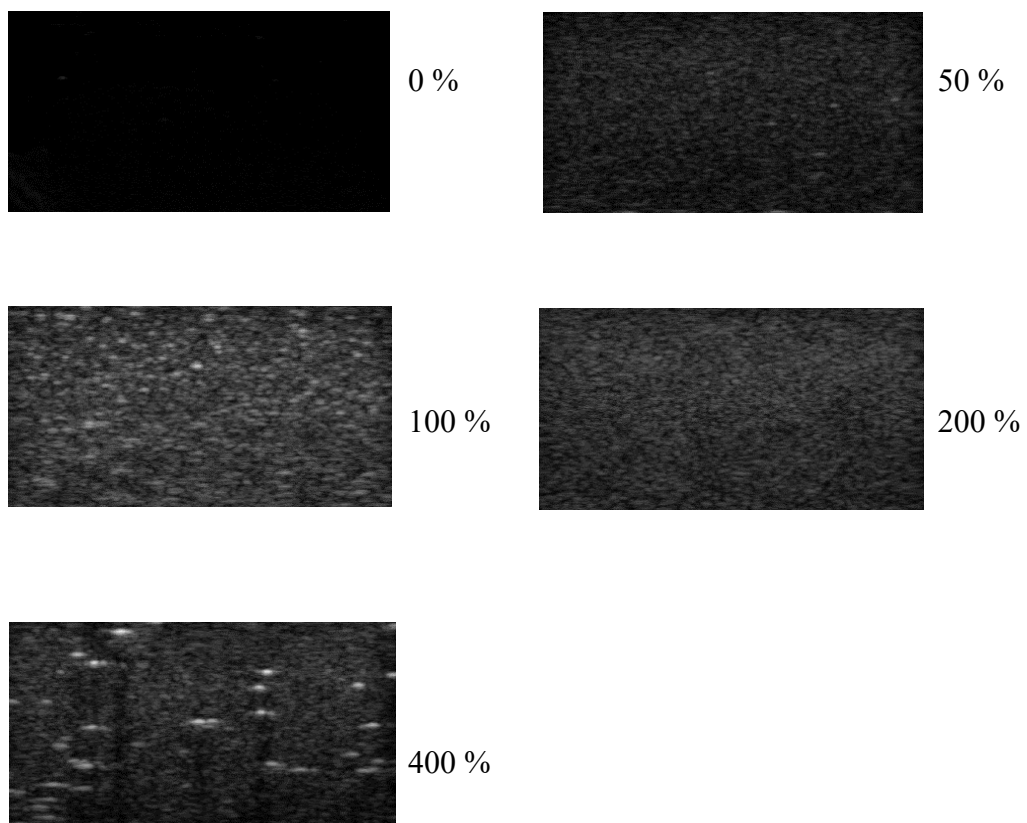
Obr. č. 18: *Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a (0, 50, 100, 200 nebo 400 %) SiC.*



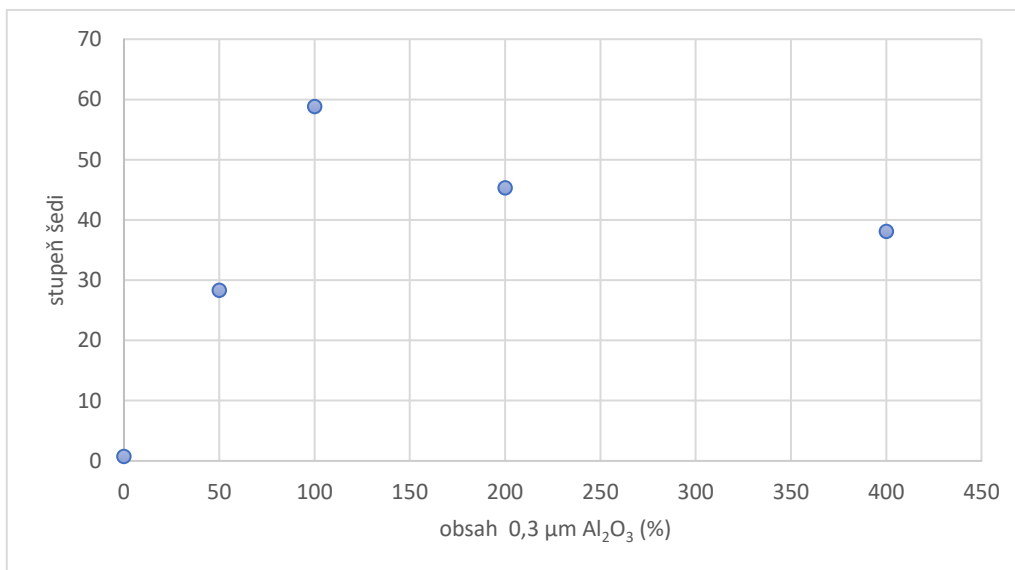
Obr. č. 19: Graf závislosti PSS AG na různém množství SiC (100 % odpovídá 0,53 g/100 g).

Na obrázku č. 18 jsou ultrazvukové obrazy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a jedním druhem částic, tj. různý obsah SiC (od 0 do 400 %). Na těchto obrazech lze vidět výraznou změnu šedi mezi vzorky s částicemi (50, 100, 200 a 400 % SiC) a bez částic (0 % SiC), který poskytuje anechogenní neboli bezodrazový ultrasonogram. Literatura udává tekutiny (např. krev) jako anechogenní obrazy.⁶¹

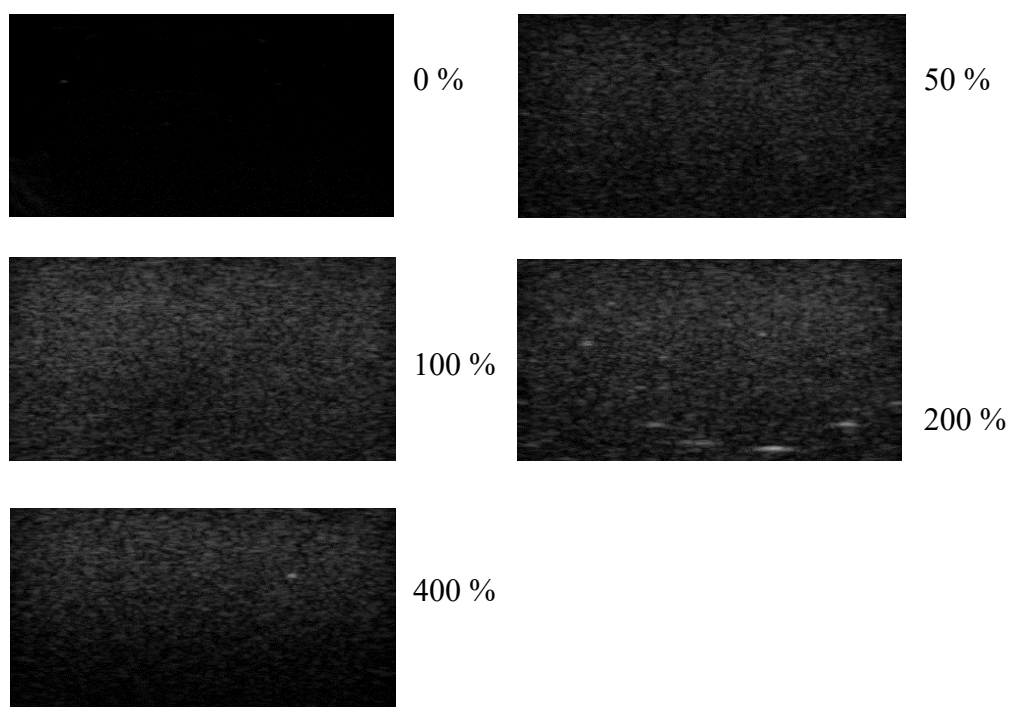
Na grafu (obrázek č. 19) je vynesena závislost PSS na obsahu SiC (0 až 400 %). Mezi 0 % a 200 % je patrný rostoucí vývoj PSS a u vzorku se 400 % SiC došlo ke snížení echogenity.



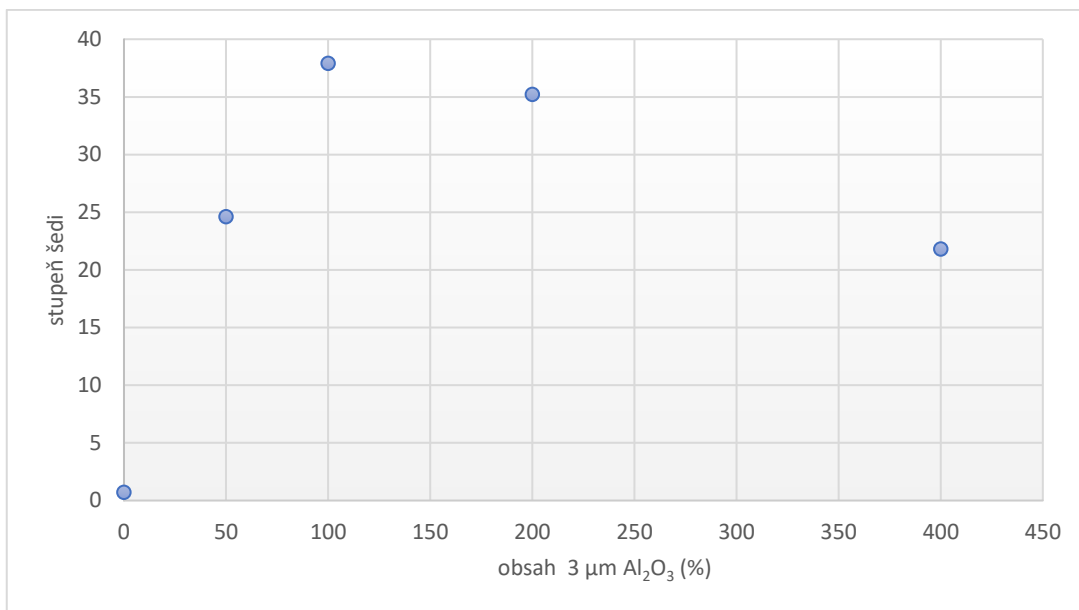
Obr. č. 20: Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a (0, 50, 100, 200 nebo 400 %) $0,3 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$.



Obr. č. 21: Graf závislosti PSS^{AG} na různém množství 0,3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,88 g/100 g).



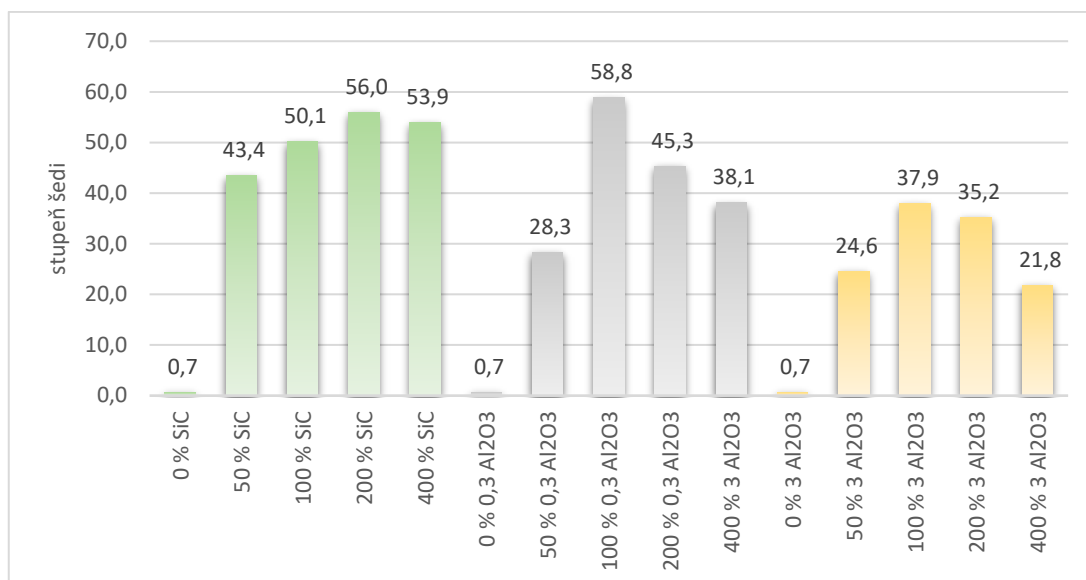
Obr. č. 22: Ultrasonogramy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a (0, 50, 100, 200 nebo 400 %) 3 μm Al₂O₃.



Obr. č. 23: Graf závislosti PSS AG na různém množství 3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,94 g/100 g).

Obrázky č. 20 a 23 ukazují ultrazvukové obrazy vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a jedním druhem částic, tj. různý obsah 0,3 μm/3 μm Al₂O₃ (od 0 do 400 %). Vzorky bez částic, stejně jako v obrázku č. 18, poskytují anechogenní ultrasonogramy. Můžeme pozorovat ultrazvukové artefakty, tj. obrazové změny. Vzhledem k jejich hyperchogenitě se jedná s největší pravděpodobností o vzduchové bubliny, jelikož právě vzduch výrazně zvyšuje odrazivost.

Obrázky č. 21 a 23 zobrazující křivky závislosti obsahu částic na PSS mají podobný průběh. Se zvyšujícím se množstvím částic se zvyšuje echogenita vzorků do obsahu částic 100 % (tj. vykazují nejvyšší stupeň šedi). U vzorků s obsahem částic 200 % a 400 % se hodnoty PSS snižují. Vyplývá z toho, že při použití menšího množství částic (100 %) se získá vzorek s vyšší echogenitou. Příprava vzorku obsahující menší množství částic je navíc snadnější.



Obr. č. 24: Přehled PSS vzorků se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) s rozdílným množstvím částic SiC, 0,3 μm Al₂O₃ a 3 μm Al₂O₃.

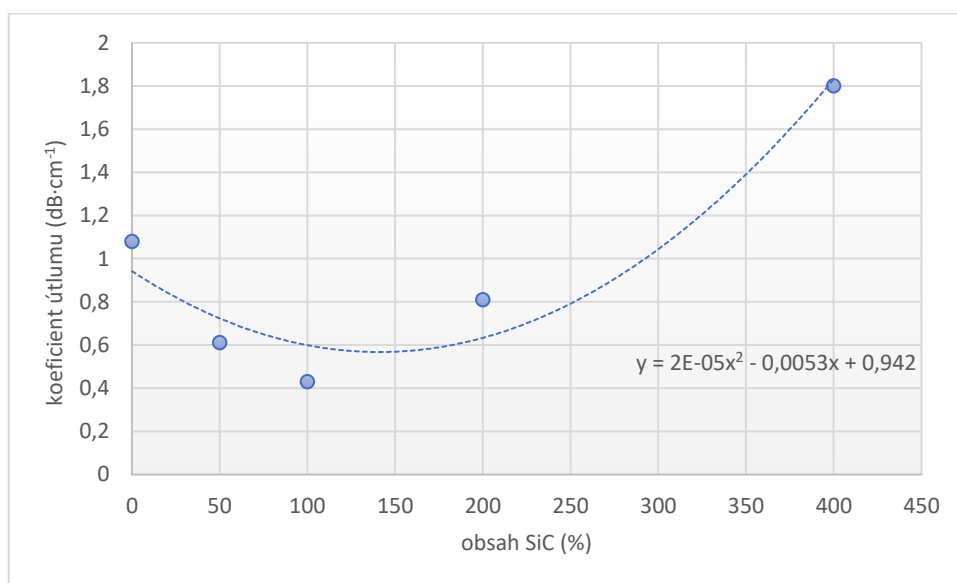
Na obrázku č. 24 je graficky znázorněno porovnání vzorků s 1 typem částic. Jelikož vzorky obsahují pouze jeden druh částic, lze srovnat jejich unikátní akustické vlastnosti bez interference ostatních dvou částic. Obsah SiC vykazuje nejvyšší PSS v množství 200 % a 0,3 a 3 μm Al₂O₃ v 100 %. Díky tomuto experimentu je patrné, které kombinace částic poskytují nižší a vyšší echogenitu pro rozlišení mozkových struktur a tumoru.

Ultrazvukové obrazy, potažmo echogenita, se liší nejen mezi jednotlivými strukturami, ale i mezi jednotlivci. I. Puls a kol⁷⁴ publikovali jako první studii týkající se echogenity mozkové tkáně. Interindividuální charakter vykazovala střední linie bazálního limbického systému, která byla u 80 % jedinců hyperechogenní a u 20 % měla stejně nízkou echogenitu jako okolní mozková tkáň. Jako části s nižší echogenitou tedy i s nízkými stupni šedi byl označen mozkový pararenchym, jako je mozkový kmen, thalamus, kalózní těleso, mozeček a bílá hmota čelního, týlního, spánkového a temenního laloku. Vyšší odrazivost mají struktury jako interpedunkulární cisterna a báze lebky. Lumen mozkových komor jsou anechogenní oblasti. S. Behnke a kol.⁷⁵ diskutovali ultrasonografický charakter tumorů mozku. Mají hyperechogenní strukturu a občasným hypoechogenním „halo“, které je vytvořeno kompresí přilehlé tkáně.

7.2.3 Koeficient útlumu

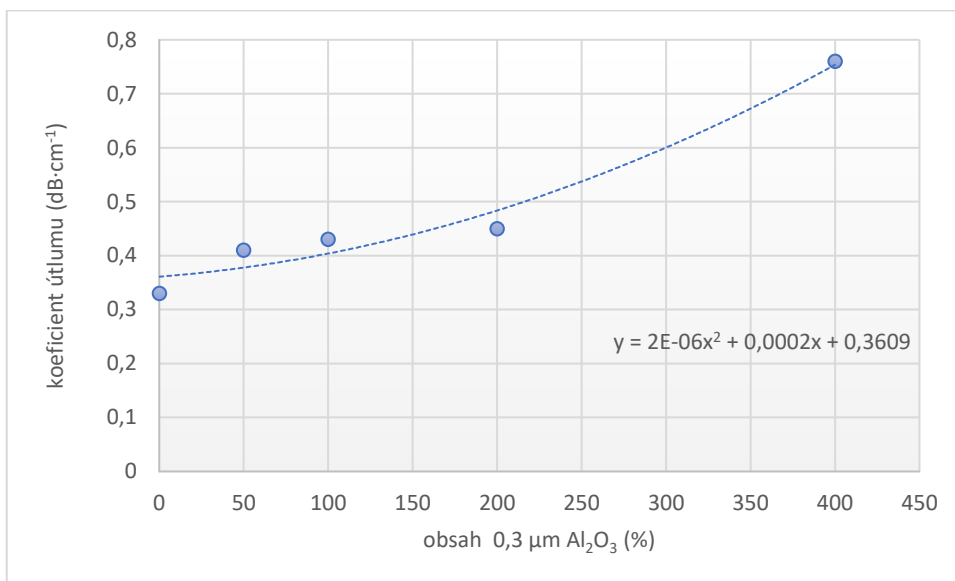
Útlum vyjadřuje pokles intenzity ultrazvuku při průchodu tkáněmi. Koeficient útlumu α je charakteristická veličina pro dané prostředí a udává se v jednotkách $\text{dB}\cdot\text{cm}^{-1}$ vztažený na 1 MHz.⁶³ Obecně je známo, že tkáně a tekutiny mají nižší koeficient útlumu než kosti. Literatura udává hodnotu koeficientu útlumu pro mozek $0,9 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$.⁶⁵ Je známo, že útlum je závislou veličinou na teplotě, a to nepřímo úměrně.^{4,72} Vzorky byly proto měřeny za stejných podmínek při laboratorní teplotě ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Jak echogenita, tak i útlum ultrazvuku má souvislost s patologickými úkazy na ultrasonogramu, a proto jsou tyto hodnoty využívány při kvantitativní charakteristice tkání.⁷⁶

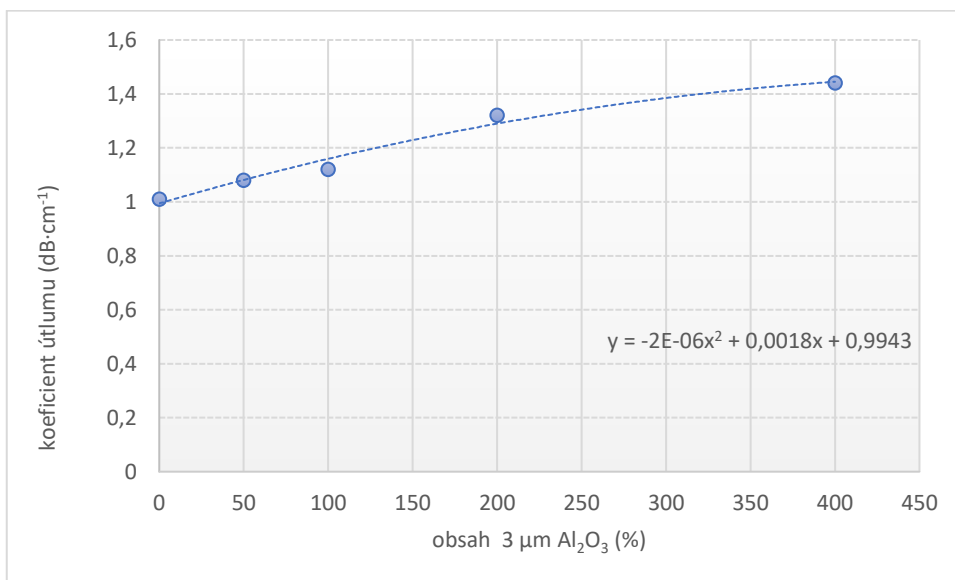


Obr. č. 25: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu SiC; vzorky se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s různým obsahem SiC (100 % odpovídá 0,53 g/100 g).

Na obrázku č. 25 můžeme pozorovat graficky vynesenu závislost útlumu na obsahu částic SiC. U vzorku s 0 % SiC je jeho hodnota $1,08 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$. U dalších vzorků je klesající trend hodnot útlumu a až vzorek obsahující 200 % SiC dosahuje vyšších hodnot, přesněji řečeno $0,81 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$. Vzorek s 400 % SiC vykazuje nejvyšší koeficient útlumu, a to $1,8 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$.

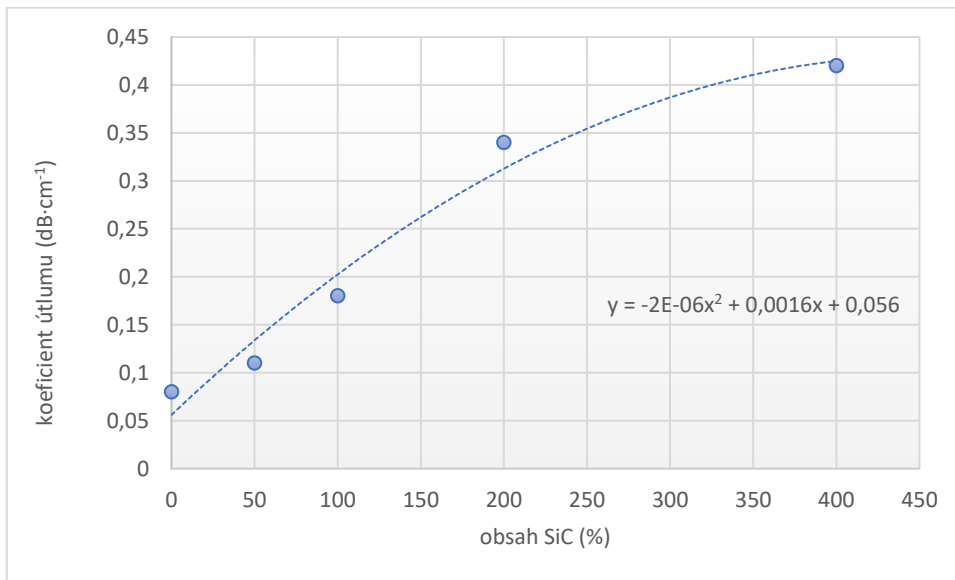


Obr. č. 26: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu 0,3 μm Al₂O₃; vzorky se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s různým obsahem 0,3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,88 g/100 g).

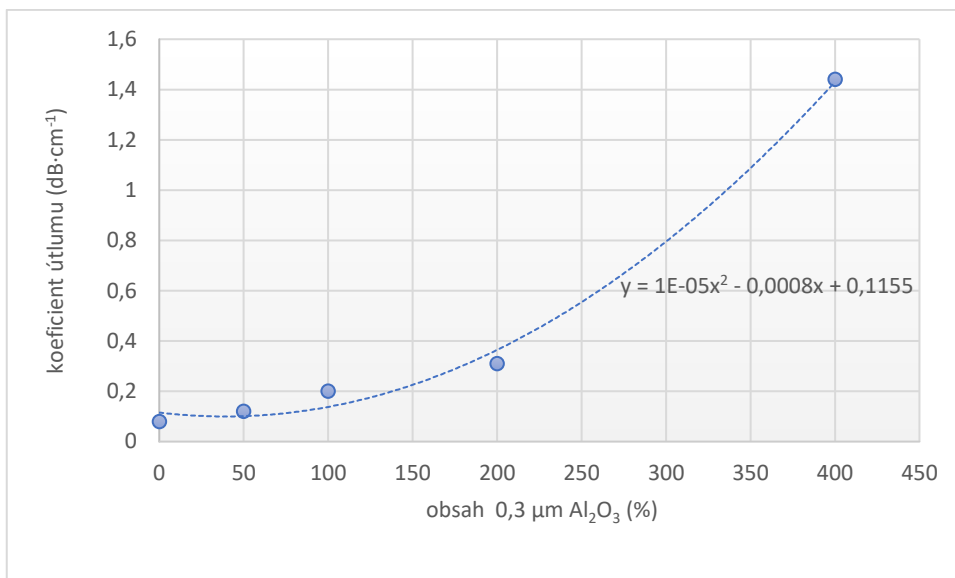


Obr. č. 27: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu 3 μm Al₂O₃; vzorky se složením 1 % agaru (w/w) a 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 druhy částic s různým obsahem 3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,94 g/100 g).

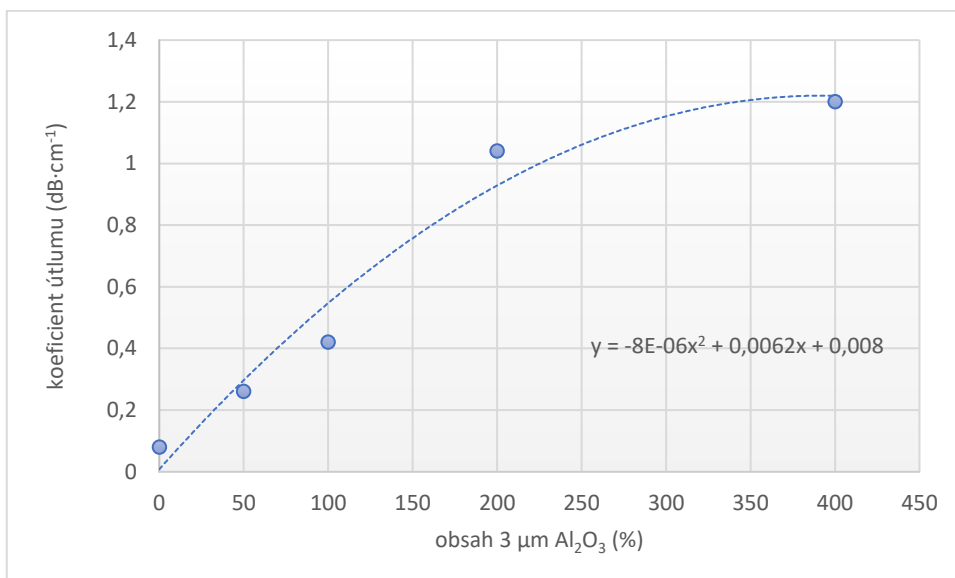
Na grafech (obrázek č. 26 a 27) jsou zobrazeny závislosti koeficientu útlumu na obsahu 0,3 a 3 μm Al_2O_3 . Se zvyšujícím se množstvím částic koeficient útlumu roste. Při porovnání obou těchto částic lze tvrdit, že vzorky lišící se obsahem 3 μm Al_2O_3 (obrázek č. 27) mají vyšší hodnoty koeficientu útlumu.



Obr. č. 28: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu SiC; vzorky se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol w/w) a SiC (100 % odpovídá 0,53 g/100 g).



Obr. č. 29: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu 0,3 μm Al₂O₃; vzorky se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 0,3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,88 g/100 g).



Obr. č. 30: Graf závislosti koeficientu útlumu na obsahu 3 μm Al₂O₃; vzorky se složením 1 % agaru (w/w), 60 % glycerolu (85% glycerol, w/w) a 3 μm Al₂O₃ (100 % odpovídá 0,94 g/100 g).

Na grafech (obrázky č. 28 až 30) jsou zobrazeny závislosti koeficientu útlumu u vzorků s 1 druhem částic (SiC, 0,3 nebo 3 μm Al_2O_3) lišící se jejich obsahem (od 0 do 400 %). Oproti koeficientům útlumu vzorků s všemi 3 druhy částic (obrázek č. 25 až 27) lze poznamenat, že při použití pouze jednoho druhu částic dojde ke snížení útlumu.

Závislosti zobrazené v obrázcích č. 29 a 30 mají nejprve pozvolný nárůst koeficientu útlumu a poté dochází k prudkému exponenciálnímu růstu. Nejvyšší koeficienty útlumu mají vzorky s 3 μm Al_2O_3 (obrázek č. 30), což může být způsobeno i jejich většími rozměry v porovnání se zbylými 2 druhy částic.

V rámci tohoto experimentu byly získány hodnoty koeficientů útlumů pro jednotlivé vzorky s odlišným obsahem částic (viz obrázky 25 až 30). Bylo dokázáno, že přidáním různého množství částic můžeme přizpůsobit žádanou echogenitu. Koeficienty útlumu jsou odlišné mezi jednotlivými strukturami mozku. To dokázal F. Kremkau a kol.⁷⁷, který porovnával útlum v 22 mozcích. Koeficienty útlumu byly získány při různých frekvencích a vyšší hodnoty koeficientu útlumu vykazovala bílá hmota v porovnání s šedou.

Z grafů na obrázcích č. 28 až 30 je patrný rozdíl mezi hodnotami koeficientu útlumu vzorků s a bez částic. Podobnou věc pozoroval i A. Józefczak a kol.⁷⁸, kteří ve své práci studovali vliv magnetických nanočástic na fantom z agarového hydrogelu. Koeficient útlumu u vzorku bez částic byl nižší, konkrétně $0,95 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$, oproti vzorku s částicemi s hodnotou $1,62 \text{ dB}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Vzhledem k akustickým parametrům se zdá být výhodnější použití ve fantomu kombinaci druhů částic, jelikož každý druh částic ovlivňuje jiným způsobem stupeň šedi a koeficient útlumu. Fantom tak může sestávat z oblastí s různým množstvím částic, a tím se jednotlivé struktury na sonogramu mohou od sebe odlišit.

8 Závěr

Z výsledků experimentální části diplomové práce vyplynuly pro vývoj materiálu pro ultrazvukový fantom mozku na bázi agaru následující závěry:

- Při přípravě vodné suspenze do vzorků obsahující částice SiC a Al₂O₃ bylo pro usnadnění smáčení a rozbití aglomerátů vhodné použít ultrazvukovou lázeň. Před odléváním vzorků do formy bylo nutné snížit teplotu směsi na 35 °C, aby nedošlo během chladnutí k sedimentaci částic.
- Byla nalezena závislost mezi množstvím odpařené vody a obsahem glycerolu, který přímo úměrně zpomaluje ztrátu vody ze vzorků. Nejmenší ztráty vykazovaly vzorky obsahující 80 % glycerolu, ty však během skladování při teplotě 37 °C změnilly své skupenství na tekuté. Vzorky s obsahem agaru 0,5 a 0,75 % byly příliš měkké a hůře manipulovatelné, jelikož se snadno porušila jejich celivost. Dle zjištění by měl mít materiál pro fantom obsah agaru minimálně 1 %. Pro hodnocení akustických parametrů byl tedy použit AG s 1 % agaru a 60 % glycerolu.
- Bylo zjištěno, že na velikost rychlosti šíření ultrazvuku nemá vliv druh a ani koncentrace částic. Vzorky bez částic, obsahující různé množství glycerolu, vykazovaly lineární závislost mezi velikostí rychlosti ultrazvuku a obsahem glycerolu. Čím více glycerolu vzorek obsahoval, tím rychleji se v něm ultrazvuk šířil.
- Rychlost šíření ultrazvuku v AG se svojí velikostí nejvíce přibližovala reálné hodnotě (pro mozek) při obsahu glycerolu 20 %. Z tohoto hlediska by bylo vhodné použít glycerolu méně než 60 %, aby se výsledná rychlost šíření ultrazvuku přiblížila té v mozku. Úbytku objemu v důsledku odpařování vody by mohlo být zabráněno jinými způsoby než vysokým obsahem glycerolu, např. změnou podmínek skladování (obalový materiál, teplota atd.).
- Vzorky s částicemi poskytovaly v závislosti na jejich typu a množství specifické ultrasonogramy. Vyšší odrazivost částic se na obrazu projevila jako oblast s jasnějšími pixely, tj. vyššími stupni šedi. Od jistého množství částic (200 % SiC a 100 % 0,3 a 3 μm Al₂O₃) začínala převažovat atenuace nad zpětným rozptylem, což se projevilo ve snížení šedosti ultrasonogramů.

- Při analýze ultrasonogramů byly objeveny hyperechogenní obrazové změny, s největší pravděpodobností se jednalo o vzduchové bubliny. Byla demonstrována důležitost správné přípravy AG, aby se tyto jevy nevyskytovaly.
- Byly získány hodnoty koeficientů útlumů pro jednotlivé vzorky s odlišným obsahem částic. Přidáním různého množství částic můžeme přizpůsobit žádanou echogenitu, která je ovlivněna i útlumem. Ukázalo se, že volbou druhu a obsahu částic je možno libovolně měnit koeficient útlumu v rozsahu $0,08 - 1,44 \text{ dB} \cdot \text{cm}^{-1}$ (2 MHz). Tím pádem se na ultrasonogramu mohou od sebe odlišit druhy mozkové tkáně a tumor.

9 Literatura

1. Forte, A. E., Galvan, S., Manieri, F., Rodriguez y Baena, F. & Dini, D. A composite hydrogel for brain tissue phantoms. *Mater. Des.* **112**, 227–238 (2016).
2. Macmanus, D. B., Murphy, J. G. & Gilchrist, M. D. Traumatic Brain Injury : A Review and Recommendation for a Universal Experimental Protocol. in *17th U.S. National Congress on Theoretical and Applied Mechanics* (2014).
3. Prevost, T. P. *et al.* Dynamic mechanical response of brain tissue in indentation in vivo, in situ and in vitro. *Acta Biomater.* **7**, 4090–4101 (2011).
4. Culjat, M. O., Goldenberg, D., Tewari, P. & Singh, R. S. A review of tissue substitutes for ultrasound imaging. *Ultrasound Med. Biol.* **36**, 861–873 (2010).
5. Schneiderová, M. Reologické vlastnosti gelů agaru pro mozkový ultrazvukový fantom. (Univerzita Karlova, 2022).
6. Qurash, M., Yaacob, N., Azuan, N., Khaleel, Y. & Zakaria, R. Special ultrasound phantom for interventional training: Construction, advantages, and application. *J. Med. Ultrasound* **26**, 210 (2018).
7. Mobashsher, A. T. & Abbosh, A. M. Artificial Human Phantoms: Human Proxy in Testing Microwave Apparatuses That Have Electromagnetic Interaction with the Human Body. *IEEE Microw. Mag.* **16**, 42–62 (2015).
8. Akhtar, K. S. N., Chen, A., Standfield, N. J. & Gupte, C. M. The role of simulation in developing surgical skills. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* **7**, 155–160 (2014).
9. Bude, R. O. & Adler, R. S. An easily made, low-cost, tissue-like ultrasound phantom material. *J. Clin. Ultrasound* **23**, 271–273 (1995).
10. Souza, R. M. *et al.* Standard operating procedure to prepare agar phantoms. *J. Phys. Conf. Ser.* **733**, 012044 (2016).
11. Sun Nuclear Corporation. <https://www.sunnuclear.com/> (2022).

12. CAE HEALTHCARE. <https://www.caehealthcare.com/> (2022).
13. Computerized Imaging Reference Systems, Inc. <https://www.cirsinc.com/> (2022).
14. Kim, Y. H. Ultrasound Phantoms to Protect Patients from Novices. *Korean J. Pain* **29**, 73–77 (2016).
15. Browne, J. ., Ramnarine, K. ., Watson, A. . & Hoskins, P. . Assessment of the acoustic properties of common tissue-mimicking test phantoms. *Ultrasound Med. Biol.* **29**, 1053–1060 (2003).
16. Cheyne, S. A. Sound speed measurements in ethanol/water solutions and Kentucky bourbon whiskey. in *179th Meeting of the Acoustical Society of America* vol. 42 045008 (2019).
17. Boote, E. J. & Zagzebski, J. A. Performance tests of Doppler ultrasound equipment with a tissue and blood-mimicking phantom. *J. Ultrasound Med.* **7**, 137–147 (1988).
18. Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4504–4526 (2003).
19. Zell, K., Sperl, J. I., Vogel, M. W., Niessner, R. & Haisch, C. Acoustical properties of selected tissue phantom materials for ultrasound imaging. *Phys. Med. Biol.* **52**, N475–N484 (2007).
20. Cao, R., Huang, Z., Varghese, T. & Nabi, G. Tissue mimicking materials for the detection of prostate cancer using shear wave elastography: A validation study. *Med. Phys.* **40**, 022903 (2013).
21. Taghizadeh, S., Labuda, C. & Mobley, J. Development of a Tissue-Mimicking Phantom of the Brain for Ultrasonic Studies. *Ultrasound Med. Biol.* **44**, 2813–2820 (2018).
22. Johnston-Banks, F. A. Gelatine. in *Food Gels* 233–289 (Springer Netherlands, 1990).
23. Schrieber, R. & Gareis, H. *Gelatine Handbook*. (2007).

24. Astrahan, M. A. Concerning hyperthermia phantom. *Med. Phys.* **6**, 235–235 (1979).
25. Ukhrowiyah, N., Setyaningsih, N., Hikmawati, D. & Yasin, M. Synthesis and characterization of breast-phantom-based gelatine-glutaraldehyde-TiO₂ as a test material for the application of breast cancer diagnosis. *J. Phys. Conf. Ser.* **853**, 012028 (2017).
26. Madsen, E. L., Zagzebski, J. A., Banjavie, R. A. & Jutila, R. E. Tissue mimicking materials for ultrasound phantoms. *Med. Phys.* **5**, 391–394 (1978).
27. Earle, M., Portu, G. De & Devos, E. Agar ultrasound phantoms for low-cost training without refrigeration. in *African Journal of Emergency Medicine* vol. 6 18–23 (African Federation for Emergency Medicine, 2016).
28. Electrotechnical Commission. IEC 60601-2-5:2015: Medical electrical equipment Part 2-37: Particular requirements for the basic safety and essential performance of ultrasonic physiotherapy equipment 2.0 ed. (2015).
29. Diego, S. Gellan gum. in *Thermoreversible Networks* 219–235 (1997).
30. Cortela, G. A., Negreira, C. A. & Pereira, W. C. A. Durability study of a gellan gum-based tissue-mimicking phantom for ultrasonic thermal therapy. *J. Acoust. Soc. Am.* **147**, 1531–1545 (2020).
31. Schofer, J. M., Nomura, J. T., Bauman, M. J. & Sierzenski, P. R. *Prospective Durability Testing of a Vascular Access Phantom. Western Journal of Emergency Medicine* vol. 302 (2010).
32. Šklubalová, Z. a kol. *Základní praktická cvičení z farmaceutické technologie.* (2020).
33. Šnejdrová, E., Sajková, D. & Černá, I. Deriváty celulosy v individuální přípravě léčiv. **11**, 133–136 (2015).
34. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **6**, 105–121 (2015).
35. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- 54**, 3–12 (2002).
36. Peppas, N. A., Slaughter, B. V. & Kanelberger, M. A. Hydrogels. in *Polymer Science: A Comprehensive Reference* vol. 9 385–395 (Elsevier, 2012).
 37. Gyles, D. A., Castro, L. D., Silva, J. O. C. & Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *Eur. Polym. J.* **88**, 373–392 (2017).
 38. Nezhad-Mokhtari, P., Ghorbani, M., Roshangar, L. & Soleimani Rad, J. Chemical gelling of hydrogels-based biological macromolecules for tissue engineering: Photo- and enzymatic-crosslinking methods. *Int. J. Biol. Macromol.* **139**, 760–772 (2019).
 39. Sharma, S. & Tiwari, S. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **162**, 737–747 (2020).
 40. Buffa, R., Pravda, M., Sedláček, P. & Chytil, M. *Hydrogely*. (Contipro Biotech, 2015).
 41. H. Gulrez, S. K., Al-Assaf, S. & O, G. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. in *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* vol. 51 1248–1259 (InTech, 2011).
 42. Sime, W. J. Alginates. in *Food Gels* 53–78 (Springer Netherlands, 1990).
 43. Takigami, M. *et al.* Preparation and Properties of CMC Gel. *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* **32**, 713–716 (2007).
 44. Hennink, W. . & van Nostrum, C. . Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 13–36 (2002).
 45. Sperinde, J. J. & Griffith, L. G. Synthesis and Characterization of Enzymatically-Cross-Linked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules* **30**, 5255–5264 (1997).
 46. Matsushashi, T. Agar. in *Food Gels* vol. 74 1–51 (Springer Netherlands, 1990).

47. Pagliaro, B. M., Rossi, M. & Pagliaro, M. *The Future of Glycerol*. (Royal Society of Chemistry, 2008).
48. Wernke, M. J. Glycerol. in *Encyclopedia of Toxicology* 754–756 (Elsevier, 2014).
49. Morrison, L. R. Glycerol. in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Wiley, 2000).
50. Cabrelli, L. C., Grillo, F. W., Sampaio, D. R. T., Carneiro, A. A. O. & Pavan, T. Z. Acoustic and Elastic Properties of Glycerol in Oil-Based Gel Phantoms. *Ultrasound Med. Biol.* **43**, 2086–2094 (2017).
51. Arham, R., Mulyati, M. T., Metusalach, M. & Salengke, S. Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. *Int. Food Res. J.* **23**, 1669–1675 (2016).
52. Lee, W.-K. *et al.* Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.* **164**, 23–30 (2017).
53. Nussinovitch, A. Agar. in *Hydrocolloid Applications* 1–18 (Springer US, 1997).
54. Lai, M.-F. & Lii, C. Rheological and thermal characteristics of gel structures from various agar fractions. *Int. J. Biol. Macromol.* **21**, 123–130 (1997).
55. Nishinari, K. & Fang, Y. Relation between structure and rheological/thermal properties of agar. A mini-review on the effect of alkali treatment and the role of agarpectin. *Food Struct.* **13**, 24–34 (2017).
56. Velíšek, J. & Hajšlová, J. *Chemie potravin 1. Chemie potravin 2* (OSSIS, 2009).
57. SELBY, H. H. & WHISTLER, R. L. AGAR. in *Industrial Gums* 87–103 (1993).
58. Vilgis, T. A. Gels: model systems for soft matter food physics. *Curr. Opin. Food Sci.* **3**, 71–84 (2015).
59. NUSSINOVITCH, A. & PELEG, M. Strength-Time Relationships of Agar

- and Alginate Gels. *J. Texture Stud.* **21**, 51–60 (1990).
60. Hrazdira, I. *Úvod do ultrasonografie v otázkách a odpovědích pro studenty lékařské fakulty.* (LF MU, 2008).
 61. Sedlář, M., Staffa, E. & Mornstein, V. *Zobrazovací metody využívající neionizující záření.* (2014).
 62. Zuna, I. & Poušek, L. *Úvod do zobrazovacích metod v lékařské diagnostice.* (Vydavatelství ČVUT, 2000).
 63. Čech, E. *et al. Ultrazvuk v lékařské diagnostice a terapii.* (Praha: Avicenum, 1982).
 64. Penhaker, M. *Lékařské terapeutické přístroje.* (VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2007).
 65. Drastich, A. *Zobrazovací systémy v lékařství.* (Mezinárodní organizace novinářů, 1990).
 66. Hrazdira, I. *et al. Úvod do ultrazvukové diagnostiky.* (Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1993).
 67. Palmer, P. E. S. ed. *Manuál ultrazvukové diagnostiky.* (Grada Publishing, 2000).
 68. *Český lékopis 2017: Pharmacopoea Bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII).* (Grada Publishing, 2017).
 69. Souza, R. M., Costa-Félix, R. P. B. & Alvarenga, A. V. The importance of proper storage of agar phantom on the water-glycerol-benzalkonium chloride mixture to maintain the ultrasonic group velocity. *Metrologia* 5–9 (2021).
 70. Su, J.-F. *et al.* Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. *Ind. Crops Prod.* **31**, 266–276 (2010).
 71. Wang, R., Wang, Q. & Li, L. Evaporation behaviour of water and its plasticizing effect in modified poly(vinyl alcohol) systems. *Polym. Int.* **52**, 1820–1826 (2003).

72. Monteiro Souza, R., de Assis, M. K. M., Pereira Barretto da Costa-Félix, R. & Victor Alvarenga, A. Speed of sound in the IEC tissue-mimicking material and its maintenance solution as a function of temperature. *Ultrasonics* **118**, (2021).
73. Liu, J. *et al.* Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography. *Phys. Med. Biol.* **51**, 2179–2189 (2006).
74. Puls, I. *et al.* Transcranial sonography of the brain parenchyma: comparison of B-mode imaging and tissue harmonic imaging. *Ultrasound Med. Biol.* **26**, 189–194 (2000).
75. Behnke, S. & Becker, G. Sonographic imaging of the brain parenchyma. *Eur. J. Ultrasound* **16**, 73–80 (2002).
76. Jiřík, R., Taxt, T. & Jan, J. Ultrasound attenuation imaging. *J. Electr. Eng.* **25**, 245–261 (2003).
77. Kremkau, F. W., Barnes, R. W. & McGraw, C. P. Ultrasonic attenuation and propagation speed in normal human brain. *J. Acoust. Soc. Am.* **70**, 29–38 (1981).
78. Józefczak, A., Kaczmarek, K., Kubovčíková, M., Rozynek, Z. & Hornowski, T. The effect of magnetic nanoparticles on the acoustic properties of tissue-mimicking agar-gel phantoms. *J. Magn. Magn. Mater.* **431**, 172–175 (2017).