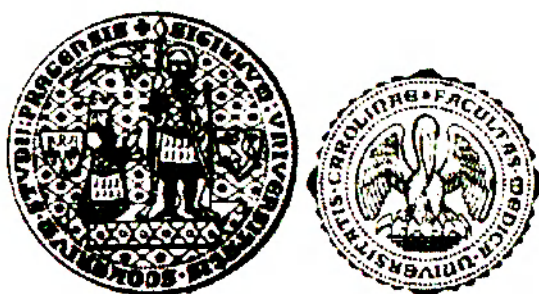


Univerzita Karlova Praha

1. lékařská fakulta



Bakalářská práce

**Závislost biologických účinků rázové vlny na
hustotě buněk v ohnisku**

Autor: *Jan Cimbálník*

Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr., RNDr. Jiří Beneš CSc.

Praha 2007

Poděkování:

Za všestrannou pomoc, užitečné připomínky a za čas, který mi věnoval, děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Prof. MUDr., RNDr. J. Benešovi, CSc. Zvláštní dík pak patří doc. RNDr. P. Poučkové, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma *Závislost biologických účinků rázové vlny na hustotě buněk v ohnisku* jsem vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Praze dne

.....

Jan Cimbálník

Abstrakt

Rozvoj techniky v medicíně zažívá v poslední době mohutný rozvoj. Tento trend se také týká ultrasonografické techniky a možných aplikací ultrazvuku v terapii. Moderní ultrasonografické přístroje umožňují nejen provádět běžné morfologické a funkční vyšetření, ale i invazivní zákroky diagnostického či léčebného charakteru. Jedna z možných aplikací ultrazvuku je využití rázové vlny k rozbíjení ledvinových či žlučových konkrementů. V dnešní době je již naprosto běžná tzv. extrakorporální litotrypse rázovou vlnou, kdy je využito mohutného tlakového kmitu rázové vlny k destrukci konkrementu, což umožní jeho odchod z těla přirozenou cestou (močovodem a močovou trubicí). V několika posledních letech jsou zkoumány rázové vlny jako možná terapie nádorů parenchymatálních orgánů. Tato práce se zabývá účinkem rázových vln na normální i nádorové buněčné elementy především v závislosti na hustotě buněk v ohnisku, a to jak u pokusů in vitro, tak na experimentálních zvířatech.

Abstract

In the last few years there has been a significant development of technics in medicine. This trend concerns ultrasonographic technics as well as possible applications of ultrasound in medicine. Modern ultrasonographic machines allow using ultrasound not only for common morfological and funcional examinations, but also for invasive diagnostic or therapeutic applications. One of possible applications of ultrasound is the usage of shock wave for destruction of kidney or gall stones. Extracorporal lithotripsy is a common method for destruction of kidney stones today. In the last couple of years are shock waves were researched as a possible treatment of parenchymatic tissue cancer. This thesis is about the dependence of biological effects of shock waves on density of cells in point of focus. It includes description of in vitro experiments as well as experiments on living animals.

Obsah

1. Úvod	6
1.1. Historie rázové vlny	6
1.2. Charakteristika rázové vlny	11
1.3. Generátory rázových vln	12
2. Cíle práce	18
3. Materiál a metody	19
4. Výsledky	21
4.1. In Vitro	21
4.2. In Vivo	24
5. Diskuse	29
6. Závěry	31
7. Literatura	32

1. Úvod

1.1 Historie rázové vlny

Mohutný rozvoj a nástup nových technologií v medicíně přináší stále dokonalejší diagnostické a terapeutické přístroje. Tyto pokroky se týkají také ultrazvukové diagnostiky a terapeutických aplikací ultrazvuku. Moderní ultrasonografické přístroje umožňují provádět nejen běžné morfologické a funkční vyšetření, ale i invazivní zákroky diagnostického či léčebného charakteru [1]. Jedna z terapeutických aplikací ultrazvuku je využití rázové vlny litotryptoru k desintegraci a odstraňování ledvinových a žlučových konkrementů.

Od prvního výzkumného použití rázové vlny v medicíně do dnešního dne uběhla jen krátká doba. Během druhé světové války bylo pozorováno, že plíce trosečníků byly narušené vlivem exploze vodních bomb, ačkoli neexistovaly žádné vnější příznaky násilí. To bylo poprvé, kdy byl pozorován vliv rázových vln vzniklých po výbuchu bomb na tkáň. První systematický výzkum použití rázových vln v medicíně byl veden v 50. letech. Například bylo publikováno, že elektrohydraulicky generované rázové vlny jsou schopné ve vodě rozbít keramické desky. V USA byl také přijat první patent na elektrohydraulický generátor rázových vln. Na konci 50. let byly popsány fyzikální vlastnosti elektromagneticky generovaných rázových vln.

Litotrypse rázovými vlnami byla zavedena jako rutinní léčebná metoda ledvinových konkrementů počátkem 80. let v Německu. Možnost využití a přenosu rázové vlny do organismu byla objevena náhodou. V roce 1966 v mnichovských laboratořích firmy Dornier vyrábějící nadzvukové letouny byl model křídla testován a zkoušen, jak odolá který materiál při vysokých rychlostech. K testování odolnosti křídla použili rázové vlny. Během experimentů se zaměstnanec dotkl plochy křídla pávě v momentu, kdy byla ostřelována rázovou vlnou, a poté si stěžoval, že byl zasažen elektrickým proudem. Pokusy ukázaly, že nešlo o elektrický proud, nýbrž o rázovou vlnu, která pronikla tělem zaměstnance [3].

V letech 1968 až 1971 se v Německu zabývali působením rázových vln na tkáň zvířat. Tento program financovalo německé Ministerstvo obrany. Výsledkem bylo zjištění, že rázové vlny s vysokou energií nemají významné vedlejší působení a jsou schopné procházet tkáněmi a koncentrovat se i přes velké vzdálenosti. Zvláště byly zkoumány vlivy rozhraní v organismu společně s rozdílem a útlumem rázové vlny při její dráze živou tkání. Bylo pozorováno, že rázová vlna má jen mírné vedlejší účinky na svaly, tukovou a pojivovou tkáň. Neporušená kostní tkáň zůstává

nepoškozena po zatížení rázovou vlnou. Část tohoto výzkumného projektu se zajímala o to, jaké nebezpečí hrozí plicím, mozku, břichu a jiným orgánům. Zjistilo se také, že nejlepší média pro přenos rázových vln je voda a želatina, protože mají podobné akustické vlastnosti jako tkáň.

Tyto výzkumy ve spolupráci s lékaři vedly k myšlence rozbít ledvinové kameny pomocí extrakorporálně generovaných rázových vln. Realizace této myšlenky z hlediska technického a medicínského nebyla zpočátku jasná, ale idea zde již existovala. V roce 1971 Haeusler a Kiefer oznámili první in vitro rozbití ledvinového kamene pomocí rázových vln bez přímého kontaktu s kamenem. Následovali další in vitro pokusy bezkontaktního rozbíjení konkrementů. V roce 1974 začalo německé Ministerstvo pro vědu a výzkum financovat výzkumný program nazvaný „Aplikace ESWL (extrakorporální litotrypse rázovou vlnou). Těmi, kteří se podíleli na tomto projektu, byli např. Eisenberger, Chaussy, Brendel, Forssmann a Hepp. V roce 1976 firma Dornier vyvíjela prototyp litotryptoru a úspěšně byl zkoušen na psech s voperovanými lidskými konkrementy. První pacient s ledvinovými kameny byl léčen prototypovým přístrojem nazvaným Dornierův litotryptor HM1 v Mnichově v roce 1980. Použití tohoto modelu bylo velmi omezeno, neboť kritéria byla velmi přísná (absolutně volné močové cesty, malý rozměr a neblokující konkrement v pánvičce). Druhý model HM2 pracoval s 90% úspěšností. První komerční litotryptor (HM3, Dornier) byl instalován ve Stuttgartu v roce 1983. Model HM3 je považován za zlatý standard s vynikajícími parametry, a proto byl v roce 1984 schválen k použití nejen v Evropě, ale i v Japonsku a USA [4].

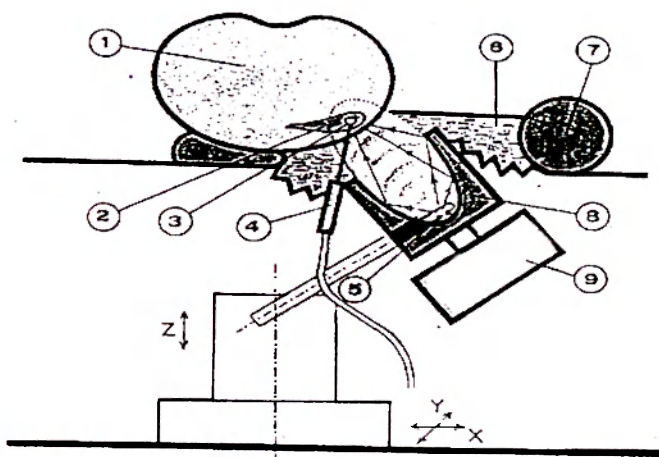
V dalších letech byla uskutečněna celá řada in vivo a in vitro pokusů o rozbití žlučových kamenů za pomoci extrakorporálně generovaných rázových vln. V roce 1985 byla v Mnichově provedena první léčba žlučových kamenů pomocí ESWL. O rok později byl v Mainzu testován prototyp litotryptoru bez vodní lázně, která je nahrazena vodou plněným akustickým vakem. Dnes je léčba ledvinových a močových konkrementů pomocí extrakorporálně vygenerovaných rázových vln léčbou tzv. první volby. Všechny moderní litotryptory pracují již bez vodní lázně a bez anestézie. Léčba s pomocí rázových vln je bezpečná a účinná, nicméně neopatrná aplikace rázových vln může způsobit vážná poškození.

Vývoj litotryptoru probíhal i v Praze. Začátkem 80. let byly ve výzkumné laboratoři při 1. interní klinice 1. LF UK v Praze studovány možnosti odstraňování žlučových konkrementů jejich rozpouštěním pomocí žlučových kyselin. Ovšem pokusy s rozpouštěním větších konkrementů (o průměrech větších než 10 mm)

nebyly úspěšně a tehdy vznikla myšlenka větší konkrementy nejdříve rozbit ultrazvukovým vlněním a teprve pak je rozpouštět. Počáteční pokusy s ultrazvukovým periodickým vlněním k dezintegraci konkrementů nepřinesly očekávané výsledky, neboť pokusy o fokusaci ultrazvukových vln narážejí na fyzikální omezení dané vlnovou délkou, absorpcí a prahem kavitací. S rostoucí frekvencí roste i absorpce ultrazvukové energie ve tkáních a narůstá i práh, při kterém dochází ke kavitačním jevům.

V roce 1984 byly využity výsledky pokusů s rázovými vlnami publikované v Německu. Rázová vlna tehdy byla novým pojmem a revoluční metodou k rozrušování a odstraňování ledvinových konkrementů neinvazivním způsobem. Ústav fyziky plazmatu (ÚFP) AV ČR je jedním z průkopníků této revoluční metody, kde byly navrženy originální litotryptory s jiskrovým výbojem a jsou používány v rutinní klinické praxi v mnoha českých nemocnicích. Odborníci v ÚFP měli mnohaleté zkušenosti s rázovými vlnami, které představovaly doprovodný jev při generování silných elektronických svazků. V roce 1986 se jim podařilo úspěšně vyrobit první experimentální zdroj rázových vln k rozrušování konkrementů ve vodě [5,6]. Zároveň byly zkoumány účinků rázové vlny na biologické tkáně u krys a prasat. Současně probíhaly úspěšné pokusy na prasatech s voperovanými lidskými konkrementy. Prase bylo umístěno do vodní lázně a exponováno rázovými vlnám [7]. Počátkem roku 1987 byl zaveden do klinické praxe první litotryptor s *ultrazvukovým zaměřením*.

Obr. 1 Schéma prvního litotryptoru s ultrazvukovým zaměřením. 1 – pacient, 2 – ledvina, 3 – konkrement, 4 – ultrazvuková sonda, 5 – jiskřiště, 6 – vodní lázeň, 7 – okraj vzduchem plněného vaku, 8 – parabolický reflektor, 9 – kondenzátor



Přednosti použití rázových vln v terapii ledvinových a žlučových konkrémentů spočívá v eliminaci chirurgického zákroku, čímž se pacienti vyhnou operačním komplikacím a jizvám. Jistou nevýhodou může být to, že k vypuzení roztržštěných konkrémentů z těla je zapotřebí určitý tlak proudu moči, což může být problém u některých starších pacientů. K indikaci jsou vhodné zejména pacienti s konkrémenty menšími než 1,5 cm, pacienti všech věkových kategorií, zejména ti, kteří nejsou doporučováni k celkové anestézii, mají vysoký krevní tlak, dýchací obtíže, diabetes, eventuálně jen jednu ledvinu. Metoda je kontraindikována u těhotných žen, u pacientů trpících hemofilii, případně při poruše koagulace, při kalcifikaci ledvinových artérií, přítomnosti aneurysmatu aorty nebo při infekci močových cest. Také u pacientů s kardiostimulátory je metoda kontraindikována z důvodů vyšších rizik možného poškození kardiostimulátoru elektromagnetickou indukci (průchodem vysokých proudů, mechanickým poškozením prvků uvnitř kardiostimulátoru).

Extrakorporální litotrypsie rázovou vlnou je sice dominantní metodou léčby ledvinových a částečně lze použít i u některých speciálních případů u konkrémentů ve žlučníku, ale zdaleka to není jediná oblast, kde se uplatňuje rázová vlna. Výhodné je použití této metody u endoskopicky neřešitelných případů konkrémentů ve žlučových cestách případně u litiázy pankreatického vývodu. Popsáno bylo i použití v některých atypických případech jako je bezoár žaludku či objemný konkrément obstruující střevo (způsobující ileus). V posledních letech se začíná do klinické praxe zavádět využití nefokusovaných rázových vln malé amplitudy k odstraňování bolestí pohybového ústrojí, jako jsou tenisové lokty, golfová kolena, bolesti páteře apod. Rázové vlny jsou také využívány ve sportovním lékařství. Mechanismus účinků rázových vln není v těchto případech znám, ale publikované výsledky hovoří o úspěšnosti 60–80 %. Další oblast využití rázových vln je ve veterinární medicíně, zejména u závodních koní. [8,9]

Biologické účinky rázových vln byly sledovány na lidských erythrocytech a lymfocytech, u kterých po aplikaci rázových vln docházelo k hemolýze erythrocytů a k poklesu životnosti lymfocytů. Rozdíly v účinku byly pozorovány při aplikaci běžných jednoduchých (JRV) běžně používaných pro klinické provádění fragmentace a interagujících (IRV) rázových vln. U IRV se jedná o generování dvojic rázových vln jedoucích velmi krátce po sobě. Princip účinku této metody bude vysvětlen dále (1.3.4.). Významné rozdíly nastaly také při různých umístěních exponovaných vzorků v ohnisku a mimo něj. S rostoucí vzdáleností od ohniska prudce mizel biologický

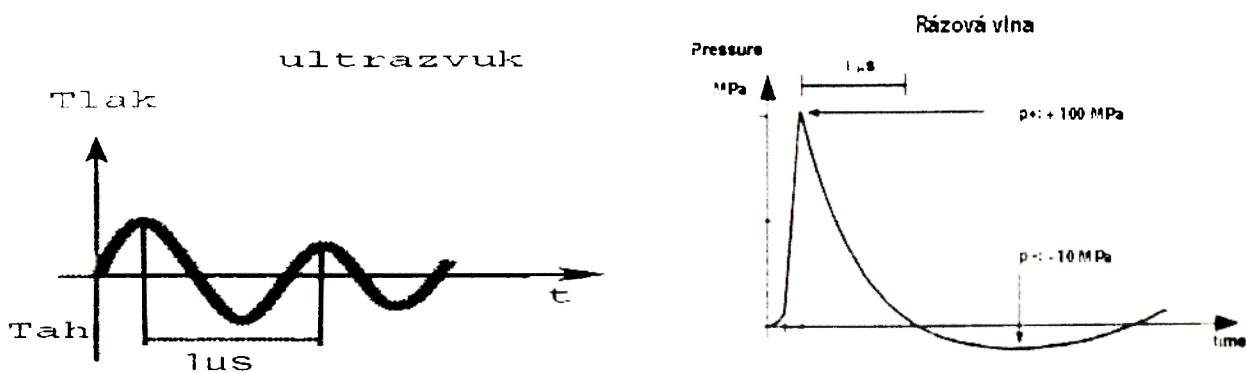
účinek. Nejvíce tento fenomén bylo možné pozorovat kolmo osu ve směru šíření rázové vlny. Tedy pokud se suspenze buněk nacházela mimo ohnisko, účinky rázových vln byly zanedbatelné. Na ÚFP byly provedeny experimenty na tkáních prasat, kde byly tkáně exponovány do jedné hodiny po odběru a uchovány v izotonickém roztoku, proto aby nedocházelo ke změně akustických vlastností odebraných tkání určených k exponování. Tkáně jater, ledvin, svalů, kůží a sleziny byly ihned po expozici fixovány pro další histologické zpracování. Po expozici mnohokanálovým zdrojem bylo poškození tkáně patrné již makroskopicky. Provedená histologie prokázala poškození od buněčné alterace až po zcela hemorrhagickou nekrozu příslušné tkáně. Obdobné pokusy byly provedeny i na klinickém litotryptoru, u kterého makroskopické poškození parenchymatózních tkání bylo klinicky nevýznamné ani při vyšších počtech rázů.

Nejvíce zkoumanou oblastí, a přesto nejméně prozkoumanou zůstává využití rázových vln k léčbě nádorových tkání. U nádorů se předpokládá, že je třeba buď výrazně zvýšit podtlak v rázové vlně, který je pak při velkých amplitudách schopen vyvolat jejich destrukci, nebo využít ineragujících rázových vln, kde je předpoklad, že vytvářejí více kavitací a tím zvyšují toxicitu takových dvojrázů [3, 10, 11].

1.2 Charakteristika rázové vlny

Rázové vlny jsou zvukové tlakové vlny, jejichž chování v různých prostředích je popsáno zákony akustické fyziky, proto prochází tekutinami a parenchymatózními tkáněmi prakticky nezměněny a jejich efekt se projeví v místech, kde se změní akustická impedance (např. konkrement, kost). Vyznačují se také tím, že na rozdíl od ultrazvuku, který má charakter sinusoidy s periodicky se střídající částí pozitivní a negativní částí vlny, je rázová vlna aperiodická. Jde o jeden kmit opakující se s frekvencí cca 1 Hz. Rázová vlna se šíří prostředím jako mohutný tlakový kmit ve velmi krátkém čase ($t < 1 \mu\text{s}$). Výkon v rázové vlně má desítky až stovky kilowattů. Popis účinku a chování i rozdílu rázové vlny a harmonického tlumeného pulsu prezentuje grafické znázornění tlaku na čase pro obě vlny.

Obr. 2 Srovnání ultrazvukové a rázové vlny



Prudký nárůst tlaku, který může dosahovat až 100 MPa, je využíván hlavně u litotrypse, což je drcení konkrementů v těle nemocného. Rázové vlny prochází vodou, tukem i ostatními nevzdušnými měkkými tkáněmi (podobný akustický odpor) relativně bez absorpce či reflexu. Při dopadu na kámen, který má odlišný akustický odpor se část rázové vlny se na akustické nehomogenitě (kterou představuje konkrement) odrazí na přední ploše a namáhá konkrement tlakem, a část rázové vlny, která projde se odrazí na zadní ploše za vzniku tahových sil. Při překročení mezí pevnosti kamene dochází k jeho postupné fragmentaci. Podtlaková část rázové vlny je zodpovědná za vznik tzv. kavitací – mikrobublin ve tkáňové tekutině, které se tvoří při překročení mezí pevnosti kapaliny. Mikrobublínky jsou nestabilní útvary, které rychle adiabaticky zanikají a způsobují tak lokální nárůst teploty o několik řádů, a proto účinek na tkáň není pouze mechanický, ale i tepelný.

1.3 Generátory rázových vln

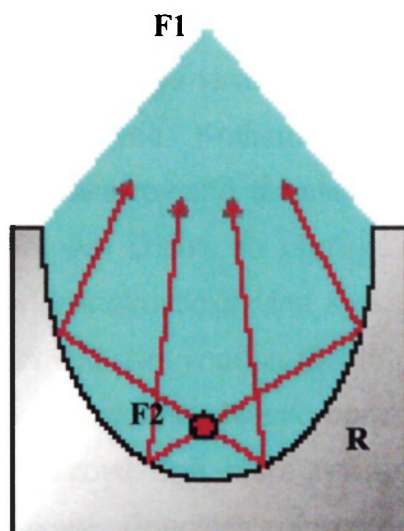
V klinické praxi se dnes používá několik typů generátorů rázových vln, které se liší maximální hodnotou tlaku, poměrem tlaku a podtlaku a prostorovým rozložením rázové vlny. Vždy se jedná o rázovou vlnu, přestože producenti v závislosti na zamýšlením terapeutickém účelu představují odlišný způsob generace jako další a další generaci rázových vln má stále původní generátor autorské firmy Dornier některé přednosti. Všechny typy generátorů rázových vln využívají elektrickou energii, kterou přemění na tlakovou akustickou vlnu. V současné době existuje několik typů generátorů lišících se technickým provedením a fyzikálními vlastnostmi vzniklé rázové vlny [12].

1.3.1 Elektrohydraulický generátor

Je prvním a nejstarším typem generátorů rázových vln v klinické praxi, vyvinutý německou firmou Dornier počátkem 80. let. Rázová vlna zde vzniká extrakorporálně při elektrickém výboji vybitím energie kondensátoru ve vodě mezi dvěma hroty elektrod. V okolí jiskry dochází k přehřátí kapaliny a prudká expanze připomínající malou explozi se šíří vodou do okolí jako tlaková vlna. Tlaková vlna se šíří všemi směry jako kulová tlaková vlna a její amplituda tlaku s narůstající vzdáleností klesá. Protože je nutné zpětně tuto energii koncentrovat, čehož je dosaženo parabolickým reflektorem, který fokusuje tlak do sekundárního ohniska. Elektrohydraulický generátor rázových vln byl prvním způsobem generování těchto vln a zavedl tuto techniku do klinické praxe a následně metoda měnila charakter léčby litiázy i oborů jako je urologie, nyní i ortopedie.

Ačkoli je stále používán, má jiskrový zdroj řadu stinných stránek. Např. lokální pozice jiskry je jen špatně kontrolovatelná, elektrody musí být často vyměňovány z důvodů opotřebování, ruší vysoká hladina hluku a část rázové vlny je nezaostřena, a tudíž v těle nevyužitelná. Princip generátoru je na obrázku 2. Rozměry ohniska závisí na rozměrech fokusačního elipsoidu (reflektoru). Větší elipsoid soustřeďuje rázovou vlnu do menšího sekundárního ohniska s vyššími tlaky [3].

Obr. 3 Elektrohydraulický generátor

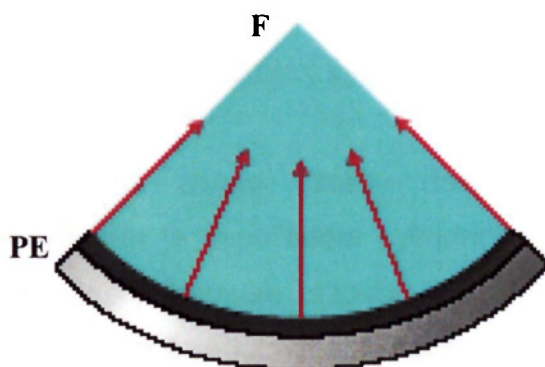


F1 – primární ohnisko (místo jiskrového výboje), F2 – sekundární ohnisko (místo působení rázových vln), R – parabolický reflektor

1.3.2. Piezoelektrický generátor

Další typ generátoru rázových vln vznikl jen o pár let později (1985). Rázová vlna vzniká superpozicí po synchronním kmitu několika stovek piezoelektrických prvků rozmístěných na ploše sférického talíře (část plochy kulového vrchlíku), který umožňuje fokusaci rázových vln do ohniska. Výhodou piezoelektrického generátoru je malé ohnisko, ale i možnost pracovat s vyšší frekvencí. Nevýhodou piezoelektrického generátoru jsou nižší tlaky rázových vln.

Obr. 4 Piezoelektrický generátor

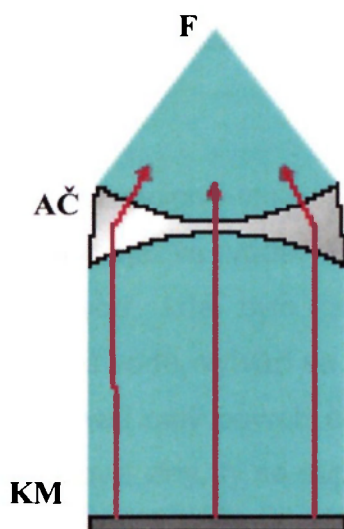


F – ohnisko rázových vln, PE – pole piezoelektrických prvků

1.3.3. Elektromagnetický generátor

Princip elektromagnetického generátoru spočívá v kmitu tenké kovové membrány přiléhající k ploché cívce. Kmitem kovové membrány po průchodu proudového impulsu v cívce vzniká rovinná akustická vlna, která se šíří vodou a je fokusována akustickým systémem čoček do ohniska. Na rozdíl od hydraulického zdroje se vytváří nejprve rovinná akustická vlna s dlouhým trváním a teprve ta se stává na své dráze vlnou rázovou. Nevýhodou těchto generátorů, zejména starších typů, je menší rázová vlna, velmi dlouhé ohnisko oproti hydraulickému generátoru a prohloubená negativní část v rázové vlně, která zvýrazní vedlejší účinky (kavitaci) a vede k traumatizaci okolních tkání. Princip je zobrazen na obrázku 4.

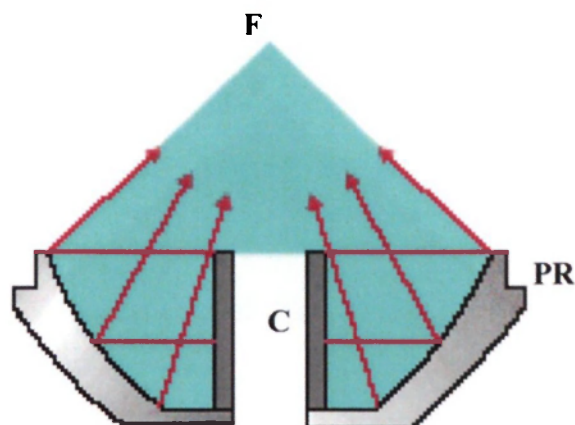
Obr. 5 Elektromagnetický generátor



F – ohnisko rázových vln, AČ – akustický systém čoček, KM – kovová membrána

Různými modifikacemi zdroje vznikly další generátory rázových vln. Nejpokročilejším uspořádáním je uspořádání cylindrické, které využívá odrazu od parabolického reflektoru, který fokusuje rázovou vlnu do ohniska. Výhodou tohoto zdroje je to, že poskytuje přesně regulovatelné rázové vlny na všech energetických hladinách. Schéma tohoto generátoru je na obrázku 5.

Obr. 6 Cylindrický elektromagnetický generátor

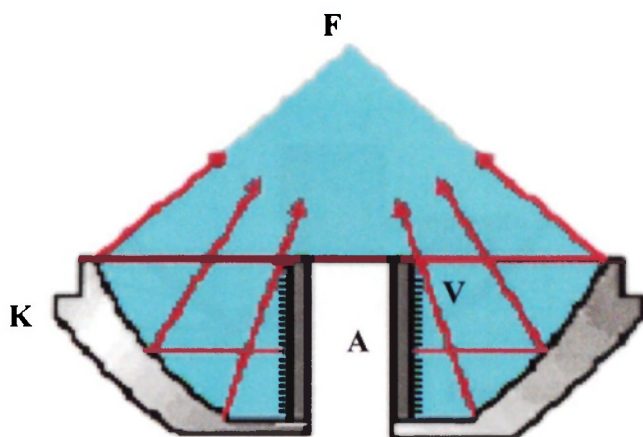


C – cylindrický zdroj rázových vln, F – ohnisko rázových vln, PR – parabolický reflektor

1.3.4. Experimentální generátor na principu mnohokanálového impulsního výboje

Patentovaný generátor rázových vln vyvinutý na ÚFP AV využívá mnohokanálového impulsního výboje ve vodě. Byl vyvinut na základě znalostí z výzkumu výbojů pro čištění vod, kde bylo možno pozorovat, že pokud je kompozitní elektroda v silně vodivé vodě, vytváří se na ní velké množství výbojových kanálků, které rovnoměrně pokrývají celý povrch elektrody. Po proběhnutí impulsu se od jednotlivých výbojů šíří tlakové vlny, ty se superponují ve vlně, která je fokusována kovovým reflektorem ve tvaru rotačního paraboloidu do ohniska podobně jako u cylindrického elektromagnetického generátoru. Fokusací se rázová vlna postupně formuje na vlnu rázovou. Lze si to představit tak, že čelo vlny postupuje do neporušené vody rychlostí zvuku, následující části vlny se šíří do již stlačené vody, tudíž větší rychlostí, a postupně dohánějí čelo, čímž se vytvoří skoková změna tlaku. Schéma generátoru je na obrázku 7.

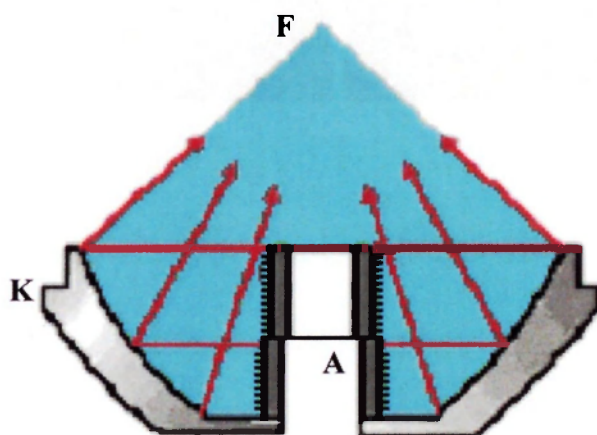
Obr. 7 Generátor mnohokanálového impulsního výboje



K – katoda, A – anoda, V – mnohokanálový výboj, F – ohnisko rázových vln

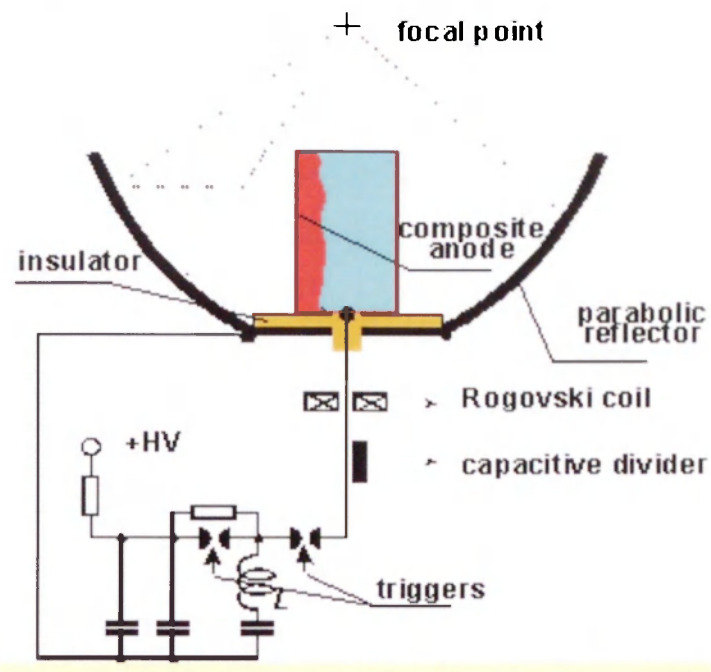
Další varianta tohoto generátoru je na obrázku 8. Anoda je zde rozdělena na dvě izolované části, napájené ze dvou nezávislých zdrojů, což umožňuje generování dvou rázových vln jdoucích rychle po sobě. První rázová vlna pak vytvoří v ohnisku akustickou nehomogenitu, na které se druhá vlna může odrážet a více absorbovat. První ráz v původně akusticky isotropním prostředí vytvoří nehomogenitu, ke které druhá rázová vlna může uvolnit svoji energii do kavitací. Tato metoda zvyšuje destruktivní účinky rázové vlny.

Obr. 8 Generátor interagujících rázových vln

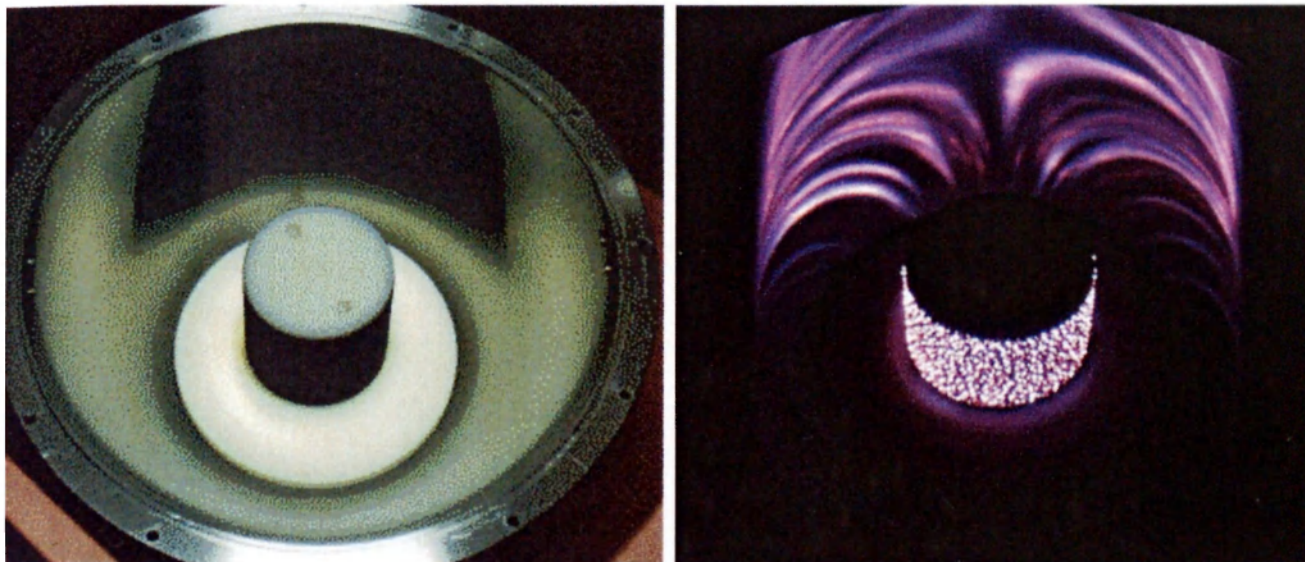


K – katoda, A – anoda, F – ohnisko rázových vln

Obr. 9 Schéma zapojení experimentálního generátoru rázových vln



Obr. 10 Mnohokanálový zdroj rázových vln. Vlevo před výbojem, vpravo při výboji.



2. Cíle práce

Po úspěchu neinvazivní litotrypse je snaha o rozšíření aplikace rázových vln i do dalších medicínských odvětví, zvláště pak do onkologie či ortopedie. Cílem této práce je nahlédnutí do této problematiky a posouzení možnosti aplikace rázových vln zejména v terapii nádorů parenchymatózních tkání a posouzení účinků rázových vln na lidské krevní elementy. K tomuto účelu byly využity experimenty zde popsané, které se zabývají účinky rázových vln na parenchymatózní tkáně jater králíků, nádorové tkáně laboratorních potkanů a vzorky lidských krevních elementů. Všechny tyto experimenty byly provedeny na ÚFP AV ČR, kde byl vyvinut generátor interagujících rázových vln. Tento generátor již dříve prokázal vyšší schopnost destrukce biologických materiálů než generátory jednoduché rázové vlny a tudíž má i větší potenciál se v destrukci nádorů uplatnit.

3. Materiál a metody

3.1 In vitro experimenty

3.1.1 Příprava plné nesrážlivé krve

Krev byla odebrána do heparinu a exponována nativně v plastických zkumavkách v objemu 1,4 ml.

3.1.2 Stanovení hemoglobinu uvolněného z erytrocytů

U vzorků nesrážlivé krve byla vždy po expozici stanovena hladina volného hemoglobinu spektrofotometrickou metodou. K měření byla použita plazma získaná po centrifugaci každého exponovaného vzorku při 3000 ot./10 min. Metoda byla založena na měření plazmy s uvolněným hemoglobinem, který má své absorpční maximum při 415 a 460 nm pro kontrolní vzorky (s nízkou koncentrací hemoglobinu). U exponovaných vzorků s vyšším stupněm hemolýzy byla koncentrace volného hemoglobinu určena z absorbance při 540 nm s použitím absorpčním koeficientem $E^{1\%} = 8,5$.

3.1.3 Izolace lymfocytů

5 ml lidské periferní krve odebrané do sterilní nádoby s přidaným heparinem se ředí 1:1 s PBS a nanese se na 3 ml dělicího roztoku Ficoll-paque a centrifuguje 20 minut při 2500 ot./min. Vrstva mononukleárních buněk oddělená v interfázi gradientu se opatrně stáhne pasturovou pipetou do sterilní zkumavky a převrství nadbytkem PBS a centrifuguje 10 min. při 1500 ot./min. Supernatant se odlije a sediment buněk se propere s PBS stejným způsobem 2x. Poté se k sedimentu buněk přidá 2 ml media RPMI 1640 obohaceného 10 % inaktivovaného lidského AB sera a antibiotiky. Buňky se spočítají v Bürkerově komůrce a naředí médiem na požadovanou koncentraci.

3.1.4 Exponování lymfocytů a erytrocytů

Do plastických zkumavek bylo napipetováno buď 1,4 ml ředěných erytrocytů nebo 1 ml izolovaných lymfocytů. Rázování bylo provedeno v ÚFP na experimentálním generátoru, který umožňoval generovat interagující rázové vlny se zpožděním cca 5 μ s. Pozitivní tlaky dosahovaly až 100 Mpa při 30 kV.

3.2 In vivo experimenty

3.2.1. Exponování jaterní tkáně králíků

Králíci byli vystaveni účinkům interagujících rázových vln s ohniskem v jaterní tkáni. Po expozici byli převezeni na společné pracoviště 1. LF UK a Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT. Zde byla na experimentální magnetické rezonanci provedena tomografie.

3.2.2. Exponování krysích lymfomů

Byli použiti potkani, samci o hmotnosti 280 – 300g. Intramuskulárně jim byl transplantován SD lymfom (10^6 buněk v 0,1 ml PBS). Čtvrtý den po transplantaci byli potkani uvedeni do narkózy a vystaveni rázovým vlnám. Narkóza byla provedena roztokem, který obsahoval 2 ml Narkamonu, 0,7 ml Xylazinu (komerční preparáty pro veterinární lékařství) a 2,3 ml vody pro injekce. Anestetikum bylo aplikováno intramuskulárně v objemu 0,5 ml na 100g hmotnosti zvířete. Délka chirurgické anestézie byla 90 minut, následný spánek po anestézii 60 minut. Pro rázování byli potkani upevněni pomocí Prubnu na rázovací desku s vyznačenou oblastí pro aplikaci rázových vln a ponořeni do vodní lázně o teplotě 37 °C (nad vodní hladinu vyčnívala pouze hlava). Následné rázování proběhlo při napětí 20 kV a 30 kV. Čtyři dny po expozici byla polovině potkanů aplikována cis Platina (6,0 mg/kg). Dvakrát týdně pak byla měřena velikost lymfomů (měřen obvod stehna s transplantovaným nádorem).

4. Výsledky

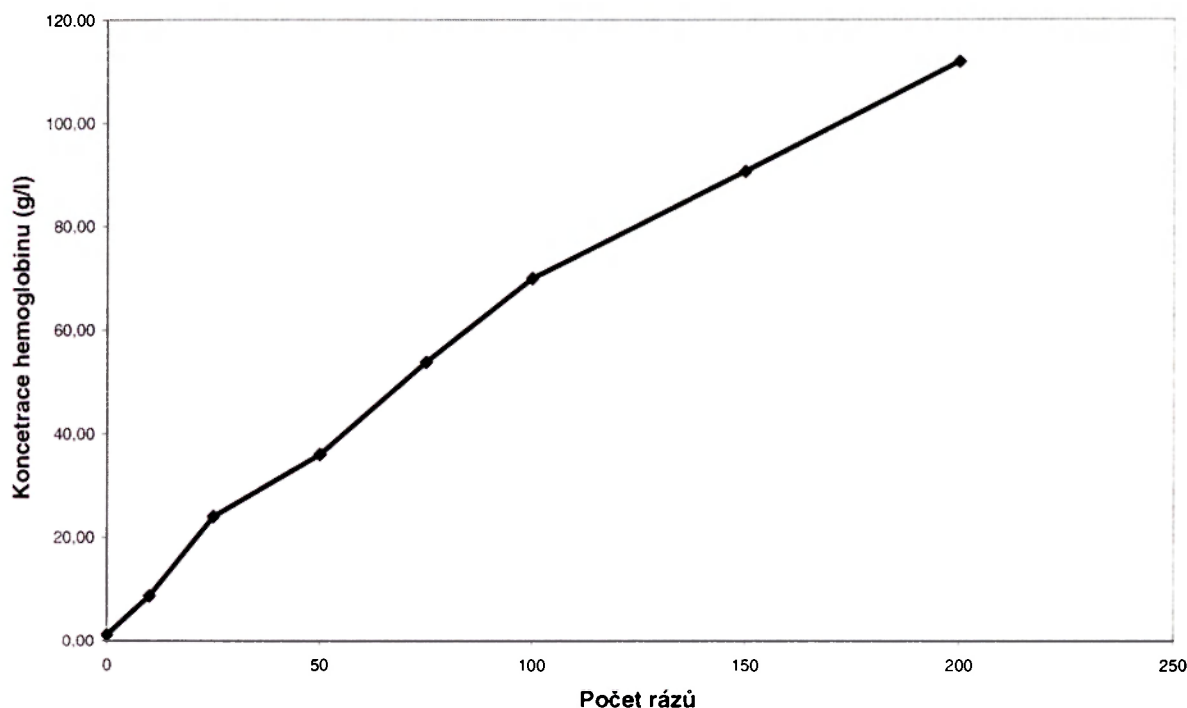
Experimenty in vitro

Hemolýza erytrocytů po aplikaci interagujících rázových vln při napětí 20 kV

Tabulka č.1 Závislost hemolýzy na počtu rázových vln

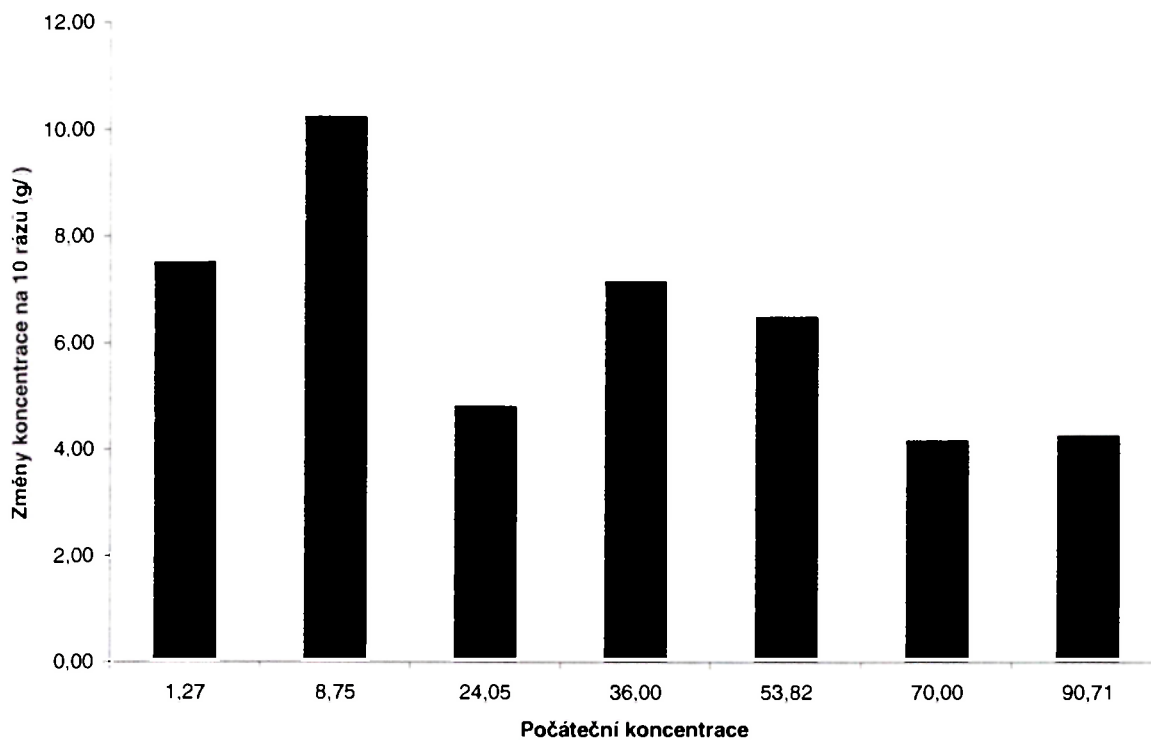
Měření	Počet rázů							
	0	10	25	50	75	100	150	200
1	1,73	9,16	25,25	34,91	51,31	67,36	94,00	116,00
2	0,89	7,29	23,60	38,28	56,89	69,21	93,51	115,44
3	1,19	9,81	23,30	34,82	53,27	73,43	84,61	104,20
Průměr	1,27	8,75	24,05	36,00	53,82	70,00	90,71	111,88

Graf č.1 Průměrná hodnota koncentrace hemoglobinu v závislosti na počtu rázů



Tabulka i graf dokazují závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů. Nárůst destrukce červených krevních elementů je dle očekávání zpočátku lineární a po 300 rázech již dochází k úplné destrukci a nárůst koncentrace hemoglobinu nepokračuje (kompletní hemolýza). Účinek rázových vln je závislý na koncentraci erytrocytů.

Graf č.2 Průměrná změna koncentrace hemoglobinu v závislosti na koncentraci po předchozím rázování.



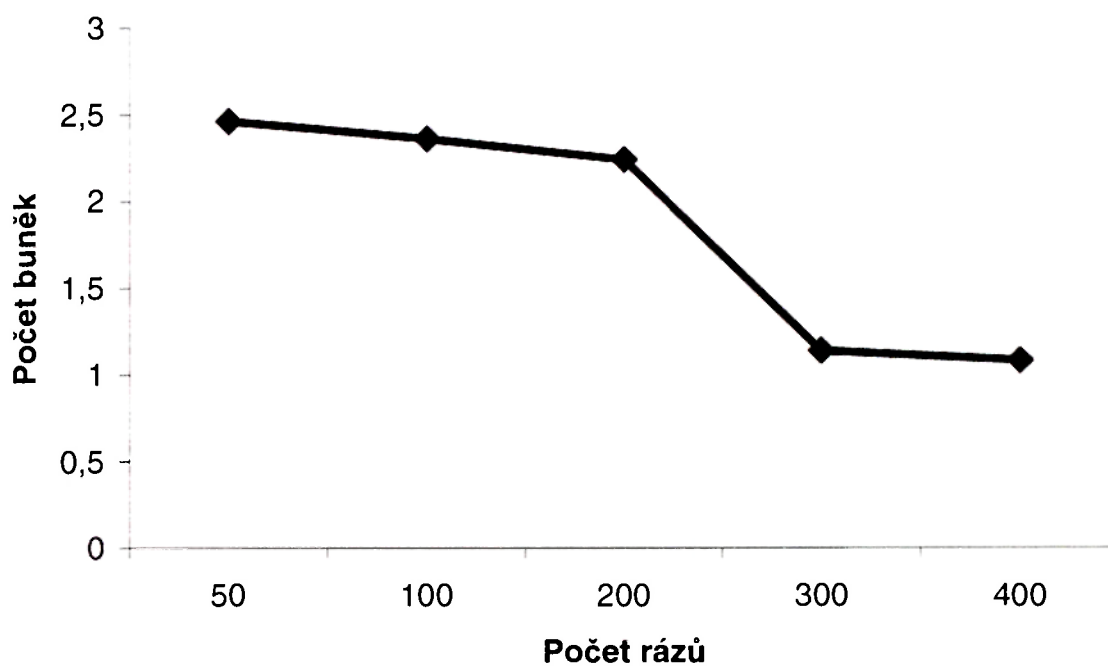
Tento graf naznačuje jistou závislost mezi koncentrací po předchozím rázování a průměrným úbytkem erytrocytů na 10 rázů. Lze pozorovat jistý trend, kdy se zvětšující se koncentrací hemoglobinu (nižší koncentrace erytrocytů) ve vzorku je buněčná suspenze méně ovlivněna rázovými vlnami než vzorky s erytrocyty o větší hustotě.

Úbytek lymfocytů po expozici ineragujícím rázovým vlnám při napětí 30 kV

Tabulka č.2 Úbytek lymfocytů v závislosti na počtu rázů

Počet rázů	50	100	200	300	400
Počet buněk *10 ⁶ /ml	2,46	2,36	2,24	1,14	1,08

Graf č. 3 Úbytek lymfocytů v závislosti na počtu rázů



Jak je patrné z tabulky i grafu, dochází podobně jako u erytrocytů k úbytku buněk v závislosti na počtu aplikovaných rázových vln.

Expozice tkání in vivo

Expozice parenchymatózní tkáně králičích jater

Dříve byly provedeny pokusy na svalové tkáni, játrech a ledvinách experimentálních zvířat ex vivo. U těchto pokusů byly vždy prokázány traumatizační účinky rázové vlny, které byly patrné na histologických preparátech a při vyšších počtech rázů bylo možno pozorovat poškození makroskopické.

Provedená histologická vyšetření neumožňovala prostorovou představu poškození in vivo. Proto byly provedeny in vivo pokusy na živých potkanech a králících. Pokusný králík byl exponován rázovým vlnám s ohniskem v játrech. Jak je patrné ze snímků NMR došlo k poškození parenchymatózní tkáně jater, avšak v důsledku poškození stěny žaludku králík uhynul.



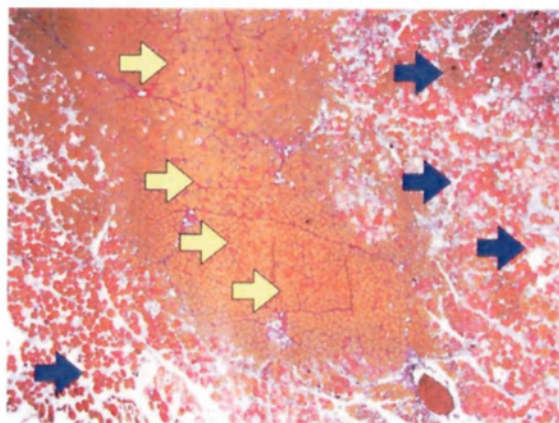
Obr. 9 Pokusný králík po expozici rázovým vlnám. Označené místo značí poškozenou jaterní tkáň a žaludeční stěnu.

Pro možnost posoudit účinek rázové vlny s určitým časovým odstupem byl exponován další pokusný králík. Na snímcích z NMR lze vidět, že tentokrát již došlo k poškození pouze tkáně jaterní, a proto bylo možno pozorovat po 14 dnech jizvení (obr. 10).

Obr. 10 Na vyznačených bodech je srovnání téhož místa s odstupem 14 dní (vlevo ihned po expozici, vpravo po 14 dnech).



Obr. 11 Histologický řez se zřetelným a ostrým přechodem mezi tkání v ohnisku a mimo ohnisko rázových vln.



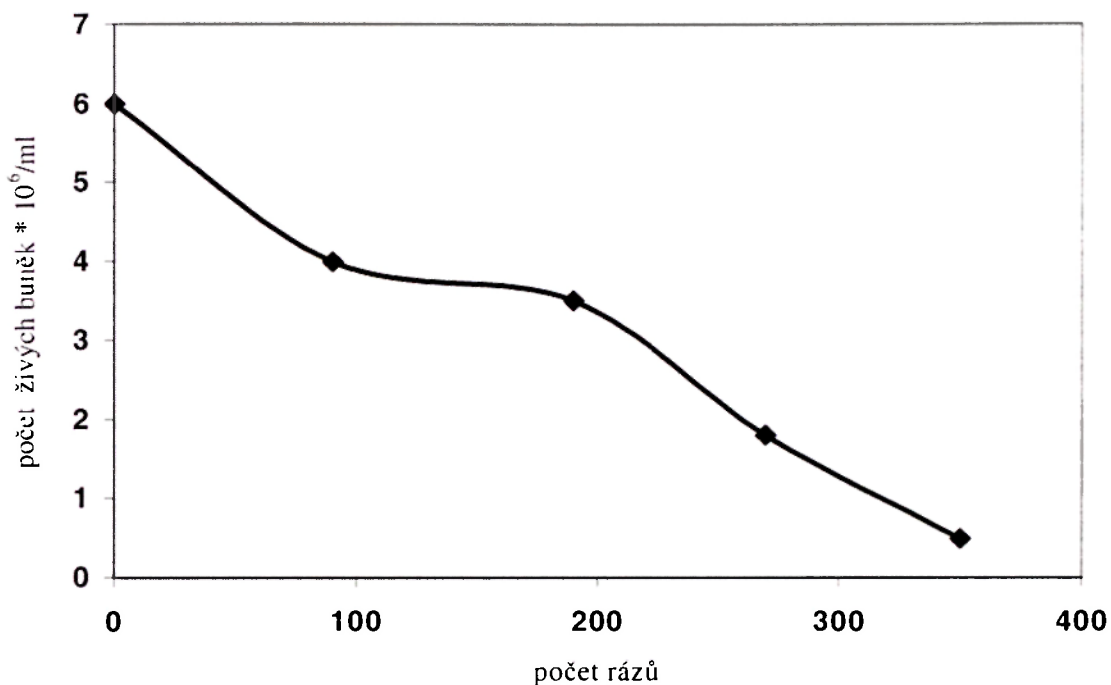
Expozice nádorové tkáně experimentálních krys

V dalších experimentech byly exponovány izolované nádorové buňky experimentálních krys. Jak je patrné z tabulky a grafu byl u těchto buněk pozorován úbytek podobně jako u buněk lidských.

Tab č. 3 Úbytek potkaních nádorových buněk

Počet rázů	0	90	190	270	350
Počet buněk *10 ⁶ /ml	6,01	3,99	3,50	1,80	0,49

Graf č. 4



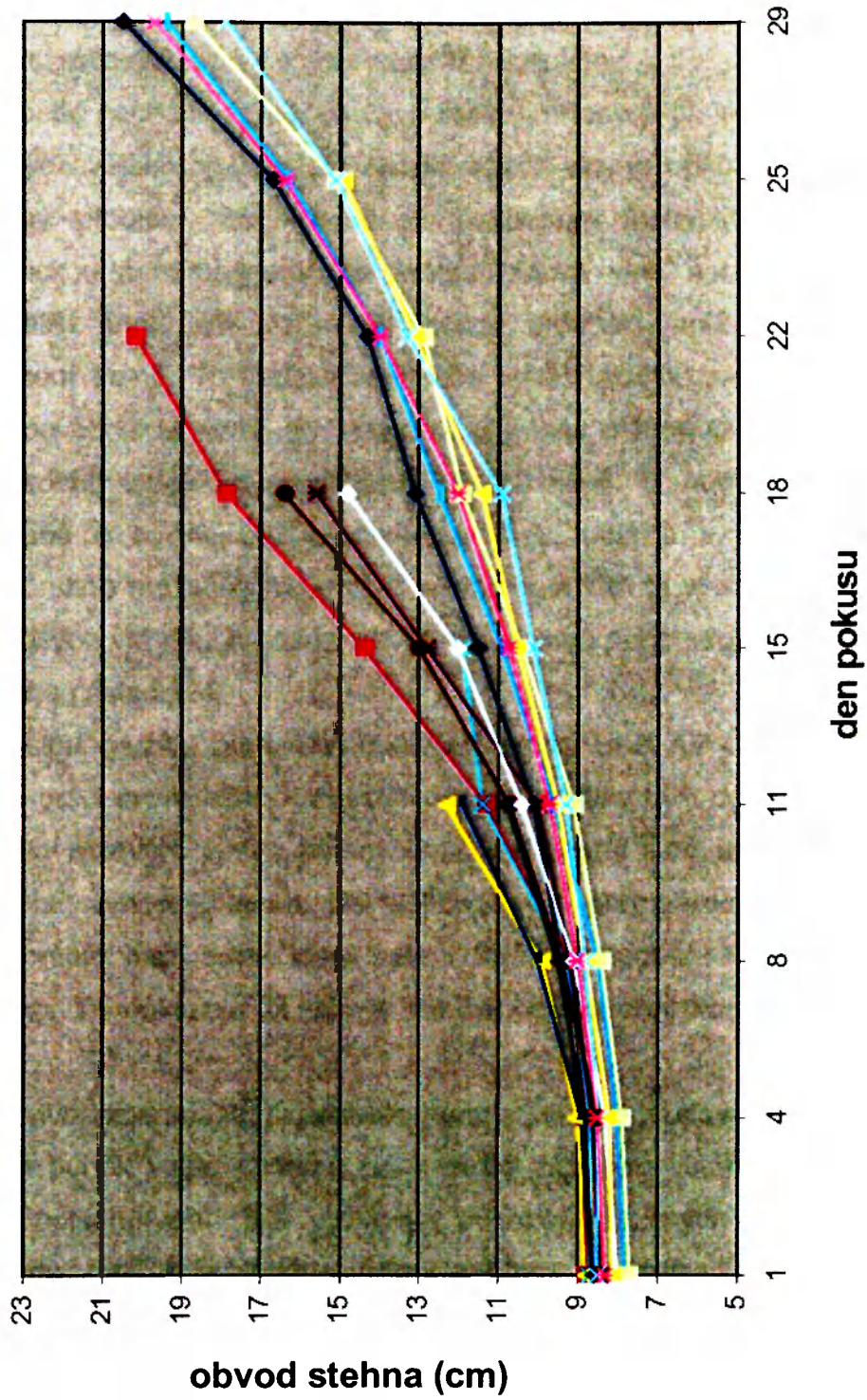
V další fázi tohoto pokusu byly nádorové buňky transplantovány intramuskulárně do oblasti dorzální končetiny experimentálních krys, které byly rozděleny do několika skupin. Z celkového počtu 14 krys byly 3 zvoleny jako kontrolní, další 3 byly také kontrolní s tím rozdílem, že čtvrtý den jim bylo podáno cytostatikum cis Platina. Zbýlých osm krys bylo exponováno rázovým vlnám s ohniskem v oblasti aplikace nádorových buněk. Jedna čtveřice byla exponována

při napětí 20 kV, druhá při napětí 30 kV. Jednomu páru z každé čtveřice pak bylo podáváno cytostatikum cis Platina. Tabulka a graf viz. následující strany.

Tab č. 4 Růst nádoru na dorsální končetině potkanů

pokusná skupina	krysa Č.	den pokusu - obvod stehna (cm) s transplantovaným nádorem								
		1	4	8	11	15	18	22	25	29
20 kV	1	8,6	8,9	9,4	10,1	11,5	13,1	14,3	16,7	20,5
	2	8,8	8,8	9,2	11,3	14,4	17,9	20,2	23.den ex	
20 kV Pt	1	8,8	9	9,9	12,3	14.den ex				
	2	8,7	8,7	9,3	11,4	11,9	16.den ex			
30 kV	1	8,4	8,6	9,2	10	12,8	15,6			
	2	8,5	8,5	9,4	10,7	13	16,4	21.den ex		
30 kV Pt	1	8,6	8,8	9,5	10,8	12.den ex				
	2	8,6	8,9	10	11,9	12.den ex				
kontrola	1	7,8	8	8,5	9,6	10,9	12,5	14	16,3	19,4
	2	8	8,3	9,1	10,4	12	14,8			
	3	7,7	7,9	8,4	9,1	10,4	11,9	12,9	15,1	18,7
kontrola Pt	1	8,1	8,2	8,8	9,5	10,5	11,4	13,1	14,9	26.den ex
	2	8,5	8,5	8,8	9,3	10,1	10,9	13,3	15,1	17,9
	3	8,3	8,5	9	9,7	10,7	12	14	16,4	19,7

Obvod stehna krys po rázování a aplikaci cis Pt



5. Diskuse

Jak již bylo řečeno na začátku této práce nachází technika v medicíně stále větší uplatnění a to se týká také aplikací ultrazvuku a rázových vln. Dnes již rutinně používaná extrakorporální litotrypse využívá rázových vln k desintegraci ledvinových či některých žlučových kamenů. U této metody je snaha minimalizovat vliv rázových vln na okolní tkáň. Po úspěchu extrakorporální litotrypse se začalo uvažovat o možnostech aplikací rázových vln i v jiných odvětvích medicíny.

V poslední době nachází rázová vlna své místo v ortopedii při léčbě kloubního aparátu, avšak nejlákavějším oborem pro využití rázové vlny je onkologie. Zde se však vyskytl určitý problém. Zatímco u extrakorporální litotrypse představuje konkrement akustickou nehomogenitu, na kterou rázová vlna naráží, nádor se akusticky příliš neliší, proto jím rázová vln pouze prochází, aniž by způsobila znatelnější poškození tkáně. To vedlo k myšlence využití podtlakové fáze rázové vlny, která je zodpovědná za vznik tzv. kavitací, což jsou mikrobublinky, které při svém zániku způsobují tepelnou traumatizaci okolní tkáně. U nově vytvořených generátorů je snaha o co největší podtlakovou fázi, tudíž o zvýšení četnosti kavitačních jevů. Druhou možností jak ovlivnit nádorovou tkáň je vytvoření dvou po sobě jdoucích rázových vln tak, že jedna vytvoří akustickou nehomogenitu ve tkáni, na kterou narazí vlna následující.

Tohoto principu využívá generátor rázových vln na ÚFP AV ČR, na kterém byly pokusy v této práci provedeny. V experimentech s králíky byly dokázány nejen traumatizační účinky rázových vln na parenchymatózní jaterní tkáň, ale i schopnost traumatizovanou tkáň vyhojit jizvením. Na histologických preparátech bylo možno pozorovat ostrou hranici mezi tkání, která byla v ohnisku působení rázových vln a tkání mimo ohnisko. To dokazuje že účinky na tkáň mimo ohnisko jsou prakticky zanedbatelné.

V dalším in vivo experimentu popsaném v této práci byla studována schopnost dělení nádorových buněk v těle potkanů po expozici rázovým vlnám v kombinaci s cytostatiky. U potkanů kteří byli vystaveni působení rázových vln došlo jak k rychlejšímu úhynu, tak k rychlejšímu růstu nádoru, dokonce i v kombinaci s cytostatiky. Jedno z možných vysvětlení tohoto jevu by bylo tvrzení, že rázová vlna

způsobuje metastazování nádoru, avšak k potvrzení této hypotézy musí být provedeny další experimenty.

Při pohledu na experiment s lymfocyty je zřejmé, že přežití lymfocytů závisí na počtu rázových vln, kterému byly vystaveny. Stejně tak zvyšující se koncentrace hemoglobinu, která značí úbytek erytrocytů závisela na počtu rázových vln. Tato zjištění již byla ověřena dříve na hydraulickém generátoru rázových vln [6]. Také lze soudit že se zvyšujícím se počtem rázových vln klesá jejich účinnost v důsledku klesající koncentrace buněk v ohnisku. S menší hustotou buněk v ohnisku klesá i počet buněk, které lze rázovou vlnou ovlivnit a z toho vyplývá i nižší úbytek v koncentraci.

6. Závěry

- Narušení erytrocytů v ohnisku (projevující se zvyšující se koncentrací hemoglobinu) závisí lineárně na počtu aplikovaných rázových vln do saturace (totální hemolýzy)
- Úbytek lymfocytů závisí na počtu rázových vln
- Parenchymatózní tkáně experimentálních zvířat vykazují poškození po expozici rázovým vlnám
- Mezi ohniskem rázových vln a okolní tkání je velmi ostrý přechod, tudíž je poškození okolních tkání zanedbatelné
- Rázová vlna může způsobovat metastazování nádoru, avšak je třeba dalších experimentů
- Lze předpokládat, že se snižující se koncentrací buněk ve vzorku je účinnost rázových vln nižší

7. Literatura

1. Mornstein, V., Škorpíková, J., Forýtková, L.: *Biologické účinky ultrazvuku - současný stav znalostí*. Sborník konference "Pacient a ultrazvuk" - Olomouc. (2003).
2. Thiel, M.: *Application of shock waves in medicine*. Clin Orthop. (2001): 18-21.
3. Beneš, J.: Biologické účinky rázové vlny a biliární litotrypse. Kandidátská dizertační práce.
4. Kordač, V., Beneš, J., Šunka, P., Štuka, C., Chmel, J., Kaláb, M., Mareček, Z.: *Lithotripsy of gallstones using shock waves. First clinical experience in Czechoslovakia*. Cas Lek Cesk. (1988) 127: 1397-9.
5. Beneš, J., Kordač, V., Šunka, P., Jirsa, M., Mirejovský, P., Štuka, C.: *Initial experimental findings on the disruption of gallstones using focused shock waves*. Cas Lek Cesk. (1986) 125: 433-5.
6. Beneš, J., Šindelka, G., Kordač, V., Souček, J., Jirsa, M., Šunka, P.: *A simple model for verifying the effects of a focused shock wave from our generator on erythrocytes and lymphocytes*. Sb Lek. (1989) 91: 123-8.
7. Beneš, J., Šunka, P., Kordač, V., Jirsa, M., Štuka, C., Mirejovský, P.: *Preclinical verification of possibilities of extracorporeal lithotripsy of gallstones in experimental animals*. Sb Lek. (1987) 89: 129-33.
8. Kordač, V., Beneš, J., Šunka, P., Štuka, C., Chmel, J., Kaláb, M., Mareček, Z.: *Lithotripsy of gallstones using shock waves. First clinical experience in Czechoslovakia*. Cas Lek Cesk. (1988) 127: 1397-9.
9. May, T.C., Krause, W.R., Preslar, A.J., Smith, M.J., Beaudoin, A.J., Cardea, J.A.: *Use of high-energy shock waves for bone cement removal*. J Arthroplasty. (1990) 5: 19-27.

10. Šunka, P., Fuciman, M., Babická, V., Člupek, M., Beneš, J., Poučková, P., Souček, J.: *Generation of focused shock waves by multicannel el. discharged in water*. Czech J Physics. (2002) 52: D397-D405.
11. Beneš, J., Šunka, P., Hani, A.B.: *Effect on hemolysis by shock waves created by a new method of multichannel discharge*. Sb Lek. (2001) 102: 29-35.
12. D. M. Gilbert *A comperative review of extracorporal shock wave generation* BJU International (2002), 90, 507-511