

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Lékařská biofyzika



Mgr. Jan Zeman

Možnosti klinického využití jednoduchých a tandemových rázových vln

Possibilities of clinical use single and tandem shock waves

Typ závěrečné práce

Disertační

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. MUDr., RNDr. JIŘÍ BENEŠ CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1.8. 2016

Mgr. Jan Zeman

Podpis

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat vedoucímu své disertační práce Prof. MUDr., RNDr. Jiřímu Benešovi, CSc. za odborné vedení a za čas, který mi věnoval při konzultacích a řešení problémů. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Pavle Poučkové, CSc. a RNDr. Marii Zadinové z oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky za pomoc s experimenty. A v neposlední řadě patří můj dík doc. Ing. Pavlu Šunkovi, CSc. a Ing. Petru Lukešovi, Ph.D. z Ústavu fyziky plazmatu za konzultaci technických stránek práce.

Identifikační záznam:

ZEMAN, Jan. Možnosti klinického využití jednoduchých a tandemových rázových vln. [Possibilities of clinical use single and tandem shock waves]. Praha, 2016. 120 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK. Vedoucí závěrečné práce Beneš, Jiří.

Abstrakt:

Rázová vlna se v medicíně využívá již více jak 30 let. Na začátku se používala zejména pro litotrypsi, ale dnes nachází uplatnění i v jiných oborech medicíny, jako jsou ortopedie, revmatologie a další. Jednoduchá rázová vlna představuje jeden ráz, který se opakuje obvykle každou 1-1,5 vteřiny. Naproti tomu tandemová rázová vlna jsou dva rázy těsně po sobě (ideální interval mezi oběma rázy je 8-15 μ s), které se opakují. V této práci je zkoumána možnost klinického využití jednoduchých i tandemových rázových vln, které jsou generovány zcela novým zdrojem. Ten je založen na principu mnohokanálového výboje. Bylo zjištěno, že jednoduchá rázová vlna dokáže narušit spojení kosti a kostního cementu, tohoto efektu by bylo možné využít v ortopedii. Jednoduchá i tandemová vlna způsobují poškození nádoru *in vivo*, princip, jakým k poškození dochází, je ale odlišný. Tandemová rázová vlna je schopna způsobit poškození v hloubce v akusticky homogenním prostředí a zvyšuje účinek podávané chemoterapie. Bylo by tedy možné jednoduchou i tandemovou rázovou vlnu využít v onkologii a to buď samotné vlny, nebo jejich kombinaci s jinými chemickými látkami. Pro tyto aplikace byl zhotoven funkční vzorek klinicky použitelného aplikátoru rázových vln s novým zdrojem.

Klíčová slova:

Rázové vlny, tandemové rázové vlny, kavitace, elektrický výboj, poškození nádoru

Abstract:

Shock waves have been used in medicine for more than 30 year. At the beginning was mainly use for lithotripsy, but today is also applied in other fields of medicine, such as orthopedics, rheumatology and others. Single shock wave is one shock that usually is repeated every 1-1.5 seconds. By contrast tandem shock waves are two shocks consecutively (ideal interval between shocks is from 8 to 15 microseconds), that are repeated. In this work we investigated the clinical use of single and tandem shock waves that are generated entirely new source. It is based on the principle of multichannel discharge. It was found that a single shock wave can destroy the union between bone and bone cement, this effect could be used in orthopedics. Single and tandem shock wave can damage the tumor *in vivo*, but the principle damage is different. Tandem shockwave is able to cause damage in a depth of acoustically homogeneous medium and enhances the effect of chemotherapy. It would therefore be possible to used single and tandem shock waves in oncology either alone, or their combination with other chemicals. Functional sample of clinically usable applicator of shock waves with a new source was made for these applications.

Key words:

Shock waves, tandem shock waves, cavitation, electrical discharges, tumour damage

Obsah

1	Úvod.....	9
1.1	Rázová vlna.....	9
1.2	Popis rázové vlny.....	9
1.3	Historie rázové vlny v medicíně	13
1.4	Historie v ČR	15
1.5	Komponenty litotryptorů.....	18
1.5.1	Generátor rázových vln.....	18
1.5.1.1	Elektrohydraulický generátor.....	18
1.5.1.2	Elektromagnetický generátor.....	20
1.5.1.3	Piezoelektrický generátor	21
1.5.1.4	Mikroexplozivní generátor	22
1.5.1.5	Generátor založený na principu mnohokanálového výboje ...	22
1.5.2	Systém pro fokusaci rázové vlny	23
1.5.3	Propojení přístroje a pacienta	24
1.5.4	Zaměřovací systém	24
1.6	Účinky rázové vlny.....	27
1.6.1	Rázová vlna a drcení konkrementu	27
1.6.2	Rázová vlna a její účinky na tkáň	28
1.6.2.1	Vedlejší účinky při litotrypsi	28
1.6.2.2	Použití v ortopedii.....	30
1.6.2.3	Použití v revmatologii	31
1.6.2.4	Permeabilizace buněk.....	31
1.6.2.5	Další možné využití rázových vln	32
1.7	Jednoduchá a tandemová rázová vlna	33
2	Cíle práce.....	34

3	Materiál a metody.....	35
3.1	Nový zdroj rázových vln.....	35
4	Výsledky.....	39
4.1	Jednoduché rázové vlny.....	39
4.2	Tandemové rázové vlny.....	59
4.3	Klinický aplikátor.....	92
5	Diskuse.....	108
6	Závěr.....	111
7	Literatura.....	112
8	Seznam obrázků.....	118
9	Sezam tabulek.....	120

1 Úvod

1.1 Rázová vlna

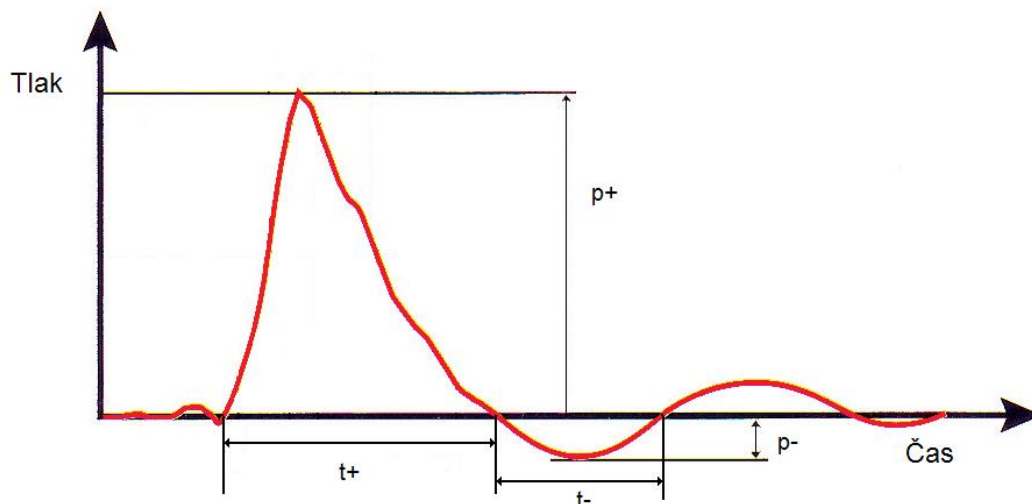
Rázové vlny se před 30 lety nečekaně uplatnily v lékařské praxi při léčbě konkrementů jejich fragmentací. Rázová vlna je zvláštní forma akustické vlny, která z hlediska fyziky představuje jednorázový děj vysokého výkonu v krátkém čase, tedy děj s malou energií. Dnes nachází uplatnění i v jiných oblastech medicíny, jako je ortopedie, revmatologie a další. Tato práce se zaměřuje na rázové vlny jednoduché a tandemové. Jednoduché rázové vlny mají po průchodu první vlny dlouhý časový odstup k druhé vlně a to v řádu až celých sekund. Časový odstup je dlouhý vzhledem k trvání jedné rázové vlny (v jednotkách mikrosekund). Jednoduché rázové vlny jsou tak z pohledu fyziky aplikovány do akusticky stálého prostředí. U tandemových rázových vln jsou aplikovány dva rázy tak rychle po sobě, že mezi nimi nastává interakce. Ta je dána tím, že první vlna vytvoří akustickou anizotropii a než tato změna zmizí (5 – 10 mikrosekund), přichází druhá rázová vlna, která může na této anizotropii uvolnit svoji energii a vytvořit vyšší hustotu kavitací.

Typický průběh rázové vlny v čase vidíme na obrázku 1. Jde o závislost tlaku na čase. Je to krátký pulz, který trvá celkem okolo 5 μs . Na začátku téměř okamžitě přechází do špičkové hodnoty pozitivního tlaku p_+ , tento přechod trvá asi 10 ns a nazývá se "shock". Pozitivní hodnota tlaku dosahuje 10 – 150 MPa. Následně klesá tlak k nule a následuje oblast negativního tlaku s trváním okolo 3 μs . Negativní tlak p_- dosahuje -25 MPa. Negativní tlak tak dosahuje menších hodnot než tlak pozitivní a zároveň v této fázi neprobíhá žádná prudká změna "shock". Jako rázová vlna se běžně označuje celý průběh, technicky vzato jde však pouze o ostrý přechod tlaku na začátku [1-3].

1.2 Popis rázové vlny

Jak bylo uvedeno, typický průběh RV vidíme na obrázku 1. Zde se rozlišuje pozitivní část, která trvá dobu t_+ (typicky 0,5 – 3 μs), na ni navazuje negativní část

s dobou trvání t_- (2 – 20 μs). Maximální hodnotu pozitivního tlaku značíme p_+ (10 – 150 MPa) a maximální hodnotu negativního tlaku p_- (-5 až -25 MPa).



Obrázek 1. Průběh rázové vlny (závislost tlaku na čase)

Hodnoty tlaku závisí na nastavení energie zdroje a také na jeho typu. V tabulce 1 jsou uvedeny typické hodnoty tlaků a časů trvání RZ pro tři základní druhy generátorů. Místo, kde dosahuje tlak svých maximálních hodnot, se nazývá ohnisko. Kolem ohniska potom sledujeme oblast, ve které je hodnota tlaku minimálně 50 % maximální hodnoty a velikost této oblasti v osách x, y a z je potom udávána jako jeden z parametrů zdroje RV. Frekvenční spektrum RV nemá dominantní frekvenci, má rozsah přibližně od 15 kHz do 20 MHz. Nejvíce energie je mezi 100 kHz a 1MHz. Vrchol se potom nachází na frekvenci 300 kHz.

Typ generátoru	p_+ [MPa]	p_- [MPa]	t_r [ns]	t_+ [μs]	t_- [μs]
Elektrohydraulický	21–78	3,6-9,5	<30	1,4-0,8	0,5-2,5
Piezoelektrický	9-114	6,2-9,9	250-<30	1,0-0,8	0,5-1,1
Elektromagnetický	8-60	2-6	641-<30	3,5-1,7	2,0-4,0

Tabulka 1. Hodnoty parametrů u komerčně využívaných typů generátorů (převzato z A. J. Coleman et al., 1993)

Jako další parametr se sleduje energie E rázové vlny, která se udává v mJ. Energii rázové vlny je možné počítat podle následující rovnice (1).

$$E = (A/\rho c) \int p^2(t)dt \quad (1)$$

Kde A je plocha vlnoplochy, ρ je hustota média, c je rychlost šíření v médiu, p je tlak a t je čas. Celková energie se pohybuje běžně v rozmezí 10 – 100 mJ. Protože je to však celková energie rázové vlny, nevíme nic o tom, kam je energie soustředěna. Tedy jak velké je ohnisko a jestli je rázová vlna vůbec fokusovaná. Nefokusované RV se používají například v ortopedii. Abychom mohli lépe vyjádřit rozložení energie, existuje další veličina a to hustota energie EFD, což je energie vztažená na jednotku plochy. Hustotu energie EFD potom počítáme podle níže uvedené rovnice (2).

$$EFD = (1/\rho c) \int p^2(t)dt \quad (2)$$

Pro určení hustoty energie je nutné měřit závislost tlaku na čase v různých osách. Obecně EFD počítáme jako integrál přes celý tlakový profil. Můžeme ještě počítat integrál pouze přes pozitivní část tlakového profilu bez negativní vlny. Konkrétně se jedná o část od doby, kdy tlak přesáhne 10% hodnoty p_+ , do doby, kdy tlak poklesne pod 10% p_+ . Tuto hustotu energie označíme EFD+. Hodnoty EFD se běžně pohybují v rozmezí od 0,2 do 2 mJ/mm² [2-7].

Dalším důležitým parametrem tentokrát ne pro popis rázové vlny, ale pro její šíření v prostředí je akustická impedance. Akustickou impedanci prostředí značíme Z a můžeme počítat jako součin hustoty daného prostředí a fázové rychlosti šíření zvuku, tedy podle rovnice (3).

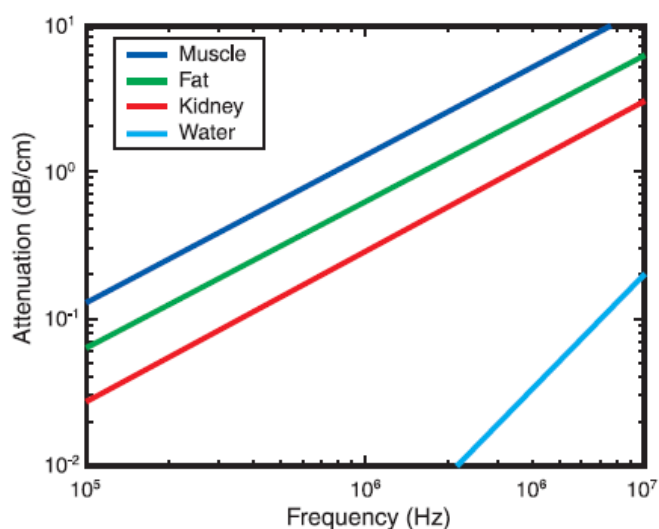
$$Z = \rho \cdot c \quad (3)$$

Pokud se rázová vlna šíří prostředími s podobnou akustickou impedancí, nedochází zde k významné ztrátě energie. Takto je tomu u tkání tukových, svalových a vody, jak je vidět v tabulce 2. Jak také vidíme akustická impedance vzduchu, plicní tkáně, kostí, nebo konkrémentu je odlišná. Na rozhraní například svalové tkáně a plicní tkáně, tak bude docházet k reflexi a transmisi rázové vlny. Odražená vlna mění svoji fázi do 180°, pokud narazí na prostředí s nižší akustickou impedancí, toto má za následek vznik silné tahové vlny, která může vytvářet kavitace. Proto je důležité, podobně jako u vyšetření ultrazvukem, zajistit, aby mezi zařízením a tělem pacienta nebyl vzduch [5,8].

	Rychlost zvuku [m/s]		Hustota [g/cm ³]	Akustická impedance [kg/s*m ²]*10 ⁻⁶	
	Min	Max		Min	Max
Plíce	650	1160	0,400	0,260	0,464
Tuk	1476		0,928	1,370	
Vzduch	330	343	0,0013	0,000429	0,000446
Voda	1492		0,998	1,489	
Ledviny	1570		1,040	1,633	
Sval	1545	1630	1,060	1,638	1,728
Kostní dřev	1700		0,970	1,649	
Kost	2700	4100	1,800	4,860	7,380
Ledvinový kámen	4000	6000	1,9-2,4	7,600	14,400
Železo	5100	5800	7,900	40,29	45,820

Tabulka 2. Hodnoty rychlosti zvuku, hustoty a akustické impedance pro jednotlivé druhy medií (převzato z McClure, Scott R, 2004)

Všechny akustické vlny, které se šíří tekutinou, přicházejí o část své energie vinou absorpce. Amplituda rázové vlny tedy postupně pomalu klesá s tím, jak se vlna šíří prostředím. Absorpce ve vodě je velice malá, pokud ji ale porovnáme s absorpcí v měkkých tkáních, tak zde je asi 1000 krát větší a má měřitelný efekt. Typické hodnoty absorpce pro svalovou, tukovou, ledvinovou tkáň a vodu můžeme vidět na obrázku 2.



Obrázek 2. Útlum zvuku jako funkce frekvence (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)

S akustickou impedancí souvisí také lom na rozhraní dvou prostředí. Zde platí podobně jako v optice (4).

$$\sin \alpha / \sin \beta = n_1 / n_2 \quad (4)$$

Kde α a β jsou úhel dopadu respektive úhel lomu a n_1 a n_2 jsou indexy lomu prostředí, které se pro lom rázové vlny nahrazují rychlostí zvuku v daném prostředí, potom tedy platí (5).

$$\sin \alpha / \sin \beta = c_1 / c_2 \quad (5)$$

Pokud tedy například přechází RV z vody, kterou je obklopen zdroj, do svalové tkáně pacienta pod úhlem 10° bude se lámat pod úhlem $9,1^\circ - 9,7^\circ$. Tato odchylka však bude hrát minimální roli.

Rázová vlna může být soustředěna do jednoho bodu, tomuto bodu říkáme ohnisko. Ohnisko má obvykle elipsoidní tvar s nejdelším rozměrem podél podélné osy. Rozměr ohniska závisí na konstrukci zdroje rázových vln a je tak charakteristickým parametrem pro každý typ zdroje [7, 8].

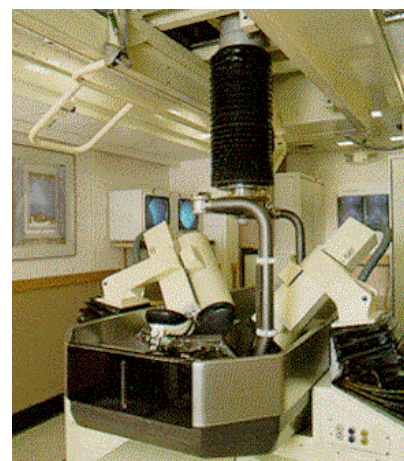
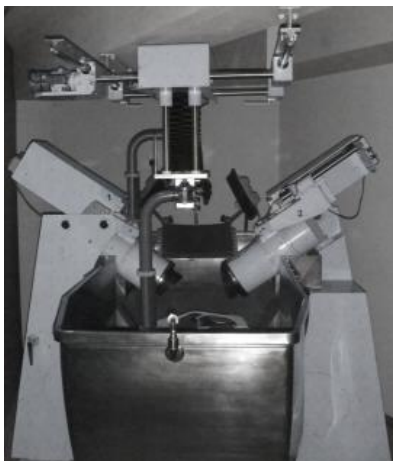
1.3 Historie rázové vlny v medicíně

Historie rázových vln z hlediska působení na člověka sahá až do druhé světové války, kdy bylo pozorováno v plicích trosečníků poškození, které bylo způsobeno výbuchem podvodních bomb. Trosečníci přitom neměli žádné vnější poškození. Bylo tak poprvé pozorováno, jaký vliv má na tkáň RV vytvořená výbuchem bomby pod hladinou. První systematický výzkum RV však přišel až v padesátých letech 19. století. Jako příklad je možné uvést zjištění, že elektrohydraulicky generovaná RV je schopna rozbít keramické štítky ve vodě. Další důležitý okamžik přišel v roce 1966, kdy došlo k nehodě v německé firmě Dornier. Firma Dornier se věnovala výrobě nadzvukových letadel a při testech, kdy byla náletová hrana křídla odstřelována vodními projektily o vysokých rychlostech, se jeden ze zaměstnanců dotkl plochy křídla v momentě, ve kterém dopadl vodní projektil. Po tomto incidentu si zaměstnanec stěžoval, že cítil, jako by ho zasáhl elektrický proud, i když veškerá měření ukázala, že zde žádný proud neproudí. K témuž docházelo i poté, co si vzal zaměstnanec izolační rukavici. Přišlo

se tak na to, že při odstřelování křídla vodními projektily, dochází ke generování rázových vln, které přecházejí do těla [8-10].

V Německu byla od roku 1968 až do roku 1971 prováděna testování interakce rázových vln a tkáně pokusných zvířat. Byly zkoumány účinky rázových vln na různé typy tkáně a také průchod těmito tkáněmi. Dále i přechod mezi různými druhy tkání a přechod rázové vlny do těla. Zde se podařilo zjistit, že nejlepší médium pro přechod RV do těla je voda, nebo želatina a to díky jejich akustickým vlastnostem (akustické impedanci). Všechny tyto pokusy pak vedly k myšlence desintegrace ledvinových kamenů mimotělně generovanou rázovou vlnou.

Už v roce 1976 byl proveden experiment, kdy byly voperovány lidské konkrementy psům a následně byla provedena jejich desintegrace pomocí přístroje firmy Dornier. O čtyři roky později, v roce 1980, byl v Mnichově ošetřen první pacient s ledvinovými kameny. Přístroj, na kterém byl pacient ošetřen, nesl označení Dornier Lithotripter HM1, kde HM1 znamená Human Model 1 obrázek 3 vlevo. Po modelu HM1 následoval model HM2. Tento model měl úspěšnost 90 % v případě konkrementů velikosti višně.



Obrázek 3. Vlevo Dornier Lithotripter HM1 a vpravo Dornier Lithotripter HM3
(převzato z <http://www.qdlitho.com.au/the-treatment/how-it-works>,
http://www.mwstone.com/kidney_lithotripsyequipment.php)

V roce 1983 bylo otevřeno druhé centrum pro litotrypsi na Oddělení urologie na Katarinen Hospital ve Štuttgartu, Německo. Zde byl instalován komerční Dornier

Lithotripter HM3. Ten byl v roce 1984 instalován také v USA v Indianapolis. Model HM3 je na obrázku 3 vpravo. S modelem HM3 jsou ostatní zařízení srovnávána. Model HM3 používá elektrohydraulický generátor. Pacient i generátor jsou umístěni v otevřené vodní lázni, což bylo typické pro první generaci litotryptorů [7,8,11,12].

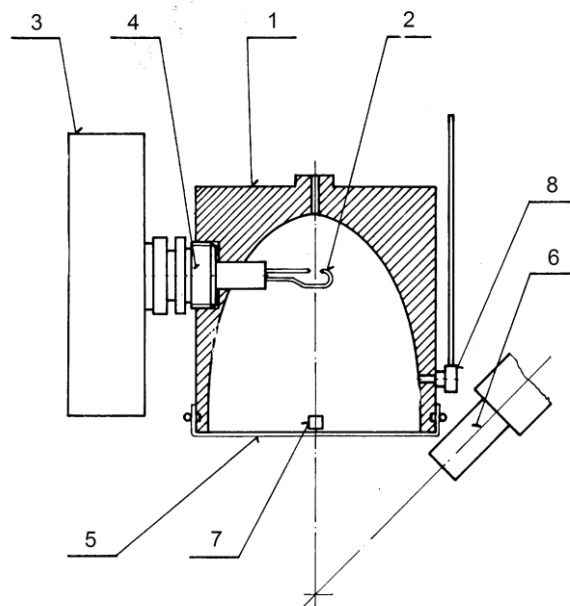
1.4 Historie v ČR

V České republice respektive v Československu byl postup vývoje zařízení pro extrakorporální litotrypsi rázovou vlnou odlišný. Začátky jsou totiž spojeny s desintegrací žlučových konkrementů. Začátky se datují do 80. let 20. století, kdy na 1. interní klinice VFN a 1. LF UK v Praze byla snaha o urychlení rozpouštění žlučkových konkrementů, které byly narušeny ultrazvukem. Ukázalo se však, že ultrazvukové vlnění nedokáže do těla pacienta proniknout s takovou intenzitou. Hledala se proto jiná možnost a pozornost se tak obrátila na rázovou vlnu, která byla již v té době ve světě známá. S generováním rázové vlny měli zkušenosti na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR, kde prováděli experimenty s generováním silných elektronových svazků, a RV byla doprovodným jevem při těchto pokusech. Díky této spolupraci se podařilo v roce 1986 vyvinout první zkušební generátor rázových vln. Na něm byly provedeny experimenty s pokusnými zvířaty [8,10,13].

První generátor se podařilo patentově chránit (PV 40066-85). Obrázek 4 ukazuje, jak generátor vypadal. Generátor se skládá z reflektoru (1), je to nádoba tvaru rotačního elipsoidu. V reflektoru je umístěno jiskřiště (2), které je proti přímému přístupu chráněno krycí fólií (5). Jiskřiště je potom propojeno s nízkoindukčním kondenzátorem (3), který je uchycen vně reflektoru pomocí přechodky (4). K zaměření sekundárního ohniska slouží ultrazvukové sondy (6,7), které jsou připevněny k reflektoru tak, aby jejich osa procházela sekundárním ohniskem. Přívodem (8) je do reflektoru přivedena kapalina se sníženým parciálním tlakem rozpuštěných plynů.

K vytvoření rázové vlny dochází v reflektoru v místě primárního ohniska. Zde jsou umístěny hroty jiskřiště, mezi kterými dochází k prudké expanzi kapaliny, ta se vypaří a při následné ionizaci vzniká vodivý plazmový kanál. Expanze kapaliny vytváří

tlakovou vlnu, ta se šíří do okolí a následně je fokusována pomocí reflektoru do sekundárního ohniska. V sekundárním ohnisku je potom umístěn konkrement [8,14].

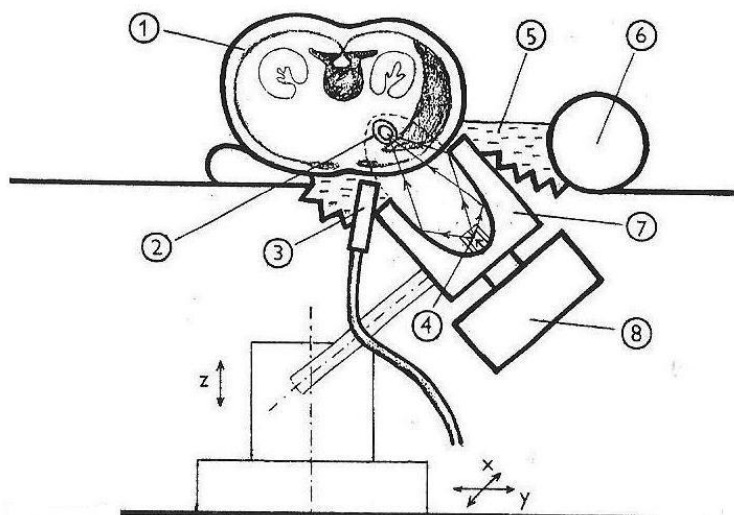


Obrázek 4. První generátor rázových vln ČR. 1-nádoba reflektoru, 2-jiskřiště, 3-bezindukční kondenzátor, 4-přechodka, 5-krycí folie, 6 a 7-ultrazvukové sondy, 8-přívod vody (převzato z Zeman, J., 2011)

Aby byla potvrzena účinnost tohoto přístroje a zároveň metody jako takové, byl v roce 1986 proveden experiment, kdy byly prasety voperovány lidské žlučové kameny. Následně byly vystaveny působení rázových vln. Aby bylo možné posoudit účinky RV na tkáň, byla exponována také játra, ledviny, plíce a svalová tkáň. Při vyhodnocení bylo zjištěno, že rázová vlna generovaná mimo tělo, byla schopna narušit voperovaný žlučový konkrement a na nevzdušných tkáních zanechává zcela zanedbatelné účinky. Výjimku tvoří plíce, kde došlo k poškození vlivem rozdílné akustické impedance [8,15].

Vzhledem k těmto úspěchům s experimentálním generátorem, byla v roce 1987 zahájena práce na klinické verzi litotryptoru. Tu se podařilo dokončit a zařízení patentovat (PV 7789-86.D). V roce 1987 zároveň proběhla první léčba pacienta a do konce roku ještě dalších osmi. Klinická verze přístroje je zobrazena na obrázku 5. Generátor, který je součástí přístroje, je výše popsán generátor (obrázek 4). Na obrázku 5 vidíme tělo pacienta (1), které je uloženo na lůžku. Akustický kontakt generátoru RV a těla pacienta je zajištěn pomocí vodní lázně (5) a těsnící manžet (6). Zaměření konkrementu (2) se provádí pomocí ultrazvukové sondy (3),

kteřá je umístěna mimo reflektor. Sonda je však k reflektoru fixována tak, aby zobrazovaná rovina protínala hlavní osu eliptického reflektoru přesně v místě sekundárního ohniska. Celá soustava manipulátoru je pohyblivá, má šest stupňů volnosti, díky tomu je možné nastavit přístroj tak, aby sekundární ohnisko leželo v místě, kde se nachází konkrement [16,17].



Obrázek 5. Klinická verze litotryptoru. 1-tělo pacienta, 2-kámen ve žlučníku, 3-sonografická sonda, 4-jiskřiště, 5-vodní lázeň, 6-vak plněný vzduchem, 7-reflektor, 8-pulzní kondenzátor (převzato z Zeman, J., 2011)

V roce 1988 byl do klinické praxe uveden přístroj pro desintegraci ledvinových konkrementů. Zaměření konkrementu se provádělo skiaskopicky a později i ultrasonograficky. Skiaskopické zaměření se provádělo dvojicí RTG projekcí, jejichž osy se protínaly v sekundárním ohnisku přístroje. Skiaskopické zaměření vzniklo ve spolupráci s Výzkumným ústavem zdravotnické techniky v Brně [18]. Skiaskopické zaměření samozřejmě znamená pro pacienta radiační zátěž, tento nedostatek eliminuje zaměření ultrasonografické. Pomocí zaměření ultrazvukem je tak možné kontinuálně sledovat postup drcení a zaměřit jak kontrastní, tak nekontrastní konkrementy [19].

Přístroj jako takový byl v dalších letech zdokonalován a dá se říci, že v roce 1992 dosahoval srovnatelné úrovně se světovou špičkou v tomto oboru. Byl instalován a používán velkou řadou pracovišť na našem území. Nejsilnějším článkem přístroje je generátor rázových vln, který má výborné výsledky při desintegraci konkrementů, je šetrný k okolním tkáním a jeho provoz je ekonomický [10].

1.5 Komponenty litotryptorů

První generaci litotryptorů reprezentuje přístroj Dornier HM3. Ten je charakteristický velkou vodní lázní, ve které je pacient ponořen pro optimální přenos rázové vlny. Je vybaven elektrohydraulickým zdrojem a elipsoidním reflektorem. Ošetření se provádělo při celkové, nebo spinální anestezii. Výsledky dosažené s tímto zařízením jsou stále považovány za základ pro srovnání všech nových zařízení [7].

Druhá generace litotryptorů používala elektrohydraulický, elektromagnetický, nebo piezoelektrický zdroj. Přenos rázové vlny se uskutečňoval prostřednictvím vodního vaku, nebo částečnou vodní lázní. Anestezie se většinou omezila na intravenózní sedaci.

Třetí generace litotryptorů je také vybavena elektrohydraulickým, elektromagnetickým, nebo piezoelektrickým zdrojem. Všechna zařízení dovolují aplikaci bez anestezie. Všechny komponenty jsou integrovány do multifunkcionálního systému [7].

Všechny přístroje se skládají ze čtyř základních komponent a to těchto.

1.5.1 Generátor rázových vln

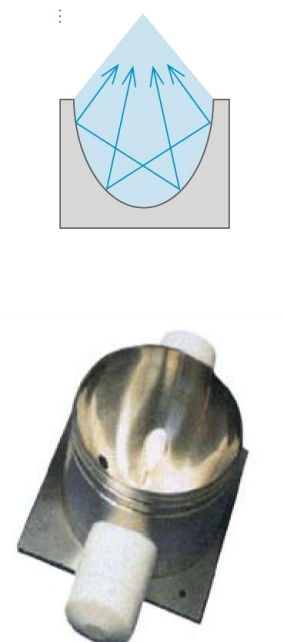
Dá se říci, že generátor rázových vln je jakési srdce každého přístroje. Ovlivňuje jak fyzikální parametry rázových vln, tak i umístění sekundárního ohniska. Existuje několik typů generátorů.

1.5.1.1 *Elektrohydraulický generátor*

Tento způsob generace rázových vln je první, který byl používán u litotryptoru Dornier HM3 a také náš první litotryptor měl jako generátor tento typ. Elektrohydraulický generátor rázových vln je založen na principu jiskrového výboje, ke kterému dochází pod vodou. Jeho schéma a reálnou podobu vidíme na obrázku 6. V primárním ohnisku jsou umístěny proti sobě dvě hrotové elektrody, tyto elektrody jsou připojeny ke kondenzátoru s kapacitou většinou kolem 100 nF. Kondenzátory jsou nabíjeny na napětí 15-30 kV a poté dojde k jejich vybití na elektrodách, zde díky tomu vzniká rychle expandující plasmový kanál a dochází k rychlému odpaření kapaliny

v okolí tohoto kanálu. Takto vznikne sférická rázová vlna, která je následně pomocí reflektoru odražena do sekundárního ohniska. Intenzita rázové vlny může být měněna pomocí nastavení napětí. Hloubka, kde se nachází ohnisko, a tvar ohniska je definován pomocí geometrie elipsoidního reflektoru. Šířka výbojového kanálu je asi 1 mm. Tento typ zdroje se stále používá i v dnešních zařízeních. Nevýhodou tohoto typu zdroje je limitovaná životnost hrotových elektrod, které vydrží většinou kolem tisíce výbojů. Je to dáno tím, že elektrody při výboji erodují a důsledkem je změna parametrů a nestabilita rázové vlny v ohnisku [7,12, 20].

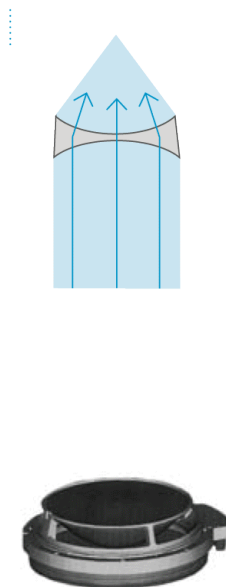
Na Ústavu fyziky plazmatu byl nalezen způsob, jak efektivně regulovat vzdálenost hrotů a tím prodloužit jejich životnost (způsob byl patentován). Hroty elektrod se ve většině případů nechají nastavovat, tedy dá se měnit jejich vzdálenost a tím regulovat stabilita parametrů rázové vlny. Toto nastavení vzdálenosti však většinou bývá mechanické a tak zcela závislé na zkušenostech obsluhy. Při výbojích dochází ke změně geometrie hrotů elektrod, což není možné nastavením na běžných zařízeních postihnout. Tento nedostatek byl odstraněn tak, že se měří čas od začátku nabíjení kondenzátorů, nebo od nabití kondenzátoru do chvíle, kdy dojde k průrazu, výboji mezi hroty elektrod. Na základě naměřených hodnot je poté provedeno nastavení hrotů a zvýší se tak jejich životnost [7,21,22,23].



Obrázek 6. Elektrohydraulický generátor (převzato z <http://eswt.net/focused-shock-waves>)

1.5.1.2 Elektromagnetický generátor

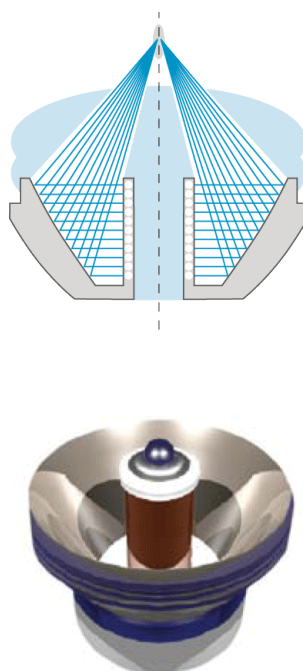
Tento typ generátoru jako první využívala firma Siemens v jejich zařízení s názvem Lithostar. Zařízení bylo uspořádáno tak, že v něm byly dva elektromagnetické zdroje po obou stranách pacienta. Generátor se skládá z ploché cívky, na tuto cívku je přiveden velký proudový puls a cívka tak generuje silné magnetické pole. Toto silné magnetické pole způsobí odpuzení izolované metalické membrány do přiléhající vody. Voda v okolí membrány je tak stlačena a vzniká plochý akustický puls. Puls je poté fokusován pomocí akustické čočky. Tlak na povrchu membrány je v ploše konstantní. Během cesty se akustický puls transformuje na rázovou vlnu. Elektromagnetický zdroj tohoto typu generuje rázovou vlnu s velmi širokým rozsahem možných intenzit a vysokým stupněm reprodukovatelnosti. Jeho schéma a reálnou podobu vidíme na obrázku 7. Životnost zdroje je kolem milionu rázových vln. V celé době životnosti vykazuje stálost parametrů RV, ale po opotřebení materiálů musí být vyměněn, což je nákladnější než u elektrohydraulického generátoru. U tohoto typu zdroje je možné volbou průměru membrány a ohniskovou vzdáleností akustické čočky měnit vyzařovací úhel. Elektromagnetický zdroj však nikdy neposkytl lepší výsledky v ošetření oproti neupravenému Dornier HM3.



Obrázek 7. Elektromagnetický generátor s plochou cívku (převzato z <http://eswt.net/focused-shock-waves>)

Druhým možným uspořádáním elektromagnetického zdroje je elektromagnetický válcový zdroj, jeho schéma a reálnou podobu vidíme na obrázku 8. Tento zdroj se skládá z válcové cívky, která je opět obklopena membránou. Na cívku je přiveden silný proudový puls, dojde k odpuzení membrány a vzniká silný akustický puls. Ten je odražen pomocí parabolického reflektoru do ohniska. Toto uspořádání je velmi stabilní a dovoluje asi milion opakování.

Pokud bychom se podívali na náklady na provoz, tak elektromagnetický zdroj sice vydrží více opakování, ale jeho výměna je potom několikrát dražší než u zdroje elektrohydraulického [7,21,22,23].

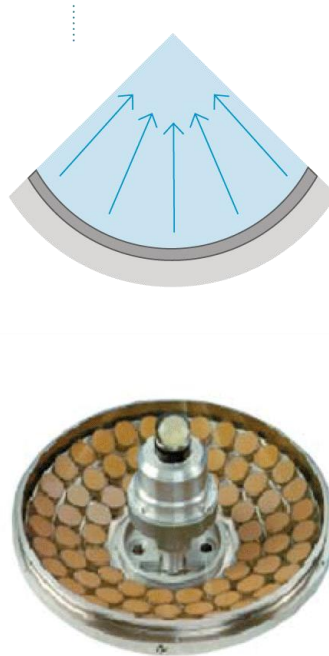


Obrázek 8. Elektromagnetický zdroj s válcovou cívkou (převzato z <http://eswt.net/focused-shock-waves>)

1.5.1.3 Piezoelektrický generátor

Piezoelektrický generátor je založen na piezoelektrickém jevu, tedy přeměně elektrické energie na mechanickou. Generátor většinou tvoří vnitřní plocha kulového vrchlíku, na které jsou rozmístěny piezoelektrické elementy. Po připojení ke zdroji vysokého napětí nastává jeden synchronní kmit všech piezoelementů. Tím je vytvořena sféricky konvergentní rázová vlna. Ohnisko tohoto zdroje leží ve středu koule, jejíž část tvoří generátor. Schéma a reálnou podobu generátoru vidíme na

obrázku 9. Tento typ zdroje má velkou aperturu, díky čemuž je ošetření téměř bezbolestné. Protože mechanická pevnost piezoelementů je omezená, je nutné používat velký počet. Piezoelektrický zdroj generuje nižší akustickou energii než ostatní typy, ale tlak v ohnisku je vysoký díky jeho malým rozměrům [7,21,22,23].



Obrázek 9. Piezoelektrický generátor (převzato z <http://eswt.net/focused-shock-waves>)

1.5.1.4 Mikroexplozivní generátor

Tento typ generátoru se v klinické praxi nepoužívá. Generátor funguje tak, že v primárním ohnisku elipsoidního reflektoru dochází k mikroexplozi malé kuličky. Tím je vytvořena tlaková vlna, která je reflektorem odražena do sekundárního ohniska [20].

1.5.1.5 Generátor založený na principu mnohokanálového výboje

Tento typ generátoru je předmětem této práce a jeho princip bude podrobně vysvětlen v další části textu.

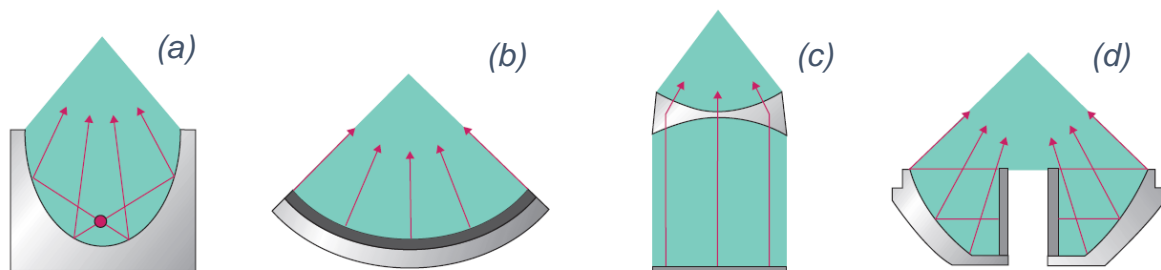
1.5.2 Systém pro fokusaci rázové vlny

Koncentrace tlaku v rázové vlně do malého objemu ohniska se označuje jako její fokusace a je součástí každého generátoru. Fokusací se dosahuje koncentrace energie a tento postup je velice důležitý pro parametry a účinek rázové vlny. Pro popis je správné uvést velikost ohniska, tlaky a délku pulsu. U elektrohydraulického zdroje a také u experimentálního zdroje mikroexplozivního je fokusace prováděna pomocí elipsoidního reflektoru. Reflektor tvoří část rotačního elipsoidu, kdy v primárním ohnisku je vytvořena tlaková vlna, která je reflektorem odražena do ohniska sekundárního, jak je vidět na obrázku 10 (a).

U zdroje piezoelektrického je rázová vlna fokusována díky tvaru samotného generátoru. Piezoelementy jsou totiž umístěny na vnitřní ploše kulového vrchlíku a tak se rázová vlna koncentruje ve středu koule, jejíž část kulový vrchlík tvoří. Schéma vidíme na obrázku 10 (b).

U zdroje elektromagnetického s plochou cívkou se k fokusaci využívá akustická čočka, která podobně jako čočka optická koncentruje rázovou vlnu do ohniska. Schéma vidíme na obrázku 10 (c).

U zdroje elektromagnetického s válcovou cívkou se k fokusaci používá reflektor tvaru části rotačního paraboloidu. V tomto generátoru vzniká válcová tlaková vlna, která je tímto reflektorem odražena do ohniska, jak vidíme na obrázku 10 (d) [12].



Obrázek 10. Různé principy fokusace rázových vln (převzato z Wilbert, D.M. 2002). (a) Reflektor tvaru části rotačního elipsoidu. (b) Fokusace díky tvaru generátoru, vnitřní část kulového vrchlíku. (c) Fokusace pomocí akustické čočky. (d) Reflektor tvaru části rotačního paraboloidu

1.5.3 Propojení přístroje a pacienta

Rázová vlna je vlna akustická, která se šíří jako střídání komprese a dekomprese prostředí. Na rozhraních prostředí s rozdílnou akustickou impedancí dochází ve větší, nebo menší míře k absorpci, reflexi nebo refrakci. Protože voda má podobné akustické vlastnosti jako většina měkkých tkání je nejvhodnějším prostředím pro generování rázové vlny a její přenos do těla pacienta.

U prvních litotryptorů se používala vodní lázeň, do které byl pacient zcela ponořen. Voda v této lázni byla odplyněná, pro zajištění šíření rázové vlny s minimálními ztrátami energie. Tento způsob je stále považován za ideální možnost přenosu, i když pro pacienta není úplně komfortní. Druhá a třetí generace litotryptorů používá vodní polštář, na kterém leží pacient. Vodní polštář je vyroben z elastického PVC nebo silikonu a dobře se tak přizpůsobí tvaru lidského těla. Aby byl zajištěn dokonalý přenos rázové vlny (akustický kontakt), je na vodní polštář v místě spojení s tělem pacienta aplikován ultrazvukový gel. Je totiž nutné, aby zde nebyly žádné vzduchové bubliny [7]. Přítomnost vzduchových bublin je opravdu zásadní, experimentálně bylo zjištěno, že pokud bubliny pokrývají 1,5 % - 19 % plochy přechodu, dochází k snížení amplitudy rázové vlny průměrně o 20 %. Pokud je spojení pacienta a vodního polštáře narušeno, jako když pacient mění polohu, dochází k poklesu akustického tlaku až o 32 %, což představuje snížení akustické energie o 57 %. Desintegrace konkrementů je bublinami také ovlivněna, pokud bubliny pokrývají 2 % plochy spojení, sníží se poškození konkrementu od 20 % do 40 % [24]. Pro lepší přenos energie je dobré pacientovi oholit ochlupení.

1.5.4 Zaměřovací systém

Zaměřovací systém je nutný k zacílení ohniska rázové vlny na konkrement (nebo jinou tkáň), což je ale objekt v těle pacienta. Zaměření je dále důležité pro monitorování průběhu aplikace rázových vln a v neposlední řadě pro zjištění stupně fragmentace konkrementu. Mezi dvě nejběžněji užívané metody zaměření řadíme ultrazvuk a skiaskopii.

Skioskopické zaměření bylo používáno u první generace litotryptorů. Zaměření je provedeno pomocí dvou rentgenových projekcí. Osy těchto projekcí se protínají v ohnisku. U dnešních litotryptorů je používáno skioskopické C-rameno. Oproti ultrasonografickému zaměření je zde pacient vystaven ionizujícímu záření. Pokud je konkrement nekontrastní, je nutné použití kontrastní látky pro zobrazení tohoto konkrémentu jako defektu v náplni kontrastní látky.

Ultrasonografické zaměření má výhodu oproti skioskopii v tom, že je schopné zaměřit jak rentgen kontrastní, tak rentgen nekontrastní konkrémenty. Obvykle je systém uspořádán tak, že ultrazvuková sonda je nastavena, aby rovina zobrazení ležela přesně v místě, kde se nachází ohnisko. Také můžeme sledovat průběh léčby kontinuálně, neboť pacient není vystaven ionizujícímu záření jako v případě skioskopie. Problém může nastat v případě malých uretrálních konkrémentů, které bývají schované za střevní kličkou, ta obvykle obsahuje vzduch [7,12].

U dnešních přístrojů se oba typy zaměření s výhodou kombinují. Litotryptory tak mají jak zaměření skioskopické, tak zaměření pomocí ultrazvuku.

Obecně můžeme dělit dnešní přístroje na modulární, integrované a hybridní.

Modulární přístroje vypadají tak, že zdroj rázových vln, zobrazovací systém a stůl pro pacienta jsou separátní moduly, které fungují i samostatně, jak vidíme na obrázku 11. Díky tomu, že jsou jednotlivé komponenty odděleny, je možné je využívat samostatně, jako v případě ultrazvuku či C-ramene.



Obrázek 11. Modulární systém. AST Lithospace (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)

Integrovaný systém je takový, kde jsou jednotlivé komponenty spojeny do jednoho zařízení, není možné je oddělit. Oproti modulárnímu systému má ten integrovaný menší rozměry a jeho komponenty jsou optimálně integrované a synchronizované. Integrovaný systém vidíme na obrázku 12.



Obrázek 12. Integrovaný systém. Siemens Lithoskop. (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)

Hybridní zařízení mají zobrazovací systém a zdroj rázových vln namontovaný společně na konzole a stůl pro pacienta je separátní část. Tento typ zařízení leží mezi modulárním a integrovaným systémem jak svými rozměry, tak investičními náklady. Příklad Hybridního zařízení vidíme na obrázku 13.



Obrázek 13. Hybridní systém. EDAP TMS Sonolith i-Sys. (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)

1.6 Účinky rázové vlny

1.6.1 Rázová vlna a drcení konkrementu

Rázová vlna má několik účinků, můžeme je rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi přímé účinky řadíme kompresi a tenzi prostředí, kterým proniká rázová vlna. Mezi účinky nepřímé řadíme kavitace, které vznikají při překročení kavitačního prahu vlivem negativní části rázové vlny.

Při desintegraci konkrementu hrají největší roli tyto mechanismy.

Tahové a smykové síly: Je-li délka pulzu menší, než jsou rozměry konkrementu, jsou poté díky geometrii konkrementu a jeho vnitřní struktuře generovány kompresní části rázové vlny tlakové gradienty. Ty mají za následek tahové napětí uvnitř konkrementu, vznik trhlinek a následnou fragmentaci. Je to podobné fragmentaci kladivem.

Drcení: Je to proces, při kterém se kompresní komponenta odráží od distální části konkrementu. Rozhraní mezi kamenem a tekutinou invertuje pozitivní část tlaku na negativní (tahovou složku), protože je zde rozdíl akustických impedancí. Amplituda tahového napětí, které naruší vnitřní napětí konkrementu, je závislá na rozdílu akustických impedancí konkrementu a kapaliny a také na geometrii konkrementu. Drcení tedy rozbijí konkrement zevnitř podobně jako při zmrazení vody uvnitř křehkého materiálu.

Stlačení: Pokud jsou rozměry ohniska větší než rozměr kamene, šíří se tlakové vlny uvnitř kamene, ale také podél něj. Jedná se o dvě odlišná prostředí a tedy i rychlost šíření bude odlišná. Pro kámen se rychlost pohybuje kolem 2500 m/s a v kapalině kolem 1500 m/s. Rázová vlna v kameni tak uteče rázové vlně v okolní kapalině. To vede ke vzniku obvodových sil kolem kamene. To má za následek namáhání v tahu na proximálním a distálním konci konkrementu a vede to k prasknutí kamene. Tento mechanismus můžeme přirovnat k louskáčku.

Superfokusace: Je způsobena rozdílnou geometrií povrchu konkrementu. Rázová vlna, která je odražena od distální části konkrementu může být fokusována

bud' refrakcí, nebo difrakcí. Uvnitř konkrementu tak vznikají lokalizované oblasti velikého namáhání jak tahem, tak tlakem.

Únava: Konkrement je vystaven velkému počtu rázových vln, to vede k rozšíření již existujících defektů a narušení konkrementu.

Oddělení vrstev: Je to proces, při kterém dojde ve vnitřních slabých místech, jako jsou místa styku matrixové a krystalické komponenty, k narušení vnitřního napětí.

Všechny výše zmíněné mechanismy patří mezi přímé [7,8,25-28]. Mezi nepřímé potom řadíme kavitace.

Kavitace: Negativní část rázové vlny může způsobit vznik kavitací v okolí konkrementu. Po krátké době tato kavitace imploduje a tím je uvolněno velké množství energie ve formě vysokoenergetických vodních výtrysků „water jets“ a vysoké teploty (dosahuje až několika tisíc Kelvinů). Water jets vznikají, pokud kolabuje kavitace, která je přilehlá k nějakému povrchu. Tato kavitace kolabuje nesymetricky, jakoby se prolamuje dovnitř, a vzniká tak tryskání tekutiny (rychlost dosahuje 100 m/s), které hraje roli při fragmentaci konkrementu. Kolapsem kavitací také vznikají sekundární rázové vlny, které dále narušují konkrement. Role kavitací je důležitá zejména v pozdější fázi fragmentace konkrementu, kdy je konkrement fragmentován na menší kusy. Význam kavitací byl prokázán v pokusech, kdy byl konkrement umístěn do média s vysokou viskozitou, nebo do prostředí s přetlakem. V tomto případě se snížila účinnost rázové vlny vzhledem ke stupni fragmentace [7,8,25,26,29,30].

1.6.2 Rázová vlna a její účinky na tkáň

1.6.2.1 Vedlejší účinky při litotrypsi

První aplikace rázových vln v medicíně byla zaměřena na drcení konkrementů, v tomto případě byla cílem fragmentace konkrementu, aniž by došlo k poškození měkkých tkání. Rázová vlna musí cestou ke konkrementu projít měkkou tkání, kde může způsobit poškození. Prvním náznakem takového poškození byl výskyt několika hematomů během léčby ledvinových kamenů. Také byla dodatečně zaznamenána hematurie při tomto typu ošetření. Hematurie se přisuzovala mikroskopickým lézím,

kteře vzniknou vinou fragmentů kamene urychlených rázovou vlnou. Renální změny po ošetřeni rázovou vlnou se podařilo potvrdit i pomocí dalších experimentů, které byly prováděny na pokusných zvířatech. Rázové vlny a jejich šířeni a účinky ve tkáni by měly být předvídatelné, dokážeme je dobře fyzikálně popsat. Ale protože se šíří v biologických systémech je věc o mnoho složitější. Ačkoli je rázová vlna při litotrypsi zaměřena na kámen, je přilehlá tkáň také vystavena jejímu působení. Délka ohniska mnoha litotryptorů je okolo 50 mm a to znamená, že celá tloušťka ledvin je vystavena působení rázové vlny. Zároveň vinou respiračních pohybů a také pohybů pacienta dochází k posunutí konkrementu mimo ohnisko a rázové vlny tak dopadají do měkké tkáně. Naštěstí má tkáň takové fyzikální vlastnosti, které ji dělají mnohem méně náchylnou na poškození rázovou vlnou. Například akustická impedance tkáně a vody je velice blízká a tak rázová vlna prochází přes rozhraní voda, tkáň téměř bez odrazu.

V ledvinách můžeme rozlišit dva druhy krváčení a to difuzní krváčení a hematomy. Dalším význačným nálezem byla tvorba krevních sraženin ve středně velkých žilách. Co se týče ledvin, byly jedním z nejvíce studovaných orgánů a podobné změny byly nalezeny ve většině ostatních tkání. Jednu z výjimek tvoří plicní tkáň. Krváčení plic bylo jedním z prvních zdokumentovaných nežádoucích účinků rázové vlny. Došlo k tomu při zaměření RV do žlučníku. Plicní tkáň se ukázala být nejcitlivější na působení rázových vln, z hlediska jejich poškození. Díky tomuto výsledku se také přišlo na to, že i běžný diagnostický ultrazvuk s akustickými parametry běžně užívaný při vyšetřeniích, může způsobit poškození plicní tkáně. Bylo prokázáno také poškození tkáně jater, žlučníku, střev a svalů, stejně jako u ledvin.

Další medicínsky přínosný efekt je účinek RV na kosti. Jak se dalo očekávat, bylo hlavním efektem rázových vln na kosti krváčení. Na okostici a také v kostní dřeni byla pozorována hemoragie. Kost však na poškození reagovala poměrně neočekávaně a to přírůstkem kosti v místě působení.

Důležitý účinek, který bylo nutné prověřit, byl účinek na srdce a nervové buňky. Srdeční arytmie byla pozorována již při prvních ošetřeniích člověka. Zde bylo řešením spouštění rázové vlny mimo vulnerabilní fázi srdečního cyklu. Prakticky to znamenalo monitorovat pacientovi EKG a spouštění rázových vln synchronizovat s R vlnou. V pokusech *in vitro* se také ukázalo, že pomocí rázové vlny je možné navodit akční potenciál. Při ošetřeni pacientů byly z tohoto důvodu pozorovány záškuby svalové tkáně [7,8,31,34].

Rázové vlny vytvářejí v tkáních kavitace, což se podařilo zjistit pomocí diagnostického ultrazvuku. Byly detekovány jako blikající plochy v poli vysokého tlaku. Již v osmdesátých letech se pracovalo s hypotézou, že kavitace jsou zodpovědné za poškození tkáně. Tuto hypotézu podpořilo několik zjištění.

Byla zjištěna souvislost mezi opakováním rázových vln a mírou poškození měkké tkáně. Během ošetření pacienta je běžně podáno 500 – 3000 rázových vln a to tak, že výboje přichází jednou až dvakrát za vteřinu. Aby došlo ke zkrácení doby ošetření bylo navrženo rychlejší opakování rázových vln. Čas ošetření by se potom zredukoval na několik minut, což by znamenalo značnou výhodu oproti chirurgii. Tato možnost byla experimentálně zkoumána a zjistilo se, že zkrácení intervalu mezi jednotlivými rázovými vlnami znamená větší míru poškození tkáně. Důvodem bylo to, že kavitace vytvořené první rázovou vlnou vydržely dost dlouho na to, aby mohly reagovat s druhou rázovou vlnou, která přišla ve velice krátkém intervalu. Toto zjištění se potvrdilo i při jiných experimentech a možnost zkrácení intervalu tak byla zavrhnuta.

Podařilo se také zjistit, že pokud jsou zároveň s rázovou vlnou podávány mikrobubliny, dochází k nárůstu krvácení. Také bylo ověřeno, že k poškození tkáně dochází přesně v místech, kde byly pomocí ultrazvuku kavitace pozorovány [33-35].

Rázové vlny, jak se podařilo prokázat, jsou schopny interagovat s tkání. V případě litotrypse je však nežádoucí, aby docházelo k poškození okolní tkáně a tak se snažíme tento účinek redukovat na minimum. Jsou ale i oblasti aplikace rázových vln, kde se dá účinků na tkáň využít.

1.6.2.2 Použití v ortopedii

Zájem o aplikaci rázových vln v ortopedii vznikl v době, kdy se ukázalo, že pokud je rázová vlna zaměřena na močovod, dochází k remodelaci kosti. Účinek je závislý na hustotě energie RV. Při prvních studiích se ukázalo, že dochází k osteonekróze závislé na dávce a narušení spongiózní kosti. Při vyhodnocení, které probíhalo po dobu 12 týdnů, bylo potom možné pozorovat novotvorbu kosti. Osteogeneze je tedy závislá na hustotě energie. Rázové vlny s vyšší hustotou energie jsou například schopné zlomit kosti potkanů. Pomocí rázových vln, jak vyplynulo

z několika studií, je možné napomoci hojení fraktur kostí. Sníží se doba nutná ke zhojení fraktury. Ukázalo se, že rázové vlny jsou schopny cyto stimulace. Buňky stimuluje tím, že stimuluje uvolňování cytokinů jako je TGF- β 1, nebo jiných mediátorů [5,40].

Další oblastí ortopedie, na kterou se zaměřuje výzkum rázových vln, je využití RV při reoperacích totálních kloubních náhrad. Zde by bylo možné pomocí RV narušit spojení kosti a kostního cementu a při samotné reoperaci by tak bylo snazší extrahovat cement spolu s dřívě kloubní náhrady z dutiny kosti. V dnešní době je samotná extrakce velice náročná a zatěžující pro pacienta. Několik studií ukázalo, že rázová vlna je schopna narušit spojení kosti a kostního cementu a zjednodušit tak extrakce [37-39]. Také v této práci se této oblasti použití RV věnujeme.

1.6.2.3 Použití v revmatologii

V revmatologii se používá především rázová vlna radiální, tedy nefokusovaná s malou hustotou energie a malou maximální hodnotou tlaku. Využití nachází i vlna fokusovaná. Ve většině přístrojů používaných v revmatologii je rázová vlna generovaná odlišným způsobem, než jsou výše popsány. Rázová vlna je generovaná pomocí pneumatických pulzů. Pomocí nich je vystřelován projektil, který narazí na vysílač, na jehož povrchu se tím generuje rázová vlna. Ta dosahuje tlaků okolo 5 bar a hustoty energie 0,1-0,25 mJ/mm². Pokud je použita rázová vlna fokusovaná je hustota energie nad 0,3 mJ/mm². S použitím se můžeme setkat například v těchto indikacích: bolesti pohybového aparátu, jako například tenisový nebo golfový loket, skokanské koleno, ostruhy kosti patní, bolesti páteře, bolestivá třísla, únavové zlomeniny, kostní přestavby, nebo chronický zánět tíhových váčků [8].

1.6.2.4 Permeabilizace buněk

Buňka je od svého okolí oddělena buněčnou membránou, kterou tvoří fosfolipidová dvojvrstva. Prostupnost membrány je řízena a je rozhodující pro přežití buněk. Pro lékařské aplikace je ale nutné někdy obejít kontrolní mechanismy tak, aby

bylo možné do buňky doručit vybrané molekuly, případně geny. V současné době existuje několik systému, jak doručit něco dovnitř buňky a volba systému pro doručení závisí na situaci. Mezi systémy fyzikální patří elektroporace a také optoporace. Lze ale také využít rázových vln, tato metoda se nazývá sonoporace. Ta je významná vzhledem k aplikaci *in vivo*. Ukázalo se, že pomocí litotryptoru je možné usnadnit přechod přes membránu buňky molekulám, které by za normálních okolností nebyly schopné přes membránu projít. Pro doručení léčiv by tak bylo možné využít postupy známé z litotrypse [33].

V experimentech se například ukázalo, že rázové vlny jsou schopny zlepšit účinek Cisplatiny. Pokud jsou buňky v nádobě, ve které je přetlak, tak je při působení rázových vln snížena propustnost membrán oproti situaci při normálním tlaku. To vede k závěru, že póry v membráně jsou způsobeny kavitacemi. Experimentálně bylo také ověřeno, že je možné doručit do nádorové buňky ribozomy inaktivující proteiny a snížit tak dávku podávaného léku až 40 000 krát [42]. Mohou být také přeneseny plazmidy velikosti několika megadaltonů, které kódují standardní enzymy jako například galaktosidasu nebo luciferázu.

Tohoto účinku na buněčné membrány, tedy sonoporace, by bylo možné využít ve spojení s chemoterapií. Co se týče *in vivo* terapie, tak se z provedených experimentů zdá, že rázová vlna má spíše účinek na mikrocirkulaci v nádoru. Dochází tak ke snížení perfuze. V současné době se pracuje na možném klinickém využití [31,32,41-43].

1.6.2.5 Další možné využití rázových vln

Experimentálně se rázová vlna používá i pro léčbu ischemické choroby srdeční. Bylo prokázáno, že rázové vlny s nižší energií než je tomu u litotrypse, navozují koronární angiogenezi a neovaskularizaci. Výsledky experimentů prokázaly, že u pacientů dochází ke zlepšení. Byly také provedeny klinické zkoušky zmíněné metody a to úspěšně [44-49].

Další oblastí medicíny, kde se rázových vln využívá je aplikace na erektilní disfunkce. Používá se zde také rázová vlna o nízké energii. Princip je podobný jako u

srdce. Jde o vyvolání neovaskularizace. V tomto případě byly provedeny experimenty s prvními pacienty a výsledek byl úspěšný [50-52].

RV mají také protizánětlivé účinky. Zde hraje významnou roli produkce NO v buňkách. RV, která se zde používá, má nízkou energii ($0,03 \text{ mJ/mm}^2$) [53]. Rázové vlny nacházejí uplatnění i ve veterinární medicíně a to při podobných obtížích jako u člověka.

1.7 Jednoduchá a tandemová rázová vlna

Rozdíl mezi jednoduchými a tandemovými rázovými vlnami je v tom, kolik rázových vln a v jakém časovém intervalu je aplikováno. U jednoduchých rázových vln je to vždy jedna vlna každou vteřinu až vteřinu a půl. Těchto vln se využívá v hlavně v litotrypsi, ale také v ortopedii či revmatologii. Jak už bylo uvedeno, pokud je interval kratší, přichází následující vlna do prostředí, ve kterém existují kavitace vytvořené první vlnou, což má za následek poškození tkáně. Tento účinek je však u litotrypse nežádoucí.

Jak víme, tak rázové vlny vytvářejí kavitace, které napomáhají fragmentaci konkrementu, ale také způsobují poškození tkáně. Existují generátory, které pracují s řízením kavitací. Jako slibný se zdá přístup, kdy první rázová vlna vytvoří kavitace a druhá vlna zintenzivní jejich kolaps, toto jsou tak zvané tandemové rázové vlny [54]. Tandemová rázová vlna je tedy schopna způsobit poškození v akusticky homogenní tkáni. První vlna, tím že generuje v místě ohniska vznik kavitací, vytvoří v ohnisku akustickou nehomogenitu a druhá rázová vlna potom v tomto místě interaguje s vytvořenou nehomogenitou a způsobuje tak poškození tkáně [57].

V *in vitro* i *in vivo* studiích se ukázalo, že tandemové rázové vlny zvyšují fragmentaci konkrementů. Ukázalo se také, že tandemové RV mají baktericidní účinek a jsou schopny destruovat buňky [55,57,58]. V neposlední řadě je možné tandemové rázové vlny využít pro doručení DNA do buněk [56].

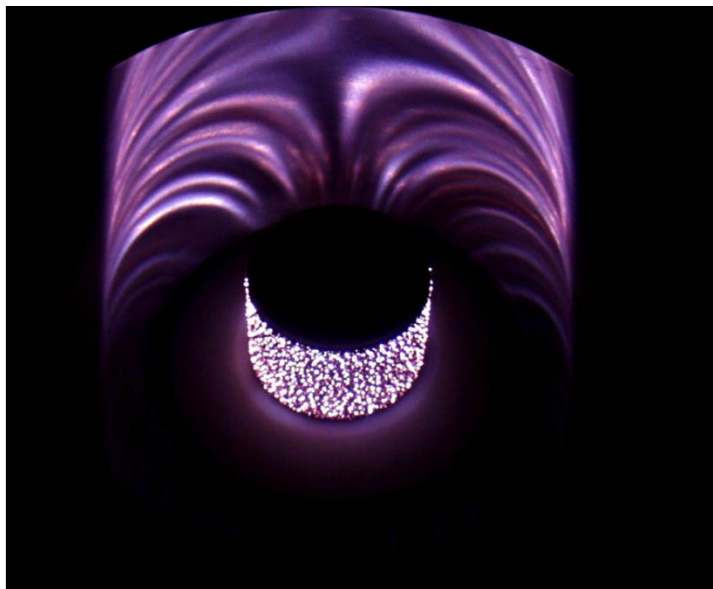
2 Cíle práce

Cílem této disertační práce je v teoretické části shrnout dosavadní poznatky z oblasti rázových vln a jejich využití v medicíně. A dále shrnout výsledky, které jsme dosáhli pomocí nového generátoru rázových vln. Ten je založen na principu mnohokanálového výboje. Výsledky jsou prezentovány v člancích, které jsou součástí této práce. Cílem práce byl také vývoj klinicky použitelného aplikátoru tandemových rázových vln.

3 Materiál a metody

3.1 Nový zdroj rázových vln

Tato práce je zaměřena na využití jednoduchých a tandemových rázových vln, které jsou generovány novým zdrojem, který je založen na principu mnohokanálového výboje. Tento způsob generování rázových vln byl zcela nově vyvinutý ve spolupráci s Ústavem fyziky plazmatu AV ČR. Při vývoji tohoto zdroje bylo využito poznatků získaných při výzkumu impulsních koronových výbojů, které byly na začátku určeny k čištění vody. Způsob jakým se vytváří objemový koronový výboj, je patentově chráněn [22, 59]. Princip generace rázové vlny spočívá v tom, že prostor mezi dvěma elektrodami je zaplněn kapalinou se zvýšenou elektrickou vodivostí. Na elektrodě, která má tvar požadované vlnoplochy, potom dochází po připojení impulzního napětí k mnohokanálovému výboji. Tento elektrický výboj hoří mezi elektrodou a kapalinou. Vytváří se tak jednotlivé kvazisférické tlakové vlny, jejichž superpozicí poté vznikne jedna mohutná tlaková vlna. Ta je dále fokusována pomocí reflektoru a během cesty do ohniska se transformuje na vlnu rázovou.



Obrázek 14. Kompozitní anoda v čase výboje.

K mnohokanálovému výboji, tak jak ho vidíme na obrázku 14, dochází na povrchu kompozitní anody. Jedná se o válec z nerezové oceli, která je pokryta tenkou vrstvou (0,2 – 0,5 mm) porézní keramiky s otevřenou pórovitostí 3-5 %. Druhou

elektrodu tvoří reflektor. Po připojení impulzního zdroje napětí na tuto elektrodovou soustavu jsou předvýbojové proudy soustředěny do jednotlivých pórů. Uvnitř těchto pórů vzniká elektrické pole s intenzitou blízkou k $E=U/r$, kde U je použité napětí a r je tloušťka keramické vrstvy. Při elektrických polích o velikosti intenzity $E \sim 0,5-1$ MV/cm dochází v pórech k iniciaci výboje. Díky použití kapaliny se zvýšenou vodivostí jsou výboje soustředěny v jednotlivých pórech izolační vrstvy.

U tohoto generátoru je možné ovlivňovat vlastnosti rázové vlny (amplitudu, časový průběh) a to nejen nastavením parametrů obvodu, jako jsou použité napětí, kapacita kondenzátorů, indukčnost obvodu, ale také nastavení vodivosti kapaliny. Díky tomu, že je výbojový proud rozdělen do mnoha pórů, je omezena eroze kompozitní anody. Tím je prodloužena její životnost. Na obrázku 15 vidíme kompozitní anodu spolu s reflektorem.



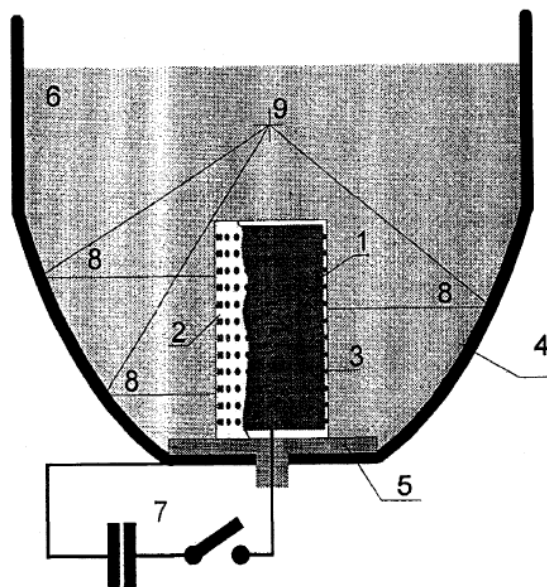
Obrázek 15. Kompozitní anoda s reflektorem.

Na obrázku 16 vidíme jedno z uspořádání generátoru. Skládá se z válcové elektrody (1). Ta je tvořena kovovým válcem pokrytým porézní keramikou (2). Elektroda je umístěna v ose kovového reflektoru (4). Reflektor má tvar části rotačního paraboloidu, který vznikne rotací paraboly kolem osy procházející ohniskem a kolmé k její ose. Od reflektoru je kompozitní anoda izolována izolátorem (5). Prostor mezi elektrodami (6) je zaplněn kapalinou se zvýšenou vodivostí, ta se většinou pohybuje kolem 18 mS/cm. Po připojení impulzního napětí 15-30 kV z impulzního zdroje (7) dochází k mnohokanálovému výboji. Ten vytvoří tlakovou vlnu tvaru válce (8), které se šíří směrem od kompozitní anody a je následně odražena reflektorem do ohniska (9).

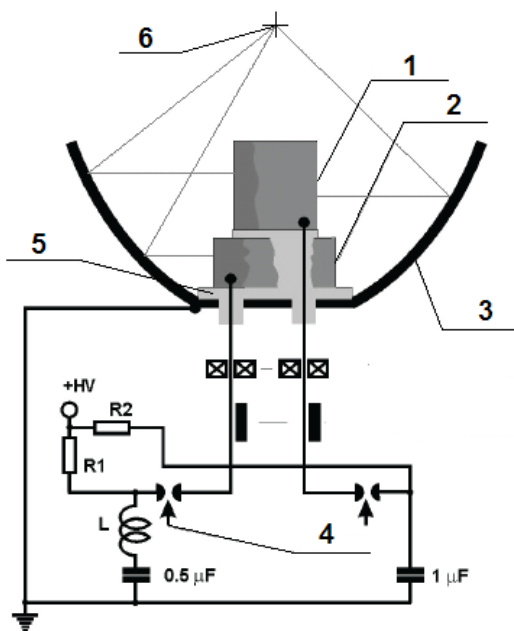
Obrázek 16. Schéma generátoru s jednou válcovou elektrodou

1-kompozitní anoda, 2-izolační vrstva, 3-otevřené póry, 4-reflektor, 5-izolátor, 6-prostor mezi elektrodami, 7-impulzní zdroj, 8-tlaková vlna, 9-ohnisko

(převzato z Zeman, J., 2011)



Generátor s jednou válcovou kompozitní elektrodou vytváří jednoduchou rázovou vlnu. Pro vytvoření tandemové rázové vlny slouží modifikovaná verze generátoru, jejíž schéma vidíme na obrázku 17.



Obrázek 17. Schéma generátoru rázových vln s rozdělenou válcovou kompozitní anodou. 1-část kompozitní anody s menším průměrem, 2-část kompozitní anody s větším průměrem, 3-reflektor, 4-jiskřiště, 5-izolátor, 6-ohnisko

V tomto případě se kompozitní anoda skládá ze dvou částí (1,2). Každá z částí kompozitní anody může být spínána zvlášť a díky tomu generovat tandemové rázové vlny s různým zpožděním mezi první a druhou vlnou. Časové zpoždění může být také dáno geometrií jednotlivých částí elektrody. To znamená, že pokud jsou obě části sepnuty současně, tak v důsledku rozdílných drah tlakových vln k ohnisku dochází ke konstantnímu zpoždění druhé rázové vlny a to o 5 μ s. V tomto případě je napájecí obvod jednodušší. Na obrázku 18 vidíme kompozitní anodu pro generování tandemové rázové vlny.



Obrázek 18. Kompozitní anoda pro generování tandemové rázové vlny bez reflektoru.

Pro jednoduchou rázovou vlnu generovanou výše popsaným zdrojem dosahují tlaky v ohnisku 372 MPa pozitivní a -17 MPa negativní. Při generování tandemových rázových vln dosahují tlaky druhé vlny v závislosti na geometrii až 100 MPa pozitivní a až – 80 MPa negativní. Ohnisko má v průměru 0,5 mm (na poloviční hodnotě tlaku).

4 Výsledky

Výsledky jsou prezentovány v podobě publikací s krátkým komentářem.

4.1 Jednoduché rázové vlny

ZEMAN, Jan., HACH, Jan, DIBDIAK, Lukáš., ŠUNKA, Pavel., LUKEŠ, Petr., HOFFER, Petr., SEDLÁČEK, Radek, KOCIOVÁ, Kamila. and BENEŠ, Jiří, 2012, Účinek rázové vlny na kostní cement a její potenciální využití v ortopedii. *Ortopedie*. 2012. Vol. 6, no. 3p. 100-102.

Tato práce je zaměřena na využití jednoduché rázové vlny v ortopedii. Je zde zkoumáno možné využití při reoperacích kloubních náhrad. V práci je použit nový zdroj rázových vln založený na principu mnohokanálového výboje. Pro generaci jednoduché rázové vlny je zvoleno uspořádání s jednou kompozitní anodou. Dále je použito 6 femurů miniprasete, ty jsou v párech. Z femuru byly odstraněny měkké tkáně a kostní dřev, byla odříznuta proximální a distální epifýza a kost byla naplněna kostním cementem, který se běžně používá k uchycení kloubních náhrad. Dále byly femury rozřezány na disky tak, že v páru zůstal vždy jeden z levého femuru a jeden z pravého femuru. Disky z jednoho z párových femurů byly poté vystaveny působení rázových vln a disky z druhého femuru sloužily jako kontrolní. Po aplikaci jednoduchých rázových vln, které byly fokusovány do místa styku cementu s kostí, bylo provedeno měření síly nutné k vytlačení cementu z kosti. Maximální velikost síly nutné k vytlačení cementu byla zaznamenána pro experimentální i pokusné vzorky a obě skupiny byly poté porovnány.

Výsledky ukázaly, že rozdíl mezi maximální silou nutnou k vytlačení cementu z kosti je u experimentální skupiny statisticky významně nižší oproti skupině kontrolní. Ukazuje se tak, že jednoduchou rázovou vlnu by bylo možné využít při reoperacích kloubních náhrad, pro zjednodušení extrakce cementu z kosti.

Účinek rázové vlny na kostní cement a její potenciální využití v ortopedii

The effect of shock wave on bone cement and its potential use in orthopaedics

Jan Zeman¹, Jan Hach², Lukáš Dibdiák¹, Pavel Šunka³, Petr Lukeš³, Petr Hoffer³, Radek Sedláček⁴, Kamila Kociová⁵, Jiří Beneš⁶

¹Ústav biofyziky a informatiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Salmovská 1, Praha 2, 120 00, tel.: 224 965 847, email: jan.zeman@lf1.cuni.cz

²Ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol

³Ústav fyziky plazmatu AV ČR, Praha

⁴Laboratoř biomechaniky člověka, Ústav mechaniky, biomechaniky a mechatroniky, Fakulta strojní, České vysoké učení technické v Praze

⁵Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta zdravotnických odborov

⁶IV. interní klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Souhrn:

Úvod: Obecně můžeme říci, že rázová vlna se vyznačuje prudkou změnou vlastností prostředí, kterým se šíří. V medicíně se rázová vlna používá již řadu let a její počátky jsou spojeny s léčbou konkrementů. Úspěchy, které byly dosaženy na poli dezintegrace konkrementů, vedly k úvahám o jiném využití rázových vln v medicíně. Dnes se například věnuje velká pozornost možnosti poškození nádorové tkáně účinkem rázových vln. Tato práce je věnována použití v ortopedii.

Metoda a materiál: Ke generování rázových vln byl použit nový zdroj, který byl vyvinut na Ústavu fyziky plazmatu AV ČR. Je založen na principu mnohokanálového výboje, ke kterému dochází na povrchu kompozitní anody. V experimentech byly zjišťovány účinky rázové vlny na spojení kostí a kostního cementu. Jednotlivé vzorky byly rázovány a poté byla měřena síla, která je nutná k vytlačení kostního cementu z kosti.

Výsledky: Byly porovnávány mezi sebou maximální síly naměřené u vzorků experimentálních a kontrolních. Z výsledků vyplývá, že síly nutné k vytlačení kostního cementu z experimentálního vzorku jsou v porovnání s kontrolními vzorky menší.

Diskuze: Z toho můžeme usuzovat, že rázová vlna dokáže narušit spojení kostí a kostního cementu. Tohoto efektu by šlo později využít při reoperacích totálních kloubních náhrad.

Klíčová slova: fokusovaná rázová vlna, výměna kyčelního kloubu, reoperace, kostní cement

Summary:

Introduction: It can be generally said that a shock wave is characterized by a sharp change in the properties of the environment through which it spreads. In medicine, shock waves have been used for many years and the origins of their application are associated with the treatment of concretions. The success that had been achieved in the field of stone disintegration encouraged further considerations in respect of other applications of shock waves in medicine. Currently, for example, much attention is given to the possibility of damaging tumour tissue by the effects of shock waves. This paper focuses upon orthopaedic applications.

Material and methods: A new source of generating shock waves, which was developed at the Institute of Plasma Physics, has been used. It is based on the principle of multichannel discharge which occurs on the surface of the composite anode. The effects of shock waves upon the connection between the bone and bone cement were studied in the experiments. Individual samples were treated by the shock wave and thereafter, the force necessary to displace bone cement from the bone was measured.

Results: The maximum forces established in experimental samples were compared to those measured in control samples. The results indicate that compared to control samples, the force necessary to displace bone cement from an experimental sample is smaller.

Conclusions: This suggests that the shock wave can influence the way the bone and bone cement connect. This effect could be later used in total joint replacements reoperations.

Key words: focused shock waves, hip joint replacement, reoperation, bone cement

Ortopedie 2012;6:100-102.

Úvod

V medicíně se rázová vlna začala využívat před více než 20 lety (6). Rázová vlna je vlna akustická, jejíž trvání se pohybuje v řádu mikrosekund. Prostředím se šíří jako jeden mohutný tlakový kmit. Nejprve

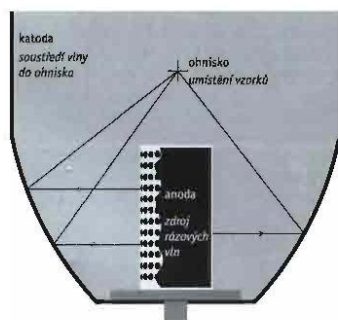
dochází k rychlému nárůstu pozitivního tlaku (k hodnotám kolem 100 MPa), který je následován negativní tlakovou půlvlnou (kolem 10 MPa) (4, 8). V medicíně se dnes rázová vlna běžně využívá k dezintegraci konkrementů (1, 2, 3).

V oblasti dezintegrace konkrementů bylo dosaženo výborných výsledků, což vyvolalo diskusi o dalším využití rázových vln v medicíně. Dnes se již běžně využívají k léčbě úponových bolestí, zkoumá se také možné použití v onkologii, ale tato práce je

věnována využití v ortopedii. V současné době je jednou z častých terapeutických metod v ortopedii implantace totální náhrady kloubu. Masové rozšíření této terapeutické metody vedlo ke zvýšení počtu revizních operací. Revizní operace představují pro pacienta jisté riziko. Právě extrakce cementového pláště dříku endoprotézy, který fixuje protézu, je obtížné a časově náročné. Naše práce se věnuje možnosti využít rázovou vlnu generovanou novým zdrojem, jako metodu usnadňující extrakci cementu při reoperacích (14). V práci byl využit nový zdroj rázových vln vyvinutý na Ústavu fyziky plazmatu AVČR. Ten je založen na principu mnohokanálového výboje, ke kterému dochází na kompozitní elektrodě. Ta je umístěna v silně vodivé vodě a po připojení impulzního napětí dochází k vytvoření velkého množství výbojových kanálů, které jsou rozloženy na povrchu celé elektrody (9, 11, 12, 13). V práci byl zkoumán účinek jednoduché rázové vlny generované novým zdrojem na spojení kosti a kostního cementu *in vitro*.

Metoda a materiál

Ke generaci rázových vln byl použit nový zdroj, který je založen na principu mnohokanálového výboje na povrchu kompozitní anody. Schéma generátoru je na obrázku 1. Na cylindrickou kompozitní anodu, která je vyrobena z nerezové oceli, je za pomoci metody plazmového stříkání nanášena tenká vrstva ($d = 0,2-0,3$ mm) porézní keramiky. Celé zařízení k aplikaci rázových vln je rozděleno na dvě části, které jsou od sebe odděleny akusticky transparentní membránou. První část je naplněna vysoce vodivým solným roztokem (s vodivosti 5–20 mS/cm), ve kterém je umístěna kompozitní anoda. Kompozitní anoda leží v ose reflektoru tvaru rotačního

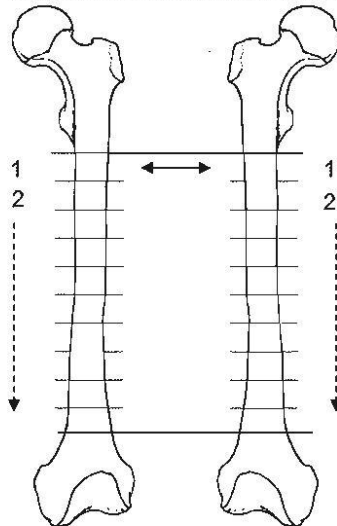


Obr. 1 Zdroj rázových vln

paraboloиду, který tvoří katodu. V druhé části zařízení se nachází ohnisko, do kterého jsou rázové vlny soustředěny. Druhá část je naplněna odplyněnou vodou. Kompozitní anoda je konstruována tak, že umožňuje současně generovat velký počet výbojových kanálů. Výbojové kanály jsou na anodě homogenně rozloženy a každý z nich vytváří kvazisférickou tlakovou vlnu. Superpozicí těchto jednotlivých vln vzniká válcová tlaková vlna. Tlaková vlna se odráží od reflektoru do ohniska a blízko ohniska se transformuje na vlnu rázovou.

V experimentu bylo použito celkem 6 femurů miniprasat (linie MeLiM). Femury byly odebrány z pravé i levé končetiny a byly ponechány v párech tak, že jeden z femurů byl užít k experimentům a druhý sloužil pro porovnání jako kontrolní. Po odebrání byly zbaveny měkkých tkání a následně byla odstraněna proximální a distální epifyza. Poté byla odstraněna kostní dřevina, kost byla naplněna kostním cementem (Refobacin Bone cement R) a po vytvrdnutí cementu rozřezána na 7 mm vysoké disky, jak je schematicky vidět na obrázku 2. Kost byla napeřena tak, že si vždy v páru odpovídaly dva disky z pravého a levého femuru. Z šesti femurů bylo získáno 22 vzorků kontrolních a 22 vzorků pokusných.

Připravené pokusné vzorky byly exponovány rázovou vlnou. Rázová vlna byla aplikována z boku tak, že procházela nejprve pevnou částí kosti a ohnisko rázových vln se nacházelo na rozhraní kosti a kostního



Obr. 2 Příprava vzorků

cementu. Celkem bylo aplikováno 200 jednoduchých rázových vln na každý pokusný vzorek. Kontrolní vzorky zůstaly bez ošetření.

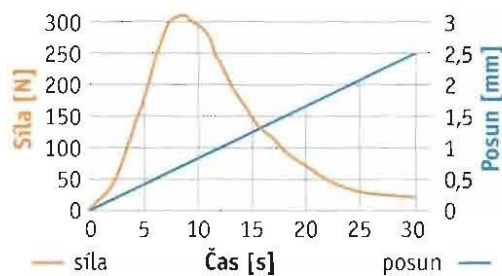
Po aplikaci rázových vln byla měřena síla nutná k vytlačení kostního cementu z kosti. Nejprve byl vypočítán obsah plochy kostního cementu z obou stran každého disku tak, aby při měření síly bylo tlačeno vždy na plochu s menším obsahem. Měření síly probíhalo na měřicím přístroji MTS 858.2 Mini Bionix v Laboratoři biomechaniky člověka (LBČ) ČVUT v Praze. Vzorek byl umístěn na kovovou podložku s kruhovým otvorem. Velikost kruhového otvoru odpovídala velikosti plochy kostního cementu a samotná disk se nacházela na podložce tak, aby se o ni při zatěžování opírala v celém svém průřezu. Následně byl pomocí kovového válečku vytlačován kostní cement. Rychlost posuvu hlavy měřicího přístroje byla konstantní, a to 5 mm/min. Měření probíhalo až do uvolnění kostního cementu. Zaznamenaný byl časový průběh síly a posuvu tlačného válečku. Vyhodnocena byla maximální síla nutná k vytlačení kostního cementu z kosti.

Výsledky

V experimentu byl sledován účinek rázové vlny generované novým zdrojem na spojení kosti a kostního cementu. Aplikace rázových vln proběhla v pořádku. Po aplikaci byla měřena maximální síla nutná k vytlačení cementu z kosti. Na grafu 1 lze vidět typický průběh vytlačování cementu z kosti u jednoho vybraného vzorku. Nejprve dochází k nárůstu síly v čase až do chvíle, kdy dojde k uvolnění cementu. Poté velikost síly klesá (oranžová křivka). Modrá křivka ukazuje průběh velikosti posuvu přístroje v čase. Tato hodnota byla nastavena na konstantní velikost. Maximální hodnota síly byla následně vyhodnocována.

V tabulce 1 vidíme průměrnou maximální sílu u kontrolních a pokusných vzorků spolu s jejich střední chybou průměru. Je zřejmé, že hodnoty síly u pokusných vzorků jsou nižší než u vzorků kontrolních. V tabulce 1 je zahrnuta i celková průměrná hodnota a střední chyba průměru u obou skupin. Porovnáme-li obě skupiny jako celek, můžeme říci, že celková hodnota maximální síly je u pokusné skupiny nižší než u kontrolní.

V grafu 2 lze zhlédnout porovnání průměrné maximální síly ve skupině kontrolní a pokusné. Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny, byla použita metoda 2-way ANOVA s jedním faktorem fixním



Graf 1 Průběh síly v čase při vytlačování kostního cementu u vybraného vzorku

Číslo vzorku	Max. síla kontrolní [N]	SEM	Max. síla pokusné [N]	SEM
1.	293,6	± 53,6	176,2	± 30,6
2.	478,7	± 77,2	272,8	± 131,5
3.	613,2	± 184,6	105,1	± 12,0
4.	547,6	± 199,4	137,6	± 18,2
5.	445,4	± 116,9	190,7	± 62,6
6.	398,6	± 86,1	124,8	± 61,6
7.	399,9	± 107,6	207,7	± 96,4
8.	584,1	± 82,0	227,4	± 106,1
Celkem	463,2	± 117,5	175,3	± 69,71

Tab. 1 Průměrné hodnoty maximální síly v jednotlivých skupinách

(kontrolní × pokusné) a jedním faktorem opakování. Bylo zjištěno, že rozdíl mezi skupinou kontrolní a pokusnou je statisticky významný ($p = 0,2531$; $\alpha = 0,05$).

Při vytlačování kostního cementu došlo u několika vzorků k rozlomení kosti. Bylo to s největší pravděpodobností způsobeno nerovnoměrným tlakem na stěny kosti v důsledku nesymetrického tvaru vnitřní stěny kosti.

Diskuze

V experimentu byl sledován účinek rázové vlny generované novým zdrojem na spojení kosti a kostního cementu. Byly použity prasečí femury. Po aplikaci rázových vln byla měřena síla nutná k vytlačení kostního cementu z kosti. Maximální hodnoty síly byly dále vyhodnoceny. Pokud porovnáme jednotlivé pokusné vzorky s jim odpovídajícími kontrolními vzorky z druhého párového femuru, výsledky ukazují, že síla potřebná k vytlačení cementu je u pokusných vzorků nižší. Pokud porovnáme průměr síly ve skupině kontrolní a ve skupině pokusné, je vidět, že síla nutná k vytlačení cementu je opět nižší. Rozdíl mezi skupinami je statisticky významný. Z toho tedy vyplývá, že rázová vlna generovaná novým zdrojem je schopna poškodit spojení kosti a kostního cementu. Tyto výsledky potvrzují již dříve

účinnější, jak potvrzují dříve provedené testy. V případě výše popsaného experimentu se jedná o předběžnou studii s použitím nového přístupu v podobě nového zdroje. Přináší však nadějně výsledky.

Závěr

Jak ukazují výsledky provedeného experimentu, rázová vlna generovaná novým zdrojem je schopna poškodit spojení kosti a kostního cementu. Tohoto účinku by šlo později využít při reoperacích kloubních náhrad. Terapie rázovou vlnou by usnadnila extrakci kostního cementu. Snížilo by se tak riziko, které při tomto druhu výkonu pacientovi hrozí. Vzhledem k tomu, že jsou zde prezentovány výsledky předběžného experimentu, bude nutné výsledky dále doplnit a zodpovědět řadu otázek.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky, projekt č. GA202/09/1151 a MSM 0021620808.

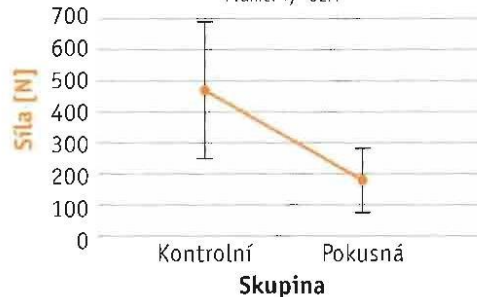
Literatura

1. Beneš J. Zavedení nového litotriptomu do klinické praxe a neobvyklé aplikace rázových vln. Habilitační práce. Praha: Univerzita Karlova 1. lékařská fakulta; 2000:146.
2. Beneš J, Sunka P, Kordač V, Jirsa M, Štuka C, Mirejovský P. Preclinical verification of possible extracorporeal lithotripsy of gall stones

Maximální síla ve skupinách

Current effect: $F(1,2)=38,023$; $p=0,02531$

Průměr +/- SEM



Graf 2 Průměrná maximální síla ve skupinách

in experimental animals. Sborník lékařský 1987;89:129-133.

3. Beneš J, Štuka C, Chmel J, et al. First experience with a Czechoslovak device for the treatment of renal concretions by lithotripsy with shock waves (in Czech). Prakt Lék 1989;69:884-887.

4. Delius M. Twenty Years of Shock Wave Research at the Institute for Surgical Research. European Surgical Research 2002;34:30-36.

5. Hach J, Benes J, Bani Hani A, Sosna A, Šunka P. Působení ultrazvukové rázové vlny na spojení kostního cementu s kostí. Acta Chir Orthop Traum Cech 2001;68:300-303.

6. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. J Urol 1982;127:417-420.

7. Lewis G. Effect Of Lithotripter Treatment On The Fracture-Toughness Of Acrylic Bone-Cement. Biomaterials 1992;13:225-229.

8. Shrivastava SK, Kailash. Shock wave treatment in medicine. Journal of Biosciences 2005;30:269-275.

9. Stelmashuk V, Sunka P. Mutual interaction of two shock waves with a different time delay. Czechoslovak Journal of Physics 2006;56B:396-400.

10. Stranne SK, Callaghan JJ, Cocks FH, Weinerth JL, Seaber AV, Myers BS. Would revision arthroplasty be facilitated by extracorporeal shock-wave lithotripsy - an evaluation including whole bone strength in dogs. Clin Orthop Relat Res 1993;287:252-258.

11. Sunka P, Babický V, Clupek M, et al. Potential applications of pulse electrical discharges in water. Acta Physica Slovaca 2004;54:135-145.

12. Sunka P, Babický V. Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Česká republika. Patentový spis 2002-08-14.

13. Sunka P, Babický V. Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Česká republika. Patentový spis 1997-08-13.

14. Weinstein JN, Oster DM, Park JB, Park SH, Loening S. The effect of the extracorporeal shock-wave lithotripter on the bone-cement interface in dogs. Clin Orthop Relat Res 1988;235:261-267.

ZEMAN, Jan, Jan HACH, Wioletta MIKULAKOVÁ, Ľubica DERŇAROVÁ, Anna ELIÁŠOVÁ, Petr LUKEŠ, Lenka BALÁŽOVÁ a Jiří BENEŠ. A Model of the Action of the Shockwave Generated by a Multichannel Discharge on the Union of Bone Tissue with Bone Cement. In Vivo. 2016,30(3), 237-242.

Tato práce je stejně jako předchozí zaměřena na využití jednoduché rázové vlny v ortopedii, pro zjednodušení extrakce kostního cementu z kosti. Jedná se o rozšíření předchozího experimentu. Je zde použit stejný zdroj a také femury miniprasat. Femurů je v tomto případě 16 a jsou v párech vždy levý a pravý. Jsou zbaveny měkkých tkání a kostní dřevě a naplněny kostním cementem. Rozřezány byly na 7 mm silné disky a označeny tak, aby bylo možné proti sobě porovnávat párové femury. Celkem bylo použito 64 experimentálních a 64 kontrolních. Aplikováno bylo u experimentální skupiny celkem 200 jednoduchých rázových vln. Následně byla měřena maximální síla nutná k vytlačení cementu z kosti a výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou.

Bylo zjištěno, že u experimentální skupiny je maximální síla nutná k vytlačení statisticky významně menší než u skupiny kontrolní. Výsledky tak podporují dříve provedené experimenty jiných autorů.

A Model of the Action of the Shockwave Generated by a Multichannel Discharge on the Union of Bone Tissue with Bone Cement

JAN ZEMAN¹, JAN HACH^{2,3}, WIOLETTA MIKULAKOVÁ^{2,3}, LUBICA DERŇAROVÁ⁵, ANNA ELIÁŠOVÁ⁵, PETR LUKEŠ⁶, LENKA BALÁŽOVÁ¹ and JIŘÍ BENEŠ¹

¹Institute of Biophysics and Informatics, and ²First Department of Orthopaedics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic;

³Motol University Hospital, Prague, Czech Republic;

Departments of ⁴Physiotherapy and ⁵Nursing, Faculty of Health Care, University of Presov, Prešov, Slovakia;

⁶Institute of Plasma Physics AS CR, Prague, Czech Republic

Abstract. *Background:* In reoperation of femoral prostheses, there is a higher percentage of complications associated with the extraction of bone cement from the femoral channel, which is technically and time consumingly tedious. Shockwaves have been used in medicine for years, particularly in urology for the destruction of concretions and orthopaedics, as a method of treating pain in patients with calcifying enthesopathy. *Materials and Methods:* We studied the use of shockwaves generated by a new source based on the multichannel discharge principle in facilitating extraction of bone cement. Femurs of experimental minipigs were chosen as models. We implanted bone cement into the femoral channel and subsequently applied shockwaves. We then measured the force necessary to extract bone cement. *Results:* The results indicate that the force necessary for extracting cement was consistently statistically significantly lower in the group treated with multichannel discharge shockwaves compared to that for the controls.

The shockwave is a therapeutic modality currently used in different areas of medicine. In general, shockwaves are characterized by a violent change in pressure, which subsequently causes changes in characteristics of the medium through which it is propagated. In medical applications, this is the case of an acoustic shockwave such as in ultrasound, which is a case of mechanical wave motion. The ultrasonic

wave consists of positive and negative, periodically repeated pressure waves. The negative part of the pressure wave can be responsible for undesirable effects of ultrasound, including the production of cavitations, which originate when exceeding the cavitation threshold. A shockwave differs from ultrasonic wave motion in that it propagates through the medium as one powerful pressure oscillation and consists of an initial sharp increase in positive pressure followed by a negative pressure half-wave (1-3). In medicine, shockwaves have been used for years for the disintegration of concretions in the urinary tract, biliary tract, pancreas or salivary glands. Its use in orthopaedics was recently introduced as an alternative to surgical intervention in the treatment of calcifying tendinitis and enthesopathy (4, 5), or as transloc osteotomy in the treatment of vital pseudoarthrosis, where the success of such therapy is comparable to that of surgical treatment (4, 6-12).

In the present work, a new source of shockwaves, developed at the Institute of Plasma Physics, Czech Academy of Sciences, was used. It is based on the principle of the discharge of a multichannel charge at a composite anode. The anode is placed in high-conductivity water and after application of a pulsed voltage, a great number of discharge channels are produced, that are distributed on the surface of the whole electrode (13-16).

The effect of a simple shockwave generated by this new source at the bone-cement interface *in vitro* was studied as a method of facilitating the extraction of the cement mantle of the shank of hip joint endoprostheses. This stage of the operation is mostly very difficult in revision of the femoral prosthesis and even experienced and skilful surgeons are not always able to avoid complications; the time-consuming nature of cement extraction, greatly contributing to the duration of the surgical intervention, cannot be disregarded.

Correspondence to: Jan Zeman, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Biophysics and Informatics, Salmovská 1, Praha 2, 120 00, Czech Republic. Tel: +420 224965852, Fax: +420 224965843, e-mail: jan.zeman@lf1.cuni.cz

Key Words: Shockwave, surgical revision, bone cement extractions.

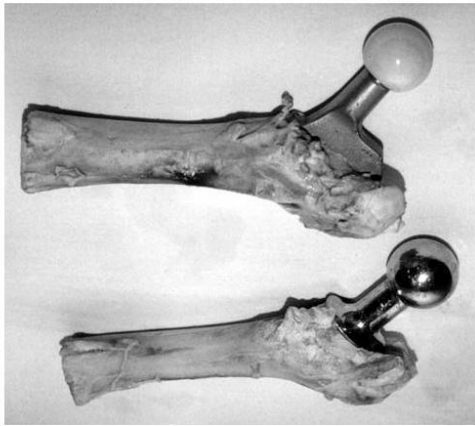


Figure 1. Surgically incorporated shanks of hip joint endoprostheses. Previously implemented experiments - sample of models.

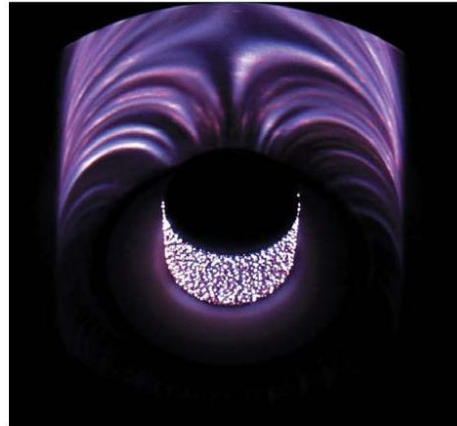


Figure 3. Anode at the time of the discharge showing a high number of discharge channels generated simultaneously.

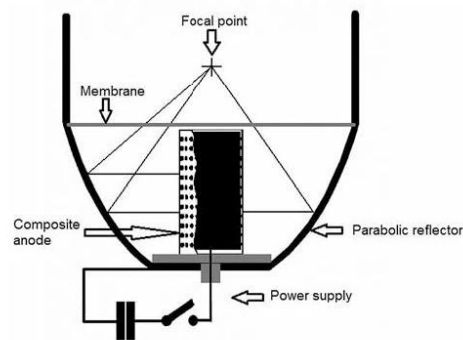


Figure 2. Generator scheme.

Any reduction of this stage of the surgery would be beneficial to the patient as well as the surgeon.

Our work was motivated by previously implemented experiments in which the extraction of the whole cemented mantle of the shank incorporated into the femur was performed (Figure 1). After the application of shockwaves, all the samples were loosened.

Materials and Methods

Shockwave generator. A new source was used for shockwave generation based on the principle of a multichannel discharge over a composite anode surface. See Figure 2 for the generator scheme.

A thin layer ($d=0.2-0.3$ mm) of porous ceramic material is deposited onto a cylinder made of stainless steel by the plasma spraying technique to produce a composite anode. The equipment used for shockwave application comprise of two parts, separated from each other by an acoustically transparent membrane. The first part contains a high-conductivity salt solution (specific conductivity of 5-20 mS/cm) in which the composite anode is placed. The composite anode is on the axle of a reflector in the shape of rotational paraboloid, which serves as a cathode. The composite anode is designed in such a way that it makes it possible to generate a high number of discharge channels simultaneously (Figure 3). The discharge channels are homogeneously distributed over the anode and each of them produces a quasispherical pressure wave. By superposition of these waves, a cylindrical pressure wave is obtained. The pressure wave is reflected from the reflector to the focus, and close to the focus, it is transformed into a shockwave. The shockwaves produced are concentrated to a focal point in the second part of the instrument, which contains degassed water.

Utilisation of shockwaves. In the experiment, 16 minipig (line MeLiM, IAPG AS CR, v. v. i., Liběchov, Czech Republic) femurs were used. The femurs were taken from the right as well as left limb, and kept in pairs in such a way that one of the femurs was used for experiments and the second served for comparison as a control. The femurs were made free from soft tissues and the proximal and distal epiphyses were removed (Figure 4). The bone marrow was then removed, and the bone was filled with bone cement (Refobacin Bone cement R, AAP Biomaterials GmbH & Co. KG, Dieburg, Germany). After the cement had hardened, each femur was cut into 7-mm-thick disks as schematically shown in Figure 5. The bone was cut in such a way that each pair comprised two disks from the right and left femur, respectively. A total 64 controls and 64 experimental disk samples were obtained from 16 femurs in this way.



Figure 4. A pair of femurs after removal of proximal and distal epiphyses.

The prepared experimental samples were exposed to shockwaves (voltage 21 kV, positive pressure of 372 MPa with a phase duration of 1.5 μ s, negative pressure of -17 MPa with a duration of 2 μ s). The shockwave was applied from the side in such a way that it passed first through the solid part of the bone, the focus of the shock wave being at the bone-cement interface. A total of 200 simple shockwaves (one per second) were applied to each experimental sample. Control samples remained without treatment.

After shockwave application, the force necessary for removing the bone cement from the bone was measured. The area of the bone cement on both sides of each disk was calculated so that when measuring the force, the pressure was always applied to the smaller area. Force measurement was carried out on an MTZS 858.2 Mini Bionix instrument (MTS Systems Corporation, Eden Prairie, MI, USA) at the Laboratory of Human Biomechanics, Czech Technical University in Prague. The sample was placed on a metallic plate with a circular opening. The size of the circular opening corresponded to the size of the bone cement area and the bone itself was placed on the plate in such a way that it was supported throughout its whole cross-section in the course of the loading process. The bone cement was then extracted with the help of a metallic cylinder. The rate of shift of the measuring instrument head was constant at 5 mm/min. The measurement was performed until the bone cement was loosened. The time course of the force and metallic cylinder shift was recorded. The maximum force necessary for extracting the bone cement from the bone was evaluated.

Results

In the experiment, the effect of the shockwave generated by the new source on the union of the bone with the bone cement was studied. Figure 6 shows one of the samples from the experimental group after shockwave application. In the Figure, there is obvious destruction of the union between the bone and bone cement. After the shockwave application, the force used for extraction was measured over time and the maximum force necessary for extracting the cement from the bone was measured. Figure 7 shows the typical course of extracting

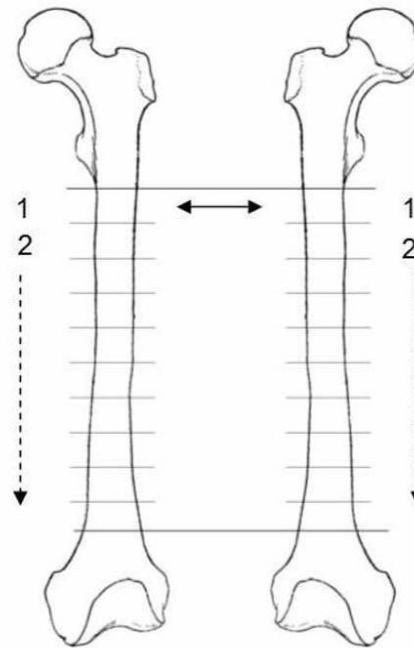


Figure 5. Sample preparation.

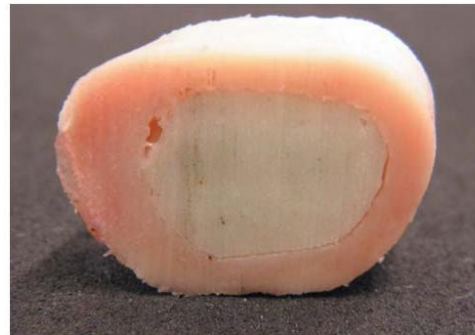


Figure 6. A sample of femur after shockwave application.

cement from the bone exemplified by a selected sample. There was first an increase in the force with time until the moment of cement loosening. After that, the force required decreases (blue curve). The grey curve shows the course of the

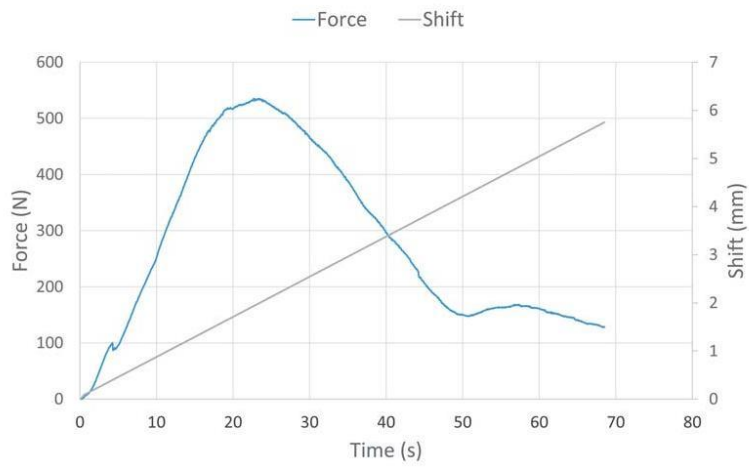


Figure 7. Time course of force required over time during extraction of bone cement in a selected femoral sample.

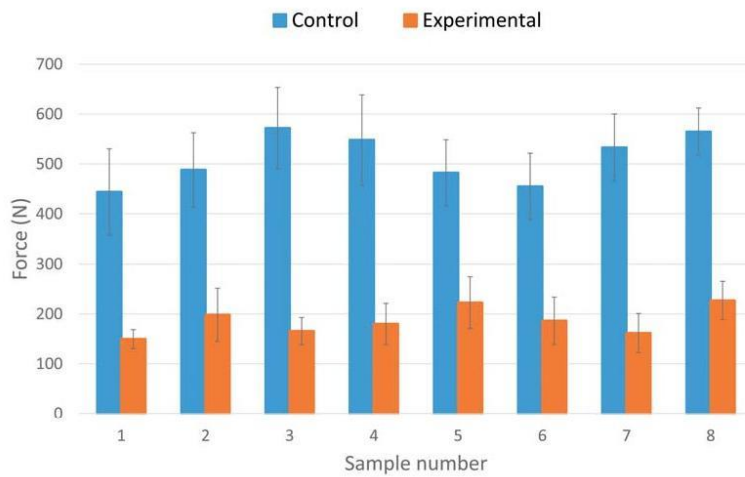


Figure 8. The mean maximum force required for extraction of bone cement for each group. Error bars are the standard error of the mean.

instrument shift over time. This value was set to a constant magnitude. After the evaluation, the maximum force used, at which the cement was loosened from the bone, was recorded.

Table I summarizes the average maximum force necessary for extracting cement from the bone calculated for pairs of femurs, together with the mean error of the average. This

was an average of values measured for eight samples prepared from the same femur. The force required in samples treated with shockwaves are clearly lower compared to control samples. The comparison of pairs (control and experimental) femurs can also be seen in Figure 8. Table I also includes the total average value and standard error of

Table I. Mean values of the maximum force for each femur for each group.

Femur number	Maximum force applied (N)			
	Control		Experimental	
	Mean	SEM	Mean	SEM
1	443.9	86.61	149.4	18.94
2	488.1	74.61	198.2	53.52
3	571.9	81.80	165.6	27.20
4	548.0	90.68	179.9	41.26
5	482.2	66.19	222.7	51.91
6	454.9	66.66	186.2	47.50
7	532.8	67.41	161.5	39.43
8	564.7	47.48	226.9	38.61
Overall	510.8	25.30	186.3	14.17

SEM: Standard error of the mean.

the mean for both groups. When comparing both groups as a whole, it is clear that the total maximum force is lower in the experimental group compared to the controls.

The values measured were statistically evaluated with the use of Student's paired *t*-test. The difference between controls and experimental group in the maximum force necessary for extracting cement from the bone was statistically significant ($p < 0.05$).

Discussion

The experiment aimed to investigate a new source of shock waves and its effects on the union of the bone with the bone cement. Pig femurs were used for the experiments, that were divided into experimental and control groups, and were also cut to obtain eight samples from each. In the experimental group, a simple shockwave was applied, and the maximum magnitude of the force necessary to extract bone cement from the bone was subsequently measured in both groups. The magnitudes of the force were subsequently evaluated and compared. In the comparison of the paired femurs, the results indicate that the force necessary for extracting cement was consistently lower in the experimental group compared to the controls. In comparison of the groups as whole, the force required in the experimental group was statistically significantly lower compared to that for the controls.

The method used does not make it possible to produce model-identical samples. If the results differ by orders of magnitude, then the error resulting from the non-homogeneity is compensated for due to the fact that the model represents the closest biological approximation to a realistic clinical situation. We tried to restrict the biological non-homogeneity by making a great number of

measurements and by repeating, where possible, to compare particular measurement and their changes (17-20).

Therefore, the shockwave generated by the new source is capable of considerable destruction of the union between the bone and bone cement. The results support the formerly performed experiments published by others (17, 20, 21-23). In the present experiment, a new shockwave source was used which generates the shockwave with the help of a multichannel discharge over a composite anode. The previously performed tests of this source demonstrated that it is more effective compared to common commercially used shockwave sources (14-16, 28). This was a preliminary study with the use of a new approach in the form of the new source, however, it offers promising results.

There is still a question regarding the efficacy of the method in loosening the whole cemented mantle of the endoprosthesis shank, particularly in the distal part, where the contact of the cement with the cortical bone is also of importance. The cemented shank mantle is also mostly macroscopically uneven, which can mechanically prevent the extraction of the whole cement block. The mechanical damage to the cement itself is rather advantageous in this case and the literature reports that the reduction in cement strength is not very considerable after exposure to shockwaves (23-25). The effect a shockwave should have on a true implant-cement-bone complex, whose characteristics are undoubtedly different from the samples studied here, is obvious from the easy cement extraction and will be perhaps be even more considerable compared to our model consisting of the bone and cement themselves. In this context, it is also necessary to take into account the presence of the intermediate fibrous layer, which is stepwise formed around the cement and can thus also act as an acoustic interface. Of course, our samples did not contain this layer.

As far as risks associated with the use of shockwaves in this indication are concerned, there is a risk of cortical bone fracturing around the total endoprosthesis shank (not mentioned in the literature) on the one hand, and also an increase in the pressure in the bone marrow cavity of the femur, with a consequent risk of fat embolism (for which reports are controversial) (26, 27) on the other. In our opinion, the increase in pressure is comparable to the effect of rasping the femur channel and subsequent application of the bone cement.

Conclusion

The shockwave generated by the new source is able to destroy the union between the bone and bone cement considerably. This effect would be suitable for femoral prosthesis reoperation where the extraction of the cement from the bone cavity poses problems. The application of such shockwaves could facilitate cement extraction, thus

reducing the risk by which the patients are endangered in this type of surgery. The application of these shockwaves is a non-invasive method, which poses less stress for the patient. However, these are results of preliminary experiments and it will be necessary to perform further experiments before applying this method in clinical practice.

References

- 1 Mornstein V: Ultrasound in biology and medicine. *Vesmír* 74: 566, 1995.
- 2 Wilbert DM: A comparative review of extracorporeal shock wave generation. *BJU-Int* 90: 507-511, 2002.
- 3 Coleman AJ and Saunders JE: A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. *Ultrasonics* 31: 75-89, 1993.
- 4 Haupt G: Stosswellen in der Orthopädie. *Der Urologe A* 36: 233-238, 1997.
- 5 Loew M, Jurgowski W, Mau HC and Thomsen M: Treatment of calcifying tendinitis of rotator cuff by extracorporeal shock waves: a preliminary report. *J Shoulder Elbow Surg* 4: 101-106, 1995.
- 6 Rompe JD, Eysel P, Hopf C, Vogel J and Kullmer K: Extrakorporale Stosswellenapplikation bei gestörter Knochenheilung. Eine kritische Bestandsaufnahme. *Unfallchirurg* 100: 845-849, 1997.
- 7 Vogel J, Hopf C, Eysel P and Pompe JD: Application of extracorporeal shock-waves in the treatment of pseudoarthrosis of the lower extremity. Preliminary results. *Arch Orthop Trauma Surg* 116: 480-483, 1997.
- 8 Valchanou VD and Michailov P: HESW in the treatment of delayed- and nonunion of fractures. *Int Orthop* 15: 181-184, 1991.
- 9 Schleberger R and Senge T: Non-invasive treatment of long-bone pseudoarthrosis by shock waves. *Arch Orthop Trauma Surg* 111: 224-227, 1992.
- 10 Heindrichs W, Witzsch U and Burger RA: Extrakorporale Stosswellentherapie von Pseudoarthrosen. Eine neue Indikation für Regionalanästhesien. *Anaesthesist* 42: 361-364, 1993.
- 11 Delius M: Biologische Wirkung der Stosswellen- mehr als "nur" Steinertrümmerung? *Zentralbl Chir* 120: 259-273, 1995.
- 12 Kuner EH, Berwarth H and Lucke SW: Behandlungsprinzipien bei aseptischen Pseudoarthrosen. *Orthopäde* 25: 394-404, 1996.
- 13 Stelmashuk V and Šunka P: Mutual interaction of two shock waves with a different time delay. *Czechoslovak Journal of Physics* 56: B396-B400, 2006.
- 14 Sunka P, Babicky V, Clupek M, Fuciman M, Lukes P and Simek M: Potential applications of pulse electrical discharges in water. *Acta physica Slovaca* 54: 135-145, 2004.
- 15 Sunka P and Babicky V: Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Czech Republic. A patent 2002-08-14. .
- 16 Sunka P and Babicky V: Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Czech Republic. A patent 1997-08-13.
- 17 Stranne SK, Callaghan JJ, Cocks FH, Weinerth JL, Seaber AV and Myers BS: Would revision arthroplasty be facilitated by extracorporeal shock wave lithotripsy? An evaluation including whole bone strength in dogs. *Clin Orthop* 287: 252-258, 1993.
- 18 Kim JK, Park JB, Weinstein JN, Marsh JL, Kim YS and Loening SA: Effect of shock wave treatment on femoral prosthesis and cement removal. *Biomed Mater Eng* 4: 451-461, 1994.
- 19 Karpman RR, Magee FP, Gruen TW and Mobley T: The lithotripter and its potential use in the revision of THA. *Orthop Rev* 16: 38-42, 1987.
- 20 Weinstein JN, Oster DM, Park JB, Park SH and Loening S: The effect of the ESWL on the bone-cement interface in dogs. *Clin Orthop* 235: 261-267, 1988.
- 21 Delius M: Twenty years of shock wave research at the Institute for Surgical Research. *European Surgical Research* 34: 30-36, 2002.
- 22 Hach J, Benes J, Bani Hani A, Sosna A and Sunka P: Působení ultrazvukové rázové vlny na spojení kostního cementu s kostí. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae slovacica* 68: 300-303, 2001.
- 23 Lewis G: Effect of lithotripter treatment on the fracture-toughness of acrylic bone-cement. *Biomaterials* 13: 225-229, 1992.
- 24 Schreurs BW, Bierkens AF, Huiskes R, Hendriks AJ and Slooff TJ: The effect of the extracorporeal shock wave lithotripter on bone cement. *J Biomed Mater Res* 25: 157-164, 1991.
- 25 May TC, Krause WR, Preslar AJ, Smith MJ, Beaudoin AJ and Cardea JA: Use of high-energy shock waves for bone cement removal. *J Arthroplasty* 5: 19-27, 1990.
- 26 Porsch M, Schmidt J, Brimmers P, Menne A and Merkle W: Intrafemorale Druckmessung bei unterschiedlichen Zemententfernungsverfahren bei Hüftendoprothesenschaftwechseloperationen- Experimentelle Studie an Leichenfemora. *Biomed Tech* 43: 53-57, 1998.
- 27 Braun W, Claes L, Ruter A and Paschke D: Untersuchungen zur Wirksamkeit von Stosswellen auf die Festigkeit des Verbundes von Knochen und Polymethyl-Methacrylat. Eine *in vitro* Studie an menschlichen Femursegmenten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 130: 236-243, 1992.
- 28 Lukes P, Zeman J, Horak V, Hoffer P, Pouckova P, Holubova M, Hosseini SHR, Akiyama H, Sunka P and Benes J: *In vivo* effects of focused shock waves on tumor tissue visualized by fluorescence staining techniques. *Bioelectrochemistry* 103: 103-110, 2015.

Received January 15, 2016

Revised March 4, 2016

Accepted March 15, 2016

LUKES, Petr, Jan ZEMAN, Vratislav HORAK, et al. In vivo effects of focused shock waves on tumor tissue visualized by fluorescence staining techniques. Bioelectrochemistry [online]. 2015, 103, 103-110

V této práci byl zkoumán účinek jednoduchých rázových vln generovaných novým zdrojem na nádorovou tkáň *in vivo*. Jednalo se o syngenní sarkom. Účinky byly sledovány jak makroskopicky, tak pomocí TUNEL techniky, imunohistochemické detekce kapsázy-3 a barvením hematoxylin-eosinem. V experimentu bylo použito osm potkanů, kterým byly inokulovány podkožně buňky sarkomu do pravého a levého stehna. Potkani byli poté ošetřeni jednoduchými rázovými vlnami. U každého potkana byl působení rázových vln vystaven vždy jeden z nádorů, druhý sloužil jako kontrolní. Celkem bylo aplikováno 600 jednoduchých RV.

Makroskopicky bylo pozorovatelné u ošetřeného nádoru mírné kruhové poškození kůže pokrývající nádor. V místě vstupu rázové vlny do nádoru byl pozorován hematoma. Kromě toho byl zřejmý homogenní rozpad nádorové tkáně. Poškození odpovídalo průchodu rázové vlny. Kontrolní nádory nejevily žádné známky poškození. Mikroskopicky bylo odhaleno jasné rozsáhlé poškození nádorové tkáně. Jeho orientace i tvar dobře korespondovalo s šířením rázové vlny. Hranice mezi poškozenou a nepoškozenou tkání byla jasně patrná. Ukázalo se, že v místě působení dochází k nekróze a na hranicích mezi poškozenou a nepoškozenou tkání dochází k apoptóze. Na základě těchto výsledků předpokládáme, že poškození nádorové tkáně je způsobeno zejména mechanickým namáháním vysokým přetlakem.



In vivo effects of focused shock waves on tumor tissue visualized by fluorescence staining techniques



Petr Lukes^{a,*}, Jan Zeman^b, Vratislav Horak^c, Petr Hoffer^a, Pavla Pouckova^b, Monika Holubova^c, S. Hamid R. Hosseini^d, Hidenori Akiyama^d, Pavel Sunka^a, Jiri Benes^b

^a Institute of Plasma Physics AS CR, v.v.i., Za Slovankou 3, 182 00 Prague 8, Czech Republic

^b Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovska 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic

^c Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Rumburska 89, 277 21 Libechev, Czech Republic

^d Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Kumamoto, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2014

Received in revised form 13 August 2014

Accepted 18 August 2014

Available online 29 August 2014

Keywords:

Electrical discharge

Shock waves

Tumor damage

Necrosis

Apoptosis

ABSTRACT

Shock waves can cause significant cytotoxic effects in tumor cells and tissues both in vitro and in vivo. However, understanding the mechanisms of shock wave interaction with tissues is limited. We have studied in vivo effects of focused shock waves induced in the syngeneic sarcoma tumor model using the TUNEL assay, immunohistochemical detection of caspase-3 and hematoxylin–eosin staining. Shock waves were produced by a multichannel pulsed-electrohydraulic discharge generator with a cylindrical ceramic-coated electrode. In tumors treated with shock waves, a large area of damaged tissue was detected which was clearly differentiated from intact tissue. Localization and a cone-shaped region of tissue damage visualized by TUNEL reaction apparently correlated with the conical shape and direction of shock wave propagation determined by high-speed shadowgraphy. A strong TUNEL reaction of nuclei and nucleus fragments in tissue exposed to shock waves suggested apoptosis in this destroyed tumor area. However, specificity of the TUNEL technique to apoptotic cells is ambiguous and other apoptotic markers (caspase-3) that we used in our study did not confirm this observation. Thus, the generated fragments of nuclei gave rise to a false TUNEL reaction not associated with apoptosis. Mechanical stress from high overpressure shock wave was likely the dominant pathway of tumor damage.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Shock waves have been used in medicine for many years, particularly in extracorporeal lithotripsy (ESWL), which uses focused shock waves to non-invasively treat patients with stone diseases (mostly, urinary stones) [1–3]. The treatment involves focusing shock waves generated by the ESWL device (lithotripter) outside of the patient's body to disintegrate the stone at a depth in tissue. In electrohydraulic lithotripters – the most common clinical type – an underwater high-current spark discharge between a pair of electrodes is generated at the focus of the ellipsoidal reflector, and the emerging spherical shock wave produced by the plasma at the spark gap is concentrated on the kidney stone located at the second focus of the ellipsoid. After this urinary stone treatment, the stone debris passes through the urinary tract. The success of the ESWL stimulated research on the applications of focused shock waves (FSWs) in other branches of medicine. Lithotripter-generated shock waves have been applied to treatment of cells and soft tissues of various cancers both in vitro and in vivo; however, only with a limited degree of

success [3–5]. In vitro studies have demonstrated that ESWL can cause various types of cell damage including fragmentation of cells [6–9]. However, in vivo treatment of tumors by lithotripter-induced shock waves has been shown to be ineffective in inhibiting tumor growth [9–12]. It has been found that shock wave-induced cavitation plays an important role in the cell damage [13–16]. The collapse time of ESWL-induced cavitation bubbles was found to be significantly reduced going from in vitro to in vivo conditions, suggesting that in vivo bubble expansion may be severely constrained by the surrounding tissue and may explain why ESWL effects are significantly lower in vivo than in vitro [17,18]. Therefore, controlling the formation and subsequent oscillations of cavitation bubbles seems to be a crucial factor in producing optimal shock wave-induced bioeffects in vivo.

Shock waves are characterized by a violent change in pressure which induces subsequent changes in characteristics of the medium through which they are propagated. A typical pressure waveform at the lithotripter focus in water consists of a leading shock wave front (compressive wave) with a peak positive pressure in the range of 30–150 MPa and a phase duration of 0.5–3 μs, followed by a tensile wave with a peak negative pressure down to –20 MPa and a duration of 2–20 μs. The negative pressure part of the shock wave produces cavitation [1]. To accelerate stone comminution and/or reduce/enhance tissue

* Corresponding author at: Institute of Plasma Physics AS CR, Za Slovankou 3, Prague, Czech Republic. Tel.: +420 266 053 233; fax: +420 286 592 644.
E-mail address: lukes@ipp.cas.cz (P. Lukes).

damage, special generators of shock waves are being designed to modify the cavitation field and to control cavitation. The corresponding methods manipulate the timing between pulses or modify the lithotripter waveform [19–22]. A promising approach to control bubble growth and collapse is the use of two focused successive (tandem) shock waves, which intensify the collapse of cavitation bubbles by sending a second shock wave before the bubbles produced by the first shock wave begin to collapse [23–28]. Shock waves produced by these modified generators have been shown to cause significant cytotoxic effects in tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. These effects were considerably higher than those reported using traditional shock wave lithotripters. Furthermore, tandem shocks were shown to delay tumor growth and this effect was significantly potentiated with cytostatic drugs [27–35].

However, despite the demonstrated effectiveness in experimental tumors, understanding the mechanism of interaction between the shock waves and tumors is limited. Both positive and negative pressures and inertial cavitation especially are thought to play roles in the interaction of lithotripter-induced shock waves with biological tissue [2]. Little is also known about how cavitation bubbles develop within tissue. One reason is that the acoustic impedance of fluid media is similar to that of soft tissues in the body, and shock waves can propagate through tissues without significant energy loss. Small-scale inhomogeneities in different layers of tissue (skin, fat and muscle) may scatter the wave, thereby distorting the wavefronts and slightly attenuating the shock wave. There is no acoustical difference between cancerous and healthy tissues in contrast to solid objects such as kidney stones in urine; thus, the localized action of shock waves is attributed to the cavitations produced in tissue *in vivo*. Collapsing cavitations create strong secondary shock waves of nanosecond duration (tens of micrometers in scale) that can interact with cell scale-structures. Local thermal effects (on the order of μm dimensions) accompanying cavitations collapse (sonoluminescence) and the production of chemical radicals may also play a role in cell damage [36–39]. Also, it might not be necessary to produce cavitation *in vivo*. Previously, we have found that when using tandem shock waves with short delays (between approximately 10 and 15 μs), the main role of the first shock wave is to produce an inhomogeneous medium at the focal zone, i.e., a low-density region [29–34]. In a low-density inhomogeneous medium, the velocity of propagation of the second shock front is slower than in a homogeneous medium. This inhomogeneity is the reason why the second shock interacts with an otherwise acoustically transparent/homogeneous liquid medium. The second shock thus propagates with growing strength through a medium with a negative density gradient and interacts with targeted tissue. However, further research is required on the optimal shock wave profile and on understanding mechanisms of interaction between the shock waves with tissue *in vivo* treatment.

Huber and Debus [35] reported histopathological changes in Dunning prostate tumors transplanted into the thighs of Copenhagen rats upon *in vivo* treatment by double shock waves. They observed a large number of pyknotic nuclei, severe intracellular and pericellular vacuoles, and patchy necrosis in the treated tumors. These tissue changes were more extensive after treatment by a higher number of double shocks which produced more severe effects on the tumor histopathology such as hemorrhaging, tissue disruption, and necrosis. Apart from mechanical effects, the shock waves may cause cavitation-induced sonochemical effects in exposed tumor tissue which could lead to other changes than necrosis, e.g., to apoptosis. Apoptosis or programmed cell death is an important physiological process whose goal is to eliminate damaged cells or redundant cells during normal development [40]. In oncology, apoptosis plays an important role in both carcinogenesis and cancer treatment. Apoptotic cells are characterized by specific morphological and biochemical changes. Participation of numerous proteins in apoptosis, several apoptotic signaling pathways, and their regulation have been well described [40,41]. The apoptotic mode has been shown to be triggered by a variety of antitumor drugs, radiation, or pulsed electric fields with pulse duration of nanosecond

range [42–50]. Focused shock waves represent to be another potential local cancer treatment strategy. However, only few studies on apoptotic pathways in tissues exposed to shock waves have been reported with no conclusive results whether shock wave may induce apoptotic changes in tissue [51–55].

In this work, we used histological and immunohistochemical techniques to investigate the effects induced by focused shock waves in tumor tissue *in vivo*. The Lewis rats with syngeneic sarcoma (developed after subcutaneous inoculation of tumor cells into thighs) were used as experimental animal models. A multichannel pulsed-electrohydraulic discharge generator with cylindrical ceramic-coated electrode was used as source of focused shock waves [56–59]. In previous work, we have demonstrated that focused shock waves produced by such a type of generator can cause localized lesions at a predictable location deep within soft tissue. The biological effects caused by these shock waves were demonstrated both *in vitro* and *in vivo* [56,57]. Present research was undertaken to contribute to better understanding of the mechanisms of interaction between the shock waves with *in vivo* tissue treatment. We evaluated serial cryosections of tumor tissue exposed to focused shock waves using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique and immunohistochemical detection of caspase-3. In addition, tissue morphology was evaluated using hematoxylin–eosin staining. The observed changes in tumor tissue upon exposure to focused shock waves were correlated with the direction and the shape of shock wave propagation in water determined using high speed shadowgraphy.

2. Experimental

2.1. Shockwave generator

Fig. 1 shows a scheme of the experimental setup. The shock wave generator consisted of a cylindrical high-voltage composite electrode (anode) placed along the axis of the outer metallic parabolic reflector (cathode) [57]. The dimension of the cylindrical composite electrode was 60 mm diameter \times 100 mm long. The generator was divided into two sections by an acoustically transparent membrane (Mylar foil). The inner part was filled with a highly conductive saline solution (18 mS/cm) and a contained electrode system. The focal point of the

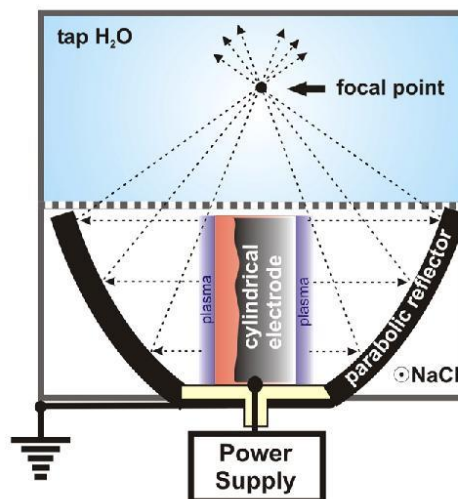


Fig. 1. Scheme of shock wave generator.

reflector was situated in the outer part of the generator, which was filled with tap water and was located 70 mm above the reflector aperture. A high voltage pulse of positive polarity with an amplitude of 21 kV was applied to the composite electrode charged from the pulse power supply, which consisted of a high voltage direct current (DC) source (model EW30P20, Glassman High Voltage, Inc.), a charging capacitor of 0.8 μF , and a spark gap switch. An underwater electrical discharge plasma at the surface of the high-voltage cylindrical electrode produced a primary cylindrical pressure wave which propagated into the liquid perpendicular to the cylinder axis. This cylindrical pressure wave was focused by the parabolic reflector to a common focal point and transformed into a shock wave at the focus.

Pressure measurements of the shock wave were made using a fiber optic probe hydrophone (FOPH 2000, RP Acoustics, Germany). The tip of the hydrophone optical fiber was placed in the generator focal area and a signal from the hydrophone photo detector was captured by a digital oscilloscope (Tektronix DPO 4104, USA). Fig. 2 shows the typical pressure waveform of the shock wave at the focus measured by the FOPH. The peak amplitude of the positive pressure wave was $P_{\text{max}} = 372 \text{ MPa}$ with a phase duration of 1.5 μs . The peak amplitude of the following negative pressure part was -17 MPa with a duration of 2 μs . Fig. 3 shows that the peak amplitudes of the positive pressure wave rapidly decreased with a lateral distance from the focus, indicating a very narrow focal area. The pressure amplitude dropped to the half value at a distance of less than 0.25 mm from the axis.

A high-speed camera (ULTRA Neo, Nac Company, Japan) and a flash lamp were used for shadowgraph visualization of the shock wave propagation through the focal area in water. Fig. 4 shows that by focusing the primary diverging cylindrical pressure wave propagating from the cylindrical discharge electrode was transformed into an approximately conical converging shock wave at the focus area. The shock front was visible in the shadowgraphs as two lines intersecting over the axis of symmetry of focusing parabolic reflector. The shock wave propagated from the bottom to the top of the frame. The experimentally determined speed of propagation of intersection point of shock wave front in axial direction was $2.17 \pm 0.1 \text{ km/s}$.

2.2. Tumor and animal model

All animal studies were performed in accordance with the Act on Experimental Work with Animals (Decree Nos. 311/97; 117/87, and

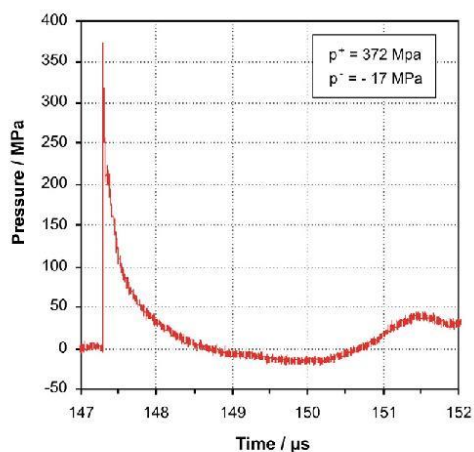


Fig. 2. Pressure waveform of the shock wave measured by the FOPH at the focus of the shock wave generator (p^+ , p^- : positive and negative peak pressure amplitudes).

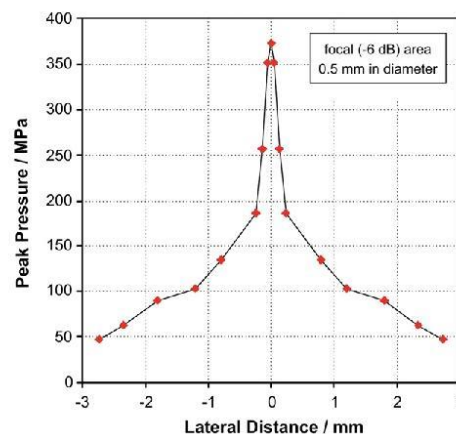


Fig. 3. Pressure profile of the shock wave at the focal area measured along the transverse (x) direction to reflector axis.

Act No. 246/96) of the Czech Republic, which is fully compatible with the corresponding European Union directives. The R5-28 sarcoma cell line was derived from a spontaneously growing tumor taken from a Lewis rat female and was characterized *in vitro* and *in vivo* [60,61]. Cells of the D6 clone were isolated from the R5-28 cell line. They were described in detail together with two other clones recently [62] and were utilized in this work. The D6 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Lonza, Switzerland), penicillin/streptomycin (10 IU/5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HEPES (10 μM), L-glutamine (1 mM), and non-essential amino acids (1 mM; all Sigma-Aldrich, Germany) in 5% CO_2 at 37 $^\circ\text{C}$. Eight male Lewis rats (body weight of 200–250 g) were subcutaneously inoculated into the right and left thighs with the D6 cells at doses of 5×10^5 cells in 0.2 mL of the phosphate buffered saline (PBS). Four weeks after the inoculation, growing tumors reached about 20–30 mm in size. Under total anesthesia, one of the tumors in each animal was treated by the focused shock waves (FSWs) for

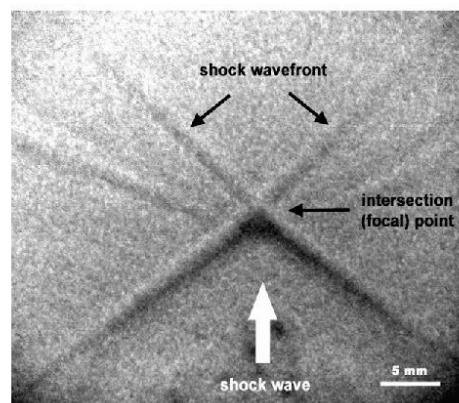


Fig. 4. Shadowgraph image visualizing the conical shock wave at the focal area. The shock wave propagated from the bottom to the top of the frame. Shock wavefront is marked after passing through the focus.

15 min (i.e., dose of 600 shocks). Shock waves were focused in the central area of the tumor. The contralateral non-treated tumor served as a control.

2.3. Staining techniques

The rats were dispatched by decapitation 48 h after FSW application. Samples from the treated and non-treated tumors were placed on a piece of cork, covered with the tissue freezing medium (Jung), and frozen immediately in liquid nitrogen. Serial cryosections (8 μm) were stained by immunohistochemical and histological procedures for detection of the tumor damage by FSW. The TUNEL technique was applied using the "In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red" (Roche Diagnostics GmbH, Germany), in accordance with the manufacturer's data sheet. Briefly, the sections were air-dried (15 min), fixed with 4% paraformaldehyde (20 min), washed with PBS (three times, 5 min each), treated with freshly prepared permeabilization solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) on ice (2 min), washed with PBS (two times, 5 min each) and incubated with the TUNEL reaction mixture in a moist chamber (dark, 37 °C, 1 h). The sections were then washed with PBS, counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, Czech Republic; 1 min) for the detection of nuclei and washed again with PBS (three times, 5 min each). Finally, the stained sections were embedded in the Mowiol Mounting Medium (prepared according to the technical data sheet No. 777; Polysciences, Inc., USA) with n-propyl gallate (at a final concentration of 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Czech Republic) as an anti-fading agent. The BX51 fluorescence microscope (Olympus Czech Group s.r.o., Czech Republic) with the Infinity 2 CCD Monochrome Microscopy Camera (Lumenera Corp., Canada) and QuickPhoto Micro 2.3 software (Promicra s.r.o., Czech Republic) in the pseudo-color mode was employed for evaluation of the fluorescence staining.

The expression of caspase-3 (full length) and activated caspase-3 (the large fragment 17/19 kDa) was demonstrated by indirect immunofluorescence using rabbit anti-caspase-3 antibody (Stressgen Biotechnologies, Canada) and rabbit anti-cleaved caspase-3 (Asp175) antibody (Cell Signaling Technology, USA), respectively. Cryosections were fixed with cold acetone (15 min), washed with PBS (three times, 5 min each), treated with 10% goat serum (1 h), and with the primary antibodies (diluted 1:500 with 10% goat serum; in refrigerator; overnight). Then, they were washed with 0.2% BSA (bovine serum albumin) in PBS (three times, 5 min each) covered with Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Chemicon International, USA; diluted 1:1 000 with 10% goat serum; 1 h) to reveal the bound primary antibody and washed again with 0.2% BSA in PBS (three times, 5 min each). Nuclei were counterstained with DAPI (10 min). The stained sections were embedded and the fluorescence staining was evaluated as described above.

Hematoxylin–eosin staining was used to detect changes of tissue structure. Cryosections were fixed with ethanol (20 min), washed with distilled water (three times, 5 min each) and treated with Weigert's hematoxylin (20 min) for nuclei staining. Then, running tap water was applied (20 min) followed with distilled water washing (three times, 5 min each). The cytoplasm was counterstained with 1% eosin alcoholic solution (1 min). After distilled water washing (three times, 5 min each), the stained sections were embedded in glycerin jelly.

3. Results and discussion

3.1. Macroscopic changes caused by focused shock waves

Subcutaneous tumors were removed from animals 48 h after FSW application. Macroscopically, tumors treated with 600 shocks exhibited slight circular damage to the skin covering the tumor and hematoma on the tumor surface in the area of the shock wave input. Moreover, there was an obvious homogeneous disintegration of the tumor tissue.

Damage to the tumors was consistently oriented in the direction of the shock wave propagation to the tumor depth. It covered almost the entire cross-section of smaller tumors (about 20 mm in size) and a large central area of bigger tumors (about 30 mm in size). Hematomas were also sometimes found in the skeletal muscles under the tumor. In contrast, no signs of damage were revealed in the non-treated contralateral (control) tumors. They usually showed small round or oval necrotic areas that were formed spontaneously during the tumor growth.

3.2. Microscopic evaluation of tumor damage

3.2.1. TUNEL staining

The extent of the damage to tumors caused by FSW was evaluated by TUNEL staining of nuclear DNA fragmentation in tumor tissue sections. This assay technique is based on enzymatic *in situ* labeling of free 3'-OH DNA strand breaks using terminal deoxynucleotidyl transferase in a template-independent manner (TUNEL-reaction) [63]. In tumors treated with FSW, large areas of damaged tissue were observed. Nuclei and their fragments showed intense red fluorescence developed by TUNEL reaction (Fig. 5a). TUNEL staining was observed almost throughout the whole cross-section of smaller tumors. In larger tumors, the damaged area covered the entire central area of the tumor. Non-treated (control) tumors did not develop any TUNEL reaction or demonstrate weak TUNEL positivity in the nuclei of individually dispersed cells or of groups of cells forming small tumor areas only. Thus, these microscopic observations based on the TUNEL reaction appropriately corresponded to the macroscopic findings.

Localization of the damaged tissue and its arrowhead shape (Fig. 5b) were identical with the site of the penetration and direction of the shock wave into the tumor. A cone-shaped region of tissue damage visualized by TUNEL reaction was clearly distinguishable from the normal tissue and apparently correlated with the geometry of the shock wave field, which was visualized using high-speed shadowgraphy (Fig. 4). The wavefront of the conical shock wave in the focal area was visible in the shadowgraph as two lines intersecting with an angle of approximately 90°. The shape of tissue damage resembled the same geometric pattern (Fig. 5b). The dimension of the focal area in the tissue targeted by the shock wave was approximated by a circular area 200 μm in diameter. A cone-shaped region visualized by the TUNEL reaction indicated that the extent of damage in tissue caused by the shock wave covered a larger area (total width of cone-shaped area depicted in Fig. 5b was approximately 0.6 mm); however, dimensions of tissue area affected by shock waves correlated well with the pressure profile of the shock wave at the focus which was determined by FOPH. Fig. 3 shows that the peak pressure amplitude dropped from 372 MPa to the half value at a lateral distance of less than 0.25 mm from the focus. Although it is not possible to sharply define the effective pressure zone and threshold pressure value in which the shock wave has a biological effect, the obtained results indicate a very narrow and well-defined area of tissue which was affected by the shock wave. Nevertheless, with an increasing number of applied shocks, the change of acoustical properties of the treated tissue also has to be considered, which affected the tumor volume exposed by the shock wave and resulted into extension of tissue damage from a single spot defined by the dimension of shock wave focus to a larger cone-shaped region.

The TUNEL technique is a widely used staining method to detect apoptotic cells in tissue sections [63]. Results obtained from TUNEL staining of tumor tissue exposed to FSW (Fig. 5a) suggest that the shock wave might be able to induce apoptosis in tumor cells. However, the specificity of the TUNEL technique to apoptotic cells is ambiguous and several drawbacks of this method have been reported [64,65]. Necrotic cells might also show positivity to the TUNEL reaction because endonucleases activated during necrosis can generate DNA fragmentation and free DNA ends where the labeled dUTP can be inserted [66,67]. On the other hand, some apoptotic cells without TUNEL positivity were observed [68]. Therefore, results in the TUNEL assay require

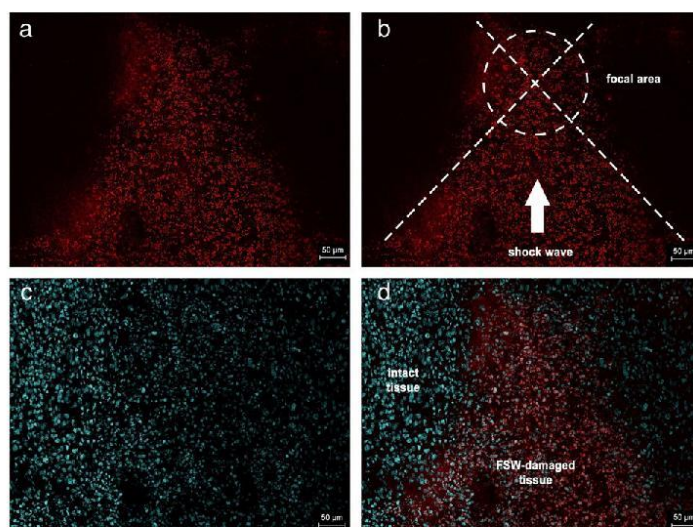


Fig. 5. Cryosection of rat subcutaneous tumor 48 h after the treatment by focused shock wave: (a) TUNEL reaction (red fluorescence); (b) approximation of tissue area damaged by the shock wave, shock wave propagated from the bottom, and diameter of focal area marked by dashed circle: 200 μm ; (c) DAPI staining (blue fluorescence); and (d) overlap of TUNEL reaction and DAPI staining.

critical interpretation of the staining to discriminate between apoptotic and necrotic cells. Simultaneous evaluation of the TUNEL reaction with some other apoptotic marker and of tissue morphology is recommended [64]. In general, cells undergoing apoptosis display a characteristic pattern of structural changes in the nucleus and cytoplasm, including rapid blebbing of the plasma membrane and nuclear disintegration. The nuclear collapse is associated with extensive damage to chromatin and DNA-cleavage into the oligonucleosomal length DNA fragments after activation of a calcium-dependent endogenous endonuclease [69,70].

DAPI staining revealed clear fragmentation of most nuclei in the areas with TUNEL positivity, i.e. in areas affected by the shock wave (Fig. 5c). In contrast, nuclei of normal living cells in surrounding tissue had oval or circular shape and demonstrated DAPI staining only. The overlap of TUNEL and DAPI staining showed co-localization of both staining in almost all nuclear elements in the damaged tissue that was clearly distinguishable from the intact tumor areas (Fig. 5d). The observed DAPI staining pattern suggested apoptotic changes in tumor cell nuclei exposed to FSW. To confirm or to exclude apoptosis induced by FSW in rat tumor tissue, we further compared ascertained findings from TUNEL reaction (combined with DAPI staining) with immunohistochemical detection of caspase-3.

3.2.2. Immunohistochemical detection of caspase-3

Caspases are a family of intracellular proteins which are involved in the initiation as well as in the execution of apoptosis. They are synthesized as procaspases that are proteolytically cleaved into subunits and then associated to form fully functional proteases. Caspase-3 is one of the key executioner caspases which is often used as a reliable marker of apoptosis [40]. We immunohistochemically detected the serial cryosections of endogenous level of caspase-3 (as a whole protein) as well as the cleaved caspase-3 (the large fragment 17/19 kDa of activated caspase-3). Intense granular staining in nuclei of almost all cells (and very rarely also in the cytoplasm of few cells) was observed in non-treated (control) tumors using the antibody against full length of caspase-3 (Fig. 6a). Very small groups of nuclei in these tumors showed no caspase-3 positivity (see the area marked by an arrow in Fig. 6a).

They probably represent necrotic areas that arose spontaneously during tumor growth. This finding suggests a great potential in rat tumor cells to develop apoptosis after appropriate external stimuli. On the contrary, cells really executing apoptosis were individually and sparsely distributed in tumor sections when the antibody against activated caspase-3 was applied. A weak expression of activated caspase-3 was usually localized in the whole cytoplasm of these cells.

The tumors treated by FSW revealed very large destroyed tissue areas in which the full length caspase-3 positivity was completely or almost completely missing (Fig. 6b; arrow). Comparing this staining with the serial section processed for TUNEL reaction (Fig. 6c), we ascertained that the tissue areas without the caspase-3 showed very strong TUNEL positivity and vice versa. Moreover, a low number of cells with weak activated caspase-3 positivity was observed (Fig. 6d). They were found mainly in the border area between the intact and damaged tissues. From these observations, it follows that while the TUNEL reaction suggested apoptosis in the tumor area damaged by a shock wave, neither expression of caspase-3 (full length, i.e. procaspase-3) nor expression of activated caspase-3 confirmed this observation. Thus, it seems that the generated fragments of nuclei gave rise to the TUNEL reaction that was false and was not associated with apoptosis.

3.2.3. Hematoxylin–eosin staining

Strong destruction of cellular integrity and tissue structure were also found in the hematoxylin–eosin stained cryosections from the tumors treated by FSW. Fig. 7 shows a comparison of hematoxylin–eosin staining of non-treated tumor tissue (Fig. 7a) and after treatment by shock waves (Fig. 7b–d). In agreement with the above-described immunohistochemical observations, the damaged tissue formed a large area that was localized and oriented along with the direction of the FSW penetration into the tumor (Fig. 7b). A different degree of tissue damage and pronounced fragmentation of nuclei was observed in the majority of cells in this region (Fig. 7c, d). The boundaries between the intact and the exposed tissue were sharp and well defined. In non-treated (control) tumors, several small areas with damaged tissue structure were ascertained only (Fig. 7a). Such necrotic areas develop spontaneously during tumor growth due to insufficient blood supply and nutrition.

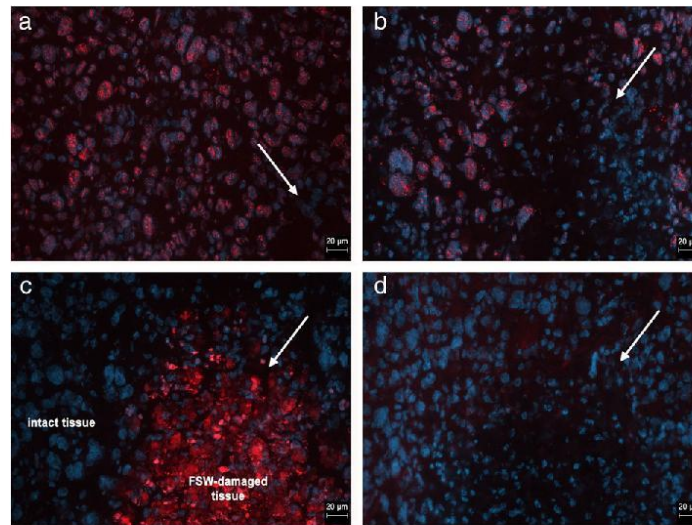


Fig. 6. (a) Overlap of caspase-3 (red) and DAPI (blue) in cryosection of non-treated (control) tumor; (b)–(d) serial cryosections of rat subcutaneous tumor 48 h after the treatment by focused shock wave: (b) overlap of caspase-3 (red) and DAPI (blue); (c) overlap of TUNEL reaction (red) and DAPI (blue); (d) overlap of activated caspase-3 (red) and DAPI (blue). White arrows in (b), (c) and (d) indicate approximately the same area on serial cryosections.

Based on these results, we assume that effects induced in the tumor tissue by shock waves were caused mainly by extensive mechanical damage of the tissue structure. The peak positive pressure amplitude of the shock wave measured at the focus in water was 372 MPa (Fig. 4). The shock wave amplitude in the targeted tissue was probably lower. In vivo pressure measurements of ESWL have shown that in vivo shock wave waveforms are 20 to 30% lower in peak amplitude than

those measured in water [71,72]. Moreover, the shock wave in the present FSW generator was formed by a different mechanism than in ESW lithotripters (i.e., during propagation of pressure wave from parabolic reflector through liquid medium to the focus); therefore, its amplitude in a targeted tumor could be more affected by the properties and thickness of tissue it passed through. Nevertheless, mechanical stress effects resulting from high overpressure and shear forces of the

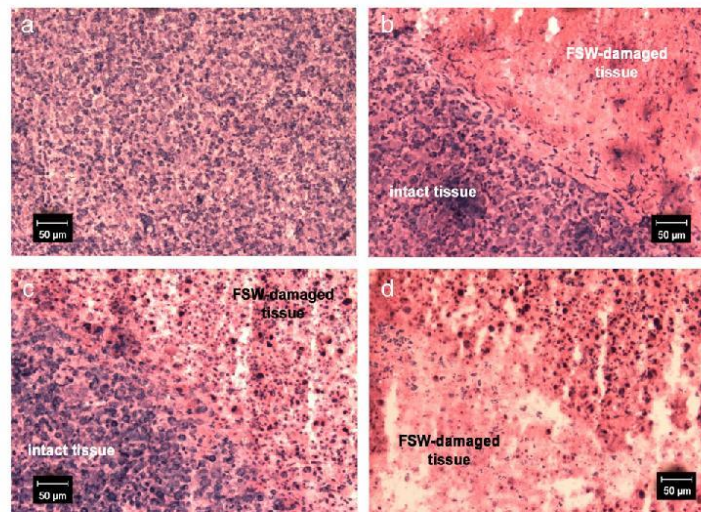


Fig. 7. Hematoxylin–eosin staining of cryosections from rat subcutaneous tumor: (a) non-treated control; (b)–(d) 48 h after the treatment by focused shock wave showing different degrees of tissue damage and the interface between intact and exposed tissues by shock wave. The nuclei and their fragments are blue-violet, and the cytoplasm is pink-red.

shock wave were likely the dominant processes in intracellular DNA damage and cell lysis that were observed in FSW-treated tumor tissue. How big a role inertial cavitation plays in this process is difficult to determine and in this study, it was likely hidden by mechanical stress effects from the shock wave that made it impossible to distinguish from effects caused by cavitation.

4. Conclusions

Cryosections from rat subcutaneous FSW-treated tumors revealed extensive tissue damage clearly distinguishable from the normal tissue. Its localization and shape correlated well with the direction and the shape of shock wave propagation. A strong TUNEL reaction suggested apoptosis in this destroyed tumor area. However, neither expression of caspase-3 (full length, i.e., procaspase-3) nor expression of activated caspase-3 confirmed this observation. A reverse relationship was found between the TUNEL reaction and expression of full length caspase-3. Moreover, activated caspase-3 was observed in very low number of cells which were localized mainly in the border area between the intact and damaged tissues. Thus, the generated fragments of nuclei give rise to the TUNEL reaction that was false and not associated with apoptosis. Based on these results, we assume that damage observed in the tumor tissue from the shock waves was caused mainly by mechanical stress effects from high overpressure and shear forces of the shock wave on tissue structures at the focus.

Acknowledgments

This work was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic (M100431203), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (CZ.1.05/2.1.00/03.0124), the Institute of Animal Physiology and Genetics AC CR (RVO 67985904) and Grant-in-Aid for Scientific Research No. 24540539 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- R.O. Cleveland, J.A. McAteer, Physics of shock-wave lithotripsy, *Smith's Textbook of Endourology*, Wiley-Blackwell, 2012, pp. 527–558, <http://dx.doi.org/10.1002/9781444345148.ch49>.
- M. Delius, Extracorporeal shock waves: bioeffects and mechanisms of action, in: R.C. Srivastava, D. Leutloff, K. Takayama, H. Grönig (Eds.), *Shock Focusing Effect in Medical Science and Sonoluminescence*, Springer, Berlin Heidelberg, 2003, pp. 211–226, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-05161-0_9.
- A.J. Coleman, J.E. Saunders, A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy, *Ultrasonics* 31 (1993) 75–89, [http://dx.doi.org/10.1016/0041-624X\(93\)90037-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0041-624X(93)90037-Z).
- M. Delius, Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves, *Shock Waves* 4 (1994) 55–72, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01418569>.
- F. Brummer, T. Brauner, D.F. Hulser, Biological effects of shock waves, *World J. Urol.* 8 (1990) 224–232, <http://dx.doi.org/10.1007/bf01580025>.
- P. Russo, R.A. Stephenson, C. Mies, R. Huryk, W.D. Heston, M.R. Melamed, W.R. Fair, High energy shock waves suppress tumor growth in vitro and in vivo, *J. Urol.* 135 (1986) 626–628 (doi:).
- K. Kohri, T. Uemura, M. Iguchi, T. Kurita, Effect of high energy shock waves on tumor cells, *Urol. Res.* 18 (1990) 101–105, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00302468>.
- R.V. Clayman, S. Long, M. Marcus, High-energy shock waves: in vitro effects, *Am. J. Kidney Dis.* 17 (1991) 436–444, [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(12\)80638-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(12)80638-X).
- R.F. Randazzo, C.G. Chaussy, G.J. Fuchs, S.M. Bhuta, H. Lovrekovich, J.B. deKernion, The in vitro and in vivo effects of extracorporeal shock waves on malignant cells, *Urol. Res.* 16 (1988) 419–426, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00280022>.
- P. Russo, C. Mies, R. Huryk, W.D. Heston, W.R. Fair, Histopathologic and ultrastructural correlates of tumor growth suppression by high energy shock waves, *J. Urol.* 137 (1987) 338–341 (doi:).
- M. Delius, G. Adams, Shock wave permeabilization with ribosome inactivating proteins: a new approach to tumor therapy, *Cancer Res.* 59 (1999) 5227–5232 (doi:).
- R.P. Holmes, L.I. Yeaman, W.J. Li, L.J. Hart, C.A. Wallen, R.D. Woodruff, D.L. McCullough, The combined effects of shock waves and cisplatin therapy on rat prostate tumors, *J. Urol.* 144 (1990) 159–163 (doi:).
- M. Delius, R. Denk, C. Berding, H.G. Liebich, M. Jordan, W. Brendel, Biological effects of shock waves: cavitation by shock waves in piglet liver, *Ultrasound Med. Biol.* 16 (1990) 467–472, [http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629\(90\)90169-D](http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629(90)90169-D).
- P. Huber, J. Debus, P. Peschke, E.W. Hahn, W.J. Lorenz, In vivo detection of ultrasonically induced cavitation by a fibre-optic technique, *Ultrasound Med. Biol.* 20 (1994) 811–825, [http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629\(94\)90038-8](http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629(94)90038-8).
- A.J. Coleman, M.J. Choi, J.E. Saunders, Detection of acoustic emission from cavitation in tissue during clinical extracorporeal lithotripsy, *Ultrasound Med. Biol.* 22 (1996) 1079–1087, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(96\)00118-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(96)00118-4).
- R.O. Cleveland, O.A. Sapozhnikov, M.R. Bailey, L.A. Crum, A dual passive cavitation detector for localized detection of lithotripsy-induced cavitation in vivo, *J. Acoust. Soc. Am.* 107 (2000) 1745–1758, <http://dx.doi.org/10.1121/1.428572>.
- P. Zhong, I. Cioanta, S. Zhu, F.H. Cocks, G.M. Preminger, Effects of tissue constraint on shock wave-induced bubble expansion in vivo, *J. Acoust. Soc. Am.* 104 (1998) 3126–3129, <http://dx.doi.org/10.1121/1.423905>.
- P. Zhong, Y. Zhou, S. Zhu, Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in SWL, *Ultrasound Med. Biol.* 27 (2001) 119–134, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(00\)00322-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(00)00322-7).
- M.R. Bailey, D.T. Blackstock, R.O. Cleveland, L.A. Crum, Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. I. Acoustic fields, *J. Acoust. Soc. Am.* 104 (1998) 2517–2524.
- M.R. Bailey, D.T. Blackstock, R.O. Cleveland, L.A. Crum, Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields, *J. Acoust. Soc. Am.* 106 (1999) 1149–1160.
- D.L. Sokolov, M.R. Bailey, L.A. Crum, Use of a dual-pulse lithotripter to generate a localized and intensified cavitation field, *J. Acoust. Soc. Am.* 110 (2001) 1685–1695, <http://dx.doi.org/10.1121/1.1394221>.
- P. Huber, J. Debus, K. Jochle, I. Simiantonakis, J. Jenne, R. Rastert, J. Spoo, W.J. Lorenz, M. Wannenmacher, Control of cavitation activity by different shockwave pulsing regimes, *Phys. Med. Biol.* 44 (1999) 1427–1437, <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/44/6/301>.
- A.M. Loske, F.E. Prieto, F. Fernandez, J. van Cauwelaert, Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy, *Phys. Med. Biol.* 47 (2002) 3945–3957, <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/47/22/303>.
- A.M. Loske, F. Fernandez, H. Zendejas, M. Paredes, E. Castano-Tostado, Dual pulse shock wave lithotripsy: in vitro and in vivo study, *J. Urol.* 174 (2005) 2388–2392, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ju.0000180416.03512.24>.
- U.M. Alvarez, A. Ramirez, F. Fernandez, A. Mendez, A.M. Loske, The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria, *Shock Waves* 17 (2008) 441–447, <http://dx.doi.org/10.1007/s00193-008-0125-2>.
- G. Canseco, M. de laCaza-Herrera, F. Fernandez, A.M. Loske, Modified shock waves for extracorporeal shock wave lithotripsy: a simulation based on the Gilmore formulation, *Ultrasonics* 51 (2011) 803–810, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2011.03.008>.
- P. Zhong, H. Lin, X. Xi, S. Zhu, E.S. Bhogte, Shock wave-inertial microbubble interaction: methodology, physical characterization, and bioeffect study, *J. Acoust. Soc. Am.* 105 (1999) 1997–2009, <http://dx.doi.org/10.1121/1.426733>.
- D.L. Sokolov, M.R. Bailey, L.A. Crum, Dual-pulse lithotripter accelerates stone fragmentation and reduces cell lysis in vitro, *Ultrasound Med. Biol.* 29 (2003) 1045–1052, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(03\)00887-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(03)00887-1).
- P. Sunka, V. Stelmashuk, V. Babicky, M. Clupek, J. Benes, P. Pouckova, J. Kaspar, M. Bodnar, Generation of two successive shock waves focused to a common focal point, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34 (2006) 1382–1385, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2006.878435>.
- P. Lukes, P. Sunka, P. Hoffer, V. Stelmashuk, J. Benes, P. Pouckova, M. Zadinova, J. Zeman, Generation of focused shock waves in water for biomedical applications, in: Z. Machala, K. Hensel, Y. Akishev (Eds.), *Plasma for Bio-decontamination, Medicine and Food Security*, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology/Springer, Dordrecht, Netherlands, 2012, pp. 403–416, http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-2852-3_31.
- P. Lukes, P. Sunka, P. Hoffer, V. Stelmashuk, P. Pouckova, M. Zadinova, J. Zeman, L. Dibdiak, H. Kolarova, K. Tomankova, S. Binder, J. Benes, Focused tandem shock waves in water and their potential application in cancer treatment, *Shock Waves* 24 (2014) 51–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s00193-013-0462-7>.
- J. Benes, J. Zeman, P. Pouckova, M. Zadinova, P. Sunka, P. Lukes, Biological effects of tandem shock waves demonstrated on magnetic resonance, *Bratisl. Med. J.* 113 (2012) 335–338, <http://dx.doi.org/10.4149/bjll.2012.076>.
- J. Benes, P. Sunka, J. Kralova, J. Kaspar, P. Pouckova, Biological effects of two successive shock waves focused on liver tissues and melanoma cells, *Physiol. Res.* 56 (2007) S1–S4 (doi:).
- J. Benes, P. Pouckova, J. Zeman, M. Zadinova, P. Sunka, P. Lukes, H. Kolarova, Effects of tandem shock waves combined with photostatic and cytotostatics on the growth of tumours, *Folia Biol.* 57 (2011) 255–260 (doi:).
- P.E. Huber, J. Debus, Tumor cytotoxicity in vivo and radical formation in vitro depend on the shock wave-induced cavitation dose, *Radiat. Res.* 156 (2001) 301–309, [http://dx.doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)156\[0301:tcivar\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1667/0033-7587(2001)156[0301:tcivar]2.0.co;2).
- A.J. Coleman, M.J. Choi, J.E. Saunders, T.G. Leighton, Acoustic emission and sonoluminescence due to cavitation at the beam focus of an electrohydraulic shock wave lithotripter, *Ultrasound Med. Biol.* 18 (1992) 267–281, [http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629\(92\)90096-8](http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629(92)90096-8).
- A.J. Coleman, M. Whitlock, T. Leighton, J.E. Saunders, The spatial distribution of cavitation induced acoustic emission, sonoluminescence and cell lysis in the field of a shock wave lithotripter, *Phys. Med. Biol.* 38 (1993) 1545–1560, <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/38/11/001>.
- T. Kodama, K. Takayama, Dynamic behavior of bubbles during extracorporeal shock wave lithotripsy, *Ultrasound Med. Biol.* 24 (1998) 723–738, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629\(98\)00022-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-5629(98)00022-2).
- T.G. Leighton, *The Acoustic Bubble*, Academic Press, San Diego, 1994.
- K.C. Zimmermann, C. Bonzon, D.R. Green, The machinery of programmed cell death, *Pharmacol. Ther.* 92 (2001) 57–70, [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00159-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00159-0).

- [41] P.C. Ashe, M.D. Berry, Apoptotic signaling cascades, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27 (2003) 199–214, [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-5846\(03\)00016-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-5846(03)00016-2).
- [42] J.A. Hickman, Apoptosis induced by anticancer drugs, *Cancer Metastasis Rev.* 11 (1992) 121–139, <http://dx.doi.org/10.1007/bf00048059>.
- [43] K.H. Schoenbach, S.J. Beebe, E.S. Buescher, Intracellular effect of ultrashort electrical pulses, *Bioelectromagnetics* 22 (2001) 440–448, <http://dx.doi.org/10.1002/bem.71>.
- [44] K.H. Schoenbach, B. Hargrave, R.P. Joshi, J.F. Kolb, R. Nuccitelli, C. Osgood, A. Pakhomov, M. Stacey, R.J. Swanson, J.A. White, S. Xiao, J. Zhang, S.J. Beebe, P.F. Blackmore, E.S. Buescher, Bioelectric effects of intense nanosecond pulses, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 14 (2007) 1088–1109, <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2007.4339468>.
- [45] K.H. Schoenbach, S. Xiao, R.P. Joshi, J.T. Camp, T. Heeren, J.F. Kolb, S.J. Beebe, The of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36 (2008) 414–422, <http://dx.doi.org/10.1109/tps.2008.918786>.
- [46] X.H. Chen, J.F. Kolb, R.J. Swanson, K.H. Schoenbach, S.J. Beebe, Apoptosis initiation and angiogenesis inhibition: melanoma targets for nanosecond pulsed electric fields, *Pigment Cell Melanoma Res.* 23 (2010) 554–563, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00704.x>.
- [47] S. Katsuki, N. Nomura, H. Koga, H. Akiyama, I. Uchida, S.I. Abe, Biological effects of narrow band pulsed electric fields, *IEEE Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 14 (2007) 663–668, <http://dx.doi.org/10.1109/tdei.2007.369529>.
- [48] J.C. Weaver, K.C. Smith, A.T. Esser, R.S. Son, T.R. Gowrishankar, A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: a region where additional intracellular effects are expected, *Bioelectrochemistry* 87 (2012) 236–243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.02.007>.
- [49] J.H. Song, R.P. Joshi, S.J. Beebe, Cellular apoptosis by nanosecond, high-intensity electric pulses: model evaluation of the pulsing threshold and extrinsic pathway, *Bioelectrochemistry* 79 (2010) 179–186, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.03.002>.
- [50] M. Stacey, P. Fox, S. Buescher, J. Kolb, Nanosecond pulsed electric field induced cytoskeleton, nuclear membrane and telomere damage adversely impact cell survival, *Bioelectrochemistry* 82 (2011) 131–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.06.002>.
- [51] E. Cimentepe, M. Eroglu, U. Ozturk, O. Bayrak, C. Tuygun, A. Acar, N. Uzum, A. Unsal, Renal apoptosis after shockwave application in rabbit model, *J. Endourol.* 20 (2006) 1091–1095, <http://dx.doi.org/10.1089/end.2006.20.1091>.
- [52] K. Kato, M. Fujimura, A. Nakagawa, A. Saito, T. Ohki, K. Takayama, T. Tominaga, Pressure-dependent effect of shock waves on rat brain: induction of neuronal apoptosis mediated by a caspase-dependent pathway, *J. Neurosurg.* 106 (2007) 667–676, <http://dx.doi.org/10.3171/jns.2007.106.4.667>.
- [53] V.M. Kira, D.J. Fagundes, C.O.P. Bandeira, O. Kaufman, A.T.N. Fagundes, V. Ortiz, Effects of repeated extracorporeal shock wave on kidney apoptosis of normal and diabetic rat, *Int. Braz. J. Urol.* 34 (2008) 91–96, <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-55382008000100013>.
- [54] O. Bayrak, E. Cimentepe, O. Karataş, A. Aker, R. Bayrak, M. Yildirim, A. Unsal, D. Unal, Ovarian apoptosis after shock wave lithotripsy for distal ureteral stones, *Urol. Res.* 37 (2009) 69–74, <http://dx.doi.org/10.1007/s00240-009-0172-x>.
- [55] I. Gecit, S. Kavak, E.K. Oguz, N. Pirincci, M. Gunes, M. Kara, K. Ceylan, M. Kaba, S. Tanik, Tissue damage in kidney, adrenal glands and diaphragm following extracorporeal shock wave lithotripsy, *Toxicol. Ind. Health* (2012), <http://dx.doi.org/10.1177/0748237112462481>.
- [56] P. Sunka, V. Babicky, M. Clupek, M. Fuciman, P. Lukes, M. Simek, J. Benes, B.R. Locke, Z. Majcherova, Potential applications of pulse electrical discharges in water, *Acta Phys. Slovaca* 54 (2004) 135–145 (doi:).
- [57] P. Sunka, V. Babicky, M. Clupek, J. Benes, P. Pouckova, Localized damage of tissues induced by focused shock waves, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 32 (2004) 1609–1613, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2004.830965>.
- [58] P. Lukes, M. Clupek, V. Babicky, P. Sunka, Pulsed electrical discharge in water generated using porous-ceramic-coated electrodes, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36 (2008) 1146–1147, <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2008.920945>.
- [59] V. Stelmashuk, P. Hoffer, Shock waves generated by an electrical discharge on composite electrode immersed in water with different conductivities, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 40 (2012) 1907–1912, <http://dx.doi.org/10.1109/tps.2012.2197638>.
- [60] A. Morakova, O. Malek, E. Pokorna, J. Stradel, J. Hradecky, V. Horak, Immune characterization of the Lewis rats inoculated with K2 sarcoma cell line and newly derived R5-28 malignant cells, *Folia Biol.* 51 (2005) 159–165 (doi:).
- [61] J. Stradel, M. Kverka, V. Horak, L. Vannucci, D. Usvald, J. Hlucilova, D. Planska, P. Vana, H. Reiserova, F. Jilek, Multiplex analysis of cytokines involved in tumour growth and spontaneous regression in a rat sarcoma model, *Folia Biol.* 53 (2007) 216–219 (doi:).
- [62] M. Holubova, M. Leba, M. Sedmikova, L. Vannucci, V. Horak, Characterization of three newly established rat sarcoma cell clones, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 48 (2012) 610–618, <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-012-9563-3>.
- [63] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Bensasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.* 119 (1992) 493–501, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>.
- [64] F. Labat-Moleur, C. Guillermet, P. Lorimier, C. Robert, S. Lantuejoul, E. Brambilla, A. Negoescu, TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement, *J. Histochem. Cytochem.* 46 (1998) 327–334, <http://dx.doi.org/10.1177/002215549804600306>.
- [65] M. Yasuda, S. Umemura, R.Y. Osamura, T. Kenjo, Y. Tsutsumi, Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method, *Arch. Histol. Cytol.* 58 (1995) 185–190, <http://dx.doi.org/10.1007/bf02400001>.
- [66] B. Grasl-Kraupp, B. Ruttkay-Nedecy, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch, R. Schultehermann, In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note, *Hepatology* 21 (1995) 1465–1468, [http://dx.doi.org/10.1016/0270-9139\(95\)90071-3](http://dx.doi.org/10.1016/0270-9139(95)90071-3).
- [67] C. Charriat-Marlangue, Y. Ben-Ari, A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis, *Neuroreport* 7 (1995) 61–64, <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199512000-00014>.
- [68] K.J. Kelly, R.M. Sandoval, K.W. Dunn, B.A. Molitoris, P.C. Dagher, A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (2003) C1309–C1318, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00353.2002>.
- [69] M.M. Compton, A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome, *Cancer Metastasis Rev.* 11 (1992) 105–119, <http://dx.doi.org/10.1007/bf00048058>.
- [70] G.P. Tolstykh, H.T. Beier, C.C. Roth, G.L. Thompson, J.A. Payne, M.A. Kuipers, B.L. Ibey, Activation of intracellular phosphoinositide signaling after a single 600 nanosecond electric pulse, *Bioelectrochemistry* 94 (2013) 23–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2013.05.002>.
- [71] M. Delius, G. Enders, G. Heine, J. Stark, K. Remberger, W. Brendel, Biological effects of shock waves: lung hemorrhage by shock waves in dogs – pressure dependence, *Ultrasound Med. Biol.* 13 (1987) 61–67, [http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629\(87\)90075-5](http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629(87)90075-5).
- [72] R.O. Cleveland, D.A. Lifshitz, B.A. Connors, A.P. Evan, L.R. Willis, L.A. Crum, In vivo pressure measurements of lithotripsy shock waves in pigs, *Ultrasound Med. Biol.* 24 (1998) 293–306, [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629\(97\)00270-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-5629(97)00270-6).

4.2 Tandemové rázové vlny

BENEŠ, J., P. POUČKOVÁ, J. ZEMAN, M. ZADINOVÁ, P. ŠUNKA, P. LUKEŠ a H. KOLÁŘOVÁ. Effects of Tandem Shock Waves Combined with Photosan and Cytostatics on the Growth of Tumours. FOLIA BIOLOGICA. 2011, 57(6), 255-260.

V této práci bylo zkoumáno působení tandemových rázových vln na svalovou tkáň *in vivo* v hloubce. A v druhé části byly zkoumány účinky tandemových rázových vln *in vivo* v kombinaci s photosanem a cisplatinou. V experimentech byl použit laboratorní králík pro zkoumání účinků na svalovou tkáň v hloubce. Králík byl ošetřen tandemovými rázovými vlnami, které byly aplikovány do stehenního svalu. Následně bylo provedeno vyšetření na magnetické rezonanci a byly odebrány vzorky pro histologické vyšetření. V druhé části byli použiti potkani. Jednalo se o dvě skupiny, které byly rozděleny každá ještě na tři menší podskupiny. První byla exponována pouze tandemovými rázovými vlnami, v druhé byla před aplikací rázových podána intravenózně dávka Photosanu a třetí byla kontrolní. V druhé velké skupině opět první část byla exponována pouze tandemovými rázovými vlnami, druhé byla před aplikací rázových podána dávka Cisplatinu a třetí byla kontrolní.

Výsledky prvního experimentu ukázaly, že tandemové rázové vlny jsou schopny způsobit poškození v akusticky homogenním prostředí v hloubce *in vivo*. Tkáně nad ohniskem směrem ke zdroji rázových vln jsou potom bez poškození. Výsledky druhého experimentu ukázaly, že tandemová rázová vlna je schopna způsobit zpoždění růstu nádoru oproti kontrolní skupině. Po podání Photosanu, nebo Cisplatinu se tento efekt ještě zvýší.

Original Article

Effects of Tandem Shock Waves Combined with Photosan and Cytostatics on the Growth of Tumours

(electrical discharges in water / focused shock waves / cavitations / tandem shock waves / tumour growth)

J. BENEŠ¹, P. POUČKOVÁ¹, J. ZEMAN¹, M. ZADINOVÁ¹, P. ŠUNKA², P. LUKEŠ²,
H. KOLÁŘOVÁ³

¹Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

²Institute of Plasma Physics AS CR, v. v. i., Prague, Czech Republic

³Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Abstract. Shock waves, pressure waves manifested as a sharp increase in positive pressure followed by a decrease and the negative part of the wave, are not only used to treat concrements in medicine. Recently, research has been focused on the possibility of their use for damaging the tumour tissue. In contrast to concrements, which are different from the surrounding tissue by their acoustic impedance, the tumour tissue has the same acoustic impedance as the surrounding soft tissue. Therefore, we have developed a new source of shock waves, which is based on the principle of multichannel discharge. This new source generates two successive shock waves (tandem shock waves). The first shock creates acoustic non-homogeneity and cavitations in the tissue, and the second shock is damped in it. In this work we demonstrated the effect of tandem shock waves on the muscle tissue in depth. The damage is shown on the images from the magnetic resonance imaging and histological sections. In the further part of the experiment, we investigated the *in vivo* effects of tandem shock waves in combination with Photosan and cisplatin on the tumour tissue. The application of tandem shock waves resulted in the inhibition of tumour growth, compared with controls, in both parts of the experiment. The largest inhibition effect was observed in the groups of tandem shock waves combined with Photosan and in the second part with cisplatin.

Introduction

Shock waves have been used in medicine for as long as 20 years (Chaussy et al., 1982). They represent microsecond pressure surges. There is first a sudden pressure jump (up to values about 100 MPa), which is followed by a smaller negative wave (about 10 MPa) (Delius, 2002; Shrivastava and Kailash, 2005). The shock wave is today frequently being used for the disintegration of renal or hepatic concrements with the help of a lithotripsy procedure, where the shock wave is generated beyond the patient's body and concentrated with the help of a reflector into the focus in which the concrement is situated (Beneš et al., 1987, 1989; Beneš, 2000).

Excellent results in the field of the concrement disintegration initiated discussion about further use of shock waves in medicine. For example, they have rather long been used in orthopaedics for the treatment of syndromes involving insertions. However, the greatest interest is being paid to a possible use for damaging tumour tissues. In contrast to concrements, which are different from the surrounding tissue by their acoustic impedance, the tumour tissue has the same acoustic impedance as the surrounding soft tissue. Thus, another approach should be selected, since common generators employed for the disintegration of concrements are designed in such a way that they do not cause clinically important damage to cells (Coleman and Saunders, 1993; Wilbert 2002). Due to that, in our experiments we use a new generator of shock waves developed at the Institute of Plasma Physics of the Czech Academy of Sciences. It is based on the principle of a multichannel discharge, which occurs at a composite electrode. The electrode is situated in strongly conductive water and after a pulsed voltage application, numerous discharge channels are produced, which are distributed throughout the electrode surface (Šunka and Babicky, 1997, 2002; Šunka et al., 2004; Stelmashuk and Šunka, 2006). If we want to achieve the effect in an acoustically homogene-

Received May 20, 2011. Accepted May 26, 2011.

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic under contract No. GA202/09/1151 and grant of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic MSM 0021620808.

Corresponding author: Jan Zeman, Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Salmovská 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 224 965 852; Fax: (+420) 224 965 843; e-mail: jan.zeman@lfl.cuni.cz

Folia Biologica (Praha) 57, 255-260 (2011)

ous medium, it is necessary to use either cavitation effects or two shock waves generated one after another in a short time interval, where the first wave forms an acoustic non-homogeneity and the second one is damped in it (Beneš et al., 1997). In our work, we employ two subsequently generated shock waves, called tandem shock waves (Loske et al., 2002). The new generator was formerly shown to cause haemolysis of erythrocytes and also necrosis of tumour cell lines (Beneš et al., 2001, 2007). *In vivo* effects were demonstrated in rats whose liver tissue was exposed to shock waves. In the work presented here we intended to demonstrate damage to deeper structures without involving surface tissue and structures through which the shock wave passes. The shock wave was focused on a region in the rabbit femoral muscle. Magnetic resonance was used to image the effects. In a further part of the experiment, we investigated *in vivo* effects of the shock wave on B-lymphoma and syngenic sarcoma tissue. The tumour growth over time was also followed and compared with the effects of Photosan and cytostatics.

Material and Methods

The shock waves were generated by a new source, which was based on the multichannel discharge principle. For a scheme of the generator see Fig. 1. The cylindrical composite anode consists of two parts (A1 - \varnothing 60

\times 70 mm, A2 - \varnothing 77 \times 25 mm). Each part of the anode is separately supplied, which makes it possible to switch the two parts with a certain time delay. If they are switched on simultaneously, the shock wave from the part with the larger focus diameter is obtained 5 ms before that from the part having the smaller diameter. The electrode itself is made of stainless steel and coated with a thin layer ($d = 0.2\text{--}0.3$ mm) of porous ceramics produced by plasma spraying. The whole equipment for the shock wave application is divided into two parts, which are separated one from another by an acoustically transparent membrane. The first part is filled with a very conductive salt solution (with specific conductivity of 5–20 mS/cm), in which the composite anode is situated coaxially with the parabolic reflector forming the cathode. The focal point at which the shock waves are aimed is present in the second part of the equipment. The second part is filled with degassed water. The design of the composite anode makes it possible to simultaneously generate many discharge channels, which are homogeneously distributed on the anode. Every discharge channel forms a quasi-spherical pressure wave. A cylindrical pressure wave is obtained by superimposition of these particular waves. The pressure wave is reflected from the reflector to the focal point and is transformed to the shock wave close to it.

Laboratory rabbit, body weight of 3,100 g, was selected as the experimental model. The rabbit was totally

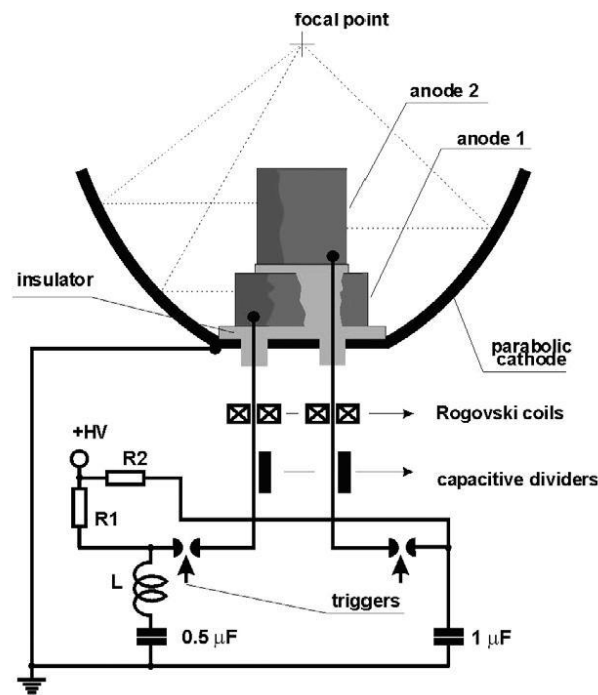


Fig. 1. Shock wave source

anaesthetized and depilated on the hind limb. The animal was then situated into the experimental equipment to have its femoral muscle in the shock wave focus. In total 1,800 tandem shock waves were applied.

MR scanning was provided in the MR tomograph Siemens Magnetom Trio 3 T (Siemens AG, Erlangen, Germany) at the Institute of Clinical and Experimental Medicine. TE and TR times were set as follows: TE = 20 ms and TR = 642 ms. The layer thickness was set to 2 mm. The imaging procedure, in the course of which the rabbit was under anaesthesia, was carried out on the first, third and seventh days after the exposure to shock waves. On the seventh day after the exposure, the animal was dissected and samples for histology were taken.

In the second part of the experiment, we used experimental outbred SD/Cub strain rats. Their body weight ranged between 200 and 220 g. They were administered with T-lymphoma tumour cells in a number of $1 \cdot 10^6$ per rat in the abdominal region. Tumours started growing in all the animals. The rats were divided into the following groups; each group included six animals.

- 1) The first group of rats were exposed to shock waves only.
- 2) The second group of rats were administered intravenously with Photosan (391C 358, Seehof Laboratorium GmbH, Wesselburen, Germany) in the vena caudalis at a dose of 25 mg/kg. After 48 h, the animals were exposed to shock waves.
- 3) The third group of rats included controls.

The shock wave application was carried out in such a way that the rats were first anaesthetized. The tumour tissue was then situated in the focus of shock waves and each animal was exposed to 1,200 tandem shock waves. The tumour volume was measured on the 3rd, 7th, 10th, 14th, 17th and 21st days.

In the third part of the experiment, Lewis strain experimental rats were used. Their body weight ranged between 200 and 250 g. Tumour cells of the syngeneic sarcoma were intradermally administered caudally on the right and left sides. The rats were subsequently divided into groups. Each group included 10 animals.

- 1) The first group of rats were exposed to the effects of shock waves.
- 2) The second group of the animals were administered with cisplatin (50 mg MO1030AC, Medac, Hamburg, Germany) at a dose of 5 mg/kg before the shock wave application. After that they were exposed to the shock waves.
- 3) The third group of the animals were administered with cisplatin at a dose of 5 mg/kg only.

The contralateral tumour served as a control. The method of the shock wave application was the same as in the preceding part with the difference that 120 shocks were applied at a certain angle and 120 shocks were applied at a different angle.

Results

Fig. 2 and Fig. 3 show an MR image of the rabbit femoral muscle in two different sections, transversal and frontal, through the same site. The femoral muscle was selected to make possible a comparison with the femoral muscle on the second limb, which served as a control. The femoral muscle exposed to the shock waves is shown on the right side of the figures. We can see damage to the muscle (the arrows). In the focus of the shock waves a haematoma was developed surrounded by perceptible oedema. The control limb was not damaged. On the third and seventh days, we repeated the imaging procedure and the damage to the muscle tissue



Fig. 2. MR image one day after shock wave exposure, transversal section



Fig. 3. MR image one day after shock wave exposure, frontal section

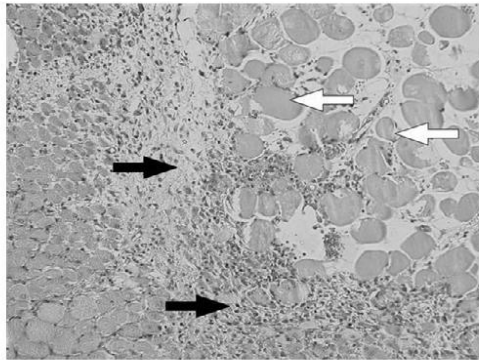


Fig. 4. Histology of damaged femoral muscle. Magnified 200 \times , stained with haematoxylin-eosin

was still visible. The damage was also obvious in a subsequently performed dissection.

Fig. 4 shows a histological section of the damaged femoral muscle with an extensive focus of granulation tissue (black) in the field of subacute dystrophic changes in muscle fibres (white).

In the second part of the experiment, the tumour volume was followed after 1,200 shock waves applied at the intervals described. The volume was already measured before the exposure and on the 3rd, 7th, 10th, 14th, 17th and 21st days after the exposure. The results measured were recorded. Fig. 5 shows average values of the tumour volume on particular days of the measurement. Colour differentiation was used for the three experimental groups.

In rats of this group, the exposure to shock waves delayed the tumour growth compared to controls. In the experimental groups of rats first administered with Photosan and exposed to shock waves 48 h after that, there was a higher inhibiting effect compared to the group exposed to shock waves only.

The highest number of animals were used in the third part of the experiment. Tumour volumes were followed and measured on the 1st, 4th, 7th and 11th days after the shock wave exposure. Average values and standard errors were calculated. Fig. 6 shows particular groups with the use of colour differentiation and the table summarizes the average values of tumour volume in percent of the baseline volume including the standard error.

In all the groups, the tumour growth was delayed compared to controls. The largest effect was observed in the group of cisplatin combined with tandem shock waves. The cisplatin administration alone had a rather lower inhibiting effect compared to the action of the tandem shock wave alone.

Discussion

The results of the first experiment indicate that the tandem shock wave is able to cause local damage inside the tissue even in an acoustically homogeneous muscle medium. This is in agreement with the damage that was described previously (Beneš et al., 2007). The damage is produced at the site of the shock wave focus, and the superficial structures through which the shock wave passes remain intact. The damage is formed in such a way that the first wave produces non-homogeneity in the acoustically homogeneous muscle tissue medium and the second one is subsequently absorbed in it.

Effects of Photosan and double shocks on B-lymphoma growth in subcutaneous layer of SD/CUB outbred rats

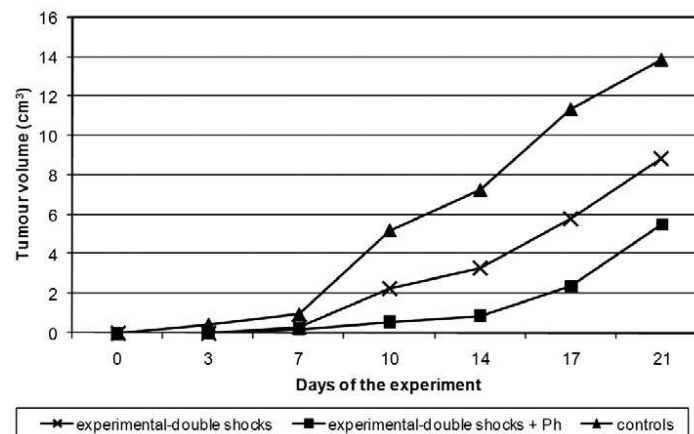


Fig. 5. Tumour volumes on particular days

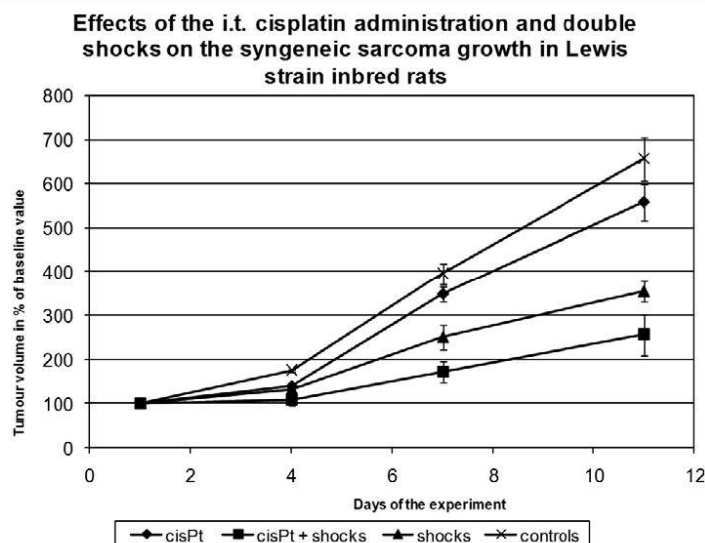


Fig. 6. Tumour volumes on particular days

The results of the second part of the experiment suggest that exposure of growing tumour (T-lymphoma) to shock waves delays tumour growth compared to controls. The delay of the tumour growth is significantly increased by administration of Photosan before the shock wave application. Photosan is a substance which is effective in photodynamic therapy, and it should be elucidated whether substances exerting effects in photodynamic therapy may also be sensitive to cavitations.

The third part is of importance not only because their result demonstrates an effect at least comparable with cisplatin, but particularly by the number of tumour types investigated.

The results of the third part indicate that the tandem shock wave is able to damage the tumour tissue and thus delay the tumour growth. An even higher effect is achieved in combination with cisplatin. The approach based on the application of these shock waves is still at the experimental stage only, but this is the only currently known type of energy that can be concentrated in a small volume without damaging the surrounding tissues, and the question remains whether the toxic effects of tandem shock waves occur in the focus, or molecules are activated by cavitations, or micelles containing the cytostatic are involved.

References

- Beneš, J., Šunka, P., Kordač, V., Jirsa, M., Štuka, C., Mirejovský, P. (1987) Preclinical verification of possible extracorporeal lithotripsy of gall stones in experimental animals. *Sb. Lek.* **89**, 129-133. (in Czech)
- Beneš, J., Štuka, C., Chmel, J., Kordač, V., Šunka, P., Simon, V., Jansta, J., Zabka, J., Rychlík, I., Tluchoř, Z. (1989) First experience with a Czechoslovak device for the treatment of renal concrements by lithotripsy with shock waves. *Prakt. Lek.* **69**, 884-887. (in Czech)
- Beneš, J., Štuka, Č., Fořtová, H., Chmel, J., Šunka, P., Klener, P. (1997) Biological effects of interacting shock waves. A model study of effects of Irv with the use of the determination of the erythrocyte haemolysis. *Sb. Lek.* **98**, 277-282. (in Czech)
- Beneš, J. (2000) *Introduction of a New Lithotripter in Clinical Practice and Unusual Applications of Shock Waves. Habilitation Thesis.* First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague. (in Czech)
- Beneš, J., Šunka, P., Hani, A. B. (2001) Study of haemolysis after action of shock wave produced by a new multichannel discharge method. *Sb. Lek.* **102**, 29-35. (in Czech)
- Beneš, J., Šunka, P., Králová, J., Kašpar, J., Poučková, P. (2007) Biological effects of two successive shock waves focused on liver tissues and melanoma cells. *Physiol. Res.* **56**, S1-S4.
- Chaussy, C., Schmiedt, E., Jocham, D., Brendel, W., Forssmann, B., Walthert, V. (1982) First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J. Urol.* **127**, 417-420.
- Coleman, A. J., Saunders, J. E. (1993) A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. *Ultrasonics* **31**, 75-89.
- Delius, M. (2002) Twenty years of shock wave research at the Institute for Surgical Research. *Eur. Surg. Res.* **34**, 30-36.
- Loske, A. M., Prieto, F. E., Fernandez, F., van Cauwelaert, J. (2002) Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. *Phys. Med. Biol.* **47**, 3945-3957.
- Shrivastava, S. K., Kailash. (2005) Shock wave treatment in medicine. *J. Biosci.* **30**, 269-275.

- Stelmashuk, V., Šunka, P. (2006) Mutual interaction of two shock waves with a different time delay. *Czech. J. Phys.* **56**, B396-B400.
- Šunka, P., Babicky, V. (1997) Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Czech Republic. Patent Document 1997-08-13.
- Šunka, P., Babicky, V. (2002) Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Czech Republic. Patent Document 2002-08-14.
- Šunka, P., Babicky, V., Člupek, M., Fuciman, M., Lukeš, P., Šimek, M., Beneš, J., Locke, B., Majcherova, Z. (2004) Potential applications of pulse electrical discharges in water. *Acta Phys. Slovaca* **54**, 135-145.
- Wilbert, D. M. (2002) A comparative review of extracorporeal shock wave generation. *BJU. Int.* **90**, 5, 507-511.

LUKEŠ, Petr, Pavel ŠUNKA, Petr HOFFER, Vitaliy STELMASHUK, Jiří BENEŠ, Pavla POUČKOVÁ, Marie ZADINOVÁ a Jan ZEMAN. Generation of Focused Shock Waves in Water for Biomedical Applications [online]. s. 403-416

Kniha:

MACHALA, Zdenko., Karol. HENSEL a Yuri. AKISHEV. Plasma for bio-decontamination, medicine and food security. New York: Springer, c2012. NATO science for peace and security series. ISBN 9400728522.

V této části knihy jsou prezentovány účinky tandemových rázových vln. Jsou zde popsány tandemové rázové vlny, její fyzikální principy a fyzikální principy zdroje tandemových rázových vln. Biologické účinky tandemové rázové vlny generované novým zdrojem zde byly prezentovány několika výsledky. *In vitro* na poškození buněk melanomu B-16, *in vivo* na poškození stehenního svalu králíka v hloubce, podobně jako v předchozí práci a také zpožděním růstu sarkomu u potkanů v porovnání s kontrolní skupinou.

Generation of Focused Shock Waves in Water for Biomedical Applications

Petr LUKES¹, Pavel SUNKKA¹, Petr HOFFER¹, Vitaliy STELMASHUK¹, Jiri BENES²,
Pavla POUCKOVA², Marie ZADINOVA², Jan ZEMAN²

¹*Institute of Plasma Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Prague, Czech Republic*

²*First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic*

Abstract. The physical characteristics of focused two-successive (tandem) shock waves (FTSW) in water and their biological effects are presented. FTSW were generated by underwater multichannel electrical discharges in a highly conductive saline solution using two porous ceramic-coated cylindrical electrodes of different diameter and surface area. The primary cylindrical pressure wave generated at each composite electrode was focused by a metallic parabolic reflector to a common focal point to form two strong shock waves with a variable time delay between the waves. The pressure field and interaction between the first and the second shock waves at the focus were investigated using schlieren photography and polyvinylidene fluoride (PVDF) shock gauge sensors. The largest interaction was obtained for a time delay of 8–15 μ s between the waves, producing an amplitude of the negative pressure phase of the second shock wave down to \sim 80 MPa and a large number of cavitations at the focus. The biological effects of FTSW were demonstrated *in vitro* on damage to B16 melanoma cells, *in vivo* on targeted lesions in the thigh muscles of rabbits and on the growth delay of sarcoma tumors in Lewis rats treated *in vivo* by FTSW, compared to untreated controls.

1. Introduction

During the past several decades, non-equilibrium atmospheric pressure plasmas generated by electrical discharges in gases and liquids were shown to be efficient treatment method in a variety of environmental applications, such as air pollution control (involving removal of NO_x, SO₂ and volatile organic compounds), removal of organic contaminants from water, or treatment of solid surfaces [1, 2]. More recently, research on the biological and medical applications of these plasmas become a rapidly developing field with many exciting and promising results. New successful or potential applications of plasmas in medicine have been demonstrated in electrosurgery, the treatment of skin diseases and dental cavities, plasma-assisted blood coagulation, the sterilization of surfaces and medical instruments, and many other applications [3-5]. Depending on the type of plasma, five main plasma agents (i.e. heat, electric field, ultraviolet radiation, charged particles, and neutral reactive species) may be involved in the plasma interaction with living matter. Chemical effects induced by the reactive oxygen species (e.g., atomic oxygen, metastable oxygen molecules, ozone, and OH radicals) and reactive nitrogen species are generally accepted to play the dominant role in the atmospheric air plasma systems [4-6]. Physical processes, such as ultraviolet (UV) photolysis, are generally not believed to participate significantly in the inactivation processes of these plasmas [6].

On the other hand, for underwater plasmas, physical processes, such as high electric field, UV radiation and shock waves, may significantly contribute to the biological effects (e.g., the inactivation of microorganisms in water) in addition to the chemical effects that are largely attributed to OH radicals and hydrogen peroxide [7-10]. For underwater plasmas initiated by exploding fine wires, it was shown that up to 28% of the energy transferred into the plasma (1.5 kJ/pulse) is converted into UV radiation with a peak radiant power of 200 MW [11]. Ching *et al.* [10] estimated the UV light intensity generated by the pulsed arc discharge to be on the order 10^6 W/cm² and determined the UV radiation to be the main disinfection process in the discharge. The significant emission of UV light has also been demonstrated for pulsed corona discharge in water, with a pulse energy on the order of several J/pulse. UV radiation was estimated to contribute about 30% of the overall plasma inactivation of bacteria *Escherichia coli* induced by electrical discharge in water [12].

In addition to UV radiation, a significant amount of the discharged energy in underwater discharges (especially pulsed electrohydraulic sparks/arcs with the pulse energies on the order of several kJ/pulse) is transformed into shock waves in water. Gilliland and Speck [13] investigated the bactericidal action produced by electrohydraulic shock waves generated by submerged high-voltage spark discharge already in the 1960s. The authors concluded that there were no indications of death caused by the mechanical disruption of cellular integrity. Later studies, however, demonstrated significant role for shockwaves in the electrohydraulic discharge treatment of water when used for sludge decontamination, killing of bacteria or Zebra mussel removal from the intake pipes of water treatment facilities [14]. Li *et al.* [15, 16] observed the mechanical rupture of intracellular gaseous vacuoles of cyanobacteria cells exposed to underwater streamer discharge, which was caused presumably by the physical effects of shock waves induced by the discharge.

Underwater shock waves are also used in extracorporeal shockwave lithotripsy (ESWL) to non-invasively disintegrate kidney stones and gallstones. In fact, ESWL is one of the most successful applications of shock waves in medicine. Since the mid-1980s, lithotripsy has been in clinical use worldwide for treating kidney stones and continues to be the favored method for uncomplicated, upper urinary tract calculi, even with the advent of percutaneous surgical methods. The treatment involves focusing shock waves generated by the ESWL device (lithotripter) outside of the patient's body to disintegrate the stone at a depth in tissue. The targeted stone is located at the shock wave focus, and hundreds to thousands of shock wave pulses are delivered to comminute the stone. Acoustic coupling with the patient is achieved through water baths or liquid-filled pillows. After the urinary stone treatment, the stone debris passes through the urinary tract. In the case of gallstones, the stones are chemically dissolved. A typical pressure waveform at the lithotripter focus in water consists of a leading shock wave front (compressive wave) with a peak positive pressure in the range of 30–150 MPa and a phase duration of 0.5–3 μs, followed by a tensile wave with a peak negative pressure down to –20 MPa and a duration of 2–20 μs [17].

Over 40 models of clinical lithotripters are commercially available worldwide (electrohydraulic, electromagnetic and piezoceramic). In electrohydraulic lithotripters, an underwater high-current spark discharge between a pair of electrodes is generated at the focus of the ellipsoidal reflector, and the emerging spherical shock wave produced by the plasma at the spark gap is concentrated on the kidney stone located at the second focus of the ellipsoid [18]. At the end of the 1980s, one of modified versions of the electrohydraulic type of lithotripter was developed at the Institute of Plasma Physics

AS CR [19-21]. These generators are used in the lithotripters Medilit (produced by the company MEDIPO, Brno, Czech Republic) at approximately 20 hospitals in the Czech and Slovak Republics [22]. So far, more than 120 000 patients have been successfully treated with these devices.

The success of the ESWL stimulated research on the applications of focused shock waves (FSW) in other branches of medicine. Shock waves are used in orthopedy for the fracture healing, the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases [23]. Great attention has been on to the role of cavitation in ESWL-induced biological effects on soft tissues and the possible treatment of some types of cancers. It was initially studied to identify possible side effects of the lithotripsy therapy, such as haematuria, renal colic, perirenal and intrarenal hematomas, pancreatitis and arrhythmias [17]. The evidence suggests that cavitation is an important factor in lithotripsy. Stones initially break by spall, and then erosion grinds the fragments into a size suitable for the patient to pass [18]. Micro-inhomogeneities or microbubbles in the fluid (e.g., water or urine) that are located in the vicinity of the focal zone may produce cavitations, which may interact with the stone but also with the cells/tissue. The threshold for cavitation in water is approximately 0.5 MPa; however, this depends on the duration of the tensile pulse [17].

To accelerate stone comminution and/or reduce/enhance tissue damage, special generators of shock waves and a focused high-intensity ultrasound (HIFU) are being designed to modify the cavitation field and to control cavitation. The corresponding methods manipulate the timing between pulses or modify the lithotripter waveform by altering the reflector material in the electrohydraulic or electromagnetic devices or by reversing the polarity in the piezoceramic devices [24-29]. Several authors have reported controlling bubble growth and collapse by so-called tandem shock waves, which intensify the collapse of cavitation bubbles by sending a second shock wave at the moment before the bubbles produced by the first shock wave begin to collapse [30, 31]. Most of these experimental studies demonstrated a significant effect on stone comminution and/or tissue injury, attributed in large part to the modified cavitation field. Shock waves have been shown to cause significant cytotoxic effects in tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, it was discovered that shock waves induce necroses in tumors, which delay tumor growth. However, despite the demonstrated effectiveness in experimental tumors, the mechanism of interaction between ultrasonic shock waves and tumors is unknown. Both positive and negative pressures, and inertial cavitation especially, are thought to play major roles in the interaction of lithotripter-induced shock waves with biological tissue [29]. The optimal shock wave profile and pulse combination have yet to be established.

One reason is a fundamental difference in the acoustic impedance of kidney stones and tissue. A kidney stone represents a relatively strong acoustical non-homogeneity in comparison with the surrounding liquid and soft tissues. The non-homogeneity localizes the action of the shock wave because the shock wave propagates through soft tissue and liquid with a small attenuation almost without interacting with them. In the case of cancer tissue, no acoustical non-homogeneities exist between cancer and healthy tissues. The localized action of the shock waves in an acoustically homogeneous medium (soft tissue) is attributed to the cavitations produced by FSW or HIFU. Collapsing cavitations create strong secondary shock waves of nanosecond duration (tens of micrometers in scale) that can interact with cell scale-structures. Local thermal effects (on the order of μm dimensions) accompanying cavitations collapse (sonoluminescence) and the production of chemical radicals may also play a role in cell

damage. In general, the intensity of the secondary shock wave and the velocity of the microjet are assumed to depend on the initial bubble radius. The larger the bubbles grow (> 1 mm), the more violent their collapse, which may be more suitable for stone or tissue damage. Small bubble sizes (< 200 μm) that are comparable to the size of cells may be used to enhance shock wave-mediated drug delivery and gene transfer. In the case of HIFU, the dynamics of cavitation can be varied by the frequency and amplitude of the wave. In the case of tandem shock waves, the second wave can interact with the cavitation produced by the first wave in a different phase of its evolution. Thus, by using tandem shock waves, inertial bubble interactions may be tailored for different biomedical applications [26].

To enhance the cavitations and the interaction of the shock waves with soft tissue, we have developed a novel generator of focused shock waves in water, which is based on the production of cylindrical pressure waves generated by underwater multichannel electrical discharges using one or two porous ceramic-coated (composite) cylindrical metallic electrodes of different diameter [32-35]. The primary pressure waves generated by the underwater plasma channels at the surface of the composite electrode(s) are focused by a metallic parabolic reflector to a common focal point and only close to the focus are transformed into a strong shock wave. Depending on the power supply arrangement, we are able to generate either one shock wave or two successive shock waves focused to a common focal point (i.e., focused tandem shock waves, FTSW) with an adjustable delay between the waves on the order of microseconds. We have found that at time interval of 8–15 μs between the two shock waves, the second original pressure wave is strongly attenuated at the focal region and reaches the focus as a rarefaction wave. The amplitude of the pressure wave is up to 100 MPa, while the amplitude of the rarefaction wave falls down to -80 MPa, producing thus a large number of cavitation bubbles at the focus. The collapsing cavitation bubbles produce secondary, short-wavelength shock waves and fast microjets that can interact with cell-scale structures and soft tissues. In this work, characteristics of the focused tandem shock waves in water and their biological effects are presented.

2. Apparatus and methods

Fig. 1 shows the scheme for a generator of focused tandem shock waves in water. The generator is divided by an acoustically transparent membrane (Mylar foil, thickness 100 μm) into two parts. The first part, which is filled with a highly conductive saline solution (on the order of tens of mS/cm), consists of two composite metallic cylindrical high-voltage electrodes of different diameter d and length h (A1: $d=90$ mm, $h=17$ mm; A2: $d=60$ mm, $h=55$ mm) placed along the axis of the outer metallic parabolic reflector. The composite anode consists of a metallic cylindrical electrode covered with a thin porous ceramic layer deposited by thermal plasma spraying. The role of the ceramic layer is to redistribute the electric field on the electrode during the pre-discharge phase. Due to the differences in conductivity and permittivity between the water and the ceramic layer, the electric field strength on the surface of the composite electrode is many times enhanced in comparison with a metallic electrode of the same dimensions. This setup allows for the simultaneous generation of a large number of filamentary discharge channels distributed almost homogeneously around the entire surface of the composite electrode at a moderate applied voltage [36].

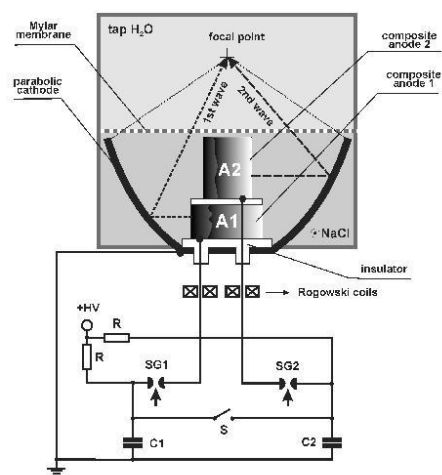


Fig. 1. The scheme of the generator of focused tandem shock waves in water.

A pulsed high voltage of positive polarity was applied to the composite electrodes using a pulse power supply that consists of two capacitors (C1, C2) charged up to 30 kV and two triggered spark gaps (SG). The spark gap switches were triggered either at the same time (switch S was closed) or with a variable delay (switch S was open), allowing us to produce either a single shock wave or two successive shock waves focused to a common focal point (i.e., focused tandem shock waves) with an adjustable delay between the waves. The spark gaps were triggered by 12 kV/ μ s pulses produced by discharging the capacitors through the thyratrons. The thyratrons were triggered by a dual-channel pulse generator with a variable time delay (100 ns step) between the channels. The focal point of the parabolic reflector is situated in the second part of the generator, which is filled with tap water and is located 5 cm from the Mylar membrane. Each discharge channel formed at the composite electrode creates a semi-spherical pressure wave in the saline solution. By superposition of the waves, a cylindrical pressure wave propagating from the anode is formed. The primary cylindrical pressure wave is focused by a reflector. Near the focus, this wave is transformed into a strong shock wave. The amplitude and, to some extent, the waveforms of the shock waves, at the focus can be controlled by the anode surface areas, the discharge circuit parameters and the solution conductivity, which play a decisive role in the characteristics of underwater plasmas. Higher conductivity leads to higher power density in the discharge channel, and this results in an increase in the plasma electron density, a higher plasma temperature and more intensive pressure wave evolution from the discharge [32]. In this work, saline solution conductivity of 18 mS/cm was used for the generation of the discharge at the composite electrode, which was based on results from previous work that demonstrated that the given experimental setup generates the highest amplitude of the pressure wave at this conductivity [33].

Schlieren photography was used to acquire time-resolved images of the pressure field induced by the shock wave(s) in the focal region. The Nd:YAG pulsed laser beam [wavelength=532 nm, pulse width=10 ns full width at half maximum (FWHM)] was expanded to a diameter of 60 mm and applied through a focal region as an illumination light source in a perpendicular direction to the shockwave propagation. A camera was set up to acquire the Schlieren photographs of the focal region at various time delays after the discharge ignition by the triggered spark gap switch SG1 and synchronized with the firing of the laser beam via a delay generator. Consequently, the pressure field and the pressure waveforms of the shock waves produced at the focus were measured by polyvinylidene fluoride (PVDF) shock gauge sensors (Model S25_04, Piezotech SA, France). The pressure field at the focal region was mapped point-by-point, and the focal volume with the dimensions $\varnothing 2.5 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$ long (FWHM) was determined [32, 33]. For observation of the dynamics of the cavitation at the focal region, a microscope and a PCO 12-bit charge-coupled device (CCD) Sencicam camera were used. Microscope magnifications of $10\times$ to $25\times$ were used. The focal area was illuminated by a xenon lamp, which was fed by a high-voltage capacitor switched by a thyatron. The ignition of the lamp was synchronized with the spark gap switches at various time delays. The exposure time of the PCO camera was 400 ns. This exposure time was sufficient to obtain sharp and bright photos.

B16 melanoma syngeneic cells were grown in a tissue culture medium (6×10^6 cells). The viability of the B16 melanoma cells after exposure to FTSW was examined using the trypan blue staining method and by optical imaging microscopy. Tumor growth delay experiments were performed with Lewis strain rats inoculated subcutaneously with R5-28 malignant cells (2.5×10^5 cells/rat) [37]. The time of the tumor growth latency and the volume of the growing sarcoma in the Lewis rats were followed throughout the experiment and compared with the control (not exposed) tumors (4 animals in each group). The tumor size was measured with Vernier calipers. The tumor volumes V at particular time intervals were calculated by the formula $V = a \cdot b^2 \cdot \pi / 6$, where a and b are the tumor length and tumor width, respectively. FTSW-induced lesions in rabbits' thigh muscles were examined by magnetic resonance imaging (MRI). Prior to exposure, the rabbits were anesthetized and depilated on their abdomen. The scanning procedure was carried out on an MR tomograph Siemens Magnetom Trio 3T at the Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. The echo (TE) and repetition (TR) times were set as follows: TE=20 ms and TR=642 ms. The slice thickness of the MRI scans was set to 2 mm. The imaging procedure was carried out on the first, second and seventh day after the exposure to shock waves. The rabbit was under anesthesia during imaging.

3. Characteristics of focused tandem shock waves in water

The pressure field at the focal region formed by the focused tandem shock waves was visualized by Schlieren photography. Fig. 2 shows the pressure field for three different situations. Figs. 2a and 2b show the pressure field when only the first or the second waves were generated, respectively. The waves propagate from right to left in these pictures. The white cross-like spot in the picture specifies the region of the highest pressure of the focused shock wave with a sharp front of the shock waves. The convergence angle corresponds to the reflector geometry and the position of the composite electrode in the reflector. The circle in the picture indicates a secondary

short-wavelength spherical shock wave created by the collapsing cavitation bubbles. Figs. 2a and 2b show that both shock waves, if produced separately (or with a long time delay between them), generated only a small number of cavitations at the focus. Fig. 2c shows the situation when two successive waves interacted (time delay of 15 μs). The second wave is heavily damped in the focal region, and this created a very complex pressure field with a large number of secondary short-wavelength shock waves from the collapsing cavitation. A shock wave duration of approximately 70 ns and a corresponding wavelength on the order of 0.1 mm were estimated, which are capable of interacting with cell-scale structures.

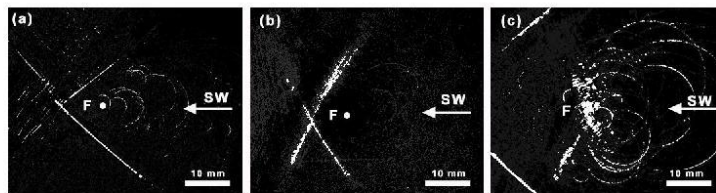


Fig. 2. Schlieren photographs of the focal region: a) first shock wave only, b) second shock wave only, and c) two interacting shock waves. The time interval between the waves was 15 μs . The direction of the shock wave (SW) propagation was from the right to the left (as depicted by the arrow).

Fig. 2 demonstrates that the degree of interaction of the second shock wave with the first one depended on the time delay between the waves. Fig. 3 shows the pressure waveforms of two interacting waves arriving at the focus with different time delays τ_d . These measurements indicate that there are three different phases in the interaction. The first and second phases are demonstrated in Fig. 3a. A relatively short delay between the shocks (time interval of 8-15 μs) resulted in the second pressure wave creating a large amplitude rarefaction wave at the focus instead of an originally positive pressure wave. With increasing time intervals between the waves, the amplitude of the second shock wave rapidly decreased. For the interval $50 \mu\text{s} < \tau_d < 500 \mu\text{s}$, the second shock wave was totally damped. The second shock started to propagate as a pressure wave for $\tau_d > 600 \mu\text{s}$, and its propagation was fully re-established only at time delays above 1 ms (Fig. 3b). This scenario can be explained by assuming that the cavitation bubbles formed by the first shock wave served as cavitation nuclei for the second shock wave.

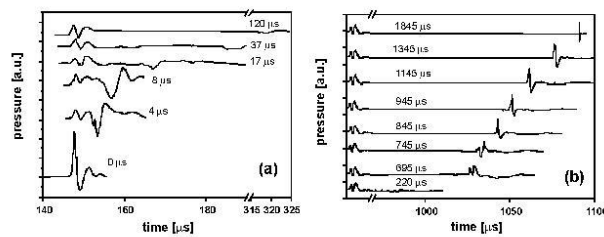


Fig. 3. The pressure waveforms of the two interacting shock waves measured at the focus for different time delays between the first and the second shock waves.

Because the cavitation nuclei dissipate over time, the interval between the shock waves affected the total number of cavitations and the amplitude of the negative pressure. Fig. 3a shows that the largest interaction between the first and second wave was obtained for a time delay of 8-15 μs , resulting in the maximum negative phase of the pressure wave of second shock wave and a large number of cavitation. With increasing time delay between the waves, the second wave propagated through the perturbed medium, and its energy was absorbed by the collapsing cavitations. Therefore, the influence of the first shock wave on the second wave was insignificant at longer time delays ($\tau_d > 600 \mu\text{s}$) when most of the cavitations produced by the first wave were quenched.

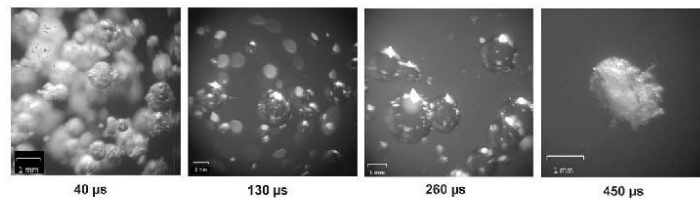


Fig. 4. The dynamics of cavitations at the focal region after the interaction of the focused tandem shock waves for a time delay of 10 μs between the waves.

An example of the evolution of the cavitation bubbles formed in water at the focus after the interaction of the focused tandem shock waves for a time delay of 10 μs is shown in Fig. 4. The growth of the bubbles lasted for about 200-250 μs (reaching a maximum bubble radius $\sim 1.3 \text{ mm}$), and then the bubbles began to collapse.

4. Biological effects of focused tandem shock waves in water

The presented FTSW generator was used to investigate the biological effects of focused tandem shock waves. A time delay between the waves of 10 μs was used based on previous experiments, which showed that the largest interaction of the waves occurred at this condition (i.e., 8-15 μs). The amplitude of the pressure (positive) wave was 80 MPa with a duration of 0.7 μs . The amplitude of the rarefaction (negative) wave was -80 MPa with a duration of 2 μs . These waves produced a large number of cavitations at the focus (see Figs. 2-4). The dimension of focal volume was $\varnothing 2.5 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$ long (FWHM) [32, 33]. The applied voltage was 30 kV. The charging capacity was 0.8 μF . The pulse repetition frequency of the applied tandem shock waves was 0.7 Hz.



Fig. 5. Optical micrographs of the melanoma B16 cells exposed *in vitro* to different numbers of focused tandem shock waves: a) control, b) 200 shocks and c) 400 shocks.

Fig. 5 shows optical micrographs of melanoma B16 cells exposed *in vitro* to a different number of tandem shocks. Polypropylene Eppendorf vials with a suspension of melanoma cells (1.5 ml) were placed at the focus of the generator and exposed to the shock waves. Fig. 5 demonstrates that exposure of carcinomas cells to the tandem shocks resulted in cell membrane perforation and total damage (fragmentation) of the cells at a higher dose. The subsequent analysis of the cell viability of the B16 melanoma cells confirmed greater damage to the cells with an increasing number of applied tandem shock waves (data not shown).

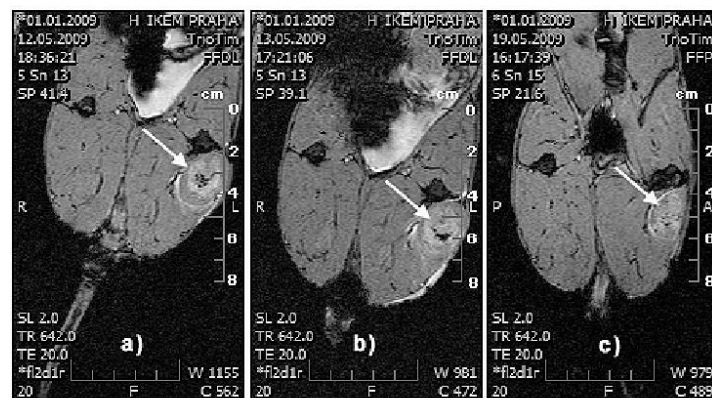


Fig. 6. MRI images of targeted lesions in a rabbit's thigh muscle (marked by the white arrow) over time induced *in vivo* by applying 900 focused tandem shock waves. The left side in each image is a control showing the non-exposed muscle. a) 1st day, b) 2nd day, and c) 7th day after FTSW exposure.

Consequently, effects of focused tandem shocks on soft tissue were examined *in vivo*. Fig. 6 shows MRI images of a targeted lesion in a rabbit's thigh muscle caused by applying 900 tandem shocks and its progress for seven days after FTSW exposure. The left side of each image is a control showing the non-exposed muscle. The lesion in the tissue is clearly visible as a dark spot of hematoma surrounded by a bright area of accompanying edema (marked by the white arrow). The differences in the shape and size of the hematoma and edema over time can be seen. After one week, the hematoma disappeared, and the edema area was reduced, indicating recovery of the injured tissue in the shock wave impact area. The larger size of the hematoma (~ \varnothing 5 mm) compared to the focal area of the FTSW (~ \varnothing 2.5 mm) can be explained by the changes in the acoustical properties of the treated tissue with an increasing number of applied shocks, which leads to enhanced damage of the tissue at the targeted area by the shock waves. Additional MRI analysis revealed that the extent of the damage in the direction of the shock propagation is about 15 mm. The subsequent histological examination of the injured femoral muscle showed an extensive focus of granulation tissue in the field of subacute dystrophic changes in the muscle fibres with a very sharp transition between the damaged and non-exposed tissue (not shown). These results showed that tandem shocks are capable of causing localized lesions at a predictable location deep within soft tissue at the focus without damaging tissue located in front of the focal point. This

finding is important in terms of the potential biomedical applications of tandem shock waves, such as in treatment of tumors that are inoperable or very difficult to be treated (e.g., many liver metastases and pancreatic tumors).

Fig. 7 shows the *in vivo* effect of FTSW on the growth of sarcoma tumors in rats of the Lewis strain. R5-28 malignant cells of the syngeneic sarcoma were subcutaneously applied caudally on the right and left sides of Lewis rats and tumors were allowed to grow for 35 days, after which the tumors were treated by FTSW. The tumors on the left sides of the rats were exposed to 240 shocks by placing the anesthetized animals in the water bath of the FTSW generator. The contralateral tumor served as a control. Shock waves were applied to the tumors from two different angles with 120 shock waves at each angle. Fig. 7 shows that, in comparison with the intact controls, the growth of the exposed tumors was significantly delayed.

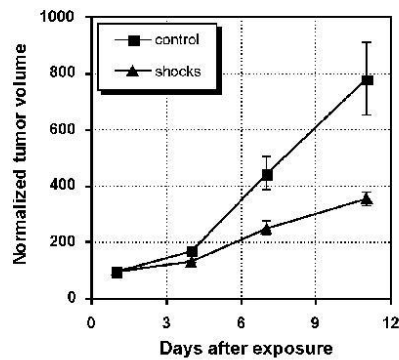


Fig. 7. The growth of sarcoma tumors in Lewis rats after *in vivo* exposure to 240 tandem shock waves.

Considering the tumor size and much smaller size of the shock wave focus area (~ order of magnitude difference), the scanning of the tumor by shock waves can be used to increase the efficiency and to enlarge the localized effect of shock wave exposure. Varying the number of applied shocks can also be used. In our case, a higher dose (~ 400 shocks) resulted in mechanical damage to the tumor tissue. Thus, repeated treatment of the tumor by a smaller number of shocks over several days might be considered. Apart from mechanical effects, the shock waves may also contribute to tumor treatment due to cavitation-induced sonochemical effects by the intracellular formation of radicals. Combining the effect of shock waves with anticancer drugs may also be possible (e.g., to enhance the chemotherapy efficiency by increasing the permeability of tumor cells membranes to cytostatic drugs by the shockwaves or through the sonodynamic activation of cytotoxic drugs by cavitation induced by FTSW). Research on the possible synergetic effects treatment with shock waves in conjunction with other therapeutic methods used in cancer treatment is in progress.

5. Conclusions

The physical principles of a novel generator of focused tandem shock waves in water have been presented. FTSW were generated with a variable time delay between the waves using underwater multichannel electrical discharges in a highly conductive saline solution using two porous ceramic-coated cylindrical electrodes of different diameter and surface area. The largest interactions were obtained for a time delay of 8–15 μ s between the waves, producing an amplitude for the negative pressure phase of the second shock wave down to -80 MPa and a large number of cavitations at the focus. The biological effects of FTSW were demonstrated *in vitro* on damage to B16 melanoma cells, *in vivo* on targeted lesions in the thigh muscles of rabbits and on the growth delay of sarcoma tumors in Lewis rats treated *in vivo* by FTSW compared to untreated controls.

Acknowledgements

This work was supported by the Czech Science Foundation (project No. 202/09/1151) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 0021620808). The authors would like to thank Dr. V. Horak from the Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR for providing R5-28 malignant cells for the experiments with the Lewis rats, Dr. V. Herynek and Dr. M. Dezortova from the Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic for the MRI analysis of the lesions in the rabbits' thighs and Dr. J. Kralova from the Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic for optical micrographs of the melanoma B16 cells.

References

1. Kim HH (2004) Nonthermal plasma processing for air-pollution control: A historical review, current issues, and future prospects. *Plasma Proc Polym* 1:91-110
2. Locke BR, Sato M, Sunka P, Hoffmann MR and Chang JS (2006) Electrohydraulic discharge and nonthermal plasma for water treatment. *Ind Eng Chem Res* 45:882-905
3. Stalder KR, McMillen DF, Woloszko J (2005) Electrosurgical plasmas. *J Phys D: Appl Phys* 38:1728-1738
4. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A (2008) Applied plasma medicine. *Plasma Proc Polym* 5:503-533
5. Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Friedman A (2009) Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11:115020
6. Laroussi M (2005) Low temperature plasma based sterilization: overview and state of the art. *Plasma Proc Polym* 2:391-400
7. Sato M, Ohgiyama T, Clements JS (1996) Formation of chemical species and their effects on microorganisms using a pulsed high-voltage discharge in water. *IEEE Trans Ind Appl* 32:106-112
8. Efremov NM, Adamiak BYu, Blochin VI, Dadashev SJa, Dmitriev KI, Semjonov VN, Levashov VF, Jusbashev VF (2000) Experimental investigation of the action of pulsed electrical discharges in liquids on biological objects. *IEEE Trans Plasma Sci* 28:224-229
9. Abou-Ghazala A, Katsuki S, Schoenbach KH, Dobbs FC, Moreira KR (2002) Bacterial decontamination of water by means of pulsed-corona discharges. *IEEE Trans Plasma Sci* 30:1449-1453
10. Ching WK, Colusi AJ, Sun HJ, Neelson KH, Hoffmann MR (2001) *Escherichia coli* disinfection by electrohydraulic discharges. *Environ Sci Technol* 35:4139-4144
11. Robinson JW, Ham M, Balaster AN (1973) Ultraviolet radiation from electrical discharges in water. *J Appl Phys* 44:72-75

12. Lukes P, Chupek M, Babicky V, Sunka P (2008) Ultraviolet radiation from pulsed corona discharge in water. *Plasma Sources Sci Technol* 17:024012
13. Gilliland SE, Speck ML (1967) Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock. *Appl Microbiol* 15:1038-1044
14. Zastawny HZ, Romat H, Karpel vel Leitner N, Chang JS (2004) Pulsed arc discharges for water treatment and disinfection. In: *Electrostatics 2003*, pp. 325. IOP Publishers, Bristol, UK
15. Li Z, Sakai S, Yamada Ch, Wang D, Chung S, Lin X, Namihira T, Katsuki S, Akiyama H (2006) The effects of pulsed streamerlike discharge on cyanobacteria cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 34:1719-1725
16. Li Z, Ohno T, Sato H, Sakugawa T, Akiyama H, Kunitomo S, Sasaki K, Ayukawa M, Fujiwara H (2008) A method of water-bloom prevention using underwater pulsed streamer discharge. *J Environ Sci Health A* 43:1209-1214
17. Coleman AJ, Saunders JE (1993) A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. *Ultrasonics* 31:75-89
18. Bailey MR, Khokhlova VA, Sapozhnikov OA, Kargl SG, Crum LA (2003) Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound (a review). *Acoust Phys* 49:369-388
19. Benes J, Sunka P, Kordac V, Barta Z, Stuka C, Figura Z, Jirsa M (1988) Apparatus for clinical performance of extracorporeal lithotripsy. UK Patent GB2199249
20. Sunka P, Babicky V, Barta Z, Benes J, Kolacek K, Kordac V, Stuka C (1990) Method and apparatus for adjusting the spark gap of a non-invasive lithotripter. EU Patent EP0349915
21. Stuka C, Sunka P, Benes J (1995) New discharge circuit for efficient shock wave generation. In: Brun R, Dumitrescu LZ (eds) *Shock Waves @ Marseille III*, pp. 455-458, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
22. MEDIPO-ZT, s.r.o. (Ltd.), <http://www.medipo.cz/litotripter.htm>
23. Haupt G (1997) Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J Urol* 158: 4-11
24. Bailey M R, Blackstock D T, Cleveland R O, Crum L A (1998) Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. I. Acoustic fields. *J. Acoust. Soc. Am.* 104: 2517-2524
25. Bailey MR, Blackstock DT, Cleveland RO, Crum LA (1999) Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields. *J Acoust Soc Am* 106:1149-1160
26. Zhong P, Lin H, Xi X, Zhu S, Bhogte E S (1999) Shock wave-inertial microbubble interaction: Methodology, physical characterization, and bioeffect study. *J Acoust Soc Am* 105:1997-2009
27. Sokolov DL, Bailey MR, Crum LA (2001) Use of a dual-pulse lithotripter to generate a localized and intensified cavitation field. *J Acoust Soc Am* 110:1685-1695
28. Sokolov DL, Bailey MR, Crum LA (2003) Dual-pulse lithotripter accelerates stone fragmentation and reduces cell lysis in vitro. *Ultrasound Med Biol* 29:1045-1052
29. Hüber P, Debus J, Jochle K, Simiantonakis I, Jenne J, Rastert R, Spoo J, Lorenz WJ, Wannenmache M (1999) Control of cavitation activity by different shockwave pulsing regimes. *Phys Med Biol* 44:1427-1437
30. Loske AM, Prieto FE, Fernandez F, van Cauwelaert J (2002) Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. *Phys Med Biol* 47:3945-3957
31. Alvarez UM, Ramirez A, Fernandez F, Mendez, Loske AM (2008) The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria. *Shock Waves* 17:441-447
32. Sunka P (2001) Pulse electrical discharges in water and their applications. *Phys Plasmas* 8:2587-2594
33. Sunka P, Babicky V, Clupek M, Benes J, Pouckova P (2004) Localized damage of tissues induced by focused shock waves. *IEEE Trans Plasma Sci* 32:1609-1613
34. Sunka P, Babicky V, Clupek M, Fuciman M, Lukes P, Simek M, Benes J, Majcherova Z, Locke BR (2004) Potential applications of pulse electrical discharges in water. *Acta Phys Slovaca* 54:135-145
35. Sunka P, Stelmashuk V, Babicky V, Clupek M, Benes J, Pouckova P, Kaspar J, Bodnar M (2006) Generation of two successive shock waves focused to a common focal point. *IEEE Trans Plasma Sci* 34:1382-1385
36. Lukes P, Clupek M, Babicky V, Sunka P (2008) Pulsed electrical discharge in water generated using porous ceramic coated electrodes. *IEEE Trans Plasma Sci* 36:1146-1147
37. Moravkova A, Malek O, Pokorna E, Stmadel J, Hradecky J, Horak V (2005) Immune characterization of the Lewis rats inoculated with K2 sarcoma cell line and newly derived R5-28 malignant cells. *Folia Biol* 51:159-165

BENES, J., J. ZEMAN, P. POUCKOVA, M. ZADINOVA, P. SUNKKA a P. LUKES.
Biological effects of tandem shock waves demonstrated on magnetic resonance. Bratislava Medical Journal [online]. 2012, 113(06), 335-338

V této práci byl sledován účinek tandemových rázových vln na akusticky homogenní tkáň *in vivo*. V práci bylo použito šest potkanů. Tandemová rázová vlna byla fokusována do oblasti jater, dále byl použit laboratorní králík, u kterého byla tandemová RV fokusována do oblasti stehenního svalu. Následně bylo provedeno vyšetření na magnetické rezonanci a to hned po aplikaci rázových vln a dále třetí a sedmý den po aplikaci. Sedmý den po aplikaci byla provedena pitva.

U všech pokusných zvířat došlo k poškození tkáně v místě ohniska, což se potvrdilo na snímcích z magnetické rezonance a také při následné pitvě. Tandemová rázová vlna je tedy schopna způsobit poškození hlouběji v těle pokusného zvířete v akusticky homogenním prostředí. Struktury, které leží nad ohniskem směrem ke zdroji RV, jsou bez poškození. Místo poškození je tedy dobře lokalizované a odpovídá fokusaci. Také se ukázalo, že dochází k regeneraci tkáně po aplikaci rázových vln.

PERSPECTIVES

Biological effects of tandem shock waves demonstrated on magnetic resonance

Benes J¹, Zeman J¹, Pouckova P¹, Zadinova M¹, Sunka P², Lukes P²*Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. jan.zeman@lfi.cuni.cz*

Abstract: *Objectives:* The shock wave is used for the treatment of kidney stones, eventually of gall stones, for more than 20 years. It is a pressure wave, which breaks through soft tissues easily and it is possible to focus it into a small volume. The excellent results of the treatment of concrements led to considerations about another usage of the shock wave. The research is now concentrated on the possibility of the damage to tumour tissues.

Methods: In contrast to concrements tumour tissues are not different from healthy tissues as for their acoustic attributes. That is why a new source of shock waves was used in this work. The source allows generating two successive shock waves focused into a common focus, so-called tandem shock waves. The biological effects of the tandem shock waves generated by the new source on rats hepatic tissue and rabbit femoral muscle in vivo were studied in this work. The damage is demonstrated by magnetic resonance imaging.

Results: MR images showed tissue damage in focus. There was damage of the liver tissue, muscle and also stomach wall.

Conclusions: We found that the tandem shock waves are able to damage the acoustically homogeneous soft tissue in the focus, i.e. in the depth. In tissues in front of the focus, there is, however, no damage (Fig. 10, Ref. 15). Full Text in PDF www.els.sk.

Key words: electrical discharges in water, focused shock waves, cavitations, tandem shock waves.

The outcomes achieved in the concrement disintegration (2, 6–8) initiated a research of a further use of shock waves in medicine. The attractiveness of shock waves results from the fact that they are the only form of energy penetrating through tissues (without damaging them up to a certain threshold) and are able to concentrate energy into a small volume (3, 4). The shock waves are used in orthopaedics for the treatment of insertion syndromes and the main interest is in the field of their use for destruction of cancer tissues (5). In contrast to concrements, which have acoustic impedance different from that of surrounding soft tissues, the cancer tissue is essentially not different from the healthy tissue in acoustic properties. Generators of shock waves for the destruction of concrements were developed with the aim to minimize side effects and thus, they cause nearly no damage to soft non-aerated tissues (9). Thus, a new generator of shock waves was developed at the Institute of Plasma Physics. The new generator is based

on a concept that if a local effect of the shock wave should be achieved in an acoustically homogeneous environment, then either the effect of cavitations should be used or two successive shock waves should be generated (10), where the first one produces an acoustic non-homogeneity and the second one is damped in this non-homogeneity (1, 9, 11, 12). The principle of the shock wave generation by the new source is based on a multichannel development, i.e. if a composite electrode is situated in strongly conductive water, many discharge channels are produced in this medium (13, 14). This multichannel generator was used to verify effects on erythrocytes, lymphocytes and cancer cell lines. After an in vivo exposure of solid tumours, the destruction was histologically demonstrated. In this approach, it is necessary to document the damage in the depth at a particular site, provided that surface structures of tissues, which are shock waves passing through, are not damaged. Given the fact that cancer tissues and healthy soft non-aerated tissues are not considerably different one from another in terms of their acoustic characteristics, we employed imaging by magnetic resonance and exposed the rat liver and rabbit femoral muscle in vivo. The aim of this was to use the imaging technique, and subsequently after dissection the histological examination, for the demonstration of the deep selective damage at a defined site.

Material and methods

Generator

The formerly developed shock wave generator was used, in which two cylindrical pressure waves are directed to a common

¹Institute of Biophysics and Informatics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, and ²Institute of Plasma Physics AS CR, v.v.i. Prague, Czech Republic

Address for correspondence: J. Zeman, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Institute of Biophysics and Informatics, Salmovska 1, Praha 2, CZ-120 00, Czech Republic.
Phone: +420.224965852, Fax: +420.224965 843

Acknowledgements: This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic under contract No. GA202/09/1151 and grant MSM 0021620808. We acknowledge Vit Herynek and Monika Dezortová (both Institute for Clinical and Experimental Medicine) for performing MRI scans of the animals.

focus with the help of a metallic parabolic reflector. The second shock can be generated with different time delays after the first one. The concept of tandem shocks is necessary to achieve the local action on the acoustically homogeneous environment (as e.g. soft tissue). The first shock produces acoustic non-homogeneity and cavitations in the tissue and the second shock is dissipated in them. Collapsing cavitations produce secondary short-wave shocks, which are capable of interaction with cell-sized formations.

The generation of focused tandem shock waves is based on focusing of cylindrical pressure waves produced in a multichannel discharge on a composite anode in highly conductive water. The composite anode consists of cylindrical electrodes of stainless steel (A2 – \varnothing 60x70 mm, A1 – \varnothing 77x20 mm) coated with a thin layer of porous ceramic material applied on the anode surface by the plasma spraying technology. Because of differences in the conductivity and permittivity between water and the ceramic layer, the intensity of the electric field on the anode surface is many times higher compared with the bare metallic electrode of the same dimensions. In the highly conductive solution, many short (less than 1 mm in length) discharged channels are produced. They are almost homogeneously distributed on the anode surface. Every expanding discharged channel forms a hemispherical pressure wave and the superimposition of all these waves results in a cylindrical pressure wave propagating from the anode surface. Cylindrical pressure waves are focused by a metallic parabolic reflector (cathode) and transformed to the shock wave in the vicinity of the focus.

Experimental procedures

Six Wistar strain rat males from the company ANLAB s.r.o. and laboratory rabbit were used in the experiment. Rats body weight was of 280–300 g and they were fed with the ST1 diet. Rabbit body weight was 3100 g. The exposure to shock waves was performed under anaesthesia. Thus, the rats and rabbit were narcotized with intramuscularly administered solution of Narkamon and Xylazin. The solution was prepared as follows: 2 ml of Narkamon per kg of body weight, 0.7 ml of Xylazin and 2.3 ml of water for injection. The rat was depilated in the region above the liver, fixed in a special holder and situated in the experimental

device with having its liver in the focus. The rabbit was depilated on the hind leg and situated in the experimental device with having its femoral muscle in the focus. Tandem shock waves were applied at two-seconds intervals for rats and one and half-second intervals for rabbit for a period of 30 min. This corresponds to 900 shocks for rats and 1800 shocks for rabbit in the focus area. After the exposure to the shock waves, the rats and rabbit were transferred to NMR scanning.

MRI scanning

MR images of rats were obtained using a 4.7T Bruker Biospec spectrometer equipped with a commercially available resonator coil (Bruker, Germany). We used a standard T2*-weighted gradient echo sequence, repetition time TR = 80 ms, TE = 3.4 ms, slice thickness = 2 mm, FOV = 6 cm, and matrix 256 x 256. During MR examinations, the rats were anesthetized by spontaneous breathing of isofluran (Foran, Abbot, Czech Republic). For induction, a 3% concentration of the anesthetic in air was used, and a 1–2 % concentration was used for maintenance. MR images of rabbit were obtained using a MR tomograph Siemens Magnetom Trio 3 T. We used repetition time TR = 642 ms, TE = 20 ms and slice thickness = 2 mm. Rabbit was anesthetized by the solution of Narkamon and Xylazin.

The scans were obtained on the first, third and seventh days after the exposure to shock waves. The dissection was performed on the seventh day after the exposure.

Results

Here, we show MR images of two rats and rabbit.

In axial scans of the first rat (Figs 1, 2 and 3) the arrow indicates the site of the damage produced in the liver region. The damage is situated in the posterior part of the liver and partially also involves the stomach wall. The lesion became clearly visible on the third day together with a huge artefact caused by a blood clot which remained between the lobes.

On the seventh day after the exposure, the rat was dissected. According to MRI scans, we located the damage and obtained its

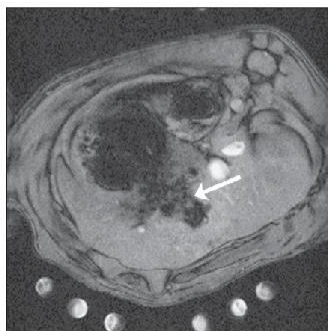


Fig. 1. MRI scan 1 day after the exposure, the first rat.



Fig. 2. MRI scan 3 days after the exposure, the first rat.

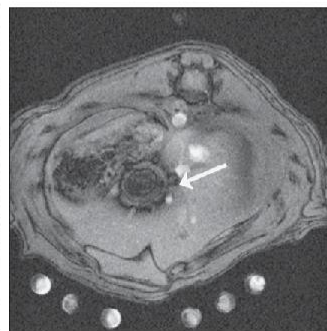


Fig. 3. MRI scan 7 days after the exposure, the first rat.

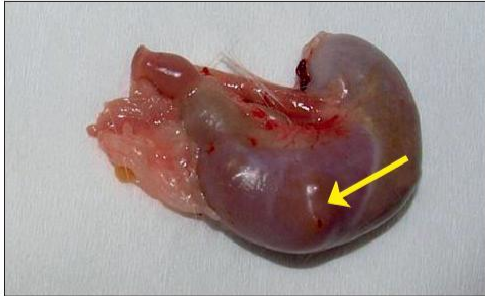


Fig. 4. The stomach of the first rat with detectable thinner wall and vaulted contents.

photo of the posterior wall of the liver with a lesion. In Figure 4, the adjacent stomach wall is shown, in which the damage can also be seen, the stomach contents being moderately vaulted and the wall thickness being moderately reduced. It is loosened on the inner side. These findings correspond with MR scans. We did not find any other damage.

In Figures 5 and 6 there are MRI scans of the second rat obtained 1 and 3 days after the exposure. A lesion can be seen in the anterior part of the liver. The bounded lesion was detectable during all the MR sessions.

On the seventh day after the exposure, dissection was carried out. In the liver, we found a lesion, the location of which corresponded to MRI scans. This lesion was sharply delimited. We did not find any other damage. The liver with the visible lesion is shown in Figure 7.

Figures 8–10 show MR images of rabbit femoral muscle. Femoral muscle was selected the one leg served as experimental and the other as control. Experimental leg is shown in all pictures on the right side. It can be seen that the soft tissues of the femoral muscle are injured due to the shock wave (arrow). In the focal point haematoma developed and around it an oedema is visible. Control leg is without damage. Imaging was carried out 1 (Fig. 8), 3 (Fig. 9) and 7 (Fig. 10) days after the application of a shock wave.

Scanning and subsequent dissection demonstrated the fact that the shock wave damaged soft tissues. The damage occurred in the region of the focus, and structures above the focus were not damaged. Thus, the shock wave did not damage the soft tissues in front of the focus.

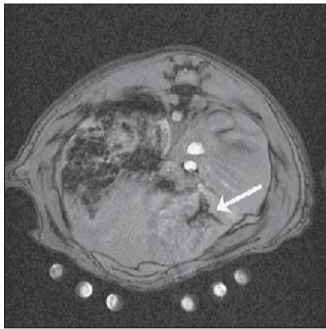


Fig. 5. MRI scan 1 day after the exposure, the second rat.

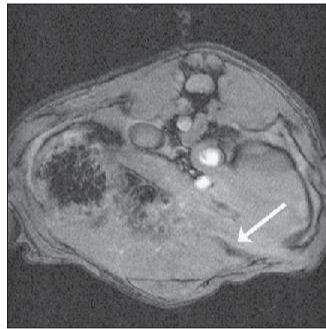


Fig. 6. MRI scan 3 days after the exposure, the second rat.

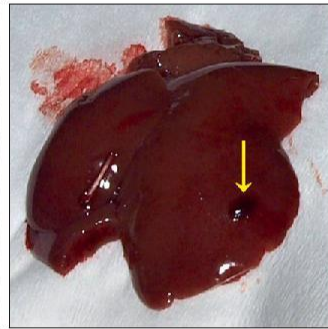


Fig. 7. A detailed photo of the damaged liver lobe, the second rat.

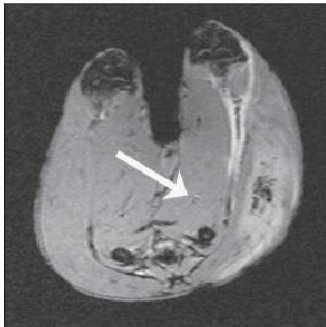


Fig. 8. MRI scan 1 day after the exposure, rabbit.

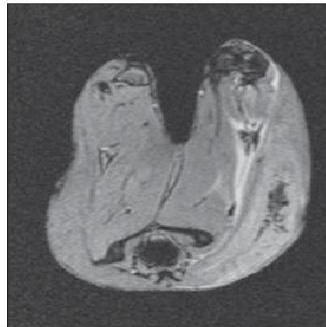


Fig. 9. MRI scan 3 days after the exposure, rabbit.

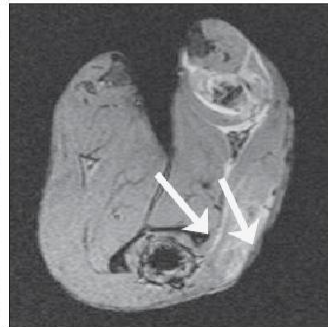


Fig. 10. MRI scan 7 days after the exposure, rabbit.

Discussion

In our experiment, we used a new source of shock waves based on the multichannel discharge in composite anode pores. Due to the fact that the anode is divided into two parts, it is possible to generate tandem shock waves, which are two shock waves subsequently delivered with a short time delay. Thereafter, interaction between the two shock waves occurs in the focus. The second wave comes into the environment with acoustic non-homogeneities produced by the first wave.

The damage occurred in all experimental animals. The experimental results indicate that tandem shock waves generated by the new source are able to damage soft tissues in the focus, i.e. in an acoustically homogeneous environment. MR images show, that it can damage hepatic tissue, stomach wall and femoral muscle. The damage is appropriately delimited and the tissues before the focus remain without any damage. The focal point is deeper under the surface. Shock wave penetrates through the structures before focal point without damage and damage occurs in focal point. The first shock produces acoustic non-homogeneity and cavitations in the tissue and the second shock is dissipated in them. Collapsing cavitations produce secondary short-wave shocks, which are capable of interaction with cell-sized formations. It leads to cell damage in focal point. We can observe it on MR images. During the following days the tissue regenerates. These results support the formerly performed experiment by Beneš et al. (2007).

Magnetic resonance imaging seems to be a suitable tool for lesion monitoring, however, attention should be paid to artifacts caused by possible blood clots, which can migrate into the abdominal cavity and mask the real extent of the lesion.

Conclusion

The target of the presented experiment was to establish *in vivo* effects of the new shock wave generator on soft tissues. For this purpose, we used six laboratory rats and one rabbit. The tandem shock waves were applied in such a way that the focus was in the liver area and in femoral muscle.

We found that the tandem shock waves are able to damage the acoustically homogeneous soft tissue in the focus, i.e. in the depth. In tissues in front of the focus, there is, however, no damage. The lesions were detected on MR scans as well as during the dissection. The effects should also be supported by further experiments.

References

1. Beneš J, Štuka Č, Fořtová H, Chmel J, Šunka P, Klener P. Biological effects of interacting shock waves. A model study of effects of Irv with the use of the determination of the erythrocyte haemolysis. Sbor Lek 1997; 98 (4): 277–282.
2. Chaussy C, Schmiedt E, Jocham D, Brendel W, Forssmann B, Walther V. First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. J Urol 1982; 127: 417–20.
3. Coleman AJ, Saunders JE. A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. Ultrasonics 1993; 31 (2): 75–89.
4. Lingeman JE. Contemporary extracorporeal lithotripsy. Urol Listy 2004; 2: 5–11.
5. Beneš J. Introduction of a new lithotripter into clinical practice and unusual applications of shock waves. Praha, 2000. 146 pp. Charles University, First Medical Faculty. Habilitation thesis.
6. Beneš J, Šunka P, Kordač V, Jirsa M, Štuka C, Mirejovský P. Pre-clinical verification of possible extracorporeal lithotripsy of gall stones in experimental animals. Sbor Lek 1987; 89 (5): 129–133.
7. Beneš J, Štuka C, Chmel J, Kordač V, Šunka P, Šimon V, Jansta J, Zabka J, Rychlík I, Tluchoř Z. First experience with a Czechoslovak device for the treatment of renal concretions by lithotripsy with shock waves. Prakt Lek 1989; 69 (23): 884–887.
8. Beneš J, Šunka P, Kordač V, Bárta Z, Štuka Č, Figura Z, Jirsa M. Equipment for clinical use of extracorporeal lithotripsy of bile concretions. 261485. ČR. A61B17/22. 1990-01-02.
9. Beneš J, Šunka P, Hani AB. Study of haemolysis after the action of a shock wave produced by a new method with the help of the multichannel discharge. Sbor Lek 2001; 102 (1): 29–35.
10. Loske AM, Prieto FE, Fernandez F, van Cauwelaert J. Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. Physics in medicine and biology. NOV 21 2002; 47 (22): 3945–3957. ISSN 0031-9155.
11. Stelmashuk V, Šunka P. Mutual interaction of two shock waves with a different time delay. Czechoslovak Journal of Physics. 2006, Vol. 56, pp. B396-B400. Available at WWW: <<http://www.springerlink.com/content/ap15j125444350j6/>>.
12. McClure S, Dorfmueller C. Extracorporeal Shock Wave Therapy: Theory and Equipment. Clin Techn Equine Pract 2003; 2 (4): 346–357.
13. Šunka P, Babický V. Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Czech Republic. Patent document. 1997-08-13.
14. Šunka P, Babický V. Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Czech Republic. Patent document. 2002-08-14.
15. Beneš J, Šunka P, Králová J, Kašpar J, Poučková P. Biological Effects of Two Successive Shock Waves Focused on liver tissues and melanoma cells. Physiological research. 2007, Vol. 56, pp. S1-S4. Available at WWW: <<http://www.biomed.cas.cz/physiolres/>>.

Received May 17, 2011.

Accepted February 20, 2012.

LUKES P., SUNKA P., HOFFER P., STELMASHUK V., POUCKOVA P., ZADINOVA M., ZEMAN J., DIBDIK L., KOLAROVA H., TOMANKOVA K., BINDER S., BENES J. Focused tandem shock waves in water and their potential application in cancer treatment. Shock Waves [online]. 2014, 24(1), 51-57

V této práci byl sledován účinek tandemových rázových vln na buňkách. Konkrétně byla sledována hemolýza u erytrocytů a viabilita u buněk lidské lymfoblastické leukemie. Dále se sledoval účinek na buňky melanomu B 16, které byly exponovány tandemovou rázovou vlnou *ex vivo* a následně byly vpraveny do podkoží pokusným potkanům. Poté byl sledován jejich růst a porovnán s kontrolní skupinou. V poslední části se práce věnuje účinkům tandemové rázové vlny v kombinaci s Cisplatinou a Photosanem. V tomto případě je po aplikaci RV sledován růst a porovnáván v rámci několika pokusných skupin spolu s kontrolní skupinou.

Podařilo se prokázat biologické účinky tandemové rázové vlny *in vitro*, kdy došlo k hemolýze erytrocytů a snížení viability buněk lidské lymfoblastické leukemie. Pokud jsou buňky melanomu B 16 exponovány *ex vivo* a následně aplikovány do podkoží potkanů je vidět, že dochází k významnému útlumu růstu nádorové tkáně oproti kontrole. A také v pokusech *in vivo* je vidět, že tandemová rázová vlna zvyšuje účinek některých chemoterapeutik, v našem případě Cisplatiny, a také fotosenzitizeru Photosan. Toto je možné vysvětlit zvýšením permeability buněčných membrán při aplikaci RV a kavitacemi indukovaným sonodynamickým účinkem RV.

Focused tandem shock waves in water and their potential application in cancer treatment

P. Lukes · P. Sunka · P. Hoffer · V. Stelmashuk · P. Pouckova ·
M. Zadinova · J. Zeman · L. Dibdiak · H. Kolarova ·
K. Tomankova · S. Binder · J. Benes

Received: 30 October 2011 / Revised: 28 January 2013 / Accepted: 17 February 2013 / Published online: 3 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The generator of two focused successive (tandem) shock waves (FTSW) in water produced by underwater multichannel electrical discharges at two composite electrodes, with a time delay between the first and second shock waves of 10 μ s, was developed. It produces, at the focus, a strong shock wave with a peak positive pressure of up to 80 MPa, followed by a tensile wave with a peak negative pressure of up to -80 MPa, thus generating at the focus a large amount of cavitation. Biological effects of FTSW were demonstrated *in vitro* on hemolysis of erythrocytes and cell viability of human acute lymphoblastic leukemia cells as well as on tumor growth delay *ex vivo* and *in vivo* experiments performed with B16 melanoma, T-lymphoma, and R5-28 sarcoma cell lines. It was demonstrated *in vivo* that FTSW can enhance antitumor effects of chemotherapeutic drugs, such as cisplatin, most likely due to increased permeability of the membrane of cancer cells induced by FTSW. Synergetic cytotoxicity of FTSW with sonosensitive porphyrin-based

drug Photosan on tumor growth was observed, possibly due to the cavitation-induced sonodynamic effect of FTSW.

Keywords Focused tandem shock waves · Multichannel underwater discharge · Biomedical application

1 Introduction

Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) has been successful for more than 30 years in non-invasive treatment of patients with stone diseases (mostly, kidney stones). The treatment involves focusing shock waves generated by an ESWL device (lithotripter) outside of the patient's body to disintegrate stones at a depth in tissue. Over 40 models of clinical lithotripters are commercially available worldwide: electrohydraulic, electromagnetic, and piezoceramic ones [1, 2]. At the end of the 1980s, one of the modified versions of electrohydraulic lithotripters was developed at the Institute of Plasma Physics AS CR [3–5]. These generators are used in the lithotripters Medilit (produced by the company MEDIPO, Brno, Czech Republic) at approximately 20 hospitals in the Czech and Slovak Republics [6].

The success of ESWL stimulated research on the applications of focused shock waves in other branches of medicine. Shock waves are used in orthopedy for fracture healing and treatment of pseudarthrosis, tendinopathy, and other orthopedic diseases [7]. Great attention has been paid to the role of cavitation in ESWL-induced biological effects on soft tissues and possible treatments of some types of cancers. It was initially studied to identify possible side effects of the lithotripsy therapy on kidney walls [1]. The evidence suggests that collapsing cavitations create strong secondary shock waves of nanosecond duration (tens of μ m scale) that can interact with cell scale structures [2]. To accelerate stone comminution

Communicated by G. Jagadeesh and K. Kontis.

The paper was based on work that was presented at the 28th International Symposium on Shock Waves, 17–22 July, 2011, Manchester, UK.

P. Lukes (✉) · P. Sunka · P. Hoffer · V. Stelmashuk
Institute of Plasma Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Za Slovankou 3, Prague 8 182 00, Czech Republic
e-mail: lukes@ipp.cas.cz

J. Benes · P. Pouckova · M. Zadinova · J. Zeman · L. Dibdiak
First Faculty of Medicine, Charles University, Katerinska 32,
121 08 Prague 2, Czech Republic

H. Kolarova · K. Tomankova · S. Binder
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University,
Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

and/or reduce/enhance tissue damage, new lithotrippers and protocols are being designed to modify the cavitation field and to control cavitation [8–13]. A promising approach to control bubble growth and collapse is the use of so-called tandem shock waves, which intensify the collapse of cavitation bubbles by sending a second shock wave before the bubbles produced by the first shock wave begin to collapse [14–18].

Most of these experimental studies demonstrated a significant effect on stone comminution and/or tissue injury, attributed to a significant extent to the modified cavitation field. However, the optimal shock wave profile and pulse combination have yet to be established. In general, the intensity of the secondary shock wave and the velocity of the microjet are assumed to depend on the initial bubble radius. The larger the bubbles grow, the more violent their collapse is, which may be more suitable for stone or tissue damage. Small bubble sizes that are comparable to the size of cells may be used to enhance shock wave-mediated drug delivery and gene transfer [10].

To enhance cavitation and the interaction of shock waves with soft tissue, we have developed a novel generator of focused shock waves in water (FSW), which is based on the production of cylindrical pressure waves generated by underwater multichannel electrical discharges using one or two porous ceramic-coated (composite) cylindrical metallic electrodes [19–25]. The primary pressure waves generated by the underwater plasma channels at the surface of the composite electrode(s) in highly conducting water (15–20 mS/cm) are focused by a metallic parabolic reflector to a common focal point and only close to the focus are transformed into a strong shock wave. Using a single composite electrode FSW system it has been demonstrated that the amplitude of the produced pressure wave reaches up to 100 MPa at the focus, with the rarefaction wave amplitude typically up to –25 MPa.

Dividing the composite cylindrical electrode into two coaxial parts of different diameter and surface area (each energized from a separate pulse power supply) it is possible to generate two successive shock waves focused at a common focal point (i.e., focused tandem shock waves, FTSW) with an adjustable delay between the waves of the order of microseconds [23]. By experimental analysis of the pressure field at the focus we have found that the most significant interaction between the first and the second waves occurs at a time delay of 8–15 μ s. Under these conditions the second pressure wave is highly attenuated at the focal region due to acoustic perturbations created by the first wave resulting in the formation of a strong rarefaction shock wave at the focus. The amplitude of the pressure wave is up to 100 MPa, while the amplitude of the rarefaction wave is up to –80 MPa, which creates a very complex pressure field and a large amount of cavitation at the focus. The interaction of these focused tandem shock waves with soft tissues *in vivo* was demonstrated

on laboratory rabbits by targeting their liver [23]. Local liver injuries induced by the shock waves were identified by magnetic resonance imaging. Histological examinations showed a very sharp boundary between the injured and healthy tissues. These results showed that tandem shocks are capable of causing localized lesions at a predictable location deep within soft tissue at the focus, without damaging tissue located in front of the focal point. This finding is important in terms of the potential biomedical applications of tandem shock waves, such as in treatment of tumors that are inoperable or very difficult to treat (e.g., liver and pancreatic tumors' metastases).

In the present work, we have modified the previously developed FTSW generator so that focused tandem shock waves are generated with a time delay of 10 μ s using only one pulse power supply, through which the high voltage is simultaneously applied to both composite electrodes. The time delay between waves at the focus is controlled by the focal parameter of the parabolic reflector and the difference in diameter of electrodes. Physical characteristics of the modified FTSW generator and the results on biological effects of focused tandem shock waves are presented for *in vitro* hemolysis of erythrocytes and cell viability of human acute lymphoblastic leukemia cells, and for tumor growth delay *ex vivo* and *in vivo* experiments.

2 Apparatus and methods

Figure 1 shows the schematics of the generator of two focused successive (tandem) shock waves in water. The generator is divided by an acoustically transparent membrane (Mylar foil, thickness 100 μ m) into two parts. The first part, which is filled with a highly conductive saline solution, consists of

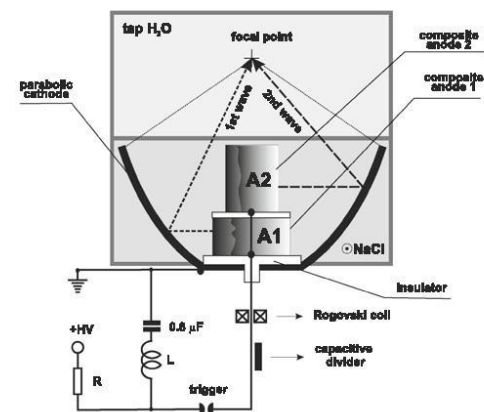


Fig. 1 Schematics of the generator of focused tandem shock waves in water

two composite metallic cylindrical high-voltage electrodes (anodes) of different diameter d and length h (A1: $d = 90$ mm, $h = 17$ mm; A2: $d = 60$ mm, $h = 55$ mm) placed along the axis of the outer metallic parabolic reflector (cathode). The focal point of the reflector is situated in the second part of the generator, which is filled with tap water and is located 5 cm from the Mylar membrane. The positive polarity pulsed high voltage is simultaneously applied to both composite electrodes using one pulse power supply that consists of the high-voltage direct current (DC) source, 0.8 μF capacitor and triggered spark gap. The composite electrodes are covered with a thin porous ceramic layer prepared from almandine silicate, which was deposited on the electrode surface by the thermal plasma spraying. The role of the ceramic layer is to redistribute and enhance electrical field on the electrode during the pre-discharge phase by the differences in conductivity and permittivity between water and the ceramic layer. This electrical field enhancement results in the initiation of a large number of filamentary discharge channels distributed almost homogeneously along the whole surface of the composite electrode at a moderate applied voltage (20–30 kV) [24]. Each discharge channel formed at the composite electrode creates a semi-spherical pressure wave in the saline solution. By superposition of the waves, a cylindrical pressure wave propagating from the anode is formed. The primary cylindrical pressure wave is focused by the reflector. Near the focus, this wave is transformed into a strong shock wave.

The amplitude and, to some extent, the waveforms of the shock waves at the focus can be controlled by the composite electrode surface areas, the discharge circuit parameters, and the solution conductivity, which play a decisive role in the characteristics of underwater plasma. Higher conductivity leads to higher power density in the discharge channel, and this results in an increase in the plasma electron density, a higher plasma temperature, and more intensive pressure wave evolution from the discharge [19]. In this work, saline solution conductivity of 18 mS/cm was used for the generation of the discharge at the composite electrodes, which was based on the results from previous work that demonstrated that the given experimental setup generates the highest amplitude of the pressure wave at this conductivity [20,21].

On the other hand, the time delay between the first and second shock waves can be controlled either by triggers (which requires two power supplies charging each electrode separately) or by the difference in diameter of electrodes A1 and A2, which determines the propagation distance of the cylindrical pressure waves formed at each composite electrode to the focus. The second option (used in this work), thus, requires only one power supply. In this work the time delay between the two shock waves at the focus was set to 10 μs . This time delay τ_d was used on the basis of previous experiments, which showed that the most prominent interaction of the waves occurred at this condition ($\tau_d = 8\text{--}15$ μs)

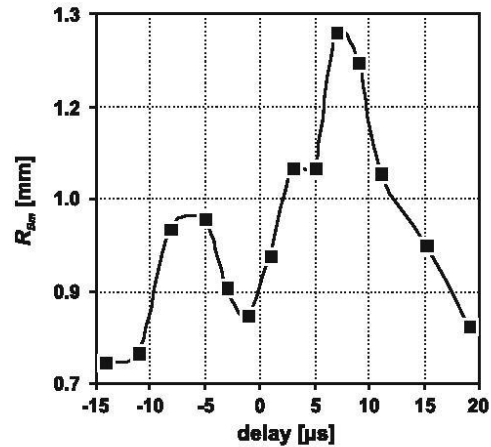


Fig. 2 Dependence of the bubble radius R_{Bm} on the time delay between the first and second shock waves. The time delay is expressed relatively to the beginning of the first shock wave, i.e., the negative delay corresponds to the situation when the shock wave from the second electrode (i.e., the second shock wave) was initiated before the first shock wave

[23,25], resulting in the maximum negative phase of the pressure wave of the second shock wave. Analysis of the pressure field at the focus by means of schlieren photography demonstrated strong interaction of the second shock wave with acoustic perturbations created by the first wave and a very complex pressure field with a large number of secondary short-wavelength shock waves from the collapsing cavitation. The analysis of the evolution of cavitation bubbles at the focus with respect to the time delays between the first and second shock waves showed a strong maximum in the cavitation bubble radius for the time delays in the range of 5–10 μs , with the bubble size larger than 2 mm (Fig. 2). With increasing time intervals between the waves, the bubble size and amplitude of the second shock wave rapidly decreased. For the interval $50 \mu\text{s} < \tau_d < 500 \mu\text{s}$ the second shock wave was totally damped. The second shock started to propagate as a pressure wave for $\tau_d > 600 \mu\text{s}$ and its propagation was fully re-established only at time delays above 1 ms when most of the cavitation produced by the first wave were quenched [25].

Figure 3 shows a typical pressure waveform generated by the modified FTSW generator at an applied voltage of 30 kV. Pressure waveforms of the shock waves at the focus were measured by piezoelectric polyvinylidene fluoride (PVDF) shock gauge sensors (S25_04, Piezotech SA, France). Two strong pressure peaks are apparent. The first peak corresponds to the compression caused by the shock wave arriving from anode A1, and the second peak, delayed by 10 μs , corresponds to the shock wave arriving from anode A2. The peak amplitude of the second positive pressure wave is 80 MPa,

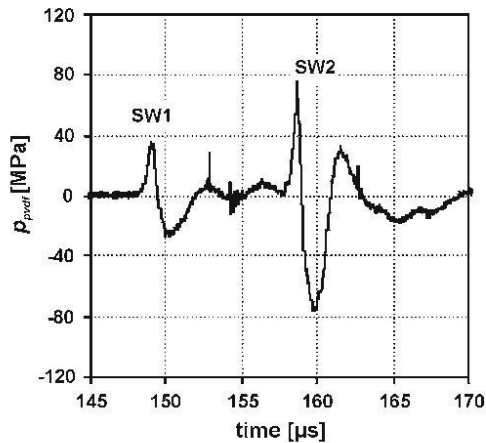


Fig. 3 The pressure waveform of a focused tandem shock wave. Peaks SW1 and SW2 correspond to shock waves from anodes A1 and A2

with phase duration of $0.7 \mu\text{s}$, which is similar to the shock wave formed by the FSW generator with one composite electrode [20]. The amplitude of the following rarefaction wave is up to -80 MPa with a wave duration of $2 \mu\text{s}$. The size of the focal volume is 2.5 mm in diameter and 32 mm in length (the full width at half maximum, FWHM).

Cellular damage induced by the shock waves was demonstrated on hemolysis of human erythrocytes. Freshly drawn human blood was treated with the anticoagulant heparin and diluted to 50 % hematocrit in saline solution. The exposed blood sample volume (1.5 ml) was sealed in polyethylene tubing, which was positioned within the shock wave focal region horizontally along the system axis. After the shock exposure the blood was separated centrifugally (15 min, 3,600 rpm, i.e., 60 Hz) and the supernatant was exhausted. The degree of hemolysis was measured by absorption spectroscopy at 576 nm .

The cell viability of CEM (multi-drug resistant) human acute lymphoblastic leukemia cells after exposure to FTSW was determined using the MTT colorimetric assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. After treatment by FTSW, CEM cells were incubated at 37°C and 5 % CO_2 for 24 h in fresh Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). DMEM was then replaced by phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 5 mM glucose. The MTT solution (dissolved in PBS) was added to the cell suspensions and the cells were incubated for 3 h at 37°C and 5 % CO_2 . The MTT was then removed and 1 ml of dimethylsulfoxide was added to solubilize the violet formazan crystals. The absorbance of the resulting solution was measured using a microplate reader (Synergy™ HT, BioTek Instruments, Inc., USA) at 570 and 690 nm. The cell viability of the sam-



Fig. 4 Picture of tumor T-cell lymphoma in the flank of outbred rat SD/CUB used for treatment by FTSW

ples was determined as percentage of control cell viability ($100 \times \text{average of test group} / \text{average of control group}$).

Tumor growth delay experiments were performed with B16 melanoma, T-lymphoma, and R5-28 malignant cells, which were acquired from tissue cultures. Syngeneic inbred female C57B16 strain mice, outbred rats SD/CUB (Sprague-Dawley strain), and Lewis strain rats were used as experimental animal models. The tumor cells were subcutaneously inoculated to the animals and the time of the tumor growth latency and the volume of the growing tumor in animals were followed throughout the experiment and compared with the control (not exposed) tumors (6 or 10 animals in each group). Figure 4 shows the picture of tumor T-cell lymphoma grown in the flank of outbred rat SD/CUB for 20 days as a typical example of the position and the size of tumors in animal models, which were used for the study of biological effects of FTSW in this work. The tumor size was measured by vernier calipers and the tumor volumes V at particular time intervals were calculated by the formula $V = a \times b^2 \times \pi / 6$, in which a and b are tumor length and tumor width, respectively.

3 Biological effects of FTSW

The presented FTSW generator was used to investigate the biological effects of focused tandem shock waves. Figures 5 and 6 show the results of in vitro experiments performed with erythrocytes and human acute lymphoblastic leukemia

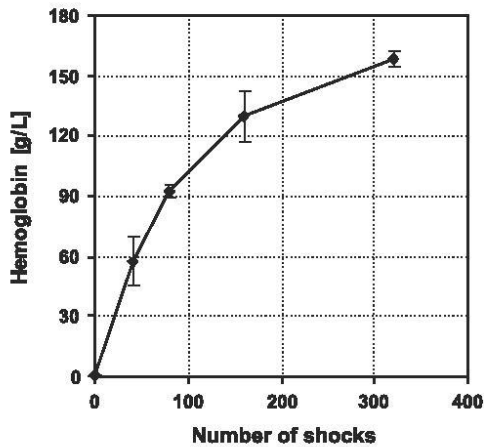


Fig. 5 Hemolysis of human blood cells versus the number of applied focused tandem shock waves

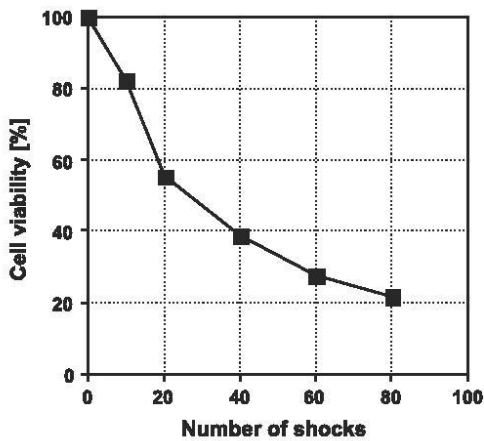


Fig. 6 Cell viability of human acute lymphoblastic leukemia CEM cells versus the number of applied FTSW

CEM cells. The blood samples (1.5 ml) were exposed in sealed polyethylene tubing, which was positioned at the shock wave focal region horizontally along the system axis. After the shock wave exposure the degree of hemolysis of red blood cells was determined by absorption spectroscopy. Similarly, viability of CEM cells (5×10^5) exposed to FTSW in polypropylene (PP) eppendorf vials (0.4 ml) was determined using the MTT colorimetric assay. Figures 5 and 6 show that both types of cells were damaged efficiently with increasing number of applied shocks. Another analysis made using optical microscopy indicated that exposure of carcinomas cells to the tandem shocks resulted in cell membrane perforation

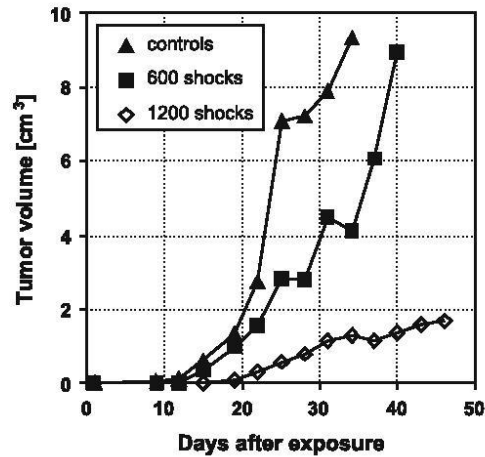


Fig. 7 Growth of the melanoma B16 tumor in inbred C57B16 mice growing from melanoma B16 cells applied after exposure to FTSW (six animals in each group)

and total damage (fragmentation) of the cells at a higher dose [25].

Consequently, ex vivo experiments were performed with melanoma B16 cell line (Fig. 7). The cells (30×10^6) were resuspended in 1 ml of the PBS and exposed to 600 and 1,200 tandem shock waves in PP eppendorf vials. One hour after the shockwave exposure, the same initial number of B16 melanoma cells (exposed and non-exposed) was subcutaneously inoculated to syngeneic inbred female C57B16 mice (6×10^6 cells per animal) in the experimental and control groups (six animals in each group). The tumor growth was monitored by measuring the volume of the growing melanoma three times weekly and compared with the control (non-exposed) group. Figure 7 shows that in comparison with the intact controls the latency period in the experimental group was extended by 13 days and tumor growth was significantly delayed. More pronounced effect was observed for exposure of the cells to 1,200 shocks than for 600 shocks.

Figure 8 shows the in vivo effect of FTSW on the growth of R5-28 sarcoma tumors in rats of the Lewis strain with and without application of cisplatin (MO1030AC, Medac, Hamburg, Germany) at a dose of 5 mg/kg applied before FTSW exposure. R5-28 malignant cells of the syngeneic sarcoma (2.5×10^5 cells/rat) [26] were subcutaneously applied caudally on the right and left sides of Lewis rats and tumors were allowed to grow for 35 days, after which the tumors were treated by FTSW. The tumors on the left sides of the rats were exposed to 240 shocks by placing the anesthetized animals in the water bath of the FTSW generator. The contralateral tumor served as a control. Shock waves were applied to the tumors from two different angles with 120 shock waves at

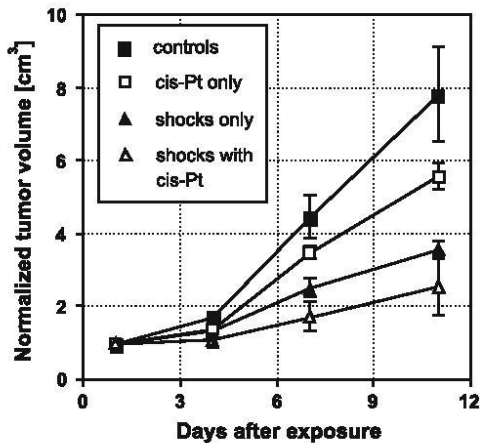


Fig. 8 Growth of R5-28 sarcoma tumor in Lewis rats after in vivo exposure to FTSW with and without applied cisplatin (dose 5 mg/kg, 10 animals in each group)

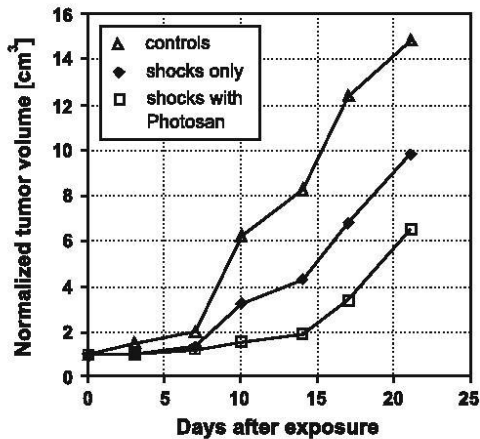


Fig. 9 Growth of the T-cell lymphoma tumor in outbred rats SD/CUB after in vivo exposure to FTSW with and without applied Photosan (dose 2.5 mg/kg, six animals in each group)

each angle. Figure 8 shows that, in comparison with the intact controls, the growth of the exposed tumors was significantly delayed. The reason for enhanced cytotoxicity of cisplatin was most likely due to increased permeability or mechanical perforation of the membrane of cancer cells induced by FTSW allowing higher dose delivery of cisplatin inside the cells.

Apart from mechanical effects, shock waves may also contribute to tumor treatment due to cavitation-induced sonochemical effects by the intracellular formation of radicals. Combining the effect of shock waves with anticancer drugs may also be possible (e.g., to enhance the chemotherapy efficiency by increasing the permeability of tumor cell membranes to cytostatic drugs by shock waves or through the sonodynamic activation of cytotoxic drugs by cavitation induced by FTSW). Figure 9 shows in vivo effect of FTSW on growth of tumor T-cell lymphoma inoculated subcutaneously into the left flanks of outbred rats SD/CUB with and without application of Photosan (391C 358, Seehof Laboratorium GmbH, Wesselburen, Germany) at a dose of 2.5 mg/kg applied 48 h before FTSW exposure. The tumors were treated 20 days after T-lymphoma cells transplantation (1×10^6) when the tumor had become detectable by palpation. Exposure of tumors was made with 600 shocks, with anesthetized animals placed in the water bath of the FTSW generator. Figure 9 shows that the delay of tumor growth was significantly increased with the application of Photosan.

Photosan is a porphyrin-based photosensitizer which is used in photodynamic therapy of cancer. More recently porphyrins have been also tested as sonosensitizers in ultrasound-induced reactions. In contrast to anticancer drugs, porphyrins are non-toxic in the absence of ultrasound and their synergistic effect is thought to be associated with cavitation which generates sonoluminescence. This might cause sonochemical excitation of porphyrins and lead into the formation of the cytotoxic singlet oxygen [27]. Therefore, we suppose that the enhanced effect of FTSW on tumor growth delay with applied Photosan might be due to the sonodynamic effect of cavitation induced in vivo by FTSW. Further evaluation of these effects and research on possible applications of FTSW with cytotoxic drugs is in progress.

4 Conclusions

Characteristics and physical principles of the novel generator of focused tandem shock waves with the time delay between the first and second shock waves of 10 μ s have been presented. The generator produces at the focus a strong shock wave with a peak positive pressure of up to 80 MPa followed by a tensile wave with a peak negative pressure of up to -80 MPa, thus generating at the focus a large amount of cavitation. Biological effects of FTSW were demonstrated in vitro on hemolysis of erythrocytes and cell viability of acute lymphoblastic leukemia cells, and on tumor growth delay ex vivo and in vivo experiments performed with three different cancerous lines (B16 melanoma, T-lymphoma, and R5-28 sarcoma). It was demonstrated in vivo that FTSW can enhance antitumor effect of chemotherapeutic drugs, such as cisplatin or photosensitizer Photosan, possibly due to increased

permeability of the membrane of cancer cells and cavitation-induced sonodynamic effect of FTSW, respectively.

Acknowledgments This work was supported by the Czech Science Foundation (202/09/1151) and the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (MSM 0021620808). The authors would like to thank Dr. V. Horak from the Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR for providing R5-28 malignant cells for the experiments with Lewis rats.

References

1. Coleman, A.J., Saunders, J.E.: A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. *Ultrasonics*, **31**, 75–89 (1993)
2. Bailey, M.R., Khokhlova, V.A., Sapoznikov, O.A., Kargl, S.G., Crum, L.A.: Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound (a review). *Acoust. Phys.* **49**, 369–388 (2003)
3. Benes, J., Sunka, P., Kordac, V., Barta, Z., Stuka, C., Figura, Z., Jirsa, M.: Apparatus for clinical performance of extracorporeal lithotripsy. UK Patent GB2199249 (1988)
4. Sunka, P., Babicky, V., Barta, Z., Benes, J., Kolacek, K., Kordac, V., Stuka, C.: Method and apparatus for adjusting the spark gap of a non-invasive lithotripter. EU Patent EP0349915 (1990)
5. Stuka, C., Sunka, P., Benes, J.: New discharge circuit for efficient shock wave generation. In: Brun, R., Dumitrescu, L.Z. (eds.) *Shock Waves@Marseille III*, pp. 455–458. Springer, Heidelberg (1995)
6. MEDIPO-ZT, s.r.o. (Ltd.). <http://www.medipo.cz/litotryptor.htm> (2005)
7. Haupt, G.: Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. *J. Urol.* **158**, 4–11 (1997)
8. Bailey, M.R., Blackstock, D.T., Cleveland, R.O., Crum, L.A.: Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. I. Acoustic fields. *J. Acoust. Soc. Am.* **104**, 2517–2524 (1998)
9. Bailey, M.R., Blackstock, D.T., Cleveland, R.O., Crum, L.A.: Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields. *J. Acoust. Soc. Am.* **106**, 1149–1160 (1999)
10. Zhong, P., Lin, H., Xi, X., Zhu, S., Bhogte, E.S.: Shock wave-inertial microbubble interaction: methodology, physical characterization, and bioeffect study. *J. Acoust. Soc. Am.* **105**, 1997–2009 (1999)
11. Sokolov, D.L., Bailey, M.R., Crum, L.A.: Use of a dual-pulse lithotripter to generate a localized and intensified cavitation field. *J. Acoust. Soc. Am.* **110**, 1685–1695 (2001)
12. Sokolov, D.L., Bailey, M.R., Crum, L.A.: Dual-pulse lithotripter accelerates stone fragmentation and reduces cell lysis in vitro. *Ultrasound Med. Biol.* **29**, 1045–1052 (2003)
13. Huber, P., Debus, J., Jochle, K., Simiantonakis, I., Jenne, J., Rastert, R., Spoo, J., Lorenz, W.J., Wannenmacher, M.: Control of cavitation activity by different shockwave pulsing regimes. *Phys. Med. Biol.* **44**, 1427–1437 (1999)
14. Loske, A.M., Prieto, F.E., Fernandez, F., van Cauwelaert, J.: Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. *Phys. Med. Biol.* **47**, 3945–3957 (2002)
15. Alvarez, U.M., Ramirez, A., Fernandez, F., Mendez, A., Loske, A.M.: The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria. *Shock Waves*, **17**, 441–447 (2008)
16. Canseco, G., de Icaza-Herrera, M., Fernandez, F., Loske, A.M.: Modified shock waves for extracorporeal shock wave lithotripsy: a simulation based on the Gilmore formulation. *Ultrasonics*, **51**, 803–810 (2011)
17. Loske, A.M., Fernandez, F., Zendejas, H., Paredes, M., Castano-Tostado, E.: Dual pulse shock wave lithotripsy: in vitro and in vivo study. *J. Urol.* **174**, 2388–2392 (2005)
18. Loske, A.M., Campos-Guillen, J., Fernandez, F., Castano-Tostado, E.: Enhanced shock wave-assisted transformation of *Escherichia coli*. *Ultrasound Med. Biol.* **37**, 502–510 (2011)
19. Sunka, P.: Pulse electrical discharges in water and their applications. *Phys. Plasmas*, **8**, 2587–2594 (2001)
20. Sunka, P., Babicky, V., Clupek, M., Benes, J., Pouckova, P.: Localized damage of tissues induced by focused shock waves. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **32**, 1609–1613 (2004)
21. Stelmashuk, V., Hoffer, P.: Shock waves generated by an electrical discharge on composite electrode immersed in water with different conductivities. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **40**, 1907–1912 (2012)
22. Sunka, P., Babicky, V., Clupek, M., Fuciman, M., Lukes, P., Simek, M., Benes, J., Majcherova, Z., Locke, B.R.: Potential applications of pulse electrical discharges in water. *Acta Phys. Slovaca*, **54**, 135–145 (2004)
23. Sunka, P., Stelmashuk, V., Babicky, V., Clupek, M., Benes, J., Pouckova, P., Kaspar, J., Bodnar, M.: Generation of two successive shock waves focused to a common focal point. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **34**, 1382–1385 (2006)
24. Lukes, P., Clupek, M., Babicky, V., Sunka, P.: Pulsed electrical discharge in water generated using porous ceramic coated electrodes. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **36**, 1146–1147 (2008)
25. Lukes, P., Sunka, P., Hoffer, P., Stelmashuk, V., Benes, J., Pouckova, P., Zadinova, M., Zeman, J.: Generation of focused shock waves in water for biomedical applications. In: Machala, Z., Hensel, K., Akishev, Y. (eds.) *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, ch. 31, pp. 403–416. Springer, Dordrecht (2012)
26. Moravkova, A., Malek, O., Pokorna, E., Strnadel, J., Hradecky, J., Horak, V.: Immune characterization of the Lewis rats inoculated with K2 sarcoma cell line and newly derived R5-28 malignant cells. *Folia Biol.* **51**, 159–165 (2005)
27. Rosenthal, I., Sostaric, J.Z., Riesz, P.: Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 349–363 (2004)

4.3 Klinický aplikátor

Cílem práce bylo také vytvořit klinicky použitelný aplikátor rázových vln a to jednoduchých i tandemových, který by bylo možné využít jak pro litotrypsi, především k efektivnější fragmentaci endoskopicky neřešitelné a často tedy objemné litiázy v choledochu, tak pro aplikaci v oblasti onkologie, ortopedie a případně revmatologie. Výsledkem je funkční vzorek takového aplikátoru, který vidíme na obrázku 19. Jeho srdcem je generátor rázových vln založený na principu mnohokanálového výboje, ten vidíme v detailu na obrázku 20.



Obrázek 19. Klinický aplikátor rázových vln s novým zdrojem.



Obrázek 20. Detail zdroje rázových vln.

Generátor je umístěn na polohovacím systému, kterým je možné pohybovat ve směru osy x,y,z a také měnit náklon. Díky tomuto polohovacímu systému je možné nastavit generátor tak, aby se ohnisko nacházelo v požadovaném místě v těle pacienta. Reflektor generátoru je překryt kovovou sítkou, aby byla zaručena elektrická bezpečnost. Celý generátor se nachází ve vaku s otevřenou hladinou, ten je naplněn kapalinou se zvýšenou vodivostí (obvykle 18 mS/cm). Celý generátor je pak zabudovaný v lůžku. Na toto lůžko je možné umístit pacienta tak, že část jeho těla je ponořena do kapaliny. Tak je zajištěn nejlepší přenos rázových vln do těla pacienta. Uvnitř kompozitní anody je potom ultrazvuková sonda. Kterou je možné zaměřit ohnisko. Ultrazvuková sonda neustále zobrazuje ohnisko, neboť se nachází v ose reflektoru. Sondou je možné otáčet a je také možné ji zcela vytáhnout. Součástí aplikátoru je také vysokonapěťový DC zdroj pro generování VN impulsu (Glassman EQ40P30-220), vysokonapěťové impulsní kondenzátory pro generování VN impulsu 0,8 μ F a spínací jiskřiště.

Na tomto aplikátoru byly provedeny testy funkčnosti a bezpečnosti s pozitivním výsledkem. Byl také podán užitný vzor a PCT přihláška (viz dále).

Výhodou tohoto aplikátoru je, že je možné jednoduše měnit kompozitní anodu a tím pádem i typ generované rázové vlny (jednoduchá x tandemová). Aplikátor je tak možné využít v několika oblastech medicíny.

V porovnání s již existujícími generátory se v našem případě jedná o zcela nový typ generátoru rázových vln, který je zabudován v aplikátoru. U tohoto typu generátoru rázových vln je možné nastavovat parametry a průběh rázové vlny, což existující generátory umožňují jen v omezené míře. Dále v porovnání s ostatními generátory dosahují tlaky v ohnisku mnohem vyšších hodnot a ohnisko má přitom malé rozměry. Díky tomu, že zaměřovací systém je v ose aplikátoru je jednodušší například kámen (litiázu) zaměřit a lze provádět kontrolu zaměření i během výkonu.

Pro aplikaci v oblasti desintegrace konkrementu byla provedena i identifikace komerčního potenciálu a identifikace trhu. Jejímž výsledkem je, že drcení kamenů (litiázy) rázovou vlnou je v dnešní době značně rozšířená metoda. Přístroje k tomu určené obsahují různé zdroje rázových vln, které pracují na základě odlišných principů. Náš přístroj obsahuje úplně nový generátor rázových vln, který má oproti již existujícím mnoho předností. V ohnisku dosahuje mnohem větších tlaků než běžné přístroje a tlak v ohnisku je možné regulovat. Lze také regulovat průběh rázové vlny v čase, tedy fázi tlakovou i podtlakovou. Díky těmto vlastnostem představuje pro pacienta zlepšení komfortu léčby, ať už jde o zkrácení času nutného k rázování kamenů, nebo možnosti léčby litiázy, která nelze běžně dostupnými přístroji vyřešit. Ze strany výrobců zdravotnické techniky jsme zaznamenali zájem o tento přístroj. Díky tomu, že tlaky v ohnisku jsou mnohem vyšší než u konkurenčních přístrojů, je možné dosáhnout zkrácení času ošetření. Tímto způsobem je možné dosáhnout také finanční úspory. Pokud bychom se podívali na urolitiázu, jedná se o závažný zdravotnický problém, který vzhledem ke své míře recidivnosti významně ekonomicky zatěžuje zdravotnický systém. Část pacientů je léčena rázovou vlnou a zde je možné díky našemu přístroji přinést jak zlepšení komfortu pro pacienta, tak úsporu nákladů. Informace byly získány z českých i zahraničních vědeckých zdrojů jako například researchandmarkets.com.

Relevantní trh je trh v oblasti zdravotnické techniky. Jedná se o velký trh se širokou základnou potenciálních zákazníků. Konkrétněji jde o trh s aplikátory rázové vlny pro drcení kamenů, který má mezinárodní rozměr. Existuje řada firem domácích i mezinárodních, které se výrobou takových přístrojů zabývají. Takové firmy mohou být komerčním partnerem. Cena dnes vyráběných přístrojů se pohybuje řádově od 800 tisíc až do 2,5 miliónu u některých přístrojů i více v závislosti na množství podpurných systémů. Pokud jde o kameny v ledvinách a močových cestách, tak například v USA je ročně diagnostikováno 5-7 % žen a 10-12 % mužů s ledvinovými kameny, což je

zhruba 2 – 2,7 milionu pacientů ročně jen v USA. Celosvětově se odhaduje, že litiáza postihne až 12 % mužů a 5 % žen do dosažení jejich 70. roku (liší se procento výskytu v závislosti na oblasti) a v příštích letech bude pravděpodobně ještě růst. V ČR potom dosahuje incidence litiázy 0,1 až 0,5 %. Zajímavými trhy mohou být také Asie a Jižní Amerika, kde dochází k nárůstu počtu výskytů ledvinových kamenů. Trh jako takový bude v příštích letech nadále růst. Drcení ledvinových kamenů je metodou první volby pro kameny do velikosti 2 cm, dále u pacientů neoperabilních a je vhodná pro všechny věkové skupiny. Dále je možné použít přístroj pro léčbu kamenů ve žlučníku. Kameny ve žlučníku se vyskytují u 10 - 20 % dospělé populace. U kamenů ve žlučových cestách záleží jejich výskyt na věku. V tomto případě nelze drtit pomocí klasických přístrojů. Kameny ve žlučovodech jsou tedy příkladem specifické diagnózy vhodné pro ošetření naším aplikátorem. Počítáme s tím, že i u ostatních diagnóz bude část pacientů vhodných k léčbě rázovou vlnou léčena na našem přístroji. Mezi největší firmy, které se celosvětově zabývají výrobou zařízení pro léčbu kamenů (litiáz), patří Dornier MedTech GmbH, Siemens Healthcare, STORZ MEDICAL AG, Medispec Ltd., E.M.S. Electro Medical Systems S.A. a další.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(10) International Publication Number
WO 2016/095876 A1

(43) International Publication Date
23 June 2016 (23.06.2016)

(51) International Patent Classification:

A61B 17/225 (2006.01) G10K 11/28 (2006.01)
G10K 15/04 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/CZ2014/000162

(22) International Filing Date:

19 December 2014 (19.12.2014)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(71) Applicant: UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
[CZ/CZ]; Ovocny trh 560/5, 116 36 Praha 1 (CZ).

(72) Inventors: BENES, Jiri; V Zahrade 195, Zbuzany, 252 25
Praha-zapad (CZ). ZEMAN, Jan; Dobrovitov 70, 286 01
Caslav (CZ).

(74) Agent: ANDERA, Jiri; Rott, Ruzicka & Guttmann,
Vinohradska 37, 120 00 Praha 2 (CZ).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AI, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GI,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

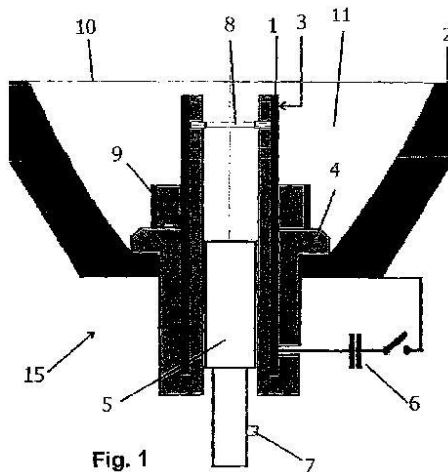
Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: SHOCKWAVE APPLICATOR AND A SHOCKWAVE APPLICATION SYSTEM



(57) Abstract: A shockwave applicator (15), especially for
clinical use in oncology, that comprises a first electrode
(1) having the shape of a hollow cylinder, which is
covered with a porous insulating layer (3) on its outer
surface. The first electrode (1) is surrounded by a second
electrode (2) of a reflector shape. Between the first elec-
trode (1) and the second electrode (2) a high-voltage im-
pulse source (6) and an isolator (4) are arranged. The
space between the electrodes (1, 2) is filled with liquid
(11) with defined conductivity. In the hollow space inside
the first electrode (1) an ultrasonic probe (5) is mounted
in a sliding way. The ultrasonic probe (5) has a defined
end position inside the first electrode (1) defined by a stop
(7) and the cavity inside the first electrode (1) is protected
from liquid (11) penetration with a membrane (8) of an
acoustically transparent material. A shockwave applica-
tion system, especially for clinical use in oncology, comprising
a bed (12) for placing the patient, where the patient surface
of the bed is fitted with an opening (13) under which the
shockwave applicator (15) according to the invention is at-
tached in a liquid-proof and adjustable manner.

WO 2016/095876 A1

Shockwave applicator and a shockwave application system

Technical Field

5 The invention relates to a shockwave applicator, especially for clinical use in oncology, comprising a first electrode having the shape of a hollow cylinder, which is covered with a porous insulating layer on its outer surface while the first electrode is surrounded by a second electrode of a reflector shape. Between the first electrode and the second electrode a high-voltage impulse source and an
10 isolator are arranged. The space between the electrodes is filled with liquid with defined conductivity. In the cavity inside the first electrode an ultrasonic probe is mounted in a sliding way. The invention also relates to a shockwave application system, especially for clinical use in oncology.

15 Prior Art

In 1980's a new non-invasive method to remove hardened masses from the patient's body, called lithotripsy, was introduced in medical practice. Its principle is pulverizing of stones by repeated action of a focused shockwave generated in
20 water outside the patient's body. Shockwave lithotripsy of kidney and urinary stones belong to routinely used treatment methods today.

For generation of focused shockwaves for lithotripsy the following physical principles have been used so far:

25

a) Heavy-current spark discharge between point electrodes (e.g. made by the companies Domier, Philips, Technomed International, Medipo Brno), which is located in the "primary" focus of the cavity of a metallic reflector having the shape of a part (approx. a half) of a rotary ellipsoid. The spark discharge is a point source
30 of strong, spherically divergent shockwave and by reflection from the reflector wall its energy is concentrated in the "secondary" focus where the stone is found. The discharges cause strong erosion of point electrodes and their service life (2000-3000 discharges) is only sufficient for one intervention, which makes the treatment

prolonged and expensive.

b) Micro-explosion of an explosive (Japan) is, similarly to the heavy-current spark discharge, a source of a spherically divergent shockwave and a reflector of the same shape as the one employed in spark generators is used for its focusing. This method is unsuitable for common clinical use.

c) Electromagnetically excited oscillation of a planar or cylindrical metallic membrane (e.g. made by the companies Siemens, Dornier, Storch). The pressure impulse is focused with the use of an acoustic lens, or with the use of a parabolic metallic reflector. The service life of these generators is 100-200 thousand impulses and it ends either due to an electric breakdown between the excitation coil and the membrane or mechanical rupture of the membrane. The replacement of the shockwave source is many times more expensive than the replacement of the water spark gap of spark generators, which makes the operation costs of both the systems comparable or even higher for some membrane generators.

d) Synchronous oscillation of a high number of piezoelectric elements deployed on the inner surface of a spherical cap (e.g. made by the companies Wolf-Austria, EDAP-France) producing a spherically convergent shockwave. With regard to a limited mechanical strength of piezoelectric elements a large-area source with several thousands of piezo-elements must be used to generate the necessary amplitude of the shockwave while the dimensions of the source (diameter of the spherical cap aperture) does not enable X-ray location of the stone in the shockwave focus without a change of the patient's position.

Possibilities of using shockwaves in other fields of medicine are being investigated. Lithotripsy in combination with endoscopy is clinically used to remove hardened masses from the gall tract. On the laboratory level experiments are conducted with the use of shockwave in orthopaedics (stimulation of bone tissue growth after fractures) and in oncology for disruption of tumoral tissues. However, acoustic properties of tumoral tissues are almost the same as those of the surrounding healthy tissues. So it is obvious that for focused mechanical stressing

of the originally acoustically homogeneous environment shockwaves with special characteristics must be used. The possibility of changing the time course of a focused shockwave (e.g. the ratio of the amplitude of the pressure and vacuum waves) is principally limited in the electromagnetic and spark generators. It is true
5 that the piezoelectric generators make a change of the time course of the wave possible, but their power supply units are quite complex and the total energy of the focused shockwave is limited by the mechanical strength of piezoelectric elements.

10 CZ291158 discloses a method of generation of a focused shockwave with electric discharge in liquid where the space between two electrodes is filled with liquid with enhanced conductivity, especially water, and after the connection of the impulse voltage multi-channel electric discharge burning between the first electrode and the liquid is generated on this first electrode with the shape of the required wave
15 front and individual quasi-spherical pressure waves generated in the discharge channels cumulate to form a pressure wave with the required wave front shape, which is further focused and transformed to a shockwave.

CZ291158 further discloses an apparatus for generation of a shockwave that
20 consists of two electrodes, the first electrode having the shape of the required acoustic wave front, and is covered with a porous insulating layer or is coated with an insulating layer where points of a conductive material are embedded that are connected to this electrode, and the other electrode consists of the reflector vessel wall, conductive foil or a net while the electrodes are insulated from each other
25 with an insulator and between the electrodes a space for liquid with enhanced electric conductivity is provided.

US5058569 discloses an apparatus for generating focused shockwaves, suitable
30 for extracorporeal lithotripsy, which has a substantially hollow-cylindrical membrane consisting of electrically conductive material and an electrical coil arrangement disposed inside the membrane which can be supplied with a high voltage pulse to rapidly repel the membrane and thereby generate a shockwave. The apparatus includes a concave reflector in the form of a paraboloid of

revolution, which surrounds the membrane and coil, and which has a center axis substantially coincident with the center axis of the membrane. An acoustic propagation medium fills at least the volume between the membrane and the reflector. The shockwave generated by the cylindrical coil and membrane
5 arrangement is reflected and focused by the paraboloid of revolution so that the shockwaves converge at a focus. The apparatus is arranged so that the focus coincides with a region of a patient to be treated with shockwave therapy, such as a calculus. The coil is wound in the shape of a cylindrical helix, and the membrane is in the form of a thin-walled, smooth tube. To align the shockwave relative to the
10 body of a patient an ultrasound applicator is provided.

The apparatus in accordance with US505856 uses a different shockwave generator from that described in CZ291158. If an ultrasound applicator is used as proposed by US505856, the ultrasound applicator would get destroyed by the
15 action of electric discharges produced by the shockwave generator according to CZ291158.

The goal of the invention is to design such an apparatus that would make it possible to focus shockwaves to an exactly specified place in the patient's body.
20

Disclosure of the Invention

The above mentioned goal is achieved with a shockwave applicator, especially for clinical use in oncology, that comprises a first electrode having the shape of a
25 hollow cylinder, which is covered with a porous insulating layer on its outer surface. The first electrode is surrounded by a second electrode of a reflector shape. Between the first electrode and the second electrode a high-voltage impulse source and an isolator are arranged. The space between the electrodes is filled with liquid with defined conductivity. In the cavity inside the first electrode an
30 ultrasonic probe is mounted in a sliding way. The ultrasonic probe has a defined end position inside the first electrode defined by a stop and the cavity inside the first electrode is protected from liquid penetration with a membrane of an acoustically transparent material.

Thanks to the defined end position of the ultrasonic probe the shockwave applicator in accordance with the invention enables exact determination of the distance between the ultrasonic probe and the focus of the applicator. The position of the ultrasonic probe inside the first electrode and the use of a membrane of an acoustically transparent material guarantee that during the generation of shockwaves the ultrasonic probe will not be damaged by electricity or pressure.

In a convenient embodiment the inner surface of the first electrode is coated with a plastic layer on which metallic foil is arranged.

In another convenient embodiment a third electrode is arranged around the first electrode having the shape of a hollow cylinder to generate a tandem shockwave.

The above mentioned goal is also achieved with a shockwave application system, especially for clinical use in oncology, comprising a bed for placing the patient while the patient surface of the bed is provided with an opening under which the shockwave applicator according to the invention is attached in a liquid-proof and adjustable manner.

Brief Description of Drawings

The shockwave applicator in accordance with the invention is schematically shown in Fig. 1. The shockwave application system for clinical use in oncology is shown in Fig. 2.

Description of preferred embodiments

The shockwave applicator according to Fig. 1 for clinical use in oncology comprises a first electrode 1 having the shape of a metallic cylinder that is covered on its outer surface with a ceramic porous insulating layer 3 with the thickness of 0.3 mm with the open porosity of 4%.

The first electrode 1 is surrounded by a metallic reflector, which forms a second

electrode 2. In this embodiment the reflector has the shape of a paraboloid and at the same time forms a vessel for liquid 11 with defined conductivity higher than 5 mS/cm, which fills the space between the electrodes 1, 2. In the described embodiment example the liquid 11 is water.

5

The first electrode 1 and the second electrode 2 are electrically separated with an insulator 4.

10 Between the first electrode 1 and the second electrode 2 a high-voltage impulse source 6 is installed.

Inside the first electrode 1 an ultrasonic probe 5 is mounted in a sliding way, which can also rotate around its longitudinal axis. Inside the first electrode 1 the ultrasonic probe 5 has an end position that is exactly defined by a stop 7.

15

The cavity inside the first electrode 1 is closed against penetration of the liquid 11 with a membrane 8 made of an acoustically transparent material.

20 The inner surface of the first electrode 1 is fitted with a plastic layer on which metallic foil is arranged.

The top part of the reflector is covered with a metallic net 10 to ensure electrical safety of the equipment. The use of a net enables free passage of gas bubbles produced during the generation of the shockwave if the equipment is arranged vertically.

25

30 After supplying of the impulse voltage of 15-30 kV to the electrodes 1, 2 from the impulse source 6 pre-discharge currents may only close through individual open pores of the porous insulation layer 3. This uneven distribution of pre-discharge currents causes local increasing of the electric field intensity in the pores to a value sufficient for initiation of multi-channel electric discharge.

The current in individual channels is limited by the resistance of the transitional layer between the discharge plasma and undisturbed liquid 11, which prevents occurrence of spark discharge and on the other hand enables simultaneous existence of many discharge channels. If the electric conductivity of water is higher
5 than 5 mS/cm, discharges only burn in the immediate vicinity of individual pores of the porous insulating layer 3. Quick heating of water around a pore causes occurrence of many quasi-spherical pressure waves and their superposition results in a cylindrical pressure wave propagating radially from the first (high-voltage) electrode 1 towards the wall of the reflector, which forms the second
10 electrode 2. By reflection from the reflector wall the energy of the cylindrical pressure wave is concentrated in the focus 14 of the reflector of the applicator 15. During the focusing the pressure wave is transformed to a shockwave 16.

If positive voltage is used on the first high-voltage electrode 1, the efficiency of
15 pressure wave generation is higher than if the opposite voltage polarity is used.

The shockwave applicator 15 in accordance with Fig. 1 and 2 additionally has a third electrode 9 arranged around the foot of the first electrode 1. Such a design allows you to generate a tandem shockwave.
20

Fig. 2 schematically shows a system for shockwave application for clinical use in oncology. The system comprises a bed 12 for positioning the treated patient. The patient surface of the bed 12 is fitted with an opening 13 under which the above mentioned shockwave applicator 15 is mounted in a liquid-proof way. The
25 shockwave applicator 15 is installed adjustably with the use of a known mechanism, so it can be moved and tilted in any way so that the focus 14 of the reflector of the applicator 15 can be placed exactly on the treated place in the patient's body. Leaking of the liquid 11 is prevented with an elastic sleeve (not shown) between the second electrode 2 and the bed 12.

30 The liquid 11 of the applicator 15 reaches up to the body of the treated patient through the open opening 13. To increase the patient's comfort the patient may be separated from the liquid 11 of the applicator with a plastic bag according to an

embodiment that is not shown here.

The ultrasonic probe 5 has an end position inside the first electrode 1 that is defined by the stop 7, precisely defining the distance between the ultrasonic probe
5 5 and the focus 14 of the reflector of the applicator 15. Having placed the patient on the bed 12 the physician switches on the ultrasonic probe 5 and finds the tumour deposit that is to be treated on the screen. As the physician knows the fixed distance between the ultrasonic probe 5 and the focus 14 of the reflector of the applicator 15, he/she can use the on-screen scale to set the applicator 15 in
10 such a way to make the focus 14 coincide with the treated tumour deposit. Then, the applicator 15 is put in operation, which generates shockwaves 16 in the above mentioned manner that act upon the treated tissue.

CLAIMS

1. A shockwave applicator (15), especially for clinical use in oncology, that comprises a first electrode (1) having the shape of a hollow cylinder, which is covered with a porous insulating layer (3) on its outer surface while the first electrode (1) is surrounded by a second electrode (2) of a reflector shape and between the first electrode (1) and the second electrode (2) a high-voltage impulse source (6) and an isolator (4) are arranged while the space between the electrodes (1, 2) is filled with liquid (11) with defined conductivity and in the hollow space inside the first electrode (1) an ultrasonic probe (5) is mounted in a sliding way, **characterized in that** the ultrasonic probe (5) has a defined end position inside the first electrode (1) defined by a stop (7) and the cavity inside the first electrode (1) is protected from liquid (11) penetration with a membrane (8) of an acoustically transparent material.
2. The shockwave applicator (15) in accordance with claim 1, **characterized in that** the inner surface of the first electrode (1) is fitted with a plastic layer on which a metallic foil is arranged.
3. The shockwave applicator (15) in accordance with claim 1 or 2, **characterized in that** around the first electrode (1) having the shape of a hollow cylinder a third electrode (9) is arranged for generation of a tandem shockwave.
4. A shockwave application system, especially for clinical use in oncology, comprising a bed (12) for placing the patient, **characterized in that** the patient surface of the bed is fitted with an opening (13) under which the shockwave applicator (15) in accordance with any of claims 1 to 3 is attached in a liquid-proof and adjustable manner.

30

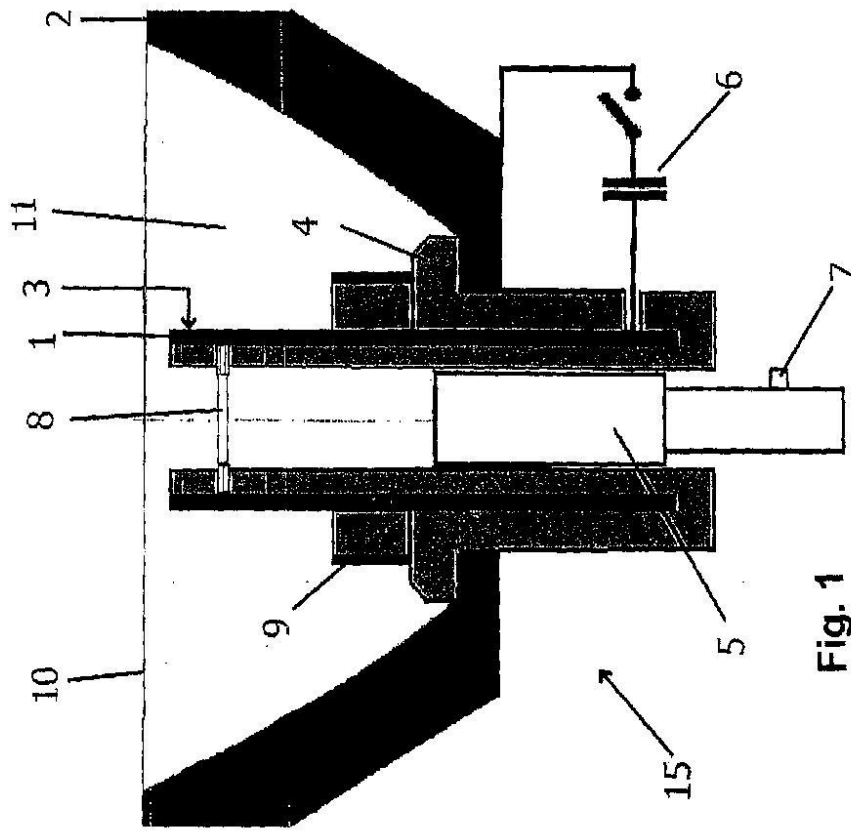


Fig. 1

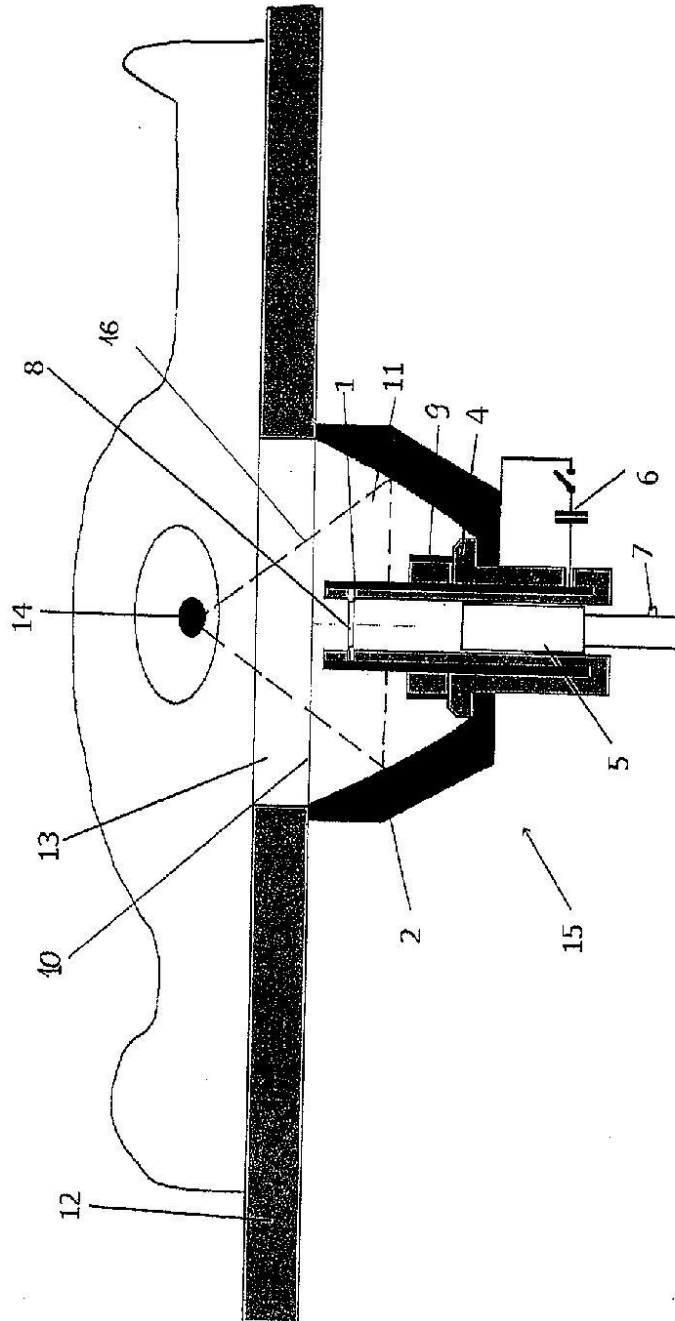


Fig. 2

5 Diskuse

Rázová vlna se v medicíně využívá již více jak 30 let. Na začátku stála extrakorporální litotrypse rázovou vlnou. Její úspěch vedl k rozvoji dalších medicínských aplikací rázových vln. Také u nás byl v osmdesátých letech vyvinut litotryptor pro desintegraci konkrementů, který je do dnešní doby používán na řadě pracovišť.

Rázová vlna se v dnešní době běžně používá v revmatologii, zde se dá říci, že počet indikací je větší než v samotné urologii. Rázová vlna nachází využití také v ortopedii pro léčbu špatně se hojících zlomenin. Experimentálně se potom používá pro léčbu ischemické choroby srdeční a léčbu erektilních dysfunkcí. V neposlední řadě je možné RV využít také k doručení různých molekul do buňky.

Zájem o rázovou vlnu je i v oblasti onkologie, kde by bylo možné způsobit poškození nádorové tkáně a také napomoci účinku chemoterapeutik.

Tato práce je zaměřena na možnosti využití jednoduchých a tandemových rázových vln v klinické praxi. Rázové vlny jsou zde generovány novým typem generátoru, který je založen na principu mnohokanálového výboje na povrchu kompozitní anody. Kompozitní anoda může být rozdělena na dvě části a je tak možné generovat vlnu tandemovou.

V této práci je jako výsledek předloženo několik odborných článků a patentová přihláška, jejichž hlavním autorem, nebo spoluautorem je autor této práce.

Experimentálně jsme ověřovali využití jednoduché rázové vlny v ortopedii pro narušení spojení kostního cementu a kosti, což by bylo možné využít při reoperacích kloubních náhrad. Bylo použito femurů miniprasete a měřena byla maximální síla nutná k vytlačení cementu z kosti. Ukázalo se, že u experimentální skupiny je síla statisticky významně nižší než u skupiny kontrolní což potvrzuje závěry jiných autorů [37-39].

Otázkou zůstává účinnost této metody při uvolňování celého cementového pláště dřívku endoprotézy, zvláště pak v distální části, kde je významně zastoupen i kontakt cementu s kortikální kostí. Cementový plášť dřívku má též většinou

makroskopické nerovnosti, které mohou mechanicky bránit extrakci celého bloku cementu. Mechanické poškození samotného cementu je v tomto případě spíše výhodou, literatura uvádí nevelké snížení pevnosti cementu po expozici rázových vln [37,60]. Problém účinku rázové vlny na komplex implantát-cement-kost, jehož vlastnosti se nepochybně liší od námi zkoumaných vzorků, je patrný ze snadných extrakcí a nejspíše bude ještě výraznější než v námi zvoleném modelu skládajícího se pouze z kosti a cementu. V této souvislosti je nutno též brát v úvahu přítomnost vazivové mezivrstvy, která se kolem cementu postupně vytváří a může též působit jako akustické rozhraní. Tuto vrstvu naše vzorky samozřejmě neobsahovaly.

Dalším využitím jednoduché rázové vlny, které zkoumá tato práce, je poškození nádorové tkáně *in vivo*. Výsledky ukázaly, že jednoduchá RV je schopna způsobit poškození nádorové tkáně. Místo poškození koresponduje s tvarem ohniska a je ostře odděleno od nepoškozené tkáně. Princip, kterým dochází k poškození nádorové tkáně, je odlišný než u tandemových rázových vln. Zde hraje největší roli mechanické poškození způsobené pozitivním tlakem, který dosahuje 372 MPa. Amplituda rázové vlny je uvnitř tkáně pravděpodobně nižší, měření ukazují, že dochází k 20 – 30% snížení amplitudy oproti měření ve vodě [61,62]. Jak velkou roli zde hrají kavitace je obtížné určit. Jejich účinek je totiž obtížné odlišit od účinku, který je způsoben mechanickým namáháním.

U tandemových rázových vln jsme zkoumali možné využití pro onkologické aplikace. Nejprve jsme prováděli experimenty s buňkami, kde bylo cílem zjistit, jestli tandemová rázová vlna dokáže interagovat s objekty buněčných rozměrů. Ukázalo se, že způsobuje hemolýzu a také poškození buněk melanomu B 16. Dále jsme zkoumali, jestli tandemová rázová vlna dokáže způsobit poškození v akusticky homogenním prostředí v hloubce *in vivo*. Ukázalo se, že ve stehenním svalu králíka i v játerní tkáni potkana dokáže tandemová RV způsobit poškození. To je ostře ohraničeno a odděleno od zdravé tkáně a tvarem odpovídá průchodu RV. Struktury, které leží nad ohniskem, jsou bez poškození. V neposlední řadě jsme se zabývali možnostmi kombinovat aplikaci tandemových RV se současným podáváním chemoterapeutik a fotosenzitizeru. Zde se prokázalo, že dochází ke snížení růstu nádorové tkáně oproti kontrole i oproti samotné tandemové RV i samotnému chemoterapeutiku či fotosenzitizeru.

Bylo zjištěno, že největšího účinku dosahují tandemové RV, pokud je zpoždění mezi jednotlivými vlnami 8-15 μ s. Druhá vlna pak dosahuje negativního tlaku pod -80 MPa a dochází tak k velké produkci kavitací.

Tandemové rázové vlny principiálně fungují tak, že v akusticky homogenním prostředí vytvoří nehomogenitu v podobě kavitací a na této nehomogenitě může druhá vlna disipovat. Významnou roli zde hrají také kavitace, které jsou schopné permeabilizovat membránu buněk a usnadnit tak prostup některých látek (chemoterapeutik a fotosenzitizeru) a také vytvářejí sekundární rázové vlny, které způsobují poškození tkáně.

Podařilo se také sestrojít funkční vzorek klinicky použitelného aplikátoru rázových vln (jednoduchých i tandemových) s novým zdrojem RV. Tento aplikátor může být využit v několika oblastech medicíny.

6 Závěr

V disertační práci jsem navázal na svou bakalářskou a diplomovou práci. V teoretické části byl shrnut dosavadní vývoj a uplatnění rázových vln v medicíně u nás i v zahraničí a byly popsány dosud publikované biologické účinky rázové vlny. V úvodu jsou také uvedeny popisy konstrukce přístrojů pro aplikaci rázových vln.

Výsledky zkoušek zcela nového generátoru rázové vlny jsou prezentovány v publikacích, které jsou součástí práce. K těmto publikacím je na začátku vždy krátký komentář. Výsledkem práce je experimentální ověření možností různého klinického využití jednoduché a tandemové rázové vlny. Pro jednoduchou rázovou vlnu je to oblast ortopedie, kde bylo experimentálně ověřena schopnost RV narušit spojení kosti a kostního cementu. Tento účinek by byl vhodný pro reoperace kloubních náhrad, kdy je problémem extrakce cementu z kostní dutiny. Aplikace rázových vln by usnadnila extrakci cementu a snížilo by se tak riziko, které pacientům při tomto druhu výkonu hrozí. Aplikace rázové vlny je neinvazivní metoda, pacienta by tedy zbytečně nezatěžovala. V práci jsou prezentovány výsledky předběžných experimentů, proto bude třeba provést další experimenty, než bude možné tuto metodu použít v praxi.

Dále je to oblast onkologie a to jak pro jednoduchou tak pro tandemovou rázovou vlnu. Z experimentů je patrné, že RV je schopna způsobit poškození *in vitro* i *in vivo*. Dokáže poškodit a zničit nádorovou tkáň v místě ohniska. Okolní měkké tkáně jsou bez poškození. V kombinaci s chemoterapeutiky či fotosenzitizérem zpomaluje růst nádorové tkáně. Zde se uplatňuje schopnost permeabilizovat buněčnou membránu, což je další možná oblast uplatnění.

Je tedy možné využít rázových vln v oblasti onkologie a to buď samotné vlny, nebo jejich kombinaci s jinými chemickými látkami. Za první vhodnou indikaci této léčby je považováno působení na neoperabilní metastázy jater u karcinomu pankreatu. Jednalo by se o podporu podávané chemoterapie. Na základě výsledků bude navrženo použití i u dalších indikací.

Pro tyto aplikace byl zhotoven funkční vzorek klinicky použitelného aplikátoru rázových vln s novým zdrojem.

7 Literatura

- [1] MORNSTEIN, Vojtěch. Ultrazvuk v biologii a medicíně. Vesmír. 1995, 74(10), 566.
- [2] LOSKE, Achim M. The role of energy density and acoustic cavitation in shock wave lithotripsy. Ultrasonics [online]. 2010, 50(2), 300-305
- [3] LUKES, P., F. FERNÁNDEZ, J. GUTIÉRREZ-ACEVES, E. FERNÁNDEZ, U. M. ALVAREZ, P. SUNKA a A. M. LOSKE. Tandem shock waves in medicine and biology: a review of potential applications and successes. Shock Waves [online]. 2016, 26(1), 1-23
- [4] COLEMAN, A.J. a J.E. SAUNDERS. A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. Ultrasonics [online]. 1993, 31(2), 75-89
- [5] MCCLURE, Scott R., David VAN SICKLE a M. Randy WHITE. Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Bone. Veterinary Surgery [online]. 2004, 33(1), 40-48
- [6] GERDESMEYER, L., M. MAIER, M. HAAKE a C. SCHMITZ. Physikalisch-technische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie (ESWT). Der Orthopäde [online]. 2002, 31(7), 610-617
- [7] SMITH, Arthur D. Smith's textbook of endourology. 3rd ed. Chichester, U.K.: Wiley, 2012
- [8] ZEMAN, Jan. Biologické účinky rázových vln generovaných mnohokanálovým výbojem [Biological effects of shock waves generated by multichannel discharge]. Praha, 2011. 76 s.
- [9] SHRIVASTAVA, S. K. a KAILASH. Shock wave treatment in medicine. Journal of Biosciences[online]. 2005, 30(2), 269-275
- [10] BENEŠ, Jiří. Zavedení nového litotryptoru do klinické praxe a neobvyklé aplikace rázových vln. Praha, 2000. 146 s. Universita Karlova 1. lékařská fakulta. Habilitační práce.
- [11] DVOŘÁČEK, J.: Urologie I. ISV nakladatelství Praha, 1998. ISBN 80-858-6630-7.
- [12] GRASSO, Michael, David A GREEN, Bobby S ALEXANDER a Lynn J PAIK. Extracorporeal Shockwave Lithotripsy. In: Medscape [online].

[cit. 2016-07-20]. Dostupné z:

<http://emedicine.medscape.com/article/444554-overview#a5>

- [13] BENEŠ, Jiří, et al. První experimentální poznatky o narušování žlučových kamenů fokusovanou rázovou vlnou. Čas. Lék. čes.. 1986, 125(14), 433-435.
- [14] BENES JIRI (CS); KORDAC VACLAV (CS); (+6). Device for hepatoolithes impairment. CS251199. Česká republika. Patentový spis. 1987-06-11.
- [15] BENEŠ, Jiří, et al. Preclinical verification of possible extracorporeal lithotripsy of gall stones in experimental animals. Sborník lékařský. 1987, 89(5), 129-133.
- [16] BENEŠ, J., et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy of gallstones with oral dissolution. Results in course of ten years in Czech Republic in correlation to indication criteria.. Sbornik lekarsky. 2001, 102(1), 17-22.
- [17] BENEŠ Jiří, Šunka Pavel, Kordač Václav, Bárta Zbyšek, Štuka Čestmír, Figura Zdeno, Jirsa Milan. Zařízení pro klinické provádění mimotělní lithotripsie žlučových kamenů. 261485. ČR. A61B17/22. 1990-01-02.
- [18] BENEŠ, Jiří, et al. První zkušenosti s ČSL. zařízením k léčbě ledvinových kamenů litotripsií rázovou vlnou. Prakt. Lék.. 1989, 69, (23), 884-887.
- [19] BENEŠ, Jiří, et al. Léčba ledvinových kamenů litotripsií rázovou vlnou se sonografickým zaměřením. Sborník lékařský. 1991, 93(9-10), 293-299.
- [20] WILBERT, D. M. A comparative review of extracorporeal shock wave generation.. BJU-Int. . 2002, 90(5), 507-511.
- [21] ZEMAN, Jan. Rázové vlny generované pomocí mnohokanálového výboje a jejich účinky na tkáň [Shock waves generated by multichannel discharge and their effects on tissue]. Praha, 2009. 42 s. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK. Vedoucí bakalářské práce Jiří Beneš.
- [22] ŠUNKA PAVEL DOC ING CSC (CZ); BABICKÝ VACLAV RNDR (CZ); (+3). Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Česká republika. Patentový spis. 2002-08-14.
- [23] UNIV KARLOVA (CS). Method and apparatus for adjusting the spark gap of a non-invasive lithotripter.. ŠUNKA PAVEL; BABICKÝ VACLAV RNDR; (+5). EP0349915. Česká republika. Patentový spis. 1990-01-10.

- [24] PISHCHALNIKOV, Yuri A., Joshua S. NEUCKS, R. Jason VONDERHAAR, Irina V. PISHCHALNIKOVA, James C. WILLIAMS a James A. MCATEER. Air Pockets Trapped During Routine Coupling in Dry Head Lithotripsy Can Significantly Decrease the Delivery of Shock Wave Energy. *The Journal of Urology* [online]. 2006, 176(6), 2706-2710
- [25] RASSWEILER, Jens J., Thomas KNOLL, Kai-Uwe KÖHRMANN, James A. MCATEER, James E. LINGEMAN, Robin O. CLEVELAND, Michael R. BAILEY a Christian CHAUSSY. Shock Wave Technology and Application: An Update. *European Urology* [online]. 2011, 59(5), 784-796
- [26] LINGEMAN, J. E. SOUČASNOST EXTRAKORPORÁLNÍ LITOTRYPSE. *Urologické listy*. 2004, 2, 5-11.
- [27] LOKHANDWALLA, Murtuza a Bradford STURTEVANT. Fracture mechanics model of stone comminution in ESWL and implications for tissue damage. *Physics in Medicine and Biology*[online]. 2000, 45(7), 1923-1940
- [28] EISENMENGER, Wolfgang. The mechanisms of stone fragmentation in ESWL. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 2001, 27(5), 683-693
- [29] DELIUS, M., W. BRENDEL a G. HEINE. A mechanism of gallstone destruction by extracorporeal shock waves. *Naturwissenschaften* [online]. 1988, 75(4), 200-201
- [30] PESHKOVSKY, Sergei L. a Alexey S. PESHKOVSKY. Shock-wave model of acoustic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2008, 15(4), 618-628
- [31] DELIUS, Michael. Twenty Years of Shock Wave Research at the Institute for Surgical Research. *European Surgical Research* [online]. 2002-7-1, 34(1-2), 30-36
- [32] LAUER, U, E BÜRGET, Z SQUIRE, K MESSMER, P H HOFSCHEIDER, M GREGOR a M DELIUS. Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Therapy* [online]. 4(7), 710-715
- [33] WOLFRUM, B. Cavitation and shock wave effects on biological systems. Dissertation 2004
- [34] MCCLURE, Scott a Christian DORFMÜLLER. Extracorporeal shock wave therapy: Theory and equipment. *Clinical Techniques in Equine Practice* [online]. 2003, 2(4), 348-357
- [35] SHIMA, A. Studies on bubble dynamics. *Shock Waves* [online]. 1997-2-1, 7(1), 33-42

- [36] CHUNG, Bryan a J. Preston WILEY. Extracorporeal Shockwave Therapy. *Sports Medicine*[online]. 2002, 32(13), 851-865
- [37] LEWIS, G. Effect Of Lithotripter Treatment On The Fracture-Toughness Of Acrylic Bone-Cement. *Biomaterials*. 1992, 13(4), 225-229.
- [38] WEINSTEIN, JN, DM OSTER, J PARK, S PARK, a S LOENING. The effect of the extracorporeal shock-wave lithotripter on the bone-cement interface in dogs. *Clinical orthopaedics and related research* 1988, 261-267.
- [39] STRANNE, SK et al. Would revision arthroplasty be facilitated by extracorporeal shock-wave lithotripsy - an evaluation including whole bone strength in dogs. *Clinical orthopaedics and related research* 1993, 252-258.
- [40] ROMEO, Pietro, Vito LAVANGA, Davide PAGANI a Valerio SANSONE. Extracorporeal Shock Wave Therapy in Musculoskeletal Disorders: A Review. *Medical Principles and Practice*[online]. 2014, 23(1), 7-13
- [41] OHL, Claus-Dieter, Manish ARORA, Roy IKINK, Nico DE JONG, Michel VERSLUIS, Michael DELIUS a Detlef LOHSE. Sonoporation from Jetting Cavitation Bubbles. *Biophysical Journal*[online]. 2006, 91(11), 4285-4295
- [42] KODAMA, Tetsuya, Apostolos G. DOUKAS a Michael R. HAMBLIN. Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves. *Cancer Letters* [online]. 2003,189(1), 69-75
- [43] OHL, Claus-Dieter a Bernhard WOLFRUM. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2003, 1624(1-3), 131-138
- [44] SHIMOKAWA, Hiroaki, Kenta ITO, Yoshihiro FUKUMOTO a Satoshi YASUDA. Extracorporeal cardiac shock wave therapy for ischemic heart disease. *Shock Waves* [online]. 2008, 17(6), 449-455
- [45] ZIMPFER, Daniel, Seyedhossein AHARINEJAD, Johannes HOLFELD, et al. Direct epicardial shock wave therapy improves ventricular function and induces angiogenesis in ischemic heart failure. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [online]. 2009, 137(4), 963-970
- [46] JARGIN, Sergei V. Shock wave therapy of ischemic heart disease in the light of general pathology. *International Journal of Cardiology* [online]. 2010, 144(1), 116-117

- [47] ITO, Kenta, Yoshihiro FUKUMOTO a Hiroaki SHIMOKAWA. Extracorporeal Shock Wave Therapy for Ischemic Cardiovascular Disorders. *American Journal Cardiovascular Drugs*[online]. 2011, 11(5), 295-302
- [48] YANG, Ping, Tao GUO, Wei WANG, et al. Randomized and double-blind controlled clinical trial of extracorporeal cardiac shock wave therapy for coronary heart disease. *Heart and Vessels*[online]. 2013, 28(3), 284-291
- [49] WANG, W., H. LIU, M. SONG, W. FANG a F. YUAN. Clinical Effect of Cardiac Shock Wave Therapy on Myocardial Ischemia in Patients With Ischemic Heart Failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2016, 21(4), 381-387
- [50] VARDI, Yoram, Boaz APPEL, Giris JACOB, Omar MASSARWI a Ilan GRUENWALD. Can Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy Improve Erectile Function? A 6-Month Follow-up Pilot Study in Patients with Organic Erectile Dysfunction. *European Urology* [online]. 2010,58(2), 243-248
- [51] PELAYO-NIETO, M., E. LINDEN-CASTRO, A. ALIAS-MELGAR, D. ESPINOSA-PÉREZ GROVAS, F. CARREÑO-DE LA ROSA, F. BERTRAND-NORIEGA a R. CORTEZ-BETANCOURT. Terapia de ondas de choque lineales en el tratamiento de la disfunción eréctil. *Actas Urológicas Españolas*[online]. 2015, 39(7), 456-459
- [52] PAN, M. M., A. RAEES a J. R. KOVAC. Low-Intensity Extracorporeal Shock Wave as a Novel Treatment for Erectile Dysfunction. *American Journal of Men's Health* [online]. 2016, 10(2), 146-148
- [53] MARIOTTO, Sofia, Elisabetta CAVALIERI, Ernesto AMELIO, Anna Rosa CIAMPA, Alessandra Carcereri DE PRATI, Ernst MARLINGHAUS, Sergio RUSSO a Hisanori SUZUKI. Extracorporeal shock waves: From lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production. *Nitric Oxide*[online]. 2005, 12(2), 89-96
- [54] LOSKE, Achim M, Fernando E PRIETO, Francisco FERN NDEZ a Javier van CAUWELAERT. Tandem shock wave cavitation enhancement for extracorporeal lithotripsy. *Physics in Medicine and Biology* [online]. 2002, 47(22), 3945-3957

- [55] ÁLVAREZ, Ulises M., Araceli RAMÍREZ, Francisco FERNÁNDEZ, Arturo MÉNDEZ a Achim M. LOSKE. The influence of single-pulse and tandem shock waves on bacteria. *Shock Waves*[online]. 2008, 17(6), 441-447
- [56] LOSKE, Achim M., Francisco FERNÁNDEZ, Denis MAGAÑA-ORTÍZ, Nancy COCONI-LINARES, Elizabeth ORTÍZ-VÁZQUEZ a Miguel A. GÓMEZ-LIM. Tandem shock waves to enhance genetic transformation of *Aspergillus niger*. *Ultrasonics* [online]. 2014, 54(6), 1656-1662
- [57] PAVEL SUNKÁ, VITALYI STELMASHUK, JIRI BENES, PAVLA POUCKOVA a JARMILA KRALOVA. Potential applications of tandem shock waves in cancers therapy. In: 2007 16th IEEE International Pulsed Power Conference [online]. IEEE, 2007, 1074-1077
- [58] BENEŠ, J., et al. Biological Effects of Two Successive Shock Waves Focused on liver tissues and melanoma cells. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. 2007, 56, S1-S4.
- [59] SUNKÁ PAVEL DOC ING CSC (CZ); BABICKY VACLAV RNDR (CZ); (+2). Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Česká republika. Patentový spis. 1997-08-13.
- [60] SCHREURS, B. W., A. F. BIERKENS, R. HUISKES, A. J. M. HENDRIKX a T. J. J. H. SLOOFF. The effect of the extracorporeal shock wave lithotripter on bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1991, 25(2), 157-164
- [61] DELIUS, Michael, G. ENDERS, G. HEINE, J. STARK, K. REMBERGER a W. BRENDEL. Biological effects of shock waves: Lung hemorrhage by shock waves in dogs—pressure dependence. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 1987, 13(2), 61-67
- [62] CLEVELAND, Robin O., David A. LIFSHITZ, Bret A. CONNORS, Andrew P. EVAN, Lynn R. WILLIS a Lawrence A. CRUM. In Vivo Pressure Measurements of Lithotripsy Shock Waves in Pigs. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 1998, 24(2), 293-306

8 Seznam obrázků

- Obrázek 1.** Průběh rázové vlny (závislost tlaku na čase)..... 10
- Obrázek 2.** Útlum zvuku jako funkce frekvence (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)
..... 12
- Obrázek 3.** Vlevo Dornier Lithotripter HM1 a vpravo Dornier Lithotripter HM3
(převzato z <http://www.qldlitho.com.au/the-treatment/how-it-works>,
http://www.mwstone.com/kidney_lithotripsyequipment.php) 14
- Obrázek 4.** První generátor rázových vln ČR. 1-nádoba reflektoru, 2-jiskřiště,
3-bezindukční kondenzátor, 4-přechodka, 5-krycí folie, 6 a 7-ultrazvukové
sondy, 8-přívod vody (převzato z Zeman, J., 2011) 16
- Obrázek 5.** Klinická verze litotryptoru. 1-tělo pacienta, 2-kámen ve žlučníku, 3-
sonografická sonda, 4-jiskřiště, 5-vodní lázeň, 6-vak plněný vzduchem, 7-
reflektor, 8-pulzní kondenzátor (převzato z Zeman, J., 2011) 17
- Obrázek 6.** Elektrohydraulický generátor (převzato z
<http://eswt.net/focused-shock-waves>) 19
- Obrázek 7.** Elektromagnetický generátor s plochou cívkou (převzato z
<http://eswt.net/focused-shock-waves>) 20
- Obrázek 8.** Elektromagnetický zdroj s válcovou cívkou (převzato z
<http://eswt.net/focused-shock-waves>) 21
- Obrázek 9.** Piezoelektrický generátor (převzato z
<http://eswt.net/focused-shock-waves>) 22
- Obrázek 10.** Různé principy fokusace rázových vln (převzato z Wilbert, D.M. 2002).
(a) Reflektor tvaru části rotačního elipsoidu. (b) Fokusace díky tvaru
generátoru, vnitřní část kulového vrchlíku. (c) Fokusace pomocí akustické
čochky. (d) Reflektor tvaru části rotačního paraboloidu 23

Obrázek 11. Modulární systém. AST Lithospace (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)	25
Obrázek 12. Integrovaný systém. Siemens Lithoskop. (převzato z SMITH, Arthur D., 2012).....	26
Obrázek 13. Hybridní systém. EDAP TMS Sonolit i-Sys. (převzato z SMITH, Arthur D., 2012)	26
Obrázek 14. Kompozitní anoda v čase výboje.	35
Obrázek 15. Kompozitní anoda s reflektorem.	36
Obrázek 16. Schéma generátoru s jednou válcovou elektrodou.....	37
Obrázek 17. Schéma generátoru rázových vln s rozdělenou válcovou kompozitní anodou. 1-část kompozitní anody s menším průměrem, 2-část kompozitní anody s větším průměrem, 3-reflektor, 4-jiskříště, 5-izolátor, 6-ohnisko	37
Obrázek 18. Kompozitní anoda pro generování tandemové rázové vlny bez reflektoru.....	38
Obrázek 19. Klinický aplikátor rázových vln s novým zdrojem.	92
Obrázek 20. Detail zdroje rázových vln.....	93

9 Seznam tabulek

Tabulka 1. Hodnoty parametrů u komerčně využívaných typů generátorů (převzato z A. J. Coleman et al., 1993).....	10
Tabulka 2. Hodnoty rychlosti zvuku, hustoty a akustické impedance pro jednotlivé druhy medií (převzato z McClure, Scott R, 2004)	12