UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ
ZDRAVOTNICKÁ TECHNIKA A INFORMATIKA
5345T018

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Pozorování účinků tandemových rázových vln na buněčných suspenzích

Autor: **Bc. Lukáš Dibdiak**

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

Praha 2010

Poděkování:

Za odborné vedení, všestrannou pomoc, zájem a čas který mi věnoval, děkuji svému vedoucímu diplomové práce prof. MUDr., RNDr. Jiřímu Benešovi, CSc. Zvláštní dík pak patří doc. Pavlu Šunkovi, CSc. za konzultace a pomoc při řešení komplikovanějších problémů, doc. RNDr. Evženu Amlerovi, CSc., Mgr. A. Mičkové. Rovněž bych chtěl poděkovat celému kolektivu Oddělení tkáňového inženýrství - Institutu klinické a experimentální medicíny za příjemné pracovní prostředí a všem mým blízkým za velkou podporu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma *Pozorování účinků tandemových rázových vln na buněčných suspenzích* jsem vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Praze dne Lukáš Dibdiak

……..

OBSAH

	OBSAH	4
	Abstrakt	6
	Abstract	8
1.	ÚVOD	10
1.1	Historie rázové vlny	10
1.1.1	Zahraničí	10
1.1.2	Česká Republika	14
1.2	Aplikace rázových vln	16
1.2.1	Litotrypse rázovými vlnami	16
1.2.2	Léčení rázovými vlnami	17
1.3	Charakteristika rázové vlny	22
1.4	Základní části přístroje	25
1.4.1	Generátor rázových vln	25
1.4.1.1	Electrohydraulický zdroj	25
1.4.1.2	Piezoelektrický generátor	27
1.4.1.3	Elektromagnetický generátor	28
1.4.1.3	Mikroexplozivní zdroj	29
1.4.1.5	Experimentální generátor na principu mnohokanálového impulsního výboje	29
1.4.2	Fokusační prvek	32
1.4.3	Zaměřovací systém	32
1.4.3.1	Rentgenová skiagrafie	32
1.4.3.2	Ultrasonografie	33
1.4.4	Vodivý systém	33
1.5	Liposomy	34
1.6	Krev	37
2.	CÍLE PRÁCE	41
3.	METODIKA PRÁCE A POUŽITÝ MATERIÁL	42

3.1 Použitý materiál 42
3.2 Metodika práce 43
3.2.1 Suspenze ředěných erytrocytů 43
3.2.2 Izolace lymfocytů 43
3.3 Exponování 46
3. 5 Stanovení liposomů 48
4. VÝSLEDKY 49
5. DISKUSE 58
6. ZÁVĚRY 62
7. LITERATURA 63
Přílohy 67

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá výzkumem vzájemné interakce dvou po sobě následujících - tandemových rázových vln, fokusovaných do společného ohniska .

První rázová (tlaková) vlna vytvoří v původně akusticky homogenním prostředí akustickou nehomogenitu, která umožní disipaci akustické energie druhé rázové vlny, s následnou tvorbou kavitací. Nehomogenita vytvářená první vlnou bude pouze v okolí ohniska s tím, že účinky druhé vlny budou lokalizovány právě v této oblasti. Kolabující kavitace vytvářené druhou vlnou generují sekundární, velmi krátkovlnné rázové vlny, které mohou interagovat se strukturami buněčných rozměrů

Cílem této práce je zjištění biologických účinků těchto vln na různých buněčných suspenzích. Hodnocení účinků rázových vln, působících na suspenzích erytrocytů a lymfocytů. U erytrocytů se spektrofotometricky stanovovala koncentrace volného hemoglobinu po exponování. Metoda byla založena na měření plazmy s uvolněným hemoglobinem, který má své absorpční maximum při 415 a 460 nm pro kontrolní vzorky (s nízkou koncentrací hemoglobinu). U exponovaných vzorků s vyšším stupněm hemolýzy byla koncentrace volného hemoglobinu určena z absorbance při 540 nm s použitím absorpčním koeficientem $E^{1\%}$ = 8,5. Určována byla míra hemolýzy při změně počtu rázu a opakovanými experimenty byl také prokázán vliv polohy exponovaného vzorku na počet hemolýz.

U experimentů s bílou krevní řadou, se hodnotil počet usmrcených lymfocytů a taktéž jejich životnost po exponování tandemovými i jednoduchými rázovými vlnami. Metodami stanovení byly v tomto případě průtoková cytometrie a počítání v Bürkerově počítací komůrce. Totéž měření bylo provedeno i s nádorovovou buněčnou linii – K562

Dalším cílem bylo sledování biologických účinků tandemových rázových vln na exponované lipozómy. Lipozómy, tvořené lipidovou dvouvrstvou, je možné využít jako doručovatele léků do postižené oblasti a následným

exponováním tandemovými rázovými vlnami toto farmakum z jejich vnitra uvolnit.

Práce se taky zabývá komparativním hodnocením účinků jednoduchých a tandemových rázových vln, působících in vitro. Důvodem je, že tyto účinky se mohou vyskytnout jak při tzv. litotrypsi extrakorporálními rázovými vlnami (LERV), tak při jiných terapeutických metodách.

Klíčové slova: rázová vlna, kavitace, nádory, tandemové vlny, účinky.

Abstract

Master's thesis deals with the research of the interaction of two consecutive - tandem shock waves focused into the common focus.

The first shock (pressure) wave creates in an acoustically homogeneous medium an acoustic nonhomogenity allowing for dissipation of acoustic energy of the second shock wave, which is followed by creation of cavitations. Inhomogeneity created by the first wave will only be around the focus, if the effects of the second wave will be located in this area. Collapsing cavitations generated by the second wave generate very short secondary shock waves that can interact with the structures of cell dimensions.

The aim of this study is to determine the biological effects of these waves in different cell suspensions. Evaluation of the shock waves effects effect on the suspensions of erythrocytes and lymphocytes. The concentration of free hemoglobin was spectrophotometrically determined after shooting when evaulating erythrocytes. The method was based on plasma measurements with released hemoglobin, which has its absorption maximum at 415 and 460 nm for control samples (low hemoglobin concentration). For samples exposed to a higher degree of hemolysis the concentration of free hemoglobin was determined from the absorbance at 540 nm using the absorption coefficient E1% = 8.5. The rate of hemolysis was determined in changing number of shock waves and it was also shown in repeated experiments that the position of the exposed sample influences the scale of hemolysis.

In experiments with a leukocytes, were evaluate the number of killed cells and also their life after exposing the single and tandem shock waves. Methods of determination in this case were flow cytometry and counting in Bürker counting chamber. The same measurements were performed with tumor cell line - K562

Another objective was to study the biological effects of tandem shock waves on exposed liposomes. Liposomes, consisting of lipid double layer, can

be used as messengers of drugs into the affected area and then when exposed to tandem shock waves the drug can be released.

This work also deals with a comparative assessment of the effects of single and tandem shock waves acting in vitro. The reason is that these effects may occur both in the so-called shock waves extracorporeal lithotripsy (ESWL), as well as in other therapeutic methods.

Key words: **shock wave, cavitation, tumor, tandem shock wave, effects**

1. ÚVOD

1.1 Historie rázové vlny

Využití rázové vlny k desintegraci a odstraňování ledvinových a žlučových konkrementů přístrojem zvaným litotryptor, je jedna z terapeutických a dnes už rutinních aplikací ultrazvuku. Ale co všechno tomu předcházelo? Technika v medicíně zažívá na celém světě obrovský rozmach a nástup nových technologií přináší stále dokonalejší diagnostické a terapeutické přístroje. Týká se to i lékařské ultrazvukové diagnostiky – ultrasonografie, a terapeutických aplikací ultrazvuku které za poslední roky(uplynulých 50 let) prošly prudkým technickým vývojem. Moderní ultrasonografické přístroje umožňují provádět nejen běžné morfologické a funkční vyšetření, ale i invazivní zákroky diagnostického či léčebného charakteru [1].

1.1.1 Zahraničí

Ve skutečnosti uběhla jen krátká doba od prvního výzkumného použití. Ale podíváme se na to pěkně po pořádku. Během druhé světové války bylo pozorováno, že plíce trosečníků byly narušené vlivem exploze vodních bomb, ačkoli neexistovaly žádné vnější příznaky násilí [2]. Šlo o první pozorování vlivu rázových vln vzniklých po výbuchu bomb na tkáň. První systematický výzkum použití rázových vln v medicíně byl veden v 50. letech. Například bylo publikováno, že elektrohydraulický generované rázové vlny jsou schopné ve vodě rozbít keramické desky. V USA byl také přijat první patent na elektrohydraulický generátor rázových vln. Fyzikální vlastnosti elektromagneticky generovaných rázových vln byly popsány na konci 50. let.

Snaha nahradit chirurgické odstraňování ledvinových kamenů neinvazivní metodou vedla k zavedení mimotělové litotrypse rázovými vlnami (ESWL – Extracorporeal shock wave lithotripsy) [3]. Litotrypse rázovými vlnami

byla zavedena jako rutinní léčebná metoda ledvinových konkrementů počátkem 80. let v Německu. Možnost využití a přenosu rázové vlny do organismu byla objevena náhodou. V roce 1966 v mnichovských laboratořích firmy Dornier vyrábějící nadzvukové letouny byl model křídla ostřelován urychlenými vodními projektily. Během experimentů se zaměstnanec dotkl plochy křídla právě v momentu, kdy byla ostřelována projektily, a poté si stěžoval, že byl zasažen elektrickým proudem. Pokusy ukázaly, že nešlo o elektrický proud, nýbrž o rázovou vlnu, která pronikla tělem zaměstnance [4].

Dalším významným milníkem vývoje rázové vlny je období mezi roky 1968 až 1971, kdy se v Německu zabývali působením rázových vln na tkáně zvířat. Výzkumný program byl financován Ministerstvem obrany Německa. Kromě jiného zjistili, že rázové vlny s vysokou energií mají vliv na organizmus i přes velké vzdálenosti. Zaměřili se na zkoumání vlivů rozhraní v organizmu společně s rozdílem a útlumem rázové vlny při její dráze živou tkání. Tady taky dospěli k významným poznatkům. Rázová vlna má jen mírné vedlejší účinky na svaly, tukovou a pojivovou tkáň, a neporušená kostní tkáň zůstává nepoškozena po zatížení rázovou vlnou. Nemalé úsilí věnovali otázce, hrozícího nebezpečí plicím, mozku, břichu a jiným orgánům. Vzešel z toho hodnotný závěr, že nejlepší média pro přenos rázových vln je voda a želatina, protože mají podobné akustické vlastnosti jako tkáně. Proto rázová vlna prochází měkkými tkáněmi takřka bez jejich poškození.

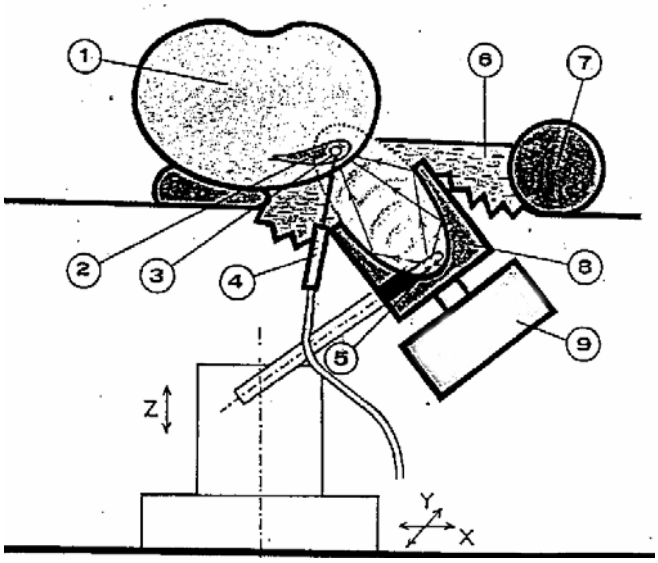
Toto všechno evokovalo myšlenku rozbít ledvinové kameny pomocí extrakorporálně generovaných rázových vln. Realizace z hlediska technického a medicínského nebyla zpočátku jasná, ale idea zde již existovala. V roce 1971 Haeusler a Kiefer oznámili první in vitro rozbití ledvinového kamene pomocí rázových vln bez přímého kontaktu s kamenem. Následovali další in vitro pokusy bezkontaktního rozbíjení konkrementů. V roce 1974 začalo německé Ministerstvo pro vědu a výzkum financovat výzkumný program nazvaný „Aplikace ESWL“. Na projektu se podíleli např. Eisenberger, Chaussy, Brendel, Forssmann a Hepp. V roce 1976 firma Dornier vyvíjela prototyp litotryptoru a úspěšně byl zkoušen na psech s voperovanými lidskými konkrementy. Rok

1980 je z pohledu litotrypse velmi významným. Právě v tomto roce, 20 února, byl v Mnichově, prototypovým přístrojem nazvaným Dornierův litotryptor HM1, léčen první pacient s ledvinovými kameny (viz obr. 1). Použití tohoto modelu bylo velmi omezeno, neboť kritéria byla velmi přísná (absolutně volné močové cesty, malý rozměr a neblokující konkrement v pánvičce). Druhý model HM2 pracoval s 90% úspěšností. První komerční litotryptor (HM3, Dornier) byl instalován ve Stuttgartu v roce 1983. Model HM3 je považován za zlatý standard s vynikajícími parametry, a proto byl v roce 1984 schválen k použití nejen v Evropě, ale i v Japonsku a USA [5].

Obr. 1. Dornier HM-1 – První přístroj (litotryptor) využívající rázové vlny k rozbíjení ledvinových kamenů (1980)

Ve snaze o rozbití tentokrát žlučových kamenů za pomoci extrakorporálně generovaných rázových vln následovala celá řada in vivo a in vitro pokusů. V roce 1985 byla v Mnichově provedena první léčba žlučových kamenů pomocí ESWL. O rok později byl v Mainzu testován prototyp litotryptoru bez vodní lázně. Dnes je léčba ledvinových a močových konkrementů pomocí extrakorporálně vygenerovaných rázových vln rutinní záležitosti a léčbou tzv. první volby. Všechny moderní litotryptory pracují již bez vodní lázně a bez anestézie. Za posledních 16 let bylo již touto metodou léčeno více jak 3 milióny pacientů.

Obr. 2. Schéma prvního litotryptoru s vodní lázní a s ultrazvukovým zaměřováním



1. Pacient
2. Konkrement
3. Žlučník
4. Ultrazvuková sonda
5. Jiskřiště
6. Vodní lázeň
7. Okraje gumového vaku
8. Kovový reflektor rázové vlny
9. Kondenzátor

Zařízení se skládá z eliptického reflektoru (8), který je upevněn na manipulátor se šesti stupni volnosti. Na manipulátoru je také umístěna zaměřovací ultrazvuková sonda a to tak, že místo sekundárního ohniska je stále v rovině zobrazení zobrazovací sondy (4). Reflektor, ke kterému je připojen pulzní kondenzátor (9), je otevřen směrem vzhůru k vlastnímu lůžku pacienta tvořenému vodní lázní (6) [9, 10,11].

1.1.2 Česká Republika

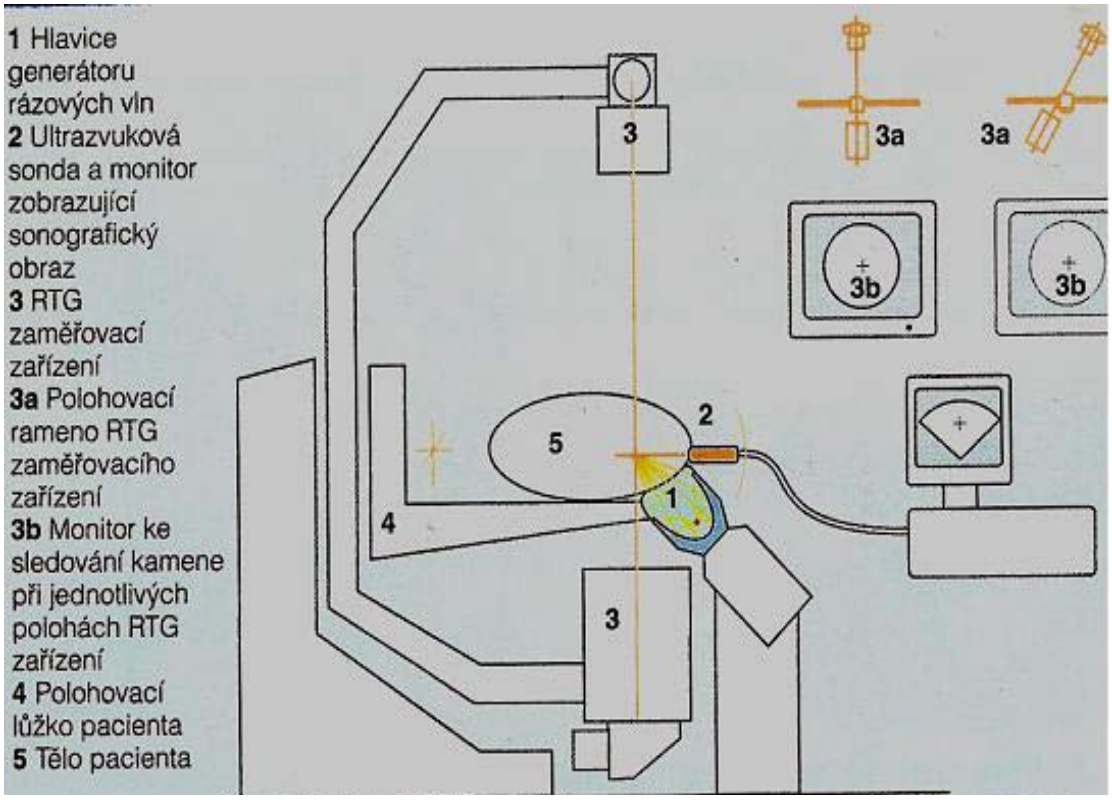
Vývoj litotryptoru probíhal i v Praze. Začátkem 80. let byly ve výzkumné laboratoři při 1. interní klinice 1. LF UK v Praze studovány možnosti odstraňování žlučových konkrementů jejich rozpouštěním pomocí žlučových kyselin. Ovšem pokusy s rozpouštěním větších konkrementů (o průměrech větších než 10 mm) nebyly úspěšně a tehdy vznikla myšlenka větší konkrementy nejdříve rozbít ultrazvukovým vlněním a teprve pak je rozpouštět. Počáteční pokusy s ultrazvukovým periodickým vlněním k dezintegraci konkrementů nepřinesly očekávané výsledky, neboť pokusy o fokusaci ultrazvukových vln narážejí na fyzikální omezení dané vlnovou délkou, absorpcí a prahem kavitací. S rostoucí frekvencí roste i absorpce ultrazvukové energie ve tkáních a narůstá i práh, při kterém dochází ke kavitačním jevům a tedy k nežádoucím účinkům.

V roce 1984 byly využity výsledky pokusů s rázovými vlnami publikované v Německu. Rázová vlna tehdy byla novým pojmem a revoluční metodou k rozrušování a odstraňování ledvinových konkrementů neinvazivním způsobem. Ústav fyziky plazmatu (ÚFP) AV ČR je jedním z průkopníků této revoluční metody, kde byly navržené originální litotryptory s jiskrovým výbojem a jsou používány v rutinní klinické praxi v mnoha českých nemocnicích. Odborníci v ÚFP měli mnohaleté zkušeností s rázovými vlnami, které představovaly doprovodný jev při generování silných elektronových svazků. V roce 1986 se jim podařilo úspěšně vyrobit první experimentální zdroj rázových vln k rozrušování konkrementů ve vodě [6, 7]. Zároveň byly zkoumány účinky rázové vlny na biologické tkáně u krys a prasat [8]. Současně probíhaly úspěšné pokusy na prasatech s voperovanými lidskými konkrementy. Prase bylo umístěno do vodní lázně a exponováno rázovými vlnami. Počátkem roku 1987 byl zahájen vývoj klinické verze litotryptoru a ještě v tom samém roce proběhla léčba prvního pacienta a do konce roku dalších osmi. Tento přístroj, schéma je na obr.1, využívá ultrazvukového zaměřování kamene a je patentově chráněn (PV 7789-86.D).

V roce 1988 byl do klinického užívání uveden litotryptor pro ledvinové kameny, nejprve se skiaskopickým, později i se sonografickým zaměřováním. Skiaskopické zaměření bylo vyvinuto ve spolupráci s Výzkumným ústavem zdravotnické techniky v Brně. Jedná se o dvojici rentgenových projekcí, jejichž osy se protínají přesně v ohnisku rázové vlny [12]. Později bylo využito i sonografické zaměření, které eliminuje radiační zátěž pro pacienta, umožňuje léčbu jak kontrastních, tak nekontrastních konkrementů a dává možnost kontinuálního sledování fragmentace [13].

Přístroj byl i nadále zlepšován a jeho poslední modely v roce 1992 byly srovnatelné se světovou špičkou tohoto oboru. Základním a nejsilnějším článkem je generátor rázových vln, vyvinutý ve spolupráci s Ústavem fyziky plazmatu, který má výborné výsledky při drcení kamenů a zároveň je šetrný k okolním tkáním [2]. Jedná se o nový zdroj, generující RV ve vodě mnohokanálovým výbojem.

Obr. 3. Schéma litotryptoru Medilit M6 používaného v České republice



1.2 Aplikace rázových vln

1.2.1 Litotrypse rázovými vlnami

Litotrypse extrakorporální rázovou vlnou (LERV, Extracorporeal shock wave lithotripsy - ESWL) je neinvazivní metodou léčby urolitiázy (močových kamenů ledviny a močovodu). Rázové vlny působí nejen přímo - mechanickým stresem - ale i nepřímo - prostřednictvím kavitace. Několik stovek až tisíců rázových vln soustředěných elipsoidním zrcadlem stačí k tomu, aby se ledvinový kámen změnil na písek, který může odejít přirozenými cestami. Přitom míra poškození okolních měkkých tkání je poměrně malá. Je metodou první volby u konkrementů lokalizovaných v ledvině a v proximálním močovodu [14].

Jak už bylo řečeno, použití rázových vln v terapii ledvinových a žlučových konkrementů je dnes každodenní záležitostí. Přednosti spočívají v eliminaci chirurgického zákroku, čímž se pacienti vyhnou operačním i postoperačním komplikacím. Jistou nevýhodou může být to, že k vypuzení roztříštěných konkrementů z těla je zapotřebí určitý tlak proudu moči, což může být problém u některých starších pacientů. K indikaci jsou vhodní zejména pacienti s konkrementy menšími než 1,5 cm, pacienti všech věkových kategorií, zejména ti, kteří nejsou doporučování k celkové anestézii, mají vysoký krevní tlak, dýchací obtíže, diabetes, eventuálně jen jednu ledvinu. Metoda je kontraindikována u těhotných žen, u pacientů trpících hemofilií, případně při poruše koagulace, při kalcifikaci ledvinových artérií, přítomnosti aneurysmatu aorty, u komorové arytmii, obezitě, infekci močových cest nebo při nespolupráci nemocného. Také u pacientů s kardiostimulátory je metoda kontraindikována z důvodů vyšších rizik možného poškození kardiostimulátoru elektromagnetickou indukcí (průchodem vysokých proudů, mechanickým poškozením prvků uvnitř kardiostimulátoru). Využití rázové vlny v medicíně je opravdu velmi široké.

Urologie – konkrétně Extrakorporální litotrypse rázovou vlnou je sice dominantní metodou léčby kamenů ledvinových a částečně ji lze použít i v některých speciálních případech konkrementů ve žlučníku, ale zdaleka to není jediná oblast, kde se rázová vlna uplatňuje. Další z nich, kde má tento fyzikální jev opravdu silné postavení je Hepatogastroenterologie. Výhodné je použití této metody u endoskopicky neřešitelných případů konkrementů ve žlučových cestách, případně při léčbě nemocných s chronickou kalcifikující pankreatitidou (litiáza pankreatického vývodu) k narušení intraduktálních konkrementů. U endoskopicky neřešitelných konkrementů obturujících pankreatický vývod se rázová vlna stala metodou volby. Metodou volby jsou rázové vlny také pro kameny intrahepatální. Úspěšnost fragmentace je tady dokonce vyšší, než u kamenů v choledochu. Popsáno bylo i použití v některých atypických případech jako je bezoár žaludku či objemný konkrement obstruující střevo (způsobující ileus).

1.2.2 Léčení rázovými vlnami

Léčba rázovými vlnami - ESWT (Extracorporal shock wawe therapy) se používá již více než 20 let. Lidské tělo dokáže samo zvládnout většinu nepříznivých vlivů svými obrannými mechanizmy. Někdy však obranné mechanismy selhávají nebo se pomýlí, například trvá-li zánětlivý proces dlouho. Terapie rázovými vlnami přináší do organismu obrovské impulsy energie, která dokáže tyto již oslabené mechanizmy stimulovat, či dokonce znovu nastartovat ! Vzniklé oxidy dusíku zlepší jejich prokrvení, rozšíří cévy a pomáhají při tvorbě nových kapilár. Současně se tvoří substance P, která účinkuje proti bolesti a má růstový efekt. Zvýší se také výměna látková a tkáně se lépe hojí. Utlumí se tvorba zánětlivých enzymů v tkáních a proto rázová vlna působí jak proti zánětu, tak proti bolesti. Aktivuje se i buněčná obrana těla, stejně jako nervová vlákna, která spouští bolest. Důsledkem je rozpouštění vápenných usazenin v tkáních a její trvalé vyhojení. Své místo si postupem času ESWT našla i v onkologii, nebo také chirurgii.

Nemožno vynechat Ortopedii, protože v posledních letech se začíná pořád častěji v klinické praxi využívat nefokusovaných rázových vln malé amplitudy, k odstraňování bolestí pohybového ústrojí, jako jsou tenisové lokty, golfová kolena, bolesti páteře, pseudoartrózy, odstraňování cementu při reoperacích endoprotéz apod. Pro léčbu úponových bolestí je také úspěšně využívá sportovní lékařství. Mechanizmus účinků rázových vln není v těchto případech plně znám, ale publikované výsledky hovoří o úspěšnosti 60 – 80 %. [15, 16]

Rázové vlny tady jsou vytvářeny ve speciálním zařízení. Tyto vlny jsou ve fokusované formě zacíleny do postižené oblasti, která způsobuje chronickou bolest. Generátor mění vzduch vháněný do přístroje pod tlakem 5 – 6 barů v kuželovitou rázovou vlnu, která dosahuje své maximální hodnoty v několika nanosekundách. (nanosekunda = 1 miliardtina sekundy). Vlna je do léčené tkáně přenášena speciální hlavicí aplikátoru a působí do hloubky až 40mm. (obr. 4)

Obr. 4. Schéma litotryptoru Medilit M6 používaného v České republice

Velmi krátký impuls působí s obrovskou intenzitou a tím:

- Narušuje a rozpouští vápenaté usazeniny ve šlachách a úponech
- Vede k lepšímu prokrvení a zvýšení látkové výměny v postižené oblasti
- U jizevnatých procesů se aktivují buňky produkující vazivovou tkáň, zvyšuje se produkce kolagenu a dalších bílkovin a dochází k regeneraci postižené tkáně
- Snižuje se napětí ve tkáních, stimuluje protizánětlivý proces a tlumí bolesti
- V konečném efektu proces vede k odeznění bolestí s klinickou účinností až 95%. S ústupem bolestí se výrazně zlepšuje pohyblivost
- Léčba má minimální vedlejší účinky. Občas zarudnutí kůže nebo mírný otok či pocit necitlivosti nebo svědění. Po aplikaci se může krátkodobě zvýšit bolest.

Co vše lze léčit rázovou vlnou:

- Záněty Achillovy šlachy, tenisový a golfový loket, Syndrom rotátorové manžety na rameni, Bolestivé třísloo
- Bolesti způsobené záněty šlach, šlachových úponů i tíhových váčků
- Počínající stadia arthrosy (do II st.), kostní výrůstky, ostruhy na patách i loktech Hallux valgus, kladívkovité prsty
- Revmatické záněty šlach a tíhových váčků
- Potraumatické stavy, špatně se hojící zlomeniny, počínající paklouby kostí
- Chronické záněty kloubů, jejich tíhových váčků se vznikem kalcifikací v kloubu
- Bolesti zápěstí a drobných kloubů, svalové bolesti
- Léčba pacientů s vysokým rizikem při operačním výkonu (vysoký věk..)

Další oblast, která využívá rázových vln je veterinární medicína, zejména u závodních koní.

V poslední době je hitem využití rázové vlny při aplikaci v oblasti akupunkturních bodů a trigger pointů – to jsou spouštěcí body při bolestivých svalových spasmech, které způsobují svalovou bolest. Pomocí těchto bodů se dají léčit recidivující lumbální bolesti – tzv. lumbago, lumboischiadický syndrom, stavy po zlomeninách kostrče, blokády páteře a bolesti za krkem, bolesti ramen, hlavy, závratě.

V zahraničí se rázová vlna hojně používá v revmatologii, ortopedii, úrazové chirurgii a zabývají se jí i specialisté na akupunkturu. Výrazné úspěchy slaví ve sportovní medicíně. Je ale vhodná nejen pro profesionální, ale i pro amatérské sportovce. V zásadě jde o zánětlivé procesy či poruchy výživy kloubů, šlach a kostí, kde se snažíme povzbudit obranné mechanizmy těla, revitalizovat a obnovit postiženou tkáň. Léčba rázovými vlnami je oceňována zvláště proto, že se dobře snáší, má minimální vedlejší účinky a je prováděna ambulantně. Při vysoké účinnosti dává rychlejší výsledky než léčba chemická a je podstatně levnější než operační zákrok [17].

Biologické účinky rázových vln byly sledovány na lidských erytrocytech a lymfocytech, u kterých po aplikaci rázových vln docházelo k hemolýze erytrocytů a k poklesu životnosti lymfocytů. Rozdíly v účinku byly pozorovány při aplikaci běžných jednoduchých (JRV) rázových vln, běžně používaných pro klinické provádění fragmentace a tandemových (TRV) rázových vln. U TRV se jedná o generování dvojic rázových vln jdoucích velmi krátce po sobě. Princip účinku této metody bude vysvětlen dále (1.4.1.5). Významné rozdíly nastaly také při různých umístěních exponovaných vzorků v ohnisku a mimo něj. S rostoucí vzdáleností od ohniska prudce mizel biologický účinek. Nejvíce tento fenomén bylo možné pozorovat kolmo na osu směru šíření rázové vlny. Tedy pokud se suspenze buněk nacházela mimo ohnisko, účinky rázových vln byly zanedbatelné. V ÚFP byly provedeny experimenty na tkáních prasat, kde byly tkáně exponovány do jedné hodiny po odběru a uchovány v izotonickém roztoku, proto aby nedocházelo ke změně akustických vlastností odebraných tkání určených k exponování. Tkáně jater, ledvin, svalů, kůží a sleziny byly ihned po expozici fixovány pro další histologické zpracování. Po expozici

mnohokanálovým zdrojem bylo poškození tkáně patrné již makroskopicky. Provedená histologie prokázala poškození od buněčné alterace až po zcela hemorrhagickou nekrózu příslušné tkáně. Obdobné pokusy byly provedeny i na klinickém litotryptoru, u kterého makroskopické poškození parenchymatózních tkání bylo klinicky nevýznamné ani při vyšších počtech rázů.

Nejvíce zkoumanou oblastí, a přesto nejméně prozkoumanou zůstává využití rázových vln k léčbě nádorových tkání. U nádorů se předpokládá, že je třeba buď výrazně zvýšit podtlak v rázové vlně, který je pak při velkých amplitudách schopen vyvolat jejich destrukci nebo využít ineragujících rázových vln, kde je předpoklad, že vytvářejí více kavitací a tím zvyšují toxicitu takových dvojrázů [4, 18, 19, 20]. Je tedy jasné, že v oblasti onkologie je situace složitější. Akustická odlišnost nádorové tkáně a tkáně zdravé je minimální a proto všechny pokusy využívající k ovlivnění růstu nádorových tkání komerčních generátorů rázových vln byly negativní. Jediný efekt, který se pozoroval bylo mírné zlepšení účinnosti cytostatik v kombinaci s rázovými vlnami.

Byl vyvinut generátor dvou po sobě následujících (tandemových) vln fokusovaných do společného ohniska. Tímto generátorem je možno dosáhnout lokalizovaného účinku vln v předem známém místě původně akusticky homogenního prostředí, jakým nádorové a zdravé tkáně jsou. První vlna vytvoří v tkáni akustickou nehomogenitu (vlnu zředění, event. kavitace) a druhá vlna s touto nehomogenitou silně interaguje. To vede k vytvoření velmi složitého tlakového pole s velkými gradienty tlaků na rozměrech řádu desítek mikrometrů. Prokázalo se, že tato tlaková pole mohou účinně interagovat se strukturami buněčných rozměrů. Tandemové rázové vlny by v kombinaci se speciálními léky mohly být využity k terapii některých nádorů [21, 22].

Vedle toho se pro terapii nádorů bouřlivě rozvíjí vysoce intenzivní fokusovaný ultrazvuk [23]. Jeho označení je „High Intensity Focused Ultrasound HIFU) a vytváří poškození zvýšením teploty tkáně v ohnisku. Ani zde však není podrobně znám podíl tepelných a netepelných účinků HIFU.

1.3 Charakteristika rázové vlny

Hrom po úderu blesku, rána bičem, letadlo, které překonává rychlost zvuku … Také tlaková vlna při výbuchu atomové bomby, nebo při vlně tsunami. To všechno jsou fyzikálně podobné akustické děje. Tlakové neboli rázové vlny [24].

Alespoň v jednom z těchto případů, se každý z nás s rázovou vlnou jistě setkal. Je to vlna akustická stejně jako ultrazvuk a dochází u ní tedy k přenosu energie z jednoho místa na druhé. Tato energie je pro medicínu atraktivní, protože snadno proniká měkkými tkáněmi (narozdíl od jiných forem energie) a lze ji lokalizovat do definovaného objemu [25, 9].

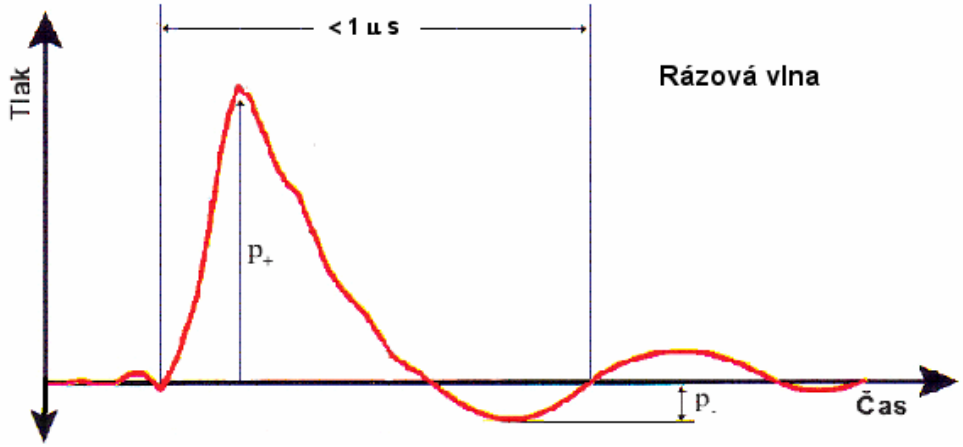
Rázové vlny (RV) jsou výraznou aplikací techniky a biofyziky v terapii a klinické praxi. Léčba s pomocí RV je bezpečná a účinná, nicméně neopatrná aplikace rázových vln může způsobit vážná poškození.

Rázová vlna se liší od vlnění ultrazvukového jednak tím, že se prostředím šíří jako jediný mohutný tlakový kmit trvající méně než 1 μs, s dobou nárůstu tlaku na hodnoty 10 – 100 MPa pod 100 ns. Na rozdíl od ultrazvuku, který má charakter sinusoidy s periodicky se střídající částí pozitivní a negativní částí vlny, je rázová vlna aperiodická. Výkon v rázové vlně má desítky až stovky kilowattů [26]. Časový průběh tlaku fokusované rázové vlny v ohnisku závisí na primárním zdroji tlaku. Silnoproudá jiskra ve vodě je primárním zdrojem „silné“ rázové vlny v generátoru pro drcení kamenů. Ta je „bodovým zdrojem“ silné rázové vlny, kde se složité nelineární procesy (kolaps plazmové bubliny a pod.) odehrávají v oblasti primárního ohniska a do sekundárního ohniska (do kamene) se podtlakové části vlny silně utlumí. Tím je značně utlumen vznik kavitací v sekundárním ohnisku, a tím je to šetrnější ke stěnám ledviny. U nového generátoru je to tak trochu naopak. Mnohokanálovým výbojem se na povrchu kompozitní anody generuje poměrně malý tlakový impuls a k jeho transformaci na rázovou vlnu dochází teprve během jeho fokusace v těsném okolí ohniska. Tím, samozřejmě, vzniká poměrně silná vlna zředění, která překračuje kavitační práh vody a kolabující kavitace generují sekundární, velmi

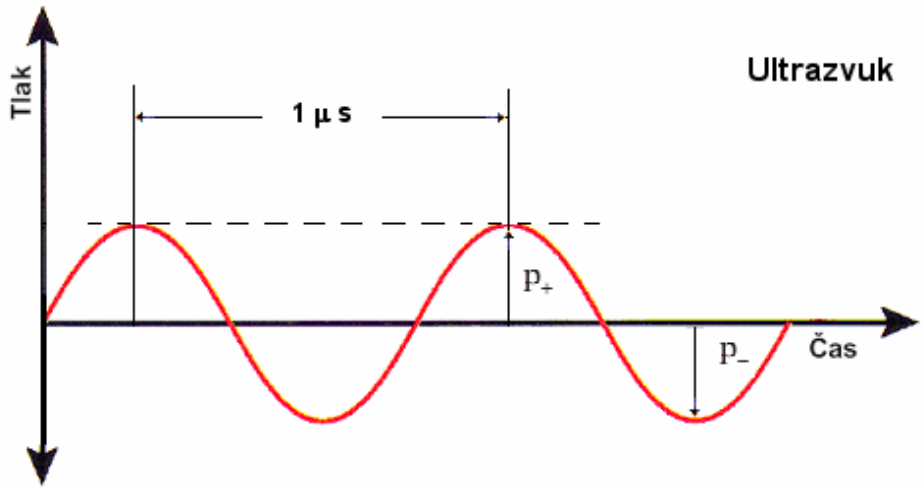
krátkovlnné rázové vlny, které mohou interagovat se strukturami buněčných rozměrů.

Na druhou stranu tlakové vlny zahrnují celou škálu akustických jevů, které jsou charakterizovány vlnovým šířením v mediu (např. vodě, tkáni). Akustická energie rázových vln má výjimečné postavení. Na rozdíl od jiných forem energie proniká snadno, a do jistého prahu bez poškození, měkkých tkání a přitom je možno ji účinně lokalizovat do definovaného objemu.

Obr 5. Charakteristika rázové vlny, která se představuje jako jediný mohutný tlakový kmit s velmi krátkým průběhem (t < 1s).



Obr 6. Ultrazvuková charakteristika s periodickým střídáním pozitivní a negativní vlny.



Praktická aplikace rázových vln je podstatou metody zvané litotrypse extrakorporální rázovou vlnou (LERV) - Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL), kde rázové vlny úplně změnily charakter léčby litiázy, protože umožňují odstraňování konkrementů jejich fragmentací. Několik stovek až tisíců rázových vln soustředěných elipsoidním reflektorem stačí k tomu, aby se žlučníkový nebo ledvinový kámen změnil na písek, který může odejít přirozenými cestami. Přitom míra poškození okolních měkkých tkání je poměrně malá.

Elektrickou jiskrou generované rázové vlny litotryptorů mají špičkovou hodnotu kladného akustického tlaku kolem 100 MPa, amplituda záporné tlakové půlvlny je zhruba desetkrát menší, přesto však dostatečná k tomu, aby mohla vyvolat expanzi a následný kavitační kolaps přítomných plynových mikrobublin, zejména těch, které se vytvářejí na povrchu kamene, který má být v těle rozrušen. Mikrobublinky jsou nestabilní útvary, které rychle adiabaticky zanikají a způsobují tak lokální nárůst teploty o několik řádů, a proto účinek na tkáň je i tepelný. Rázové vlny tedy působí nejen přímo - mechanickým stresem - ale i nepřímo - prostřednictvím kavitace a zvýšením teploty (viz Příloha Obr. 1). Předností metody je malá zátěž pro nemocného a možnost opakovat i u nemocných v těžkém klinickém stavu.

1.4 Základní části přístroje

Všechny přístroje využívající rázovou vlnu, bez ohledu na to, jestli se jedná o terapeutické, experimentální, nebo diagnostické využití, se skládají ze 4 základních částí: 1. Generátor, 2. Fokusační prvek, 3. Zaměřovací systém, 4. Vodivý systém - systém pro odstranění útlumu na rozhraní.

1.4.1 Generátor rázových vln

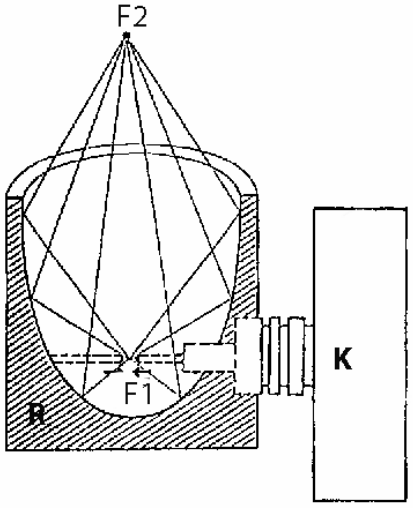
Generátory rázových vln používané pro drcení ledvinových a žlučových kamenů lze rozdělit na tři hlavní typy. Generátory elektrohydraulické, piezoelektrické a elektrodynamické. Tohle dělení je podle způsobu vzniku rázových vln. Z hlediska vedlejších účinků rázových vln je významné, že v piezoelektrickém a elektrodynamickém generátoru vzniká rázová vlna až při cestě médiem. Pro formování čela rázové vlny je přitom odsávána část energie z pozdější fáze vlny, kde dochází k prohloubení podtlakové fáze s jejími negativními účinky na organismus [27].

1.4.1.1 Electrohydraulický zdroj

Jedná se o nejstarší princip generování rázové vlny, vyvinutý v roce 1980 společností Dornier (Německo) a zabudovaný do prvního klinicky použitého litotryptoru [28]. Výboj, vzniklý extrakorporálně ve vodním jiskřišti mezi dvěma hroty elektrod, způsobí ve svém ohnisku vypaření vody. V daném místě se tím uvnitř kapaliny vytvoří kavitace, kterou si můžeme představit jako plynnou kouli. Tato v krátkém časovém okamžiku výrazně zvětšuje svůj objem. To nazýváme objemovou expanzí. Expanze způsobí v okolním vodním prostředí prudké zvýšení tlaku [29]. Jiskrový výboj mezi hrotovými elektrodami vzdálenými od sebe kolem 1 mm generuje ve výbojovém kanálu při proudech kolem 10 kA extrémně vysoké tlaky řádu GPa (10tisíc atmosfér) [30]. Tento energetický impulz se šíří do okolí nadzvukovou rychlostí všemi směry. Má podobu

divergentní kulové tlakové (rázové) vlny, jejíž amplituda tlaku klesá s narůstající vzdáleností. Ta je odražena kovovým reflektorem ve tvaru zhruba poloviny-elipsoidu (Eliptický otevřený reflektor). Šíří se vodní náplní a v sekundárním ohnisku (mimo elipsoid), ve kterém je umístěn kámen, se opět zkoncentruje. V tomto bodě má koncentrovaná energie své největší účinky. Voda je ohřátá na tělesnou teplotu a pro eliminaci volných vzduchových bublin řádně odplyněna. Zabraňuje to rozptylu energie, což je jev snižující účinek terapie. Energii výboje je možné plynule nastavovat. Systém jiskřiště umožňuje regulaci vzdálenosti mezi špičkami elektrod podle nastaveného napětí, kvality vody a stupně opotřebení elektrod. Systém výměnných elektrod představuje velmi nízké provozní náklady na pacienta. Opotřebované hroty obou elektrod mohou být přebroušeny několikrát, hrot dlouhé elektrody lze při úplném opotřebení nahradit hrotem novým [31]. Princip generátoru je na obrázku 7.

Obr. 7 Schéma elektrohydraulického generátoru RV



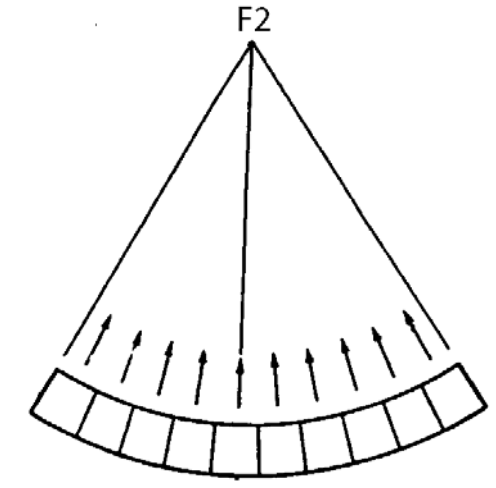
1. F1 – primární ohnisko (místo vzniku rázových vln ve vodě mezi hroty elektrod)
2. F2 – sekundární ohnisko (místo, kde leží cílený předmět např. konkrement)
3. R – kovový reflektor RV
4. K – kondenzátor (zdroj napětí)

1.4.1.2 Piezoelektrický generátor

Vznik tohoto dalšího typu generátoru rázových vln je spojován s rokem 1985. Piezoelektrický zdroj pozůstává z několika piezoelektrických elementů (keramická tělíska), která jsou zasazena na sférický talíř a vytváří se tak samo zaostřovací zařízení. Piezoelektrické elementy jsou rozkmitávány přiváděnými elektrickými impulzy, čímž vznikají a do prostředí se vysílají zvukové vlny. Frekvence kmitů piezoelektrických elementů je v oblasti ultrazvukového vlnění. Je to proces přeměny elektrické energie v mechanickou (jde vlastně o obrácený piezoelektrický jev, kde elektrické pole působí na krystal). Emitovaná energie každého prvku je docela slabá, a dosahuje vyšší energie pouze v místě ohniska, kde se všechny jednotlivé vlny spojují [32].

Za výhodu je možno považovat fakt, že ohnisková zóna je docela malá a má doutníkový tvar. Kladem tohoto zdroje je také možnost pracovat s vyšší frekvenci a aplikovat tak větší počet rázů. Piezoelektrické zdroje rázové vlny jsou velmi spolehlivé. Velký otvor zdroje umožňuje téměř bezbolestnou léčbu, z důvodu nízkých tlaků v oblasti přechodu kůži. Jako nevýhoda piezoelektrického generátoru se uvádí právě nižší hodnota tlaků rázových vln. Obr. 8 Piezoelektrický generátor

Obr. 8 Schéma piezoelektrického (sférického) generátoru RV



piezoelektrický zdroj rázové vlny

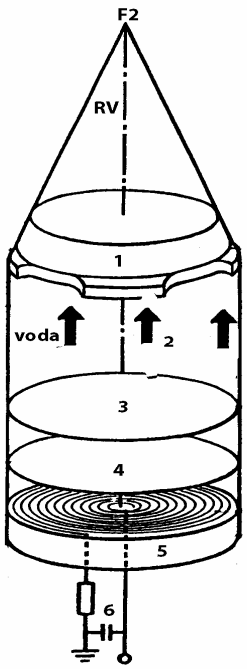
1. Šipky ukazují směr fokusace rázových vln do ohniska (F2).
2. Čtverce představují piezoelektrické elementy

1.4.1.3 Elektromagnetický generátor

První litotryptor který využil tohoto zdroje byl přístroj Lithostar od firmy Siemens (1986) s dvojicí včleněných elektromagnetických zdrojů rázových vln na obou stranách pacienta, který ležel na zádech na standardním rentgenovým stole. Poprvé popsal nefokusovanou elektromagnetickou rázovou vlnu v roce 1962 německý experimentální fyzik Wolfgang Eisenmenger.

Principiálně se využívá, jak už i samotný název napovídá, elektromagnetického jevu. Základními součástmi jsou plochá elektromagnetická cívka a na ní uložena kovová membrána. Jakmile je vysoké napětí aplikováno na cívku, kovová membrána se rozkmitá, a vyprodukuje akustickou vlnu (podobně jako u zvukového reproduktoru). Jde o rovinnou vlnu, která postupuje vodním prostředím paralelním směrem. K fokusaci rovinné tlakové vlny je použit systém „akustických čoček“. Výhodou systému „akustických čoček“je, že můžou být používány pro několik sto tisíc rázových vln bez potřeby výměny [34]. Nevýhodou těchto generátorů, obzvláště starších typů, je ve srovnání s hydraulickým generátorem menší rázová vlna, velmi dlouhé ohnisko a prohloubená negativní část, následkem čeho jsou zvýrazněny vedlejší účinky (kavitace) a traumatizace okolních tkání.

Obr. 9 Elektromagnetický generátor rázových vln (RV).



1. Akustický fokusační systém čoček
2. Šipky představují akustickou rovinnou vlnu ve vodném prostředí
3. Kovová membrána
4. Izolační folie
5. Plochá elektrická cívka s keramickým dnem
6. Zdroj vysokého napětí

1.4.1.3 Mikroexplozivní zdroj

Tento zdroj rázové vlny je zmíněn jen pro historický zájem. Rázová vlna byla vytvořená malou kuličkou olověné kyseliny, která byla odpálena v primárním ohnisku semi-elipsoidu (Elipticky otevřený reflektor). Následně byla odražená stěn okolního kovového semi-elipsoidu a nasměrována k sekundárnímu ohnisku elipsoidu [33].

Nicméně, tato metoda nebyla přijatá a opustilo se od ní z důvodu rizika exploze.

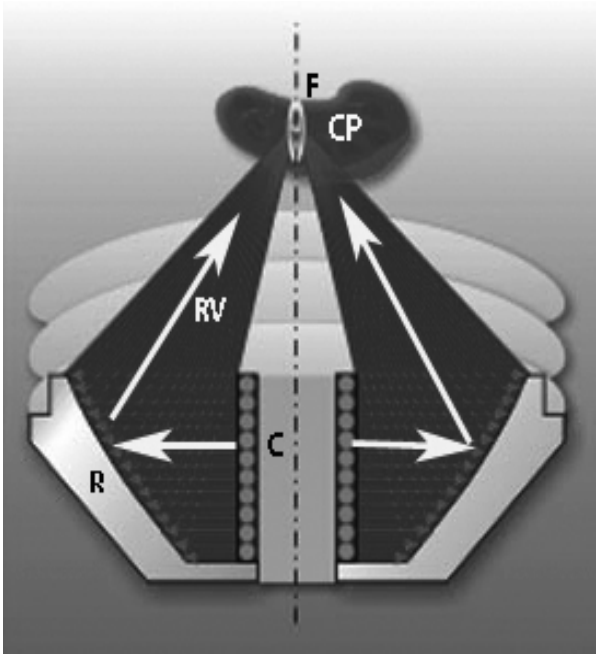
1.4.1.5 Experimentální generátor na principu mnohokanálového impulsního výboje

Ve spolupráci s Ústavem fyziky plazmatu byl vytvořen nový zdroj generující RV ve vodě mnohokanálovým výbojem. Využili k tomu znalostí z výzkumu výbojů pro čištění vody, kde pozorovali, že pokud je kompozitní elektroda v silně vodivé vodě, vytváří se na ní velké množství výbojových kanálků, které rovnoměrně pokrývají celý povrch elektrody. K získání výboje tedy použili válcovou kompozitní elektrodu (Ø60x100mm, povrch cca 200cm^2), pokrytou tenkou vrstvou porézní keramiky (kompozitní anoda). V každém póru anody vznikne ve vodě se zvýšenou elektrickou vodivostí (slaná voda s vodivostí kolem 15 mS/cm) – český patent č. 291 158 udělený 30. 10. 2002., výbojový kanál a superpozicí se získá cylindrická tlaková vlna šířící se od anody. Tato vlna je fokusována kovovým parabolickým reflektorem na silnou rázovou vlnu s nárůstem tlaku na 100 MPa za 50 ns a transformuje se na vlnu rázovou až v těsném okolí ohniska. Tím je zároveň dosaženo toho, že podtlaková fáze rázové vlny dosahuje v ohnisku hodnot kolem 20 – 25% tlakové fáze vlny (–25 MPa) a tím přesahuje kavitační práh vody. Kolabující kavitace generují sekundární, velmi krátkovlnné (pod 100 μm dlouhé) rázové vlny, které mohou interagovat se strukturami buněčných rozměrů. Lze si to představit tak, že čelo vlny postupuje do neporušené vody rychlostí zvuku.

Následující části vlny se šíří do již stlačené vody, a tedy větší rychlostí a postupně „dohánějí“ čelo, čímž se vytváří téměř skoková změna tlaku. Za tlakovou fází vzniká poměrně silná vlna zředění. Pokud amplituda vlny zředění překročí kavitační práh (pevnost vody na tah), vznikají kavitace, které při svém kolapsu mohou narušovat buňky.

Průměr ohniska na poloviční amplitudě tlaku je 2,5 mm. U tohoto nového generátoru bylo experimentálně prokázáno, že rozměr ohniska je Ø2,5 x 35 mm, parametry obvodu je možné ovlivňovat poměr tlakové a podtlakové fáze FRV a tím regulovat oblast vzniku kavitací [25, 30].

Obr. 10 Princip cylindrického elektromagnetického zdroje rázových vln.



1. R – parabolický reflektor
2. C – cylindrický zdroj RV
3. F – sekundární ohnisko RV
4. CP – cílový předmět

K lepší lokalizaci účinků rázové vlny, se v dalších experimentech „kompozitní“ anoda rozdělila na dvě části napájené ze dvou impulsních zdrojů s různým časovým zpožděním (viz Příloha Obr. 2). Dává to možnost generovat dvě po sobě následující rázové vlny fokusované do společného ohniska (tzv. Tandemové rázové vlny). V analogii s litotrypsí se předpokládalo, že první vlna

vytvoří v prostředí akustickou nehomogenitu (jakýsi fiktivní kámen) se kterou bude druhá, hlavní vlna silně interagovat (zpoždění RV je do 100 μs). Když nehomogenitu nemám, tak si ji udělám.

Obr. 11 Experimentální generátor před výbojem (vlevo) v čase výboje (vpravo).

Exponováním lidské krve, bylo experimentálně prokázáno, že rázová vlna může účinně interagovat s objekty buněčných rozměrů [25, 30].

Během řešení projektu se prokázalo, že:

1. Tandemovými rázovými vlnami je možné bezkontaktně a lokálně narušovat buňky měkkých tkání v předem známém místě - v ohnisku rázových vln.
2. Hlavním účinkem tandemových rázových vln je mechanické narušení buněčných membrán, eventuálně působení vznikajících chemických radikálů na buňky.
3. V kombinaci se speciálními sonosensitivními léky by tandemové rázové vlny mohly být využity k sonodynamické terapii některých nádorových onemocnění.

1.4.2 Fokusační prvek

Již samotný název naznačuje, že hlavním úkolem prvku, je soustředění energie do jednoho místa – ohniska (fokusace).

Nekoncentrovaná RV by potrebovala k destrukci kamene extrémne vysokou energii, což by vedlo i výraznému poškození vedlejších tkání. Je proto nanejvýš nutné RV presne nasmerovat (fokusovat) na cíl [35].

Jakým způsobem bude k fokusaci docházet, záleží na generátoru rázových vln. Máme reflektory, které mají tvar podmíněný tvarem samotného zdroje. Pokud jde o bodový zdroj, je využíván reflektor tvaru větší poloviny rotačního elipsoidu, kde v primárním ohnisku je zdroj a do ohniska sekundárního je energie soustředěna. Máme-li zdroj tvaru válce, pracujeme s reflektorem parabolickým. Zadruhé k fokusaci slouží akustické čočky. Ty nachází uplatnění např. u rovinných zdrojů. A zatřetí je to přímo tvar zdroje vln (jako u zdroje piezoelektrického). Je-li např. zdroj ve tvaru vnitřní plochy kulového vrchlíku, tvoří se sféricky konvergentní rázová vlna [36].

1.4.3 Zaměřovací systém

Při terapeutickém, diagnostickém i experimentálním využití přístroje, se soustředíme do rozměrově ohraničené oblasti (konkrement, nádor, zkumavka). Tyhle oblasti pozorování a exponování také musíme umístit do ohniska rázové vlny. K lokalizaci a zaměření je určen právě zaměřovací systém. Lze jím také kontrolovat průběh léčby.

Existují dvě metody zaměřování, které jsou běžně užívány.

1.4.3.1 Rentgenová skiagrafie

Rentgenový zaměřovací systém je starší, byl využíván u prvních litotryptorů firmy Dornier. Zaměření je většinou prováděno pomocí dvou rentgenových projekcí, jejichž osy se protínají přímo v ohnisku, k tomu je dnes využíváno rentgenové C-rameno.

Nevýhodou je radiační zátěž pro pacienta a také nemožnost zobrazení rentgen nekontrastních kamenů, to se dá však překonat podáním kontrastu. Co se týče rentgen kontrastních kamenů, jejich lokalizace je přesnější, jsme schopni rozeznat i malé fragmenty kamene, což je výhoda oproti ultrasonografické lokalizaci (viz obrázek 3).

1.4.3.2 Ultrasonografie

Ultrasonografické zaměření je většinou realizováno tak, že ke generátoru je připojena ultrazvuková sonda. V rovině zobrazení sondy je stále umístěno ohnisko. Výhodou tohoto systému je možnost zobrazení rentgen kontrastních i nekontrastních kamenů a také kontinuální sledování fragmentace během ošetření. Limitováno je u zobrazení kamenů v močovodech, kde může být signál rušen vzduchem přítomným ve střevních kličkách, ale i při lokalizaci malých kamenů [36,12,13]

1.4.4 Vodivý systém

Systém pro odstranění útlumu na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými akustickými hustotami – při přechodu rázové vlny do těla pacienta.

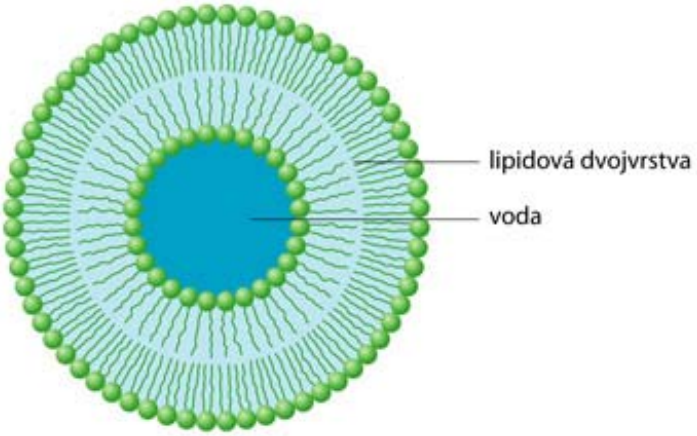
Jedná se o velmi důležitou součást celého přístroje. Víme, že energie je nejvíce pohlcována na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými akustickými hustotami, přičemž zde platí přímá úměra. Proto je tento systém využíván při přechodu vlny do těla pacienta. Běžně užívaným prostředkem je voda, která má podobnou akustickou impedanci jako měkké tkáně. Voda je ohřátá na tělesnou teplotu a pro eliminaci volných vzduchových bublin řádně odplyněna. V kombinaci se snížením tlaku se vytváří prostředí pro lepší akustický přenos rázové vlny. Na začátku byl pacient celý ponořený do vodní lázně, dnes je většina litotryptorů uzavřena membránou a s pacientem je spojena bez přítomnosti vzduchu. To usnadňuje celý výkon.

1.5 Liposomy

Liposomy jsou definovány jako malé sférické vesikuly, které jsou vytvořeny z jedné nebo více lipidových dvojvrstev. Mezi jednotlivými dvojvrstvami (převážně fosfolipidovými) je uzavřena vodná fáze. Do liposomů může být enkapsulována řada agens různého fyzikálně-chemického charakteru. Hydrofóbní látky jsou zainkorporovány do lipidové dvojvrstvy a hydrofilní látky do vnitřního vodného prostředí [37]. Připravil je A. Bangham před více než 40 lety a nyní jsou v popředí zájmu v lékařství, biochemii a biologii. Mnohé preparáty dosáhly komerčního uplatnění, např. liposomální preparáty s cytostatiky, antibiotiky, vakcínami nebo preparáty pro radiodiagnózu.

Liposomy mohou být připraveny s různým povrchovým nábojem, o různé velikosti i počtu lamel (unilamelární, oligo- nebo multilamelární vesikuly). Všechny parametry jsou závislé na zvolené metodě a chemickém složení. Liposomy slouží též jako model pro studium vlastností biologických membrán [38].

Obr. 12 Schéma liposomu



Chemické složení liposomů

Hlavní stavební složkou jsou estery 1,2-diacyl-glycerol-3-fosforečné (fosfatidové) kyseliny-fosfolipidy. Vznikají esterifikací zbytku kyseliny fosforečné ve fosfatidové kyselině alkoholem nebo aminoalkoholem (cholin, ethanolamin,

glycerol atd.). Podle zvolených fosfolipidů se připraví liposomy neutrální nebo s kladným a záporným nábojem [39].

Enkapsulace látek do liposomů

Pro enkapsulaci látek jsou více méně vhodné všechny typy liposomů. Z různých studií *in vivo* tak *in vitro* vyplynulo, že při kolizích s pevnými povrchy – například s jinými membránami nebo s molekulami bílkovin, dochází k částečnému uvolňování látek z vnějších membrán liposomu. Aby se minimalizovaly ztráty enkapsulované látky při cirkulaci liposomu, je vhodné omezit tento kritický povrch na co nejmenší plochu. Z toho vyplývá, že nejvhodnějším typem jsou multilamelární liposomy. Uvolňování látky z postupně se odbourávajících koncentrických membrán je pozvolné a dochází k němu většinou až v cílovém místě. Při kolizi MLV s pevnými povrchy dojde k narušení pouze vnějších membrán, vnitřní membrány zůstanou nepoškozené [40].

Množství léčiva, které bude enkapsulováno do liposomů závisí na jeho fyzikálně-chemickém charakteru a výběru lipidů pro přípravu liposomální kompozice.

Interakce liposomů s buňkami

Možnost využití liposomů jako terapeutických přenašečů léčiv je dáno jejich biodistribucí a intracelulárním osudem. Intravenózně aplikované liposomy jsou rychle vychytávány retikulo-endoteliálním systémem a kumulují se fagocytózou v játrech, slezině nebo v plicích [41]. Nejsou schopné proniknout do ostatních orgánů, které mají kontinuální vlásečnicový endotel. Hlavní role liposomálních preparátů je omezená na doručení enkapsulovaných látek do retikulo-endoteliálním systému, ochraně nestabilních látek před degradací, redukci toxicity léčiva v prevenci jeho vstupu do citlivých míst a v prodloužení doby působení účinné koncentrace v krvi nebo v místě injekce při extravaskulární aplikaci.

Adsorbce na povrch buňky

Téměř všechny typy liposomů primárně interagují s buňkami svou adsorbcí na buněčnou membránu. Průběh je velmi rychlý. Liposom může zůstat adsorbovaný na delší dobu a jen malá část enkapsulovaného materiálu se dostane do buňky. Při adsorbci může docházet k extensivní výměně lipidů mezi liposomem a buněčnou membránou. Jinou možností je, že po počátečním stupni adsorbce dojde k mezimembránovému přechodu nebo k fúzi liposomů s buňkou. Tento přenos zprostředkovávají specifické výměnné proteiny na povrchu buňky.

Fúze

Při fúzi dochází ke smísení lipidů liposomů s lipidy v plasmatické membráně buněk. V případě multilamelárních liposomů podléhá fúzi vnější membrána a do cytoplasmy se dostává liposom, který stejným mechanismem může interagovat s intracelulárními membránovými organelami. Liposomy je tedy možné specificky cílit nejen na buňky samotné, ale i do jednotlivých buněčných kompartmentů.

Uvolnění při kontaktu (contact-release)

Tento děj zatím nedostatečně prostudován. Při kontaktu liposomu s buňkou dojde k náhlému zvýšení permeability liposomální membrány a nastává uvolnění jeho vodných složek bezprostřední blízkosti plasmatické membrány buňky. Látky potom mohou za určitých podmínek projít membránou buňky, což má velký význam hlavně u buněk, které nejsou fagocytózy schopny.

Fagocytóza

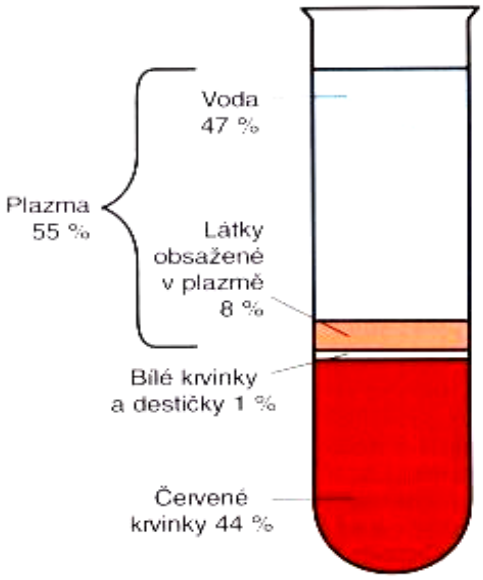
Po adsorbci liposomu na buněčnou membránu dochází k jeho obalení plasmatickou membránou buňky za vzniku endosomu. Endosomy poté fúzují s lysozomy a vznikjí tzv. sekundární lysozomy, v nichž dochází k rozrušení liposomu lysozomálními enzymy při pH okolo 4,5 [42]. Liposomální fosfolipidy jsou hydrolyzovány a obsah liposomu je uvolněn do lysozomu. Odtud je odstraňován exocytosou nebo proniká difuzí do cytoplasmy.

1.6 Krev

Krev (haema, sanquis) je suspenze formovaných elementů erytrocytů, leukocytů a trombocytů v krevní plazmě. Jako součást oběhového systému se krev podílí na mnoha funkcích – transportuje dýchací plyny (kyslík, oxid uhličitý), živiny, katabolity, hormony, vitaminy a ionty. Transportem tepla se podílí na udržení tělesné teploty u homoitermních živočichů [43].

Krev se skládá ze dvou složek – krevní plazmy (55 %) a krevních buněk (45 %).

Obr. 13 Složení krve



Zdroj: http://nova.medicina.cz/files/460.jpg

Krevní plazma

Krevní plazma je slámově zbarvená, lepkavá tekutina bez krevních buněk. Složení – 91 % voda, v ní rozpuštěných 8 % látek organických a 1 % látek anorganických.

Červené krvinky (erytrocyty)

Červené krvinky jsou nejspecializovanější, nepravé, bezjaderné buňky bez organel, které nemají dělící schopnost. U všech savců jsou kruhovité ve

tvaru dvojdutého kotouče. Jejich specifickým tvarem (až o 1/3 větší povrch než koule) je umožněno lepší vázání kyslíku na červené krevní barvivo – hemoglobin. Průměr červené krvinky se pohybuje kolem 7,2 μm.

Červené krvinky jsou nejpočetnější složkou krve. Jejich počet je u mužů a žen různý. Pohlavní rozdíly jsou dány vlivem pohlavních hormonů (testosteron a estrogen) na erytropoetin. U novorozenců je počet vyšší, protože přenos plynů přes placentu je obtížnější. Rozpad červených krvinek po narození je u novorozenců často spojen s novorozeneckou žloutenkou [44].

Funkce červených krvinek

a) transport dýchacích plynů – kyslíku (z plic ke tkáním) a oxidu uhličitého (z tkání do plic)
b) udržování stálého ph krve

Stavba a chemické složení červených krvinek

Povrch červených krvinek je určen buněčnou membránou, která se skládá z lipidové dvojvrstvy a asymetricky uspořádaných bílkovin. Bílkoviny buněčné membrány (membránový skelet) umožňuje deformaci červených krvinek při průchodu kapilárami. Hlavní stavební složkou erytrocytů je červené barvivo – hemoglobin – který tvoří 95% sušiny. Hemoglobin patří mezi dýchací pigmenty a skládá se ze dvou složek:

a) Globin – složka bílkovinné povahy
b) Hem – barevná skupina obsahující kationt železa Fe^{2+} a Fe^{3+} [44]

Bílé krvinky (leukocyty)

Bílé krvinky jsou průhledné, pravé buňky s jádrem. Jejich množství v krvi kolísá mezi hodnotami 4000 – 10000/mm^3 krve v souvislosti se zdravotním stavem. Délka života bílých krvinek je několik hodin. Jejich funkcí je zajišťovat imunitu organismu [44].

Činnost bílých krvinek

- Fagocytóza – pohlcování antigenů pomocí panožek
- Diapedéza – jsou schopny améboidního (měnavkovitého) pohybu – ten jim umožňuje procházet mezi buňkami kapilární stěny
- Pozitivní chemotaxe – jsou přitahovány chemickými látkami. Podnětem mohou být látky uvolněné z poškozených buněk či toxiny bakterií.
- Adheze – mají schopnost přilnout k různým povrchům

Rozdělení leukocytů

1) Granulocyty - jsou druhem bílých krvinek se členěným jádrem. Dále se dělí na:
    - neutrofilní granulocyty – nejpočetnější bílé krvinky. Představují první obranou linii těla proti vniklým částečkám. Jejich funkce spočívá ve fagocytóze cizorodých látek – malých částic a bakterií – mikrofágů.
    - eozifilní granulocyty – zmnožují se při alergiích a parazitárních onemocněních. Ve fagocytóze mají menší význam.
    - bazofilní granulocyty – uplatňují se při zánětlivých a alergických procesech granula. Obsahují heparin a histamin [45].

2) Agranulocyty - jsou druh bílých krvinek s velkým nečleněným jádrem. Ve své cytoplazmě neobsahují barvitelná grana a dále se dělí na:
    - Monocyty – cirkulují v krvi. Jsou to nezralé buňky, které se dostávají do některých tkání, kde se přeměňují ve volné nebo fixované fagocytující makrofágy. Jsou roztroušeny v místech, kde hrozí infekce (plíce, vazivo, trávicí trubice).
    - Lymfocyty – nejpočetnější skupina leukocytů. Mají centrální význam v imunitním systému organismu. Vznikají v kostní

dřeni. Mají schopnost tvořit protilátky nebo vyvolat jejich tvorbu. Jsou přítomné v lymfě i v lymfatických uzlinách[45].

Dělí se na:

- B-lymfocyty – zajišťují látkovou (humorální) imunitu. Při setkání s antigenem produkují protilátky, které se na antigen cizorodé buňky naváží a takto označené buňky jsou fagocytovány.
- T-lymfocyty – zajišťují buněčnou imunitu proti cizorodým buňkám (mikroorganismům, transplantátům, nádorovým buňkám, buňkám napadeným viry). Na svém povrchu mají receptory, na které se cizorodé buňky váží svými antigeny [44].

Krevní destičky (trombocyty)

Krevní destičky – nejmenší, bezjaderné fragmenty krve s ozubeným okrajem. Vedou k vytváření krevních sraženin. Jejich velikost činí 2 – 4,0 μm. Vznikají v kostní dřeni jako odštěpky velkých buněk. Jejich životnost je přibližně 12 dní. Normální počet krevních destiček se pohybuje kolem 1 200 000 – 400 000/ mm^3 krve. Nedostatek krevních destiček v krvi je zapříčiněn nízkým obsahem imunoglobulinu a vitamínem B_{12}.

Funkce destiček při srážení krve

- primární agregace – krevní destičky se váží na kolagen, který je obnažen při poranění cévy a zároveň jsou aktivovány trombinem. Aktivní trombocyty se v přítomnosti fibrinogenu shlukují a vytváří bílý trombus (zátku).
- sekundární agregace – je způsobena uvolňováním obsahu svých granul. Je započata hemokoagulace, na jejímž konci je vytvořena síť, která zpevňuje rozpadlé destičky – vytváří se červený trombus (konečná krevní sraženina) [44].

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je zjištění biologických účinků tandemových rázových vln na různých buněčných suspenzích. Hodnocení účinků rázových vln, působících na suspenzích erytrocytů a lymfocytů. Vliv polohy exponovaného vzorku na účinnost rázových vln.

Část prováděných experimentů se zabývá exponováním lypozómů, kterými by bylo možné cíleně aplikovat léky („doručit“) do oblasti poštižené nádorem a následně urychlit uvolňování farmaka z vnitra lypozómu rázovou vlnou.

Práce má taky za cíl, komparativním způsobem zhodnotit účinek jednoduchých (JRV) a tandemových (TRV) rázových vln, působících in vitro. Tyto účinky zavislé na kavitacích se mohou vyskytnout jak u litotrypse extrakorporálními rázovými vlnami (LERV), tak při jiných terapeutických metodách.

3. METODIKA PRÁCE A POUŽITÝ MATERIÁL

3.1 Použitý materiál

1) Plná krev od zdravého dárce, 15 ml
2) Heparin SANDOZ 25 000 IU/5 ml, koncentrace 1/70 ml krve
3) PBS pufr pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K2HPO4 1,50g; KH2PO4 0,20g v 1 l dest. vody)
4) Pipeta Research vari 100 – 1000 µl
5) Zkumavka PP s víčkem, centrifugační, 50ml,
6) Mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml Safe-Lock
7) Stojan na mikrozkumavky 1.5ml
8) Spektrofotometru UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-2401PC (Shimadzu, Praha, Česká Republika
9) Buňky K562: nádorová buněčná linie odvozená z myeloidní leukémie s Filadelfským chromozomem (buňky jsou volně rostoucí v médiu)
10) Medium RPMI 1640 obohacené 10% fetálního telecího séra a ATB
11) Ficoll-Paque
12) Türkův roztok (1 ml kyseliny octové, 1 ml jednoprocentního roztoku gentiánové violeti, 100 ml destilované vody)
13) Bürkerova počítací komůrka

3.2 Metodika práce

3.2.1 Suspenze ředěných erytrocytů

1. krok: Odebrání plné krve od zdravých dárců do plazmové vakuové zkumavky s heparinem litným (17 IU heparinu na 1 ml krve)
2. krok: Přidání heparinu v poměru 0,1 ml/7 ml krve
3. krok: Naředění erytrocytů PBS pufrem poměrem 1 : 1 (vznik suspenze)
4. krok: Napipetování suspenze do plastikových mikrozkumavek Eppendorf o objemu 1,5 ml
5. krok: Exponování (tabulky a grafy 1 – 2)
6. krok: Centrifugace – 15 min. při 4000 ot. /min., 4 ^{o}C
7. krok: Převedení supernatantu do nových (stejně označených) mikrozkumavek
8. krok: Stanovení volného hemoglobinu

3.2.2 Izolace lymfocytů

1. krok: Odebrání plné krve od zdravých dárců do plazmové vakuové zkumavky s heparinem litným (17 IU heparinu na 1 ml krve)
2. krok: Naředění krve PBS pufrem poměrem 1 : 1 (vznik suspenze)
3. krok: nanesení suspenze se na dělicí roztok Ficoll-Paque (5 : 4)
4. krok: Centrifugace – 20 min. při 2500 ot. /min., 4 ^{o}C
5. krok: Oddělení vrstvy mononukleárních buněk v interfázi gradientu (opatrné odpitetování pasteurovou pipetou do sterilní zkumavky)
6. krok: Doplnění PBS pufru do plného objemu sterilní zkumavky
7. krok: Centrifugace – 10 min. při 1500 ot. /min., 4 ^{o}C

8. krok: Odlití supernatantu, 2x proprání buněk PBS pufrem + centrifugace (10 min. při 1500 ot. /min., 4 ^{o}C)

9. krok: K sedimentu buněk přidání 2ml media RPMI 1640 obohaceného 10 % inaktivovaného lidského AB séra a antibiotiky

10. krok: Barvení – Türkův roztok smíchán s upraveným sedimentem (1 : 9)

11. krok: Napipetování kapky obarveného sedimentu na podložní sklíčko mikroskopu a následné spočítání počtu buněk na 1 ml

12. krok: Ředění médiem RPMI v poměru 1 : 7

13. krok: Exponování

14. krok: Barvení – Türkův roztok smíchán s upraveným sedimentem (1 : 9)

15. krok: Počítání počtu buněk v Bürkerově komůrce

3.2.3 Příprava liposomů

Unilamelární liposomy byly připraveny z L-α-fosfatidylcholinu ze sóje, Typ II-S (SPC) standartní metodou [46].

1. krok: 20 mg SPC bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu.

2. krok: Odpařením chlorofomu pod proudem dusíku při 4°C byl následně vytvořen fosfolipidový film

3 krok: Resuspenodování vysušeného filmu fosfolipidů v pufru TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) s 15 mM ANTS a 45 mM DPX.

4 krok: Směs byla vortexována po dobu 15 minut

5 krok: Opakovaná extruze Multilamelárních liposomů přes 1.0 μm a 0.05 μm polykarbonátove membrány (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL).

6 krok: Liposomy obsahující ANTS + DPX byly separovány gelovou filtrací na Sephadexové kolone G-25M (Sigma-Aldrich, UK) pro odstranění nekapsulované sondy a zhášeče.

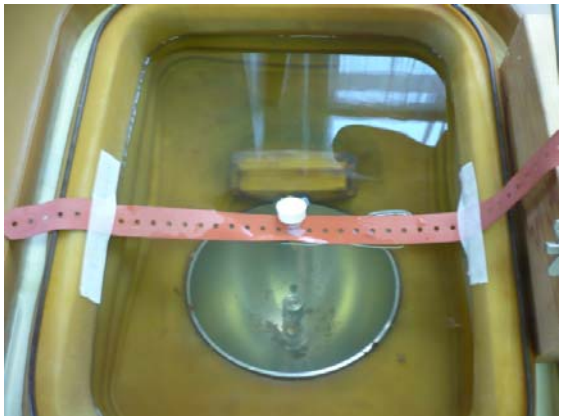
7 krok: Exponování liposomů

8 krok: Stanovení lyzi – Fluorescenční spektroskopie

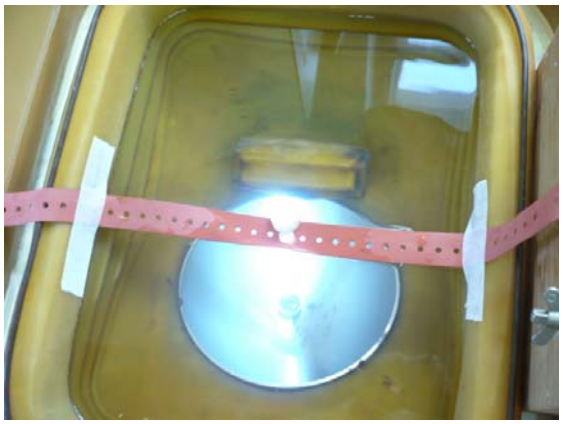
3.3 Exponování

Pro experimenty prováděné v klinickém prostředí, byl použit generátor rázových vln litotriptor Medilit, který má v základním uspořádání amplitudu pozitivní tlakové vlny p^+ = 80 MPa a amplitudu negativní vlny p^- = -10 MPa. Rázová vlna byla generována elektrickým výbojem ve vodě při různém napětí podle experimentálního uspořádání pokusu. Napětí se pohybovalo v rozsahu od 8 kV do 12 kV a kapacitě kondenzátoru od 0,2 μF. Voda pro tento experiment byla odplyněná úpravnou vody z přístroje Medilit 6 Použitý fokusační elipsoid měl poloosy 138 mm a 78 mm a velikost sekundárního ohniska bylo zhruba Ø10x45 mm. Při expozici byly zkumavky se vzorky umístěny pomocí speciálního držáku do ohniska rázové vlny (F2) a celkový počet rázů se pohyboval od 5 do 200 rázů. Na tomto typu generátoru byly exponovány pouze vzorky erytrocytů. Fotodokumentace exponování erytrocytů litotryptorem Medilit na IV. Interní klinice VFN v Praze je zachycena na obr. 13, 14, a na obrázku v příloze 3.

Obr. 14 Litotryptor Medilit před výbojem



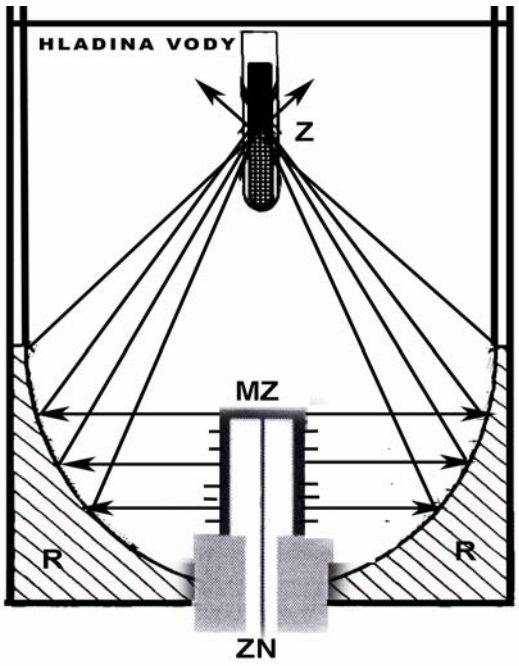
Obr. 15 Litotryptor Medilit v čase výboje



Experimenty zaměřené na sledování účinků tandemových rázových vln (interakce dvou rychle po sobě následujících vln) byly prováděné pomocí mnohakanálového výboje na ploše cylindrického válce v ÚFP, který umožňoval generovat dvě rázové vlny těsně po sobě se zpožděním cca 5 μs. Pozitivní

tlaky dosahovaly až 100 MPa při 30 kV. Vodivost okolního roztoku (vody) se pohybovala v rozmezí 3 – 20 μS/cm Schéma experimentálního uspořádání je na obrázku 14.

Obr. 16 Schéma mnohakanálového cylindrického zdroje rázových vln.



- ZN – Zdroj vysokého napětí
  15 – 30 kV
- R – Kovový reflektor RV
- MZ – Mnohakanálový zdroj
  s válcovou elektrodou
- Z – Plastická zkumavka
  s vzorkem lymfocytů nebo
  plné krve.

3. 4 Stanovení hemoglobinu uvolněného z erytrocytů

Spektrofotometrickou metodou byla u vzorků nesrážlivé krve vždy po expozici stanovena hladina volného hemoglobinu.

Stanovování se provádělo na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze (ÚHKT), na klinickém spektrofotometru UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-2401PC (Shimadzu, Praha, Česká Republika)

K měření byla použita plazma získaná po centrifugaci každého exponovaného vzorku při 3000 ot. /10 min. Metoda byla založena na měření plazmy s uvolněným hemoglobinem, který má své absorpční maximum při 415 a 460 nm pro kontrolní vzorky (s nízkou koncentrací hemoglobinu). U exponovaných vzorků s vyšším stupněm hemolýzy byla koncentrace volného hemoglobinu určena z absorbance při 540 nm s použitím absorpčním koeficientem $E^{1\%} = 8,5$ [60].

3. 5 Stanovení koncentrace a životnosti lymfocytů

Životnost a koncentrace byla stanovena ručním počítáním obarvených izolovaných lymfocytů v kalibrované Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem. K obarvení se použil Türkův roztok. Nejdříve se vyhodnocovaly kontrolní vzorky, kde se potvrdilo, že byly splněny obě základní podmínky pro stanovování lymfocytů. Izolované lymfocyty byly nasazované v koncentraci 1 mil. /ml a jejich životnost na počátku testu byla $>$ 95 % (přesně 96 %).

3. 5 Stanovení liposomů

Stanovení lyzi liposomů se provádělo na základě Fluorescenční spektroskopie. Měření fluorescence se uskutečnilo přesně podle [47] na spektrofluorimetru FluoroMax-3 JY-Horiba (excitace 370 nm, emise 505 nm, šířka štěrbiny 4 nm). Výsledná intenzita fluorescence byla korigována vůči pozadí (lipozomy bez ANTS a DPX, přibližne 2% celkové intenzity) a rozředění po přidaní Tritonu X-100.

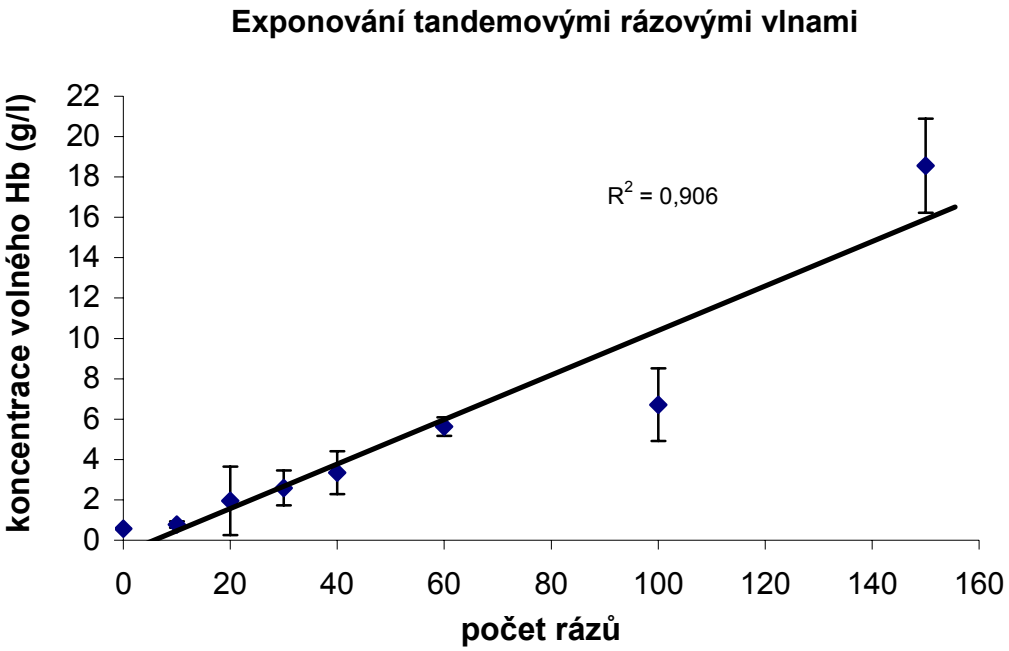
4. VÝSLEDKY

Výsledky uvedené v tabulkách a grafech (1, 3, 5) byly provedeny v ÚFP AV ČR na experimentálním mnohakanálovém zdroji rázových vln, zatím co výsledky shrnuté v tabulce a grafu 2 byly uskutečněny na klinickém litotryptoru Medilit na IV. interní klinice VFN 1. LF UK. Tabulky a grafy (4, 6, 7) zachycují komparativním způsobem, účinky jednoduchých a tandemových rázových vln na různých buněčných suspenzích.

Měření hemolýzy erytrocytů po exponování tandemovými rázovými vlnami

	Koncentrace hemoglobinu v g/l			
Počet rázů	1.měření	2.měření	**průměr**	**SD**
0	0,57	0,59	**0,58**	**0,01**
10	0,93	0,62	**0,78**	**0,16**
20	3,64	0,25	**1,94**	**1,70**
30	3,45	1,72	**2,59**	**0,86**
40	4,42	2,29	**3,35**	**1,06**
60	6,09	5,17	**5,63**	**0,46**
100	8,51	4,91	**6,71**	**1,80**
150	20,90	16,22	**18,56**	**2,34**

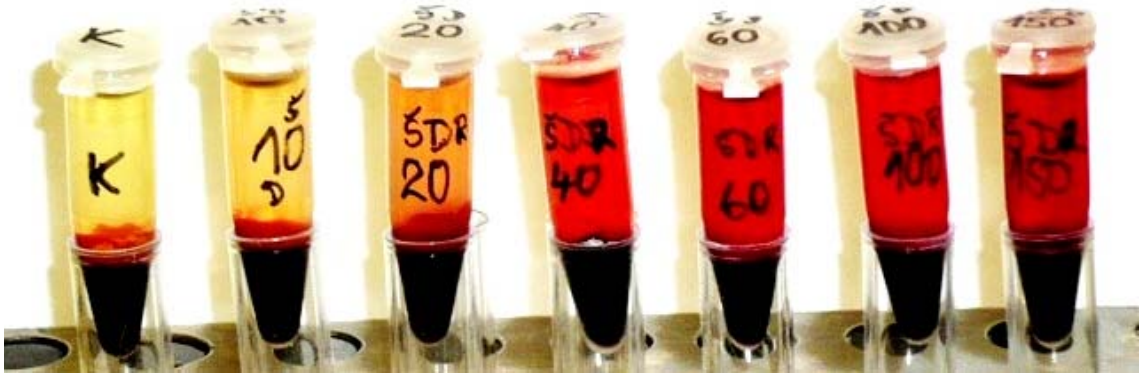
Tabulka 1: Koncentrace hemoglobinu v g/l, v závislosti na počtu rázu tandemových rázových vln.



Graf 1: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na zvyšujícím se počtu rázů

V tabulce i v grafu č. 1 je patrný pozitivní a velmi významný koeficient determinace (R^2 = 0,906) mezi koncentrací hemoglobinu a počtem rázů (TRV). Se zvyšujícím se počtem rázů dochází k většímu poškození erytrocytů, a tím i k větší koncentraci uvolněného hemoglobinu i při nezměněných nastaveních experimentálního zařízení.

Obr. 17 Fotodokumentace z experimentu – viditelná stoupající barevná řada, jako důsledek zvyšující se koncentrace volného hemoglobinu v plazmě

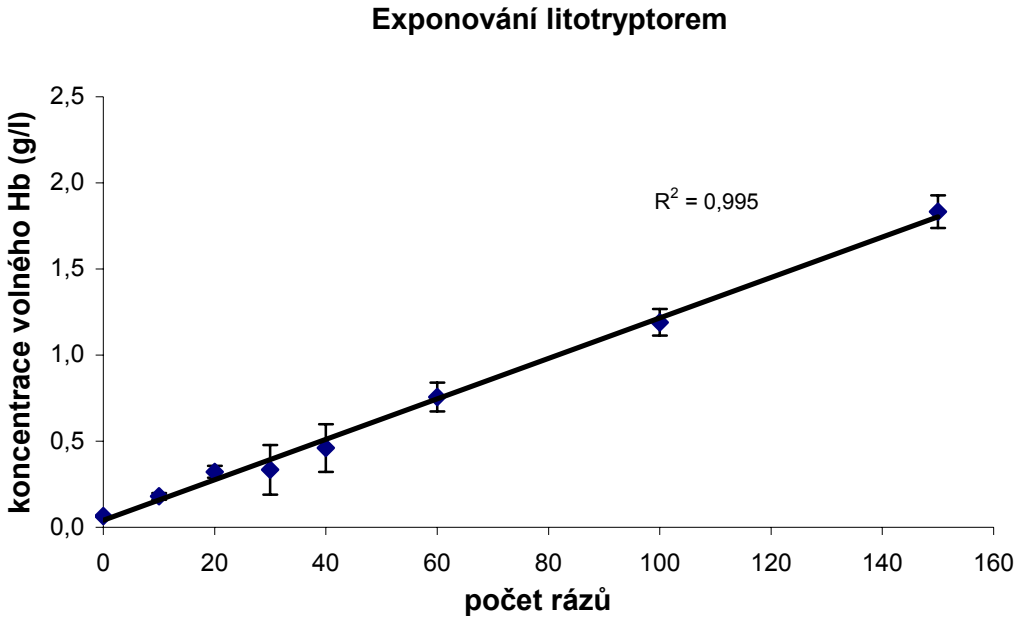


Stanovení koncentrace volného hemoglobinu po exponování klinickým litotryptorem Medilit na IV. interní klinice VFN

V grafu č. 2, je ještě výraznější koeficient determinace (R^2 = 0,995), velká síla lineární závislosti mezi koncentrací hemoglobinu a počtem rázů (JRV). Se zvyšujícím se počtem rázů dochází k většímu poškození erytrocytů, a tím i k větší koncentraci volného hemoglobinu. Účinnost litotryptoru je o řád nižší - podrobnější srovnání je v tabulce a grafu č. 3.

	Koncentrace hemoglobinu v g/l			
Počet rázů	**1.měření**	**2.měření**	**průměr**	**SD**
0	0,06	0,07	0,06	0,00
10	0,20	0,16	0,18	0,02
20	0,29	0,36	0,32	0,04
30	0,19	0,48	0,33	0,14
40	0,32	0,60	0,46	0,14
60	0,67	0,84	0,76	0,08
100	1,11	1,27	1,19	0,08
150	1,74	1,93	1,83	0,09

Tabulka 2: Koncentrace hemoglobinu v g/l, v závislosti na počtu rázu tandemových rázových vln.

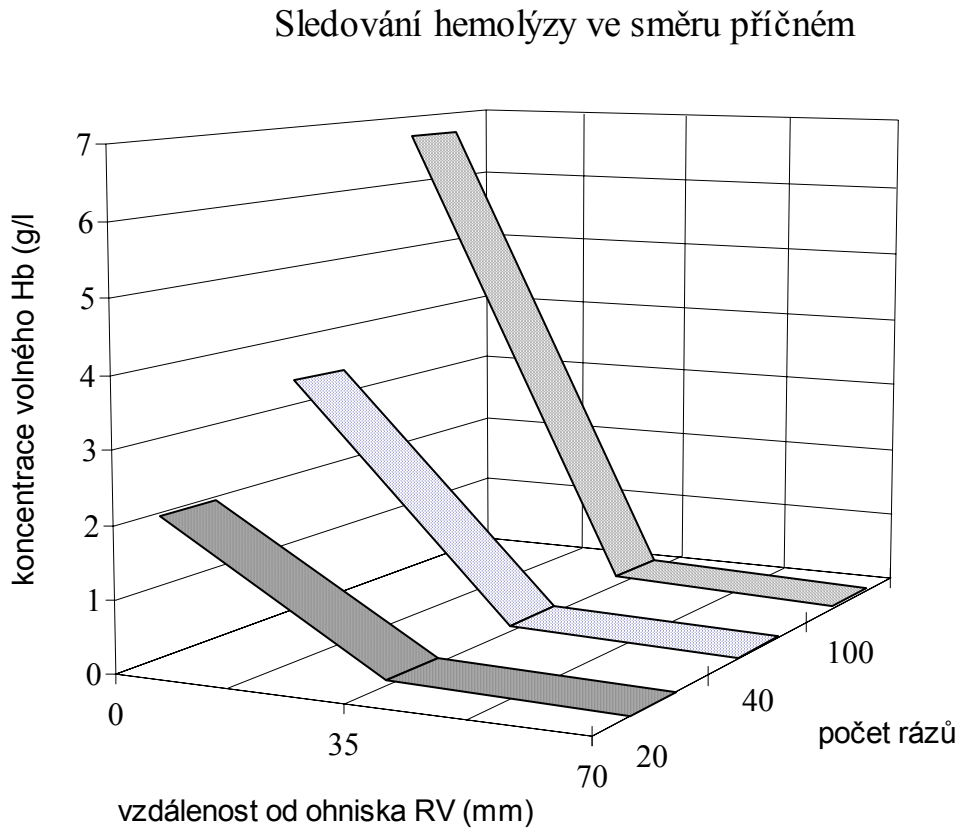


Graf 2: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace Hb v g/l) na změnu počtu rázů.

Sledování hemolýzy ve směru příčném k směru rázové vlny

	vzdálenost od ohniska		
počet rázů	**0 mm**	**35 mm**	**70 mm**
20	1,94	0,07	0,01
40	3,35	0,09	0,02
100	6,71	0,15	0,04

Tabulka 3: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů a vzdálenosti od ohniska u tandemových rázových vln (TRV) ve směru příčném. 10 násobek gramů je zvolen z důvodu malých výsledných hodnot



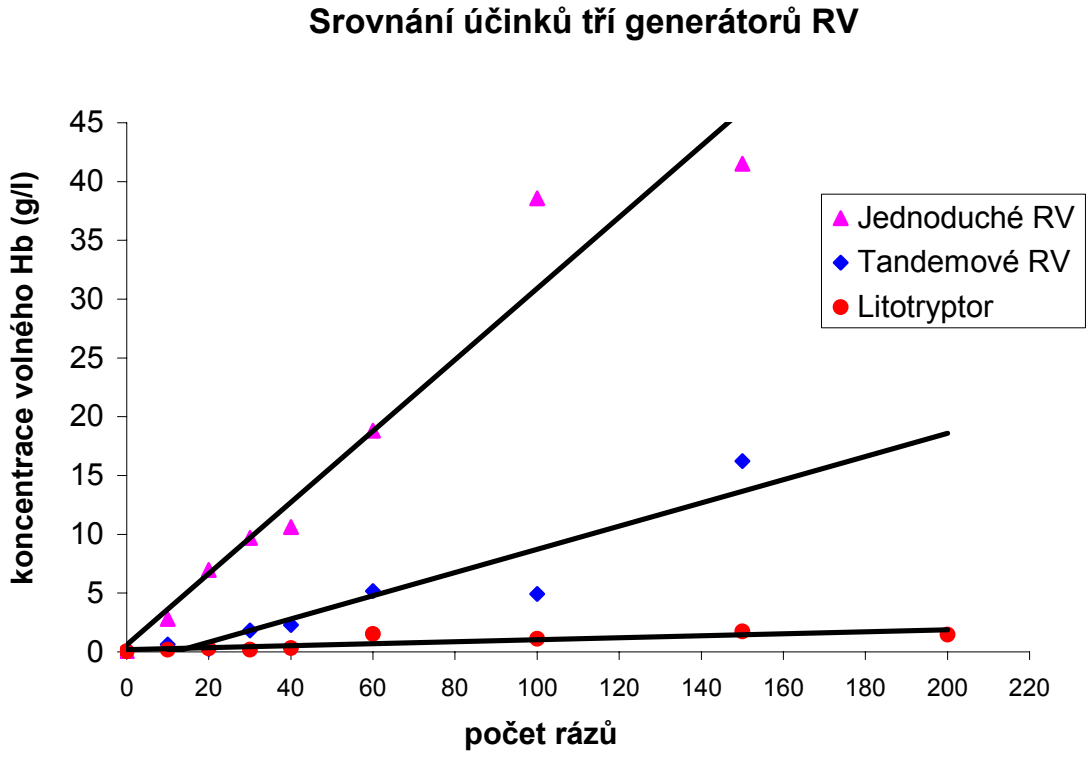
Graf 3: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů a vzdálenosti od ohniska při 30 kV u tandemových rázových vln (TRV)

Tandemové rázové vlny (TRV) mají výraznější biologické účinky v ohnisku a mimo něj jsou účinky klesající až zanedbatelné, jak ukazuje graf 3.

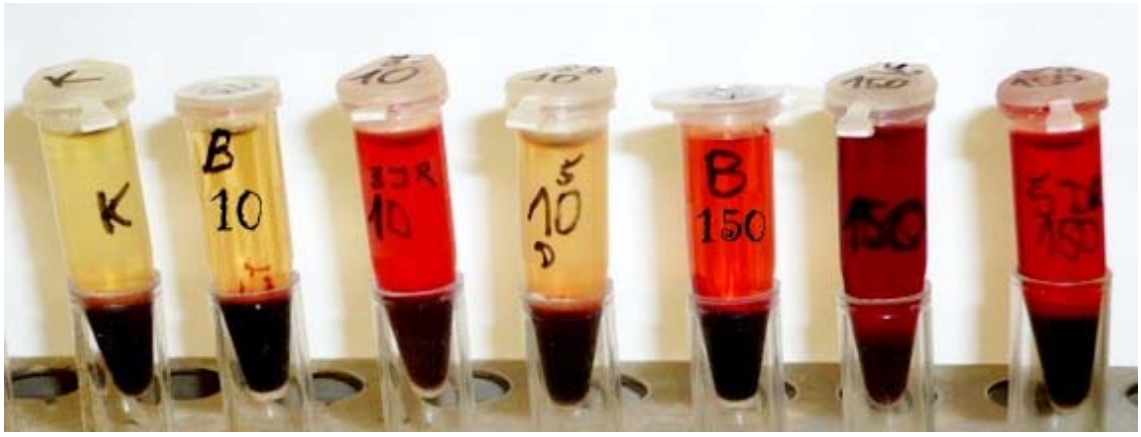
Trojí srovnání - srovnání účinků experimentálního a klinického litotryptoru

	Koncentrace hemoglobinu v g/l		
Počet rázů	**Litotryptor**	**Jednoduché RV**	**Tandemové RV**
0	0,06	0,06	0,06
10	0,20	2,80	0,62
20	0,29	6,98	0,25
30	0,19	9,69	1,82
40	0,32	10,62	2,29
60	1,54	18,82	5,17
100	1,11	38,58	4,91
150	1,74	41,52	16,22
200	1,48		

Tabulka 4: Srovnání účinnosti tří typů rázových vln – Jednoduché RV, Tandemové RV, RV generované klinickým Litotryptorem, v rozmezí 0 – 200 rázů



Graf 4: Koncentrace volného hemoglobinu v g/l po exponování experimentálním generátorem (JRV + TRV) i klinickým litotryptorem v rozmezí 0 – 200 rázů



Obr. 18 Fotodokumentace experimentu – trojí porovnání – volným okem rozeznatelná účinnost jednotlivých typů generátorů; B = klinický litotryptor, JR = jednorázy ne ÚFP, D(DR) = dvourázy (tandemové RV), čísla uvádějí počty rázů kterými byl vzorek exponován

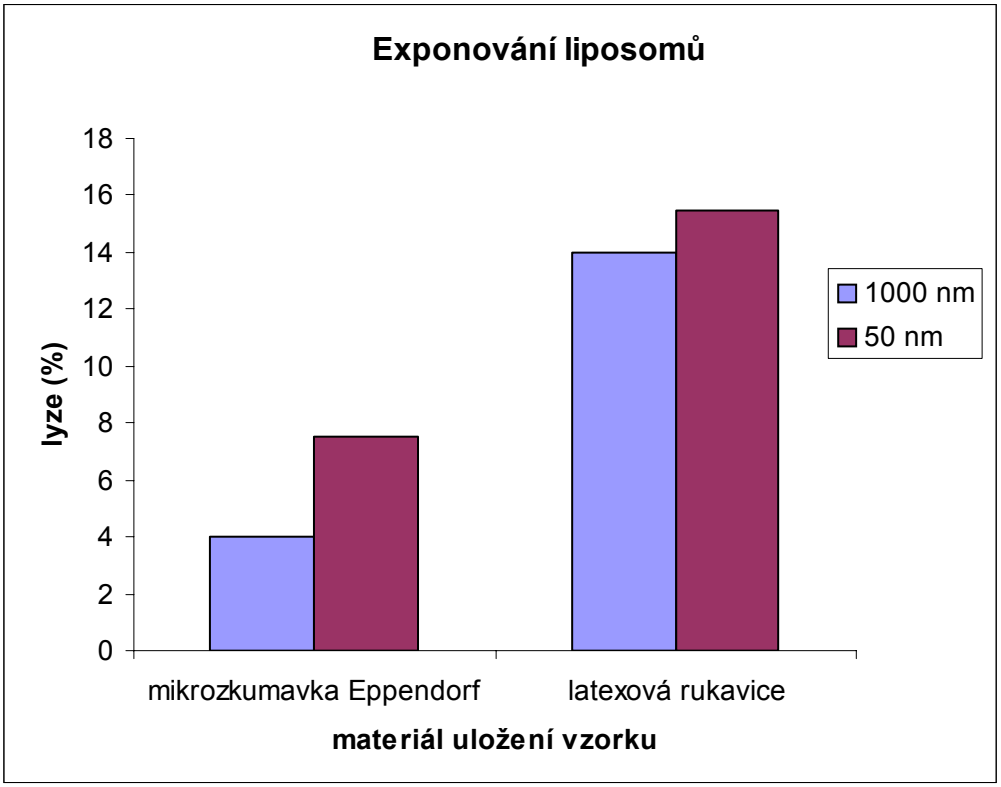
U klinického litotryptoru s rázovou vlnou určenou pro dezintegraci konkrementů je mnohem nižší účinek na erytrocyty, než u experimentálního litotryptoru. Nežádoucí účinek rázové vlny souvisí také s použitým napětím, které je u litotryptoru určenému pro klinickou aplikaci 12 kV na rozdíl od experimentálního litotryptoru, kde je použité napětí vyšší (30 kV). Důležité zjištění je však u srovnání jednorázů a tandemrázů, kde překvapivě hodnoty jednorázů převyšují hodnoty tandemových rázových vln.

Exponování Liposomů

Exponování se provádělo na experimentálním generátorů, přičemž se sledovala možnost porušení integrity membrány liposomů. Sledování se provádělo ve dvou variantách velikosti liposomů a taktéž ve dvou různých materiálech pro uložení vzorku. Průměry výsledků několika opakovaných měření jsou zachyceny v tabulce č. 5.

	rozměr (nm)	lyze (%)
mikrozkumavka Eppendorf	1000	**4**
	50	**7,5**
latexová rukavice	1000	**14**
	50	**15,5**

Tabulka 5: Exponování liposomů 600 tandemrázy

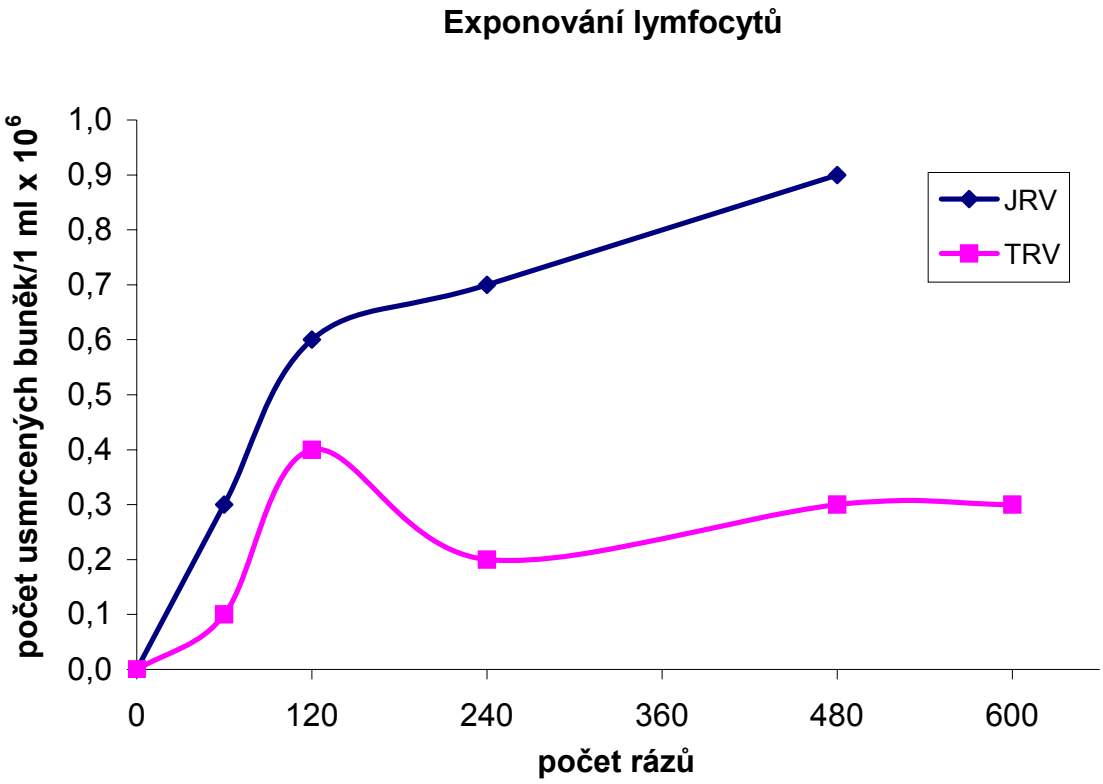


Graf 5: Procento lyze membrány liposomů vzniklé působením 600 rázů tandemových rázových vln

Exponování lymfocytů – srovnání účinků klinického a experimentálního litotryptoru

	TRV	JRV	TRV	JRV
počet rázů	počet usmrcených buněk/1 ml x 10^6	počet usmrcených buněk/1 ml x 10^6	životnost (%)	životnost (%)
0	**0**	**0**	96	96
60	**0,1**	**0,3**	97	95
120	**0,4**	**0,6**	96	94
240	**0,2**	**0,7**	96	94
480	**0,3**	**0,9**	95	89
600	**0,3**		93	

Tabulka 6: Účinnost jednoduchých a tandemových RV na suspenzi lymfocytů

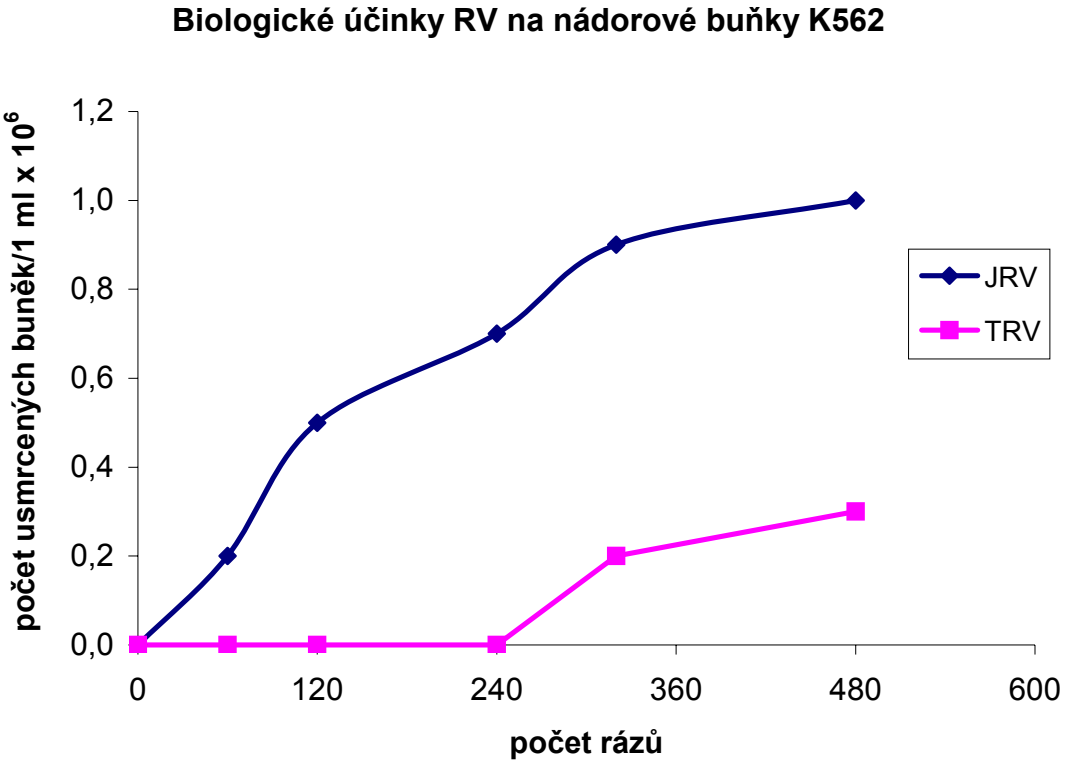


Graf 6: Počet usmrcených buněk lymfocytů

Exponování nádorové buněčné linie K562

	TRV	JRV	TRV	JRV
počet rázů	**počet usmrcených buněk/1 ml x 10^6**	**počet usmrcených buněk/1 ml x 10^6**	**životnost (%)**	**životnost (%)**
0	**0**	**0**	96	96
60	**0,1**	**0,3**	97	95
120	**0,4**	**0,6**	96	94
240	**0,2**	**0,7**	96	94
480	**0,3**	**0,9**	95	89
600	**0,3**		93	

Tabulka 7: Účinnost tandemových a jednoduchých RV na nádorové buněčné linie K562



Graf 7: Srovnání účinnosti tandemových a jednoduchých RV na nádorové buňky K562

5. DISKUSE

Zavedení ESWL do klinické praxe před 25 lety byl velký úspěch využití rázové vlny v léčbě litiázy. Vývoj ukazoval, že nezůstaly aplikace jen pro léčbu konkrementů. Celosvětový rozvoj techniky v medicíně, je patrný i v technických publikacích výzkumníků a vědců zabírajících se využitím rázových vln i v jiných medicínských odvětvích.

Klinické využití rázových vln v revmatologii v současnosti převyšuje počet výkonů prováděných pro fragmentaci litiázy. Rázová vlna je aplikována a hojně používána v revmatologii, ortopedii, akupunktuře a úrazové chirurgii a také v sportovní a ve veterinární medicíně. Velmi atraktivní a perspektivní možností je rozšíření aplikací rázových vln pro destrukci tkání zhoubných nádorů či jiných chorobných ložisek jako podpora paliativních způsobů léčby.

Při rozbíjení žlučových a jaterních kamenů je cílem vytvořit rázovou vlnu s malou podtlakovou fázi (málo kavitací), abychom minimalizovali vedlejší působení na parenchym ledvin a stěnu dutého systému. Cílem u nádorových tkání je naopak zvýšit toxické působení. Jak zařídit, aby rázové vlny působily v předem známem místě v původně akusticky homogenním prostředí tumoru na buňky, kde není problém, že buňky jsou mnohonásobně menší než konkrementy, a, že nádorové tkáně se akusticky od zdravých neliší. Buňky jsou malé a k účinné interakci dochází tehdy, když je vlnová délka srovnatelná s rozměry objektu. Proto se vedou úvahy o tom, zda v narušování buněk nehrají hlavní roli sekundární rázové vlny generované kolapsem kavitací. Tohoto principu využívá generátor rázových vln na ÚFP AV ČR, na kterém byla podstatná část pokusů v této práci provedena. Vytváří tzv. „tandemové (interagující) rázové vlny“, které mají některé přednosti či zvláštnosti. Měřením se přišlo na to, že za určitých podmínek se druhá vlna šíří do ohniska jako vlna zředění, tudíž, generuje mnohem víc kavitací a tím řádově zesílí jejich účinek v ohnisku. Interakci těchto dvou vln vzniká v ohnisku velmi složité tlakové pole s velkými gradienty tlaku na rozměrech řádu 10 mikrometru, které účinně rozbíjejí buňku, nebo krevní destičky. Samozřejmě, k nějakému praktickému využití

těchto efektu je ještě dlouhá cesta, protože jsou způsobeny fyzikálně ne zcela jasným mechanizmem. Hodnotným poznatkem ale je, že u těchto tandemových vln se zatím zásadní fyzikální bariéra nenašla.

V této práci jsme na základě experimentu *in vitro* studovali biologické účinky rázové vlny na suspenzi erytrocytů a lymfocytů. Komparativně byl sledován účinek jednoduchých (JRV) a tandemových rázových vln (TRV). Mezi oběma typy rázových vln je patrný rozdíl, přičemž TRV mají menší účinek na erytrocyty, což je deklarováno i v samotných výsledcích. Toto zjištění je zajímavé a velmi hodnotné, jelikož doposud publikované práce účinku na tkáně prokázaly výsledek zcela opačný, čili účinnost větší u tandemových rázových vln [48]. Model suspenze erytrocytů je především proti pokusům in vivo jednoduchý a lze provádět často levněji a rychle opakovat. Tím lze zpětně pomocí zjištěné hemolýzy měnit fyzikální podmínky, jako jsou výšky tlaků první či druhé rázové vlny, jejich zpoždění a pod. Právě zmíněny fyzikální podmínky mají největší vliv na účinky jednotlivých rázových vln a v budoucnu se stanou předmětem našeho zájmu. Budeme se snažit najít optimální konfiguraci generátorů a dosáhnout tak nejlepších možných výsledků, které nám poslouží k posunutí klinického využívání rázových vln směrem vpřed.

Pokus, kde erytrocyty prokazují nejvyšší hemolýzu o jednouchých rázů je, že zvolené zpoždění může již způsobovat místo účinku naopak neefektivní disipaci energie druhého rázu bez biologického účinku. Další argument jistě je, že se jednalo o experiment, kde byly přísně dodržené požadavky nezměněných podmínek. Krev exponována na všech třech typech generátorů pocházela od stejného dárce a manipulace, transport a vliv fyzikálních činitelů, byly taky stejné u všech vzorků. Pravdou zůstává, že účinnost tandemových rázových vln je způsobena fyzikálně nezcela jasným mechanizmem a dává nám více pohnutek k zabývání se touto tematikou.

Dále byly potvrzeny již publikované výsledky o tom, že existuje ostrá závislost mezi působením rázové vlny a polohou exponovaného vzorku (tabulka a graf 4). Opět byl prokázán vyšší efekt TRV přímo v bodě, do kterého je energie rázové vlny koncentrována (ohnisko).

Několik experimentů bylo zaměřeno na pozorování lineárních závislostí koncentrace hemoglobinu. První prokázána byla pozitivní lineární závislost mezi koncentrací hemoglobinu a napětím. U JRV i TRV generovaných na experimentálním generátoru v ÚFP dochází z důvodu vyššího napětí k zvýraznění účinku, poškození exponovaných erytrocytů a tím i k zvýšené koncentraci uvolněného hemoglobinu (tabulka a graf 4). Dále se sledovala lineární závislost mezi koncentraci hemoglobinu a počtem rázů. Jak u jednoduchých (tabulka, graf 2), tak u tandemových rázových vln (tabulka, graf 1) je koeficient determinace – vyjadřující sílu závislosti mezi dvěmi veličinami – pozitivní a velmi významný.

Pilotní experiment prováděný ve spolupráci s Laboratoři tkáňového inženýrství ÚEM AV byl zaměřen na sledování účinků rázových vln na směs liposomů, konkrétně zjistit procento lýze liposomů. Liposomy obsahující uzavřenou fluorescenční sondu ANTS a zhášeč DPX byly exponovány 600 rázy. Pokus se prováděl ve čtyřech variantách – exponování liposomů o velikosti 50 a 1000 nm a exponování ve dvou různých materiálech pro umístnění směsi (mikrozkumavky Eppendorf, latexové vyšetřovací rukavice). Výsledky experimentu jsou shrnuty v tabulce č. 5, která obsahuje výsledné průměry ze čtyř pozorování pro každou variantu.

Z pilotního experimentu mužem jednoznačně vyvodit závěr že vhodnějším materiálem na rozbíjení liposomů je latexová vyšetřovací rukavice. Důvodem zde bude slabší stěna materiálů a tím menší útlum energie na přechodu prostředí. Co se různé velikosti lipozomů týče na základe získaných výsledků nemůžeme jednoznačně tvrdit, že pro enkapsulaci sondy a zhášeče jsou vhodnější menší velikosti liposomů, i když naše výsledky na toto v menší míře poukazují. K vyslovení jednoznačných závěrů bude potřeba několikanásobné opakování a metodologické upravování prováděných experimentů.

Řada pracovišť se účinkem tlakových akustických energií zabývá a jeden principiální účinek již je klinicky průkazný u vysokointenzivního fokusovaného ultrazvuku (HIFU). Tato metoda sice má za hlavní toxické působení účinek

tepelný než kavitační, ale dokazuje, že lze i akustickou formou koncentrovat energii dojednoho bodu v hloubce tkání.

6. ZÁVĚRY

- Se zvyšujícím se počtem rázů dochází k většímu poškození erytrocytů, a tím i k větší koncentraci uvolněného hemoglobinu.
- Počet přežitých lymfocytů je přímo úměrný počtu tlakových vln.
- Čím větší je napětí, tím větší je biologický účinek rázové vlny.
- Mezi ohniskem rázových vln a okolní tkání je velmi ostrý přechod, tudíž je poškození okolních tkání zanedbatelné
- Lze předpokládat, že se snižující se koncentrací buněk ve vzorku je účinnost rázových vln nižší
- Koncentrace uvolněného hemoglobinu je při působení dvou po sobě jdoucích rázových vln (TRV) nižší než při jednoduché rázové vlně (JRV).

7. LITERATURA

1. MORNSTEIN, V; ŠKORPÍKOVÁ, J; FORÝTKOVÁ, L. *Biologické účinky ultrazvuku : Biologické účinky ultrazvuku*. Olomouc, 2003. současný stav znalostí. In Pacient a ultrazvuk, [část knihy]

2. THIEL, M Application of shock waves in medicine. In . Clin orthop, 2001. [příspěvek]

3. MORNSTEIN, V; ŠKORPÍKOVÁ, J; FORÝTKOVÁ, L. *Biologické účinky ultrazvuku : Biologické účinky ultrazvuku*. Olomouc, 2003. současný stav znalostí. In Pacient a ultrazvuk, [část knihy]

4. BENEŠ, Jiří. *Biologické účinky rázové vlny a biliární litotrypse*. Praha, 1999. 3 s. Dizertační práce. 1. lékařská fakulta. [akademická práce]

5. DVOŘÁČEK, J. *Urologie I*. Praha : ISV nakladatelství Praha, 1998. [kniha]

6. BENEŠ, J, et al. Initial experimental findings on the disruption of gallstones using focused shock waves. *Cas Lek Cesk*. 1986, 91. [článek]

7. BENEŠ, J, et al A simple model for verifying the effects of a focused shock wave from our generator on erythrocytes and lymphocytes. In . sb lek., 1989. [příspěvek]

8. BENEŠ, J, et al Preclinical verification of possibilities of extracorporeal lithotripsy of gallstones in experimental animals. In . sb lek., 1987. [příspěvek]

9. BENEŠ, Jiří. *Zavedení nového litotryptoru do klinické praxe a neobvyklé aplikace rázových vln*., 2000. 146 s. Habilitační práce. Univerzita Karlova 1.lékařská fakulta. [akademická práce]

10. 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. In . sb lek., 2001. s. 17-22. [příspěvek]

11. BENEŠ, J, et al. *Zařízení pro klinické provádění mimotělní lithotripsie žlučových kamenů*. Čr.a 61B17/22, 1990-01-02. Zařízení pro klinické provádění mimotělní lithotripsie žlučových kamenů. [část knihy]

12. BENEŠ, J, et al První zkušenosti s ČSL. zařízením k léčbě ledvinových kamenů litotripsií rázovou vlnou. In.ročenka.: Prakt.lek, 1989. [příspěvek]

13. BENEŠ, J, et al Léčba ledvinových kamenů litotrypsí rázovou vlnou se sonografickým zaměřením. In *Sborník lekařský*., 1991. s. 293-299. [příspěvek]

14. *Www.fno.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-05-27]. Http://www.fno.cz/oddeleni-urologicke/casto-kladene-otazky. Dostupné z WWW: <http://www.fno.cz>. [webová stránka]

15. KORDAČ, V, et al Lithotripsy of gallstones using shock waves. First clinical experience in Czechoslovakia.. In . cas.lek cesk., 1988. s. 127. [příspěvek]

16. MAY, T.C., In *Use of high-energy shock waves for bone cement removal*. J Arthroplasty., 1990. s. 19-27. [příspěvek]

17. *Www.ortopediekozak.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-05-27]. [http://www.ortopediekozak.cz/vlna.htm]. Dostupné z WWW: <www.ortopediekozak.cz>. [webová stránka]

18. ŠUNKA, P, et al Generation of focused shock waves by multicannel el. discharged in water. In . Czech J Physics, 2002. [příspěvek]

19. BENEŠ, J, et al Effect on hemolysis by shock waves created by a new method of multichannel discharge. In . sb lek., 2001. s. 29-35. [příspěvek]

20. COLEMAN, A.j., et al. Acoustic cavitation generated by an extracorporeal shockwave lithotripter. *Ultrasound Med Biol*. 1987, 13, s. 69-76. [článek]

21. ŠUNKA, P, et al Potential applications of tandem shock waves in cancer therapy, Pulsed Power and Plasma Science Conference 2007. In ., 2007. s. 1074-1077. ISBN 1-4244-0914-4. [příspěvek]

22. GRANJA, C., et al. *Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine*. AIP Conference Proceedings, Vol. 958. Prague : Softcover, July 2007. 308 p. s. ISBN 978-0-7354-0472-4/07.

23. ŠUNKA, Pavel Impulzní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně. In *Impulzní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně*. Ústav fyziky plazmatu AV ČR : [s.n.], 2006. s. 999. Dostupné z WWW: <http://archiv.otevrena-veda.cz>. [příspěvek]

24. *Www.ceska televize.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-05-30]. Http://www.ceskatelevize.cz/program/port/tema/76-vyboj-ktery-leci. Dostupné z WWW: <ceska televize.cz>. [webová stránka]

25. MORNSTEIN, Vojtěch. Ultrazvuk v biologii a medicíně. *Vesmír*. 1995, 74, 10, s. 566. Dostupný také z WWW: <vesmir.cz>. [článek]

26. MORNSTEIN, Vojtěch ; POSPÍŠILOVÁ, Jiřina . *Www.zcu.cz* [online]. Plzeň : 1999, 1999 [cit. 2010-05-31]. Stag.zcu.cz/fel/kae/le/ultrazvu.doc. Dostupné z WWW: <stag.zcu.cz/fel/kae/le/ultrazvu.doc>.

27. ŠTUKA, č; BENEŠ, J; ŠUNKA, P. Rázové vlny a litotrypse. *Remedia populi*. 1998, 3, s. 6-16. ISSN 1211-698X. [článek]

28. WILBERT, D.m. A comparative review of extracorporeal shock wave generation. In *Department of Urology*. Tuebingen, Germany : University of Tuebingen Medical School, [příspěvek]

29. RAJMON, Pavel. CO NOVÉHO V LÉČBĚ UROLITIÁZY. *Urologická klinika FN Olomouc Interní medicína : meziodborové přehledy*. 2003, 1, s. 4-5. [článek]

30. ŠUNKA, Pavel. *Impulsní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně aneb kam až sahá čtvrté skupenství hmoty*. Ústav fyziky plazmatu AV ČR

31. *Www.medipo.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-05-30]. Www.medipo.cz. Dostupné z WWW: <medipo.cz>.[webová stránka]

32. MARBERGER, M; TUERK, C; STEINKOGLER, I. Painless piezoelectric extracorporeal lithotripsy. *J Urol*. 1988, 139, s. 695-699. [článek]

33. KUWAHARA, M; KAMBE, K; KUROSU, S. Clinical application of extracorporeal shock wave lithotripsy using microexplosions. *J Urol*. 1987, 137, s. 837-841. [článek]

34. WILBERT, Dm, et al. New generation shock wave lithotripsy. *J Urol*. 1987, 138, s. 563-565. [článek]

35. DVOŘÁČEK, J. Principy litotripse mimotelní rázovou vlnou a její historie. *VFN/novinky* [online]. 2009, 999, [cit. 24.9.2009]. Dostupný z WWW: <http://www.fno.cz>. [e-článek]

36. GRASSO, Michael Extracorporeal Shockwave Lithotripsy. In *Extracorporeal Shockwave Lithotripsy* [online]., 2008 [cit. 2010-05-30]. Dostupné z WWW: <emedicine.com>.[e-článek]

37. BANGHAM, A.d.; STANDISH, M.m.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Moleccular Biology*. 1965, 13, s. 238-252. [článek]

38. KODÍČEK, M. *Výkladový slovník* . Praha : VŠCHT, 2007. 999 s. Dostupné z WWW: <vydavatelstvi.vscht.cz>.

39. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Academie Praha : [s.n.], 2002. 999 s. [kniha]

40. Rickwood D., Hames B. *Liposomes- a practical approach*. RCC Nem, ed. IRL Press Oxford, United Kingdom, 1990

41. VAN ROOIIJEN, N. Liposomes in host defence mechanism : A key role for macrophages. *Journal of Liposome Reasearch*. 1994, 4, s. 193 - 201

42. DINGLE, JT; JACQUES, PJ; SHAW, IH. Liposomes in applied biology and therapeutics. *North Holland publishing Co*. 1979, 6, s. 49.

43. LANGMEIER, Miloš, et al. *55. Základy lékařské fyziologie*. [s.l.] : Grada Publishing a.s., 2009. 320 s. ISBN 8024725266, 9788024725260. [kniha]

44. *Www.moje-krev.cz* [online]. 2010 [cit. 2010-05-30]. Www.moje-krev.cz. Dostupné z WWW: <moje-krev.cz>.[webová stránka]

45. DYLEVSKÝ, I; TROJAN, S. *Somatologie I.*. 1. vydání. Praha : Avicenum , 1990. 271 s. ISBN 80-201-0026-1. [kniha]

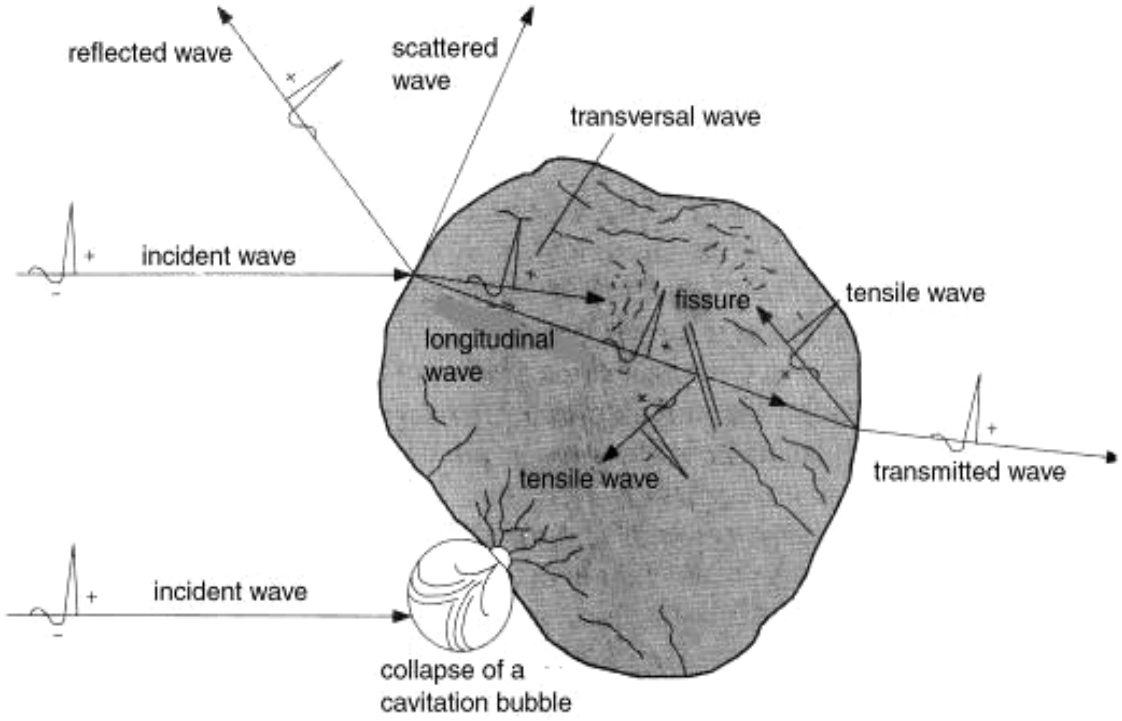
46. FIŠER, R; KONOPÁSEK, I. *Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins : HlyA from Escherichia coli and CyaA from Bordetella pertusis*. [s.l.] : Biochim Biophys, 2009. 999 s. [kniha]

47. MACDONALD, R.c., et al. *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large : unilamellar vesicles*. Biochim. Biophys : [s.n.], 1991. 303 s. [kniha]

48. IBRAHIM, Ibrahim. *Biologické účinky rázové vlny*. Praha, 2004. 43 s. Diplomová práce. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze.

Přílohy

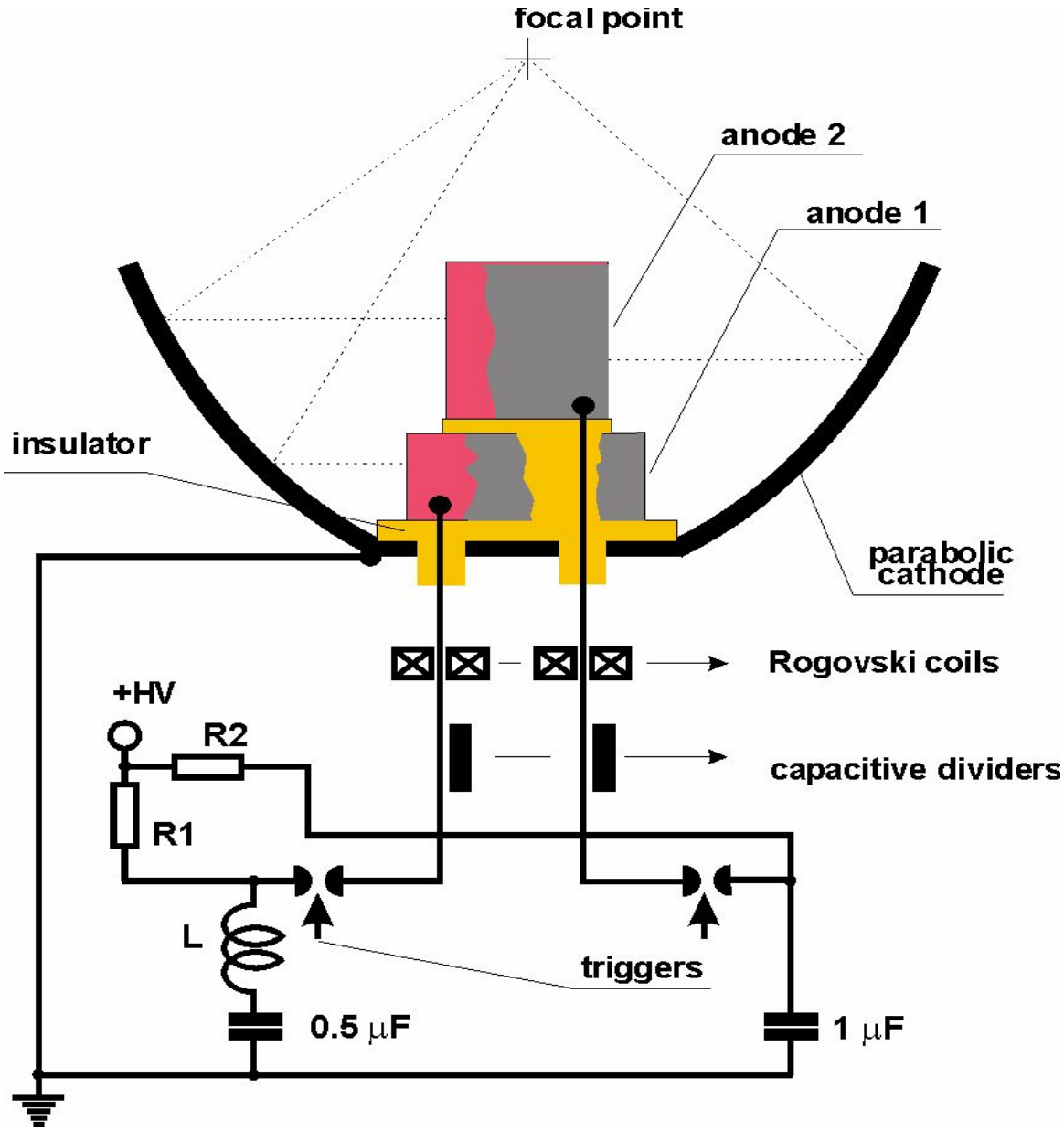
Příloha č. 1



Obr. 1. Kombinace přímého a nepřímého efektu rázové vlny na konkrement

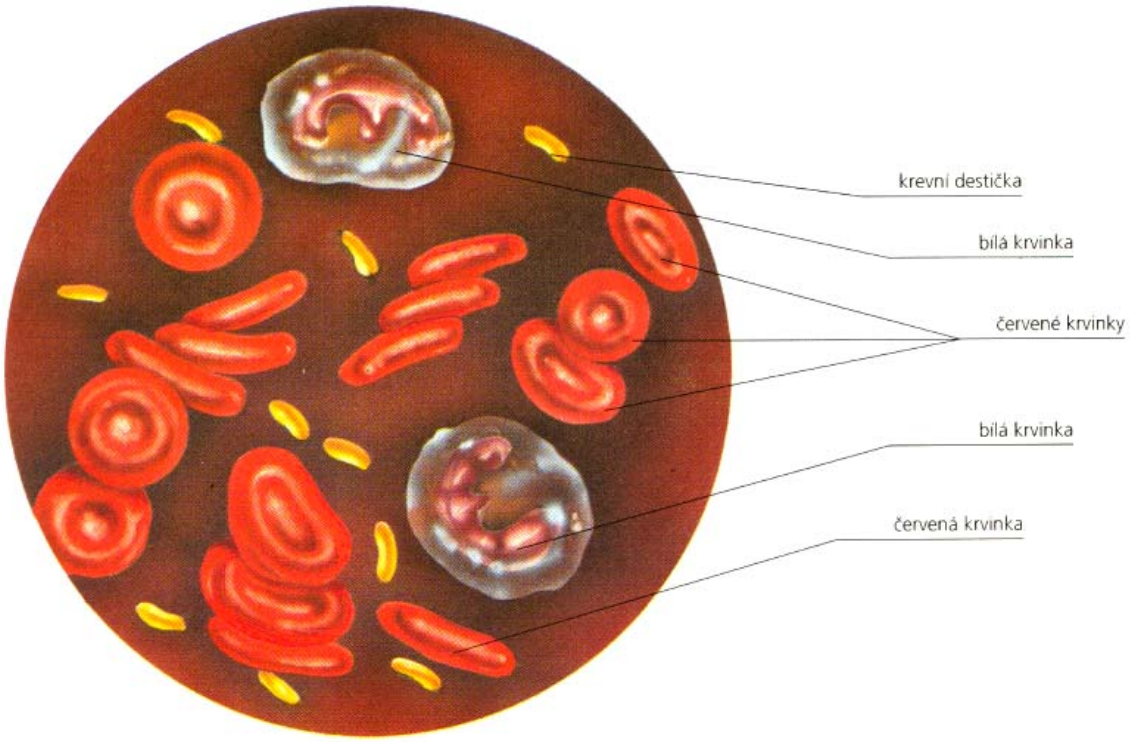
- přímý efekt (mechanický stres – tlakové a tahové síly – reflected and tensile wave)
- nepřímý efekt (kavitační kolaps mikrobublin, zejména těch, které se vytvářejí na povrchu konkrementu – collapse of cavitation bubble)

Příloha č. 2



Obr. 2. Schéma zapojení experimentálního generátoru rázových vln

Příloha č. 3



Obr. 14. Buňky krve

Zdroj: *Atlas anatomie [Svojtka & Vašut, Praha, 1996] [ISBN 80-7180-092-9]*

Příloha č. 4

Obr. 11. Fotodokumentace experimentu prováděného na IV. Interní klinice VFN