

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Působení interagujících rázových vln na tkáň

(Bakalářská práce)

Autor: Lukáš Dibdiak

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

Praha 2008

Poděkování:

Za odborné vedení, všestrannou pomoc, zájem a čas který mi věnoval, děkuji svému vedoucímu bakalářské 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 bakalářskou práci na téma *Působení interagujících rázových vln na tkáň* jsem vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Praze dne

.....

Lukáš Dibdiak

Abstrakt

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, která za poslední roky (uplynulých 50 let) prošla prudkým technickým vývojem. Biofyzikální pohnutkou je rozšíření aplikací ultrazvuku pro neinvazivní likvidaci zhoubných nádorů či jiných chorobných ložisek prostřednictvím rázových vln. Táto práce se zabývá hodnocením a porovnáváním účinků jednoduchých a interagujících rázových vln, působících na lidské erytrocyty in vitro. Studuje hemolýzu erytrocytů exponovaných rázovými vlnami. Určována byla míra hemolýzy při změně počtu rázu a změně napětí generátoru rázových vln. Opakovanými experimenty byl také prokázán vliv polohy exponovaného vzorku na počet hemolýz.

Abstract

Medical engineering is flourishing in the world. Diagnostic and therapeutic instruments are becoming highly sophisticated thanks to the uprise of new technologies. This also applies to ultrasound-based diagnostic imaging technique - ultrasonography - which experienced rapid development in the last 50 years. Biophysical incentive is to extend the applicability of ultrasonography for non-invasive treatment of malignant tumor or other lesions using shock waves. In this paper, we present an evaluation and comparison of single and tandem shock waves effecting human erythrocytes in vitro. We have studied hemolysis by shock waves and how it is being effected when the number and intensity of shock waves is changed. We have proved that the number of hemolysis of exposed sample is dependent its position.

OBSAH

OBSAH.....	5
1. ÚVOD.....	6
1.1 Historie rázové vlny.....	6
1.2 Současnost a využití.....	10
1.3 Charakteristika rázové vlny.....	13
1.4 Generátory rázových vln.....	16
1.4.1 Electrohydraulický zdroj.....	16
1.4.2 Piezoelektrický generátor.....	17
1.4.3 Mikroexplozivní zdroj.....	18
1.4.4 Elektromagnetický generátor.....	19
1.4.5 Experimentální generátor na principu mnohokanálového impulsního výboje.....	20
2. CÍLE PRÁCE.....	23
3. MATERIÁL A METODY.....	24
3.1 Příprava erytrocytů.....	24
3.1.1 Příprava suspenze ředěných erytrocytů.....	24
3.1.2 Příprava plně nesrážlivé krve.....	24
3.2 Exponování erytrocytů.....	24
3.3 Stanovení hemoglobinu uvolněného z erytrocytů.....	27
4. VÝSLEDKY.....	28
5. DISKUSE.....	38
6. ZÁVĚRY.....	40
7. LITERATURA.....	41

1. ÚVOD

1.1 Historie rázové vlny

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]. Využití rázové vlny k desintegraci a odstraňování ledvinových a žlučových konkrementů přístrojem zvaným litotryptor, je jedna z terapeutických a dnes už rutinních aplikací ultrazvuku.

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 elektrohydraulicky 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.

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 [3].

Dalším významným milníkem vývoje rázové vlny je období mezi roky 1968 až 1971, kdy se v Německu zabývali působením rázových vln na tkáň zvířat. Výzkumný program byl financován Ministerstvem obrany Německa. Kromě jiného zjistili, že rázové vlny s vysokou energií mají vliv na organismus 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 tkáň. 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 rozbítí 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 byl v Mnichově, prototypovým přístrojem nazvaným Dornierův litotryptor HM1, léčen první pacient s ledvinovými kameny. Použití tohoto modelu bylo velmi omezeno, neboť kritéria byla velmi přísná (absolutně volné močové cesty, malý rozměr a neblokující konkrement v pánvičce). Druhý model HM2 pracoval s 90% úspěšností. První komerční litotryptor (HM3, Dornier) byl instalován

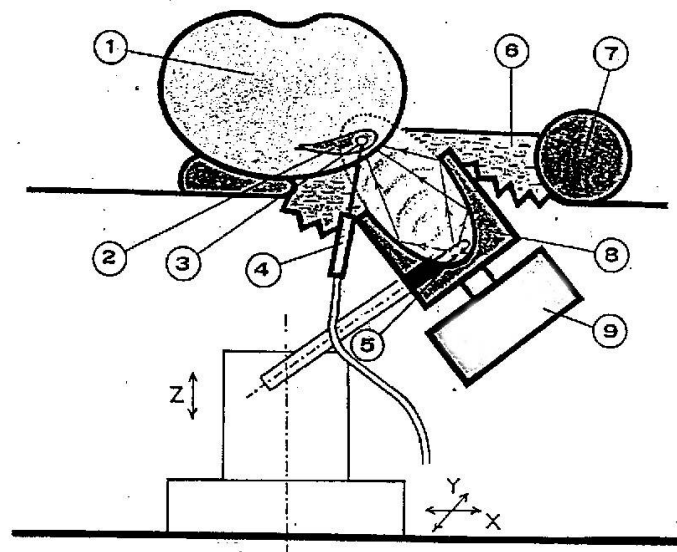
ve Stuttgartu v roce 1983. Model HM3 je považován za zlatý standard s vynikajícími parametry, a proto byl v roce 1984 schválen k použití nejen v Evropě, ale i v Japonsku a USA [4].

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 záležitostí 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.

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 navrženy originální litotryptory s jiskrovým výbojem a jsou používány v rutinní klinické praxi v mnoha českých nemocnicích. Odborníci v ÚFP měli mnohaleté zkušenosti s rázovými vlnami, které

představovaly doprovodný jev při generování silných elektronových svazků. V roce 1986 se jim podařilo úspěšně vyrobit první experimentální zdroj rázových vln k rozrušování konkrementů ve vodě [5, 6]. Zároveň byly zkoumány účinky rázové vlny na biologické tkáně u krys a prasat [7]. Současně probíhaly úspěšné pokusy na prasatech s voperovanými lidskými konkrementy. Prase bylo umístěno do vodní lázně a exponováno rázovými vlnami. Počátkem roku 1987 byl zaveden do klinické praxe první litotryptor s ultrazvukovým zaměřením (Obr. 1).



Obr. 1. Schéma prvního litotryptoru s vodní lázní a s ultrazvukovým zaměřením

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

1.2. Současnost a využití

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 doporučováni k celkové anestézii, mají vysoký krevní tlak, dýchací obtíže, diabetes, eventuálně jen jednu ledvinu. Metoda je kontraindikována u těhotných žen, u pacientů trpících hemofilii, případně při poruše koagulace, při kalcifikaci ledvinových artérií, přítomnosti aneurysmatu aorty, u komorové arytmií, 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). 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. Mechanismus účinků rázových vln není v těchto případech znám, ale publikované výsledky hovoří o úspěšnosti 60–80 %. Další oblast využití rázových vln je ve veterinární medicíně, zejména u závodních koní. [8,9]

Biologické účinky rázových vln byly sledovány na lidských erythrocytech a lymfocytech, u kterých po aplikaci rázových vln docházelo k hemolýze erythrocytů a k poklesu životnosti lymfocytů. Rozdíly v účinku byly pozorovány při aplikaci běžných jednoduchých (JRV) rázových vln, běžně používaných pro klinické provádění fragmentace a interagujících (IRV) rázových vln. U IRV se jedná o generování dvojic rázových vln jdoucích velmi krátce po sobě. Princip účinku této metody bude vysvětlen dále (1.4.5.). 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.

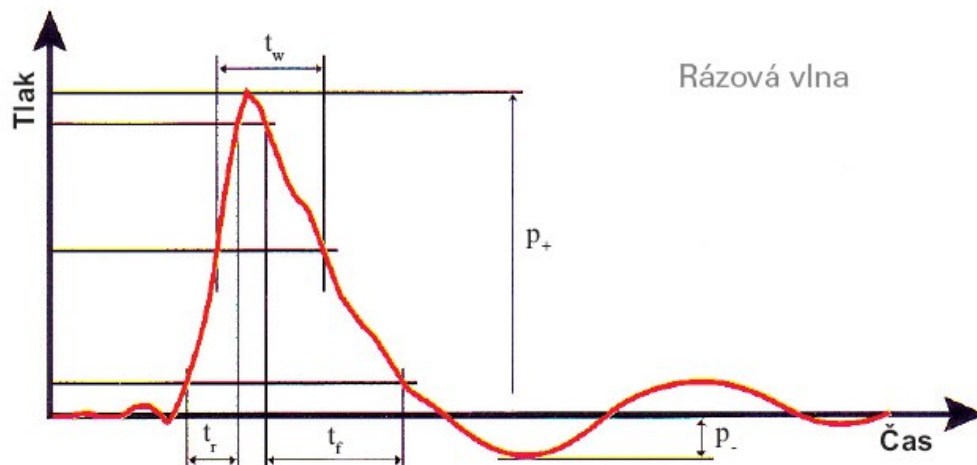
Nejvíce zkoumanou oblastí, a přesto nejméně prozkoumanou zůstává využití rázových vln k léčbě nádorových tkání. U nádorů se předpokládá, že je třeba buď výrazně zvýšit podtlak v rázové vlně, který je pak při velkých amplitudách schopen vyvolat jejich destrukci nebo využít interagujících rázových vln, kde je předpoklad, že vytvářejí více kavitací a tím zvyšují toxicitu takových dvojrázů [3, 10, 11, 12]. 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. Teprve v posledních letech jsou vyvíjeny speciální generátory, které by měly sloužit k výzkumu léčení nádorů. Vychází se z toho, že pokud má být dosaženo lokálního účinku rázové vlny v akusticky homogenním prostředí, pak je buď nutné využít efektu kavitací, nebo vytvořit dvě po sobě následující rázové vlny tak, že první vlna vytvoří akustickou nehomogenitu (podobně jako u kamenů) a druhá vlna se na ní utlumí. V obou případech se využívá účinku sekundárních, velmi krátkovlnných (pod 100 μm dlouhých) rázových vln vzniklých kolapsem kavitací, které jsou schopny interagovat se strukturami buněčných rozměrů. Vedle toho se pro terapii nádorů bouřlivě rozvíjí vysoce intenzivní fokusovaný ultrazvuk [13]. 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

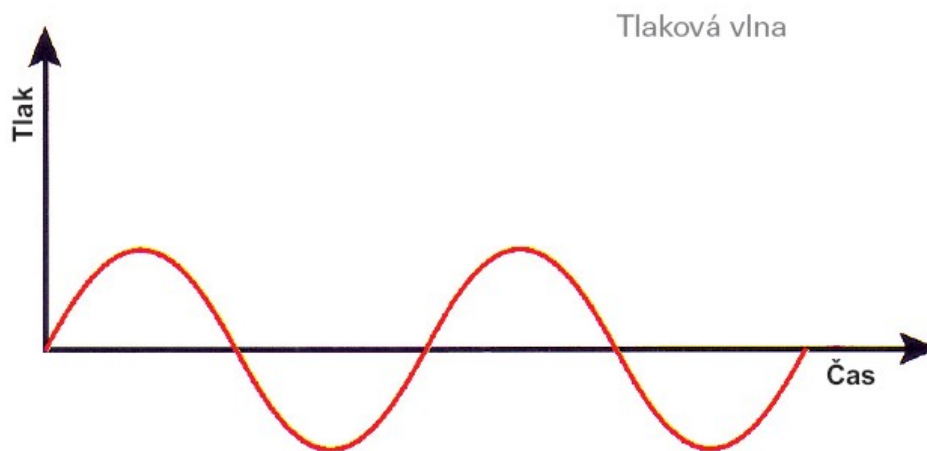
Rázové vlny (RV) jsou výraznou aplikací techniky a biofyziky v terapii a klinické praxi.[14] Léčba s pomocí RV je bezpečná a účinná, nicméně neopatrná aplikace rázových vln může způsobit vážná poškození.

Rázová vlna se liší od vlnění ultrazvukového jednak tím, že se prostředím šíří jako jediný mohutný tlakový kmit trvajícím méně než 1 μ s, 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 [15]. 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 apod.) 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 [14].



Obr. 2. Charakteristika rázové vlny, která se představuje jako jediný mohutný tlakový kmit s velmi krátkým časovým průběhem ($t < 1 \mu s$)

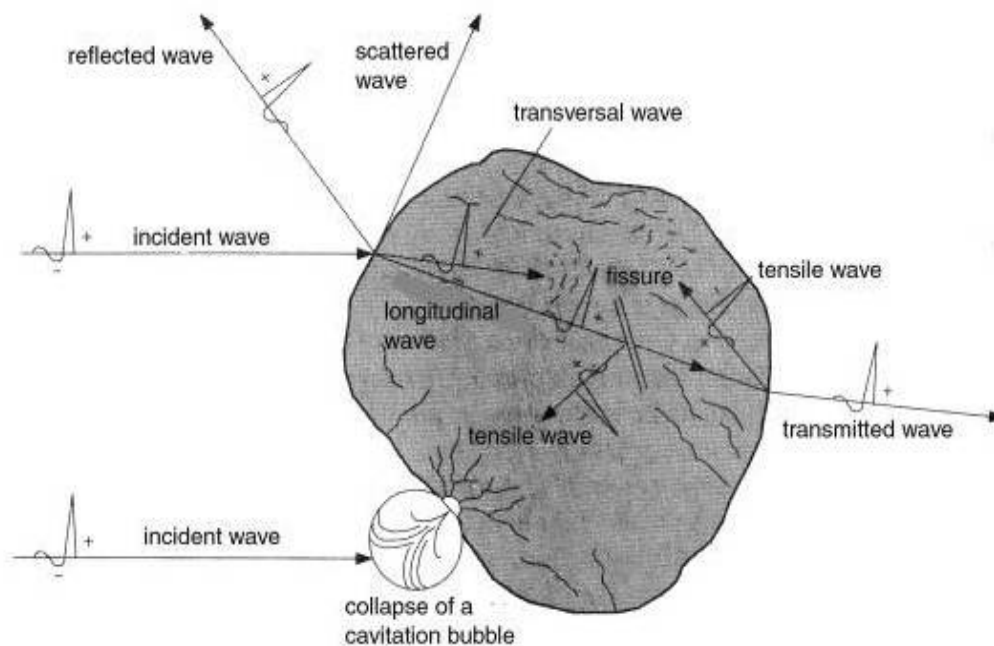


Obr.3. Ultrazvuková charakteristika s periodickým střídáním pozitivní a negativní vlny

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 konkrémentů 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. Mikrobublínky 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 nepřímě - prostřednictvím kavitace a zvýšením teploty (viz obr.). Předností metody je malá zátěž pro nemocného a možnost opakovat i u nemocných v těžkém klinickém stavu.



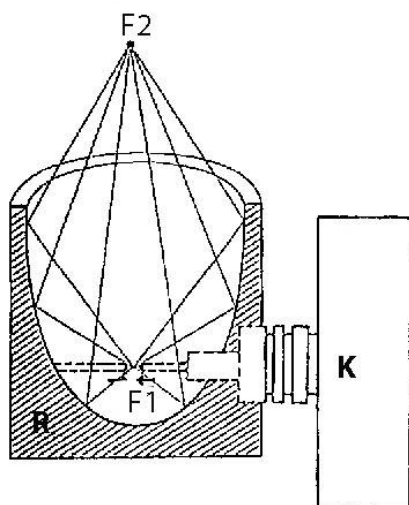
Obr. 4. Kombinace přímého a nepřímého efektu rázové vlny na konkrement

- 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)

1.4. Generátory rázových vln

1.4.1. Electrohydraulický zdroj

Jedná se o nejstarší princip generování rázové vlny, vyvinutý v roce 1980 společností Dornier (Německo) a zabudovaný do prvního klinicky použitého litotryptoru [16]. 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 [17]. 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) [18]. 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 [19]. Princip generátoru je na obrázku 5.



Obr. 5. Schéma elektrohydraulického generátoru RV

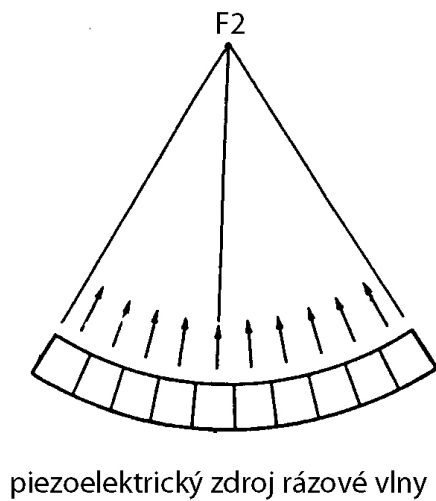
1. F1 – primární ohnisko (místo vzniku rázových vln ve vodě mezi hroty elektrod)
2. F2 – sekundární ohnisko (místo, kde leží cílený předmět např. konkrement)
3. R – kovový reflektor RV
4. K – kondenzátor (zdroj napětí)

1.4.2. 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 [20].

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 frekvencí 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. 6 Piezoelektrický generátor

Obr. 6. Schéma piezoelektrického (sférického) generátoru RV



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

1.4.3. Mikroexplozivní zdroj

Tento zdroj rázové vlny je zmíněn jen pro historický zájem. Rázová vlna byla vytvořena malou kuličkou olověné kyseliny, která byla odpálena v primárním ohnisku semi-elipsoidu (Elipticky otevřený reflektor). Následně byla odražená stěnou okolního kovového semi-elipsoidu a nasměrována k sekundárnímu ohnisku elipsoidu [21].

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

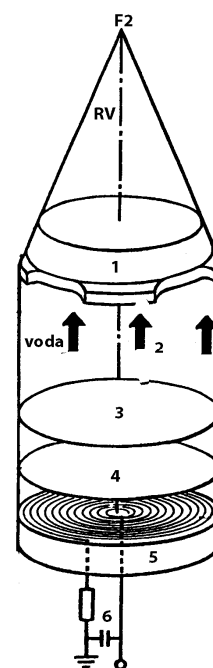
1.4.4. Elektromagnetický generátor

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 rentgenovém stole.

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. 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 [22]. 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. 7. Elektromagnetický generátor rázových vln (RV).

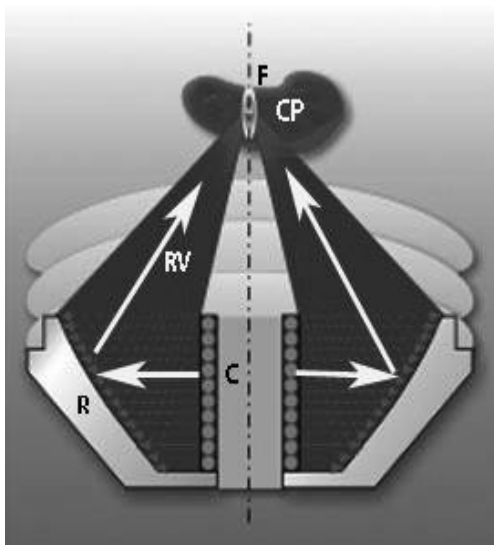
1. Akustický fokusační systém čoček
2. Šipky představují akustickou rovinnou vlnu ve vodném prostředí
3. Kovová membrána
4. Izolační folie
5. Plochá elektrická cívka s keramickým dnem
6. Zdroj vysokého napětí



1.4.5. 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 ($\text{Ø}60 \times 100 \text{ mm}$, povrch cca 200 cm^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 $100 \mu\text{m}$ 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 $2,5 \text{ mm}$. U tohoto nového generátoru bylo experimentálně prokázáno, že rozměr ohniska je $\text{Ø}2,5 \times 35 \text{ mm}$, parametry obvodu je možné ovlivňovat poměr tlakové a podtlakové fáze FRV a tím regulovat oblast vzniku kavitací [23, 18].

Obr. 8. 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. 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 μ s). Když nehomogenitu nemám, tak si ji udělám.

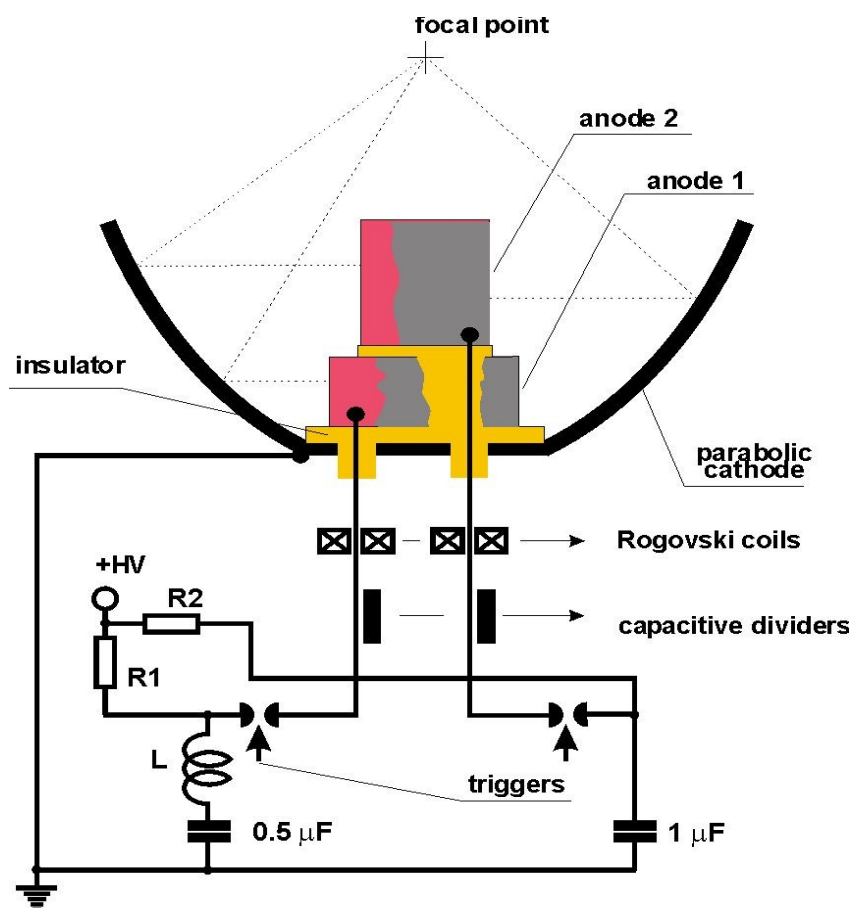


Obr. 9. experimentální generátor před výbojem (vlevo) v čase výboje (vpravo)

Exponováním lidské krve, bylo experimentálně prokázáno, že rázová vlna může účinně interagovat s objekty buněčných rozměrů [23, 18].

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 [24].



Obr. 11 Schéma zapojení experimentálního generátoru rázových vln

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je sledování biologických účinků rázové vlny v experimentech in vitro. Tyto účinky se mohou vyskytnout jak při tzv. litotrypsi extrakorporálními rázovými vlnami (LERV), tak při jiných terapeutických metodách.

Práce má taky za cíl, komparativním způsobem zhodnotit účinek jednoduchých (JRV) a interagujících (IRV) rázových vln. Měřením koncentrace uvolněného hemoglobinu studovat hemolýzu erytrocytů exponovaných rázovými vlnami. Opakovanými experimenty také určit rozdíly v míře hemolýzy, při změně počtu rázu a změně napětí generátoru rázových vln.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Příprava erytrocytů

3.1.1. Příprava suspenze ředěných erytrocytů

1. krok: Plná krev od zdravých dárců byla odebrána do heparinu
2. krok: Centrifugace - 10 min při 3000 ot./min
3. krok: Naředění erytrocytů 8x fyziologickým roztokem (vytvoření suspenze)
4. krok: Napipetování suspenze do plastických zkumavek o objemu 1,4 ml
5. krok: Exponování (tabulky a grafy 1 - 2).

3.1.2. Příprava plné nesrážlivé krve

1. krok: Krev byla odebrána do heparinu
2. krok: Napipetování do plastických zkumavek o objemu 1,4 ml
3. krok: Exponování nativně (tabulky a grafy 3 - 8)

3.2. Exponování erytrocytů

Do plastických zkumavek bylo napipetováno 1,4 ml naředěných nebo nenaředěných erytrocytů. Pro některé experimenty byl použit generátor rázových vln litotriptoru 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 12 kV do 30 kV a kapacitě kondenzátoru od 0,2 μ F do 1,0 μ F. Vodivost okolního roztoku (vody) se pohybovala v rozmezí 3 – 20 μ S/cm. Použitý fokusační elipsoid měl poloosy 138 mm a 78 mm a velikost sekundárního

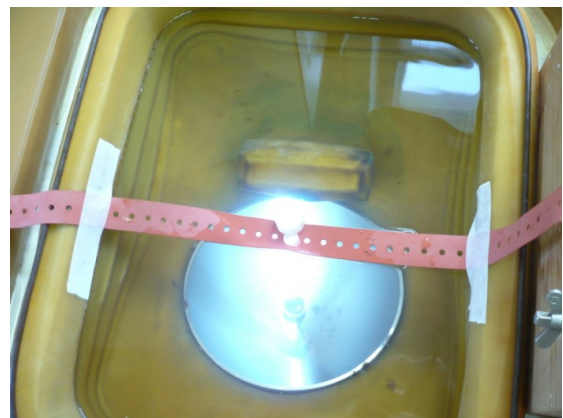
ohniska bylo zhruba $\text{Ø}10 \times 45$ mm. Při expozici byly zkumavky se vzorky umístěny pomocí speciálního držáku do ohniska rázové vlny (F2) a celkový počet rázů se pohyboval od 5 do 200 rázů.



Obr. 11.



Obr. 12.



Obr. 13.

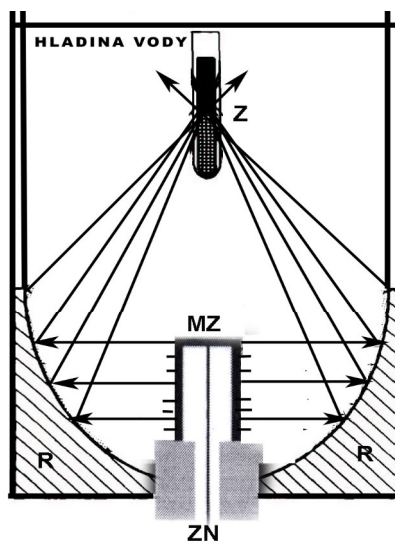
Fotodokumentace exponování erytrocytů litotryptorem Medilit na IV. Interní klinice VFN v Praze

Obr. 11. Umístění zkumavky pomocí speciálního držáku

Obr. 12. Litotryptor Medilit před výbojem

Obr. 13. Litotryptor Medilit v čase výboje

Pro experimenty s využitím interference dvou rychle po sobě následujících vln byl použit mnohakanálový výboj na ploše cylindrického válce v ÚFP, který umožňoval generovat dvě rázové vlny těsně po sobě se zpožděním cca 5 μ s. Pozitivní tlaky dosahovaly až 100 MPa při 30 kV. Schéma experimentálního uspořádání je na obrázku 14.



Obr. 14. 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.

3.3. Stanovení hemoglobinu uvolněného z erytrocytů

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

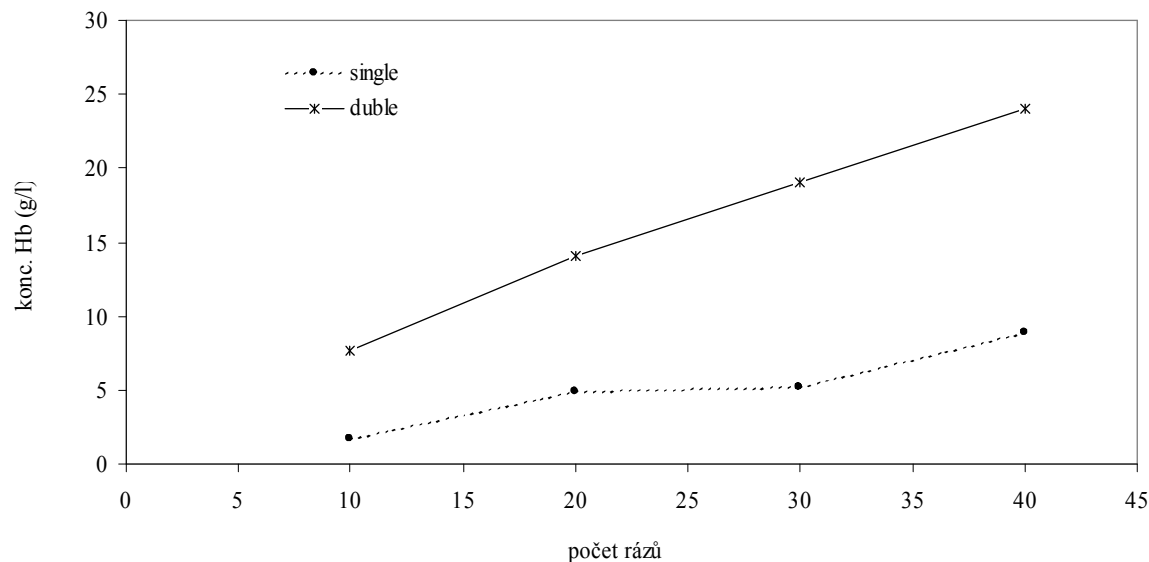
4. VÝSLEDKY

Výsledky uvedené v tabulkách a grafech 1 – 7, 9 - 12 byly provedeny v ÚFP AV ČR na experimentálním mnohakanálovém zdroji rázových vln, zatím co výsledky shrnuté v tabulkách a grafech 7 - 8 byly uskutečněny na klinickém litotriptoru Medilit na IV. interní klinice VFN 1. LF UK.

Sledování hemolýzy erytrocytů pro jednoduché a interagující rázové vlny

Tabulka 1: Závislosti hemolýzy (koncentrace hemoglobinu v g/l) ředěných erytrocytů 8x fyziologickým roztokem na počtu rázů a typu rázové vlny (jednoduchá (JRV) – single a interagující (IRV) – double)

Počet rázů	Typ rázové vlny	
	single	double
10	1,69	7,64
20	4,90	14,02
30	5,13	19,00
40	8,92	24,05



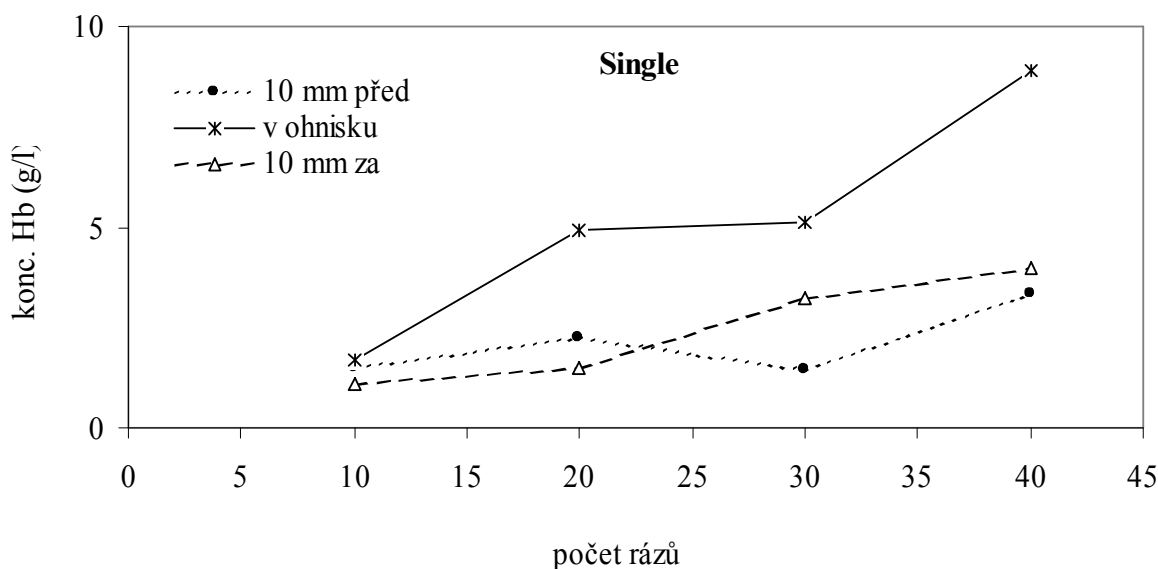
Graf 1: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů a typu rázové vlny (jednoduchá (JRV) – single a interagující (IRV) – double) při 25 kV.

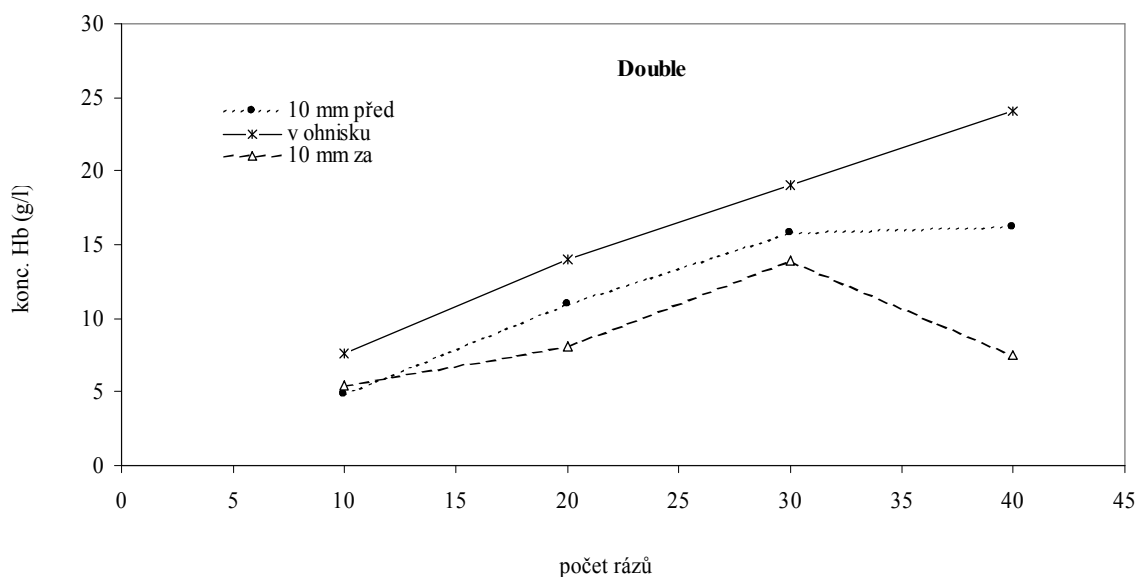
Je patrný rozdíl v biologickém působení obou typů rázových vln na erythrocyty a závislost hemolýzy na počtu rázů. Působení dvou po sobě jdoucích rázových vln (IRV) v krátkém čase (5 μ s) je vyšší než běžná jednoduchá rázová vlna (JRV), která je používána v klinické praxi.

Biologické ověření prostorového působení rázových vln

Tabulka 2: Závislost hemolýzy (koncentrace hemoglobinu v g/l) 8x ředěných erythrocytů na počtu rázů, typu rázové vlny (JRV – single a IRV – double) a vzdálenosti od ohniska ve směru šíření rázové vlny

Počet rázů	<u>Typ rázové vlny</u>					
	single			double		
	10 mm před	v ohnisku	10 mm za	10 mm před	v ohnisku	10 mm za
10	1,48	1,69	1,11	4,82	7,64	5,41
20	2,25	4,90	1,49	10,94	14,02	8,06
30	1,42	5,13	3,26	15,82	19,00	13,94
40	3,3	8,92	3,96	16,20	24,05	7,47





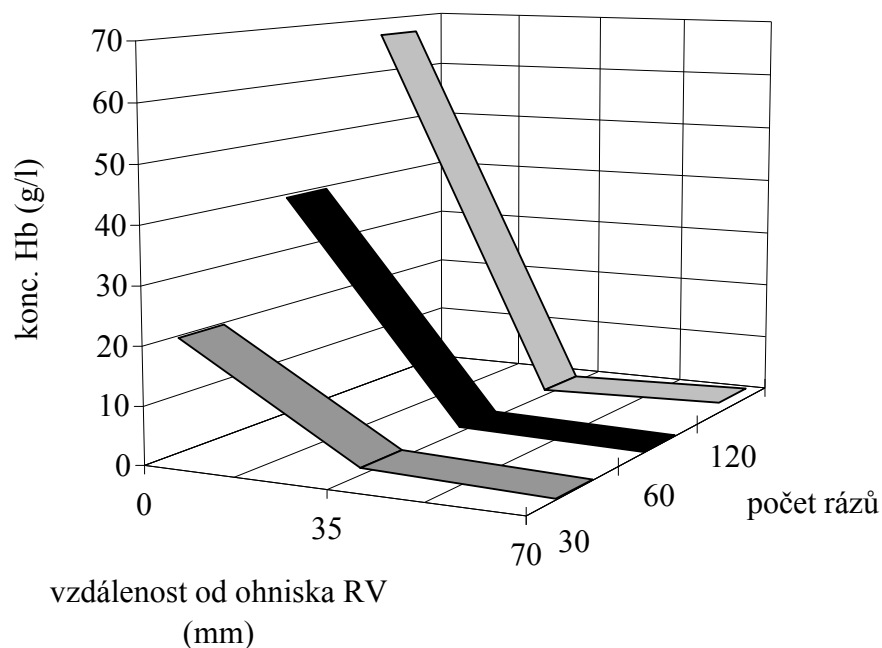
Graf 2: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů, typu rázové vlny (jednoduchá (JRV) – single a interagující (IRV) – double) a vzdálenosti od ohniska při 25 kV

Tabulka 2 a grafy 2 ukazují na možné poškození erytrocytů v ohnisku rázové vlny a pokles účinků před a za ohniskem (10 mm). Cílem tohoto pokusu bylo biologické ověření účinků v okolí ohniska. Výsledky korelují s fyzikálními měřeními rozložení tlaků. Již při malé změně polohy exponovaného vzorku klesá hemolýza, a to jak u jednoduchých, tak u interagujících rázových vln.

Sledování hemolýzy ve směru příčném k směru rázové vlny

Tabulka 3: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů a vzdálenosti od ohniska u interagujících rázových vln (IRV) ve směru příčném

Počet rázů (IRV)	<u>Vzdálenost od ohniska</u>		
	0 mm	35 mm	70 mm
30	19,68	1,20	0,19
60	39,47	0,88	0,22
120	66,94	0,99	1,86



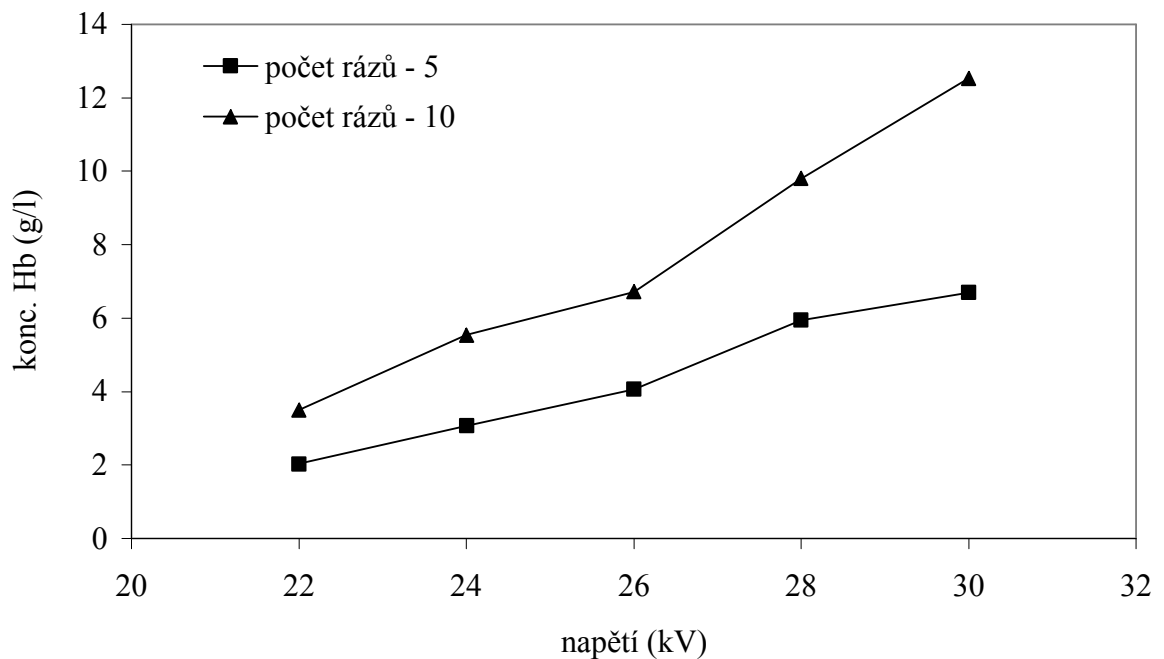
Graf 3: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů a vzdálenosti od ohniska při 20 kV u interagujících rázových vln (IRV)

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

Sledování změny hemolýzy v závislosti na napětí u interagujících rázových vln

Tabulka 4: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů (IRV) při různém napětí

Počet rázů	<u>Napětí</u>				
	22 kV	24 kV	26 kV	28 kV	30 kV
5	2,04	3,08	4,07	5,95	6,70
10	3,50	5,54	6,71	9,80	12,53



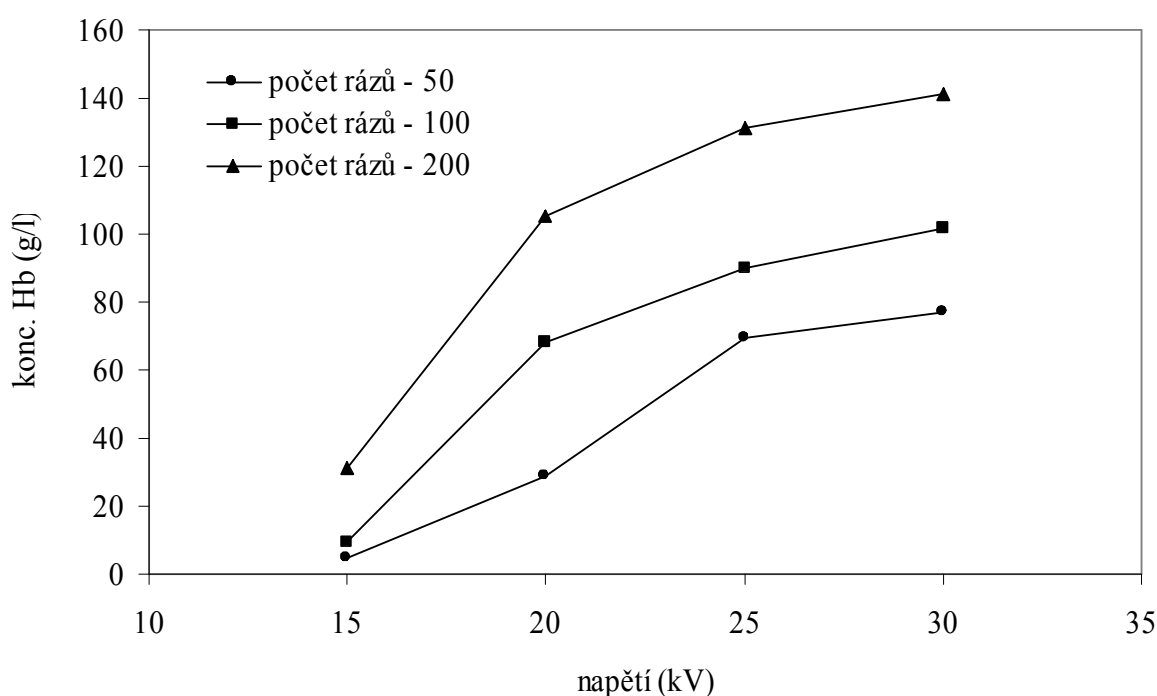
Graf 4: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů (IRV) při různém napětí

Interagující rázová vlna (IRV) má větší biologický účinek než jednoduchá (JRV) a její hemolýza je výraznější při vyšším napětí (30 kV) a počtu rázů. Graf 4 s tabulkou ukazuje na vyšší koncentraci uvolněného hemoglobinu, pokud je suspenze erytrocytů vystavena interagujícím rázovým vlnám, a to i při jejich poměrně malém počtu.

Sledování změny hemolýzy v závislosti na napětí u jednoduchých rázových vln

Tabulka 5: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů (JRV) při různém napětí

Počet rázů	Napětí			
	15 kV	20 kV	25 kV	30 kV
50	4,71	28,75	69,31	77,30
100	9,68	68,47	90,00	102,00
200	30,90	105,30	131,31	141,18



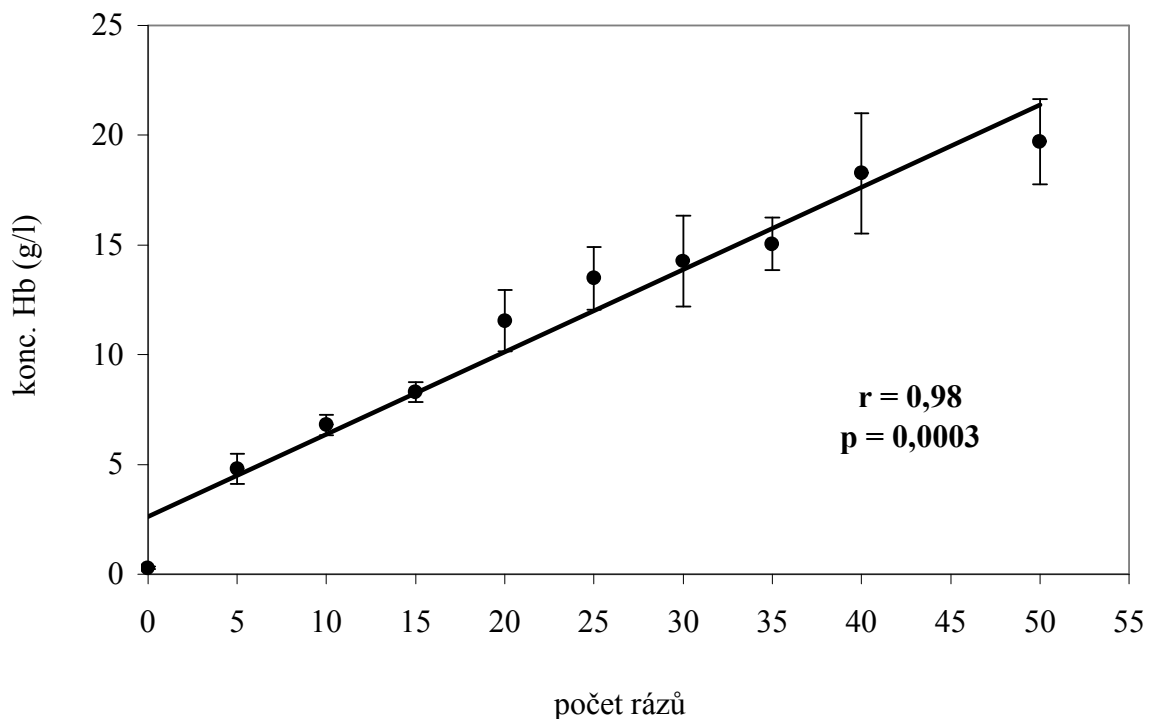
Graf 5: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v g/l) na počtu rázů (JRV) při různém napětí

Také u jednoduchých rázových vln (JRV) používaných v klinické praxi při dezintegraci konkrementů dochází při zvyšujícím se napětí k zvýraznění účinku a poškození exponovaných erytrocytů, jak ukazují tabulka a graf 5. Čím větší je napětí (15 – 30 kV) a počet rázů (50 – 200 rázů), tím větší je biologický účinek rázové vlny.

Sledování hemolýzy erytrocytů pro jednoduché rázové vlny při napětí 20 kV

Tabulka 6: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů (JRV) v rozmezí 0 – 50 rázů při 20 kV

Počet rázů	Koncentrace hemoglobinu (g/l)						Průměr	SD
	1. měření	2. měření	3. měření	4. měření	5. měření	6. měření		
0	0,32	0,25	0,36	0,20	0,26	0,29	0,28	0,05
5	3,56	4,90	5,90	4,53	4,92	4,99	4,80	0,69
10	7,60	6,99	6,044	6,87	6,69	6,63	6,80	0,46
15	9,02	7,56	8,59	8,23	8,09	8,25	8,29	0,45
20	13,22	10,90	9,15	13,06	11,10	11,84	11,55	1,39
25	15,88	12,48	11,19	14,01	13,52	13,83	13,48	1,44
30	12,06	18,13	13,46	14,95	14,86	12,11	14,26	2,08
35	14,00	16,88	16,40	15,02	14,11	13,86	15,04	1,20
40	17,66	20,56	12,48	20,10	19,67	19,10	18,26	2,74
50	18,00	19,95	22,37	18,80	21,94	17,13	19,70	1,94



Graf 6: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů při 20 kV

Korelační koeficient závislosti mezi koncentrací hemoglobinu a počtem rázů (JRV) je pozitivní a velmi významný ($r = 0,98$, $p = 0,0003$). Se zvyšujícím se počtem rázů dochází k většímu poškození erytrocytů, a tím i k větší koncentraci uvolněného hemoglobinu i při konstantním napětí (20 kV).

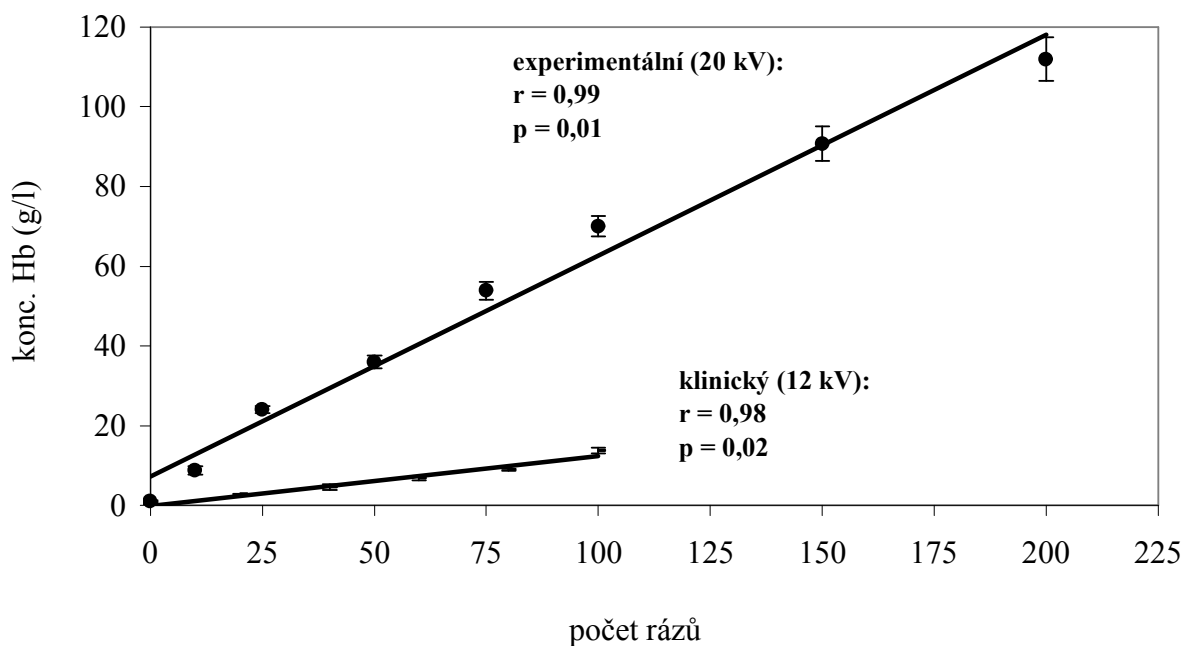
Srovnání účinků experimentálního a klinického litotryptoru na hemolýzu erytrocytů

Tabulka 7a: experimentální litotryptor - mnohakanálový zdroj IRV v rozmezí 0 – 200 rázů při 20 kV

Počet rázů	Koncentrace hemoglobinu (g/l)			Průměr	SD
	1. měření	2. měření	3. měření		
0	1,37	0,89	1,19	1,15	0,20
10	9,16	7,29	9,81	8,75	1,07
25	25,25	23,60	23,30	24,05	0,85
50	34,91	38,28	34,82	36,00	1,61
75	51,31	56,89	53,27	53,82	2,31
100	67,36	69,21	73,43	70,00	2,54
150	94,00	93,51	84,61	90,71	4,32
200	116,00	115,44	104,20	111,88	5,43

Tabulka 7b: klinický litotryptor Medilit – zdroj JRV v rozmezí 0 – 100 rázů při 12 kV

Počet rázů	Koncentrace hemoglobinu (g/l)		Průměr	SD
	1. měření	2. měření		
0	0,29	0,33	0,31	0,02
20	2,66	2,98	2,82	0,16
40	3,89	5,28	4,59	0,70
60	6,26	7,35	6,81	0,55
80	8,65	9,25	8,95	0,30
100	14,42	12,99	13,71	0,72



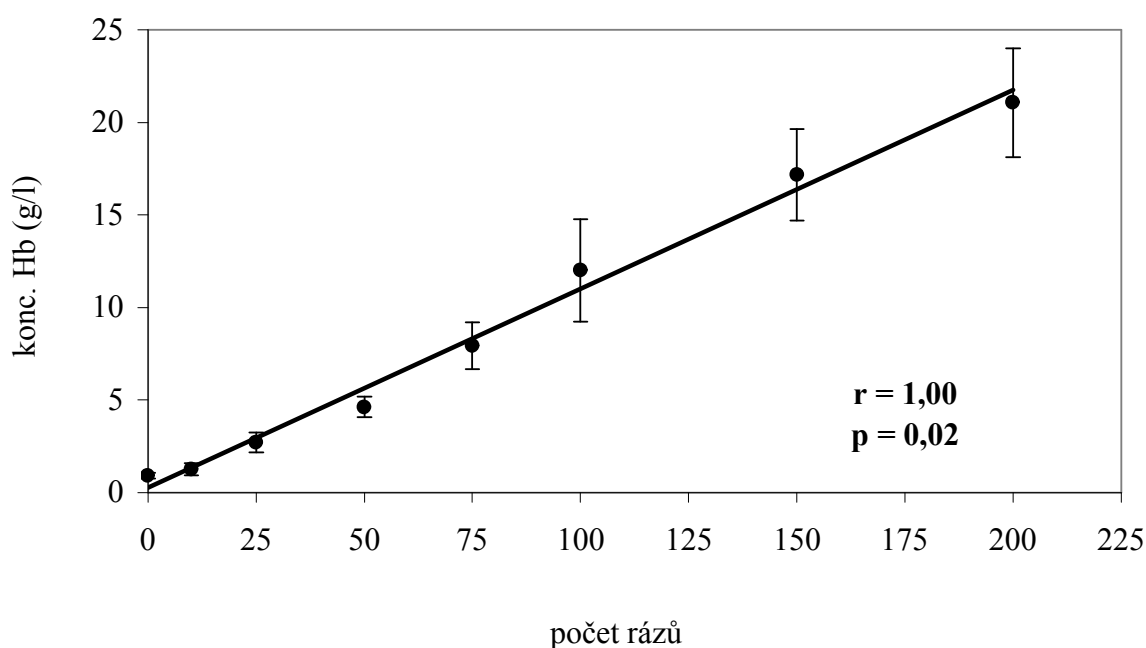
Graf 7: Srovnání účinků experimentálního a klinického litotryptoru

Z tabulek a grafu 7 je patrná významná korelace mezi koncentrací hemoglobinu a počtem rázů, a to jak u experimentálního ($r = 0,99$, $p = 0,01$), tak u klinického litotryptoru ($r = 0,98$, $p = 0,02$). 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 (20 kV).

Sledování změn hemolýzy erytrocytů při použití klinického litotryptoru Medilit

Tabulka 8: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů (JRV) v rozmezí 0 – 200 rázů při 12 kV u klinického litotryptoru Medilit

Počet rázů	Koncentrace hemoglobinu (g/l)			Průměr	SD
	1. měření	2. měření	3. měření		
0	0,77	1,11	0,84	0,91	0,15
10	0,95	1,69	1,12	1,25	0,32
25	3,20	2,98	1,97	2,72	0,54
50	3,97	5,33	4,55	4,62	0,55
75	9,12	8,51	6,19	7,94	1,26
100	14,80	12,99	8,21	12,00	2,78
150	18,67	19,17	13,68	17,18	2,48
200	24,54	17,36	21,35	21,08	2,94



Graf 8: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů při 12 kV

U klinického litotryptoru s napětím 12 kV platí pozitivní lineární vztah mezi koncentrací hemoglobinu a počtem jednoduchých rázových vln (0 – 200 JRV), jak je patrné z tabulky a grafu 8. Korelace je významná ($r = 1,00$, $p = 0,02$).

5. DISKUSE

Jak již bylo zmíněno v úvodu práce, technika v medicíně zažívá na celém světě obrovský rozmach, který neobešel ani terapeutické možnosti použití ultrazvuku a rázových vln. Jednou z možností použití, dnes už rutinní záležitostí, je rozbíjení ledvinových či žlučových konkrementů. Jak je známo - s jídlem roste chuť, a tak po úspěchu extrakorporální litotrypse se začalo uvažovat o možnostech aplikací rázových vln (změnou fyzikálních charakteristik) i v jiných odvětvích medicíny.

V poslední době je rázová vlna užívána v ortopedii na odstraňování kostního cementu či na léčbu úponových bolestí jako je tenisový loket. Avšak velkou biofyzikální pohnutkou je právě určitá perspektiva o rozšíření aplikací rázových vln pro neinvazivní likvidaci zhoubných nádorů či jiných chorobných ložisek. Pokud šlo o kameny, bylo cílem vytvořit rázovou vlnu s malou podtlakovou fází (málo kavitací), abychom šetřili stěnu ledviny. U nádorů je problém opačný. Jak zařídit, aby rázové vlny působily v předem známém místě v původně akusticky homogenním prostředí na buňky, které jsou mnohonásobně menší než kameny (nádorové tkáně se akusticky od zdravých neliší). Mimo toho, buňky jsou malé a k účinné interakci dochází tehdy, když je vlnová délka srovnatelná s rozměry objektu. Proto se vedou úvahy, že v narušování buněk hrají 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“. V čem je přednost "tandemových" vln? 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 smysluplnému využití těchto efektu je ještě velmi

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

V této práci jsem na základě experimentu *in vitro* studoval biologické účinky rázové vlny na suspenzi erytrocytů. Komparativně byl sledován účinek jednoduchých (JRV) a interagujících rázových vln (IRV). Mezi oběma typy rázových vln je patrný rozdíl, přičemž IRV mají větší účinek na erytrocyty, což je deklarováno i v samotných výsledcích. Prokázáno bylo také, že účinky rázových vln na suspenze erytrocytů mimo ohnisko, tj. před respektive za ohniskem, jsou klesající až zanedbatelné v závislosti na napětí, počty rázů a zvyšující vzdálenost. Byly potvrzeny již publikované výsledky o tom, že existuje ostrá závislost mezi působením rázové vlny a polohou exponovaného vzorku. Opět byl prokázán vyšší efekt IRV 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 IRV dochází při zvyšujícím se napětí k zvýraznění účinku, poškození exponovaných erytrocytů a tím i k zvýšené koncentraci uvolněného hemoglobinu (tabulky a grafy 4 – 5). Dále se sledovala lineární závislost mezi koncentrací hemoglobinu a počtem rázů. Jak u jednoduchých (tabulky a grafy 6, 7b, 8), tak u interagujících rázových vln (tabulka a graf 7a) je korelační koeficient závislosti pozitivní a velmi významný.

6. ZÁVĚRY

- Se zvyšujícím se počtem rázů dochází k většímu poškození erytrocytů, a tím i k větší koncentraci uvolněného hemoglobinu.
- 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 (IRV) vyšší než při běžné jednoduché rázové vlně (JRV).

7. LITERATURA

1. Mornstein, V., Škorpíková, J., Forýtková, L.: Biologické účinky ultrazvuku - současný stav znalostí. Sborník konference "Pacient a ultrazvuk" - Olomouc. (2003).
2. Thiel, M.: Application of shock waves in medicine. Clin Orthop. (2001): 18-21.
3. Beneš, J.: Biologické účinky rázové vlny a biliární litotrypse. Kandidátská dizertační práce. (1999).
4. Dvořáček, J.: Urologie I. ISV nakladatelství Praha. (1998).
5. Beneš, J., Kordač, V., Šunka, P., Jirsa, M., Mirejovský, P., Štuka, C.: Initial experimental findings on the disruption of gallstones using focused shock waves. Cas Lek Cesk. (1986) 125: 433-5.
6. Beneš, J., Šindelka, G., Kordač, V., Souček, J., Jirsa, M., Šunka, P.: A simple model for verifying the effects of a focused shock wave from our generator on erythrocytes and lymphocytes. Sb Lek. (1989) 91: 123-8.
7. Beneš, J., Šunka, P., Kordač, V., Jirsa, M., Štuka, C., Mirejovský, P.: Preclinical verification of possibilities of extracorporeal lithotripsy of gallstones in experimental animals. Sb Lek. (1987) 89: 129-33
8. Kordač, V., Beneš, J., Šunka, P., Štuka, C., Chmel, J., Kaláb, M., Mareček, Z.: Lithotripsy of gallstones using shock waves. First clinical experience in Czechoslovakia. Cas Lek Cesk. (1988) 127: 1397-9.
9. May, T.C., Krause, W.R., Preslar, A.J., Smith, M.J., Beaudoin, A.J., Cardea, J.A.: Use of high-energy shock waves for bone cement removal. J Arthroplasty. (1990) 5: 19-27.
10. Šunka, P., Fuciman, M., Babická, V., Člupek, M., Beneš, J., Poučková, P., Souček, J.: Generation of focused shock waves by multicannel el. discharged in water. Czech J Physics. (2002) 52: D397-D405.
11. Beneš, J., Šunka, P., Hani, A.B.: Effect on hemolysis by shock waves created by a new method of multichannel discharge. Sb Lek. (2001) 102: 29-35.
12. Coleman, A.J., Saunders, J.E., Crum, L.A., Dyson, M.: Acoustic cavitation generated by an extracorporeal shockwave lithotripter. Ultrasound Med Biol. (1987) 13: 69-76.
13. Pavel Šunka, Impulsní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně aneb kam až sahá čtvrté skupenství hmoty

14. Rázové vlny v lékařství, využití a nové možnosti Jiří Beneš, 1Pavel Šunka, 2Jan Kašpar, Pavla Poučková IV. interní klinika a Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK, Praha, 1Ústav fyziky plazmatu AV ČR, 2Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT, Praha
15. Ultrazvuk jako biofyzikální činitel; Doc. RNDr. Vojtěch Mornstein, CSc.
16. A comparative review of extracorporeal shock wave generation, D.M. WILBERT
Department of Urology, University of Tuebingen Medical School, Tuebingen, Germany
17. CO NOVÉHO V LÉČBĚ UROLITIÁZY, MUDr. Pavel Rajmon
Urologická klinika FN Olomouc Interní medicína – mezioborové přehledy 2003 / 1 str.4, 5, www.solen.cz
18. Impulsní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně aneb kam až sahá čtvrté skupenství hmoty, Pavel Šunka, Ústav fyziky plazmatu AV ČR, E-mail: sunka@ipp.cas.cz
19. [www: http://www.medipo.cz](http://www.medipo.cz)
20. Marberger M, Tuerk C, Steinkogler I. Painless piezoelectric extracorporeal lithotripsy., J Urol 1988; 139: 695–9
21. Kuwahara M, Kambe K, Kurosu S. Clinical application of extracorporeal shock wave lithotripsy using microexplosions. J Urol 1987; 137: 837–41
22. Wilbert DM, Reichenberger H, Noske E, Hohenfellner R. New generation shock wave lithotripsy. J Urol 1987; 138: 563–5
23. Rázové vlny v lékařství, využití a nové možnosti, Jiří Beneš, 1Pavel Šunka, 2Jan Kašpar, Pavla Poučková
24. Prezentace Doc. Ing. Pavel Šunka, CSc.