

# Univerzita Karlova v Praze

## 1. lékařská fakulta



Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotnická technika

**Jan Zeman**

**Rázové vlny generované pomocí mnohokanálového výboje a jejich účinky na tkáň**

(Bakalářská práce)

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

**Praha 2009**

## **Poděkování:**

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

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma *Rázové vlny generované pomocí mnohokanálového výboje a jejich účinky na tkáň* jsem vypracoval samostatně za použití uvedené literatury.

V Praze dne

**Jan Zeman**

.....

## **Abstrakt**

Výborné výsledky při využití rázové vlny k léčbě ledvinových či jiných kamenů vedly k úvahám o jejich využití i v jiných oblastech. Hlavní směr vede k možnostem léčby nádorových onemocnění. Nádorová tkáň má ale nárůzdíl od konkrementu stejnou akustickou impedanci jako měkké tkáně. Je proto zapotřebí využít efektu kavitací a interagujících rázových vln k vyvolání poškození. Prozatím byly v experimentech využívány běžné generátory určené k léčbě litiázy. Na Ústavu fyziky plazmatu vyvinuli nový zdroj generující rázové vlny prostřednictvím mnohoanádového výboje, který vzniká na kompozitní anodě. Tato práce se zabývá účinky tohoto zdroje na jaterní tkáň krys in vivo. Poškození je zobrazeno magnetickou rezonancí a pozorováno při pitvě. Dále sleduje účinky na nádorové buňky aplikované intradermálně krysám. Změny v růstu jsou vyhodnoceny pomocí růstové křivky.

### **Klíčová slova:**

Rázové vlny, kavitace, poškození tkáně, lithotripse, mnohokanálový výboj

### **Identifikační záznam:**

ZEMAN, Jan. *Rázové vlny generované pomocí mnohokanálového výboje a jejich účinky na tkáň [Shock waves generated by multichannel discharge and their effects on tissue]*. Praha, 2009. 42 s. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK. Vedoucí bakalářské práce Jiří Beneš.

## **Abstract**

Excellent results of using the shock wave for treatment of renal or other stones led to considerations about their use also in other regions. The main direction leads to possibilities of treatment of tumor disease. However, tumor tissue has in contrast to concretions the same acoustic impedance as soft tissues. Therefore it is necessary to use the effect of cavitation and interaction of shock waves to cause damage. For the present, in experiments there were exploited common generators which are intended for treatment of lithiasis. On the Institute of plasma physics there was developed a new source generating shock waves by multichannel discharge formed on composite anode. This work put mind to effects of sources on rats' hepatic tissue *in vivo*. The damage is displayed by magnetic resonance and observed during autopsy. Further the effects on tumor cells applied *in vivo* are traced. Changes in growth are traced by the help of growth waveform.

### **Key words:**

Shock waves, cavitation, tissue injury, lithotripsy, multichannel discharge

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
1.1 Charakteristika rázových vln.....	7
1.2 Historie využití rázových vln .....	8
1.3 Vývoj v České republice .....	9
1.4 Konstrukce přístrojů.....	12
1.4.1 Generátor rázových vln .....	12
1.4.2 Systém pro fokusaci rázových vln .....	15
1.4.3 Systém propojení s pacientem .....	15
1.4.4 Zaměřovací systém .....	16
1.5 Mechanismus drcení litiázy.....	16
1.6 Nový zdroj rázových vln.....	17
1.6.1 Vývoj a konstrukce .....	17
1.6.2 Výhody .....	20
1.6.3 Výsledky experimentů .....	21
1.7 Kavitace.....	23
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>25</b>
3.1 První pokus, rázování krysích jater.....	25
3.1.1 Pokusná zvířata.....	25
3.1.2 Generátor rázových vln .....	25
3.1.3 Umístění krysy do ohniska .....	27
3.1.4 Aplikace rázových vln.....	27
3.1.5 Snímkování na NMR .....	28
3.1.6 Pitva .....	29
3.2 Druhý pokus, rázování nádoru.....	29
3.2.1 Pokusná zvířata.....	29
3.2.2 Rázování krysy.....	29
3.2.3 Měření růstu nádoru .....	29
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>30</b>
4.1 První pokus, rázování krysích jater.....	30
4.2 Druhý pokus, rázování nádoru.....	34
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>36</b>
<b>6. ZÁVĚRY</b> .....	<b>37</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>38</b>
<b>8. PŘÍLOHY</b> .....	<b>41</b>
8.1 Příloha 1 .....	41

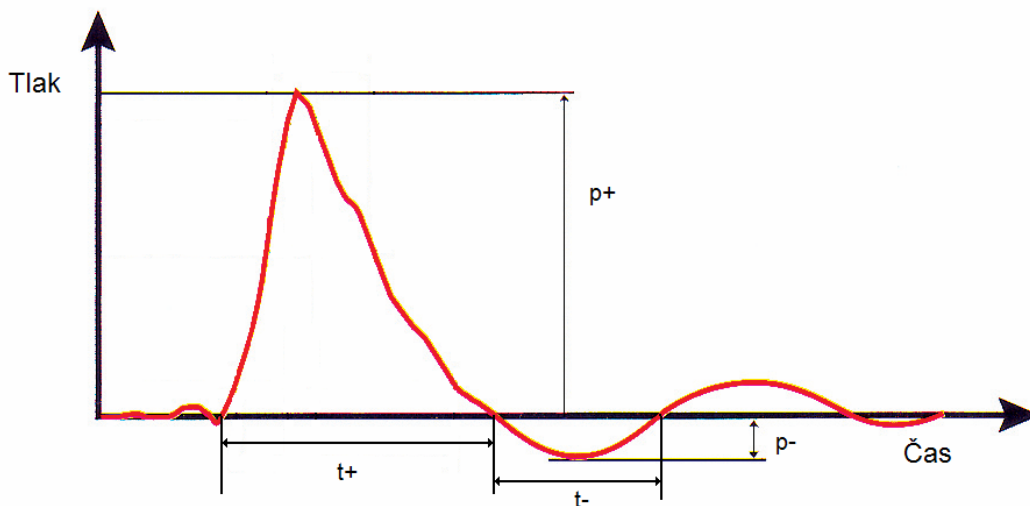
# 1. ÚVOD

## 1.1 Charakteristika rázových vln

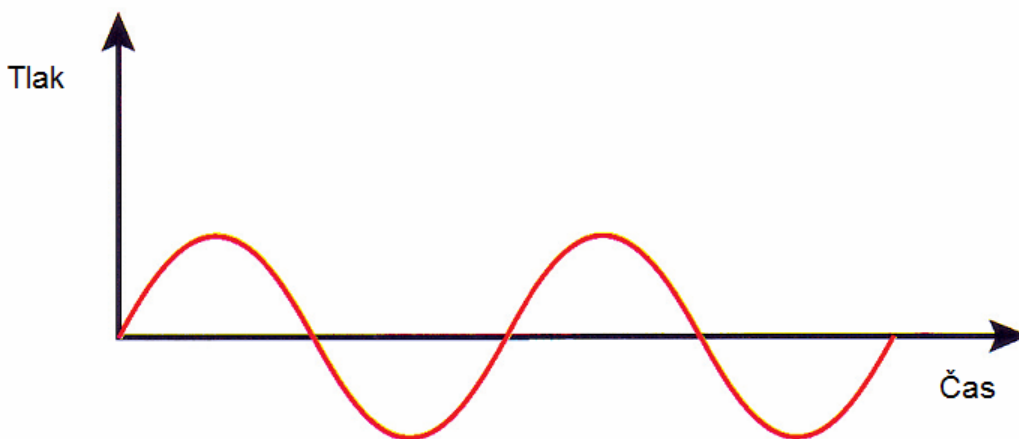
Medicína se neustále vyvíjí jako dynamický obor. Tento vývoj je také možný díky využití poznatků z jiných oblastí vědy. Výsledkem je potom vznik nových, stále přesnějších a dokonalejších, diagnostických a terapeutických přístrojů. Jedním takovým terapeutickým přístrojem je i litotryptor, tedy přístroj určený k dezintegraci především ledvinových a žlučových konkrementů extrakorporálně generovanou rázovou vlnou. Úspěch tohoto přístroje má za následek výzkum možností využití rázových vln i v jiných oblastech medicíny, jako je například ovlivnění růstu nádorů.

S rázovou vlnou se každý z nás jistě setkal a to například při úderu blesku, či průletu nadzvukového letadla. 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. Od vlnění ultrazvukového se však zásadně liší jednak tím, že se prostředím šíří jako jeden mohutný tlakový kmit, jednak svým odlišným tvarem, jak je patrné z obrázku 1 a 2 [1,2]. Ultrazvuková vlna má pozitivní a negativní část tlaku, pokud hodnota negativního tlaku ( $p_-$ ) překročí tzv. kavitační práh je odpovědná za nežádoucí účinky. Takových hodnot však běžný diagnostický ultrazvuk nedosahuje, je tedy bezpečný (zatím se žádné vedlejší účinky nepodařilo prokázat).

Rázová vlna má také pozitivní a negativní část tlaku, její tvar v závislosti na čase je ale odlišný. Na počátku je prudký vzestup, který trvá přibližně 100 ns a dosahuje velmi vysokých hodnot kladného okamžitého tlaku asi 100 MPa. Trvání celé kladné půlvlny se pak pohybuje v řádu jednotek mikrosekund. Po této kladné půlvlně následuje půlvlna záporná, která je relativně mělká, asi 10 MPa (všechny hodnoty jsou závislé na druhu generátoru). Přesto dostatečná k tomu, aby mohla vyvolat vznik kavitací, tedy bublinek, které ve vodě a tkáni vznikají vlivem podtlaku [2,3,4]. Takovouto rázovou vlnu lze generovat na různých typech zařízení, o jejich vlastnostech se zmíním níže.



**Obr. 1.** Závislost tlaku na čase pro rázovou vlnu.



**Obr. 2.** Závislost tlaku na čase pro ultrazvukové vlnění.

## **1.2 Historie využití rázových vln**

Poprvé byl pozorován vliv rázové vlny na tkáně za druhé světové války. Plíce trosečníků byly vlivem exploze vodní bomby poškozeny, ačkoliv neexistoval žádný vnější příznak násilí [5]. Později byla náhodou objevena možnost přenosu rázové vlny do lidského organismu. Stalo se to v 70. letech, když německá společnost Dornier, vyrábějící nadzvukové letouny, prováděla ve svých mnichovských laboratořích testy těchto letadel. Náletová hrana křídla byla ostřelována vodními projektily a v momentě nárazu se jeden z techniků o plochu opřel. Následně si stěžoval, že byl zasažen elektrickým proudem. Při kontrole ale nebylo žádné probíjení zjištěno. Pokus byl tedy opakován s izolační rukavicí, kterou rána také

projela. Z toho bylo jasné, že se nejedná o elektrický proud ale o něco jiného a to rázovou vlnu [2,6].

Společnost na základě těchto zjištění začala s výzkumem rázových vln na biologické tkáni a vyvíjela prototyp litotryptoru, který v roce 1976 úspěšně použila k litotrypsi lidských konkrementů voperovaných psům. U člověka byl přístroj poprvé použit k desintegraci ledvinových kamenů v roce 1980. Jednalo se o typ HM–1 (Human Model – 1). Následoval prototyp HM–2, který pracoval s 90% úspěšností u konkrementů do velikosti višně, až byl v roce 1983 uveden do provozu typ HM–3. Ten byl prvním sériově vyráběným litotryptorem a dodnes je jedním z nejefektivnějších. Díky svým výborným parametrům se stal zlatým standardem, se kterým jsou všechna ostatní zařízení srovnávána [6].

HM–3 byl založen na elektrohydraulickém zdroji, rázové vlny byly fokusovány pomocí kovového eliptického reflektoru a pacient i generátor byli ponořeni ve vodou naplněné nádrži. Konkrement byl zaměřován skiaskopicky [7].

V roce 1985 byla extrakorporální litotripse rázovou vlnou poprvé aplikována při léčbě žlučových kamenů. Později byla také využita pro drcení pankreatických kamenů u pacientů s chronickou kalcifikující pankreatitidou a syndromem chronické bolesti [8]. Ledvinové a močové kameny jsou dnes dokonce indikovány v rámci první volby k terapii rázovou vlnou [9]. Oblast gastroenterologie však není jedinou, kde našly rázové vlny uplatnění. Jejich účinku se využívá v ortopedii, při uvolňování kostního cementu u reoperacích endoprotéz [10], částečně úspěšné byly pokusy využít je ke zlepšení srůstání špatně srůstajících zlomenin. V posledních letech se začínají v klinické praxi uplatňovat nefokusované rázové vlny malé amplitudy k léčbě bolestí pohybového aparátu, jako například tenisový nebo golfový loket, skokanské koleno, ostruhy kosti patní nebo bolesti páteře. Úspěšnost v těchto případech je 60 – 90 %, ale mechanismus působení není zcela znám. V neposlední řadě se rázových vln užívá ve veterinární medicíně, zvláště u závodních koní [11].

### **1.3 Vývoj v České republice**

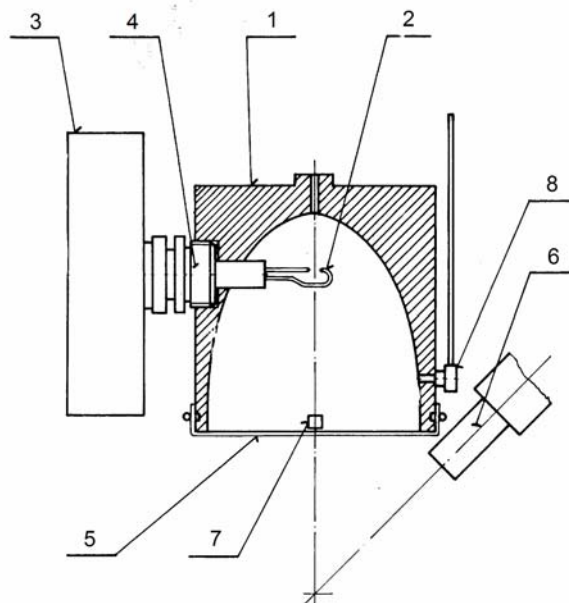
Vývoj přístroje pro litotripsi extrakorporální rázovou vlnou začal v České republice na 1. interní klinice 1. LF UK v Praze v 80. letech. Zpočátku byla snaha o urychlení rozpouštění po narušení konkrementů ultrazvukem. Pokusy však byly neúspěšné, neboť ultrazvukové vlnění nedokáže do organismu proniknout

s dostatečnou intenzitou. Hledalo se tedy jiné řešení a tím řešením byly rázové vlny. Ukázalo se, že v Ústavu fyziky plazmatu měli s rázovými vlnami zkušenosti, protože byly doprovodným jevem při generování silných elektronových svazků. A tak začali vyvíjet první zkušební generátor, což se i během roku 1986 povedlo, a testovali jeho účinky na různé tkáně pokusných zvířat a také na žlučové kameny [12].

Tento experimentální generátor je i patentově chráněn (PV 40066-85). Jeho konstrukce je naznačena na obr. 3. Tento přístroj využívá k vytvoření rázové vlny elektrický výboj ve vodě. Skládá se z nádoby reflektoru (1), kde vzniká tlaková vlna prudkou expanzí kapaliny, která se vypaří, a následnou ionizací se vytvoří vodivý plasmový kanál. Toto se odehrává v jiskřišti (2). Následně je vlna šířící se do okolí fokusována za pomoci reflektoru ve tvaru části rotačního elipsoidu tak, že k výboji dochází v primárním ohnisku a reflektor soustřeďuje energii do ohniska sekundárního, které je v těle pacienta. Další součástí je přechodka (4), ta připevňuje bezindukční kondenzátor (3) mechanicky k reflektoru, těsní proti vodě a také obsahuje propojení jiskřiště a kondenzátoru. Reflektor je překryt folií (5) a celý systém je opatřen zaměřovacím zařízením v podobě ultrazvukových sond (6,7). Poslední součástí zobrazenou na obr. 3 je přívod vody (8) [13].

**Obr. 3.** Provedení experimentálního reflektoru.

- 1-nádoba reflektoru, 2-jiskřiště,
- 3-bezindukční kondenzátor,
- 4-přechodka, 5-krycí folie,
- 6 a 7-ultrazvukové sondy, 8-přívod vody



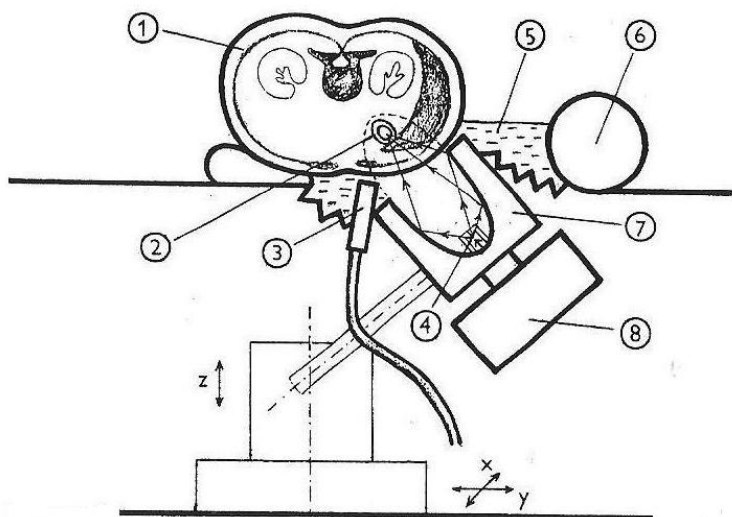
V roce 1986 byl proveden pokus, který potvrdil účinnost této metody. Lidské žlučové kameny byly voperovány do prasat a po vhojení byly vystaveny působení rázových vln, zároveň byly exponovány další tkáně (játra, plíce, ledviny a sval) kvůli specifikaci vedlejších účinků. Potvrdilo se, že energie rázové vlny je schopná narušit

žlučový kámen a na nevzdušných tkáních zanechává zcela bezvýznamné vedlejší účinky. Výrazné poškození plic je dáno jejich odlišnou akustickou impedancí [14].

Vývoj klinické verze litotryptoru byl zahájen počátkem roku 1987 a ještě v tom samém roce proběhla léčba prvního pacienta a do konce roku dalších osmi. Tento přístroj, schéma je na obr.4, využívá ultrazvukového zaměřování kamene a je patentově chráněn (PV 7789-86.D). Zařízení se skládá z eliptického reflektoru (7), 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 (3). Reflektor, ke kterému je připojen pulzní kondenzátor (8), je otevřen směrem vzhůru k vlastnímu lůžku pacienta tvořenému vodní lázní (5) [2,15,16].

**Obr. 4.** Schéma litotryptoru se sonografickým zaměřením.

1-tělo pacienta, 2-kámen ve žlučníku, 3-sonografická sonda, 4-jiskřiště, 5-vodní lázeň, 6-vak plněný vzduchem, 7-reflektor, 8-pulzní kondenzátor



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 [17]. Později bylo využito i sonografické zaměření, které eliminuje radiační zátěž pro pacienta, umožňuje léčbu jak kontrastních, tak nekontrastních konkrémentů a dává možnost kontinuálního sledování fragmentace [18].

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].

## **1.4 Konstrukce přístrojů**

Můžeme říci, že všechny přístroje se skládají ze čtyř základních částí:

### **1.4.1 Generátor rázových vln**

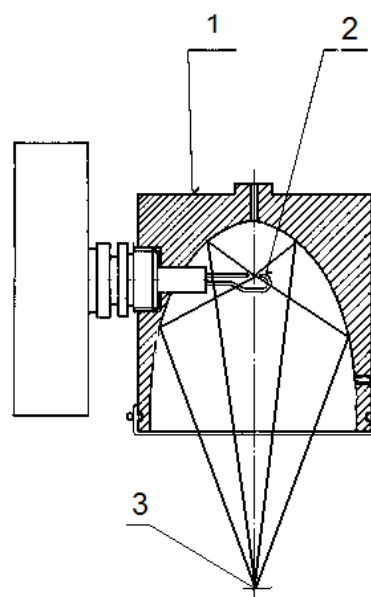
V podstatě se jedná o nejdůležitější součást přístroje. Ke generování rázové vlny v klinické praxi se využívají tři druhy generátorů. Zmíníme se i o jednom zdroji, který se však v klinické praxi nepoužívá. Na způsobu generace rázové vlny záleží, jaký bude průběh vlny v čase a jakých tlaků, pozitivních či negativních, bude dosahovat.

#### **1.4.1.1 Elektrohydraulický generátor**

Toto je nejstarší princip generace rázových vln používaný v prvních litotryptorech firmy Dornier i v prvních litotryptorech české výroby. Jedná se o silnoproudý jiskrový výboj mezi hrotovými elektrodami, které jsou od sebe vzdáleny asi 1 mm. Průměr výbojového kanálu rovněž nepřevyšuje 1 mm, proto můžeme výboj považovat za bodový zdroj. Tlaková vlna kulového tvaru vzniká prudkou expanzí kapaliny, šíří se do okolí a její energie klesá nepřímou úměrně s druhou mocninou vzdálenosti od místa vzniku a také absorpcí prostředím. Proto se využívá fokusace pomocí reflektoru. Reflektor je kovový rotační elipsoid (jeho větší polovina) naplněný kapalinou, v jehož ohnisku (primární ohnisko) je umístěno jiskřiště. Jeho stěny odrážejí vzniklou tlakovou vlnu do druhého ohniska (sekundární ohnisko) [3,4,11,13,19]. Schéma tohoto zdroje je na obrázku 5.

Hroty elektrod podléhají opotřebení a musí se vyměňovat. Jejich životnost lze prodloužit jejich nastavením. Proto byl na Ústavu fyziky plazmatu vymyšlen způsob, jak hroty jiskřiště regulovat a tento způsob je i patentově chráněn (PV 4771-88.J) [20].

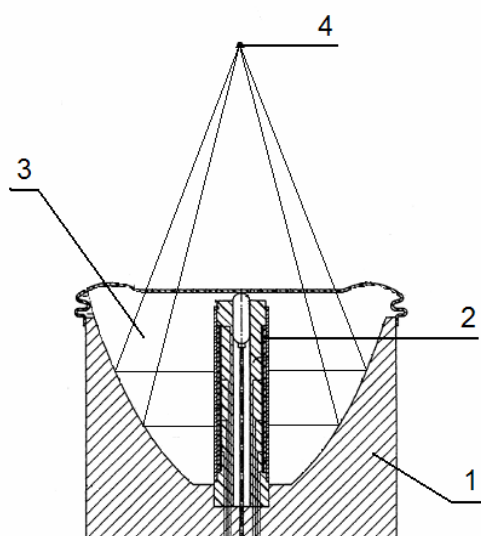
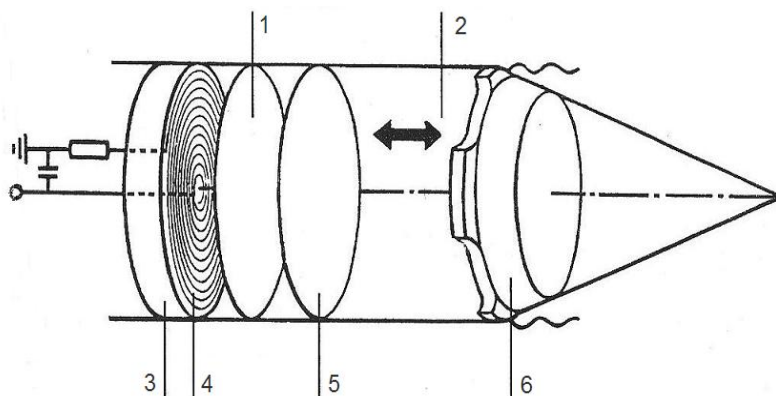
**Obr. 5.** Schéma elektrohydraulického generátoru rázových vln  
1-kovový reflektor, 2-primární ohnisko (místo vzniku elektrického výboje, 3-sekundární ohnisko



#### 1.4.1.2 Elektromagnetický generátor

Poprvé popsal nefokusovanou elektromagnetickou rázovou vlnu Eisenmenger v roce 1962 a prvním přístrojem využívajícím tento zdroj byl Lithostar Siemens. Jak už sám název napovídá, jedná se o elektromagneticky buzený kmit rovinné nebo cylindrické kovové membrány (podobně jako u zvukového reproduktoru). Tohoto kmitu je dosaženo prostřednictvím cívky, kterou projde proudový pulz. Následně je odpuzena rovinná kovová membrána a vzniká tlaková vlna. Ta je fokusována pomocí akustické čočky. Jinou variantou je zdroj s cylindrickou membránou, kde je tlaková vlna fokusována parabolickým reflektorem. Elektromagnetický generátor produkuje slabší rázovou vlnu než generátor elektrohydraulický, jeho životnost je sice 100-200 tisíc impulzů, avšak výměna zdroje je mnohonásobně dražší než výměna jiskrových generátorů. Provozní náklady jsou tedy srovnatelné [3,4,6,7,19]. Schémata obou typů elektromagnetických generátorů jsou na obrázcích 6 a 7.

**Obr. 6.** Schéma elektromagnetického generátoru s rovinnou membránou  
 1-izolační fólie, 2-voda, 3-keramické dno, 4-elektrická cívka, 5-kovová membrána, 6-akustická čočka

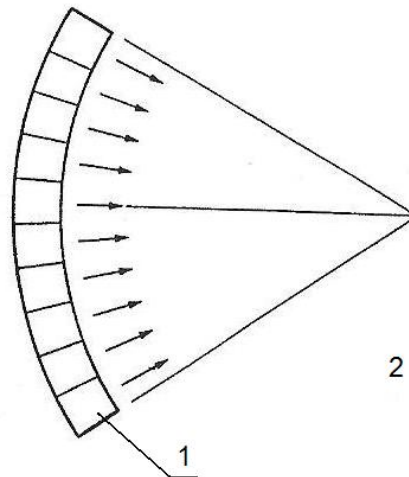


**Obr. 7.** Schéma elektromagnetického generátoru s cylindrickou membránou  
 1-parabolický reflektor, 2-cívka s cylindrickou membránou, 3-voda, 4-ohnisko

### 1.4.1.3 Piezoelektrický generátor

Tento generátor je složen z několika tisíc piezoelementů, ty jsou rozmístěny na vnitřní ploše kulového vrchlíku a jejich synchronním kmitem vzniká sféricky konvergentní rázová vlna. Fokusací docílíme v ohnisku vysokých energií. Výhodou je velký otvor zdroje, díky kterému jsou na přechodu do kůže pacienta relativně malé tlaky, a tak je ošetření téměř bezbolestné a není tedy třeba podávat anestetika. Ohnisko má malé rozměry a tlaky jsou nižší a můžeme pracovat s vyšší frekvencí [3,4,6,7,19]. Schéma piezoelektrického generátoru je na obrázku 8.

**Obr. 8.** Schéma piezoelektrického generátoru rázových vln  
1-soustava piezoelektrických elementů,  
2-ohnisko



#### 1.4.1.4 Mikroexplozivní zdroj

Tento zdroj není v klinické praxi používán. Vymyšlen byl v Japonsku. Malá kulička výbušniny je umístěna v primárním ohnisku, po mikrovýbuchu vzniká (podobně jako u jiskrového výboje) sféricky divergentní rázová vlna. K fokusaci je použit reflektor ve tvaru větší poloviny rotačního elipsoidu [3,19].

#### 1.4.2 Systém pro fokusaci rázových vln

Jaký systém bude k fokusaci využit, 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. Zadržet 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 [7].

#### 1.4.3 Systém propojení s pacientem

Toto je důležitá 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. 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 [7].

#### **1.4.4 Zaměřovací systém**

Zaměřovací systém je určen k lokalizaci a zaměření konkrémentu, ten musí být v ohnisku rázové vln. Lze jím také kontrolovat průběh léčby. Existují dvě metody zaměřování, které jsou běžně užívány, a to rentgenová skiografie a ultrasonografie.

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 ultrasonografickému zaměření.

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 střevočních kličkách, ale i při lokalizaci malých kamenů [7,17,18].

### **1.5 Mechanismus drcení litiázy**

Existuje několik mechanismů, které se na drcení kamene podílí:

1) **Drcení** – je to proces, kdy se pozitivní části vlny odrážejí od okraje konkrémentu a tím dojde k narušení jeho vnitřního napětí.

2) **Kavitace** – negativní vlna způsobí vznik kavitace (mikrobublinky) na povrchu konkrémentu. Po zániku podtlaku dochází k nesymetrickému kolapsu kavitace tak, že se prolamuje směrem k povrchu kamene a vznikne mikroskopický paprsek kapaliny dosahující vysokých rychlostí. Ten konkrément poškodí. Nebo při kolapsu kavitace vznikají sekundární rázové vlny, jež kámen narušují (viz níže).

3) **Stlačení** – rázové vlny se šíří kolem a skrze konkrement a odlišný tlak mezi tekutinou a konkrementem způsobí narušení.

4) **Superfokusace** – při odrazu rázových vln od zakřiveného povrchu konkrementu dochází k interferenci a vznikají tak oblasti s vysokým tlakem.

5) **Únava** – opakující se vlny způsobují postupné rozšíření defektů a následné poškození.

6) **Oddělení vrstev** – je to proces, kdy na vnitřních slabých místech dojde k narušení vnitřního napětí.

Je samozřejmé, že se při drcení konkrementu neuplatňuje pouze jeden z mechanismů, ale podílí se na něm více či méně všechny [27].

## **1.6 Nový zdroj rázových vln**

### **1.6.1 Vývoj a konstrukce**

Úspěchy dosažené v desintegraci kamenů, ať už ledvinových či žlučových, vedly k úvahám o dalším využití rázových vln. Zájem o ně je i díky jejich vlastnostem (dobře pronikají do měkkých tkání, šíří se s malým útlumem a dají se fokusovat). Jeden z hlavních směrů výzkumu je orientován na možné poškození nádorových tkání [2]. Nádorové tkáně se však svými akustickými vlastnostmi od okolní zdravé tkáně příliš neliší, je tedy jasné, že k poškození takové oblasti je třeba použít rázovou vlnu speciálních vlastností. Co se týká elektromagnetických a elektrohydraulických generátorů, tak u nich je možnost změny časového průběhu vlny principiálně omezena. U generátoru piezoelektrického lze sice tento průběh měnit, ale celková energie rázové vlny je omezena mechanickou pevností piezoelektrických elementů [19].

Na pracovišti Ústavu fyziky plazmatu ČAV vyvinut nový generátor rázových vln. Základem, z kterého nový generátor vychází, je myšlenka, že pokud má být dosaženo lokálního poškození v akusticky homogenním prostředí, potom je nutné využít buď efektu kavitací, nebo použít dvě po sobě jdoucí vlny, z nichž jedna vytvoří nehomogenitu a ta druhá se na ní utlumí. Ve vývoji byly užity znalosti z výzkumu impulzních korónových výbojů pro čištění vody. Mechanismus vzniku korónového výboje ve vodě není prozatím detailně znám. O jeho vlastnostech se však dá usuzovat z experimentů. K jeho vzniku je zapotřebí elektrické pole řádů 1MV/cm a

snáze se zapaluje z kladné elektrody. Problémem je, jak dosáhnout tak silných polí při použití napětí v řádu desítek kV [11].

Toto řeší způsob navržený Ústavem fyziky plazmatu, který byl také patentován (číslo dokumentu: 282566). Spočívá v tom, že intenzita elektrického pole v blízkosti elektrody se zvýší částečným pokrytím této elektrody pevným nebo plynným dielektrikem. Na povrchu této elektrody se potom vytvoří místa styku materiálu elektrody a dielektrik s rozdílnými dielektrickými vlastnostmi. Těmto místům se říká trojné body. V nich se po připojení napětí vytvoří elektrické pole, které je vyšší než u elektrody bez trojných bodů. Podle výše zmíněného patentově chráněného vynálezu se trojné body na elektrodě vytvoří tím, že:

- a) elektroda je pokryta vrstvou porézní keramiky,
- b) elektroda je pokryta přerušovanou vrstvou skla,
- c) elektroda je vyrobena z plynopropustného materiálu a připojena k přívodu plynu,
- d) elektroda vyrobená z plynopropustného materiálu je pokryta porézní keramikou a připojena k přívodu plynu.

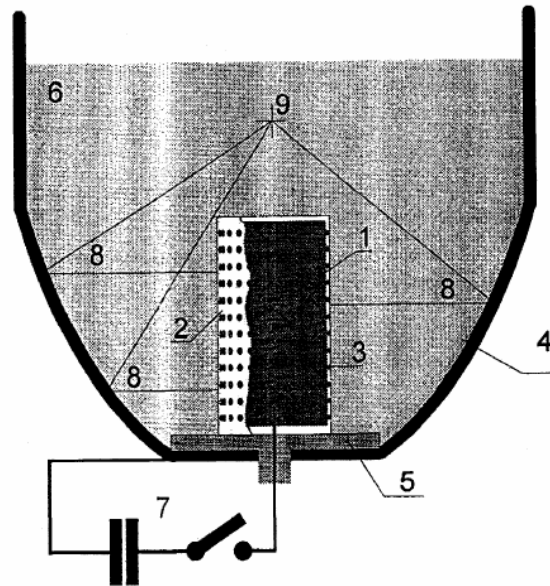
Vhodnou konstrukcí elektrody je pak možno dosáhnout vysoké hustoty trojných bodů a v souvislosti s tím i vysoké hustoty výbojových kanálů. A trojné body mají ještě jednu výhodu, tím, že je do jejich okolí soustředěno elektrické pole, se rozšiřuje rozsah použitelných napětí, při nichž nedochází ke vzniku nežádoucích jiskrových výbojů [21].

Na základě těchto znalostí byl vyvinut nový generátor rázových vln. Ten je také patentově chráněn (číslo dokumentu: 291158). Existuje více verzí uspořádání.

Jedna z verzí (obrázek 9) se skládá z kovové anody tvaru válce, která je pokryta tenkou vrstvou porézní keramiky (2), říká se jí kompozitní anoda (1). Pórovitost u takové anody je 3 – 5 %. Katodu tvoří kovový reflektor (4), který má tvar části rotačního paraboloidu tak, aby dokázal fokusovat vzniklou tlakovou vlnu. Anoda je umístěna v jeho ose. Funguje tak, že prostor mezi oběma elektrodami se naplní kapalinou se zvýšenou elektrickou vodivostí (více než 5mS/cm). Po připojení impulzního napětí (15-30 kV) se mohou předvýbojové proudy uzavírat pouze přes jednotlivé otevřené póry (3). Tímto nerovnoměrným rozložením předvýbojových proudů dochází k lokálnímu zvýšení intenzity elektrického pole. To má hodnotu dostatečnou k iniciaci mnohokanálového elektrického výboje. Výboje hoří jen v těsné blízkosti pórů. Nastává rychlý ohřev vody, který vede ke vzniku mnoha kvazisférických tlakových vln. Jejich superpozicí pak vzniká válcová tlaková vlna. Ta

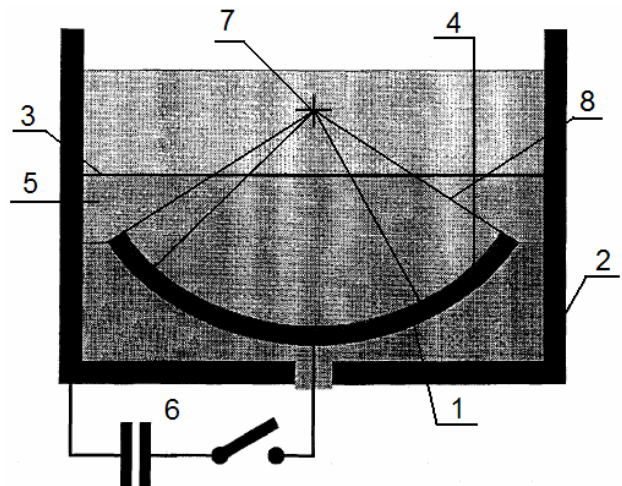
je následně fokusována kovovým reflektorem. Během fokusace se tlaková vlna transformuje na vlnu rázovou [19,22].

**Obr. 9.** Schéma nového generátoru rázových vln (válcová elektroda)  
 1-kompozitní anoda, 2-izolační vrstva,  
 3-otevřené póry, 4-reflektor, 5-izolátor,  
 6-prostor mezi elektrodami, 7-impulzní zdroj, 8-tlaková vlna, 9-ohnisko

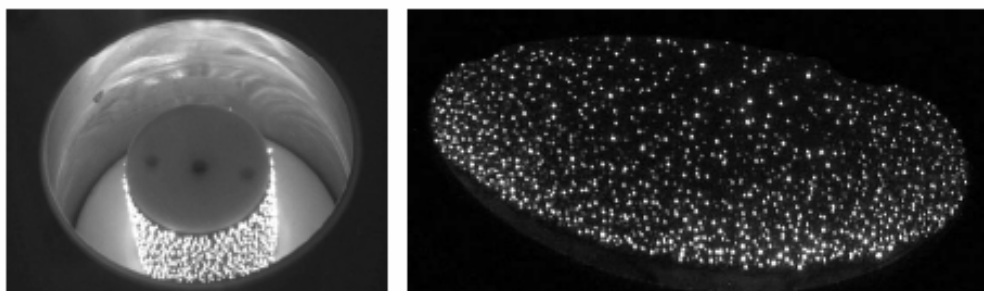


Jiná verze (obrázek 10) je uspořádána tak, že první elektroda (1) má tvar kulového vrchlíku a je pokryta tenkou izolační vrstvou s mnoha póry (4). Pórovitost se pohybuje v rozmezí 3-5 %. Druhá elektroda je buď tvořena vodivými stěnami nádoby (2), ve které je první elektroda umístěna, nebo tenkou vodivou fólií (3), kterou bez problémů prochází generovaná tlaková vlna. Prostor mezi oběma elektrodami je opět zaplněn kapalinou se zvýšenou elektrickou vodivostí. Mechanismus, kterým vzniká mnohokanálový výboj, je shodný jako v předchozím případě. Rozdíl je v tom, že zde vzniká superpozicí jednotlivých kvazisférických tlakových vln sféricky konvergentní tlaková vlna, která se v průběhu fokusace transformuje na vlnu rázovou [19].

**Obr. 10.** Schéma nového generátoru rázových vln (elektroda tvaru části kulového vrchlíku)  
 1-kompozitní anoda, 2-stěny nádoby,  
 3-tenká fólie, 4-izolační vrstva  
 s otevřenými póry, 5-prostor mezi  
 elektrodami, 6-impulzní zdroj,  
 7-ohnisko, 8-tlaková vlna



Na obrázku 11 je zachycen okamžik výboje obou generátorů. Můžeme vidět velký počet výbojových kanálů, díky kterým se následně tvoří tlaková vlna.

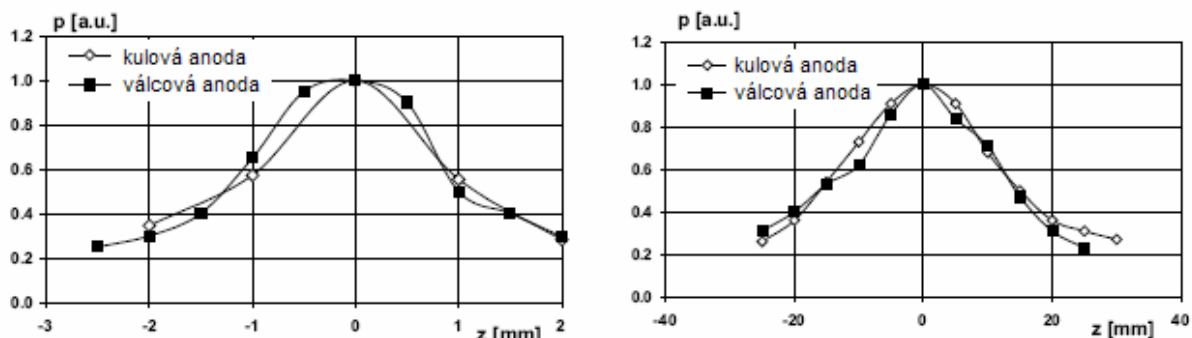


**Obr. 11.** Okamžik mnohokanálového výboje, vlevo válcové, vpravo kulové kompozitní anody.

### 1.6.2 Výhody

Nespornou výhodou nového generátoru je to, že má možnost ovlivňovat amplitudu i časový průběh rázové vlny a to buď volbou parametrů výbojového obvodu (napětí, indukčnost, kapacita kondenzátoru), nebo změnou vodivosti kapaliny, která vyplňuje prostor mezi elektrodami. Díky tomu můžeme dosáhnout stavu, kdy vlna zředění je v místě ohniska potlačena (vhodné pro litotrypsi), nebo stavu opačného, kdy vlna zředění v okolí ohniska překračuje kavitační práh. V ohnisku se tedy tvoří kavitace a jejich účinkem je možné dosáhnout lokálního mechanického namáhání původně akusticky homogenního prostředí. Toho lze dosáhnout i generací dvou rázových vln jdoucích po sobě v intervalu kratším než je doba akustického zklidnění prostředí [19,23].

Bylo změřeno, že tlaková amplituda dosahuje 90 MPa při napětí 25kV a fáze podtlaková s amplitudou kolem -25 MPa vytváří kavitace. Obrázek 12 nám ukazuje příčný a podélný tlakový profil ohniska obou popisovaných generátorů. Rozměry ohniska v poloviční amplitudě tlaku jsou 2,5 x 32 mm pro oba generátory [22].



**Obr. 12.** Tlakový profil ohniska, vlevo příčný, vpravo podélný.

### 1.6.3 Výsledky experimentů

Experimentálně bylo prokázáno, že generátor s válcovou elektrodou, u kterého je tlaková vlna fokusována pomocí části rotačního paraboloidu, má dobrou fokusaci. Možné poškození tedy může nastat pouze v ohnisku, mimo ohnisko je již biologické působení zdroje zanedbatelné. Co se týká drcení kamenů, je efektivnější než u zařízení MEDILIT. To je dáno jeho lepší fokusací [24].

Již dříve byly experimentálně zkoušeny biologické účinky dvou interagujících rázových vln v akusticky homogenním prostředí. Takový pokus byl proveden i s využitím českého litotryptoru MEDILIT s elektrohydraulickým zdrojem. Posilování traumatických účinků pomocí zvětšování amplitudy negativního tlaku má limitovaný význam. Proto se využilo dvojice rázových vln generovaných velice krátce po sobě, kdy druhá vlna vstupuje v okolí ohniska do prostředí, které je ještě nezrelaxované po průchodu první vlny a uvolňuje tam část energie nesené pozitivní částí vlny. Jde o to, že po průchodu první vlny vzniknou v okolí ohniska akustické nehomogenity a kavitace, protože negativní tlak překračuje kavitační práh. A potom následuje druhá vlna, která interaguje se vzniklými nehomogenitami a uvolní tak značnou část své energie. Doba, po níž existuje registrovatelná akustická nehomogenita po průchodu první vlny, je závislá na stupni odplynění kapaliny nebo tkáně. U odplyněné vody je tato doba kratší než 100 ms. V pokusu byla exponována suspenze erytrocytů a sledována hemolýza. Zjistilo se, že toxicita interagující rázové vlny je několikrát vyšší než u vlny jednoduché, a byl tedy potvrzen efekt interakce rázových vln [25].

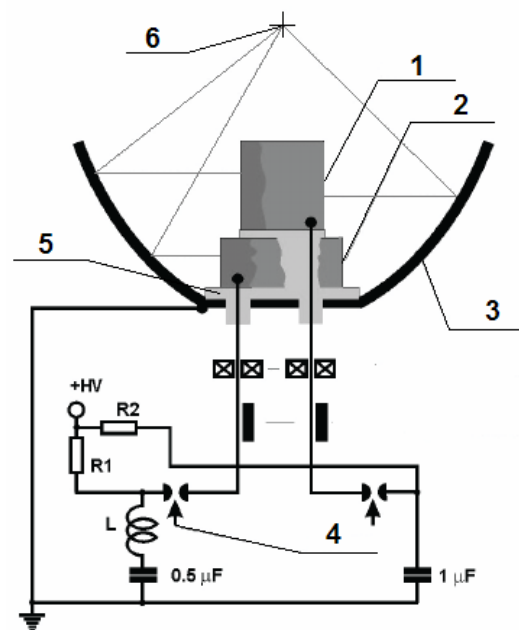
V dalších experimentech byl proto použit nový generátor rázových vln s válcovou elektrodou, která však byla rozdělena na dvě izolované části napájené ze

dvou nezávislých zdrojů, což umožňuje generovat dvě následné rázové vlny fokusované do společného ohniska (ty spolu interagují) a měnit čas mezi oběma vlnami. V experimentech byla exponována lidská krev, aby se zjistilo, jestli rázová vlna může působit na objekty buněčných rozměrů. Ukázalo se, že k úplné hemolýze stačí 50 rázů narozdíl od klinického litotryptoru, kde po 200 rázech byla hemolýza dvakrát nižší. K ověření průniku vlny do struktur jako je tkáň byla použita čerstvá brambora (velký obsah vody). Ta byla exponována 10 rázy a po podélném rozříznutí v ose šíření vlny se uvnitř brambory objevilo ostře ohraničené poškozené místo v místě ohniska (mající tvar kužele), přičemž povrch brambory zůstal bez poškození [11].

Dále bylo experimentálně prokázáno toxické působení a lokalizované účinky rázových vln šířících se v původně akusticky homogenním prostředí. Pro tento pokus byla zvolena králičí játra. Rázové vlny byly generovány na novém generátoru pomocí mnohokanálového výboje s rozdělenou válcovou elektrodou, tu vidíme na obrázku 13. Válcová kompozitní anoda je rozdělena na dvě izolované části, které jsou napájené ze separátních zdrojů, takže mohou být sepnuty s rozdílným časovým zpožděním. Pokud jsou sepnuty současně, rázová vlna z anody o větším průměru (2) dosahuje ohniska o  $5 \mu\text{s}$  dříve než rázová vlna z anody o menším průměru (1). Parametry rázové vlny mohou být měněny. Generátor je umístěn v nádrži s vodivým roztokem a oddělen od experimentální nádrže akusticky transparentní membránou.

**Obr. 13.** Schéma nového generátoru rázových vln s rozdělenou válcovou kompozitní anodou.

1-část kompozitní anody s menším průměrem, 2-část kompozitní anody s větším průměrem, 3-reflektor, 4-jiskřiště, 5-izolátor, 6-ohnisko



Králičí játra byla vystavena 1200 dvojitým interagujícím rázům s časovým zpožděním 5  $\mu$ s. Králik byl následně snímkován na magnetické rezonanci a potom byl podroben histologickému vyšetření. Na snímcích z magnetické rezonance bylo zjevné poškození jater a částečně také přední stěny žaludku. Histologické vyšetření prokázalo poškození tkáně a přechod mezi poškozenou a zdravou tkání byl ostrý. To prokázalo toxický efekt interagujících rázových vln.

Studován byl i efekt rázových vln na nádorové buňky melanomu B16. Nádorové buňky byly rozděleny do ampulí, v každé bylo 6 milionů buněk, a tyto ampule byly exponovány. Ihned po expozici bylo stanoveno přežití nádorových buněk. Po 90 rázech přežily 4 miliony buněk, po 190 rázech 3,5 milionu buněk, po 270 rázech 2 miliony a po 350 rázech okolo půl milionu buněk. Vyšší počet rázů způsobil téměř kompletní destrukci všech buněk.

Buněčná suspenze exponovaná 600 rázovými vlnami byla subkutánně transplantována myším C57B16. Ve srovnání s kontrolní skupinou byla doba přežití u experimentální skupiny prodloužena o 13 dní a růst nádoru byl zpožděn [26].

Z těchto výsledků je patrný vliv rázové vlny generované novým generátorem a využití interakce takto generovaných rázových vln na oblast akusticky homogenní.

## **1.7 Kavítace**

Jak už bylo výše uvedeno, pokud má být dosaženo lokálního poškození v akusticky homogenním prostředí, potom je nutné použít buď dvě po sobě jdoucí vlny, z nichž jedna vytvoří nehomogenitu a ta druhá se na ní utlumí, nebo využít efektu kavitací. Překročí-li vlna zředění amplitudu kavitačního prahu (tj. pevnost vody v tahu), vznikají kavítace. Jsou to vlastně mikrobublínky, které jsou nestabilní a po vymizení podtlaku kolabují. Tento kolaps je velice rychlý, jedná se o děj adiabatický a v místě se zvedá teplota až o 4 řády. Dále při kolapsu dochází ke vzniku sekundárních sférických rázových vln s krátkou vlnovou délkou, které jsou schopny interagovat s buněčnými strukturami. A je-li kavítace v blízkosti pevného povrchu (kamene při lithotripsi), nekolabuje symetricky, ale hrouť se a prolamuje směrem k pevnému povrchu za vzniku mikroskopického paprsku kapaliny, který dosahuje rychlosti až 200 m/s. Ten působí takovou silou, že poškodí i titanové slitiny. Navíc

kavitace vytváří v místě ohniska nehomogenitu, na které se při využití interagujících rázových vln druhá vlna utlumí [2,23,27,28,29].

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je zjistit, jaké jsou biologické účinky rázových vln generovaných pomocí nového zdroje na tkáň pokusných zvířat, tedy in vivo a pozorování těchto účinků prostřednictvím magnetické rezonance a histologického vyšetření. Exponována byla játra dvou krys.

Cílem je také zjistit, jaký vliv mají rázové vlny na růst nádoru v porovnání s výsledky kontrolní skupiny. Zde je exponována nádorová tkáň, nádorové buňky jsou aplikovány kryse intradermálně.

## **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1 První pokus, rázování krysíh jater**

#### **3.1.1 Pokusná zvířata**

K pokusu byly použity dvě krysy WISTAR. Jednalo se o samice o hmotnosti 280-300 g. Před pokusem byly krysy na dietě ST1 a voda jim byla podávána ad libitum. Dodavatelem zvířat je ANLAB s. r. o.

Krysy jsme si označili, abychom je mohli rozlišit, dále tedy budeme používat rozdělení těchto dvou krys na značenou (1) a neznačenou (2).

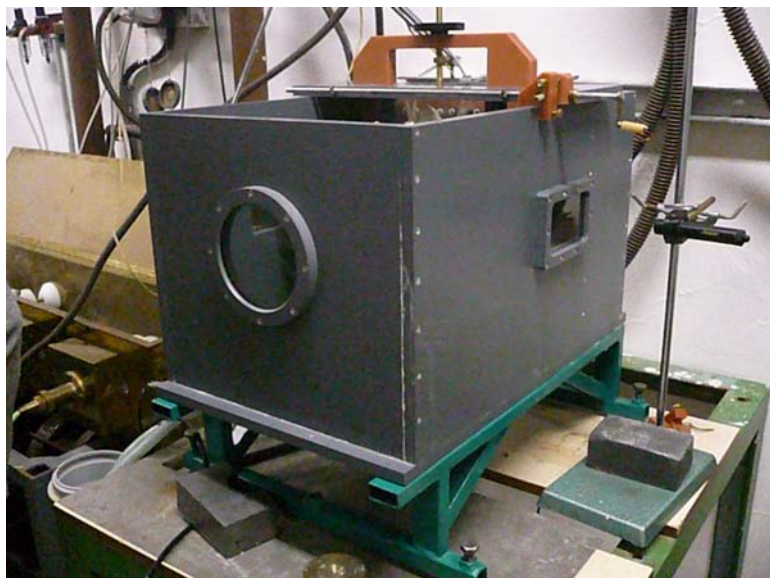
#### **3.1.2 Generátor rázových vln**

Ke generaci rázových vln jsme použili nový generátor sestavený pracovníky Ústavu fyziky plazmatu AV, který je založený na principu mnohokanálového výboje v kapalině. Využívá kompozitní anodu, to je anoda pokrytá porézní keramikou a obklopená kapalinou o vysoké vodivosti. V pórech vznikají tzv. trojné body a dochází zde po připojení ke zdroji k zažehnutí výbojových kanálů. V našem pokusu je použito uspořádání, kde je tato válcová kompozitní anoda rozdělena na dvě části, které jsou od sebe izolované a jsou napájené ze dvou nezávislých zdrojů. Díky tomu lze generovat dvě následné rázové vlny a měnit časový interval mezi nimi. Rozměry obou částí anody jsou A1 60 x 70 mm, A2 77 x 20 mm (jde o průměr x výšku anody). Časový interval mezi první a druhou z dvojice interagujících vln dosahuje 5  $\mu$ s. Amplituda pozitivního tlaku přesahuje v ohnisku 100 MPa, tlaku negativního -25 MPa, při napětí 30 kV. Rozměr ohniska v poloviční amplitudě tlaku je 2,5 x 32 mm.

##### **3.1.2.1 Uspořádání celého zařízení**

Celkové uspořádání zařízení vidíme na obrázku 14. Je to nádrž tvaru kvádrů rozdělená na dvě části. V menší části je umístěn generátor a to tak, že jeho osa vede podélně. Tato část je naplněna kapalinou o vysoké vodivosti, aby zde mohlo docházet k mnohokanálovým výbojům a generaci tlakové vlny. Druhá experimentální část je od té první oddělena akusticky transparentní membránou, aby tlakové vlny mohly procházet bez útlumu. Tuto membránu vidíme na obrázku 15. Ohnisko je lokalizováno v experimentálním prostoru. My známe jeho polohu a pomocí laseru

můžeme rázovaný objekt umístit tak, aby byl přesně v ohnisku. Kapalina v experimentální části je odplyněná a ohřátá na vyhovující teplotu.



**Obr. 14.** Celkový pohled na pokusné zařízení.



**Obr. 15.** Pohled na akusticky transparentní membránu, která odděluje oba prostory pokusného zařízení.

### **3.1.3 Umístění krysy do ohniska**

#### **3.1.3.1 Narkóza a připevnění krysy**

Rázové vlny jsme aplikovali kryse v narkóze. Krysu jsme nejprve mírně narkotizovali etherem a následně jsme aplikovali roztok Narkamonu, Xylazinu a vody pro injekce. Příprava aplikačního roztoku je následující:

Na 1 kg hmotnosti - 2 ml Narkamonu  
- 0,7 ml Xylazinu  
- 2,3 ml vody pro injekce

Tento preparát se využívá ve veterinářství. Aplikuje se intramuskulárně. My jsme ho aplikovali do zadních nohou, polovinu dávky do jedné, polovinu do druhé. Narkamon obsahuje 50 mg účinné látky na 1 ml a Xylazin 23,3 mg účinné látky na 1 ml. Délka chirurgického stádia anestézie je 90 minut a spánek po anestézii trvá 1 hodinu. Délka anestézie je postačující pro provedení pokusu.

Hmotnost našich dvou krys byla mezi 280 – 300 g, aplikovaná dávka tedy byla 1,4 – 1,5 ml roztoku.

Kryse v anestézii jsme vyholili oblast nad játry, připevnili ji na držák, který je součástí pokusného zařízení, a poté jsme ho i s krysou umístili do experimentálního prostoru. Krysa byla připevněna tak, aby exponované místo bylo přístupné.

#### **3.1.3.2 Umístění do ohniska**

Kryse jsme kvůli snadnějšímu zaměření udělali nad oblastí jater na kůži značku. Držák spolu s krysou jsme ponořili do kapaliny v experimentálním prostoru a pomocí laseru jsme nastavili krysu tak, aby se ohnisko nacházelo v jejích játrech. Důležité je zkontrolovat, jestli má krysa hlavu nad vodou a dýchá.

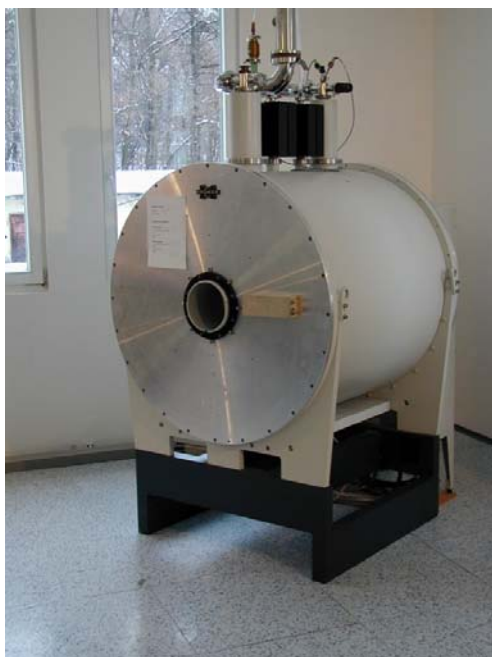
### **3.1.4 Aplikace rázových vln**

Celková doba aplikace rázových vln byla 30 minut. Aplikovány byly dvojice rázů, kde druhá vlna následovala tu první s časovým zpožděním 5  $\mu$ s. Tato dvojice rázů se opakovala každé 2 vteřiny. Obě krysy byly tedy exponovány 900 dvojrázy do oblasti jater. Poté byly krysy usušeny a převezeny do IKEMu k snímkování na NMR.

### 3.1.5 Snímkování na NMR

Snímkování bylo provedeno v Experimentální MR laboratoři IKEM na přístroji MR tomograf Bruker Biospec 4.7 T, který slouží k výzkumu malých zvířat. Toto zařízení je na obrázku 16. Snímky se pořizovaly 1., 3. a 7. den po rázování.

Snímkování se provádí v narkóze. Zde bylo užito inhalační anestetikum Isofluran. Aplikace isofluranu se provádí pomocí speciálního odpařovače. V tom se mísí s kyslíkem a oxidem dusným, jeho koncentrace je 1,0 – 2,5 %. Krysu jsme nejprve dali do uzavřené sklenice s přívodem anestetika a poté, co byla navozena anestézie, jsme krysu připevnili na speciální držák a na hlavu jsme upevnili masku s přívodem udržovací anestézie. Držák i s krysou (obrázek 17.) jsme poté vložili do cívky magnetické rezonance.



**Obr. 16.** Experimentální MR tomograf Bruker Biospec 4.7 T pro výzkum na malých zvířatech.



**Obr. 17.** Držák s upevněnou krysou a přívodem udržovací anestézie.

Snímali jsme pomocí sekvence flash, to je T2\*-T1 vážená sekvence. Řezy byly pořizeny ve třech rovinách - koronární, sagitální a axiální.

### 3.1.6 Pitva

Krasy jsme desátý den po rázování pitvali a z poškozených míst jsme odebrali vzorky pro histologii.

## 3.2 Druhý pokus, rázování nádoru

### 3.2.1 Pokusná zvířata

V tomto pokusu byly použity krasy LUIS. Jednalo se o samice. Dvě ze čtyř byly vystaveny působení rázových vln a zbylé dvě sloužily jako kontrola. Abychom tyto dvojice rozlišili, označili jsme vždy jednu na ocase. Všem krysám byly intradermálně do abdominální oblasti aplikovány buňky B-lymfomu. Po sedmi dnech měl nádor objem 0,02 cm<sup>3</sup>.

### 3.2.2 Rázování krysy

K aplikaci rázových vln jsme využili stejný přístroj jako v prvním pokusu. Krasy jsme narkotizovali obdobným způsobem (ether a následně roztok Narkamonu, Xylazinu a vody pro injekce podaný intramuskulárně).

Krasy jsme nastavili tak, aby se nádory nacházely v ohnisku rázových vln. Aplikovali jsme dvojici interagujících rázových vln, kde časový interval mezi první a druhou z dvojice byl 5 μs. Tato dvojice se opakovala každou vteřinu po dobu 25 minut. Celkem tedy byla každá krasy exponována 1500 dvojrázy.

### 3.2.3 Měření růstu nádoru

Rozměry nádoru jsme měřili před rázováním a potom 3., 7., 10., 14., 17. a 21. den. Měření jsme prováděli pomocí digitálního posuvného měřidla a z naměřených hodnot jsme spočítali objem nádoru. Ten jsme zapisovali do tabulky. Jelikož jsme měli dvě krasy pokusné a dvě kontroly, počítali jsme aritmetický průměr dle vzorce:

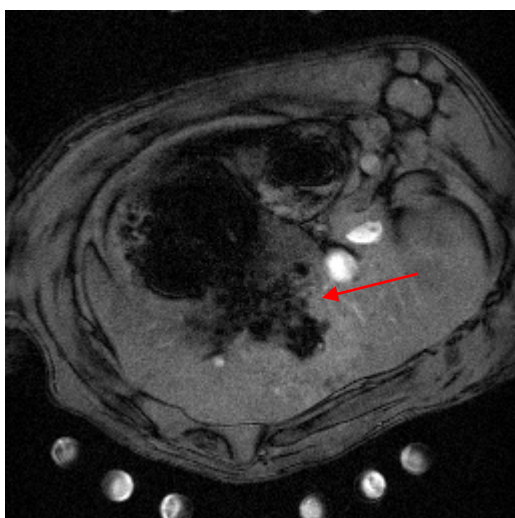
$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

kde  $x$  jsou hodnoty objemu nádoru v daný den a  $n$  je počet krysy ve skupině tedy 2. Aritmetický průměr hodnot jsme vynesli do grafu a dostali jsme tak růstovou křivku.

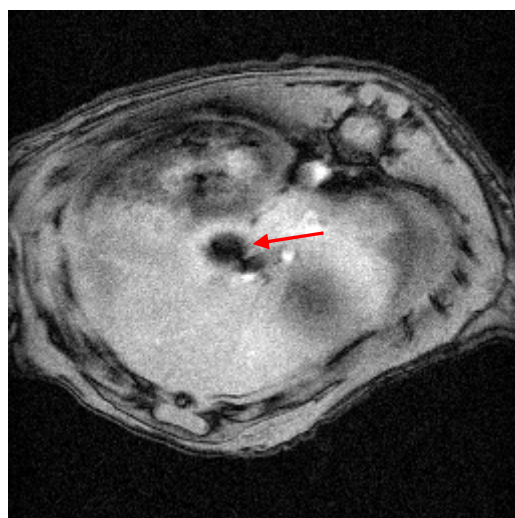
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 První pokus, rázování krysích jater

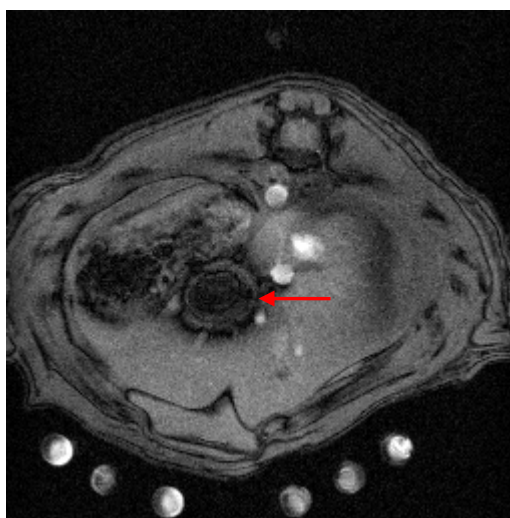
V prvním pokusu jsme exponovali krysí játra 900 dvojrázy. Celá procedura proběhla v pořádku. Následně jsme krysy snímkovali na magnetické rezonanci 1., 3. a 7. den po rázování. Krysy dělíme na značenou a neznačenou. Snímky byly pořízeny sekvencí flash. Na obrázcích 18, 19 a 20 vidíme tyto řezy neznačené krysy a na obrázcích 21, 22 a 23 řezy krysy značené.



**Obr. 18.** Snímek MR 1 den po rázování neznačená krysa.

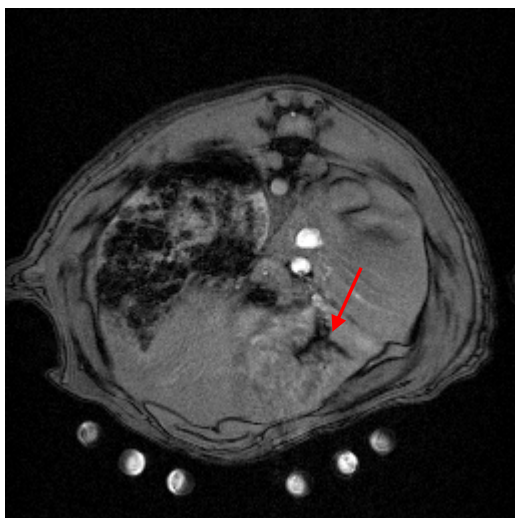


**Obr. 19.** Snímek MR 3 dny po rázování neznačená krysa.



**Obr. 20.** Snímek MR 7 dní po rázování neznačená krysa.

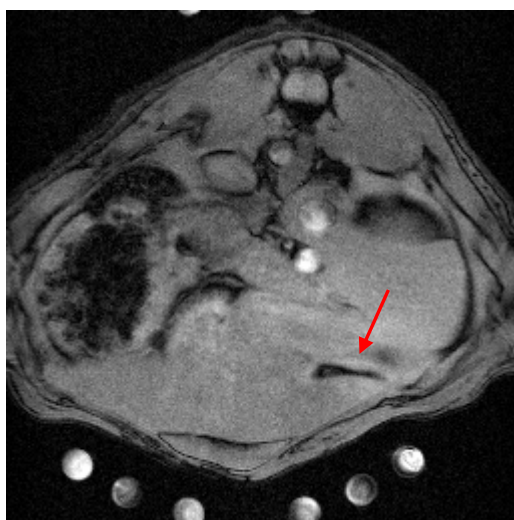
Na axiálních snímcích oblasti jater neznačené krysy (obrázek 18, 19 a 20) je červenou šipkou vyznačeno místo vzniklého poškození. Jak je vidět, leží v zadní části jater a mírně zasahuje i do stěny žaludku. Vidíme, že léze je celkem dobře ohraničená a zůstává viditelná ve všech třech řezech.



**Obr. 21.** Snímek MR 1 den po rázování značená krysa.



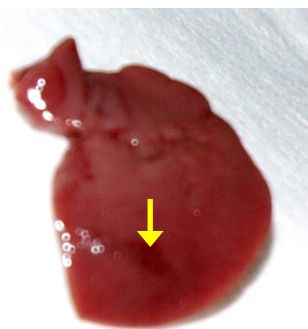
**Obr. 22.** Snímek MR 3 dny po rázování značená krysa.



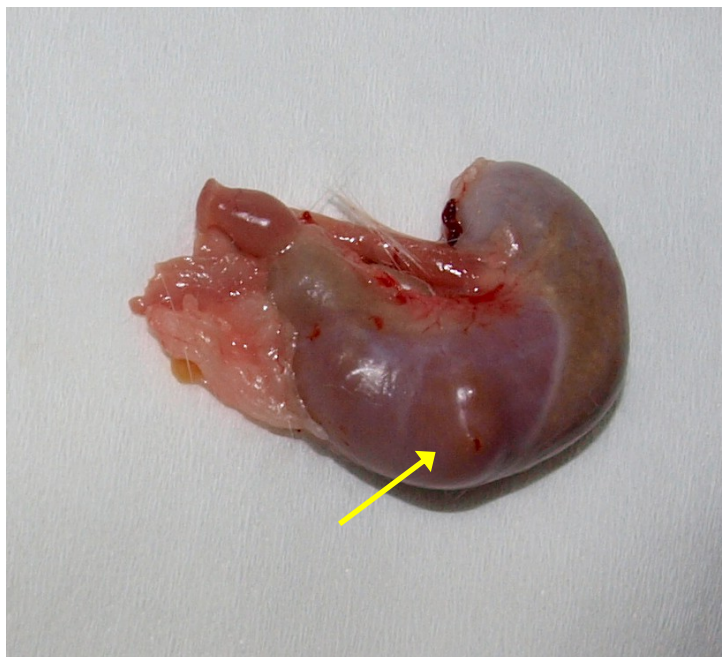
**Obr. 23.** Snímek MR 7 dní po rázování značená krysa.

Na těchto snímcích jsou opět axiální řezy v oblasti jater u značené krysy (obrázek 21, 22 a 23). I zde je patrné poškození, nachází se v přední části jater na všech třech řezech. Léze je ohraničená.

Sedmý den po rázování jsme krysy pitvali na Ústavu biofyziky a informatiky. Obě krysy jsme otevřeli a hodnotili jsme poškození jater patrné ze snímků MR. Léze jsme vyfotografovali (obrázky 24, 25, 26, 27 a 28).



**Obr. 24.** Jaterní lalok se stopami poškození, neznačená krysa.



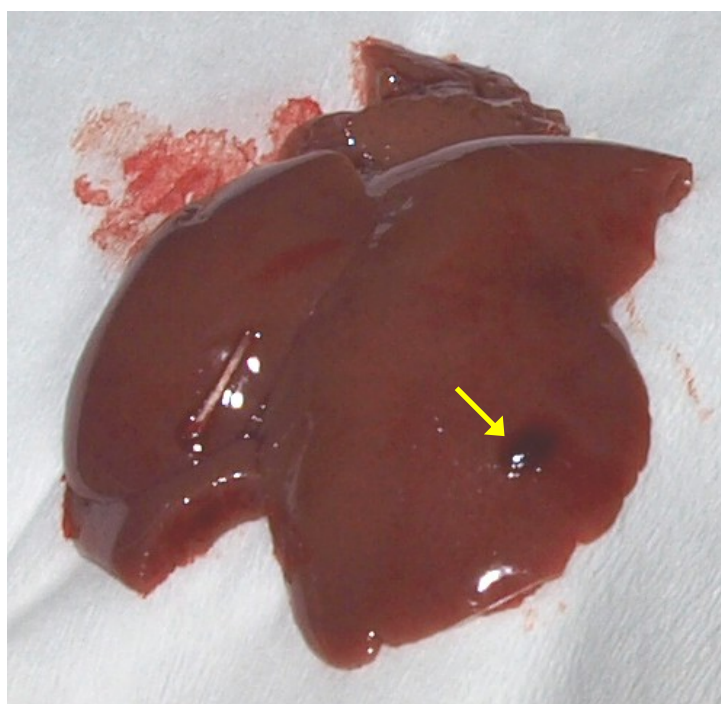
**Obr. 25.** Žaludek neznačené krysy s patrnou zeslabenou stěnou a vyklenutým obsahem.



**Obr. 26.** Vyjmutá oblast žaludku neznačené krysy zasažená rázováním. Sliznice na vnitřní straně odpadá, útvar vpravo je část uvolněné sliznice.



**Obr. 27.** Otevřená značená krysa, žlutá šipka ukazuje lézi v játrech.



**Obr. 28.** Detail poškozeného jaterního laloku značené krysy.

Pitva obou krys jasně prokázala, že rázová vlna způsobila poškození tkáně. U neznačené krysy jsme našli lézi na zadní části jater přiléhající k žaludku (obrázek 24), léze byla ostře ohraničená. Poškozena byla i přiléhající stěna žaludku, ta byla

zeslabená a obsah žaludku se zde vyklenul (obrázek 25). Tuto poškozenou část jsme vyjmuli a zjistili jsme, že vnitřní část sliznice v místě poškození odpadá (obrázek 26). Nález odpovídal snímkům z MR. U značené krysy jsme našli poškození na přední části jaterního laloku (obrázek 27 a 28). Léze byla dobře ohraničená. To korespondovalo i s výsledkem snímkování na MR.

Výsledkem je zjištění, že rázová vlna prošla tkáněmi před ohniskem, aniž by je poškodila. Nenašli jsme žádné známky poranění těchto struktur. K samotnému poškození měkkých tkání došlo až v oblasti ohniska a to na játrech a u neznačené krysy i na stěně žaludku. Průměr léze byl v obou případech asi 5 mm.

Z poškozených míst jaterní tkáň jsme odebrali vzorky a histologicky je vyšetřili (obrázky viz příloha 1a a 1b). Zjistili jsme, že došlo k ložiskové hemoragii s regresivními změnami hepatocytů a překrvení jaterních sinusů. Histologický nález však nebyl zcela průkazný.

Zjistili jsme, že rázová vlna tedy dokáže způsobit poškození měkkých tkání. Tím jsme potvrdili výsledky dosažené v předchozích experimentech (Beneš, J., et al. 2007) [26]. Její účinky se projevují pouze v oblasti ohniska a jsou ohraničeny.

## 4.2 Druhý pokus, rázování nádoru

V druhém pokusu jsme exponovali B-lymfom aplikovaný intradermálně do abdominální oblasti 1500 dvojrázy. Procedúra proběhla bez větších komplikací. Následně jsme sledovali růst nádoru a porovnávali vývoje objemu u experimentální a kontrolní skupiny. Měření objemu nádoru jsme provedli před rázováním a potom 3., 7., 10., 14., 17. a 21. den jak u kontrolní, tak u experimentální skupiny. Výsledky jsme zapsali do tabulek (tabulky 1 a 2). Dvojici krys dělíme na značenou na ocas (ocas) a neznačenou (čistá).

**Tabulka 1.** Naměřené objemy nádorů u obou experimentálních krys a jejich průměr.

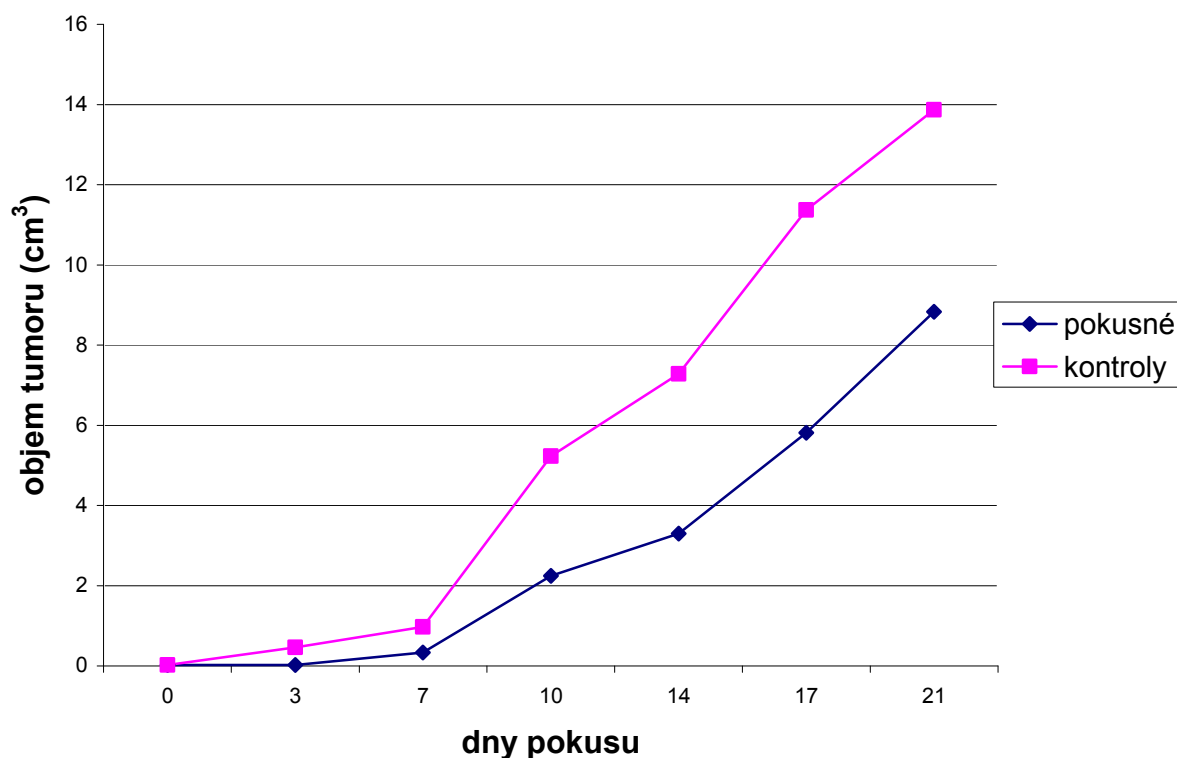
Pokusné								
	Den	0	3	7	10	14	17	21
Objem nádoru [cm <sup>3</sup> ]	Krysa ocas	0,02	0,02	0,2	1,705	2,479	4,395	7,375
	Krysa čistá	0,02	0,02	0,664	2,779	4,119	7,225	10,29
	<b>Průměr</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,432</b>	<b>2,242</b>	<b>3,299</b>	<b>5,81</b>	<b>8,8325</b>

**Tabulka 2.** Naměřené objemy nádorů u obou kontrolních krys a jejich průměr.

Kontrola								
	Den	0	3	7	10	14	17	21
Objem nádoru [cm <sup>3</sup> ]	Krysa ocas	0,02	0,422	1,288	7,514	10,26	13,178	15,841
	Krysa čistá	0,02	0,512	0,664	2,948	4,298	9,553	11,899
	<b>Průměr</b>	<b>0,02</b>	<b>0,467</b>	<b>0,976</b>	<b>5,231</b>	<b>7,279</b>	<b>11,3655</b>	<b>13,87</b>

Z naměřených objemů kontrolní a experimentální skupiny jsme vypočítali průměr a sestavili růstové křivky, které jsou v grafu 1.

### Vliv dvojrázů na růst lymfomu v podkoží lab. krys



Porovnáním růstových křivek v grafu 1. jsme zjistili, že růst nádoru u experimentální skupiny se sice nezastavil, ale byl o tři dny zpožděn v porovnání s kontrolní skupinou.

Výsledkem je tedy zjištění, že rázová vlna dokáže poškodit nádorové buňky exponované in vivo. Růst nádoru nebyl zastaven, ale zpomalen.

## 5. DISKUSE

Rázová vlna již 25 let slouží k léčbě ledvinových a žlučových kamenů. U nás se také podařilo vyvinout funkční lithotriktor, který využíval generátor s velmi dobrými parametry, sestrojený v Ústavu fyziky plazmatu AV ve spolupráci s 1. interní klinikou 1.LF UK v Praze. Výsledky v této oblasti vedly k úvahám o jiném využití rázových vln. Hlavní směr vede k léčbě nádorových onemocnění. Zde byly v experimentech využívány běžné generátory rázových vln, u nás byl však vyvinut zcela nový zdroj založený na principu mnohokanálového výboje na povrchu kompozitní anody. U tohoto zdroje lze v široké míře nastavovat amplitudu i časový průběh vlny. Později byla ještě tato kompozitní anoda rozdělena na dvě vzájemně oddělené části, které měly každá vlastní zdroj. Tímto generátorem je možno generovat dvě rázové vlny s krátkým časovým zpožděním a využívat tak jejich interakce, kdy druhá vlna vstupuje do prostředí s akustickými nehomogenitami, které vytvoří první vlna. Důležitou roli zde hrají také kavitace.

Výsledky obou experimentů ukazují, že interagující rázové vlny generované novým generátorem, jsou schopny vyvolat změny i v případě, že ohnisko leží v akusticky homogenním prostředí. V našem případě se jednalo o krysí játra a nádorové buňky aplikované kryse intradermálně do abdominální oblasti. Zjistili jsme, že rázová vlna dokáže vyvolat poškození jak v játrech, tak v nádoru. Což potvrzuje výsledky dosažené v experimentech publikovaných v článcích *Prat, F., et al. 1994 [30]* a *Beneš, J., et al. 2007 [26]*. Rázová vlna také dokáže dobře pronikat tkáněmi před ohniskem, aniž by způsobila jejich poškození, to se projevuje až v ohnisku. Ohnisko je přitom dobře ohraničeno, což jsme pozorovali u lézí v játrech. Podařilo se nám také prokázat, že rázová vlna je schopna poškodit stěnu žaludku, ta byla zeslabená, a z vnitřní části odpadala část sliznice.

Dosáhli jsme také zpoždění růstu nádoru u rázovaných krys v porovnání s kontrolní skupinou, což dokazuje, že rázová vlna je schopna interagovat s nádorovými buňkami.

K vyhodnocení účinků jsme použili snímky z magnetické rezonance, makroskopické zhodnocení, histologické preparáty u prvního pokusu a růstové křivky u pokusu druhého.

## 6. ZÁVĚRY

Ve své bakalářské práci jsem využil nový zdroj, založený na generování rázových vln pomocí mnohokanálového výboje. Jedním cílem bylo zjistit, jaké jsou biologické účinky tohoto generátoru rázových vln na tkáň pokusných zvířat, tedy in vivo a pozorování těchto účinků prostřednictvím magnetické rezonance a histologického vyšetření. Exponována byla játra dvou krys.

Zde jsem zjistil, že rázová vlna vyvolává poškození měkkých tkání v ohnisku, přičemž tkáň před dosažením ohniska jsou bez známky poškození. Lézi jsem detekoval na snímcích magnetické rezonance a poté i při pitvě rázovaných zvířat. Z poškozených míst byly odebrány vzorky k histologickému vyšetření, výsledky však nebyly zcela průkazné.

Dalším cílem bylo zjistit, jaký vliv mají rázové vlny na růst nádoru, a porovnat výsledky s kontrolní skupinou. Zde byl exponován nádor. Nádorové buňky byly aplikovány kryse intradermálně.

Zjistil jsem, že u rázovaných krys byl růst nádoru v porovnání s kontrolní skupinou o 3 dni zpožděn. Porovnání jsem provedl pomocí růstových křivek. Rázová vlna tedy dokázala opozdit růst nádoru, nedokázala ho však zcela zastavit.

Bylo by však dobré účinky rázové vlny, ať už na měkké tkáň, či na tkáň nádorovou, potvrdit dalšími experimenty. K experimentům by bylo lépe využít větší pokusné zvíře (např. králíka).

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

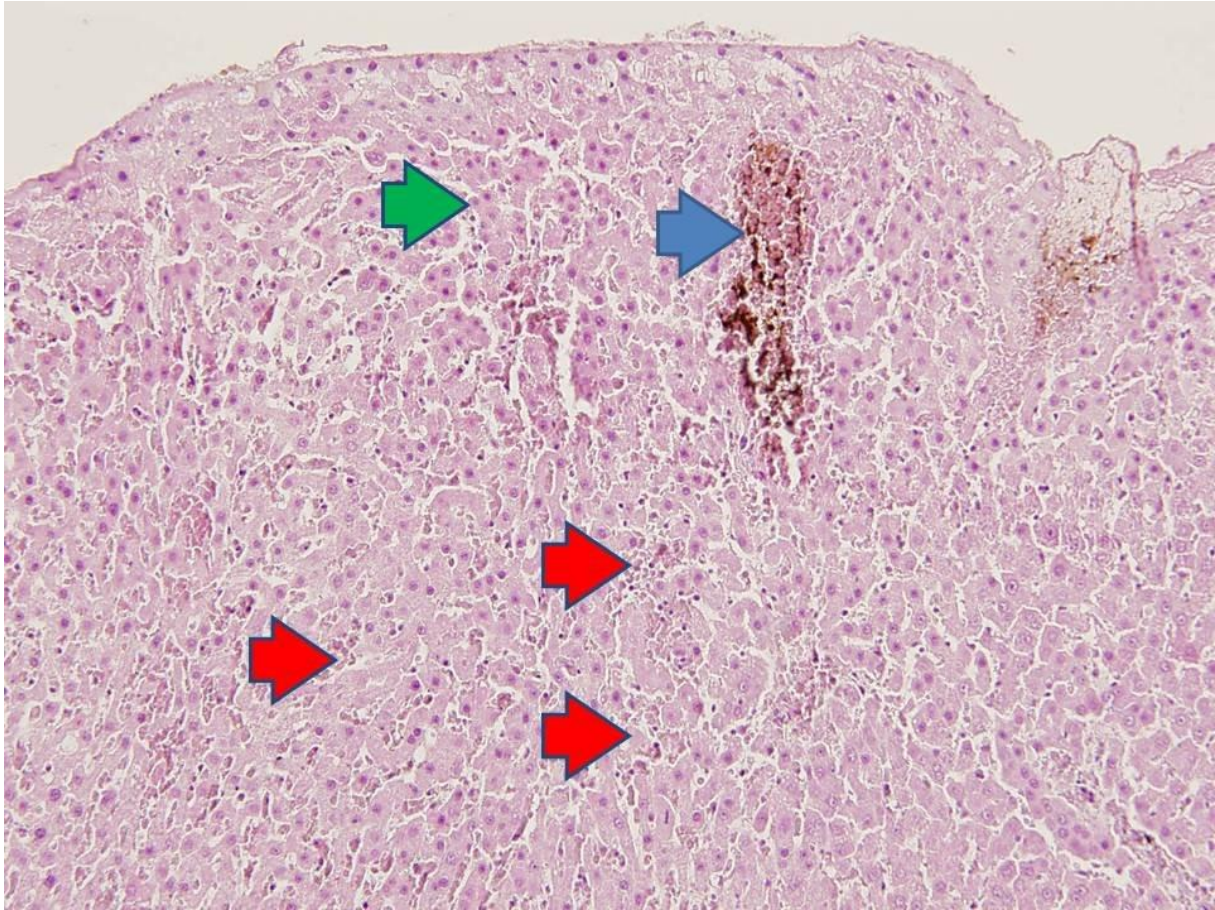
- [1] MORNSTEIN, Vojtěch. Ultrazvuk v biologii a medicíně. Vesmír. 1995, roč. 74, č. 10, s. 566. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanky/clanek/id/5114>>.
- [2] BENEŠ, Jiří. Zavedení nového litotryptoru do klinické praxe a neobvyklé aplikace rázových vln. Praha, 2000. 146 s. Universita Karlova 1. lékařská fakulta. Habilitační práce.
- [3] WILBERT, D. M. A comparative review of extracorporeal shock wave generation.. BJU-Int. . 2002, vol. 90, no. 5, s. 507-511.
- [4] COLEMAN, A.J., SAUNDERS, J.E. A review of the physical properties and biological effects of the high amplitude acoustic fields used in extracorporeal lithotripsy. Ultrasonics. 1993, vol. 31, no. 2, s. 75-89.
- [5] THIEL, M.: Application of shock waves in medicine. Clin Orthop. (2001): 18-21.
- [6] DVORÁČEK, J.: Urologie I. ISV nakladatelství Praha. (1998).
- [7] GRASSO, Michael. Extracorporeal Shockwave Lithotripsy. eMedicine [online]. 2008 . Dostupný z WWW: <<http://www.emedicine.com/med/TOPIC3024.HTM>>.
- [8] SAUERBRUCH, T. Extracorporeal shock wave lithotripsy. *Digestion*. 1997, vol. 58, no. 1, s. 98-100.
- [9] CO NOVÉHO V LÉČBĚ UROLITIÁZY, MUDr. Pavel Rajmon Urologická klinika FN Olomouc Interní medicína – mezioborové přehledy 2003 / 1 str.4, 5, [www.solen.cz](http://www.solen.cz)
- [10] BENEŠ, J., et al. Působení rázové vlny na implantovanou kyčelní náhradu (předběžné sdělení). Sborník lékařský. 2001, roč. 102, č. 1, s. 37-40.
- [11] ŠUNKA, Pavel. Impulzní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně. Dostupný z WWW: <<http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/8.pdf>>.
- [12] BENEŠ, Jiří, et al. První experimentální poznatky o narušování žlučových kamenů fokusovanou rázovou vlnou. *Čas. Lék. čes.*. 1986, roč. 125, č. 14, s. 433-435.
- [13] BENES JIRI (CS); KORDAC VACLAV (CS); (+6). Device for hepatoolithes impairment. CS251199. Česká republika. Patentový spis. 1987-06-11.
- [14] BENEŠ, Jiří, et al. Preclinical verification of possible extracorporeal lithotripsy of gall stones in experimental animals. *Sborník lékařský*. 1987, roč. 89, č. 5, s. 129-133.
- [15] BENEŠ, J., et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy of gallstones with oral dissolution. Results in course of ten years in Czech Republic in correlation to indication criteria.. Sbornik lekarsky. 2001, vol. 102, no. 1, s. 17-22.

- [16] BENEŠ Jiří, Šunka Pavel, Kordač Václav, Bárta Zbyšek, Štuka Čestmír, Figura Zdeno, Jirsa Milan. Zařízení pro klinické provádění mimotělní lithotripsie žlučových kamenů. 261485. ČR. A61B17/22. 1990-01-02.
- [17] BENEŠ, Jiří, et al. První zkušenosti s ČSL. zařízením k léčbě ledvinových kamenů litotripsíí rázovou vlnou. *Prakt. Léč.*. 1989, roč. 69, č. 23, s. 884-887.
- [18] BENEŠ, Jiří, et al. Léčba ledvinových kamenů litotrypsíí rázovou vlnou se sonografickým zaměřením. *Sborník lékařský*. 1991, roč. 93, č. 9-10, s. 293-299.
- [19] SUNKA PAVEL DOC ING CSC (CZ); BABICKY VACLAV RNDR (CZ); (+3). Generation method of focused shock wave by electric discharge in a liquid and apparatus for making the same. CZ20001513. Česká republika. Patentový spis. 2002-08-14.
- [20] UNIV KARLOVA (CS). Method and apparatus for adjusting the spark gap of a non-invasive lithotripter.. SUNKA PAVEL; BABICKY VACLAV RNDR; (+5). EP0349915. Česká republika. Patentový spis. 1990-01-10.
- [21] SUNKA PAVEL DOC ING CSC (CZ); BABICKY VACLAV RNDR (CZ); (+2). Method of generating spacious corona discharge in water and apparatus for making the same. CZ9601596. Česká republika. Patentový spis. 1997-08-13.
- [22] SUNKA, P., et al. Potential applications of pulse electrical discharges in water. *Acta physica slovacica*. 2004, vol. 54, no. 2, s. 135-145.
- [23] STELMASHUK, V., ŠUNKA, P. Mutual interaction of two shock waves with a different time delay. *Czechoslovak Journal of Physics*. 2006, Vol. 56, s. B396-B400. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/ap15j125444350j6/>>.
- [24] BENEŠ, J., ŠUNKA, P., HANI, A. B. Sledování hemolýzy po působení rázové vlny vytvořené novou metodou pomocí mnohakanálového výboje. *Sborník lékařský*. 2001, roč. 102, č. 1, s. 29-35.
- [25] BENEŠ, J., et al. Biologické účinky interagujících rázových vln. Modelová studie účinků IRV s využitím stanovení hemolýzy erytrocytů.. *Sborník lékařský*. 1997, roč. 98, č. 4, s. 277-282.
- [26] BENEŠ, J., et al. Biological Effects of Two Successive Shock Waves Focused on liver tissues and melanoma cells. *PHYSIOLOGICAL RESEARCH*. 2007, Vol. 56, s. S1-S4. Dostupný z WWW: <<http://www.biomed.cas.cz/physiolres>>.
- [27] LINGEMAN, J. E. SOUČASNOST EXTRAKORPORÁLNÍ LITOTRYPSE. *Urologické listy*. 2004, č. 2, s. 5-11.
- [28] SHIMA, A. Studies on bubble dynamics. *Shock Waves*. 1997, no. 7, s. 33-42.

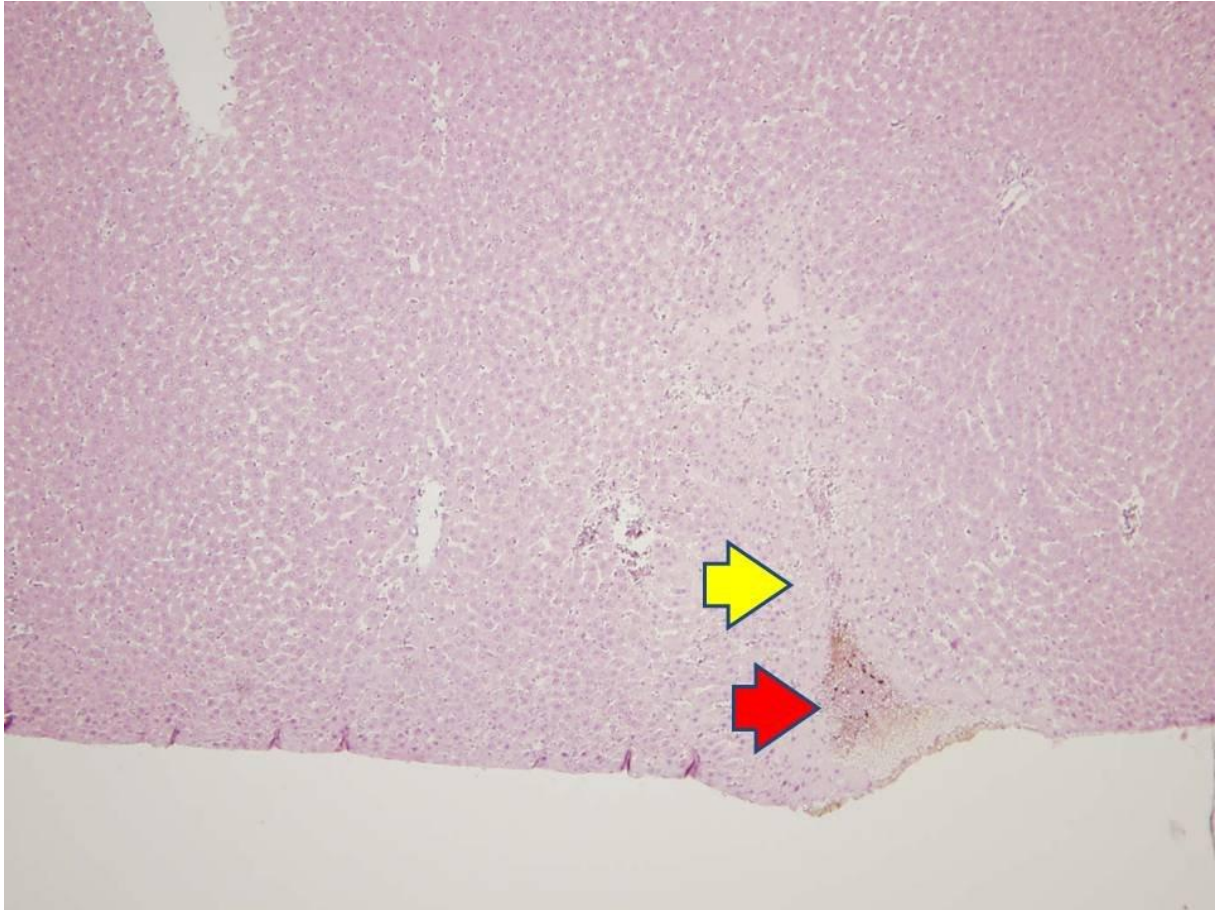
- [29] McCLURE, Scott, DORFMÜLLER, Christian. Extracorporeal Shock Wave Therapy: Theory and Equipment. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2003, vol. 2, no. 4, s. 346-357.
- [30] PRAT, F., et al. Focused liver ablation by cavitation in the rabbit: a potential new method of extracorporeal treatment. *Gut*. 1994, no. 35, s. 395-400.

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1 Příloha 1



**Příloha 1a.** Ložisková hemoragie (modrá šipka), s překrvením jaterních sinusů (červené šipky) a regresivní změny hepatocytu (zelená šipka). Zvětšeno 200x.



**Příloha 1b.** Ložisková subkapsulární hemoragie (červená šipka), s regresivními změnami hepatocytu (žlutá šipka). Zvětšeno 100x.