

Received: 2007.02.05
Accepted: 2007.04.25
Published: 2007.06.01

Ultradźwięki – mechanizmy działania i zastosowanie w terapii sonodynamicznej

Ultrasound – mechanisms of action and application in sonodynamic therapy

Katarzyna Miłowska

Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Ultradźwięki są to fale sprężyste o częstotliwościach niesłyszalnych dla człowieka. W naturze ultradźwięki o małych częstotliwościach są emitowane i odbierane przez wiele zwierząt (m.in. nietoperze i delfiny). Jednakże dla człowieka bardziej interesujące są ultradźwięki wytwarzane sztucznie, które mogą być wykorzystane do celów praktycznych. Szerokie możliwości stosowania ultradźwięków w technice, technologii przemysłowej, i w urządzeniach użytku powszechnego stwarzają ryzyko zagrożenia dla zdrowia człowieka, gdyż ultradźwięki w dużych dawkach mogą na niego niekorzystnie działać. Człowiek może być również narażony na ultradźwięki powstające w czasie zastosowań medycznych, głównie w diagnostyce ultradźwiękowej, oraz podczas leczenia i zabiegów chirurgicznych. Ryzyko zagrożenia dla zdrowia, jakie istnieje skłania naukowców do podejmowania badań nad skutkami i mechanizmami ich biologicznego działania. Oddziaływanie ultradźwięków z materią można podzielić na termiczne i nietermiczne. Efekt termiczny występuje, gdy energia akustyczna pochłaniana przez materię przekształca się w ciepło i jest zależny od absorpcji. Efekty nietermiczne można sklasyfikować jako kawitacyjne i naprężenia. Naprężenia obejmują następstwa spowodowane przez ciśnienie ultradźwięków, siłę przemieszczenia i przepływy akustyczne. Szczególnie interesujące wydaje się zjawisko kawitacji prowadzące do powstania reaktywnych form tlenu oraz ich konsekwencje. Opierając się na koncepcji fotodynamicznej terapii nowotworowej w latach siedemdziesiątych XX wieku powstała idea sonodynamicznej terapii nowotworowej. Terapia sonodynamiczna jest nową obiecującą techniką niszczenia komórek nowotworowych opartą na synergistycznym efekcie wywołanym połączeniem oddziaływania pewnych związków chemicznych zwanych „sonouczulaczami” i ultradźwięków. Pomimo doświadczonego wykazania istnienia efektu sonodynamicznego, nie udało się jeszcze określić jednoznacznie mechanizmu tego procesu.

Słowa kluczowe:

ultradźwięki • kawitacja • terapia sonodynamiczna • sonouczulacze • efekt synergistyczny

Summary

Ultrasound is a mechanical wave at a frequency beyond human hearing. In nature, ultrasound waves of low frequency are emitted and received by many animal species. However, people are interested in ultrasound which is artificially produced because of its possible practical applications. The wide spectrum of ultrasound (US) application in industrial technology and devices of general use poses a risk to human health because ultrasound in high doses can be harmful. People can also be exposed to ultrasound generated during medical treatment, mainly in ultrasound diagnostics and therapy as well as surgery. The possible risk to human health creates the need for investigation of the effects and mechanisms of its biological activity. The mechanisms of ultrasound action on biological material can be divided into thermal and nonthermal. Thermal effects

occur when acoustic energy is absorbed and transformed to heat and depends on the absorption and dissipation of ultrasound energy. Nonthermal mechanisms can be classified as cavitation and shear stress. Shear stress includes the effects of the radiation pressure, radiation force, and acoustic streaming. Cavitation leading to the formation of reactive oxygen species and its consequences are of primary interest. To support photodynamic cancer therapy in the 1970s, the idea of sonodynamic cancer therapy was formulated. Sonodynamic therapy is a promising new technique for killing cancer cells based on the synergistic interactions of ultrasound and certain chemical compounds called "sonosensitizers". In spite of the experimental proof of the existence of the sonodynamic effect, attempts of a clear qualification of the mechanism of this process have been unsuccessful.

Key words: ultrasound • cavitation • sonodynamic therapy • sonosensitizers • synergistic effect

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10519.pdf

Word count: 4792

Tables: –

Figures: 3

References: 101

Adres autorki: dr Katarzyna Miłowska, Katedra Biofizyki Ogólnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: miłowska@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **3H-dth** – tymidyna; **CHO** – komórki jajnika chomika chińskiego; **HeLa** – linia komórek nabłonkowych człowieka pochodzących z raka szyjki macicy; **HL-60** – komórki białaczki człowieka; **I_{SATA}** – chwilowe średnie natężenie średniego obszaru; **SDT** – sonodynamiczna terapia nowotworowa; **US** – ultradźwięki; **Walker 256** – linia komórkowa mięsaka szczura.

ZASTOSOWANIE ULTRADŹWIĘKÓW

Ultradźwięki ze względu na specyfikę oddziaływań z materią znajdują szerokie zastosowanie w technice, przemyśle i medycynie. Obejmują one bierne i czynne działanie ultradźwięków na środowisko, w którym się rozchodzą. Spośród biernych zastosowań jako najważniejsze wymienią się defektoskopię ultradźwiękową, hydrolokację oraz niezwykle istotną we współczesnej medycynie diagnostykę ultradźwiękową. Bierne zastosowanie polega na wytwarzaniu i detekcji fal ultradźwiękowych o takich natężeniach, które nie niszczą struktury badanego ośrodka. Każda zmiana stanu lub właściwości ośrodka powoduje zmianę warunków rozchodzenia się w nim fali akustycznej (zmiana prędkości fali i straty jej amplitudy lub energii). Ocenę zmian parametrów pola akustycznego wykorzystuje się w badaniach właściwości i struktury różnych ciał. Ultradźwięki w badaniach strukturalnych stosuje się przede wszystkim w defektoskopii do wykrywania niejednorodności makroskopowych lub wad materiałowych. Metody te mogą być stosowane do kontroli jakości metali i ich stopów, materiałów ceramicznych, tworzyw sztucznych, betonu, drewna, skał itp. [65,66,73].

Jednym z najstarszych (1917 r.) zastosowań ultradźwięków jest konstrukcja echosondy hydrolokacyjnej do wykrywania przeszkód morskich. Od tego czasu echosondy instaluje się na statkach jako urządzenia do detekcji obiektów podwodnych (skał, gór lodowych), dna (kontrola głębokości) oraz innych przeszkód nawigacyjnych (statki czy łodzie podwodne). Obecnie, gdy zwiększyła się dokładność urządzeń hydroakustycznych można rejestrować co-

raz mniejsze obiekty w toni wodnej, takie jak ławice ryb a nawet pojedyncze ryby [73].

W dziale czynnych zastosowań wykorzystuje się ultradźwięki o średnich i dużych natężeniach wywołujące zmiany fizyczne, chemiczne i biologiczne w nadźwiękowanym obiekcie. Czynne działania ultradźwięków są związane z efektami nieliniowymi, które w wyniku powstawania dużych sił lokalnych w polu ultradźwiękowym prowadzą do procesów wywołujących zwykle nieodwracalne zmiany makroskopowe ośrodka. Ważną rolę odgrywają tutaj procesy kawitacji i wywoływania reakcji chemicznych, koagulacji i dyspergowania ultradźwiękowego. Działanie chemiczne i dyspergujące jest wykorzystywane w myjkach ultradźwiękowych, za pomocą których usuwa się niepożądane substancje zanieczyszczające dany obiekt. Zanieczyszczenia te nie mogą być usunięte podczas zwykłego mycia lub szorowania a ich rozmiary często są mikroskopowe. Od wielu lat stosuje się ultradźwięki o dużych natężeniach do plastycznej obróbki materiałów twardych i kruchych oraz w procesach lutowania, spajania metali i wielu innych [41,48,78].

ULTRADŹWIĘKI W MEDYCYNIE

Ultradźwięki oprócz wielu zastosowań w technice i przemyśle znalazły również szerokie zastosowania w medycynie [28]. Wykorzystuje się zarówno bierne (w diagnostyce medycznej), jak i czynne (w terapii medycznej) działanie ultradźwięków [33]. W diagnostyce medycznej ultradźwięki są stosowane na całym świecie od pół wieku. Przez ten czas różnorodne techniki diagnostyczne rozwijano w celu

licznych zastosowań klinicznych. Należy podkreślić, że nie zaobserwowano niekorzystnych efektów będących wynikiem działania ultradźwięków zarówno u pacjentów, jak i operatorów aparatów ultradźwiękowych. Jest to zgodne z obecnym stanem wiedzy na temat interakcji ultradźwięków z tkankami biologicznymi, obejmującymi termiczne i nietermiczne mechanizmy. Chociaż istnieje możliwość, że niektóre działania mogą być zidentyfikowane w przyszłości, obecne wyniki wskazują, że przy rozsądnym zastosowaniu ultradźwięków w diagnostyce korzyści przeważają nad ryzykiem, jeśli w ogóle takie istnieje [8].

Podstawą wykorzystania ultradźwięków w diagnostyce medycznej jest to, że fale ultradźwiękowe rozchodzące się w tkankach miękkich mogą dostarczyć informacji o geometrycznym rozkładzie tkanek, ich strukturze, a także ich ruchu. Informacje o strukturze i czynności ruchowej narządów uzyskuje się na podstawie odbicia wiązki fal ultradźwiękowych (efekt echa) od różniących się własnościami struktur tkankowych lub zmiany ich częstotliwości (efekt Dopplera) od ruchomych części narządów w penetrowanym obiekcie. Fala przechodząca przez badany obszar jest częściowo odbijana, a częściowo pochłaniana przez tkanki. Ze stosunku energii fali pochłoniętej do odbitej można uzyskać wiele cennych informacji o tkankach zdrowych i zmienionych patologicznie. Większość medycznych zastosowań diagnostycznych wykorzystuje ultradźwięki w zakresie częstotliwości 0,3–15 MHz, z wyjątkiem badań okulistycznych, w których stosuje się częstotliwości aż do 30 MHz [68,86].

W ciągu ostatnich lat ultrasonografia stała się rutynową procedurą diagnostyczną w wielu dziedzinach medycyny, a niekiedy jest jedynym źródłem informacji diagnostycznej. Pozwala ona uzyskać w sposób nieinwazyjny informacje o kształcie, wielkości i położeniu narządów, czy przestrzeni anatomicznej, a także pozwala ocenić powierzchnię i wnętrze tych narządów w organizmie człowieka. Z technicznego punktu widzenia badanie polega na wysyłaniu fali ultradźwiękowej, która odbita od narządów powraca do urządzenia detekcyjnego, skąd po przetworzeniu trafia na ekran monitora w postaci obrazu [10,24,90,101]. W wielu przypadkach w celu poprawienia jakości obrazów wprowadza się do badanego obiektu czynnik kontrastowy. W przypadku technik dopplerowskich czynnikiem kontrastowym mogą być mikropełcherzyki gazu, od których uzyskuje się silniejsze sygnały echa ultradźwiękowego i w ten sposób kontrast badanego obiektu znacznie się zwiększa. Wstrzykiwanie kontrastu umożliwia także łatwiejsze i skuteczniejsze wykrywanie metodami ultrasonograficznymi tkanek patologicznych [25,79].

Czynne działanie ultradźwięków na żywe organizmy i tkanki biologiczne wywołuje liczne nieodwracalne lub utrzymujące się stosunkowo długo efekty, które zależą przede wszystkim od natężenia ultradźwięków i czasu ich działania. Terapeutyczne następstwa działania ultradźwięków zależą w dużej mierze od zdolności tkanki do pochłaniania energii. Absorpcji energii ultradźwiękowej towarzyszy wydzielanie się ciepła, dlatego korzystnym skutkiem działania ultradźwięków jest wybiórcze nagrzewanie obszarów wymagających ogrzania. Ultradźwięki o niezbyt dużych natężeniach (2–3 W/cm²) i częstotliwościach (ok. 800 kHz) wywołują swego rodzaju mikromasaż elementów tkanek, powodując lokalne przekrwienia i zmiany

limfatyczne korzystne w terapii niektórych schorzeń np. reumatycznych. Jednakże duże przegrzania na skutek absorpcji, a także w przypadku zaistnienia kawitacji, mogą powodować uszkodzenia lub zniszczenie struktur biologicznych [17,47,83].

W fizykoterapii ultradźwiękowej znajdują najczęściej zastosowanie ultradźwięki o częstotliwościach z zakresu od 750 kHz do około 3 MHz [72].

Stosując ciągłą falę ultradźwiękową przy dynamicznej technice zabiegu wyróżnia się natężenia:

- słabe do 0,5 W/cm²,
- średnie 0,5–1,5 W/cm²,
- mocne 1,5–2,0 W/cm².

Im natężenie jest większe, tym czas zabiegu powinien być krótszy i na ogół waha się od 1 do 10 min [50].

Ultradźwięki mogą być stosowane również w leczeniu ran. Pobudzają regenerację tkanek i przyspieszają gojenie się ran, które jest zależne od poprawy ukrwienia i pobudzenia metabolizmu. Coraz częściej stosuje się też zabiegi zwane sonoforezą (ultrasonoforezą). Polega ona na wprowadzaniu leku przez skórę za pomocą energii ultradźwiękowej. Ogrzanie ultradźwiękami zwiększa energię kinetyczną cząsteczek leku oraz cząsteczek błony komórkowej, działa rozszerzająco na drogi przenikania oraz zwiększa ukrwienie w miejscu działania, co wspomaga przenikanie leku [12,13,61].

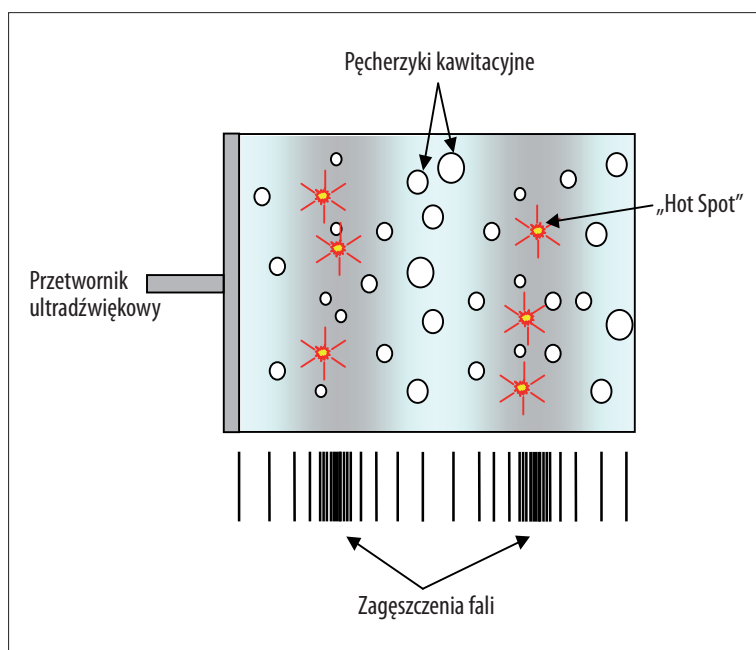
Wykorzystanie ultradźwięków w chirurgii jest związane z działaniem ultradźwięków jako narzędzia chirurgicznego do cięcia tkanki oraz niszczeniem tkanek w wyniku skupienia energii w zlokalizowanym obszarze (np. w gałce ocznej). Szczególnie przydatne są ultradźwięki do rozkruszania kamieni nerkowych (i innych) tzw. litotrypsja bez konieczności wykonywania zabiegu operacyjnego [71]. W metodzie tej stosuje się fale wstrząsowe generowane poza ciałem pacjenta, a następnie skupiane na kamieniu w celu rozbicia go. Fragmenty kamienia są wydalane z nerki wraz z moczem. Właściwości destrukcyjne ultradźwięków wykorzystuje się również w stomatologii do niszczenia kamienia nazębnego, w laryngologii w celu upłynnienia treści zatok oraz w celu udrażniania naczyń krwionośnych [16]. W ostatnich latach badana jest możliwość wykorzystania ultradźwięków w terapii nowotworowej, co zostanie dokładniej opisane w kolejnych rozdziałach.

MECHANIZMY DZIAŁANIA ULTRADŹWIĘKÓW

Jednym z mechanizmów działania ultradźwięków o potencjalnym znaczeniu biologicznym jest mechanizm termiczny, gdyż energia akustyczna pochłaniana przez materię przekształca się w ciepło. Efekt termiczny jest zależny od absorpcji i rozpraszania energii ultradźwiękowej. Poza działaniem termicznym przechodzenie fali ultradźwiękowej wywołuje wiele działań nietermicznych, które można sklasyfikować jako kawitacyjne i naprężenia [5,57,67,71].

Mechanizm termiczny

W procesie oddziaływania ultradźwięków z materią część energii zostaje zaabsorbowana i ulega przekształceniu w cie-



Ryc. 1. Zjawisko kawitacji w cieczy; „hot spot” – „gorące plamki” – miejsca o lokalnie podwyższonej temperaturze i ciśnieniu, generujące fale uderzeniowe

pło. Przyrost temperatury będący wynikiem tego procesu zależy od ilości zaabsorbowanej energii, a więc natężenia ultradźwięków i ich częstotliwości, od ciepła właściwego ośrodka oraz od równowagi dynamicznej między gromadzeniem a oddawaniem ciepła [3,10,59].

W leczniczych zastosowaniach ultradźwięków pochłanianie energii i wytworzenie ciepła w tkankach są zwykle skutkami pożądanymi. Efekty leczenia zależą od podwyższenia temperatury tkanek. Ciepło generowane jest przede wszystkim w tkankach o wysokim współczynniku absorpcji np. w kościach, ścięgnach, w tkance nerwowej i w mięśniach. Zjawisko to jest bardzo ważne zwłaszcza na granicy ośrodków o różnej impedancji akustycznej. Wzrost temperatury na granicy mięsień–kość jest 2–4 razy większy niż w samych mięśniach przy tych samych warunkach ekspozycji. Na granicach tych tkanek występuje największe nagromadzenie energii, które jest wynikiem odbicia fal ultradźwiękowych. Wiadomo również, że wytworzone ciepło zwiększa energię kinetyczną poszczególnych składników błony komórkowej tj. białek, lipidów i węglowodanów, wpływając na zmiany jej przepuszczalności [4,10,17,91].

Oprócz pożądaných działań termicznych w niektórych działach medycyny istnieje również ryzyko, że wzrost temperatury może prowadzić do uszkodzeń tkanek, a nawet do natychmiastowej śmierci komórek [83]. Badania hipertermii na zwierzętach wskazują, że uszkodzenia tkanek zależą od temperatury, czasu ekspozycji oraz typu i wrażliwości tkanki [9]. Dlatego bardzo ważne jest zastosowanie w diagnostyce medycznej takich dawek ultradźwięków, które nie powodują wzrostu temperatury mogącej szkodzić.

Mechanizmy naprężenia

W układach biologicznych narażonych na działanie ultradźwięków pojawiają się naprężenia, czyli siły będące wynikiem działania pola ultradźwiękowego na te układy. Wielkość naprężeń i efekty biologiczne wywołane przez

te siły zależą od właściwości pola ultradźwiękowego i od właściwości układu biologicznego. Liczne skutki w układach komórkowych *in vitro* mogą być spowodowane przez siły zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki, które mogą działać za pośrednictwem mechanizmów naprężeniowych. Do naprężeń można zaliczyć:

- siły pławne o charakterze oscylacyjnym, które wywierają ciśnienie ultradźwiękowe na ciała o gęstości różnej od gęstości otaczającego go ośrodka,
- siły przemieszczenia, które mogą wywoływać względny ruch pomiędzy obiektem biologicznym lub innym ośrodkiem niejednorodnym a ośrodkiem otaczającym,
- siły związane ze zmianą lepkości, wynikiem czego jest akustyczny przepływ strumieniowy.

Pole ultradźwiękowe rozchodzące się w płynie może powodować skręcanie lub wirowanie zawieszonych elementów. W przypadku działania ultradźwiękami na komórki, struktury komórkowe lub makromolekuły o asymetrycznych kształtach następuje obrót obiektów. Dążą one do przyjęcia takiego położenia, w którym siła obrotowa jest jak najmniejsza. Naprężenia związane z przepływem strumieniowym mogą powodować zmianę ładunku powierzchni komórki, zmianę przepuszczalności błony komórkowej, przerwanie i fragmentację błony komórkowej i inne [6,22].

Mechanizmy kawitacyjne

Procesy kawitacyjne obejmują nieinercyjną (wcześniej zwaną trwałą) i inercyjną (wcześniej zwaną przejściową) kawitację. Oba rodzaje kawitacji stanowią ważne mechanizmy biologicznego działania ultradźwięków. W wielu przypadkach obydwa rodzaje kawitacji występują jednocześnie, ale w pewnych sytuacjach pojawia się tylko kawitacja nieinercyjna [5,42].

Zjawisko kawitacji polega na powstawaniu w cieczy pulsujących pęcherzyków próżniowych lub wypełnionych parą nasyconą lub gazem rozpuszczonym w cieczy, które poja-

wiąją się w wyniku lokalnych rozerwania ośrodka pod wpływem dużych sił rozciągających (ryc. 1). Pęcherzyki kawitacyjne mogą rozrastać się i pulsować w sposób wymuszony w następnych fazach fali ultradźwiękowej (kawitacja nieinercyjna) lub zapadać się w fazie zagęszczenia fali, wytwarzając nagłe zmiany ciśnienia, będące źródłem lokalnych fal uderzeniowych (kawitacja inercyjna), a także w określonych warunkach powodować powstawanie krótkotrwałych lokalnych błysków sonoluminescencyjnych. Procesy powstawania i zapadanie się pęcherzyków były rejestrowane za pomocą ultraszybkiej fotografii i wykazały olbrzymie bogactwo form ruchu oraz aktywnego oddziaływania w cieczy i na powierzchniach granicznych [18]. Zaobserwowano, że pęcherzyki ulegają deformacji do postaci lejkowatych wirów skierowanych końcówką do powierzchni granicznej ciecz/ciało stałe, powodując przyspieszenie procesów korozyjnych i erozyjnych ciał stałych [5].

Warunkiem koniecznym wystąpienia kawitacji w roztworze jest osiągnięcie i przekroczenie pewnego progu natężenia ultradźwięków, tzw. progu kawitacji. Wartość ta zależy od rodzaju cieczy i częstotliwości oraz od obecności w cieczy cząsteczek gazu i mikroskopijnych zanieczyszczeń, które stanowią podłoże powstawania pęcherzyków kawitacyjnych [15,18,89].

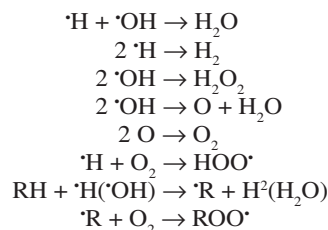
Kawitacja nieinercyjna zawiera różne typy akustycznie indukowanej aktywności pęcherzyków gazowych. Przykładami tej aktywności są: przejściowe ruchy wolnych pęcherzyków, zniekształcenia powierzchni (powstawanie strumieni cieczy i gazowych mikropęcherzyków), wzrost pęcherzyków w wyniku dyfuzji lub przez łączenie się, wyzwalamie ciepła i akustyczne przepływy gazu wewnątrz cieczy i na zewnątrz zwane mikroprzepływami [5,42]. Pęcherzyki kawitacyjne, gdy osiągną odpowiednie rozmiary, wpadają w rezonans z drganiami fali ultradźwiękowej i oscylują. Oscylacje warstwy granicznej powietrze-ciecz na powierzchni pęcherzyka kawitacyjnego wywołują ruch wirowy w bezpośrednio przylegającej cieczy. Tak powstały przepływ wirowy nazywany jest ruchem mikrostrumieniowym, który charakteryzuje się wysokim gradientem prędkości. Gdy komórki zawieszona w cieczy znajdują się w pobliżu pulsującego pęcherzyka mogą zostać wciągnięte w obszar wysokiego gradientu prędkości. Wtedy pęcherzyk oscylujący wokół błony komórkowej wywołuje jej drgania i doprowadza do ruchów strumieniowych w komórce. W wyniku tych procesów komórka jest poddawana działaniu naprężeń ścinających, które mogą powodować jej uszkodzenia [75]. Przepływ strumieniowy może powodować zmiany względnych pozycji organelli wewnątrzkomórkowych oraz przerwy w strukturach cytoplazmatycznych. Oscylujące pęcherzyki kawitacyjne mogą również powodować przepływ mikrostrumieniowy w tkankach. Miller i wsp. [57] wykazali, że liza komórek jest związana z kawitacją i sugerowali, że ultradźwięki indukując siły ścinające w pierwszej kolejności uszkadzają błony komórkowe.

W przeciwieństwie do kawitacji nieinercyjnej kawitacja inercyjna występuje przy wyższych natężeniach ultradźwięków i ma bardziej burzliwy charakter. Pęcherzyki kawitacyjne pod wpływem działania pola ultradźwiękowego zwiększają swój promień dwukrotnie lub więcej, a następnie gwałtownie się zapadają. Zapadaniu się pęcherzyków

kawitacyjnych towarzyszy uwolnienie dużej ilości energii, która musi być rozproszona w skrajnie małej objętości, co przejawia się lokalnym skokiem temperatury i ciśnienia. Gwałtowny wzrost ciśnienia we wnętrzu pęcherzyków powoduje ich pęknięcie i powstawanie hydrodynamicznej fali uderzeniowej, która niszczy struktury biologiczne znajdujące się w jej zasięgu. Te ekstremalne warunki przyczyniają się do termicznego rozpadu cząsteczek wody w wyniku, którego powstają atomy wodoru i rodniki hydroksylowe [27,71].



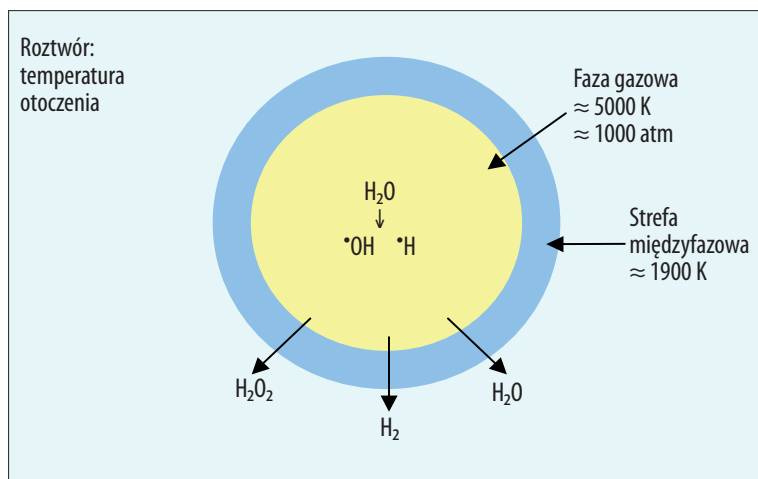
Rodniki te mogą reagować ze sobą lub cząsteczkami rozpuszczonymi w cieczy zapoczątkowując reakcje łańcuchowe, których produkty są niejednokrotnie bardziej toksyczne. Atomy wodoru i rodniki hydroksylowe wchodząc ze sobą w reakcje prowadzą do powstania H_2 , H_2O_2 , H_2O lub atakują rozpuszczone cząsteczki, które są redukowane lub utleniane [7]. Nadźwiękawianie w obecności tlenu prowadzi do generowania atomów tlenu. Atomy wodoru reagują z cząsteczkami tlenu tworząc rodnik $\text{HOO}\cdot$, kwasową postać anionorodnika ponadtlenkowego. Następnym tego są często chemiczne oddziaływania tych rodników z substancjami organicznymi znajdującymi się w roztworze lub biomakromolekułami, co prowadzi do zmiany właściwości tych związków lub zmian w biomakromolekułach [15,42,71].



Reakcje inicjowane przez kawitację mogą występować w trzech różnych obszarach (ryc. 2). Pierwszym obszarem jest wnętrze zapadającego się pęcherzyka kawitacyjnego, w którym panują ekstremalne warunki temperatury (kilka tysięcy stopni K) i ciśnienia (kilkaset atmosfer). W wyniku termicznej dysocjacji wody powstają rodniki hydroksylowe i atomy wodoru, które mogą reagować z substancjami obecnymi w fazie gazowej.

Drugim obszarem jest granica faz gaz-ciecz, czyli obszar pomiędzy zapadającym się pęcherzykiem kawitacyjnym a rozpuszczalnikiem, gdzie nadal jest wysoka temperatura i ciśnienie. W tych warunkach nawet mało lotne substancje ulegają pirolizie. Skuteczność termicznego rozkładu rozpuszczonych nielotnych substancji w tym obszarze zależy od ich hydrofobowości, która określa ich zdolność do akumulowania się na granicy faz gaz-ciecz oraz energii aktywacji potrzebnej do rozerwania wiązania. Im większa hydrofobowość roztworu i niższa energia aktywacji, tym więcej powstaje produktów termicznego rozkładu.

W trzecim obszarze, którym jest roztwór o temperaturze otoczenia, wolne rodniki powstałe w pęcherzykach kawitacyjnych, które nie weszły w reakcję w strefie granicznej reagują z substancją rozpuszczoną w roztworze dając produkty podobne do tych obecnych w radiolizie wody [7,71].



Ryc. 2. Obszary reakcji sonochemicznych

Ponadto w roztworze może zachodzić mechanochemiczna degradacja makrostruktur. Proces ten jest wynikiem sił ścinających generowanych wokół zapadających się pęcherzyków kawitacyjnych. Hydrodynamiczne ścinanie nie ma znacznego wpływu na małe cząsteczki, ale jest zdolne uszkodzić makrocząsteczki np. rozzerwać łańcuchy polimerów [74].

WPLYW ULTRADŹWIĘKÓW NA KOMÓRKI I UKŁADY BIOLOGICZNE

Badanie skutków działania ultradźwięków na układy biologiczne prowadzono zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Skutki działania ultradźwięków na wyizolowane komórki niekoniecznie muszą być takie same, jak skutki oddziaływania na nienaruszoną tkankę lub organizm. Jednakże badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów działania mogą być łatwiej wykonane i ocenione, gdy stosuje się zawiesiny komórkowe, a nie całe organizmy, gdyż eliminuje się liczne niepodlegające kontroli zmienne biologiczne.

Ultradźwięki o dostatecznie dużych natężeniach są w stanie wywoływać kawitację mogącą rozbić całkowicie mikroorganizmy, wirusy, bakterie oraz komórki zwierzęce i roślinne. Jednym z pierwszych opisanych efektów działania ultradźwięków była liza czerwonych krwinek (hemoliza) [29]. Obecnie hemoliza jest dość dobrze przebadanym zjawiskiem, zarówno w erytrocytach człowieka, jak i innych ssaków. Wiadomo, że poziom hemolizy w erytrocytach zależy od wielu czynników. Miller i Bataglia [53] wykazali, że rozmiar komórek wpływa znacząco na hemolizę indukowaną przez ultradźwięki. Komórki o większych rozmiarach są bardziej podatne na hemolizę [1]. Niedawno badania przeprowadzone przez Millera i wsp. [14,54,55,56] wykazały zależność hemolizy powodowanej przez ultradźwięki (w zakresie MHz) od rozmiaru komórek, stężenia rozpuszczonego tlenu, toniczności medium i długości impulsu. Konkluzja z tych badań była taka, że siły ścinające indukujące cytolizę były dominującym mechanizmem powodującym uszkodzenia w zastosowanych warunkach eksperymentów. Liza komórek jest wynikiem działania hydrodynamicznego ścinania lub kawitacji inercyjnej.

Prowadzenie badań nad subletalnymi efektami jest ciągle bardzo ważne z biologicznego punktu widzenia. Efekty te mogą być spowodowane np. oscylującymi pęcherzykami

kawitacyjnymi lub pośrednio, działaniem wolnych rodników. Skutki obserwowane w komórkach poddanych działaniu ultradźwięków obejmują zmiany w błonie komórkowej, zmiany właściwości wzrostu komórek, modyfikacje dróg syntezy makrocząsteczek i ultrastruktury komórkowej, uszkodzenia DNA i inne.

Błona komórkowa jest pierwszą barierą, która oddziela środowisko zewnętrzne od wnętrza komórki. A zatem fale ultradźwiękowe i substancje powstające w polu ultradźwiękowym mogą oddziaływać z warstwą lipidową, czego skutkiem są zmiany w strukturze chemicznej i funkcjonowaniu błon biologicznych. Wielu badaczy opisało zmiany czynnościowe wywołane ultradźwiękami w błonie plazmatycznej. Zmiany te obejmują zwiększoną przepuszczalność, zmniejszony transport i zmniejszenie ruchliwości elektroforetycznej. Zmiany te mogą mieć istotne znaczenie w odniesieniu do warunków *in vivo* ze względu na udział powierzchni komórki w takich funkcjach jak reakcje odpornościowe, układy topograficznego rozmieszczenia receptorów i rozpoznanie komórki przez komórkę. Mehier-Humbert i wsp. [49] obserwowali tworzenie się otworków w błonie komórkowej (erytrocytów i komórek MAT B III) w wyniku kawitacji. Powstawanie otworów może być użyteczne w przypadku transportu np. leków przez błonę komórkową, jednakże może również powodować śmierć komórki, jeśli indukowane otwory będą zbyt duże i błona komórkowa nie będzie się mogła szybko ponownie uszczelnić.

Wiadomo, że ultradźwięki są szeroko stosowane w preparatyce liposomów, jednakże stwierdzono, że działanie ultradźwiękami może prowadzić do utleniania liposomów, a także chemicznej degradacji niespowodowanej utlenianiem. Jana i wsp. [34,35] wykazali, że nadźwiękawianie prowadzi do peroksydacji lipidów w błonach plazmatycznych. Wyniki wskazują na znaczącą rolę rodników hydroksylowych w zapoczątkowaniu procesu peroksydacji lipidów. Również Hristov i wsp. [31] wykazali wzrost poziomu peroksydacji lipidów w komórkach Ehrlicha poddanych działaniu ultradźwięków. Stwierdzono natomiast brak istotnych różnic między mechanizmem peroksydacji lipidów inicjowanej przez ultradźwięki, a inicjowanej przez jony Fe^{2+} , co świadczy o tym, że za procesy te są odpowiedzialne wolne rodniki powstające w wyniku kawitacji.

Działanie ultradźwięków *in vitro* może zmieniać przepuszczalność oraz transport przez błonę komórkową. Mortimer i Dyson [64] poddali działaniu ultradźwięków o częstotliwości stosowanej w terapii (1 MHz) fibroblasty 3T3 zarodków myszy, co spowodowało zwiększoną o 18% zawartość jonów wapnia w komórkach. Jednakże stężenie wapnia wróciło do normy po 10–20 min od zaprzestania nadźwiękawiania. Również Dinno i wsp. [20,21] wykazali zmiany w przewodności błony komórkowej. Zaobserwowali, że pod wpływem ultradźwięków (1 MHz) modyfikacji ulegają parametry elektrochemiczne i całkowite przewodnictwo wzrasta. Mediatorem tego efektu są rodniki generowane podczas kawitacji, gdyż zmiatacze wolnych rodników redukują go [19].

Spośród organelli komórkowych największą wrażliwość na ultradźwięki wykazują mitochondria. Zmiany w mitochondriach objawiają się obrzękiem, utratą grzebieni i przerwaniem błony zewnętrznej. Mniejszą wrażliwość wykazuje siateczka śródplazmatyczna, ale w miarę wydłużania czasu nadźwiękawiania pojawiają się w niej jamy, następuje utrata rybosomów powierzchniowych i wakuolizacja.

Reakcje rodnikowe, gradient temperatury, czy siły ścinające będące wynikiem działania ultradźwięków, mogą powodować również denaturację białka. Tian i wsp. [85] stwierdzili, że aktywność trypsyny maleje wraz ze wzrostem natężenia fali ultradźwiękowej i z wydłużaniem czasu nadźwiękawiania. Ponadto sugerują, że kawitacja powoduje zniszczenie (rozerwanie) wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych wewnątrz trypsyny. Również Barteri i wsp. [11] stwierdzili, że kawitacja może być przyczyną rozrywania wiązań wodorowych i osłabiania oddziaływań van der Waalsa w polipeptydach, co prowadzi do zmiany drugo- i trzeciorzędowej struktury białka.

Z danych literaturowych również wynika, że działanie ultradźwięków może prowadzić do zmian morfologicznych w komórkach przejawiających się kondensacją chromatyny na obrzeżach jądra i fragmentacją DNA, a więc powstawaniem charakterystycznych komórek apoptotycznych [43]. Zmiany takie obserwowano w komórkach Walker 256 po nadźwiękawianiu falą o natężeniu 17 W/cm² przez 3 i 5 godzin [84]. Również pod wpływem ultradźwięków terapeutycznych obserwowano kurczenie się komórek, kondensację chromatyny jądrowej i fragmentację jądra w komórkach HL-60 [2]. Wszelkie zmiany prowadzące do powstania komórek apoptotycznych były obserwowane co najmniej kilka godzin po nadźwiękawianiu.

Badania dotyczące wpływu ultradźwięków na DNA mają dwa różne aspekty. W pierwszym przypadku bada się wpływ ultradźwięków na syntezę DNA w komórkach eukariotycznych. Uzyskane wyniki są charakteryzowane jako „uszkodzenia” w syntezie DNA. Obserwowano zwiększone włączanie tymidyny (³H-dTh) w DNA *in vitro*, po działaniu ultradźwięków fali ciągłej o częstotliwości 1 MHz i natężeniu 1,8 W/cm² na wyizolowane kości piszczelowe noworodków myszy [23]. Jednak, Prasad i wsp. [69] zauważyli zmniejszone włączanie tymidyny (³H-dTh) w komórkach HeLa poddanych działaniu ultradźwięków diagnostycznych. Również Repacholi i wsp. [70] stwierdzili hamowanie włączania tymidyny w limfocytach krwi ludzkiej poddanych działaniu *in vitro* ultradźwięków o natężeniach leczniczych (870 kHz, 4 W/cm²). Liebeskind i wsp. [44] poddali ko-

mórki HeLa w hodowli działaniu ultradźwięków impulsowych (2,5 MHz, I_{SATA}=17 mW/cm²) i stwierdzili syntezę nieregularną i poza-S-fazową DNA. Wynik ten świadczy o uszkodzeniu DNA. W innym doświadczeniu stwierdzili niewielkie, lecz istotne, zwiększenie częstości wymiany chromatyd siostrzanych w następstwie działania ultradźwięków (impulsy, 2 MHz, I_{SATA}=2,7 i 5,0 mW/cm²) na prawidłowe limfocyty ludzkie [45]. Forytkova i wsp. [26] nadźwiękawiali komórki nowotworowe falą ciągłą (0,8 MHz; 1,0 i 0,5 W/cm²) i zaobserwowali statystycznie istotne zahamowanie replikacyjnej syntezy DNA, podczas gdy naprawcza synteza DNA nie ulegała zmianie.

Drugi aspekt to badanie skutków oddziaływania ultradźwięków na DNA. DNA jest materiałem genetycznym wszystkich organizmów, dlatego ważne jest prowadzenie badań *in vitro* i *in vivo* mających na celu sprawdzenie bezpieczeństwa stosowania diagnostycznych i terapeutycznych dawek ultradźwięków. Badano wpływ ultradźwięków na roztwory wyizolowanego DNA, a także na DNA w komórce. Kondo i Kano [38] wykazali podwójne pęknięcia nici DNA w komórkach myszy w wyniku działania ultradźwiękami o częstotliwości 1 MHz (5–8 W/cm²). Liczba podwójnych pęknięć zwiększała się wraz z wydłużaniem czasu nadźwiękawiania. Również Miller i wsp. [51,52] stwierdzili pęknięcia nici DNA w komórkach CHO chomika chińskiego poddanych działaniu ultradźwięków. Z dotychczasowych badań wynika, że uszkodzenia DNA mogą być powodowane przez mechaniczne i sonochemiczne działanie kawitacyjne. Działanie mechaniczne występuje, gdy komórki lub wyizolowany DNA bezpośrednio oddziałują z pęcherzykami kawitacyjnymi. Naprężenia ścinające mogą prowadzić do pojedynczych i podwójnych pęknięć nici DNA, które występują głównie między atomami tlenu i węgla, prowadząc do fragmentacji DNA z fosforylowym końcem 5' i alkoholowym końcem 3' [27]. Jednak, działanie sonochemiczne jest wynikiem stresu oksydacyjnego. Wolne rodniki oraz nadtlenek wodoru generowane podczas kawitacji inercyjnej również powodują uszkodzenia DNA. Mogą one wpływać na zasady purynowe lub pirymidynowe prowadząc do ich modyfikacji [27].

SONODYNAMICZNA TERAPIA NOWOTWOROWA (SDT)

W oparciu o koncepcję fotodynamicznej terapii nowotworowej w latach 70 XX w. powstała idea sonodynamicznej terapii nowotworowej.

Terapia sonodynamiczna jest nową obiecującą techniką niszczenia komórek nowotworowych przez poddanie ich działaniu fali ultradźwiękowej [63,93]. Zasada metody oparta jest na synergistycznym efekcie wywołanym połączeniem oddziaływania pewnych związków chemicznych zwanych „sonouczulaczami” z ultradźwiękami, co w konsekwencji powoduje niszczenie komórek nowotworowych. W porównaniu ze stosowaną od kilku lat w fotodynamicznej terapii nowotworowej wiązką laserową, ultradźwięki wykazują większą zdolność przenikania w głąb ciała ludzkiego uaktywniając podany lek i ograniczając destrukcję sąsiednich zdrowych komórek. Występowanie efektu synergistycznego działania ultradźwięków i sonouczulaczy zostało wykazane doświadczalnie zarówno *in vitro* [94,97], jak i *in vivo* [30,98]. Badania sonodynamicznej terapii antynowotworowej są prowadzone od wielu lat na zwierzętach [96],

z zadowalającymi efektami, a także opatentowano już kilka metod stosowania tej terapii (WO 9852610, WO 9852609, US Pat. No 4,971,991, itd.). Przyjmuje się następujące zastrzeżenia prawne stosowania tej metody: częstotliwość 0,5–5 MHz, natężenie 2–8 W/cm², przy czasie działania ultradźwięków w zakresie 2–40 min (Pat. WO 9852610). Jako sonouczulacze są stosowane te same substancje, co w terapii fotodynamicznej, a więc leki przeciwnowotworowe, porfiryny i ich pochodne, a także niektóre organiczne rozpuszczalniki polarne, takie jak np. dimetyloformamid (DMF) [36]. Również takie związki jak: merocyjanina 540, erytrozyna B, róż bengalski [88] i inne mogą być chemicznie aktywowane przez nadźwiękowanie [93,94].

Oryginalnego podejścia do terapii sonodynamicznej można się doszukać w nieswoistym termicznym efekcie ultradźwięków [39]. Skoro stwierdzono, że hipertermia zwiększa cytotoksyczność, ultradźwięki ze swoimi zdolnościami skupiającymi mogły być atrakcyjnym narzędziem do osiągnięcia tego celu. Zwiększenia cytotoksyczności przez ultradźwięki dowiedziono po raz pierwszy, gdy komórki białaczkowe myszy L1210 zawieszona w iperycie azotowym poddano działaniu ultradźwięków (2 MHz, 10 W/cm²) *in vitro* [40]. Myszy z wszczepionymi komórkami, które były traktowane lekiem i ultradźwiękami, żyły dłużej niż zwierzęta kontrolne, które otrzymały komórki poddane działaniu leku, lecz bez ultradźwięków. Następane badania również wykazały synergistyczny wzrost cytotoksyczności spowodowany działaniem hipertermii ultradźwiękowej i innych czynników alkilujących [46] oraz adriamycyny [76]. Wykazano, że hipertermia indukowana przez ultradźwięki była zasadniczo bardziej efektywna we wzmacnianiu działania adriamycyny niż hipertermia indukowana w łaźni wodnej. Średni czas podwajania komórek nowotworowych traktowanych adriamycyną i ultradźwiękami był dwukrotnie dłuższy niż komórek nowotworowych podgrzewanych w łaźni wodnej [77]. Jednakże wspólne działanie ultradźwięków i leków przeciwnowotworowych nie ogranicza się do wywołania hipertermii. Wielu innych badaczy stwierdziło, że ultradźwięki wzmacniają działanie leków przeciwnowotworowych, takich jak: adriamycyna, 5-fluorouracyl, arabinozo-cytozyna, nie tylko w wyniku wzrostu temperatury [81,92]. Hussein i wsp. [32] wykazali, że uszkodzenia DNA w komórkach białaczki HL-60 spowodowane przez wspólne działanie ultradźwięków i doksorubicyny są znacznie większe niż w komórkach poddanych działaniu tylko leku.

Badając właściwości sonodynamiczne substancji zwrócono uwagę na porfiryny i ich pochodne hematoporfirynowe [63,98]. Związki te mają zdolność wybiórczego gromadzenia się w komórkach nowotworowych. W odróżnieniu od leków przeciwnowotworowych porfiryny nie są toksyczne bez działania ultradźwięków. Energia ultradźwiękowa generująca sonoluminescencję może powodować wzbudzenie porfiryny przez transfer energii i inicjować proces fotochemiczny prowadzący do powstania cytotoksycznego tlenu singletowego [75]. Badania *in vitro* i *in vivo* dotyczące wpływu hematoporfiryny aktywowanej przez ultradźwięki na komórki mięsaka myszy wykazują działanie przeciwnowotworowe [95]. Zmiany w strukturze komórek, aktywności oksydazy cytochromu C i degradacja DNA były ważnym czynnikiem hamującym wzrost komórek, a nawet indukującym ich śmierć. Synergistyczne działanie pochodnej porfiryny, fotofrinu II i ultradźwięków wykaza-

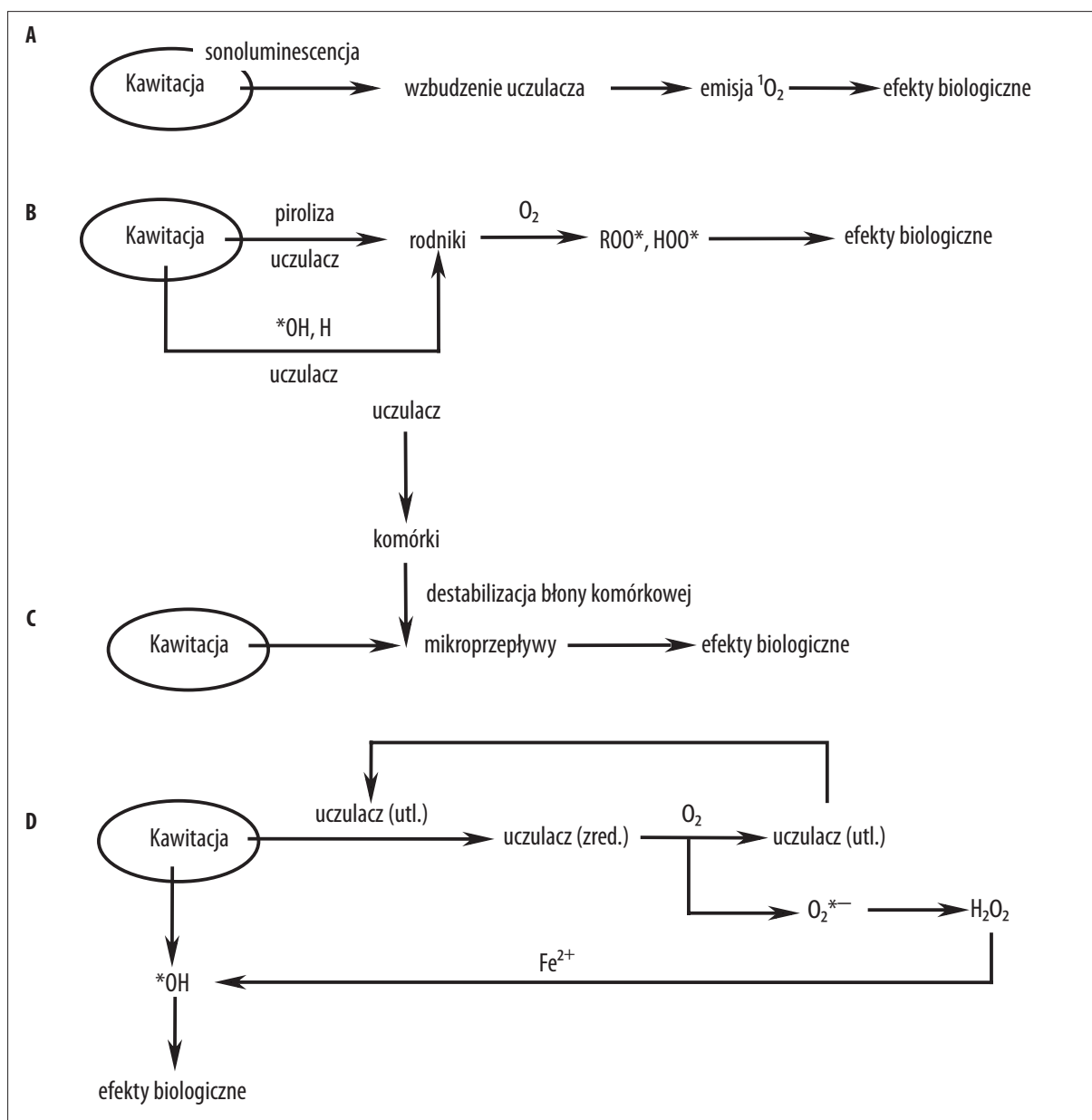
no w stosunku do raka okrężnicy u myszy [96], komórek HL-60 [80] i AH130 [99]. Inne pochodne porfiryny (np. galoporfiryna ATX-70) również są aktywowane przez ultradźwięki do działania przeciwnowotworowego [37,63]. Wartościowych danych dostarczyły badania współdziałania mezoporfiryny, protoporfiryny, protoporfiryny miedziowej i ATX-70 na komórki białaczki L1210. Zmniejszenie żywotności komórek było związane z zahamowaniem transportu aminokwasów i fragmentacją komórki, sugerującym zakłócenie integralności błony komórkowej [37].

Również ftalocyjaniny – związki aromatyczne o budowie podobnej do naturalnie występujących porfiryn, wykazują właściwości sonodynamiczne. Miłowska i Gabryelak [58] w badaniach *in vitro* zaobserwowały synergistyczne oddziaływanie ultradźwięków i ftalocyjanin (cynkowej i chloroaluminiumowej) z błoną komórkową erytrocytów jądrzastych. Yumita i Umemura [100] oceniali ultradźwiękową aktywację tetrasufonianu ftalocyjaniny chloroaluminiumowej u myszy *in vivo*. Zwierzęta poddawano działaniu ultradźwięków (2 MHz), gdy stężenie barwnika w komórkach nowotworowych osiągnęło maksymalną wartość. Uzyskane wyniki wykazały znaczne działanie przeciwnowotworowe określane jako zmniejszenie się rozmiaru nowotworu.

MECHANIZMY TERAPII SONODYNAMICZNEJ

Uszkodzenia komórek w wyniku działania ultradźwięków i sonouczulaczy skłaniają wielu badaczy do poszukiwania i wyjaśnienia mechanizmu synergistycznego oddziaływania tych czynników. Jednakże różnorodność strukturalna związków, które wykazują sonodynamiczną aktywność stwarza trudności w określaniu uniwersalnego mechanizmu sonodynamicznego. Jest on uwarunkowany następującymi czynnikami: rodzajem materiału biologicznego, jego właściwościami, rodzajem sonouczulacza i parametrami ultradźwięków [75]. Choć więc mechanizm zjawisk leżących u podstaw terapii sonodynamicznej nie został dotąd ustalony, to jednak na podstawie doniesień literaturowych można zaproponować kilka hipotez.

W pierwszej (ryc. 3A) z nich zakłada się, że aktywnym czynnikiem generowanym w trakcie reakcji sonodynamicznych prowadzących do niszczenia komórek jest tlen singletowy, powstający przez wzbudzenie fotouczulacza impulsem sonoluminescencyjnym, towarzyszącym zjawisku kawitacji. Sugerowano, że uszkodzenie komórek w obecności hematoporfiryn jest właśnie wynikiem działania wysoce reaktywnego tlenu singletowego. Wyniki te są oparte na zastosowaniu zmiataczy, takich jak histydyna (zmiatacz tlenu singletowego oraz rodnika hydroksylowego), mannitol (zmiatacz rodnika hydroksylowego) i dysmutaza ponadtlenkowa (zmiatacz rodnika ponadtlenkowego). Obserwowano tłumienie efektu sonodynamicznego przez histydynę, natomiast mannitol i dysmutaza ponadtlenkowa nie zmniejszały intensywności efektu [87]. Tezie tej sprzeciwili się Miyoshi i wsp. [62] stwierdzając, że zdolność zmiatania rodników z dyfundujących pęcherzyków kawitacyjnych zależy głównie od hydrofobowości zmiataczy. Wyznacza ona stężenie w strefie międzyfazowej pęcherzyka. Ze względu na znacznie wyższą hydrofobowość histydyny, występują lokalne strefy zwiększonego jej stężenia, co tłumaczy spadek działania synergistycznego w jej obecności.



Ryc. 3. Schematy zaproponowanych hipotez

Hipoteza druga (ryc. 3B) sugeruje, że sonouczulanie jest spowodowane chemiczną aktywacją uczulacza, znajdującego się w sąsiedztwie zapadających się pęcherzyków kawitacyjnych. Dochodzi do powstania rodnika na uczulaczu w wyniku reakcji z rodnikiem hydroksylowym lub atomem wodoru. Tak powstały rodnik, z centrum aktywnym na węglu, reaguje z tlenem dając rodniki nadtlenkowe i alkoksylowe. Reaktywność tych rodników jest mniejsza niż rodników hydroksylowych, ale charakteryzują się dłuższym czasem trwania i mogą za pośrednictwem dyfuzji przemieszczać się na dalsze odległości [60].

Również zmiany sonomechaniczne mogą prowadzić do destrukcji komórek. Autorzy tej hipotezy (ryc. 3C) sugerują, że uczulacz powoduje destabilizację błony komórkowej, przez co komórka staje się bardziej wrażliwa na mikroprzepływy związane z szybko poruszającymi się pęche-

rykami kawitacyjnymi, które uszkadzają komórki znajdujące się na ich drodze [75].

Tata i wsp. [81] wysunęli natomiast hipotezę, że kavitacja odgrywa główną rolę w zwiększaniu wytwarzania rodników $*OH$ w obecności leków przeciwnowotworowych – adriamycyny i mitocyny C w cyklu reakcji redoks. Zaobserwowano, że leki chinonowe w obecności elektronodonorowej reduktazy i tlenu ulegają autoutlenianiu. Stwierdzono, że duże znaczenie w generowaniu rodników hydroksylowych odgrywa reakcja Fentona. W tkankach biologicznych reakcja Fentona może być limitowana przez trudną dostępność do wolnego żelaza. Jednakże autorzy sugerują, że w wyniku działania ultradźwięków powstaje anionorodnik nadtlenkowy, który wspomaga uwalnianie żelaza z ferrytyny i dostarcza pułę żelaza do reakcji Fentona (ryc. 3D).

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach nastąpił postęp w rozwoju badania terapii sonodynamicznej. Metodę zgłoszono do opatentowania, a nawet skonstruowano prototypy aparatów terapeutycznych, jednakże pełne poznanie zachodzących zjawisk oraz dobór odpowiedniego sonocuczulacza wy-

maga jeszcze wielu doświadczeń zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Uzasadnione jest również prowadzenie badań nad wpływem i mechanizmami działania ultradźwięków, aby poprzez nowoczesne rozwiązania konstrukcyjne aparaty ultradźwiękowej oraz prawidłowe jej stosowanie ograniczyć do minimum zagrożenia spowodowane ich niepożądanym działaniem.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abramowicz J.S., Miller M.W., Battaglia L.F., Mazza S.: Comparative hemolytic effectiveness of 1 MHz ultrasound on human and rabbit blood *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 867–873
- [2] Ashush H., Rozenszajn L.A., Blass M., Barda-Saad M., Azimov D., Radnay J., Zipori D., Rosenschein U.: Apoptosis induction of human myeloid leukemic cells by ultrasound exposure. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1014–1020
- [3] Atkins T.J., Duck F.A.: Heating caused by selected pulsed Doppler and physiotherapy ultrasound beams measured using thermal test objects. *Eur. J. Ultrasound*, 2003; 16: 243–252
- [4] Barnett S.B.: Ultrasound. Update on thermal bioeffects issues. *Ultrasound Med. Biol.* 1998; 24 (Suppl. 1): S1–S10
- [5] Barnett S.B.: Ultrasound. Nonthermal issues: cavitation – its nature, detection and measurement. *Ultrasound Med. Biol.*, 1998; 24 (Suppl. 1): S11–S21
- [6] Barnett S.B.: Ultrasound. Other nonthermal mechanisms: acoustic radiation force and streaming. *Ultrasound Med. Biol.*, 1998; 24 (Suppl. 1): S23–S28
- [7] Barnett S.B.: Ultrasound. Free-radical production: its biological consequences. *Ultrasound Med. Biol.*, 1998; 24 (Suppl. 1): S29–S34
- [8] Barnett S.B.: Ultrasound. Clinical implications. *Ultrasound Med. Biol.*, 1998; 24 (Suppl. 1): S51–S55
- [9] Barnett S.B.: Biophysical aspects of diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 2000; 26 (Suppl. 1): S68–S70
- [10] Barnett S.B.: Intracranial temperature elevation from diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 2001; 27: 883–888
- [11] Barteri M., Fioroni M., Gaudiano M.C.: Oxidation of Fe(II) horse heart cytochrome c by ultrasound waves. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1296: 35–40
- [12] Bommannan D., Menon G.K., Okuyama H., Elias P.M., Guy R.H.: Sonophoresis. II. Examination of the mechanism(s) of ultrasound-enhanced transdermal drug delivery. *Pharm. Res.*, 1992; 9: 1043–1047
- [13] Byl N.N.: The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. *Phys. Ther.*, 1995; 75: 539–553
- [14] Chen W.S., Brayman A.A., Matula T.J., Crum L.A., Miller M.W.: The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 739–748
- [15] Church C.C., Carstensen E.L.: „Stable” inertial cavitation. *Ultrasound Med. Biol.*, 2001; 27: 1435–1437
- [16] Clement G.T.: Perspectives in clinical uses of high-intensity focused ultrasound. *Ultrasonics*, 2004; 42: 1087–1093
- [17] Demmink J.H., Helders P.J., Hobaek H., Enwemeka C.: The variation of heating depth with therapeutic ultrasound frequency in physiotherapy. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 113–118
- [18] Deng C.X., Xu Q., Apfel R.E., Holland C.K.: *In vitro* measurements of inertial cavitation thresholds in human blood. *Ultrasound Med. Biol.*, 1996; 22: 939–948
- [19] Dinno M.A., al-Karmi A.M., Stoltz D.A., Matthews J.C., Crum L.A.: Effect of free radical scavengers on changes in ion conductance during exposure to therapeutic ultrasound. *Membr. Biochem.*, 1993; 10: 237–247
- [20] Dinno M.A., Crum L.A., Wu J.: The effect of therapeutic ultrasound on electrophysiological parameters of frog skin. *Ultrasound Med. Biol.*, 1989; 15: 461–470
- [21] Dinno M.A., Dyson M., Young S.R.: The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 1989; 34: 1543–1552
- [22] Duck F.A.: Radiation stress and its bio-effects. European Committee for Medical Ultrasound Safety (ECMUS). *Eur. J. Ultrasound*, 2000; 11: 61–64
- [23] Elmer W.A., Fleischer A.C.: Enhancement of DNA synthesis in neonatal mouse tibial epiphyses after exposure to therapeutic ultrasound. *J. Clin. Ultrasound*, 1974; 2: 191–195
- [24] Flobbe K., Nelemans P.J., Kessels A.G., Beets G.L., von Meyenfeldt M.F., van Engelshoven J.M.: The role of ultrasonography as an adjunct to mammography in the detection of breast cancer: a systematic review. *Eur. J. Cancer*, 2002; 38: 1044–1050
- [25] Forsberg F., Merton D.A., Liu J.B., Needleman L., Goldberg B.B.: Clinical applications of ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*, 1998; 36: 695–701
- [26] Forýtková L., Hrazdira I., Mornstein V.: Effect of ultrasound on DNA synthesis in tumor cells. *Ultrasound Med. Biol.*, 1995; 21: 585–592
- [27] Fuciarelli A.F., Sisk E.C., Thomas R.M., Miller D.L.: Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 18: 231–238
- [28] Harvey C.J., Pilcher J.M., Eckersley R.J., Blomley M.J., Cosgrove D.O.: Advances in ultrasound. *Clin. Radiol.*, 2002; 57: 157–177
- [29] Harvey E.N.: Biological aspects of ultrasonic waves, a general survey. *Biol. Bull.*, 1930; 59: 306–325
- [30] He Y., Xing D., Yan G., Ueda K.: FCLA chemiluminescence from sonodynamic action *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.*, 2002; 182: 141–145
- [31] Hristov P.K., Petrov L.A., Russanov E.M.: Lipid peroxidation induced by ultrasonication in Ehrlich ascitic tumor cells. *Cancer Lett.*, 1997; 121: 7–10
- [32] Husseini G.A., El-Fayoumi R.I., O’Neill K.L., Rapoport N.Y., Pitt W.G.: DNA damage induced by micellar-delivered doxorubicin and ultrasound: comet assay study. *Cancer Lett.*, 2000; 154: 211–216
- [33] Ilyukhina M.A., Makov Y.N.: Effects of ultrasound action on cellular membranes. XV Session of the Russian Acoustical Society, Nizhny Novgorod, 2004; 456–459
- [34] Jana A.K., Agarwal S., Chatterjee S.N.: Ultrasonic radiation induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1986; 25: 309–314
- [35] Jana A.K., Agarwal S., Chatterjee S.N.: The induction of lipid peroxidation in liposomal membrane by ultrasound and the role of hydroxyl radicals. *Radiat. Res.*, 1990; 124: 7–14
- [36] Jeffers R.J., Feng R.Q., Fowlkes J.B., Hunt J.W., Kessel D., Cain C.A.: Dimethylformamide as an enhancer of cavitation-induced cell lysis *in vitro*. *J. Acoust. Soc. Am.*, 1995; 97: 669–676
- [37] Kessel D., Jeffers R., Fowlkes J.B., Cain C.: Porphyrin-induced enhancement of ultrasound cytotoxicity. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994; 66: 221–228
- [38] Kondo T., Kano E.: Effect of free radicals induced by ultrasonic cavitation on cell killing. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1988; 54: 475–486
- [39] Kremkau F.W.: Cancer therapy with ultrasound: a historical review. *J. Clin. Ultrasound*, 1979; 7: 287–300
- [40] Kremkau F.W., Kaufmann J.S., Walker M.M., Burch P.G., Spurr C.L.: Ultrasonic enhancement of nitrogen mustard cytotoxicity in mouse leukemia. *Cancer*, 1976; 37: 1643–1647
- [41] Kruus P.: Production of zinc dust using ultrasound. *Ultrasonics*, 1988; 26: 216–217
- [42] Kudo N., Yamamoto K.: Impact of bubbles on ultrasound safety. International Congress Series, 2004; 1274: 129–132
- [43] Lagneaux L., de Meulenaer E.C., Delforge A., Dejenéffe M., Massy M., Moerman C., Hannecart B., Canivet Y., Lepeltier M.F., Bron D.: Ultrasonic low-energy treatment: a novel approach to induce apoptosis in human leukemic cells. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 1293–1301
- [44] Liebeskind D., Bases R., Elequin F., Neubort S., Leifer R., Goldberg R., Koenigsberg M.: Diagnostic ultrasound: effect on the DNA and growth patterns of animal cells. *Radiology*, 1979; 131: 177–184

- [45] Liebeskind D., Bases R., Mendez F., Elequin F., Koenigsberg M.: Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science*, 1979; 205: 1273–1275
- [46] Longo F.W., Tomashefsky P., Rivin B.D., Tannenbaum M.: Interaction of ultrasonic hyperthermia with two alkylating agents in a murine bladder tumor. *Cancer Res.*, 1983; 43: 3231–3235
- [47] Marks R., Ghanagaraja S., Ghassemi M.: Ultrasound for osteo-arthritis of the knee: a systematic review. *Physiotherapy*, 2000; 86: 452–463
- [48] McQueen D.H.: Frequency dependence of ultrasonic cleaning. *Ultrasonics*, 1986; 24: 273–280
- [49] Mehier-Humbert S., Bettinger T., Yan F., Guy R.H.: Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J. Control. Release*, 2005; 104: 213–222
- [50] Mika T.: *Fizykoterapia*. PZWL, Warszawa 1993
- [51] Miller D.L., Thomas R.M.: The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.*, 1996; 22: 681–687
- [52] Miller D.L., Thomas R.M., Buschbom R.L.: Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.*, 1995; 21: 841–848
- [53] Miller M.W., Battaglia L.F.: The relevance of cell size on ultrasound-induced hemolysis in mouse and human blood *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 1479–1485
- [54] Miller M.W., Battaglia L.F., Mazza S.: Biological and environmental factors affecting ultrasound-induced hemolysis *in vitro*: medium tonicity. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 713–724
- [55] Miller M.W., Everbach E.C., Miller W.M., Battaglia L.F.: Biological and environmental factors affecting ultrasound-induced hemolysis *in vitro*: 2. Medium dissolved gas (pO₂) content. *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 93–102
- [56] Miller M.W., Luque A.E., Battaglia L.F., Mazza S., Everbach E.C.: Biological and environmental factors affecting ultrasound-induced hemolysis *in vitro*: 1. HIV macrocytosis (cell size). *Ultrasound Med. Biol.*, 2003; 29: 77–91
- [57] Miller M.W., Miller D.L., Brayman A.A.: A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med. Biol.*, 1996; 22: 1131–1154
- [58] Milowska K., Gabrylak T.: Synergistic effect of ultrasound and phthalocyanines on nucleated erythrocytes *in vitro*. *Ultrasound Med. Biol.*, 2005; 31: 1707–1712
- [59] Mišić V., Riesz P.: EPR characterization of free radical intermediates formed during ultrasound exposure of cell culture media. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 936–943
- [60] Mišić V., Riesz P.: Free radical intermediates in sonodynamic therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000; 899: 335–348
- [61] Mitragotri S., Kost J.: Low-frequency sonophoresis: a review. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2004; 56: 589–601
- [62] Miyoshi N., Igarashi T., Riesz P.: Evidence against singlet oxygen formation by sonolysis of aqueous oxygen-saturated solutions of hematoporphyrin and rose bengal. The mechanism of sonodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.*, 2000; 7: 121–124
- [63] Miyoshi N., Sostarić J.Z., Riesz P.: Correlation between sonochemistry of surfactant solutions and human leukemia cell killing by ultrasound and porphyrins. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 710–719
- [64] Mortimer A.J., Dyson M.: The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med. Biol.*, 1988; 14: 499–506
- [65] Mouritz A.P., Townsend C., Shah Khan M.Z.: Non-destructive detection of fatigue damage in thick composites by pulse-echo ultrasonics. *Compos. Sci. Technol.*, 2000; 60: 23–32
- [66] Moussatov A., Castagnede B.: Ultrasonic defectoscopy of damage materials by modulation transfer method: nonlinear pump-probe interaction. WCU, Paris, September 7–10, 2003; 1327–1330
- [67] Natori M.: Ultrasound safety: overview and what we do need in daily clinics for a safe use of diagnostic ultrasound. *International Congress Series*, 2004; 1274: 125–128
- [68] Nowicki A.: Podstawy obrazowania przepływów metodą dopplerowską. *Ultrasonografia Polska*, 1991; 1: 163–183
- [69] Prasad N., Prasad R., Bushong S.C., North L.B., Rhea E.: Ultrasound and mammalian DNA. *Lancet*, 1976; 1 (7970): 1181
- [70] Repacholi M.H., Kaplan J.G., Little J.: The effect of therapeutic ultrasound on the DNA of human lymphocytes. W: Kaplan J.G. (red.). *The molecular basis of immune cell function*. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979; 443–446
- [71] Riesz P., Kondo T.: Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.*, 1992; 13: 247–270
- [72] Robertson V.J., Ward A.R.: Longwave ultrasound reviewed and reconsidered. *Physiotherapy*, 1997; 83: 123–130
- [73] Rojek M., Stabik J., Wróbel G.: Ultrasonic methods in diagnostics of epoxy-composites. *J. Mater. Process. Tech.*, 2005; 162–163: 121–126
- [74] Rokita B., Ulański P.: Studies on the spatial distribution of polymeric reagents in sonochemical reactions – application of competitive kinetics. *Polimery*, 2005; 50: 29–36
- [75] Rosenthal I., Sostarić J.Z., Riesz P.: Sonodynamic therapy – a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochem.*, 2004; 11: 349–363
- [76] Saad A.H., Hahn G.M.: Ultrasound enhanced drug toxicity on Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Cancer Res.*, 1989; 49: 5931–5934
- [77] Saad A.H., Hahn G.M.: Ultrasound-enhanced effects of adriamycin against murine tumors. *Ultrasound Med. Biol.*, 1992; 18: 715–723
- [78] Sivakumar V., Rao P.G.: Studies on the use of power ultrasound in leather dyeing. *Ultrason. Sonochem.*, 2003; 10: 85–94
- [79] Słonina J., Nienartowicz E., Agrawal A.K., Malczewska J., Morofi K.: Przydatność ultrasonograficznego środka kontrastującego Levovist w diagnostyce różnicowej guzów nadnerczy. *Endokrynologia Polska*, 2006; 57: 230–236
- [80] Tachibana K., Kimura N., Okumura M., Eguchi H., Tachibana S.: Enhancement of cell killing of HL-60 cells by ultrasound in the presence of the photosensitizing drug Photofrin II. *Cancer Lett.*, 1993; 72: 195–199
- [81] Tachibana K., Uchida T., Tamura K., Eguchi H., Yamashita N., Ogawa K.: Enhanced cytotoxic effect of *Ara-C* by low intensity ultrasound to HL-60 cells. *Cancer Lett.*, 2000; 149: 189–194
- [82] Tata D.B., Biglow J., Tritton T.R., Dunn F.: Ultrasound-enhanced hydroxyl radical production from two clinically employed anticancer drugs, adriamycin and mitomycin c. *Ultrasonics Sonochem.*, 1996; 3: 39–45
- [83] ter Haar G.: Therapeutic ultrasound. *Eur. J. Ultrasound*, 1999; 9: 3–9
- [84] Tian Z.M., Wan M.X., Lu M.Z., Wang X.D., Wang L.: The alteration of protein profile of Walker 256 carcinosarcoma cells during the apoptotic process induced by ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.*, 2005; 31: 121–128
- [85] Tian Z.M., Wan M.X., Wang S.P., Kang J.Q.: Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. *Ultrason. Sonochem.*, 2004; 11: 399–404
- [86] Tomizawa M., Ebara M., Saisho H., Sakiyama S., Tagawa M.: Irradiation with ultrasound of low output intensity increased chemosensitivity of subcutaneous solid tumors to an anti-cancer agent. *Cancer Lett.*, 2001; 173: 31–35
- [87] Umemura S., Yumita N., Nishigaki R., Umemura K.: Mechanism of cell damage by ultrasound in combination with hematoporphyrin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1990; 81: 962–966
- [88] Umemura S., Yumita N., Umemura K., Nishigaki R.: Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999; 43: 389–393
- [89] Wang S., Feng R., Mo X.: The cavitation valley phenomenon of rectangular wave modulation ultrasound. *Ultrason. Sonochem.*, 1996; 3: 69–71
- [90] Wang Y., Wang Y., Dong Y., Wang Y.: The value of intraoperative ultrasonography in neurosurgery. *J. Med. Ultrasonics*, 2006; 33: 61–64
- [91] Ward A.R., Robertson V.J.: Comparison of heating of nonliving soft tissue produced by 45 kHz and 1 MHz frequency ultrasound machines. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1996; 23: 258–266
- [92] Yu T., Wang Z., Jiang S.: Potentiation of cytotoxicity of adriamycin on human ovarian carcinoma cell line 3AO by low-level ultrasound. *Ultrasonics*, 2001; 39: 307–309
- [93] Yu T., Wang Z., Mason T.J.: A review of research into the uses of low level ultrasound in cancer therapy. *Ultrason. Sonochem.*, 2004; 11: 95–103
- [94] Yumita N., Kawabata K., Sasaki K., Umemura S.: Sonodynamic effect of erythrosin B on sarcoma 180 cells *in vitro*. *Ultrason. Sonochem.*, 2002; 9: 259–265
- [95] Yumita N., Nishigaki R., Umemura K., Umemura S.: Synergistic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1990; 81: 304–308

- [96] Yumita N., Nishigaki R., Umemura S.: Sonodynamically induced antitumor effect of Photofrin II on colon 26 carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2000; 126: 601–606
- [97] Yumita N., Sasaki K., Umemura S., Nishigaki R.: Sonodynamically induced antitumor effect of a gallium-porphyrin complex, ATX-70. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1996; 87: 310–316
- [98] Yumita N., Sasaki K., Umemura S., Yukawa A., Nishigaki R.: Sonodynamically induced antitumor effect of gallium-porphyrin complex by focused ultrasound on experimental kidney tumor. *Cancer Lett.*, 1997; 112: 79–86
- [99] Yumita N., Umemura S.: Sonodynamic therapy with photofrin II on AH130 solid tumor. Pharmacokinetics, tissue distribution and sonodynamic antitumoral efficacy of photofrin II. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003; 51: 174–178
- [100] Yumita N., Umemura S.: Ultrasonically induced cell damage and membrane lipid peroxidation by photofrin II: mechanism of sonodynamic activation. *J. Med. Ultrasonics*, 2004; 31: 35–40
- [101] Ziskin M.C., Barnett S.B.: Ultrasound and the developing central nervous system. *Ultrasound Med. Biol.*, 2001; 27: 875–876