Fakulta biomedicínckého inženýrství Českého vysokého učení technického v Praze
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA. dr.h.c.

prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.

doc. PhDr. Ing. Jaroslav Průcha, CSc., Ph.D.

RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Mgr. Josef Skopalik, Ph.D.

Název metodiky:

Uplatnění bezkontaktně indukovaných elektrických proudů vytvářených prostřednictvím vysokoindukční magnetické stimulace při léčebném ovlivňování příznaků osteoartritidy

Praha, 30.12.2019

Odkaz na výzkumnou aktivitu, na jejímž základě metodika vznikla:

Projekt NV16-28784A „Ovlivnění příznaků degenerativních onemocnění pohybového aparátu vysokoindukční magnetickou stimulací“, Ministerstvo zdravotnictví ČR, Agentura pro zdravotnický výzkum

Výsledek výzkumu, experimentálního vývoje a inovací typu N_{metS}
vzniklý při řešení projektu NV16-28784A

Oponenti:

doc. MUDr. Libor Paša, Ph.D., Klinika Traumatologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno, Ponávka 10, 662 50 Brno

prof. MUDr. Marcela Grünerová-Lippertová, Ph.D., MSc., Klinika rehabilitačního lékařství Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Šrobárova 1150/50, 100 34 Praha 10; 3 . lékařská fakulta Univerzity Karlovy Praha, Ruská 87, 100 00 Praha 10.

Návrh uživatelů: Lékaři uplatňující metody fyzikální medicíny v klinické praxi, fyzioterapeuti

OBSAH:

1 Vymezení terapie u dané diagnózy (přehledně a stručně: název a třída typu ZP, diagnóza MKN 10, obsluhující personál, stručný účel terapie, …)..... 4

2 Popis terapie..... 6

2.1 Obecná definice typu terapie 6

2.2 Vymezení týkající se předkládaného metodického postupu (pro daný účel a diagnózu) 7

3 Mechanismus účinku terapie..... 8

3.1 Výsledky buněčných studií 8

3.1.1 Studium působení indukovaných elektrických proudů na senzorické nervové buňky 8

3.1.1.1 Analýza souvislostí výsledků klinického výzkumu s výsledky buněčného výzkumu na senzorických nervových buňkách.....15

3.1.2 Studium působení indukovaných elektrických proudů na endoteliální a mezenchymální stromální buňky.....18

3.2 **Výsledky animálních studií**.....24

3.2.1 Animální studie ovlivňování projevů osteoartritidy kolenního kloubu u králíka.....24

3.2.1.1 Densitometrie.....26

3.2.1.2 Histopatologicko-morfologická analýza.....28

3.2.1.3 Mobilita laboratorních zvířat s indukovanou osteoartritídou při HIMS.....34

3.2.1.4 Výzkum mediátorů zánětu při indukované osteoartróze a jejím ovlivňování indukovanými elektrickými proudy HIMS 37

3.2.1.5 Technika realizace animální studie.....42

3.2.1.6 Shrnutí výsledků animální studie ovlivňování indukované osteoartritidy kolenního kloubu indukovanými elektrickými proudy 44

3.2.2 Příspěvek k výzkumu vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na činnost srdce (animální studie) 45

3.3 Výsledky preklinických studií 47

3.3.1 Studium vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na elasticitu ligament 47

3.3.2 Výzkum změn viskoelastických vlastností tkání ovlivňovaných vysokoindukční magnetickou stimulací pomocí myotonometrie 50

3.3.3 Výzkum změn mikrovaskulární perfuze pod vlivem vysokoindukční magnetické stimulace 58

3.3.3.1 Výzkum za pomoci laserové dopplerovské flowmetrie....58

3.3.3.2 Výzkum za pomoci kapilaroskopie....61

3.3.3.3 Výzkum za pomoci remisní spetrofotometrie 62

3.3.3.4 Výzkum s uplatněním perfuzního indexu a kapacitní pletysmografie....64

3.4 Multicentrická klinická studie a její diskuse a vyhodnocení 66

3.4.1 Výsledky studia vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na bolest při léčbě pacientů s degenerativními onemocněními pohybového aparátu s ohledem na aplikovanou magnetickou indukci 77

4 Hlavní cíle terapie u dané diagnózy 82

4.1 Podmínky a požadavky na spektrální vlastnosti vysokoindukční magnetické stimulace z hlediska bolesti 82

5 Faktory ovlivňující efekt terapie 84

6 Kontraindikace, rizika a potenciální vedlejší účinky metody 86

7 Dávkování procedur 89

8 Analýza rizik terapie 90

8.1 Určené použití přístrojů pro vysokindukční magnetickou stimulaci 90

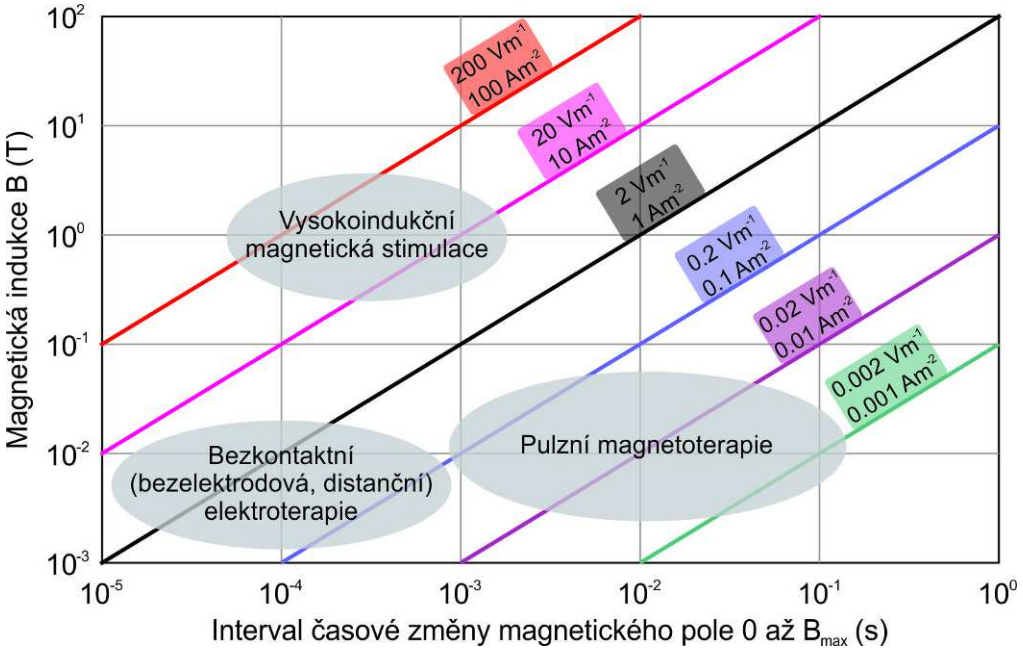
8.2 Přehled deklarovaných rizik, jejich pravděpodobností, závažnosti a opatření na snížení rizika 91

9 Literatura....98

1 Vymezení terapie u dané diagnózy (přehledně a stručně: název a třída typu ZP, diagnóza MKN 10, obsluhující personál, stručný účel terapie, …)

V současné fyzikální medicíně je stále častěji využíváno fyzikálních intervencí založených na aplikaci nejrůznějších typů nízkofrekvenčních periodicky časově proměnných magnetických polí, tedy nízkofrekvenčních polí elektromagnetických. Vzniká však otázka, jaký je mechanismus a účinnost tohoto léčebného působení a jaká fyzikální veličina ve skutečnosti působí na buňky, tkáně a orgány léčeného těla. Směrnice ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection: Guidelines for limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic, and Electromagnetic Fields), která je impementována v legislativě Evropského společenství i většiny zemí světa a v české legislativě je představována nařízením vlády č. 291/2015 Sb., dříve Nařízením vlády č. 1/2008 Sb., o ochraně zdraví před neionizujícím zářením (5), jasně vymezuje, že tímto biologicky účinným projevem nízkofrekvenčních elektromagnetických polí je indukovaný elektrický proud, jehož amplituda je závislá na velikosti magnetické složky elektromagnetického pole, tedy magnetické indukci, a na rychlosti časových změn této veličiny. Biologická účinnost indukovaného elektrického proudu je přitom dána jeho proudovou hustotou, to znamená velikostí elektrického náboje přeneseného přes jednotku plochy (jednotkou soustavy SI je A/m^2). Lidské tkáně jsou vodičem 2. řádu s měrným odporem relativně dobře vodivých tkání (svaly, nervy, tělesné tekutiny) kolem 2 Ω.m. Časově proměnné magnetické pole ve tkáních bez ohledu na jejich vodivost vytvoří (indukuje) indukované elektrické pole (jednotka V/m). Ovšem ve vodivých tkáních toto indukované elektrické pole způsobí pohyb nosičů elektrických nábojů, elektrický proud, jehož proudová hustota je biologicky účinným fyzikálním podnětem a představuje fyzikální energii interagující s živou tkání. Upozorňujeme, že stále uvažujeme pouze o nízkofrekvenčním působení, definovaném podle (5) do frekvence 100 kHz. V případě vysokoindukční magnetické stimulace, kam pro účely této metodiky zahrnujeme též tzv. „distanční elektroterapii“, v zahraničí známou spíše pod názvy „contactless electrotherapie“ nebo „electrodeless electrotherapie“, se však obvykle pohybujeme řádově maximálně do jednotek až desítek kHz. Ve světle těchto skutečností lze vytvořit graf (obrázek 1), na kterém vodorovná osa popisuje rychlost časových změn časově proměnného magnetického pole a svislá osa velikost magnetické indukce (v jednotkách Tesla, T). Šikmo položené úsečky pak představují amplitudu indukovaného elektrického pole, respektive amplitudu hustoty indukovaného elektrického proudu. Podle (5) se biologická účinnost těchto proudů projevuje hraničně již od řádu tisícin A/m^2, ale zjistitelné biologické efekty lze prokazovat až v řádech desetin až jednotek A/m^2, percepční projevy až kolem 10 A/m^2 a motorické efekty (svalové kontrakce)

až při několika desítkách až stovkách A/m^2. Graf na obrázku 1 zároveň vymezuje oblast uplatnění pulzní magnetoterapie, distanční (bezkontaktní) elektroterapie a vysokoindukční magnetické stimulace. Pro účely této metodiky budeme za formu uplatnění vysokoindukční magnetické stimulace považovat i tzv. distanční elektroterapii, nebo jiné formy „electrodeless electrotherapie“, pokud jí indukované elektrické proudy vytvářejí v živých tkáních elektrický indukovaný proud o proudové hustotě alespoň 1 A/m^2. Problematikou uplatnění tzv. pulzní magtoterapie vytvářející indukované eleketrické proudy o proudových hustotách v řádu tisícin až desetin A/m^2 se v této předložené metodice zabývat nebudeme.



***Obrázek 1**: Indukované elektrické pole a hustota indukovaného elektrického proudu v závislosti na velikosti magnetické indukce a na rychlosti jejích časových změn, zároveň vyznačeny oblasti odpovídající typickým aplikacím léčebných metod využívajících nízkofrekvenčních indukovaných elektrických proudů – pulzní magnetoterapie, distanční elektroléčby a vysokoindukční magnetické stimulace.*

Pro účely podávání bezkontaktně indukovaných elektrických proudů prostřednictvím vysokoindukční magnetické stimulace, respektive tzv. distanční elektroterapie, „electrodeless electrotherapie“, je v současné klinické praxi používána řada přístrojů, které splňují požadavky direktivy EU č. MDD 93/42/EEC na zdravotnické prostředky, resp. mají šanci od května 2020 plnit též požadavky nové direktivy č. MDR 2017/745, přesto však není dostatečně a z různých úhlů pohledu analyzován mechanismus účinku této terapie a její účinnost. Všechny tyto přístroje předávají do léčených, respektive ovlivňovaných, tkání fyzikální energii potenciálně bezpečným způsobem (nejedná se o ionizující záření), takže se řadí do IIa třídy bezpečnosti zdravotnických prostředků podle klasifikace výše uvedených

direktiv. Prostřednictvím těchto zdravotnických prostředků jsou podávány procedury fyzikální terapie, které vždy indikuje příslušně kvalifikovaný lékař a odborně podává fyzioterapeut.

Indikační škála těchto přístrojů je poměrně široká. V této metodice se však zaměřujeme pouze na ovlivňování příznaků osteoartritidy nosných kloubů, případně páteře. Podle Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10 se v širším pojetí jedná o kódy M15 až M19, kde je termín osteoartritida používán jako synonymum pro artrózu nebo osteoartrózu. Dále pak kód M47 (artróza nebo osteoartritida páteře, degenerace kloubních plošek).

Jako příklad přístrojů (zdravotnických prostředků) používaných pro podávání indukovaných elektrických proudů lze uvést např.:

- Salus Talent – výrobce CRTechnology Co., Ltd., Korea
- Saluter Moti – výrobce Embitron s.r.o., Česká republika
- BTL 6 000 *S*uper Inductive Syslem - výrobce BTL BTL zdrav. technika, a.s., ČR
- Tesla Stym FMS – výrobce Iskra Medical d.o.o., Slovinsko
- VASS – 07 ed. „Better Future“ - výrobce Embitron s.r.o., Česká republika
- Biomet EBI bone healing System – výrobce společnost Biomet – Zimmer, USA
- Magstim – výrobce The Magstim Company Ltd., Velká Británie

2 Popis terapie

2.1 Obecná definice typu terapie

Účelem terapie je docílení příznivého léčebného ovlivňování bolestivých stavů a podpora hojení, regenerace či reparace tkání pohybového aparátu. Přístroje jsou určeny k neinvazivním periferním aplikacím v ortopedii, neurologii, urologii, gynekologii, léčebné rehabilitaci a fyzikálním lékařství a ostatních oborech medicíny, kde mohou poskytovat přínos v podobě účinku analgetického, perfuzního a trofického (zvl. při poruchách kapilární perfuze), antiedematózního (vlivem na svalovou pumpu a perfuzi), tixotropního a disperzního (mechanickou svalovou stimulací a mikromasáží se dosahuje přeměny gelovitých struktur na sol, zvyšuje se elasticita vazů a ligament a lépe se ve tkáních distribuují látky a metabolity). Aplikace indukovaných elektrických proudů v závislosti na jejich proudové hustotě

bezkontaktně generované v ovlivňovaných nervových a svalových tkáních může probíhat jako apercepční (proudové hustoty řádově jednotek A/m^2), jako percepční (proudové hustoty řádově desítek A/m^2), nebo jako svalově motorické (proudové hustoty kolem 100 A/m^2 a více). Zvláště při nadprahově motorických proudových hustotách lze aktivně dosahovat účinku myostimulačního (při svalových dysbalancích, posilování ochablých svalů, např. ochablého svalstva pánevního dna apod.), myorelaxačního (při svalových dysbalancích a svalových spasmatech – antispastický účinek), nervově stimulačního (při neuropatiích periferních nervů) a lze tak zvýraznit i efekty podpory perfuze a trofiky (zvl. při poruchách kapilární perfuze), efekty antiedematózní (vlivem na svalovou pumpu a perfuzi), jakož i účinky tixotropní a disperzní (mechanickou svalovou stimulací a mikromasáží se dosahuje přeměny gelovitých struktur na kvazikapalný koloidní sol; zvyšuje se též elasticita vazů a ligament a lépe se ve tkáních distribuují látky a metabolity). Aplikace přístrojů produkujících vyšší proudové hustoty je určena zejména k nervosvalové stimulaci podpůrného a pohybového aparátu jako podpůrná metoda při léčbě jeho bolestí provázených degenerativních onemocněních, při léčbě následků úrazů a následků metabolických, neurologických a cévních chorob projevujících se na tomto pohybově-podpůrném aparátu, potenciálně pak pro podporu procesů hojení, regenerace a reparace periferních tkání lidského těla.

2.2 Vymezení týkající se předkládaného metodického postupu (pro daný účel a diagnózu)

Předkládaný metodický postup je vymezen na aplikaci bezkontaktně indukovaných elektrických proudů o proudových hustotách vznikajících v léčených tkáních o minimálních hodnotách alespoň 1 A/m^2 a maximálních hodnotách pohybujících se až v řádu několika set A/m^2. Pro bezkontaktní (bezelektrodové) vytváření těchto elektrických fyzikálních intervencí v léčených tkáních je nezbytné využívat časově proměnného nestacionárního magnetického pole, schopného na základě Faradayova zákona elektromagnetické indukce takto vysoké hodnoty indukovaného elektrického proudu generovat, v čemž je zásadní rozdíl od tradiční a již mnoho desítek let zavedené pulzní magnetoterapie. Můžeme zde tudíž hovořit o vysokoindukční magnetické stimulaci.

V předloženém metodickém postupu se zaměřujeme výlučně na ovlivňování příznaků degenerativních onemocnění pohybového aparátu touto formou fyzikální terapie. Předmět metodiky přitom dále omezujeme na ovlivňování příznaků osteoartritidy nosných kloubů, případně páteře.

Podle Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10 se v širším pojetí jedná o kódy M15 až M19, kde je termín osteoartritida používán jako synonymum pro artrózu nebo osteoartrózu. Dále pak kód M47 (artróza nebo osteoartritida páteře degenerace kloubních plošek).

3 Mechanismus účinku terapie

Mechanismus účinku terapie byl v rámci řešení projektu NV16-28784A a pro účely přípravy této metodiky zkoumán ve čtyřech úrovních:

- buněčné
- animální
- preklinické
- klinické

3.1 Výsledky buněčných studií

3.1.1 Studium působení indukovaných elektrických proudů na senzorické nervové buňky

Podařilo se prokázat účinek indukovaných elektrických proudů na změny koncentrace vápenatých iontů jako regulačního podnětu (posla 2. řádu v buněčné komunikaci) v buňkách se simulovaným zánětem a tak přispět k objasnění mechanizmu účinku této fyzikální intervence při sterilních i nesterilních zánětech v oblasti pohybového aparátu a při nervovém přenosu informace o bolesti.

Jako buněčný model účinků bezkontaktně aplikovaných indukovaných elektrických proudů impulzního časového průběhu byly zvoleny primární senzorické nervové buňky, poněvadž klinické efekty fyzioterapeutických přístrojů pro distanční elektroléčbu a vysokoindukční magnetickou stimulaci s vysokou pravděpodobností souvisejí právě s působením indukovaných elektrických proudů na senzorické nervové buňky. Pro studium vlivu indukovaných elektrických proudů byly zvoleny buňky typu F11 (ECACC 08062601),

hybridomální buňky, embryonální neurony ganglií zadních kořenů míšních potkana – tedy model specifické podskupiny senzorických neuronů zodpovědných za převod podnětů různých modalit, včetně podnětů souvisejících s nocicepcí a bolestí, souvisejících se zánětem, úrazem, degenerativním onemocněním lokomočního aparátu, ale také s procesy hojení, reparace a regenerace, tedy s oblastí pokrývanou hlavními klinickými účinky aplikace indukovaných elektrických proudů (pulzní magnetoterapie, distanční elektroléčba, vysokoindukční magnetická stimulace) podávaných odpovídajícími fyzikálně-léčebnými přístroji. Na této buněčné linii jsme pozorovali následující patrné účinky indukovaných elektrických proudů jako důsledku působení nízkofrekvenčního elektromagnetického pole, na které by bylo vhodné se zaměřit i v dalším výzkumu.

Nejprve byl zkoumán vliv impulzního indukovaného elektrického proudu na modelové senzorické nervové buňky v přítomnosti zánětlivého mediátoru, jehož zvýšená koncentrace je v podmínkách *in vivo* spojena s typickými projevy bolesti. Sterilní, někdy i nesterilní zánět je obvyklým stavem provázejícím degenerativní onemocnění pohybového aparátu i následky jeho poškození, což jsou obvyklé indikace přístrojů aplikujících pulzní i harmonické (sinusoidální), respektive interferenční nebo amplitudově modulované indukované elektroléčebné proudy. Zánět byl experimentálně simulován bradykininem, který byl k buněčné kultuře v účinné koncentraci (10 nM) přidán. Bradykinin je nativní vazodilatačně a nocicepčně působící peptid o 9 aminokyselinách, typický zánětlivý mediátor.

Účinek chemicky indukovaných odpovědí byl pozorován jako časový průběh změn koncentrace vápenatých iontů v nitrobuněčném prostředí. Volné kalciové ionty uvnitř buňky jsou odrazem aktivace specifických receptorů, jež vážou bradykinin a aktivují řadu signálních drah v buňce. Je známo, že tyto signální dráhy ovlivňují aktivitu různých iontových kanálů, jejichž otevření způsobí depolarizaci buněčné membrány a následný výlev neuropřenašečů na centrálních synapsích nervových buněk. V centrálním nervovém systému je signál následně modulován a převeden do vyšších nervových struktur. Snahou fyzikálně terapeutických přístupů je příznivě ovlivnit projevy neuroplasticity, podpořit reparaci buňky a normalizaci buněčných procesů, případně zajistit zánik již neopravitelné buňky apoptózou, tedy bez rizika nekrotických procesů ničících okolní buňky.

Na obr. 2 převzatém z publikace (15) je v části obrázku A vlevo znázorněn průměr časového záznamu změn intracelulární koncentrace volných vápenatých iontů v roli posla 2. řádu buněčné komunikace při dvou po sobě následujících třicetivteřinových aplikacích bradykininu na tkáňovou kulturu F11 neuronů. Časový odstup mezi dvěma aplikacemi byl 3 minuty. Bylo sledováno 85 kontrolních buněk (křivka šedé barvy) a 46 buněk exponovaných po celou dobu záznamu časově proměnným nízkofrekvenčním elektromagnetickým polem

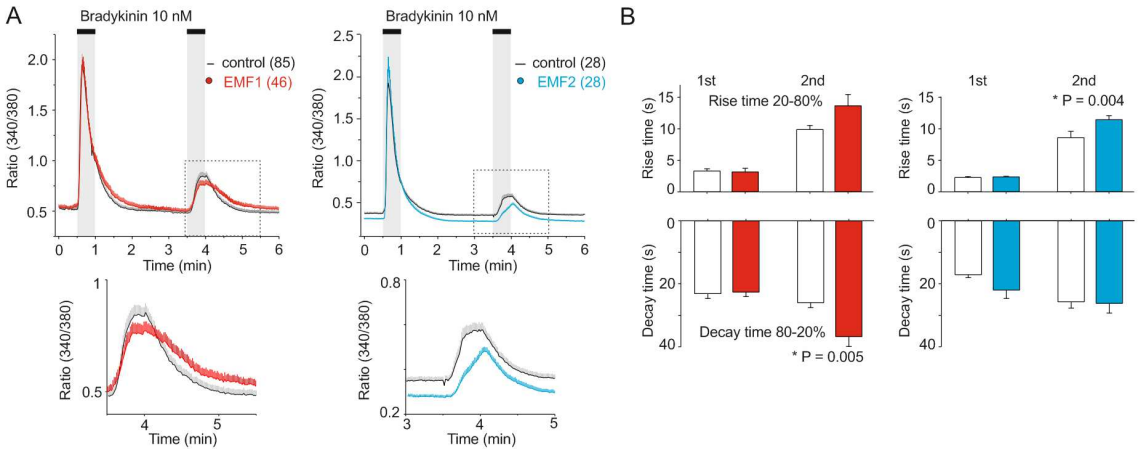
produkujícím biologicky potenciálně účinné impulzy indukovaných elektrických proudů (křivka červené barvy). Použit byl přístroj *VAS-7 edice „Better Future“,* výrobce Embitron s.r.o., s impulzními indukovanými proudy o parametrech typických (1, 3) pro tuto proceduru (proudová hustota 1 A/m^2, frekvence impulzů 72 Hz, šířka impulzu 340 mikrosekund). Data jsou průměrem tří nezávislých experimentů pro každou skupinu, měření jsou realizována ekvidistantně po 1 sekundě.

Na obrázku 2 v části A vpravo je vyobrazen průměr časového průběhu odpovědí na stejný chemický podnět, ovšem při působení indukovaných elektrických proudů o proudových hustotách o jeden až dva řády vyšších (10 – 100 A/m^2), tedy odpovídajících vysokoindukční magnetické stimulaci s percepčními a dokonce i motorickými účinky na dráždivé tkáně (použit byl přístroj pro vysokoindukční magnetickou stimulaci typu *Saluter Moti,* výrobce Embitron s.r.o., max. magnetická indukce 2,5 - 3 T, harmonický bipolární impulz délky 350 – 400 μs (mikrosekund), frekvence 20 Hz, impulzy v paketech o délce 2 s, pauzy doby trvání 5 s, 28 buněk exponovaných, modrá barva křivky, 28 buněk kontrolních, šedá barva křivky).

Odezva má v obou případech podobný charakter, ***i když v případě vyšších proudových hustot je charakter změn vyvolaných fyzikální intervencí výraznější***. Ovšem rovněž distanční elektroterapie (levá část A obrázku 2), aplikující indukované elektrické proudy o proudové hustotě maximálně kolem 1A/m^2, způsobuje zřetelnou odezvu, což svědčí o tom, že distanční elektroterapie ***je na buněčné úrovni prokazatelně účinnou metodou, přestože je apercepční***. Účinek indukovaných elektrických proudů se projevuje až při druhé odpovědi na bradykinin. Snížení citlivosti k mediátoru zánětu v důsledku působení nízkofrekvenčního elektromagnetického pole, respektive jím indukovaných elektrických proudů, může v reálných podmínkách představovat obranný mechanizmus, který chrání buňku před jejím zánikem nebo poškozením.

Při aplikaci indukovaných elektrických impulzů generovaných přístrojem pro distanční elektroléčbu (proudová hustota indukovaných elektrických proudů v amplitudě jejich pulzů cca 1 A/m^2) je účinnost bradykininu snížena a odeznění druhé bradykininové odpovědi výrazně opožděno (viz dolní část obr. 2, část A). Tato pozorování mohou vést k hypotéze, že účinky distanční elektroterapie mohou být nejen reparační, resp. apoptické, ale i ovlivňující výlev neuropřenašečů převádějících informaci o bolesti do centrálního nervového systému. Vlivem aplikovaných indukovaných elektrických proudů může být v podmínkách zánětu snížena účinnost převodu nocicepčního podnětu z periferie do centrálního nervového systému. Tlumená odezva buněčné komunikace v podmínkách modelového zánětu je tedy charakteristická pro působení přístrojů pro distanční elektroterapii. Při aplikaci přístroje primárně určeného pro tzv. vysokoindukční magnetickou stimulaci (proudová hustota

indukovaných elektrických proudů v amplitudě jejich pulzů 10 – 100 A/m^2) se dospělo k podobným závěrům, navíc je však patrné, že účinnost bradykininu je snížena ještě výrazněji, doba nástupu odpovědi je signifikantně zpomalena a doba jejího odeznění je zkrácena obr. 2, část A dole a obr. 2 část B).



Obr. 2: *Ovlivnění intracelulární koncentrace kalciových iontů zvýšené vlivem aplikace bradykininu. Toto ovlivnění je důsledkem vlivu nízkofrekvenčních elektromagnetických polí produkujících indukované elektrické proudy, v jejichž důsledku je vlna zvýšené intracelulární kalciové koncentrace nižší, nastupuje pomaleji, případně i déle přetrvává, čímž může být buňka chráněna před nežádoucím poškozením a zároveň získávat lepší podmínky pro vyrovnání se s důsledky zánětu. Podrobně v impaktované publikované literatuře (15), ze které je tento obrázek převzat.*

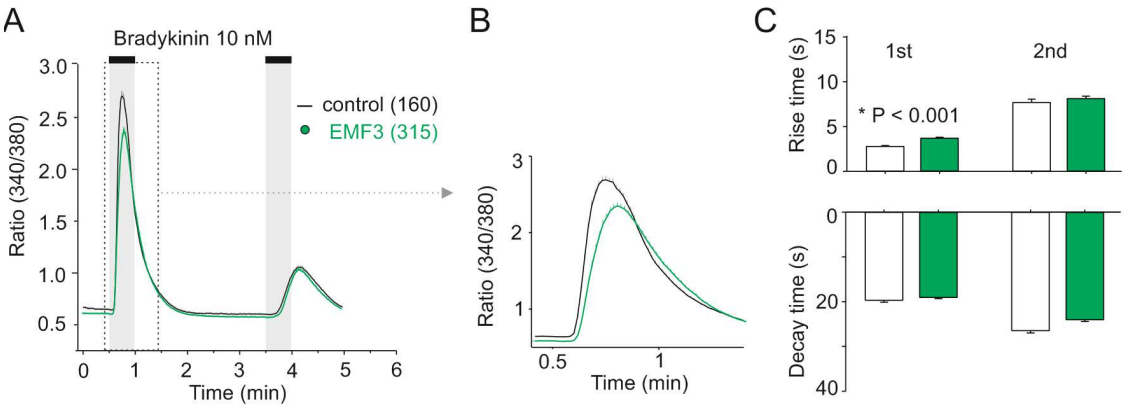
V případě vysokoindukční magnetické stimulace charakterizované proudovými hustotami řádu desítek až stovek A/m^2 je redukce nárůstu koncentrace kalcia v buňce vystavené zánětlivému mediátoru výraznější, ***ovšem tento jev je patrný i při proudových hustotách desetin až jednotek A/m^2 , tedy hodnotách aplikovaných při tzv. distanční elektro-terapii („contactless electrotherapie“).*** Lze uvažovat o hypotéze, že buňka postižená zánětem nebo i jiným oslabením si pod vlivem indukovaných elektrických proudových impulzů lépe zachovává svoji funkčnost a schopnost reagovat na vnější podněty.

Působení indukovaných elektrických impulzních proudů má vliv nejen na snížení koncentrace kalcia v buňce, ale též na rychlost nárůstu i rychlost poklesu koncentrace kalcia v buňce. Prodloužení poklesu koncentrace vápenatých iontů uvnitř neuronu jako informačního podnětu pro buněčnou odpověď je patrno v případě distanční elektroterapie (proudové hustoty v řádu jednotek A/m^2). Buňka tak může aktivovat reparační procesy po delší dobu a s nižším rizikem poškození nebo zničení. Naopak v případě vysokoindukční

magnetické stimulace (proudové hustoty v řádu desítek až stovek A/m^2) je i nárůst koncentrace kalcia signifikantně zpomalen, takže buňka stačí lépe reagovat informaci v době nástupu této informace.

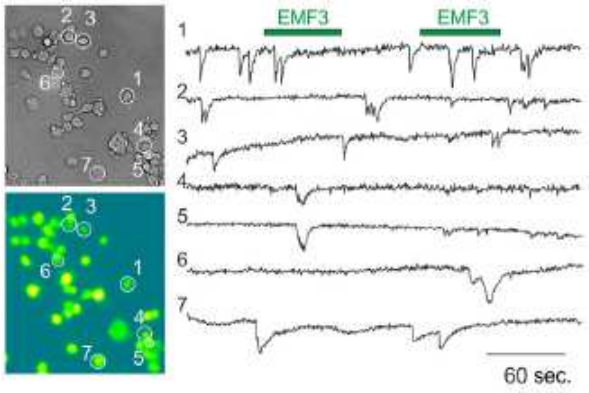
V zásadě má však distanční (bezkontaktní) elektroterapie i vysokoindukční magnetická stimulace na buněčné úrovni senzorických nervových buněk překvapivě podobný efekt, lišící se především intenzitou reakce s popsanými - nikoliv však zásadními - potenciálními výhodami na straně vysokoindukční magnetické stimulace.

Bylo tedy experimentálně potvrzeno, že indukčně vázané nízkofrekvenční impulzní elektrické proudy snižují bradykininem indukovanou vápníkovou odpověď. Pro některé typy vysokoindukční magnetické stimulace (řádově desítky A/m^2 proudové hustoty a delší pulzní pakety s vyššími frekvencemi kolem 50 Hz a výše) se efekt inhibice bradykininové odpovědi v senzorických neuronech neprojevil až při druhé bradykininové odpovědi, ale bezprostředně při první aplikaci bradykininu, s výrazným projevem inhibice a se signifikantně sníženou rychlostí odpovědi (obr. 3).



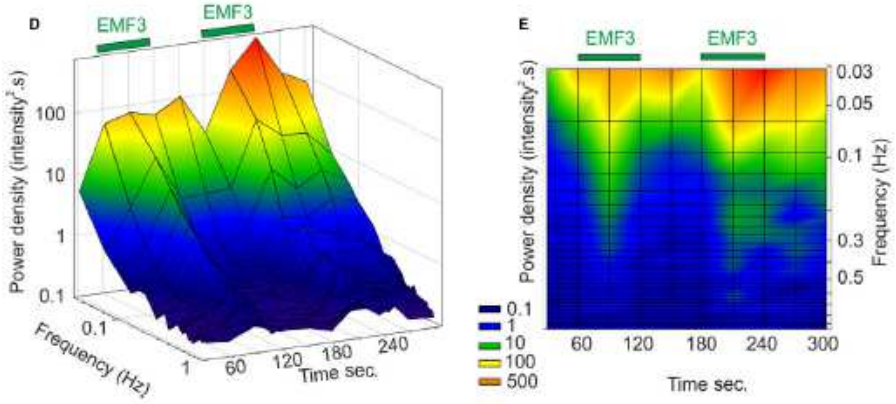
Obr. 3: *Vysokoindukční magnetická stimulace určitých frekvenčních parametrů dokáže ovlivnit reakci buňky na působení zánětlivého mediátoru bradykininu již při první aplikaci bradykininu, navíc s výraznou inhibicí bradykininové odpovědi a se signifikantně sníženou rychlostí nástupu kalciové vlny (B – detail časového průběhu kalciové vlny, C – kvantifikace v histogramu). Převzato z (15).*

Experimentálně byl rovněž studován vliv indukčně vázaných impulzních elektrických proudů o vysokých proudových hustotách (vysokoindukční magnetická stimulace, proudové hustoty v buněčné suspenzi desítky až stovky A/m^2) na spontánní aktivitu sledovaných primárních aferentních senzorických buněk, tedy bez ovlivnění mediátorem zánětu bradykininem. Buňky projevující spontánní aktivitu se ve fluorescenčním mikroskopu jeví jako zeleně svítící, ilustraci poskytuje následující obrázek číslo 4.



Obr. 4: *Nízkofrekvenční elektromagnetické pole s parametry odpovídajícími vysokoindukční magnetické stimulaci zvyšuje spontánní aktivitu sledovaných primárních aferentních senzorických buněk. Vodorovné úsečky označené EMF3 představují intervaly působení vysokoindukční magnetické stimulace. Převzato z (15).*

Samotné objektivní vyhodnocení tohoto jevu však není deterministické, ale musí se využívat statistických metod, speciálně výpočtu spektrální výkonové hustoty získaného frekvenčního signálu. Tímto analytickým nástrojem byla zcela jednoznačně potvrzena závislost spontánní aktivity buněk na aplikované vysokoindukční magnetické stimulaci. Na obr. 5 je patrné, že v době působení elektrického podnětu a určitou dobu po něm je spontánní buněčná aktivita signifikantně zvýšena:

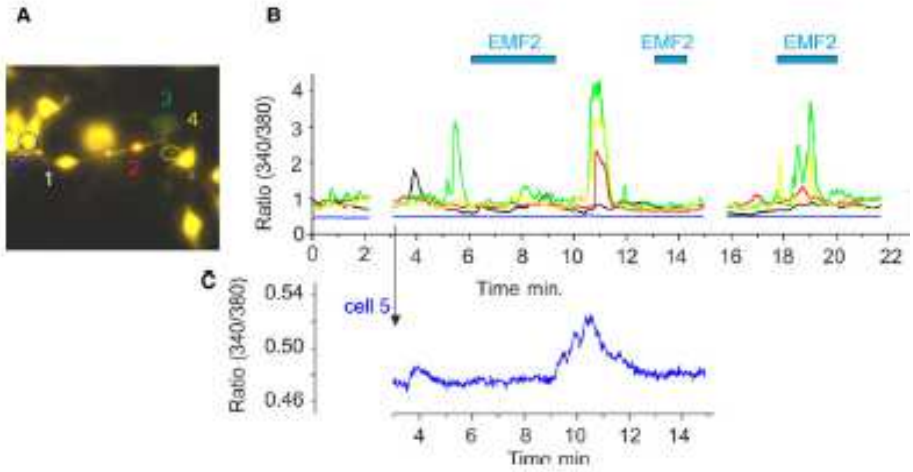


Obr. 5: *Spektrální výkonová hustota signálu odpovídajícího spontánní aktivitě buněk je zvýšena vlivem aplikace vysokoindukční magnetické stimulace. Výsledky byly získány ze 154 buněk, viz literatura (15).*

Tento výsledek poukazuje na klinický význam vysokoindukční magnetické stimulace týkající se podpory spontánní aktivity neuronů, čímž se otevírají možnosti dalšího testování hypotéz,

které by mohly vést ke smysluplnému využití této procedury v celé řadě klinických neurologických indikací. Zdůrazněme, že ***tento jev byl pozorován pouze u vysoko-indukční magnetické stimulace s proudovými hustotami alespoň v řádu desítek A/m^2***, tedy indukovanými elektrickými pulzními proudy klinicky způsobujícími již alespoň percepční efekty. U samotné distanční elektroterapie s proudovými hustotami kolem 1 A/m^2 nebyl tento jev pozorován.

Otázky vzniku a přenosu informace o bolesti a její modulace působením distanční elektroléčby a vysokoindukční magnetické stimulace byly našim výzkumným týmem rovněž studovány na modelu F11 buněk, do kterých byl ***experimentálně vnesen gen kódující TRPA1 receptory***. Aktivita tohoto receptoru zajišťuje převod nocicepčních podnětů na primárních aferentních senzorických neuronech u savců. Tyto iontové kanály mají klíčovou úlohu v mechanizmech vzniku bolesti (nocicepce) při zánětu a cílem bylo zjistit, zda vysokoindukční magnetická stimulace může ovlivnit aktivitu právě těch neuronů, které TRPA1 zvýšeně exprimují. Zjistili jsme, že pod vlivem vysokoindukční magnetické stimulace je zřetelně potlačována neuronální aktivita, viz následující grafy na obr. 6:



Obr. 6: *Potlačení neuronální aktivity buněk F11 se zmnoženými TRPA1 receptory vlivem vysokoindukční magnetické stimulace. Převzato z (10).*

Zmiňované výzkumy byly uskutečněny ve spolupráci s Oddělením buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v Praze.

3.1.1.1 Analýza souvislostí výsledků klinického výzkumu s výsledky buněčného výzkumu na senzorických nervových buňkách

Provedené klinické studie byly zaměřeny na sledování efektu ústupu bolesti jako klíčového příznaku degenerativního onemocnění pohybového aparátu. Při řešení projektu jsme byli vedeni snahou zjistit, zda a jakým způsobem ovlivňuje vysokoindukční magnetická stimulace (HIMS) biologické procesy probíhající v buňkách a tkáních. Výsledky buněčných výzkumů na senzitivních nervových buňkách nám dovolily formulovat zásadní předpoklady fungování HIMS na buněčné úrovni. Ukázalo se, že v modelovém případě zánětu, jemuž jsou vystaveny citlivé aferentní nervové buňky vedoucí informaci o bolesti a samy podléhající poškozením vyvolaným působky zánětu (v našem modelu bradykinin), je fyzikální intervence HIMS schopna snížit amplitudu nárůstu intracelulární koncentrace kalcia i rychlost nástupu nárůstu této koncentrace. Můžeme tudíž hovořit o potlačení nadměrných projevů zánětu. Tento mechanismus může nepochybně přispět k záchraně buňky před jejím zánikem nekrózou, umožnit jí správně reagovat na zánět, uplatnit inherentní regulační mechanismy, nebo alespoň přejít na mechanismus zániku buňky apoptózou, nikoliv nežádoucí nekrózou.

Poněvadž se jedná o senzitivní aferentní buňku, zkoumali jsme dále ovlivnění mechanismů vzniku a vedení informace o bolesti na této nejnižší buněčné úrovni. K tomu jsme vnesením příslušného genu do senzitivní nervové buňky experimentálně exprimovali větší počet TRPA1 receptorů bolesti v této buňce. ***Ukázalo se, že za přítomnosti zánětu vlivem HIMS klesá spontánní aktivita těchto afrerentních buněk vedoucích informaci o bolesti, na jejímž vzniku se TRPA1 receptory zásadním způsobem podílejí. Naopak, pokud buňka není ovlivňována projevy zánětu, její spontánní aktivita se pod vlivem HIMS signifikantně zvyšuje. Působení HIMS je tudíž schopno za přítomnosti zánětu informaci o bolesti tlumit, a to ihned na buněčné úrovni v místě jejího vzniku. Naopak pokud není senzitivní nervová buňka zatěžována poškozující noxou (v našem modelu bradykinin), je schopna pod vlivem HIMS fungovat s vyšší výkonností vzniku a přenosu nervových vzruchů. Zde může být principiální příčina stimulujícího účinku HIMS při některých neuropatiích.***

Při našich buněčných studiích bylo používáno v zásadě třech velikostí proudových hustot přítomných v experimentálním materiálu průtokem indukovaných elektrických proudů vznikajících v důsledku časově proměnných magnetických polí při vysokoindukční magnetické stimulaci na základě Faradayova zákona elektromagnetické indukce (2. Maxwellův zákon).

Aplikované hodnoty proudových hustot se nacházely:

- v řádech jednotek A/m^2 (při klinických aplikacích ještě bez percepčních efektů),
- v řádech desítek A/m^2 (při klinických aplikacích s percepčním efektem),
- v řádech stovek A/m^2 (při klinických aplikacích se svalově motorickým efektem).

Snížení amplitudy nárůstu intracelulární koncentrace kalcia i zpomalení rychlosti nástupu nárůstu této koncentrace jsme zaznamenávali – i když v poněkud kvalitativně i kvantitativně odlišných projevech - v zásadě při všech třech řádově se lišících proudových hustotách.

Účinek indukovaných elektrických proudů na potlačování nežádoucích projevů zánětu na buněčné úrovni a při záchraně fungování buňky i buňky jako takové je tedy jen málo závislý na intenzitě a lze jej předpokládat i u méně výkonných přístrojů. Naopak, efekty potlačení spontánní aktivity senzitivní buňky za přítomnosti zánětu vyvolávajícího bolestivé vzruchy, respektive efekty vzrůstu spontánní aktivity neuronu v situaci bez zánětu (ale např. s omezenou schopností buňky vytvářet a vést vzruchy) jsou patrny jen při silnějších intervencích. Převratné výsledky tohoto výzkumu dobře ilustruje publikace (15):

> *Průcha, J., Krusek, J., Dittert, I., Sinica, V., Kadkova, A., Vlachova, V. Acute exposure to high-induction electromagnetic field affects activity of model peripheral sensory neurons. J Cell Mol Med, roč. 22, 2018, č. 2, s. 1355-1362.*

Výsledky tohoto výzkumu z roku 2017 a 2018 se opakováním pečlivě připravených experimentů s frekvencí 72 Hz (dále) podařilo zopakovat s nově vyvinutým prototypem přístroje produkujícího vyšší frekvenci 72 Hz a užší, půlsinusoidální impulz o době trvání 180 – 200 mikrosekund i v posledním roce řešení projektu 2019.

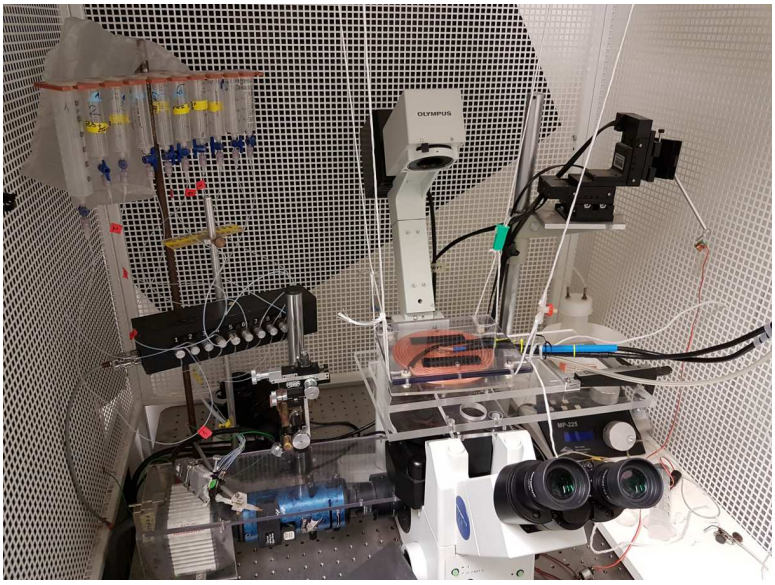
Buněčnému výzkumu byla věnována mimořádná pozornosta byl rozvinut až na molekulární úroveň. V rámci tohoto výzkumu byly zkoumány obecné mechanizmy, které mohou být zodpovědné za **citlivost proteinů** k elektromagnetickému poli. Na molekulární úrovni byla též studována **aktivita tzv. elektoromagnetického perceptivního genu (EPG),** který je citlivý na působení slabého statického (permanentní magnet) i střídavého magnetického pole (50-70 mT, 5ms pulzy o frekvenci 10 Hz). Tento protein byl v nedávné době izolován z elektroreceptorového orgánu sumečka průsvitného (Kryptopterus bicirrhis). Návrh experimentů provedených během roku 2019 vycházel z předpokladu, že EPG protein zřejmě nevytváří iontový kanál a mechanizmus, kterým je převeden elektromagnetický signál na aktivaci senzorické buňky není zatím znám. Podle navrženého harmonogramu byly provedeny experimenty, ve kterých byl EPG gen heterologně exprimován v lidských

embryonálních ledvinných buňkách společně s genem pro zelený fluorescenční protein a snímána byla aktivita dvěma technikami: Ca2+-imaging (Fura-2) a snímání změn membránového potenciálu za využití fluorescenční sondy FluoVolt™. Porovnávány byly účinky orientace aplikační cívky, intensity stimulace a frekvence. Podařilo se prokázat, že přítomnost EPG proteinu zvyšuje pravděpodobnost Ca2+-odpovědí. Vzhledem k tomu, že se nejedná o iontový kanál, znamená to zvýšený výlev vápenatých iontů z endoplazmatického retikula. Výsledky experimentů byly popsány v přehledném článku (8):

> *Navratil, L., Dylevsky, I., Prucha, J., Krusek, J., Dittert, I., and Vlachova, V. (2019). Studium buněčných mechanismů působení vysokoindukčního elektromagnetického pole na periferní senzorické neurony. Československá fyziologie 68(1), 16-21.*

Kromě uvedených plánovaných experimentů byl studován z hlediska citlivosti k elektromagnetickému poli nedávno identifikovaný protein TAX-4. Podařilo se nám získat plazmid od členů týmu, který prokázal úlohu tohoto iontového kanálu v citlivosti ke geomagnetickému poli in vivo u modelového organismu háďátka obecného. Plazmidová DNA byla amplifikována, sekvenována a exprimována v HEK293T buňkách společně s červeným fluorescenčním proteinem. Pilotní experimenty naznačují slibný směr dalšího studia, který by mohl prokázat úlohu glykosylace jako mechanizmu zodpovědného za vyvolání konformačních změn proteinů vlivem elektromagnetického pole.

Byly rovněž provedeny další experimenty, jejichž cílem bylo porovnání účinků prototypu zcela nově vyvinutého přístroje pro vysokoindukční magnetickou stimulaci s našimi předchozími výsledky získanými s různými typy elektromagnetických stimulačních zařízení, popsanými v publikaci (15) Prucha et al. (2018) J. Cell. Mol. Med. 22(2), 1355-1362. Přístroj byl použit v uspořádání zobrazeném na obr. 18 při nastavení: 72 Hz, paket 2 s, pauza 10 s, intenzita 50% (2 T). Aplikátor byl intenzivně chlazen vzduchem a po 2 minutách aplikace ihned odtažen, aby se zabránilo opožděnému efektu ohřátí prostoru nad preparátem. Analyzovali jsme poměr intenzit fluorescence Fura-2 na dvou vlnových délkách (340 a 380 nm) u modelových senzorických neuronů F11. Experimenty potvrdily, že akutní stimulace opět vyvolává zvýšenou pravděpodobnost vápníkových odpovědí. Případné opožděné účinky stimulátoru je obtížné posoudit, protože aplikace střídavého elektromagnetického pole vyvolává vibrace pohyblivých částí invertovaného mikroskopu a nelze technicky zajistit, aby obraz buněk byl stabilní a umožnil spolehlivou analýzu. Je tedy možné, že část dlouhodobých odpovědí obsahuje složku vznikající mechanickou stimulací, která souvisí s individuální buněčnou morfologií a mírou diferenciace neuronů.



Obr. 7: *Uspořádání experimentu s fluorescenční mikroskopií*

Celkově se v rámci řešení projektu NV16-28784A podařilo vyvinout spolehlivý buněčný model senzorických neuronů, který umožňuje studovat účinky elektromagnetického pole ex vivo. Byl testován účinek pěti různých typů stimulačních zařízení (certifikovaných VAS-07 STRONG, SALUTER MOTI, SALUS TALENT, DIPOL SETA-D a prototypové zařízení vyvinuté v rámci projektu).

Pro laboratorní účely bylo vyvinuto zařízení umožňující testování účinků různých parametrů elektromagnetického pole na buňky v tkáňové kultuře. Na základě našich měření vyslovujeme obecnou hypotézu, že kromě akutního stimulačního efektu vyvolává dlouhodobější stimulace i změny klidového membránového potenciálu ve směru hyperpolarizace. Podařilo se prokázat, že existují proteiny (EPG, TRPA1, TAX-4), jejichž zvýšená exprese může vést ke zvýšené citlivosti buněk k elektromagnetickému poli.

3.1.2 Studium působení indukovaných elektrických proudů na endoteliální a mezenchymální stromální buňky

Kromě studia ovlivnění senzorických buněk vysokoindukční magnetickou stimulací se na buněčné úrovni experimentovalo též s endoteliálními a mezenchymálními stromálními buňkami. Zde se pracovalo s proudovými hustotami kolem 1 A/m^2, ale se dvěma odlišnými typy časového průběhu signálu (odlišné spektrální vlastnosti signálu): impulzním a amplitudově modulovaným harmonickým (sinusoidálním). Impulzní stimulace byla schopna podpořit viabilitu a metabolismus endoteliálních buněk, ale neměla vliv na stromální buňky. Naopak,

stimulace modulovanými harmonickými indukovanými elektrickými proudy vedla u stromálních buněk k vyšší schopnosti jejich migrace a ke zvýšené produkci matrixmetaloproteináz, zatímco impulzní proudy biologické efekty u těchto buněk nevykazovaly.

Na základě získaných unikátních výsledků tohoto výzkumu lze předpokládat, že impulzní stimulace bude vhodná zvláště pro podporu neovaskularizace a arteriogeneze v poškozených tkání, zatímco stimulace amplitudově modulovanými harmonickými proudy podpoří regenerativní procesy. Tento výklad by odpovídal i klinickým zkušenostem, že jak impulzní, tak harmonická elektrostimulace podporují hojení, poněvadž proces hojení vyžaduje jak účinné zapojení regenerativních procesů zahrnujících regenerativní (stromální) buňky, tak neovaskularizaci.

Zároveň se ukazuje, že pro stimulaci těchto procesů není nezbytně nutné aplikovat vysoké magnetické indukce a extrémně vysoké hodnoty proudových hustot indukovaných elektrických proudů. Na druhé straně je však zřejmé, že k docílení pozorovaných efektů bylo potřebné pohybovat se alespoň v proudových hustotách blížících se 1 A/m^2, což je v plné shodě s některými zahraničními zkušenostmi.

Uvedené výsledky výzkumů na buněčné úrovni jsou podrobně zpracovány v publikacích uveřejněných během roku 2019 v impaktovaných časopisech (16, 17):

> *Průcha, J., Skopalik, J., Socha, V., Hanáková, L., Knopfová, L., Hána, K. Two types of high inductive electromagnetic stimulation and their different effects on endothelial cells. Physiol Res, roč. 68, 2019, č. 4, s. 611-622.*
>
> *Průcha, J., Skopalik, J., Justan, I, Parák, T., Gabrielová, E, Hána, K., NavrátiL, L. High Inductive Magnetic Stimuli and Their Effects on Mesenchymal Stromal Cells, Dendritic Cells, and Fibroblasts. Physiol. Res. 68 (Suppl. 4): S000-S000, 2019.*

Za významnou publikaci, především pro praktické klinické uplatnění výsledků našich buněčných a dalších preklinických výzkumů, považujeme též (13):

> *Průcha, J., Dylevský, I., Navrátil, L., Vlachová, V., Krůšek, J., Dittert, I., Skopalik, J., Klapalová, A., Štengl, M., Socha, V. Přínosy základního, preklinického a klinického výzkumu k uplatnění indukovaných elektrických proudů v indikacích rehabilitační a fyzikální medicíny. Rehabilitace a fyzikální lékařství 2019, 26, č. 4.*

Uveďme zde podrobněji, že další, dosud probíhající biomedicínský výzkum preklinických účinků indukovaných elektrických proudů produkovaných zdravotnickými prostředky typu

„distanční elektroterapie“ s indukovaným elektrickým polem řádů desetin až jednotek V/m, je zaměřen na:

a) výzkum vlivu impulzních i interferenčních indukovaných elektrických proudů na endoteliální buňky.
b) výzkum vlivu impulzních i interferenčních indukovaných elektrických proudů na stromální mezenchymální buňky.

Ad a)

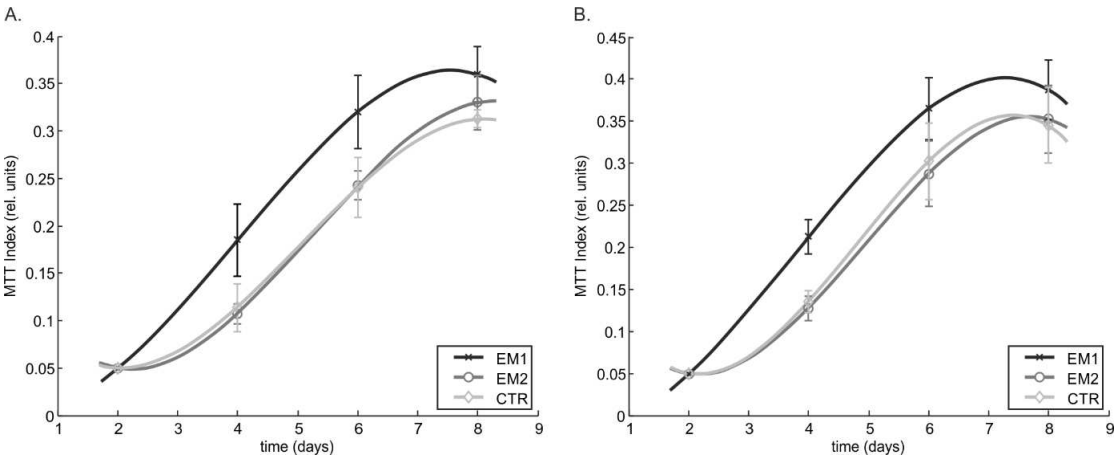
Endoteliální buňky jsou vysoce specializované epitelové buňky, které lemují srdce, cévy a lymfatické cévy, které tvoří endotel. Jsou polygonálního tvaru a spojeny jsou tzv. tight junctions. Tight junctions umožňují variabilní propustnost pro specifické makromolekuly, které jsou přepravovány přes endoteliální vrstvy. Endoteliální buňky mají zcela zásadní význam při angiogenezi - procesu nezbytném při jakémkoliv hojení, zánětu i při kompenzaci degenerativních onemocnění tkání, tedy prakticky ve všech indikacích distanční elektroléčby a vysokoindukční magnetické stimulace.

Byly zkoumány lidské i myší endoteliální buňky pod vlivem impulzních indukovaných elektrických proudů typických jako léčebné agens pro přístroje určené k jejich aplikaci (distanční čili bezkontaktní elektroterapie). V případě těchto impulzních indukovaných elektrických proudů můžeme počítat s následujícími parametry:

- hodnota špička - špička magnetického pole 5 mT,
- šířka impulzu 340 µs; tvar budicího impulzu rektangulární,
- frekvence 72 Hz,
- aplikace této frekvence po dobu 2,5 sekundy (burst), pak 0,5 sekundy pauza a dále periodicky.

Indukované elektrické proudové impulzy mající hodnotu špička - špička 4,5 mV/cm v buňkách vytvářejí proudovou hustotu 0,27 A/m^2 (při předpokládané měrné vodivosti suspenze buněk 0,6 S/m).

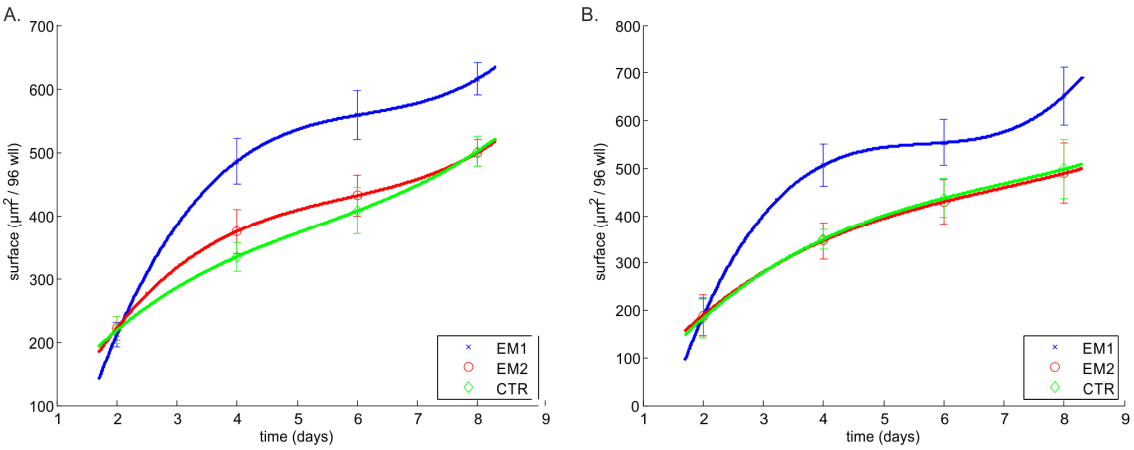
Parametry těchto impulzních proudů jsou tedy identické parametrům proudů uplatňovaných ve výzkumných i klinických pracích prof. C.A.L. Bassetta, označovaným jako single pulze, SP (1,2).



Obr. 8: Metabolická aktivita lidských (vlevo) a myších (vpravo) endoteliálních buněk. Křivka s označením EM1 představuje vliv distanční elektroterapie produkující impulzní proudy 72 Hz, šíře 340 mikrosekund, křivka s označením EM2 představuje distanční elektroterapii produkující harmonické (sinusoidální) proudy s nosnou frekvencí 5 kHz, amplitudově modulované, a označení CTR je vyhrazeno pro kontrolní skupinu. Pouze impulzní indukované el. proudy signifikantně zvyšují metabolismus endoteliálních buněk.

Obrázek. 8 ukazuje zvýšení metabolické aktivity lidských (vlevo) i myších (vpravo) endoteliálních buněk pod vlivem indukčně vázaných impulzních elektrických proudů produkovaných přístrojem pro distanční čili bezkontaktní elektroterapii (označeno EM1), křivka označená CTR je neozařovaná kontrolní skupina buněk, křivka označená EM2 představuje v tomto případě neúčinnou formu působení indukovaného proudu s amplitudově modulovaným harmonickým (sinusovým) průběhem, byť se srovnatelnou hodnotou amplitudy proudové hustoty indukovaného elektrického proudu tohoto harmonického průběhu. Metabolická aktivita byla ohodnocena fotometricky prostřednictvím testu MTT.

Kromě zvýšení metabolické aktivity bylo experimentálně prokázáno též celkové zvýšení viability endoteliálních buněk, na které působily induktivně vázané impulzní elektrické proudy produkované přístrojem pro distanční elektroterapii (obr. 9). Bylo tedy prokázáno rovněž zvětšení počtu endoteliálních buněk, tedy jejich usilovnější množení (na obr. 9 označeno EM1, modré křivky). Celkový počet buněk byl měřen numerací na fluorescenčním mikroskopu po obarvení Calcein AM vitálním barvivem, statistika byla prováděna z 10 zorných polí objektivu 10x, přepočtena na buněčnost/cm^2, viz grafy na obrázku níže, opět pro lidské (vlevo) i myší (vpravo) endoteliální buňky, a opět ve srovnání s kontrolou (označenou CTR, zeleně) i s neúčinným působením indukovaného proudu s amplitudově modulovaným harmonickým (sinusovým) průběhem, byť se srovnatelnou hodnotou amplitudy proudové hustoty tohoto indukovaného elektrického proudu (označeno EM2, červené křivky).



Obr. 9: *Zvětšení počtu endoteliálních buněk, tedy stimulace jejich množení, pod vlivem impulzních indukovaných elektrických proudů demonstrují modré křivky. Obdobný výsledek byl získán u myších (vpravo) i lidských (vlevo) endoteliálních buněk. Zlené křivky odpovídají kontrole, červené neúčinnému působení indukovaných elektrických proudů s amplitudově modulovaným harmonickým (sinusovým) průběhem.*

Ad b)

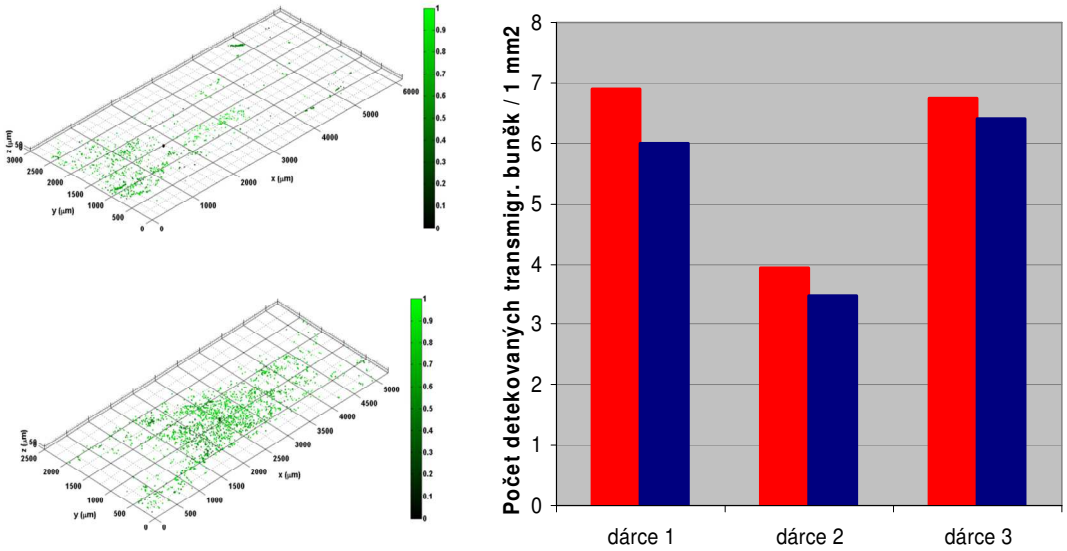
Stromální mezenchymální buňky jsou multipotentní buňky schopné obnovovat poškozené tkáně. Jsou schopné se měnit (diferencovat) na široké spektrum buněčných typů, jako je chondrocyt, adipocyt, osteocyt, osteoblast, myocyt, kardiomyocyt, neuron či inzulin produkující buňka. Stromální mezenchymální buňky jsou proto důležité při jakémkoliv procesu hojení, regenerace a reparace (7), zvláště tkání lokomočního aparátu, kůže a nervových buněk, tedy v celém spektru indikací příslušných metod a fyzikálně-léčebných přístrojů, jejichž účinky se v této metodice zabýváme.

Důležití je, že indukované elektrické proudy produkované příslušnými fyzikálně-léčebnými přístroji mohou příznivě ovlivňovat jak vlastní stromální buňky nacházející se nativně v léčených tkáních pacienta, tak i stromální buňky vpravené do léčené části těla iatrogenně.

Experimentální důkaz účinku interferenčních indukovaných elektrických proudů na stromální mezenchymální buňky byl proveden na buňkách získaných z lidské tukové tkáně a to s následujícími parametry harmonických (sinusoidálních), amplitudově modulovaných proudů typických pro distanční elektroléčbu a odpovídajících parametrům harmonických, resp. interferenčních proudů aplikovaných ve fyzikální léčbě a rehabilitaci:

- hodnota špička - špička magnetického pole 6 mT,
- harmonická nosná frekvence 5 000 Hz, amplitudově modulována frekvencí 1 až 100 Hz se 100% promodulací, po dobu 6 sekund frekvenční vzestup (sweep) od 1 Hz do 100 Hz lineárně, po dobu dalších 6 sekund pokles ze 100 Hz na 1 Hz opět lineárně,
- indukované interferenční proudy (špičková hodnota při jedné polaritě) při intenzitě elektrického pole 18,8 mV/cm; vytvářejí proudovou hustotu 1,1 A/m^2 (za předpokladu měrné vodivosti suspenze buněk 0,6 S.m).

Veškeré elektrické a magnetické veličiny byly měřeny pomocí přístroje Maschek ESM100 firmy Maschek (BRD) a pomocí přístroje Gaussmeter GM05 fy Hirst Magnetic Instruments Ltd. (GB). Studie byla provedena na společných pracovištích Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně a Biomedicínckého ústavu Fakulty elektrotechniky a informatiky Vysokého učení technického v Brně. Ilustrativní sken v okrsku 200 x 600 mikrometrů ukazuje signifikantně zvýšenou schopnost stromálních buněk migrovat k místu léze přes kolagenní vrstvu a membránu. Histogram pak vystihuje kvantifikaci tohoto jevu dosaženého stimulací sinusoidálními, amplitudově modulovanými, indukčně vázanými proudy s nosnou frekvencí 5 kHz (migrační projevy stimulovaných buněk vyznačeny na histogramu červeně, kontrolních, nestimulova-ných modře, tři různí dárci stromálních mezenchymálních buněk získaných ultracentrifugací z tukové tkáně):



Obr. 10: *Zvýšení migrační schopnosti lidských mezenchymálních stromálních buněk tří různých dárců pod vlivem indukovaných elektrických proudů harmonického (sinusoidálního) časového průběhu, amplitudově modulovaných v souladu s požadavky na interferenční elektroterapii. Stimulovaným buňkám přísluší červeně vybarvené histogramy, kontrolní skupině modře vybarvené histogramy. V levé části obrázku je mikroskopické zobrazení migrace stromálních buněk, nahoře kontrolní skupina, dole stimulované buňky.*

Bylo experimentálně dokázáno, že indukované elektrické proudy sinusoidálního (harmonického) průběhu, amplitudově modulované po vzoru léčebných proudů interferenčních určených pro distanční elektroterapii, působí rovněž signifikantní zvýšení produkce matrix-metaloproteináz, enzymů majících význam při hojení tkání a regeneraci. Matrix-metaloproteinázy jsou důležité pro řadu biologických dějů zahrnujících například buněčnou proliferaci, diferenciaci a zvláště pak remodelaci extracelulární matrix, nebo také angiogenézi a buněčnou migraci. Impulzní indukované elektrické proudy produkované přístrojem pro distanční elektroterapii na stromální mezenchymální buňky vliv nevykazovaly. Tyto závěry slouží mimo jiné pro podporu vhodné kombinace impulzních a interferenčních indukčně vázaných elektrických proudů v přístrojích určených pro tzv. distanční (bezkontaktní) elektroterapii.

3.2 Výsledky animálních studií

3.2.1 Animální studie ovlivňování projevů osteoartritidy kolenního kloubu u králíka

Z pohledu úžeji pojatého tématu projektu NV16-28784A promítnutého do vypracování této metodiky bychom kromě všech výše uvedených experimentů a studií a jejich interpretací potřebovali rovněž posoudit, jak jsou působením fyzikální intervence HIMS ovlivněny poškozené struktury a jak se změní osteoartritické markery nejčastěji degenerativně zasažených částí pohybového aparátu – kloubů, případně jak je ovlivněna mobilita postiženého jedince. Poněvadž tyto aspekty nelze tak snadno zkoumat na humánních modelech, provedli jsme studii animální. Tuto studii jsme po důkladné přípravě v roce 2017 zahájili již v roce 2018 a její rozhodující část a vyhodnocení jsme realizovali v roce 2019.

Jako experimentální zvíře jsme zvolili dospělé (4 – 5 měsíců) zdravé samce králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*); HIL (crossbred NZB x CA), hmotnost 2,70 ± 10 kg, původ zvířat: Oddelenie toxikológie a chovu laboratórnych zvierat, číslo : SK CH 24016, CEM, ÚEFT, Slovenská akademie věd, 919 54 Dobrá Voda č. 360.

Osteoartritída se indukovala enzymaticky, podáním 0,5 ml roztoku kolagenázy typu II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland, skladováno při teplotě 2-8°C) v dávce 1,5 mg/ml ve fyziologickém roztoku intraartikulární injekcí do pravého i levého kolenního kloubu králíka v úplné anestézii zajištěné směsí Zoletil+xylazín (25 mg/kg + 16 mg/kg, lékopisná kvalita). Místo vpichu se znecitlivělo ještě lokální anestézií vyvolanou subkutánní

aplikací 1 % mezokainu. Osteoartritídu vyvolávající agens se podávalo v -4. a 0. dni experimentu všem zvířatům,, u nichž měla být ostoartritída indukována. Sledovaná plocha v kolenní oblasti zvířete byla vyholena, umyta čistou teplou vodou a vydezinfikována dezinfekčním prostředkem určeným pro desinfekci kůže Septoderm. Vždy byla přesně vyhmátnuta štěrbina kolenního kloubu a do tohoto prostoru se jemně zavedla jehla injekční stříkačky obsahující popsanou artritidu indukující látku, která se tímto způsobem aplikovala do dané oblasti. V kontrolní skupině (sham, negativní kontrola) se zcela shodným způsobem aplikoval fyziologický roztok. Po vpichu se koleno opět vydesinfikovalo a překrylo sterilním obvazem. Po zákroku i během léčby bezkontaktně indukovanými elektrickými proudy se zvířatům poskytovala standardní veterinární péče a ustájení ve vydesinfikovaných nerezových klecích s plastovou podlahou v počtu jeden králík na plochu 4 200 cm^2. Laboratorní zvířata byla rozdělena do skupin (ve středním sloupci uveden počet zvířat):

Pozitivní kontrola	6	osteoartritída indukována a zvířata neléčena
EMF 1 A/m2 harm	8	ostoeartritída indukována, působeno indukovanými el. proudy o proudové hustotě v řádu jednotek A/m2 se sinusoidálním (harmonickým) amplitudově modulovaným průběhem
EMF 1 A/m2 pulz	4	ostoeartritída indukována, působeno indukovanými el. proudy o proudové hustotě v řádu jednotek A/m2 s pulzním průběhem
EMF 10 A/m2 20 Hz	5	ostoeartritída indukována, působeno indukovanými el. proudy o proudové hustotě v řádu desítek A/m2 s frekvencí 20 Hz sinus
EMF 10 A/m2 72 Hz	5	ostoeartritída indukována, působeno indukovanými el. proudy o proudové hustotě v řádu desítek A/m2 s frekvencí 72 Hz půlsinus
Negativní kontrola	5	ostoeartritída neindukována, bez působení indukovaných el. proudů

Tabulka 1: Soubor experimentálních zvířat

Po 56 dnech byla laboratorní zvířata humánně usmrcena předávkováním anestetika (Zoletil 100 mg/kg + xylazín 16 mg/kg, i.m.). Následně probíhal výzkum post mortem, na jehož počátku byly vypreparovány potenciálně postižené struktury pohybového aparátu.

3.2.1.1 Densitometrie

Bylo předpokládáno, že postižení kolenního kloubu osteoartritidou se projeví snížením density femuru. Laboratorní zvíře s indukovanou asteoartrózou bude mít významně omezenou pohyblivost a tím i nefyziologicky snížené zatěžování příslušné kosti. Absence fyziologického zatěžování příslušné části skeletu pak povede ke snižování kostní density směrem k ostopenii až osteoporóze. Densitometrické vyšetření vypreparovaných femurů demonstruje obrázek 11.

Obr. 11: *Příprava a provádění densitometrie femuru*

Densitometrickému vyšetření femuru post mortem byli podrobeni tři králíci ze skupiny „EMF 1 A/m^2 pulz“ a dva králíci ze skupiny „EMF 1 A/m^2 harm“, tedy ze skupin, kde působení indukovaných elektrických proudů v řádu jednotek A/m^2 nevyvolávalo ještě ani prahově motorické efekty. Při použití vyšších proudových hustot indukovaných elektrických proudů, odpovídajících aplikaci přístrojů produkujících magnetická pole o velikosti magnetické indukce jednotek Tesla, byla laboratorní zvířata explozivně excitována a experimenty by nebylo možno provést jinak, než v úplné anestezii, což by však bylo v rozporu s podmínkami schválené studie a navíc i v rozporu s požadavkem volného pohybu zvířat v klecích a jeho

kvantifikace. Byl by tím porušen i zásadní aspekt této fáze výzkumu, neboť indukované svalové kontrakce by simulovaly fyziologické zatěžování kosti a bránily by tak vzniku předpokládané osteopenie. Jako positivní kontrola bylo využito šesti králíků, jako negativní kontrola pěti králíků. Výsledky měření byly následující:

Pozitivní kontrola, osteoartritída indukována a zvířata neléčena:

$BMD = 0{,}20 \pm 0{,}01\ g/cm^2$

$BMC = 1{,}82 \pm 0{,}16\ g$

Negativní kontrola, ostoeartritída neindukována, bez působení indukovaných el. proudů:

$BMD = 0{,}22 \pm 0{,}01\ g/cm^2$

$BMC = 2{,}17 \pm 0{,}25\ g$

Skupina, kde byla ostoeartritída indukována a bylo působeno indukovanými el. proudy

o proudové hustotě v řádu jednotek A/m^2 s časovým průběhem pulzním, resp. modulovaným sinusoidálním:

$BMD = 0{,}19 \pm 0{,}01\ g/cm^2$

$BMC = 1{,}62 \pm 0{,}10\ g$

Rozdíly v parametrech density kosti BMD (Bone mineral density) a BMC (Bone mineral content) mezi jednotlivými skupinami však nejsou statisticky významné a nemůžeme tedy tvrdit, že bychom prostřednictvím měření parametrů density femuru mohli posoudit vliv indukovaných elektrických proudů na analgezi, hojení, celkový fyziologický pohyb a zatěžování skeletu při asteoartritídě. Zcela jinak by samozřejmě mohly vyznít výsledky experimentu, pokud by bylo možno využít motoricky nadprahové stimulace, což však nebylo u laboratorních zvířat realizovatelné.

V těchto experimentech by byl pochopitelně užitečný i větší počet jedinců v jednotlivých skupinách. S omezenými zdroji výzkumného projektu jsme ovšem studii realizovali pouze jako pilotní, přičemž jsme se snažili – tako jako i všech dalších dílčích animálních studiích - dodržovat počet laboratorních zvířat stanovený nornou ČSN EN ISO 10993-11, která vyžaduje pro akutní studie alespoň 3 jedince, pro subakutní studie 6 jedinců a pro studie chronického působení 8 jedinců.

3.2.1.2 Histopatologicko-morfologická analýza

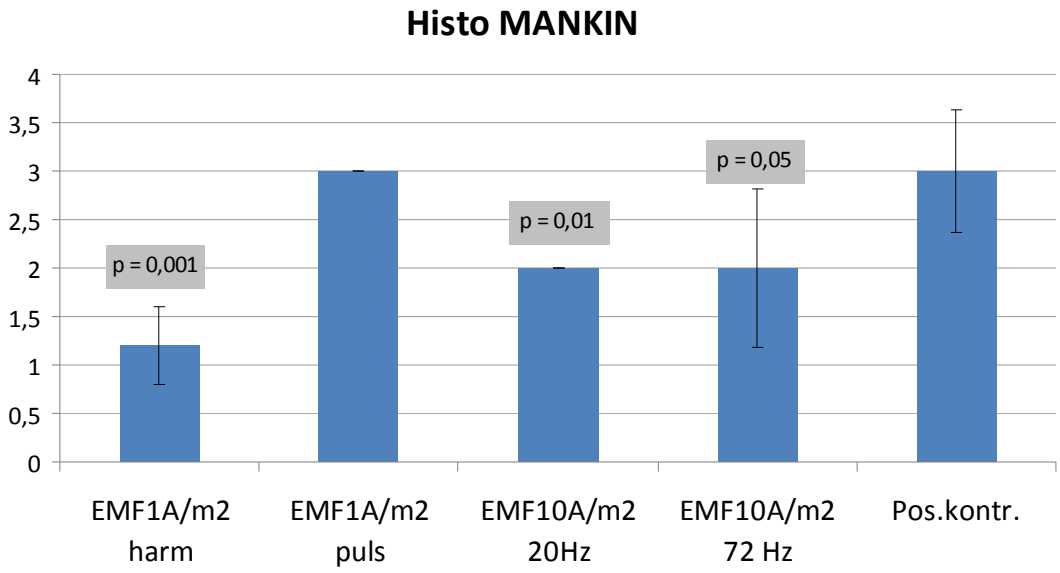
Daleko zajímavější výsledky poskytla **histologicko-morfologická analýza** prováděná podle klasifikace systému MANKIN, navrženého Mankinem et al. v roce 1971, viz lit.:

> *Mankin, H.J. Biochemical and metabolic aspects of osteoarthritis. Orthop Clin North Am. 1971;2:19–31.*
>
> *Rutgers M., van Pelt, M.J., Dhert, W.J., Creemers, L.B., Saris, D.B. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18:12–23.*
>
> *Pauli, C., Whiteside, R. Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. Osteoarthritis Cartilage. 2012 Jun; 20(6): 476–485.*

Tento systém je široce používán pro hodnocení osteoartritické chrupavky. Byl původně vyvinut pro hodnocení chrupavky lidského kyčle postiženého osteoartritidou a následně byl rovněž použit k hodnocení degradace chrupavky v různých zvířecích modelech osteoartritidy. Systém MANKIN hodnotí čtyři parametry: strukturu chrupavky, celularitu, výsledek barvení barvivem Safranin O a integritu „tide mark“. V původní podobě systému MANKIN má každý parametr několik podkategorií a jednotlivá skóre se sčítají, přičemž celkové skóre se nachází v rozsahu od 0 (normální) do 14 (nejtěžší postižení osteoartritidou). V naší práci jsme ovšem použili recentního hodnocení podle modifikovaného systému MANKIN, který je čtyř-stupňový (stupeň 1 až 4), přičemž stupeň 1 přísluší intaktnímu kloubu a stupeň 4 kloubu nejvíce postiženému, viz literatura:

> *Kikuchi,T., Yamada,H., Shimmei,M.: (1996) - Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis.Osteoarthritis and Cartilage, 4, p. 99 - 110.*
>
> *Hluchý S., Švík K. et al. The histological and biochemical changes on experimental osteoarthritis in rabbit knee. Scientific papers animal science and biotechnologies, vol. 41 (1) (2008).*

Dosažené výsledky pro jednotlivé skupiny experimentálních zvířat poskytuje diagram na obrázku č. 31 (pro negativní kontrolu je skóre 1):



Obr. 12: *Dosažená skóre u jednotlivých skupin experimentálních zvířat na základě histologicko-morfologické analýzy prováděné dle klasifikace modifikovaného systému MANKIN*

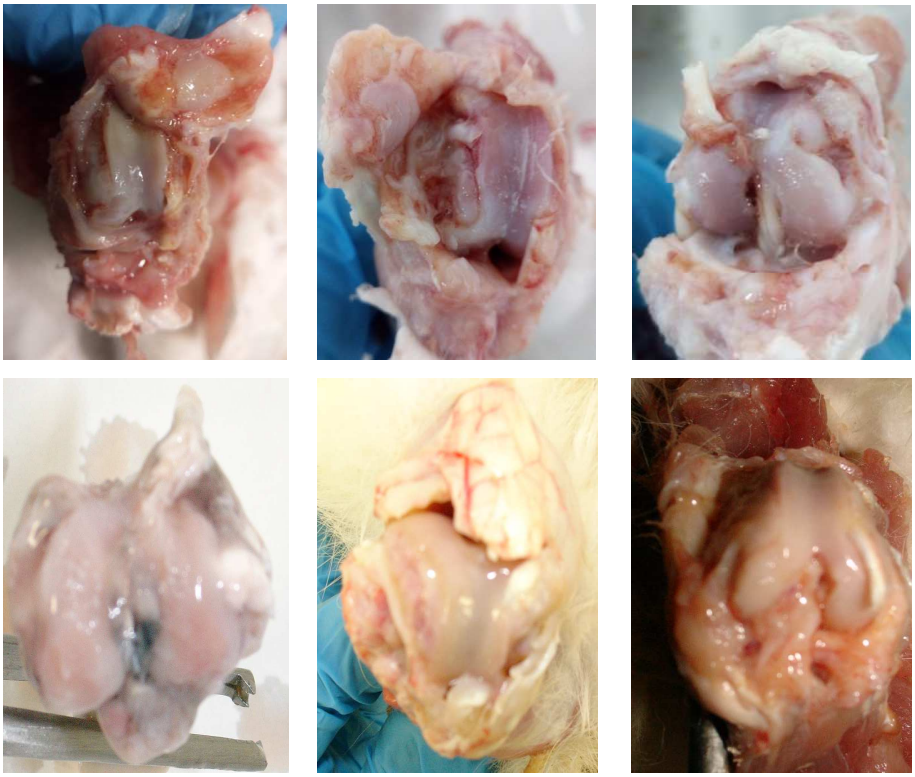
Mezi skupinou ovlivňovanou indukovanými elektrickými proudy o proudové hustotě řádově v jednotkách A/m^2 s pulzním časovým průběhem 72 Hz (skóre 3) a pozitivní kontrolou (skóre 3) nebylo dosaženo rozdílu. I když u tohoto výsledku nelze prokázat statistickou významnost, lze soudit, že tento typ vysokoindukční magnetické stimulace není schopen účinně ovlivňovat histopatologicko-morfologické změny vyvolané indukovanou osteoartritidou.

Obě formy vysokoindukční magnetické stimulace produkující indukované elektrické proudy o proudových hustotách v řádu desítek A/m^2 ovšem poskytují již signifikantní výsledek – poškození chrupavky bylo po 56 dnech výzkumu hodnoceno již jen se skóre 2.

Nejlepší výsledek ve smyslu příznivého ovlivnění histopatologicko-morfologických změn vyvolaných indukovanou osteoartrózou však poskytují indukované elektrické proudy středofrekvenčního sinusoidálního, amplitudově modulovaného časového průběhu s proudovými hustotami řádově jednotek A/m^2 v amplitudě. MANKIN skóre zde činí pouze 1,2 s hladinou významnosti p = 0,001 ve srovnání s pozitivní, neléčenou kontrolou.

Hrubou demonstraci morfologických projevů v makroskopickém fotografickém zobrazení poskytuje obrázek č. 32. Vlevo je zachycen příklad indukovanou osteoartritidou nejvíce poškozeného kloubu ze skupiny pozitivních kontrol - na dolním snímku jsou dokonce patrné nekrotické změny. Uprostřed jsou klouby, u kterých byl proces strukturálních změn tlumen aplikací vysokoindukční magnetické stimulace s indukovanými elektrickými proudy proudové

hustoty řádově v desítkách A/m^2 v amplitudě (nahoře 20 Hz, sinusoidální bifázické pulzy mag. pole 400 mikrosekund; dole 72 Hz, půlsinusoidální monofázické pulzy magnetického pole 200 mikrosekund). Vpravo je nejméně postižený kloub, u něhož byla indukovaná osteoartritida ovlivňována indukovanými elektrickými proudy s proudovou hustotou řádově jednotek A/m^2 v amplitudě a harmonickým středofrekvenčním, amplitudově modulovaným časovým průběhem.



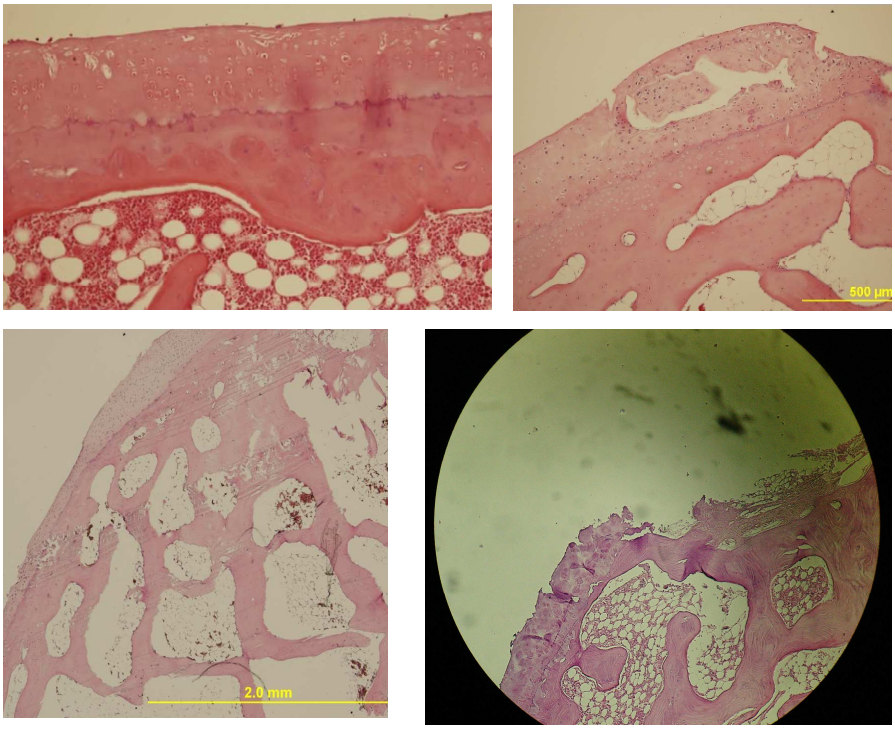
Obr. 13: *Demonstrace vypreparovaných kolenních kloubů.*

Mimořádně zajímavé výsledky poskytovala histopatologická analýza. Ve skupinách zvířat „EMF 10 A/m^2 20 Hz“, „EMF 10 A/m^2 72 Hz“ a zvláště pak ve skupině „EMF 1 A/m^2 harm“ byl patrný proces vyplňování defektů ve chrupavce, vzniklých poškozením koleganázou, a to řídkou tkání se zjevnou kulatobuněčnou celularizací na povrchu. Nelze však vyloučit, že by se jednalo o části synovialis, které byly do poškozených povrchových částí chrupavky zaneseny v důsledku pohybu zvířete, které pod vlivem analgetických účinků elektrických proudů indukovaných vysokoindukční magnetickou stimulací bylo více mobilnější. Každopádně se zde projevuje krytí nerovnoměrností v poškozené chrupavce, které by mohlo být považováno za projev reparace. Nelze ovšem ani vyloučit, že by se tento proces mohl vyvíjet až k fibrotizaci a případnému vzniku ankylózy, i když jsme nic takového v našem experimentálním materiálu nepozorovali. Osm týdnů pro vznik ankylózy je sice krátká doba, ale ankylózu by však bylo možno předpokládat jen při masivnějším poškození kloubu spojeném s projevy nekrózy, kterou však právě u kloubů účinně ovlivňovaných

indukovanými elektrickými proudy nepozorujeme. V histologických preparátech se signifikantně prokázaným snížením MANKIN skóre oproti pozitivní kontrole byla vždy patrna menší plocha poškozená kolagenózou. Např. kloubní povrch sledovaného laterálního kondylu femuru byl na okrajích intaktní, miskovité defekty byly zachyceny pouze v místech konvexit. Tyto defekty se ovšem na svém povrchu vyplňovaly již zmíněnou kulatobuněčnou celularizací (viz obr. 33 a 34). Nicméně bylo v místě konvexity patrné zeslabení chrupavky a drobné defekty povrchu, ojediněle s naznačenou deskvamací drobných povrchových okrsků. Sousedící úseky kloubní chrupavky se vyznačovaly různou mírou fragmentace.

V histopatologickém obraze kloubní chrupavky u zvířat skupiny negativní kontroly (bez indukované osteoatrtritis) je kloubní povrch laterálního kondylu intaktní v celém rozsahu, maximálně zde mohou být zachyceny drobné degenerativní změny v povrchových etážích. Poškození chrupavky ve skupině pozitivní kontroly bylo naopak masivní, s množstvím strukturálních defektů, bez projevů vitální tkáně, chrupavka byla ve velkých úsecích odloučena, místy byla patrna výrazná acelulární vrstva.

Histopatologický popis a výpočet MANKIN skóre prováděl zkušený histopatolog. Mikroskopické snímky přibližují popsané a zhodnocené rozdíly (obr. 14, detailněji obr. 15):

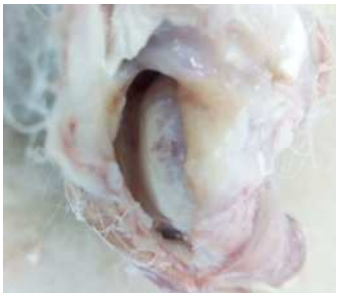
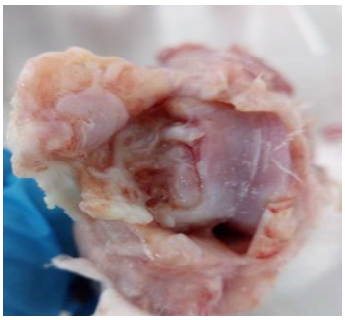
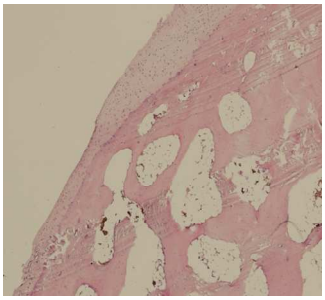
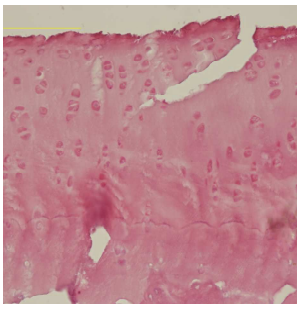
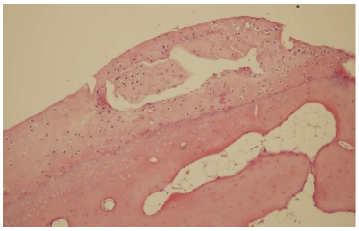


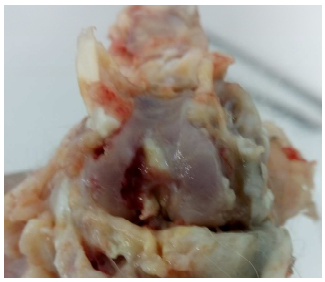
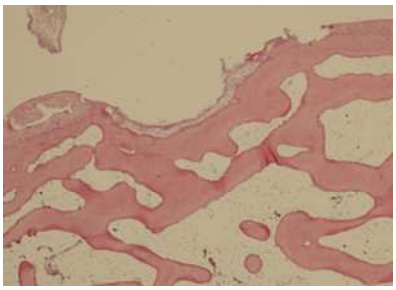
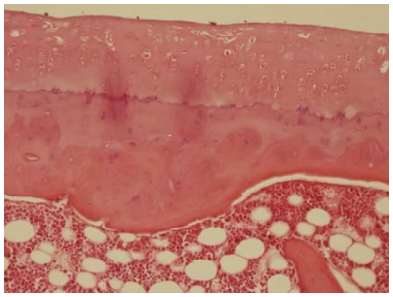
Obr. 14: *Mikroskopické histopatologické snímky poškozené kloubní chrupavky. Vlevo nahoře je chrupavka intaktní, vedle chrupavka, jejíž míra poškození je ovlivněna vysokoindukční magnetickou stimulací řádově desítky A/m^2, 20 Hz, vlevo dole ovlivnění harmonickými indukovanými elektrickými proudy a vpravo dole pozitivní kontrola.*

Popsané hodnocení vnitřního povrchu kloubu spočívalo metodicky v otevření kloubu ihned po eutanazii zvířete (8. týden po indukci defektu), fixaci kloubu v 10% formaldehydu, dekalcifikaci, provedení řezů, jejich zalití do parafínu, následné realizaci mikrotomálních řezů, jejich umístění na podložní sklíčko a eosinovém barvení metodou HE, metodika:

> *Bajpayee, Ambika G., et al. "A rabbit model demonstrates the influence of cartilage thickness on intra - articular drug delivery and retention within cartilage." Journal of Orthopaedic Research 33.5 (2015): 660-667.*

Poněvadž histolomorfologické analýze byla v naší studii věnována mimořádná pozornost, uvádíme podrobnější dokumentaci histomorfologické analýzy kloubních ploch OA králíků – typické případy pro skupiny s odlišnou formou elektromagnetické stimulace (obr. 15):

EMF 1A/m^2 harm	EMF 1A/m^2 puls	EMF 10 A/m^2 20 Hz
		
		
Chrupavka je v místech na okrajích hlavice ztenčená, jen drobné degenerativní změny. Synoviální tekutina čirá. Pozn: Lze předpokládat na základě paralelních výsledků qPCR, že EMF má efekt buď hlavní na časnou produkci TIMP (neutralizuje MMP) nebo na snížení exprese zánětlivého faktoru IL-1 (kaskáda podmiňující produkci MMP) (to vše možná díky akceleraci proliferace nebo migrace MSC buněk, jak naznačuje náš in vitro článek	Chrupavka je často prasklá až ke spongiozní tkáni, povrch sice pevnostně lepší než u pozitivní kontroly (neléčené), ale synoviální tekutina zakalená. Pozn: EMF nemá velký vliv na zastavení procesu OA eroze, ani na eliminaci zánětlivých faktorů (IL1 a imunitní aktivita možná ještě EMF podporována, viz náš článek, kde podporuje množení endoteliálních buněk) uvolňovaných kloubními buňkami a stav kloubu se tak nenávratně zhoršuje během 8 týdnů.	Kloubní povrch na většině plochy intaktní, zejména na okrajích hlavice vykazuje praskliny, vzhledově však stabilizované, místy pláty chrupavky posunuté a fixované do jiné lokace, bez akutního krvácení. Nejde však o novotvorbu chrupavky. Synoviální tekutina většinou mírně zakalená.

EMF 10 A/m^2 72 Hz	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola
		
		
Kloubní povrch na většině plochy intaktní, na okrajích hlavice vykazuje miskovité defekty, vyplněné kulatobuněčnou celulizací. Defektů je ale výrazně méně než v pozitivné kontrole, nebo EMF-pulzní. Synoviální tekutina téměř bez zakalení Analgetický efekt pravdpodobně umožní zvířeti bezbolestný pohyby ve větším úhlu, což možná prospívá sekundární stimulaci chrupavky a eliminaci zánětu, ale zároveň vede k „ustřihnutí“ vnitřní snoviální mebrány, a také větší pohyblivost k většímu zatížní okrajových „styčných ploch“ kloubů a větší pravděpodobnosti „vylomení“ částí chrupavky.	nekróza Odloučená vrstva chrupavky, zejména v místě tlakových oblastí kloubních hlavic, často lokálně krvácivé nebo silně postižené nekrózou, pronikající a do vrstvy kostní. Synoviální tekutina mléčná a zakalená.	Intaktní kloubní povrch, bez prasklin a krvácejících oblastí; synoviální tekutina čirá bez zánětlivých komponent

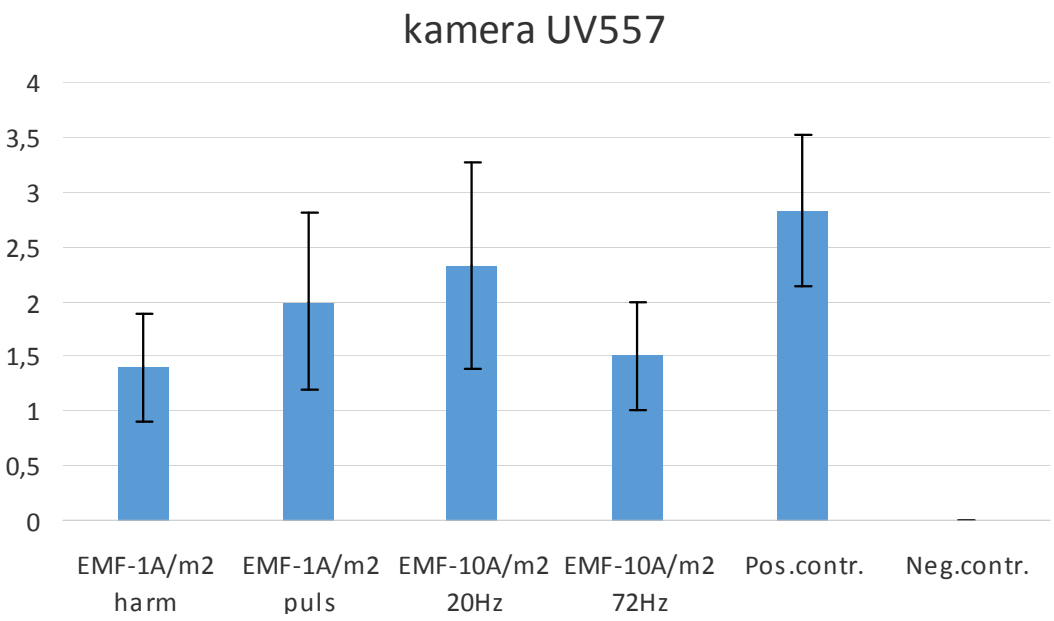
Obr. 15: *Podrobnější fotoilustrace a histologický popis typických kloubních defektů a jejich ovlinění HIMS pro jednotlivé studované skupiny laboratorních zvířat*

3.2.1.3 Mobilita laboratorních zvířat s indukovanou osteoartritídou při HIMS

Další sledovaný faktor v naší animální studii byl funkční – **mobilita laboratorního zvířete postiženého indukovanou osteoartritidou**. K tomuto účelu bylo využito kvazikontinuálního fotografického sledování s pomocí fotopastí, zaznamenávajících počet změn polohy zvířete. Ke kvantitativní analýze byla použita metodika časosběrného snímání. Tato metodika byla realizována s použitím černobílé automatické kamery UV557 (výrobce UOVision, Honkong) s vnitřním datovým uložištěm (tzv. „fotopast“). Sběr dat probíhal především v těch úsecích dne, kdy byl kolem kotců klid a pohyb zvířete byl iniciován pouze fyziologickými potřebami (potrava, pití, …), tedy především v noci. Jako směrodatný ukazatel se pak vypočítal průměrný počet změn polohy za hodinu. Výsledky jsou shrnuty na obr. 16.

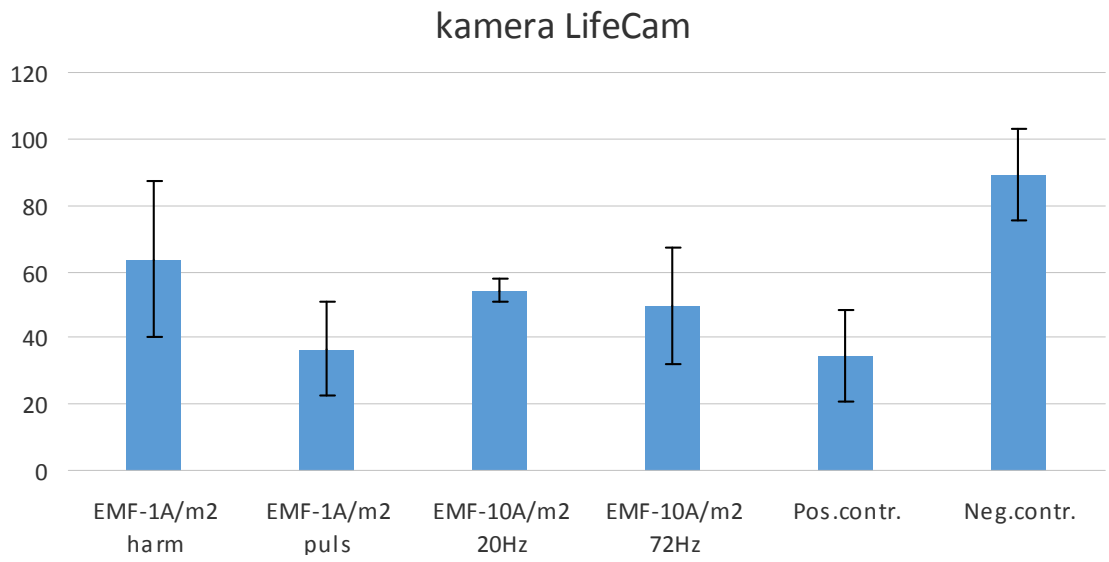
Z důvodů zacílení na detailní motilitu kloubu byla pro pokročilé analýzy rovněž použita kamera Microsoft HD LifeCam (výrobce Microsoft, USA), spojená s řídícím osobním počítačem, který zabezpečoval chod a uložení snímků. Kamerový systém prošel optimalizací a bylo dosaženo originálního systému objektivního hodnocení pohyblivosti zvířete s využitím sledování doby, po kterou je těžiště zvířete v pohybu a doby, po kterou je jeho těžiště v klidu. Výsledky byly převedeny na semikvantitativní škálu se stupni 0 (úplně zdravý, normálně pohyblivý jedinec) až 4 (téměř nehybný jedinec). Byly tak uplatněny dvě odlišné metodiky.

Výsledky dosažené s využitím výše popsané metodiky semikvantitativního hodnocení (s využitím kamery MS HD LifeCam) ilustruje obrázek 17. Statisticky významné je zvýšení pohyblivosti při aplikaci indukovaných elektrických proudů s proudovou hustotou řádu jednotek A/m^2 a harmonickým časovým průběhem a indukovaných elektrických proudů s proudovou hustotou řádu desítek A/m^2 a frekvencí 72 Hz.



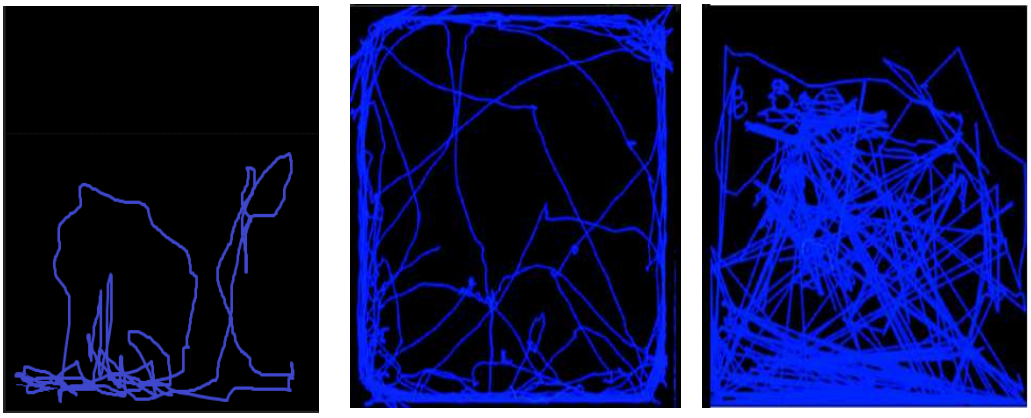
Obr. 16: *Změny mobility osteoartritických zvířat pod vlivem indukovaných el. proudů*

Metodika časosběrného využití kamery UV557 (fotopast), poskytuje signifikantní zvýšení pohyblivosti laboratorních zvířat s indukovanou osteoartritis nejvýrazněji opět v případě aplikace harmonických indukovaných elektrických proudů, ale též v případě působení obou zvolených frekvencí (20 Hz i 72 Hz) vysokoindukční magnetické stimulace s indukovanými proudovými hustotami řádu desítek desítek A/m^2 (obr. 36). Obě metodiky prokazující změny v mobilitě laboratorních zvířat byly uplatněny v 8. týdnu výzkumu.



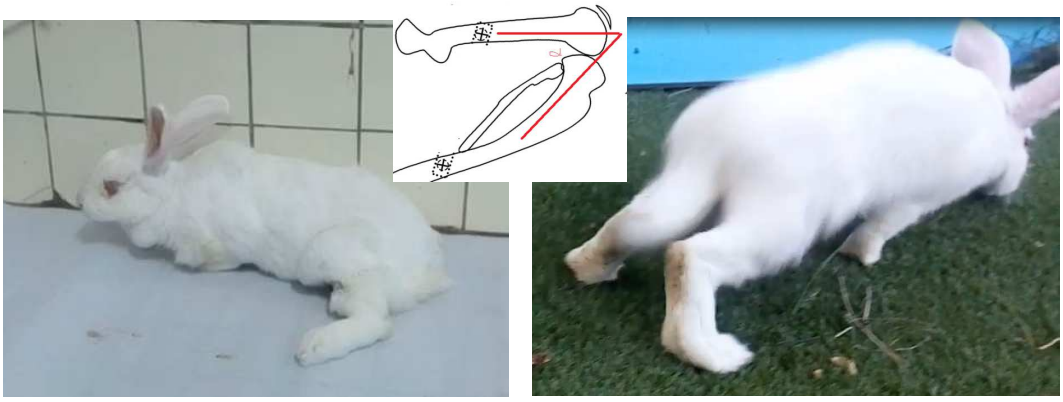
Obr. 17: *Změny mobility osteoartritických zvířat pod vlivem indukovaných el. proudů (jiná metodika výzkumu).*

Zajímavé je i názorné zobrazení trajektorií pohybu těžce postiženého zvířete (vlevo), zvířete s omezenou pohyblivostí (uprostřed) a jedince zcela zdravého (vpravo). Pohyb sledován při ustájení v boxu se čtvercovým půdorysem (obr. 18).



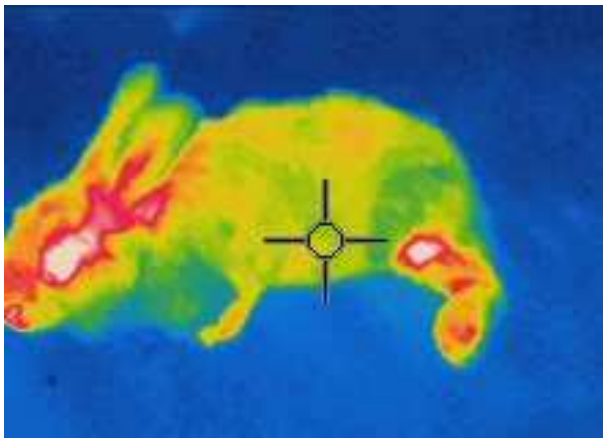
Obr. 18: *Trajektorie pohybu laboratorního zvířete v boxu.*

Představu laboratorního zvířete se středně těžce postiženou hybností přibližuje obrázek č. 19. Zároveň je zde znázorněn úhel flexe v postiženém kolenním kloubu, který hraje při objektivním posuzování pohyblivosti zvířete ve vztahu k indukovanému osteoartritickému postižení kolenních kloubů významnou roli



Obr. 19*: Představu laboratorního zvířete se středně těžce postiženou hybností*

Výzkumy mobility zvířat byly doplněny ještě jejich sledováním termokamerou. Po aplikaci HIMS byla vždy změřena změna teplota kloubu i celého těla a její profil (pro odhalení možné akutní odezvy zánětlivého procesu na HIMS nebo pro odhalení akutního přehřátí tkáně z důvodu zavedené fyzikální intervence). Byla použita kamera FLIR T400. Žádné vyhodnotitelné změny tohoto sledovaného parametru však zaznamenána nebyly (obr. 20).



Obr. 20: Ilustrace termografického sledování.

3.2.1.4 Výzkum mediátorů zánětu při indukované osteoartróze a jejím ovlivňování indukovanými elektrickými proudy HIMS

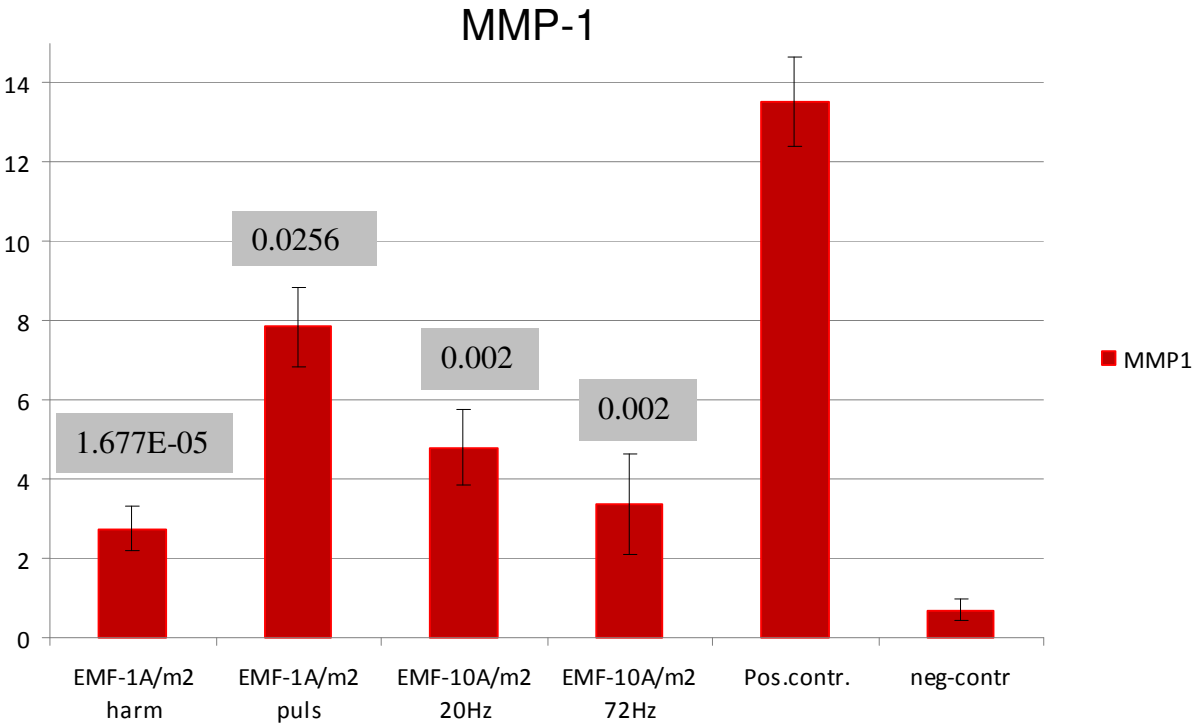
Za mimořádně zajímavou a významnou považujeme analýzu exprese typických osteo-artritických markerů buňkami kloubní výstelky, provedenou metodou kvantitativní PCR (qPRC). Konkrétně jsme sledovali interleukin 1 (IL-1), interleukin 10 (IL-10), matrixmetaloproteinázu 1 (MMP-1) a tissue inhibitor of matrixproteinase (TIMP). Postupovali jsme metodikou v souladu s:

> *Li, F., Yin, Z., Zhou, B., Xue, F., Yang, W., Chang, R., ... & Qiu, Y. (2015). Shikonin inhibits inflammatory responses in rabbit chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rabbit knee. International immunopharmacology, 29(2), 656-662.*

Odběr vzorku spočíval v otevření kloubu ihned po eutanazii zířete (8. týden po indukci defektu) a disekci 2x2x(1-2) mm tkáně a jejím okamžitém laboratorním zpracování. Původní představa o možnosti využití synoviální tekutiny k obdobnému výzkumu osteoartritických markerů se ukázala nereálná pro nedostatečné množství této tekutiny, její nízkou vazkost a celkově nízký obsah mediátorů zánětu.

Zájem o marker matrix-metaloproteinázu MMP-1 při výzkumu vlivu bezkontaktně aplikovaných elektrických proudů vytvářených v léčených tkáních osteoartriticky postiženého kloubu vysokoindukční magnetickou stimulací vycházel z představy o roli matrix-metaloproteináz při zánětu. Jejich vysoká hladina v prostředí artrotického kloubu umožňuje zvýšené štěpení bílkovin extracelulární matrix, tedy právě i kolagenu, a tím i potenciaci poškození kloubu s problematickou možností jeho reparace. Proto nás zajímal vliv

indukovaných elektrických proudů na expresi těchto matrix-metaloproteináz, speciálně jsme se zabývali matrix-metaloproteinázou 1, MMP-1, viz obrázek č. 21.



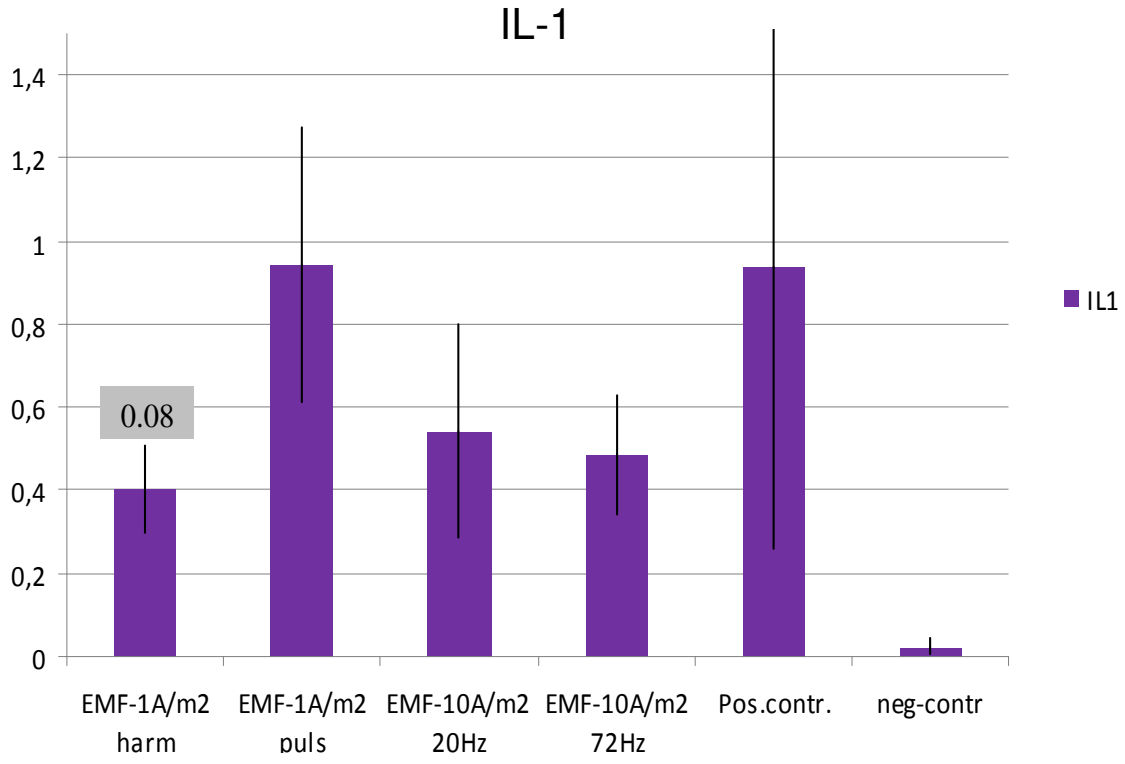
Obr. 21: *Ovlivnění MMP-1 vlivem indukovaných elektrických proudů*

Výsledek výzkumu vyznívá tak, že ve zdravém kloubu je skutečně exprese MMP-1 minimální, zatímco v artroticky postiženém mnohonásobně vyšší (z hodnoty 0,7 zvýšení na hodnotu 13,5). Dále pak jsme zjistili, že prakticky všechny formy aplikace indukovaných elektrických proudů jsou schopny statisticky významně snížit patologicky zvýšenou hladinu MMP-1 a tím tlumit průběh a důsledky osteoartritického postižení. S vysokou statistickou významností a v nejvyšší míře se tento účinek projevil při aplikaci indukovaných elektrických proudů s harmonickým, amplitudově modulovaným časovým průběhem a hustotou indukovaného proudu v řádu jednotek A/m^2 v amplitudě.

Interleukin 1 (IL-1), který byl námi vybrán jako další osteoartritický marker, se vyznačuje pleiotropním působením. Jednoznačně je však známo, že je rychle uvolňován mikrofágy při všech formách zánětu. Poněvadž se projevuje jako ukazatel neregulovaného zánětu vedoucího při osteoartritídě k degeneraci chrupavky, je jistě nezbytné, aby působením léčby bylo zvyšování jeho hladiny potlačováno a tím bylo blokováno mnoho nepříznivých aspektů zánětu. Výsledky našeho výzkumu ukázaly, že negativní kontrola (zdravá laboratorní zvířata)

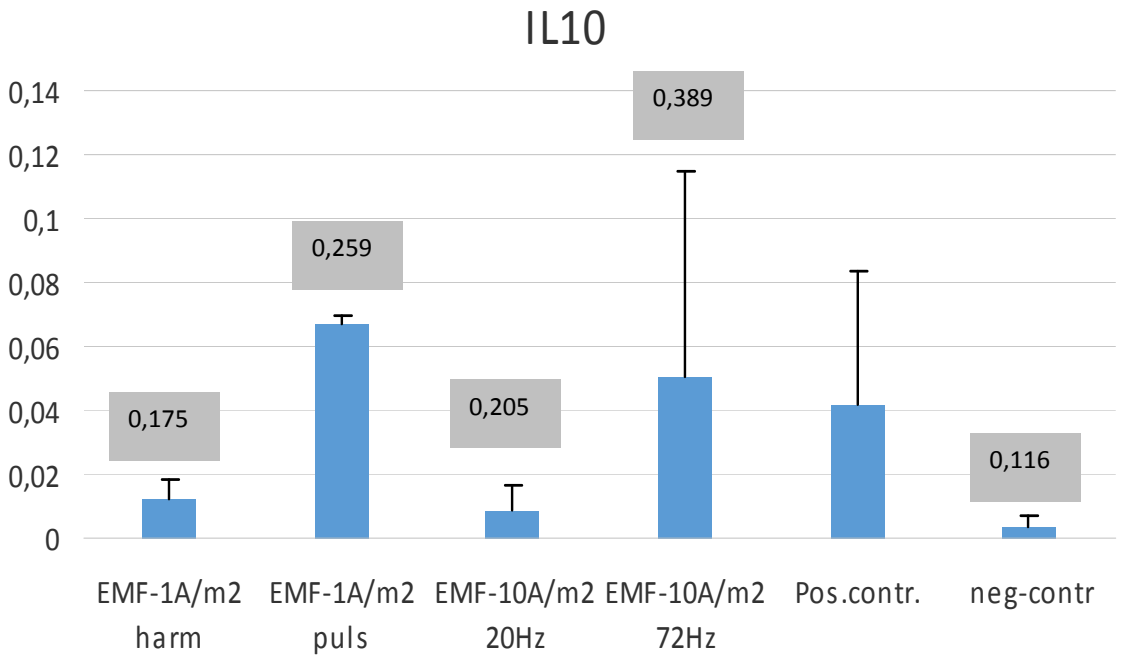
mají hodnotu tohoto mediátoru pouze 0,02, zatímco positivní kontrola (neléčená zvířata s indukovanou osteartritídou) mají hodnotu IL-1 rovnou 0,94. Výsledky našeho výzkumu zároveň ukazují, že indukované elektrické proudy mají zřejmě schopnost potlačovat produkci IL-1. Nicméně získané výsledky nejsou v případě tohoto markeru statisticky významné; pouze aplikace indukovaných elektrických proudů s harmonickým, amplitudově modulovaným časovým průběhem a hustotou indukovaného proudu v řádu jednotek A/m^2 v amplitudě poskytuje hladinu významnosti p = 0,08, kterou by bylo možno považovat minimálně za průkaz trendu požadovaného účinku této fyzikální intervence (obr. 22).

Zbývá uvést, že veškeré uváděné hodnoty zkoumaných mediátorůmzánětu jsou uváděny v relativních jednotkách, vztažených k tzv. „housekeepingů genům. Housekeeping geny jsou geny exprimované ve většině tkání organismu. Jejich exprese je pro buňku zpravidla esenciální a značně neměnná. Housekeeping geny se tudíž využívají jako referenční geny pro kalibraci v kvantitativních studiích v oblasti molekulární biologie.



Obr. 22: *Ovlivnění IL-1 vlivem indukovaných elektrických proudů*

Co se týče interleukinu 10 (IL-10), poskytuje výsledky výzkumu graf na obrázku č. 23:



Obr. 23: *Ovlivnění IL-10 vlivem indukovaných elektrických proudů*

Interpretace výsledků dosažených u IL-10 je již problematičtější, neboť ani jedna ze skupin laboratorních zvířat nevykazuje statisticky významnou odchylku od positivní kontroly, a to dokonce ani kontrola negativní. Zde však při testování statistické významnosti oproti positivní kontrole byla přece jen pomocí Studentova t-testu vypočtena nejvyšší hladina významnosti ($p = 0,116$), což ukazuje na jakýsi velmi mírný trend ke statistické významnosti nárůstu IL-10 u skupiny pozitivních kontrol, tedy laboratorních zvířat s indukovanou osteoartritidou bez jakéhokoliv ovlivňování fyzikální intervencí. Podprahová statistická významnost však spíše svědčí o tom, že se interleukin IL-10 za podmínek naší studie ještě nezačal statisticky významně uplatňovat, ale jeho hladina v jednotlivých zkoumaných skupinách pouze osciluje kolem celkově průměrné hodnoty 0,03, a to zhruba v pásmu +/- tohoto průměru (od 0,003 pro negativní kontrolu až po 0,067 pro pulzní indukované proudy).

IL-10 je schopný inhibovat syntézu prozánětlivých cytokinů (např. IFN-γ, IL-2, IL-3, TNFα a GM-CSF) produkovaných především makrofágy a Th1 lymfocyty. Exprese IL-10 je v nestimulovaných tkáních nízká a zvyšuje se standardně např. aktivací od komensální nebo patogenní flóry. Role IL-10 je spatřována především v supresi „přestřelené“ imunitní reakce. Uplatnění tohoto mechanismu bychom očekávali spíše v pozdní fázi reakce na indukovanou osteoartritídu. Je možné, že v naší studii trvající jen 56 dnů k této fázi ještě nedošlo.
K tomuto vysvětlení odpovídá i statisticky nevýznamný rozdíl mezi pozitivní i negativní kontrolou, i když při testování právě tohoto rozdílu získáváme nejvyšší hladinu významnosti,

což by mohlo ukazovat na to, že po 8 týdnech od indukce osteoartritídy se role IL-10 začíná teprve uplatňovat.

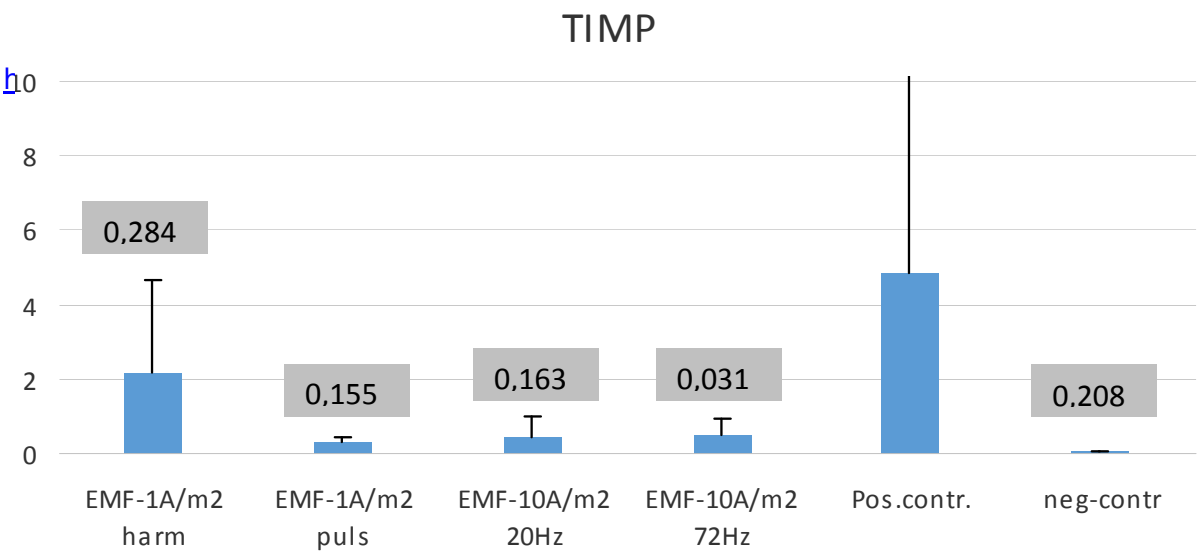
Testování vztažené ke skupině negativních kontrol ukazuje na obecně vyšší hladiny významnosti, což svědčí pro trend zvyšování IL-10 u všech osteoartritických zvířat, výraznější spíše při aplikacích nižších proudových hustot v řádech jednotek A/m^2.

IL-10				
skupina	průměr	sm.odchylka	t-test vůči Pos.kontr.	t-test vůči Neg.kontr.
EMF-1A/m^2 harm	0,012	0,006	0,175	0,070
EMF-1A/m^2 puls	0,067	0,002	0,259	0,002
EMF-10A/m^2 20Hz	0,009	0,008	0,205	0,246
EMF-10A/m^2 72Hz	0,050	0,065	0,388	0,183
Pos.contr.	0,042	0,041		0,116
Neg.contr.	0,003	0,004	0,116	

Tab. 2: *Tabulka statistických ukazatelů pro IL-10*

Posledním sledovaným markrem byl tkáňový inhibitor matrix-metaloproteinázy (TIMP). Jeho roli ve studiu indukované osteoartritídy jsme spatřovali v potlačování produkce matrix-metaloproteináz a tím tlumení nepříznivých projevů zánětu a limitaci degenerace kloubních tkání, zvláště chrupavky. TIMP považujeme za prostředek terciárního boje proti osteoartritickému poškození kloubu poté, co by léčbou prostřednictvím fyzikální intervence nebylo lze účinně snižovat hladinu IL-1 jako základního zánětlivého mediátoru, a rovněž tak by nebylo možno účinně redukovat samotnou produkci MMP. Výsledky výzkumu demonstruje obrázek č. 24.

Ze samotných zjištěných průměrných hladin TIMP by bylo možno usuzovat, že indukovaná osteoartritis ve všech sledovaných skupinách vyvolá zvýšení koncentrace tohoto cytokinu, čímž se snaží v terciární linii řízení zánětu tlumit produkci matrixmetaoproteináz, viz graf na obr. 44 i tabulka na obrázku č. 45. U skupin, kde byla aplikována HIMS, není toto zvýšení však tak výrazné, zvláště při aplikaci indukovaných elektrických proudů harmonického, amplitudově modulovaného časového průběhu, což by se dalo vysvětlit tím, že v případě příznivějšího a méně destruktivního průběhu zánětu není zapotřebí tak výrazného uplatnění terciární ochrany tkáně mediátorem TIMP. Tuto hypotézu však zatím nemůžeme podepřít signifikantními hladinami statistické významnosti.



Obr. 24: Ovlivnění TIMP vlivem indukovaných elektrických proudů

TIMP				
skupina	průměr	sm.odchylka	t-test vůči Pos.contr.	t-test vůči Neg.contr.
EMF-1A/m^2 harm	2,187	2,478	0,285	0,211
EMF-1A/m^2 puls	0,303	0,148	0,155	0,105
EMF-10A/m^2 20Hz	0,461	0,523	0,164	0,246
EMF-10A/m^2 72Hz	0,483	0,437	0,031	0,198
Pos.contr.	4,840	5,526		0,208
Neg.contr.	0,089	0,002	0,208	

Tab. 3: Tabulka statistických ukazatelů pro IL-10

3.2.1.5 Technika realizace animální studie

Samotné technické provádění animální studie bylo značně náročné. Během procedury bezkontaktní (bezelektrodové) aplikace indukovaných elektrických proudů metodou vysokoindukční magnetické stimulace bylo nutno umístit aplikátor přístroje co nejblíže k osteoartritickému kloubu laboratorního zvířete (mimi klec) a zvíře fixovat v kleci na příslušném místě podávání procedury.

Na následujícím obrázku č. 25je patrné uspořádání při aplikaci řádově desítek A/m^2 s frekvencí 20 Hz (vlevo), při aplikaci pulzních nebo harmonických proudů o proudové hustotě jednotek A/m^2 (uprostřed) a při aplikaci řádově desítek A/m^2 s frekvencí 72 Hz (vpravo). Tato posledně uvedená aplikace byla realizována zcela nově vyvinutým přístrojem a byla provázena nezbytností chlazení experimentální cívky vyvinutého a zhotoveného prototypu tohoto přístroje. Cívka byla vložena do nádoby s olejovou lázní a nádoba byla ponořena do suchého lihu. Teplo produkované aplikátorem nesmělo ovlivňovat laboratorní zvíře. Problémem vysokoindukční magnetické stimulace byl i hluk produkovaný samotným aplikátorem (rázy). Ten stresoval zvíře a bránil jeho účinné fixaci v požadovaném místě. Akustické projevy fungování aplikátoru byly tudíž tlumeny odhlučněním realizovaným s využitím neoprenu a pěnového polystyrenu.

Geometrie chovných boxů, v nichž byly procedury podávány, musela být upravena Stejně tak materiál, kdybylo nutno přejít z původních klasických kovových boxů na plastové. Fixace zvířete byla realizována pomocí stavitelných přepážek. Amplituda indukovaných proudových hustot musela být volena těsně pod hranicí prahu motorického dráždění, neboť jen tak bylo docíleno, aby zvíře nebylo vyvolávanými záškuby svalů nepřijatelně stresováno. Tímto opatřením jsme ale zároveň a zcela jednoznačně oddělili případné důsledky svalových kontrakcí na sledované parametry, což považujeme za velmi důležité (viz rozbor výše).

Obr. 25: *Uspořádání experimentu při podávání procedur*

3.2.1.6 Shrnutí výsledků animální studie ovlivňování indukované osteoartritidy kolenního kloubu indukovanými elektrickými proudy

Dosažené výsledky histopatologicko-morfologických studií, výzkumu mobility laboratorních zvířat i významná zjištění týkající se vývoje sledovaných mediátorů zánětu validují účinnost působení indukovaných elektrických proudů aplikovaných bezkontaktním (bezelektrodovým) způsobem prostřednictvím vysokoindukční magnetické stimulace na osteoartriticky postižený kloub:

- Histopatologicko-morfologické nálezy byly významně příznivější v případě kloubů ovlivňovaných studovanou fyzikální intervencí HIMS.

- Mobilita zvířat ovlivňovaných HIMS byla signifikantně vyšší, zvláště u některých forem této fyzikální intervence.

- Zvolené markery zánětu buď přímo ovlivnění aplikací indukovaných elektrických proudů statisticky signifikantně potvrdily (MMP, IL-1), nebo alespoň vyjádřily trend k očekávanému příznivému vlivu (IL-10, TIMP). Lze tedy s poměrně vysokou pravděpodobností předpokládat, že indukované elektrické proudy budou jako vhodná fyzikální intervence příznivým způsobem modulovat proces zánětu, který provází, ale zároveň i vyvolává degenerativní onemocnění pohybového aparátu. Aplikovali jsme ovšem elektrické proudy o proudových hustotách v řádech alespoň jednotek až desítek A/m^2. Přitom se ukazuje, že pro statisticky významné účinné působení na modulaci zánětlivých mediátorů není ani tak důležité další zvyšování proudové hustoty indukovaných elektrických proudů, ale spíše jejich frekvenční spektrum. Účinnější pro tento účel by mohly být středofrekvenční harmonické, amplitudově modulované proudy, které i při nižší amplitudě proudové hustoty indukovaných elektrických proudů přenáší do ovlivňovaných tkání vyšší celkový integrál elektrické energie, respektive zasahují specifická frekvenční okna biologického působení. Z „klasické“ vysokoindukční magnetické stimulace se pak nejlépe osvědčují vyšší frekvence biologického okna 72 Hz (v souladu s klasickými pracemi Bassetta). Tyto výsledky animálních studií jsou v dobré shodě i s výsledky našich buněčných experimentů (viz výše). Na mediátory zánětu měl nejmenší nebo žádný vliv indukovaný elektrický proud s úzkými impulzy a menší proudovou hustotou. Ten se ovšem v buněčných experimentech úspěšně uplatňoval při stimulaci endoteliálních buněk, tedy neovaskularizaci postižené tkáně, přičemž tento aspekt nemohl být v naší animální studii zohledněn.

3.2.2 Příspěvek k výzkumu vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na činnost srdce (animální studie)

V souvislosti s aplikací vysokoindukční magnetické stimulace vznikají otázky jejího vlivu na srdce – orgán mimořádně úzce související s generováním a vedením nativních a subtilních, avšak vitálně zcela zásadních elektrických signálů. Na rozdíl od vysokoindukční magnetické stimulace mozku (transkraniální magnetická stimulace), která je široce zavedena jako šetrnější náhrada elektrokonvulze i jako metoda fyzikální intervence při některých neurologických a psychiatrických postiženích, se otázkou vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na srdce jakožto „elektrický“ orgán nezabýval dosud zřejmě nikdo. Námi provedené experimenty (Biomedicínský ústav Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy) využívaly jako animálního modelu, obr. 26, sus scrofa domestica (prase domácí) v anestézii, s působením vysokoindukční magnetické stimulace vysoce nadprahově svalově motorickým (m. pectorales major a ostatní svaly přední části hrudníku pracovaly až do extrémně silných tetanických kontrakcí). Přesto nebyly současným měřením EKG zjištěny žádné zásadní změny v elektrické činnosti srdce. Pouze podrobnou matematickou analýzou záznamů EKG ve smyslu HRV (heart rate variability) byly zjištěny změny ve variabilitě srdeční frekvence prokazující sympatikotonní aktivaci (12).

Obr. 26: Ilustrace podávání vysokoindukční magnetické stimulace na přední část hrudníku u animálního modelu sus scrofa přístrojem typu *Saluter Moti*. Byla podávána frekvence 1 Hz i frekvence 20 Hz v periodických burstech zajišťujících silnou svalovou kontrakci po dobu několika sekund, následovanou dva až třikrát tak dlouhou pauzou. Procedura byla podávána po dobu 10 minut pro frekvenci 1 Hz a 10 min pro frekvenci 20 Hz.

Získané výsledky jsou jistě příznivým zjištěním podporujícím aspekt bezpečnosti vysokoindukční magnetické stimulace, ale v žádném případě neznamenají, že by se vysokoindukční magnetická stimulace mohla bezrizikově aplikovat na oblast srdce, kde je obvykle kontraindikována, zvláště u kardiaků nebo u rizikových pacientů. Přítomnost kardiostimulátoru nebo jiné elektronické náhrady v těle je přitom zcela primární a naprosto absolutní kontraindikací nejen vysokoindukční magnetické stimulace, ale též distanční elektroléčby a jakékoliv jiné aplikace indukovaných elektrických proudů a elektromagnetických polí, které by mohly funkci kardiostimulátoru nebo jakékoliv jiné elektronické náhrady v těle pacienta nepříznivě a fatálně ovlivnit. Vliv nízko-frekvenčních elektromagnetických polí, rovněž vysokoindukčních, se však se vzdáleností od aplikátoru rychle snižuje. Konkrétní bezpečná vzdálenost závisí na typu přístroje a individuální konfiguraci. Například pro přístroj SALUS Talent uvádí výrobce bezpečnost vzdálenost 150 cm od čela aplikátoru pro všechny osoby, 90 cm pro obsluhu. Vychází přitom z požadavků (4), které však neuvažují přítomnost extrémně citlivé vitálně důležité elektronické náhrady či stimulátoru v těle pacienta.

Provedený experiment poukázal na značnou odolnost fyziologicky fungujícího elektrického převodního systému srdečního a na minimální možnost ovlivnění činnosti sinoatriálního uzlu nízkofrekvenčními elektromagnetickými poli u zdravého srdce. Vysvětlení tohoto jevu můžeme hypoteticky hledat ve vynikající elektrické vodivosti prsních svalů i dobře vodivých serosních tekutin nacházejících se mezi pohrudnicí a poplicnicí i mezi perikardem a epikardem. Do těchto dobře elektricky vodivých prostředí se může soustředit větší část indukovaných elektrických proudů, zde se mohou uzavřít jejich proudové dráhy, vytvořit vysoká proudová hustota a samotné srdce tak může být tímto mechanismem od vlivu indukovaných elektrických proudů do značné míry odstíněno. Jinou hypotézou je představa o samotné „odolnosti“ sinoatriálního uzlu a celého elektrického převodního systému srdečního proti vlivům zvenčí působících elektromagnetických polí. Zdůrazněme však, že se zde jedná o vlivy vysloveně nízkofrekvenční, nikoliv vysokofrekvenční působení elektromagnetických polí, známé ve fyzikální medicíně z použití diatermie.

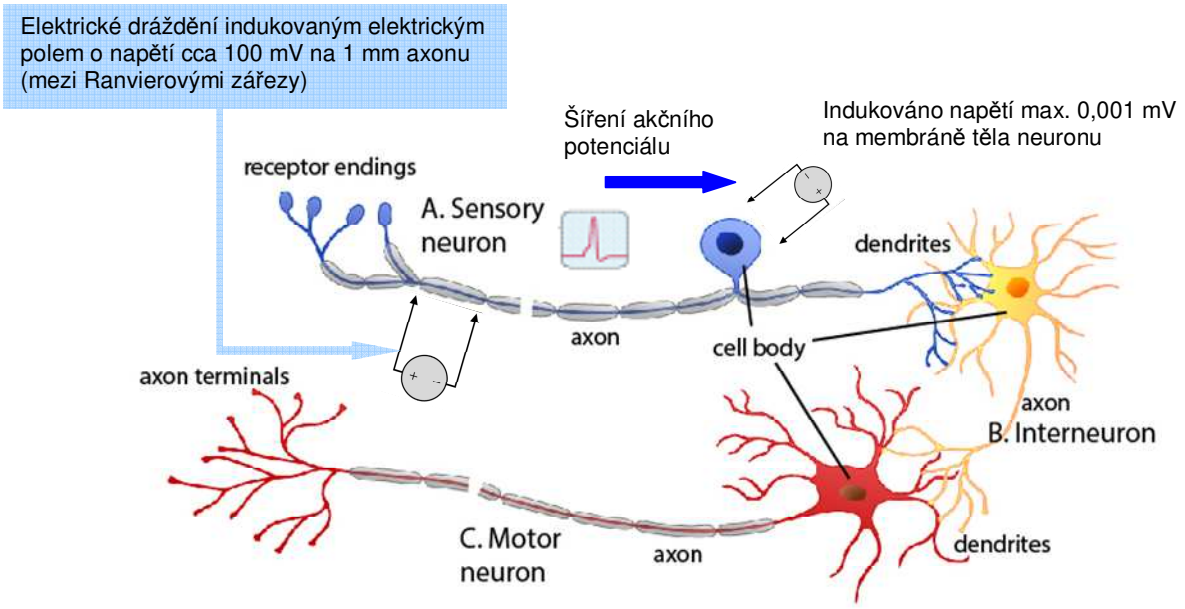
Podrobně je tato problematika zveřejněna v recentně publikovaném odborném článku:

> *HANÁKOVÁ,L., PRŮCHA,J., SOCHA,V., ŠTENGL,M., VAN BERGH,S.: Effect of High-Induction Magnetic Stimulation on Complex Heart Rate Variability of Sus Strofa Domesticus under General Anesthesia. Appl. Sci. 2020, 10, 589; doi:10.3390/app10020589*

3.3 Výsledky preklinických studií

3.3.1 Studium vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na elasticitu ligament

Pro vyvolání percepčních nebo dokonce motorických efektů dráždivých nervových a svalových tkání, spojených se vznikem a šířením akčního potenciálu (viz následující obrázek 7), intenzita indukovaného elektrického pole a indukovaná proudová hustota typická pro distanční elektroterapii není ještě dostačující, takže realizace percepční stimulace nebo svalové stimulace může být dosaženo až vysokoindukční magnetickou stimulací, viz obr. 27.



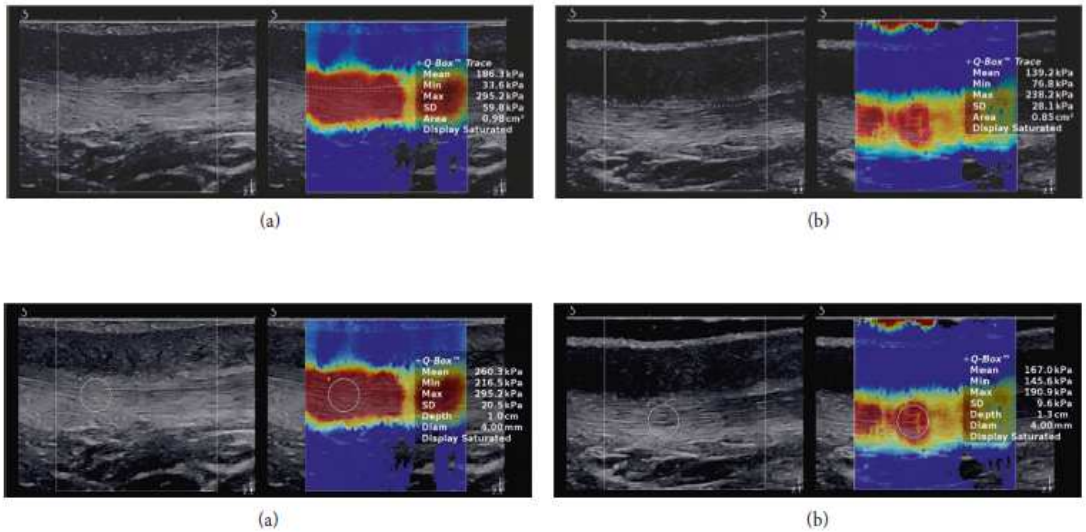
Obr. 27: *Stimulace aferentní nervové dráhy senzorického neuronu s důsledkem vzniku reflexního oblouku a motorického účinku vysokoindukční magnetické stimulace. Proudové impulzy vytvářené touto fyzikální intervencí mají již natolik velkou hustotu indukovaného elektrického proudu, že mezi Ranvierovými zářezy zajistí dostatečný potenciálový spád, který generuje akční potenciál šířící se po axonu senzorického neuronu a dále vytvořeným reflexním obloukem. Na těle nervové buňky je však stále tak malý napěťový spád, že se není nutno obávat elektrického poškození membrány těla samotné nervové buňky. Obrázek byl vytvořen na základě publikovaného schematu reflexního oblouku, převzato z: https://www.quizover.com/course/section/types-of neurons-nervous-system-by-openstax*

Z hlediska experimentálního studia jednoho z posledně jmenovaných aspektů (elasticita vazů a šlach) byla uskutečněna měření (11 probandů), která měla přispět k potvrzení možností ovlivnění funkčních vlastností měkkých tkání, které mají afinitu k onemocněním pohybového aparátu, a to prostřednictvím fyzikální intervence vysokoindukční magnetickou stimulací (ve studii uplatněn přístroj typu *Saluter Moti*). Zvoleno bylo ligamentum patelae, vysokoindukční magnetická stimulace měla parametry:

- frekvence 20 Hz,
- paket délky 2 s,
- pausa 5 s,
- maximální hodnota magnetické indukce 2,5 T,
- hustota indukovaného elektrického proudu v oblasti šlachy 100 A/m^2 ,
- účinek percepční i šetrně, ale prokazatelně motorický.

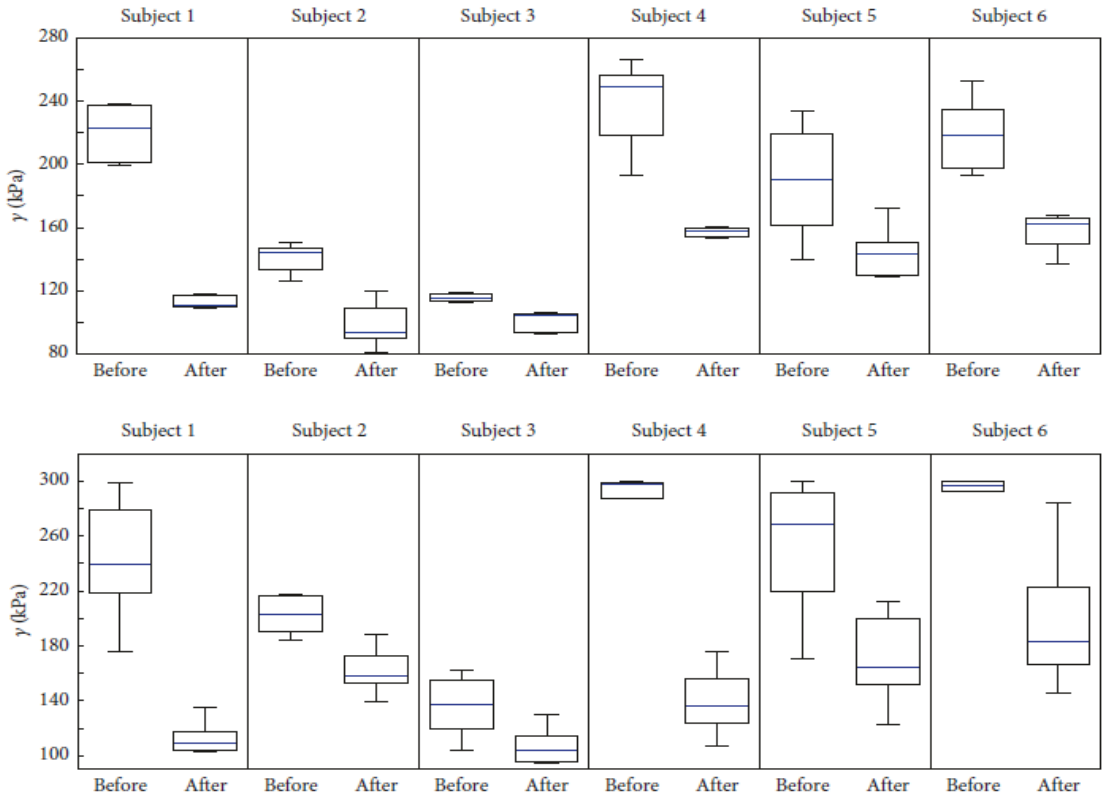
Onemocnění lokomočního aparátu jsou často spojena se změnami elasticity měkkých tkání, která by měla být průtokem indukovaných elektrických proudů vysoké proudové hustoty při vysokoindukční magnetické stimulaci příznivě ovlivněna. Jako objektivizační diagnostické metody bylo použito ultrazvukové elastografie typu shear-wave, prováděné přístrojem typu Aixplorer.

Následující obrázek 28 ilustruje měření zvoleného ligamenta:



Obr. 28: *Všechny demonstrované snímky představují kvantitativní ohodnocení střihového napětí (shear stress) ve vazu ligamentum patellae. Snímky vlevo, označeny (a), se vztahují ke stavu před podáním procedury vysokoindukční magnetické stimulace, snímky vpravo, označeny (b), se vztahují ke stavu krátce po podání vysokoindukční magnetické stimulace. Obrázky nahoře demonstrují měření v celé na snímku zachycené části vazu, obrázky dole zachycují měření v místě maximální tuhosti vazu. Převzato z práce (18).*

Histogramy na obr. 29 (18) vyjadřují změnu elasticity ligamenta v místě její maximální tuhosti (graf na obrázku nahoře) a v celém změřeném objemu ligamenta (graf na obrázku dole):



Obr. 29: *Změřené změny elasticity ligamenta před (Before) a po (After) proceduře vysokoindukční magnetické stimulace. Box-plots představují vždy medián, 1. a 3. kvartil a maximální a minimální hodnotu z opakovaných měření. Yangův modul pružnosti je uveden na vertikální ose v kPa. Převzato z práce (18).*

Všechny naměřené změny jsou konsistentní a signifikantní sumární výsledek svědčí pro zvýšení elasticity šlach a vazů vlivem léčebného působení vysokoindukční magnetické stimulace. Tento efekt je připisován mechanickému napínání a uvolňování ligamenta během svalové stimulace, prováděných s relativně vysokou frekvencí 20 Hz, kterou je ovšem sval svými kontrakcemi a uvolněními do určité míry ještě schopen periodicky sledovat a tak zajistit požadovanou a jinak těžko dosažitelnou mechanicky evokovanou změnu struktury ligamenta rezultující ve zvýšení elasticity. Lze uvažovat i o uplatnění efektu vlnitého tetanu. Je zřejmé, že pro tyto účely jsou nezbytné dostatečně velké amplitudy stimulujícího indukovaného elektrického proudu a tím i použití vysokých magnetických indukcí se zřetelným svalově motorickým účinkem. V průměru se Yangův modul pružnosti při měření v celém zobrazeném objemu ligamenta zmenšil z původní hodnoty 207,3 kPa na hodnotu 121,7 kPa a při měření v místě maximální tuhosti se Yangův modul pružnosti snížil z 254,3

kPa na 147,3 kPa. Výsledky byly dosaženy na hladině významnosti p=0,03. Snížení Yangova modulu pružnosti vyjadřuje zvýšení elastičnosti, tedy potřebu pro protažení vazu vynaložit menší napětí, tedy menší sílu vztaženou perpendikulárně k ploše, na níž působí. Pro ilustraci je Yangův modul pružnosti gumy může být v řádu jednotek až desítek kPa.

3.3.2 Výzkum změn viskoelastických vlastností tkání ovlivňovaných vysokoindukční magnetickou stimulací pomocí myotonometrie

Značná pozornost byla během řešení projektu NV16-28784A, vedoucího k přípravě této metodiky, věnována výzkumu předpokládaných změn viskoelastických vlastností měkkých tkání, zejména svalů, pod vlivem HIMS, tedy disperznímu vlivu této fyzikální intervence. Výzkumy propvedené již v roce 2017 a publikované v roce 2018 zcela jednoznačně ukázaly na možnost zvýšení elasticity ligament a šlach, viz výše zmíněná publikovaná práce (18):

> *Průcha, J., Socha, V., Sochova, V., Hanakova, L., Stojic, S. Effect of High-Induction Magnetic Stimulation on Elasticity of the Patellar Tendon. J Healthc Eng, 2018, art. no. 7172034.*

Pro další výzkumy disperzních účinků vysokoindukční magnetické stimulace, zejména pro měření elasticity sledované tkáně byl v roce 2018 a roce 2019 využíván **myotonometer** (poskytnut zápůjčkou - Technická univerzita v Liberci), který simuluje diagnostickou palpaci (obr. 30). Na základě zvoleného postupu profilu indentoru je možno určit rychlost pohybu, hloubku vtlačení indentoru do tkáně a počet kroků (jemnost) měření. Je možné vytvořit plynulý pohyb konstantní rychlosti nebo dosáhnout jiného komplikovaného pohybu se zrychlením, přestávkami a čekáním v určité poloze, spolu se všemi kombinacemi výše uvedených stavů. Pohyb může být definován pevnou polohou, v níž je odčítána odpovídající síla. Proto je možno vytvořit závislost síly na hloubce vtlačení (průniku) indentoru, stejně jako naopak závislost hloubky vtlačení na působící síle.

Naměřená síla (jednotka Newtony) může být dle zvoleného indentoru a znalosti jeho kontaktního povrchu konvertovaná a převedená na tlak pomocí jednoduché konverze. Dále toto zařízení umožňuje, pomocí firmware, vykreslení hysterezní křivky zatěžující a uvolňující síly. Na základě definovaných nastavení je z křivky možné vyjádřit elastickou a viskózní složku sledované tkáně.

Obr. 30: *Zařízení pro měření viskoelasticity tkáně „Myotonometer“ (vlevo) a reálný setup při realizaci měření (vpravo).*

Pro zodpovězení výzkumných otázek, týkající se objektivizace účinnosti vysokoindukční magnetické stimulace (HIMS), byly využívány možnosti této diagnostické metodiky. Mimo uvedené byl taktéž měřen klidový potenciál svalu prostřednictvím elektromyografie.

Obr. 31*: Aplikátor pro vysokoindukční magnetickou stimulaci přiložený k m. biceps brachii.*

Samotné experimentální měření sestává z aplikace vysokoindukční magnetické stimulace s využitím komerčního zařízení SETA-D (obr. 31). HIMS byla uplatněna na dominantní horní končetinu v obasti *m. biceps brachii* a radiálního, příp. ulnárního ligamenta. Nastavení magnetické indukce je na úrovni 1,2 T s induktorem, aplikátorem o průměru 100 mm.

Procedura trvala 10 minut, sestávala se z 10 sérií za minutu, přičemž bylo indukováno 6 impulzů v jedné sérii.

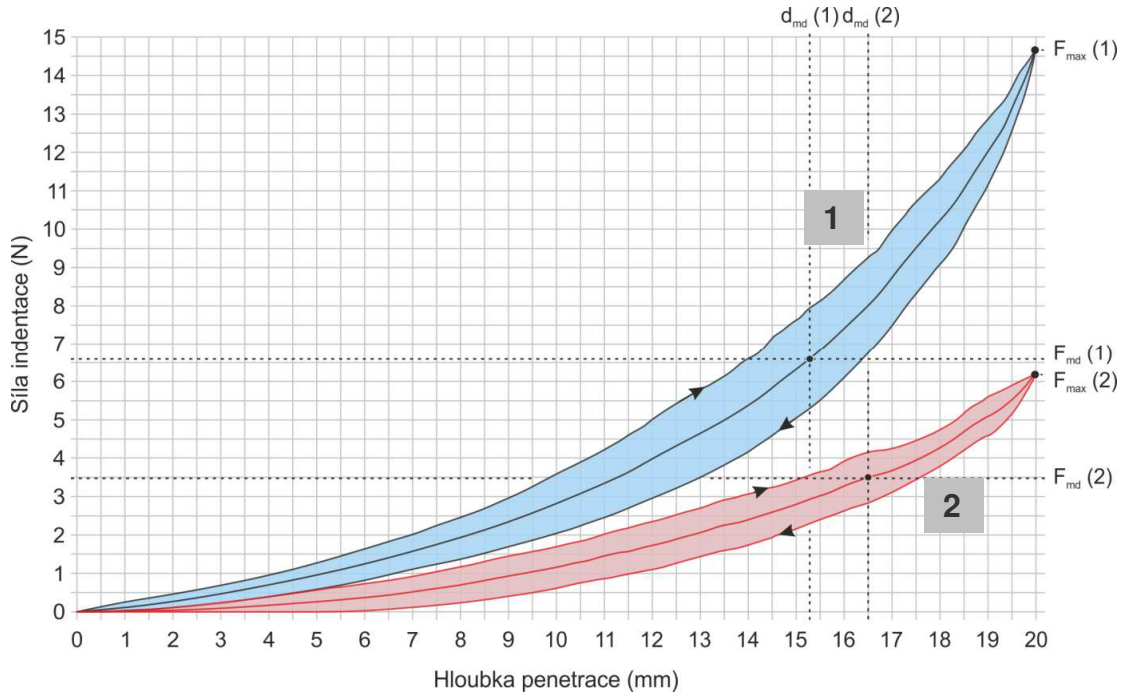
Sběr dat (s využitím myotonometru a EMG) byl realizován bezprostředně před a po aplikaci HIMS. Základní hypotézou přitom bylo, že se biomechanické viskoelastické vlastnosti tkání v místě aplikace signifikantně změní před a po působení HIMS.

Každý subjekt byl měřen s jednotným nastavením myotonometru tak, aby byla zabezpečena uniformnost měření a možnost následné evaluace dat. Toto nastavení bylo zjištěno experimentálně, a to tak, aby zabezpečilo správné naměření celé hysterezní křivky. Konkrétně se jednalo o nastavení maximálního limitu působící síly F_{lim} = 30 N, hloubku penetrace d_{max} = 20 mm, rychlost indentace v = 3 mm/s. Použit byl cylindrický indentor s průměrem 18 mm. Trvání jednoho měření s využitím myotonometeru je 13,33 s. Sval byl měřen ve středu, na bříšku bicepsu. Lokalizace pro měření byla určena zejména s ohledem na jednoduchou identifikaci a eliminaci vlivu jiných tkáňových struktur.

Myopotenciály byly měřeny standardním způsobem, diferenciálně, se vzorkovací frekvencí záznamu 512 Hz.

Základním kritériem pro zařazení participanta do studie je, aby jeho osobní anamnéza byla negativní na jakékoli onemocnění pohybového aparátu, systémové onemocnění a jakákoli jiná onemocnění, která by mohla ovlivnit elasticitu sledovaných struktur. Anamnéza o prodělaných úrazech a operacích musela být taktéž negativní. Celá studia byla vykonána pod lékařským dohledem, v souladu s Helsinskou deklarací a s informovaným souhlasem účastníků. V rámci projektu NV16-28784A proběhl experiment na 15 subjektech.

Pro účely analýzy byl využit parametr, který charakterizuje maximální dosaženou indentační sílu F_{max} při maximální definované penetraci 20 mm. Tento parametr charakterizuje rezistenci vyšetřované tkáně v maximální definované hloubce penetrace. Dalším sledovaným parametrem byla síla F_{md}, která charakterizuje sílu ležící na křivce elasticity (střední linie hysterezní křivky), a to v oblasti s největší energií, přičemž je tato oblast charakterizována hloubkou penetrace d_{md}. Mimo uvedené byl do analýzy zahrnut i poměr F_{md}/d_{md}, a dále na základě přepočtu při znalosti plochy indentoru také maximální dosažený tlak P_{max}, resp. P_{md}. Tyto parametry souvisí s viskozitou tkání. Posledním sledovaným parametrem je disipační energie, tj. plocha mezi křivkami reprezentujícími zatížení a uvolnění. Tento parametr odpovídá elasticitě tkání. Uvedené parametry jsou zobrazeny na obr. 21 společně s příkladem hysterezních křivek změřených v rámci experimentu u subjektu č. 5.

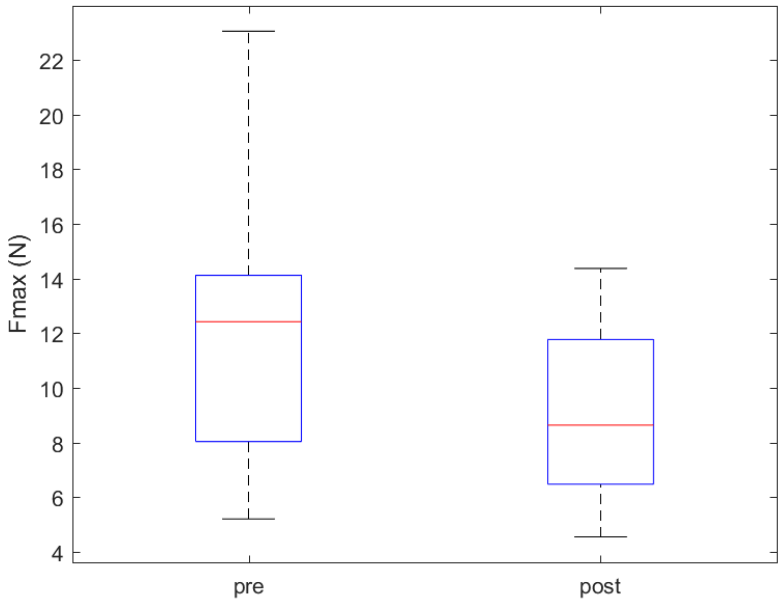


Obr 32: *Příklad hysterezních křivek pro subjekt 5 charakterizujících viskoelastické vlastnosti m. biceps brachii před aplikací vykoindukční magnetické stimulace – modrá křivka (1) a po její aplikaci – červená křivka (2).*

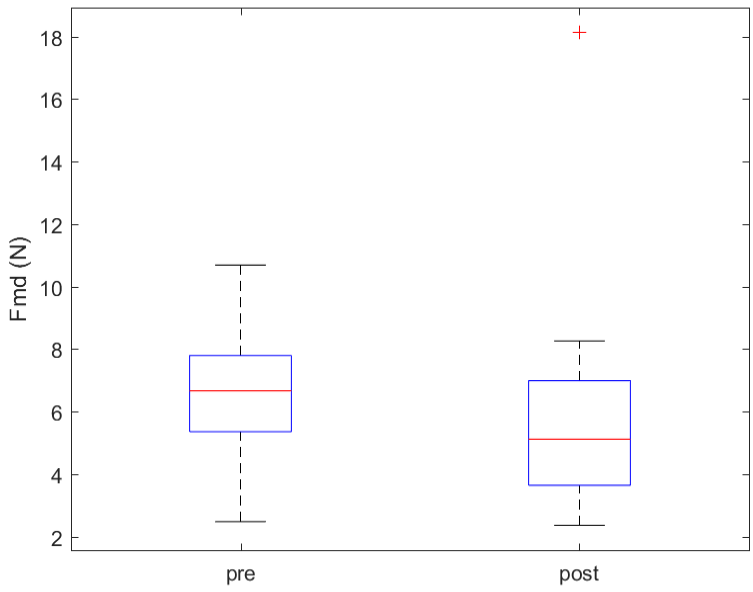
Samotné parametry získané při měření na *m. biceps brachii* byly komplexně zpracovány na konci experimentálních měření, tedy post-hoc, a to proto, aby vyhodnocování na místě, resp. v průběhu výzkumné aktivity, neovlivňovalo vyšetřování.

Další úsilí bylo věnováno prezentaci a diskusi získaných výsledků.

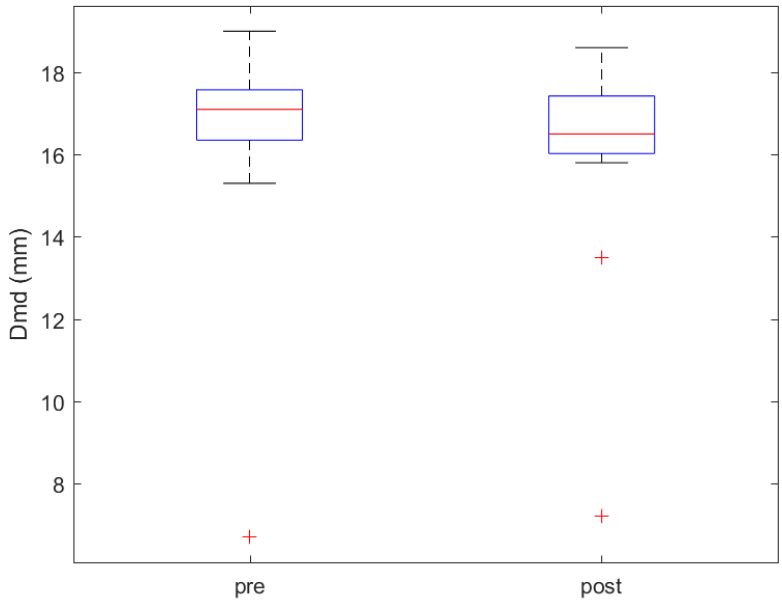
Jednotlivé parametry získané před a po aplikaci HIMS byly statisticky porovnány. S ohledem na velikost souboru a vyvrácené hypotéze o normálním rozdělení byla statistická podobnost testována pomocí znaménkového testu na hladině významnosti $\alpha = 5$ %. Distribuce jednotlivých parametrů byla znázorněna prostřednictvím boxplotů (viz obr.33 - 39). Mezi zobrazenými parametry pak není uveden parametr d_{max}, který byl pro všechny subjekty fixně nastaven, tj. pro všechna měření byl konstantní.



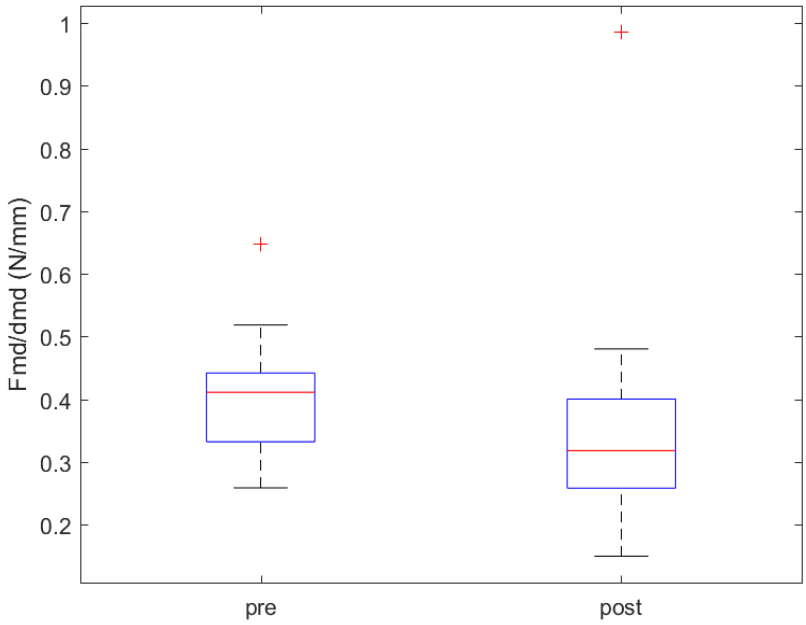
Obr. 33: *Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující maximální dosaženou sílu při penetraci (F_{max}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace.*



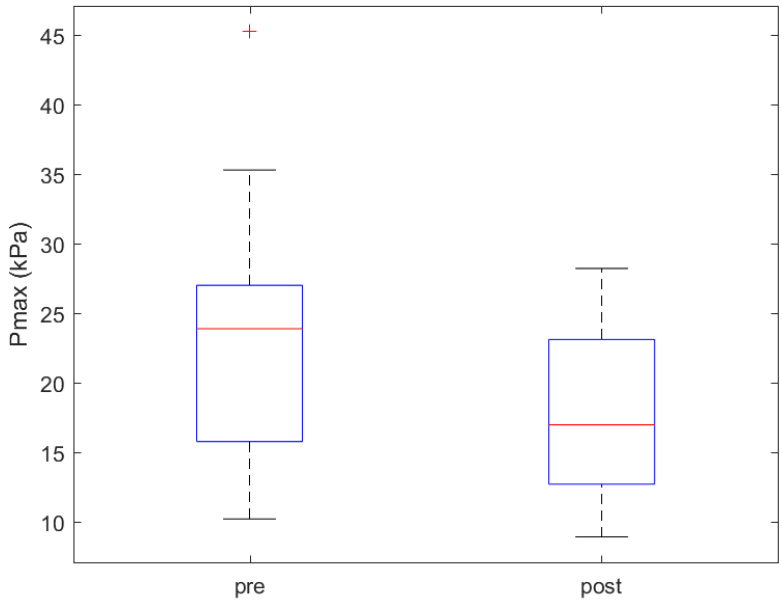
Obr. 34: *Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující sílu při penetraci v bodě největší energie hysterezní křivky (F_{md}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace.*



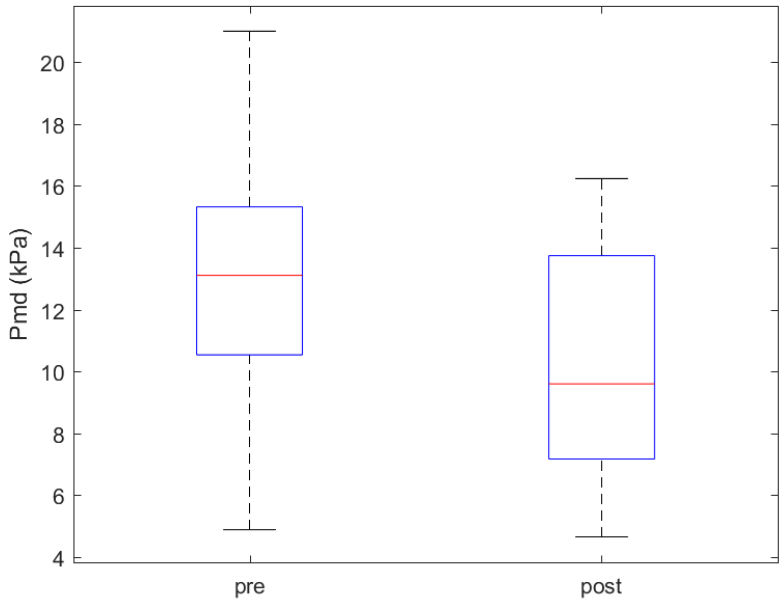
Obr. 35: *Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující hloubku penetrace v bodě největší energie hysterezní křivky (d_{md}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace.*



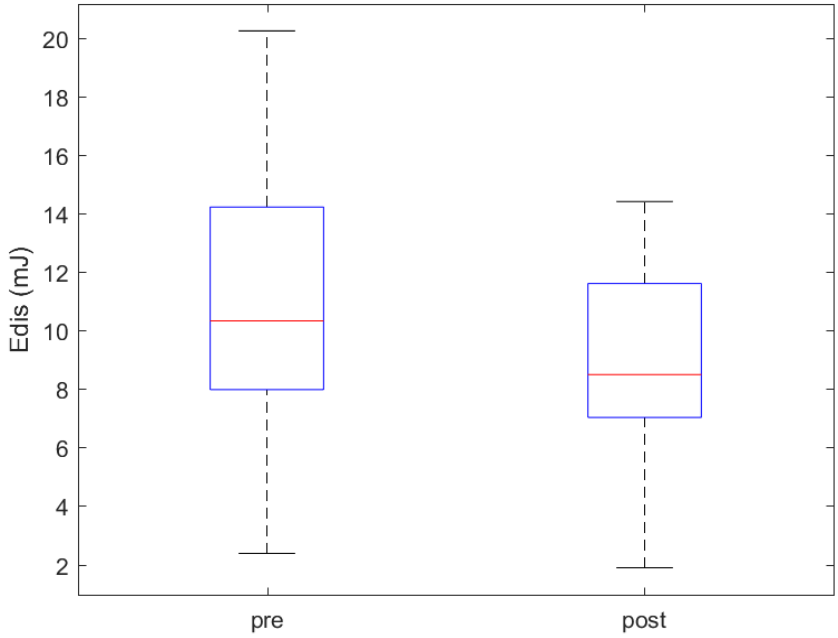
Obr. 36: *Grafické zobrazení distribuce poměru parametrů charakterizujících sílu a hloubku penetrace v bodě největší energie hysterezní křivky (F_{md}/d_{md}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace.*



Obr. 37: *Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující maximální dosažený tlak při penetraci (P_{max}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace.*



Obr. 38*: Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující tlak při penetraci v bodě největší energie hysterezní křivky (P_{md}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vysokoindukční magnetické stimulace.*



***Obr. 39**: Grafické zobrazení distribuce parametru charakterizující disipační energii při penetraci (E_{dis}) naměřené před (pre) a po (post) aplikaci vykoindukční magnetické stimulace*.

Z výše uvedených distribucí (obr. 33 – 39) je zjevné, že u všech sledovaných parametrů došlo u skupiny subjektů k poklesu mediánů těchto parametrů. Jak již bylo uvedeno, statistická podobnost byla pro stav před a po aplikaci HIMS standardně testována a výsledky analýzy prezentované prostřednictvím p-hodnot jsou zobrazeny v tabulce 4.

parametr	F_{max}	F_{md}	d_{md}	F_{md}/d_{md}	P_{max}	P_{md}	E_{dis}
p-hodnota	0,0186*	0,0098*	0,0801	0,0302*	0,0186*	0,0098*	0,0420*

*statisticky signifikantní rozdíl mezi parametrem před a po aplikaci HIMS

Tab. 4: Výsledky znaménkového testu (hladina významnosti $\alpha = 5$ %) pro parametry získané před a po aplikaci vysokoindukční magnetické stimulace (HIMS).

Z výsledků uvedených v tabulce 4 je zřejmé, že téměř u všech parametrů byl pozorován statisticky signifikantní rozdíl mezi parametry získanými před a po aplikaci HIMS. Jediným parametrem s odlišnými projevy byl parametr d_{md}, u něhož, stejně jako u ostatních parametrů došlo k poklesu mediánu (viz obr. 35), avšak tento pokles nebyl statisticky signifikantní.

Na základě výsledků je možné tvrdit, že po aplikaci HIMS dochází ke změně svalové ztuhlosti, tj. k jejímu snížení. Uvedené tvrzení podporují téměř všechny sledované parametry mimo d_{md}. Jak je však patrné, tento parametr je závislý na maximální energii hysterezní křivky v dané penetrační hloubce a při charakteristické síle indentace. Z těchto důvodů se zdá jako vhodnější využití jejich poměru, tj. poměru F_{md}/d_{md}, který poukazuje na komplexnější změnu viskoelastických vlastností měřené tkáně.

3.3.3 Výzkum změn mikrovaskulární perfuze pod vlivem vysokoindukční magnetické stimulace

3.3.3.1 Výzkum za pomoci laserové dopplerovské flowmetrie

Pro měření změn mikrovaskulární perfuze při aplikaci indukovaných elektrických proudů se zvláště osvědčila laserová dopplerovská flowmetrie, realizovaná za pomoci přístroje PeriFlux System 5000 (společnost Perimed, Švédsko) se sondou vyhřívanou na vysoce přesnou konstantní teplotu. Jako nejvhodnější lokalita pro umístění sondy bylo určeno dobře vaskularizované lůžko 1. prstu nohy. Pro propojení sondy s přístrojem bylo vyvinuto unikátní stínění minimalizující šum, jakož i vliv indukovaných elektrických proudů produkovaných samotným aplikátorem přístroje pro vysokoindukční magnetickou stimulaci.

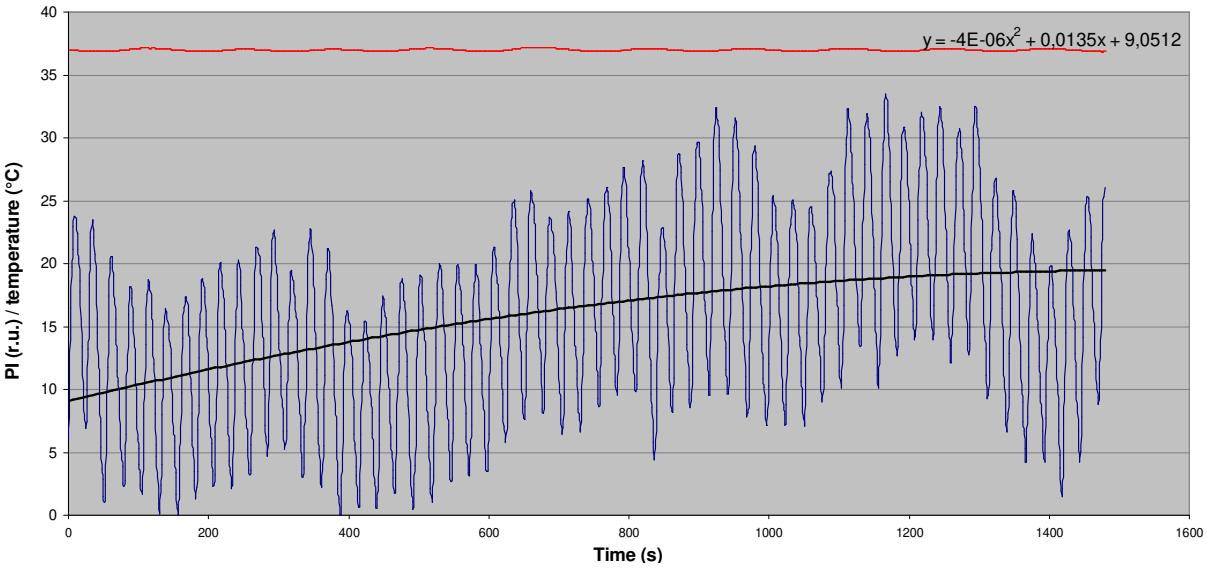
Při vyhodnocování dat bylo využito SW aplikace PeriSoft a dále pak námi vyvinuté aplikace v Matlabu. Pro podávání procedur bylo používáno certifikovaného přístroje Saluter Moti společnosti Embitron s.r.o. s chlazeným aplikátorem. Srovnávací experimenty byly prováděny rovněž s využitím certifikovaného přístroje Salus Talent (CRTechnology Co., Ltd., Korea), který nabízí srovnatelné parametry. První části studie, kdy aplikátor přístroje byl přiložen na distální část dolní končetiny, se postupně zúčastnilo 21 probandů s rovnoměrným zastoupením podle pohlaví i věku. Získaná průměrná hodnota časové změny mikrovaskulární perfuze během 25 minut trvající procedury je demonstrována na obrázku 40.

Ukazuje se statisticky významný nárůst mikrovaskulární perfuze v několika časových fázích následovaných vždy opětovným mírným poklesem. Interpolaci dat nejlépe vyhovoval polynom 2. řádu (viz. černá křivka v grafu). Celkový nárůst perfuze je sice patrný, statisticky

významný, avšak ve srovnání s jinými fyzikálními podněty podporujícími prokrvení tkání (např. vakuově-kompresní terapií) se jedná o změnu malou; maximální inkrement se pohybuje kolem 10 relativních jednotek, což v průměru znamenalo maximální nárůst mikrovaskulární perfuze o 50 % oproti výchozímu stavu. Mírné zvýšení mikrovaskulární perfuze v oblasti aplikace HIMS během lokálního podávání procedury je však prokazatelné a signifikantní.

Domníváme se, že důvodem je především percepční a zřetelně nadprahové svalově-motorické působení HIMS, kterého bylo při aplikované frekvenci 10 až 20 Hz, době trvání paketu 1-2 sekundy, pause 3 – 5 sekund a amplitudě indukovaných elektrických proudů řádově desítek A/m^2 až 100 A/m^2 běžně dosahováno.

Často zmiňovanou otázku uvolnění prekapilárních sfinkterů nelze na základě získaných výsledků vyloučit ani potvrdit, ale další experimenty (viz dále) s měřením perfuzního indexu ukázaly, že pravděpodobným mechanismem nárůstu lokální periferní perfuze je otevírání jinak uzavřených kapilár. Kontrolní experimenty s pulzní magnetoterapií při indukci řádu desítek mT hluboko pod prahem percepce a s hustotou indukovaného elektrického proudu o 3 řády nižší (setiny A/m^2) – tedy typickými parametry pulzní magnetoterapie - však neprokázaly žádný vliv na kapilární perfuzi měřenou laserovou dopplerovskou flowmetrií.



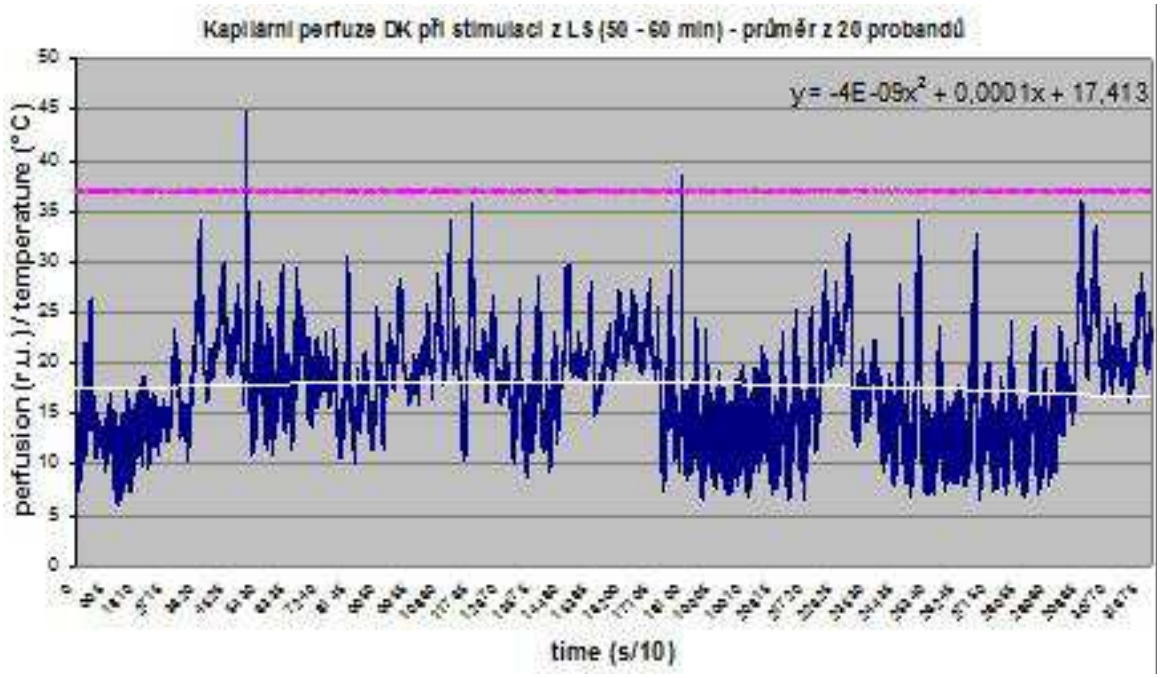
Obr. 40: *Časová změna mikrokapilární perfuze při přímé aplikaci vysokoindukční magnetické stimulace na distální část DK. Procedury byly podávány po dobu 25 minut. Na grafu je vynesen časový průběh průměru získaného z měření 21 probandů.*

Výsledky obdobně provedené studie s 20 probandy, u nichž byla aplikace HIMS zaměřena na oblast LS laterálně s cílem dosáhnout zlepšeného prokrvení dolní končetiny, jejíž inervace a cévní zásobování touto oblastí prochází, zjevně neukazují na žádný perfuzní dopad na distální části takto ovlivňované dolní končetiny. I když se ve fyzikální terapii tradičně předpokládá podpora periferní perfuze kontaktní aplikací elektrických proudů na příslušný segment páteře, při použití indukovaných elektrických proudů při HIMS, a to se zřetelně hlubším průnikem, jsme tento jev v naší studii nezaznamenali. Ilustrace na grafu obrázek 2 naznačuje naopak spíše mírné snížení perfuze o několik málo relativních jednotek (na grafu na obr. 41 je interpolační křivka odpovídající polynomu 2. řádu vykreslena bíle).

Zaznamenaný pokles perfuze je sice při vyhodnocení z-testem dokonce signifikantní, což je však spíše následkem velkého počtu dat, nikoliv skutečně klinicky významného poklesu prokrvení periferie, potenciálně ovlivňovaného vzdáleným působením HIMS na příslušný segment páteře.

Reálné zhodnocení situace spíše svědčí pro absenci jakéhokoliv vlivu segmentálně aplikované HIMS na periferní prokrvení, i když procedury byly voleny poměrně dlouhé (50 – 60 min).

Pro statistické vyhodnocování získaných dat bylo využito t-testů a z-testů stat. významnosti.



Obr. 41: *Časová změna mikrokapilární perfuze na distální části DK při segentální aplikaci vysokoindukční magnetické stimulace*

3.3.3.2 Výzkum za pomoci kapilaroskopie

U pacientů zařazených do klinických studií (viz dále) byl rovněž zjišťován stav kapilár nehtového lůžka dolní končetiny. Byli zvoleni pacienti s prokázanými končetinovými ischémiemi. **Kapilaroskopie** byla zvolena proto, že na rozdíl od laserové dopplerovské flowmetrie nezahrnuje současně nutritivní i termoregulační řečiště, ale soustředí se především na povrchovou, tedy nutritivní část vaskuatury. Jedná se však výlučně o subjektivně hodnocenou obrazovou informaci. Náplní studie bylo zaznamenat stav kapilár před procedurou HIMS, po proceduře i po ukončené sérii procedur. Obrazový záznam byl pořizován za pomoci kapilaroskopu Dino Capture 2 s anulárním osvětlením. Diagnostický přístroj byl napojen na počítač. Subjektivně bylo toto měření velmi náročné, zvláště na vyhledání vhodné lokality měření na akrální části dolní končetiny při nehtovém lůžku. Z principu nebylo možno dokonale zajistit, aby časově vzdálená měření probíhala vždy na stejném místě.

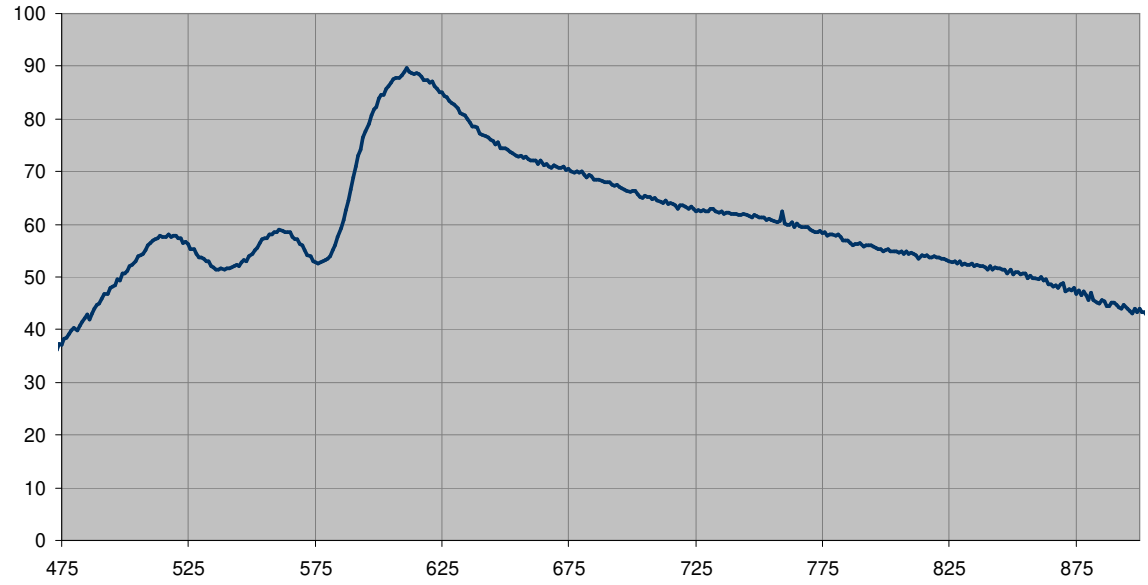
Sledován byl počet kapilár, avaskulární a vaskulární zóny, přítomnost porušených kapilár, dilatované kapiláry, megakapiláry, stupeň stázy, trombóza kapilár, hemorrhagie apod. V souvislosti s podáváním procedur HIMS byl proveden pokus o dynamické sledování v reálném čase během procedury, které však nebylo i přes snahu o permalloyové stínění kapilaroskopu od aplikátoru technicky možné. Ze získaných záznamů (ilustrace viz obrázek č. 3) nebylo možno vyhodnotit žádné strukturální změny v obraze kliček kapilárního řečiště při porovnání před a po proceduře i po ukončené sérii procedur HIMS.

Obr. 42: *Ilustrace kapilaroskopie*

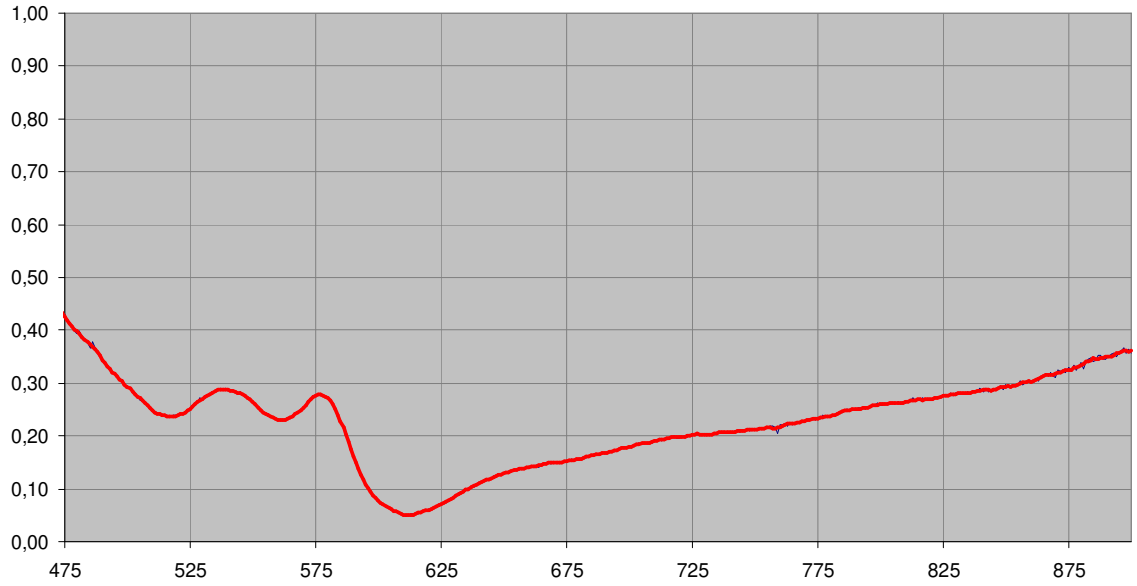
3.3.3.3 Výzkum za pomoci remisní spetrofotometrie

Remisní spektrofotometrie rovněž umožňuje zachytit změny vyvolané aplikací HIMS. Prostřednictvím spektofotometru Optic Ocean, s pomocí námi vyvinuté Ulbrichtovy polokoule jako snímače a s využitím rovněž vyvinutého polychromatického zdroje světla VIS a NIR oblasti jsme naměřili spektrální křivky a z nich vypočetli hodnoty logaritmu inverzní reflektance (LIR). Z těchto hodnot jsme pak pomocí empirických vztahů vypočítali procentuální hodnoty saturace krve kyslíkem (sondou je zachycena jak složka arteriální, kapilární, tak i venózní krve) a relativní změny koncentrace oxyhemoglobinu, deoxyhemoglobinu i celkového hemoglobinu v krvi.

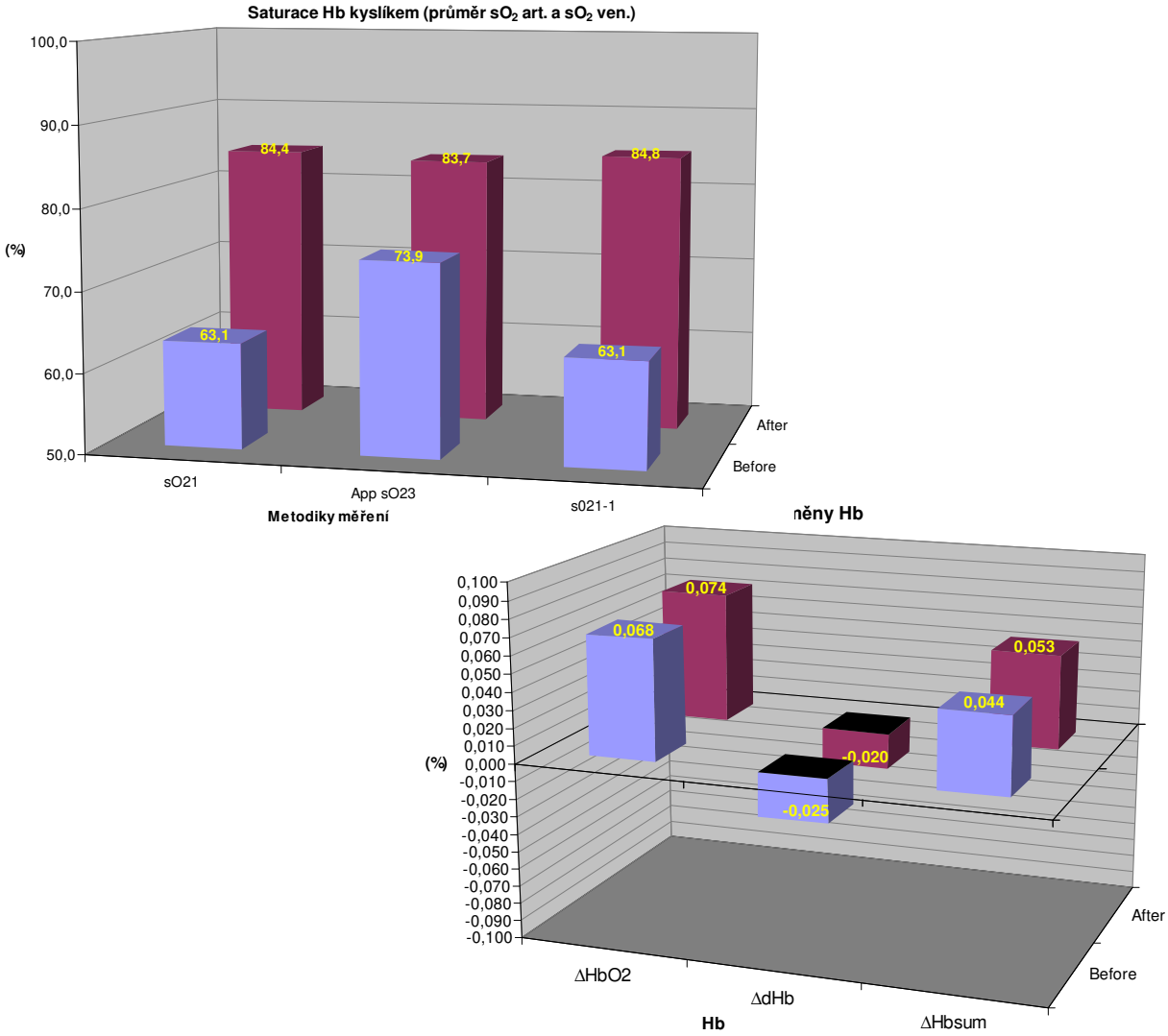
Měřili jsme vždy na akrálních částech dolních končetin a vyhodnocovali stav před a po lokální aplikaci procedury HIMS při jediném přiložení sondy. Experimentální data jsme takto získali od 18 probanů, snažili jsme se opět o vyrovnanost tohoto souboru z hlediska pohlaví a preferovali jsme starší probandy, u kterých bylo lze předpokládat určité limitace v možnostech periferní perfuze a tím i zřetelnější efekt působení procedury HIMS. Zprůměrňované grafy remisního spektra (modře) i spektra logaritmu inverzní reflektance LIR (červeně) uvádí obrázky č. 43 a 44 v přiložené verzi „Postupu prací a rozboru řešení“, která zahrnuje i obrazovou dokumentaci (v přílohách). Ve spektrech jsou dobře patrna maxima oxyhemoglobinu, což je jedním z důkazů validity těchto měření. Samotné výpočty saturace krve kyslíkem byly provedeny podle třech různých metodik a poskytují vysoce signifikantní cca 10 až 20% nárůst. Rovněž tak signifikantní je nárůst koncentrace hemoglobinu, i když absolutní hodnota inkrementu se pohybuje v řádu setin procent.



Obr. 43: *Zprůměrňovaný graf remisního spektra*



Obr. 43: *Zprůměrňované grafy spektra vyjádřeného jako logaritmu inverzní reflektance*



Obr 44: *Výsledné změny v saturaci krve kyslíkem a v koncentraci hemoglobinu*

Zaznamenané změny byly zcela jednoznačně vyvolávány aplikací procedur HIMS, ovšem soudíme, že se na nich významnou měrou opět podílely percepční a zejména svalově motorické efekty, vytvářené podáváním této procedury při motoricky nadprahové intenzitě. Z provedených experimentů je patrné, že procedury HIMS aplikované s nadprahově motorickou intenzitou stimulace do místa aplikace redistribují skutečně větší množství krve, čímž zajišťují též vyšší saturaci krve kyslíkem.

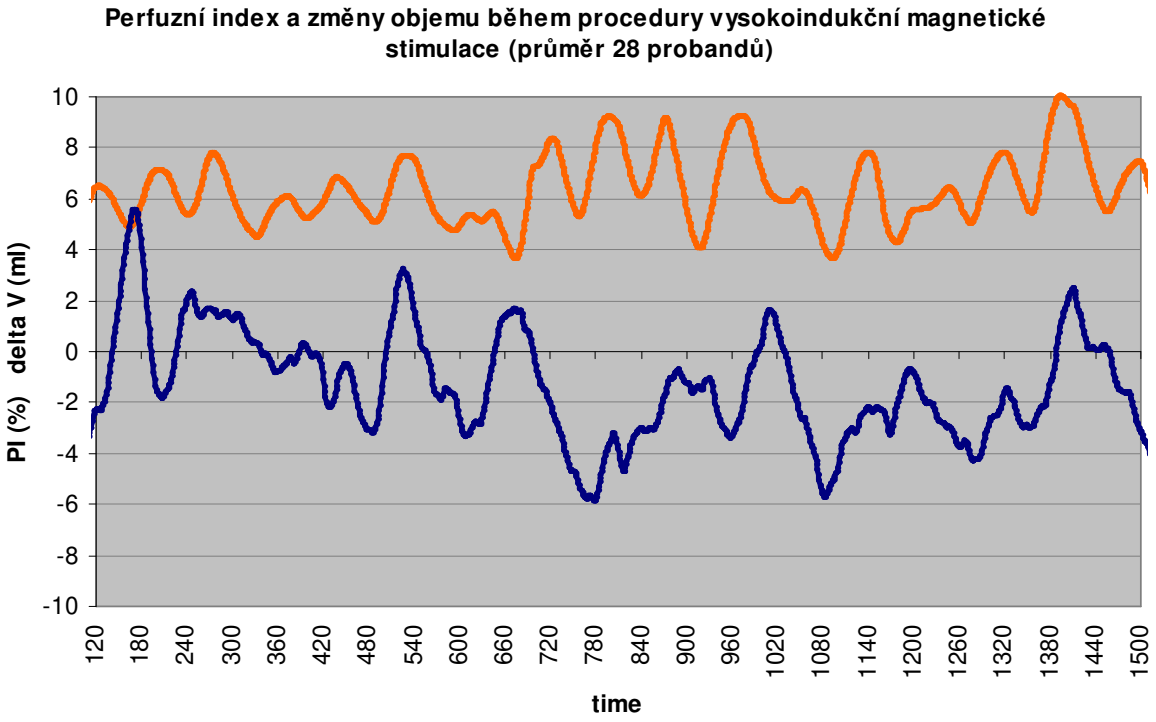
Podmínkou se přitom vždy ukazuje, aby fyzikální intervence vytvářela v oblasti léčených tkání indukované elektrické proudy dostatečné proudové hustoty schopné vyvolávat percepční a svalově motorickou odezvu, a tím i vyšší přísun krve a kyslíku. Větší počet pohybujících se erytrocytů s dostatečně oxygenovaným hemoglobinem v kapilárním a mikrovaskulárním krevním toku při proceduře HIMS je kromě remisní spektrofotometrie, vyvinuté pro účely našich výzkumů prokazován též standardní metodou laserové dopplerovské flowmetrie (viz výše). Předpokládáme, že při aplikaci HIMS dochází vlivem percepčních, ale též svalově motorických efektů k dráždění aferentních somatosenzitivních nervových vláken typu Ib a II. Zároveň je realizována jistá míra svalové aktivity. Tyto faktory způsobují mimo jiné otevření jinak uzavřených kapilár, tím i snížení systémového odporu vaskulatury v dané oblasti fyzikální intervence, zlepšení prokrvení a tím i zvýšení saturace léčených tkání kyslíkem.

3.3.3.4 Výzkum s uplatněním perfuzního indexu a kapacitní pletysmografie

Další výzkumy založené na uplatnění námi vyvinuté metody měření perfuzního indexu (PI) prostřednictvím modifikovaného přístroje pro optickou pulzní oxymetrii ukazují, že aplikace HIMS do léčené oblasti periferie na rozdíl od jiných vazoaktivních fyzikálních intervencí (například vakuově-kompresní terapie) nepřivádí v pulzní vlně zvýšené množství okysličené krve. Perfuzní index je poměr objemu pulzní složky a objemu časově konstantní, nepulzující složky krve v měřené oblasti a udává tudíž příspěvek nově přiváděné okysličené krve do dané oblasti. Tudíž, jinými metodami (laserová dopplerovská flowmetrie, remisní spektro-fotometrie) prokázané zlepšení perfuze tak nepadá na vrub zvýšenému přísunu okysličené krve jako projevu vlivu HIMS na centrální hemodynamiku pacienta, ale je důsledkem lepší redistribuce krevního toku bezprostředně ve stimulované oblasti.

Obrázek č. 45 demonstruje výsledek měření perfuzního indexu jako parametru makrovaskulární perfuze. Toto měření se provádělo společně s pletysmografickým měřením změn objemu končetiny ovlivňované HIMS. Pletysmografické měření bylo založeno na

impedanční metodě s využitím kapacitního snímače, kdy jedna z elektrod v podobě půlválcové plochy se nacházela v blízkosti měřené končetiny a druhá byla tvořena povrchem končetiny, jejíž změna objemu byla měřena. Potvrdilo se očekávání, že HIMS nemá vliv na změny objemu končetiny – není schopna redistribuovat tekutiny v inersticiu, ani aktivně působit na lymfatickou drenáž jiným způsobem, než prostřednictvím navozovaných svalových kontrakcí. Mírný pokles objemu končetiny je typickým důsledkem klidové supinační pozice probandů při stimulaci a měření. Často citované antiedematózní účinky u pacientů s otoky lze tudíž přičíst na vrub vyvolávání kontrakcí a mikrokontrakcí svalů léčené končetiny, případně na vrub kapilární perfuze se zlepšenou filtrací i resorpcí nově otevřených kapilár.



Obr. 45: Časový vývoj perfuzního indexu jako parametru makrovaskulární perfuze během 25 minutové procedury HIMS (červeně). Toto měření se provádělo společně s pletysmografickým měřením změn objemu končetiny ovlivňované HIMS (modře).

3.4 Multicentrická klinická studie a její diskuse a vyhodnocení

Celkem byly provedeny 3 dílčí klinické studie s zahrnutím celkového počtu 155 pacientů a podaných 169 ukončených sérií procedur. Tento rozsah považují řešitelé za jeden z významných atributů této předložené metodiky. Pro srovnání: Dosavadní tuzemské studie, např. studie (20):

> *Šťastný, E., Prouza, O. Clinical study of applied high-induction electromagnetic field on painful conditions. Rehabil. fyz. Lék., roč. 23, 2016, č. 3, s. 142-148)*

zahrnovala 57 pacientů;

další studie (10):

> *Pětioký, J., Váňa, Z., Šubert, D., Žarkovič, D., Prouza, O., Bittner, V. Výkonová indukční stimulace v léčbě algických stavů muskuloskeletárního aparátu – pilotní studie. Rehabil. fyz. Lék., roč. 23, 2016, č. 4, s. 195-200.*

zahrnovala 31 pacientů. Naše multicentrická studie byla organizována tak, že na dvou pracovištích (Therap Tilia Praha a Hamzova odborná léčebna Luže-Košumberk) byly podávány procedury se zvolenými parametry (2,5 T, resp. 1,5 T, 20 Hz, paket 1 s, pauza 4 s – bez tepelného vlivu), na třetím zdravotnickém pracovišti (Rehabilitační ústav Brandýs nad Orlicí) byla vytvořena kontrolní skupina. Sběr dat probíhal po více než 2 roky řešení projektu. Předmětem sledování ve všech studiích byl ústup bolesti podle klasické vizuální analgetické škály (VAS). Převážná většina indikací se týkala dorzopatií a artropatií (celkem 100 pacientů), tedy typických a nejčastějších projevů degenerativních onemocnění pohybového aparátu. Zahrnuty byly ale i některé další indikace (celkem 55 pacientů), viz tabulka na obrázku č. 46. Vypočítané a sumarizované výsledky klinických studií uvádí tabulka č. 5.

Ovlivnění bolesti provázející degenerativní onemocnění pohybového aparátu vysokoindukční magnetickou stimulací (kvantifikace bolesti škálou VAS)		počet procedur	průměr	směrodatná odchylka průměru	medián	t-test proti "celkem"	hladina významnosti p (t-test v rámci podskupin)	hladina významnosti p (t-test proti "kontrolní skupina")
Hamzova odborná léčebna (HOL) Luže-Košumberk	celkem	44	**1,61**	1,27	2,0			0,04
	muži	15	**1,67**	1,28	2,0	0,45	0,30	0,31
	ženy	29	**1,76**	1,33	2,0	0,64		0,03
	artropatie	14	**1,25**	1,04	1,0	0,26	0,01	0,07
	dorzopatie	30	**1,54**	1,27	2,0	0,09		0,004
Terap Tilia Praha	celkem	101	**1,84**	1,93	1,5			0,03
	muži	39	**1,67**	1,84	1,5	0,22	0,07	0,23
	ženy	62	**1,95**	2,07	2,0	0,35		0,01
	starší (61-91)	29	**1,90**	1,63	1,5	0,82	0,78	0,02
	mladší (12-45)	45	**1,77**	1,81	1,5	0,90		0,07
	artropatie	11	**1,82**	1,60	1,5	0,99	0,92	0,08
	dorzopatie	60	**1,88**	1,72	2,0	0,83		0,03
Celkem léčení		145	**1,75**	1,78	1,5			0,03
Kontrolní skupina		24	**0,92**	1,26	0,5			

***Obr. 46:** Sumarizované výsledky klinických studií*

M00–M25	Artropatie				
M30–M36	Systémová onemocnění pojivové tkáně				
M40–M54	Dorzopatie				
M60–M79	Onemocnění měkké tkáně				
M80–M94	Osteopatie a chondropatie				
M95–M99	Jiná onemocnění svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně				

Tab. 5: *Indikace v klinických studiích*

Pro celkem 145 podaných sérií procedur HIMS bylo dosaženo průměrného ústupu bolesti s aritmetickým průměrem 1,75 a mediánem 1,5. Tento výsledek je realistický, práce s pacienty byla provázena snahou, aby jejich subjektivní hodnocení nebylo z jakýchkoliv důvodů nadhodnocováno, aby bylo dostatečně kritické a objektivní. Zároveň bylo dbáno na to, aby se v ústupu bolesti neprojevily žádné jiné bezprostřední faktory léčebné, režimové, psychologické apod. Pokud k podezření na něco takového došlo, byl pacient z vyhodnocení studie vyřazen.

Dosažený průměrný ústup bolesti odpovídá aplikacím jiných fyzikálně léčebných intervencí s potenciálně analgetickým účinkem (laser, elektroléčba, ultrazvuk, …) a rovněž tak odpovídá výše zmíněným dvěma recentním domácím studiím, kde bylo dosaženo hodnot ústupu bolesti 1,5 a 1,8 stupně VAS. Pouze práce (Poděbradský, J., Poděbradská, R.: Clinical study of high-induction electromagnetic stimulator SALUS Talent. Rehabil. fyz. Lék., roč. 17, 2010, č. 3, s. 95-100) cituje 2,7 stupně VAS. Zahraniční autoři uvádějí ústup bolesti o velikostech 2,2 (Lee), 2,33 (Uher). Za zcela nevšední lze považovat výsledek studie (Zarkovic, D., Kazalakova, K.), kteří v souboru 40 pacientů dosáhli zcela mimořádného ústupu bolesti z průměrné počáteční hodnoty VAS 7,6 na hodnotu 1,1, tedy o celých 6,5 stupně. Výzkum uskutečnili na Fakultě tělesné výchovy a sportu v Praze a publikovali v indickém časopise Physical Medicine, Rehabilitation Medicine. Některé naše vlastní – mnohem skromnější – výsledky a jejich vysvětlení předkládá publikace (13):

> *Průcha, J., Dylevský, I., Navrátil, L., Vlachová, V., Krůšek, J., Dittert, I., Skopalik, J., Klapalová, A., Socha, V., Štengl, M. Přínosy základního, preklinického a klinického výzkumu k uplatnění indukovaných elektrických proudů v indikacích rehabilitační a fyzikální medicíny. Rehabilitace a fyzikální lékařství 2019, 26, č. 4.*

Odkazy na ostatní citované autory a jejich práce (12, 9, 21, 22) jsou uvedeny v seznamu literatury a pro jednoduchost citovány i bezprostředně v tomto textu:

Poděbradský, J., Poděbradská, R.: Clinical study of high-induction electromagnetic stimulator SALUS Talent (2010). Rehabilitation and Physical Medicine (on-line), 17, 2010, 3, s. 95-100.

Lee, P.B., Kim, Y.C., Lim, Y.J. et al. Efficacy of Pulzed Electromagnetic Therapy for Chronic Lower Back Pain: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. The Journal of international medical research, 2006, 34(2):160-7. DOI: 10.1177/147323000603400205

Uher, E., Schneider, R., Wewalka, M., Schuhfried, O. Pilot study of musculoskeletal diseases with low effecti-ve high-energy electromagnetic stimulation. Physical Medicine, Rehabilitation Medicine, 2012, 1, s. 22-30.

Zarkovic, D., & Kazalakova, K. (2016). Repetitive peripheral magnetic stimulation as pain management solution in musculoskeletal and neurological disorders - a pilot study. International Journal of Physiotherapy, 3(6), 671-675.

Je dlužno podotknout, že z důvodů srovnatelnosti výsledků, jakož i z dalšího důvodu možnosti použít pro klinické studie výlučně přístroje řádně certifikovaného dle direktiv EU 93/42/EEC, byl aplikován přístroj Saluter Moti s výše uvedenými parametry. Ovšem ani při frekvencích 143 Hz a 150 Hz produkovaných přístrojem typu BTL 6 000 Super Inductive System nebylo jinými autory dosaženo zásadně lepších výsledků (s výjimkou práce (22)). Nepochybně se jedná o určité zklamání, poněvadž výchozí hypotetická představa o analgetickém účinku vysokoindukčního percepčního a dokonce svalově motorického fyzikálně terapeutického přístroje byla optimističtější.

Lze však ještě předpokládat, že nové generace přístrojů s kratším stimulačním impulzem a menší předanou energií, schopných však dosahovat stejných nebo i lepších efektů percepčních i motorických, zvýší i účinnost analgetickou, neboť je zřejmé, že percepce vyvolávaná HIMS, zvláště u některých citlivějších pacientů, vyvolává i určitou algickou odezvu. Ta se pak hypoteticky sčítá s inherentní bolestí a působí proti analgetickému efektu této formy fyzikální intervence, vysvětlovanému endorfinovou, vrátkovou a/nebo kódovou teorií bolesti. Nelze však opomenout, že analgetické efekty, zvláště dlouhodobé, jsou nepochybně podmíněny i podporou perfuze v oblasti léčených tkání, nevyjímaje i významné působení na perfuzi v oblasti vasa nervorum, a tím zlepšování trofiky samotných somatosenzitivních nervů. Stejně tak za dlouhodobé analgetické efekty mohou odpovídat i disperzní účinky HIMS, vyvolávané především svalově-motorickou stimulací, navíc specifickou pro různé frekvence, respektive časové průběhy signálu, jakož i pro odlišné intenzity působení.

Analgetický účinek HIMS nelze tedy hledat jen na základě endorfinové, vrátkové či kódové teorie, ale též na základě významné podpory perfuze v léčené oblasti a na základě disperzních účinků, spočívajících v přeměně nežádoucích oblastí pevné fáze ve tkáních (gel) koloidní roztok (sol) požadovaných fyziologických vlastností.

A konečně, analgetické efekty mají nepochybně i svůj buněčný původ, spočívající zejména v potlačení poškození těch nejvíce citlivých buněk – senzitivních nervových buněk, indikujících a vedoucích informaci o bolesti ze strukturálně nebo funkčně poškozované periferie. Přitom k poškození těchto buněk může např. docházet jejich nadměrnou reakcí na přítomnost chemických látek spojených se zánětem, a to mechanismem, ve kterém hraje významnou roli nárůst intracelulární koncentrace kalcia, jakožto posla 2. řádu parakrinní a autokrinní buněčné komunikace. Tento nárůst je potřebným signálem k reakci buněk na zánět, ale v nadměrné míře vede k jejich poškození končícím nekrózou, spojenou s intenzivním vysíláním informace o bolesti. Fyzikální podněty charakteru indukovaných elektrických proudů (HIMS) mohou nárůst koncentrace intracelulárního kalcia i rychlost náběhu tohoto nárůstu mírnit, tím umožnit buňce uplatnit fyziologické regulační mechanismy, vyhnout se nekróze nebo závažnému poškození, a tak přímo eliminovat důvody pro vznik informací o bolesti. Navíc se ukázalo, že senzitivní aferentní buňky nacházející se pod vlivem působků zánětu potlačují působením indukovaných elektrických proudů svoji spontánní aktivitu, čímž může být limitována i míra přenosu informace o bolesti hned z místa jejího vzniku, viz dále.

Při uvedených indikacích se již v rámci klinické studie (HOL Luže-Košumberk) prováděné v loňském roce ukázalo, že není významného rozdílu mezi analgetickým efektem při magnetické indukci 2,5 Tesla a 1,5 Tesla. Toto tvrzení se ovšem týká jen analgetického efektu při ovlivňování bolestivých příznaků degenerativních onemocnění pohybového aparátu a je podporováno výsledky buněčného (viz zpráva za předchozí roky řešení, viz publikace i viz dále) i animálního výzkumu (viz dále). Netýká se například zvyšování elasticity ligament, kde efekt je způsobován mikrokontrakcemi svalů „vlnitým“ způsobem napínajících a uvolňujících ligamentum s relativně vysokou frekvencí (viz zpráva za rok 2018) a publikace, netýká se rovněž těch indikací, kde je třeba posilovat svaly (aplikace na posilování ochablého svalstva dna pánevního při stresových a urgentních inkontinencích), netýká se ani požadovaného vyvolávání svalových kontrakcí při centrálních i periferních parézách a plegiích, při svalových dysbalancích apod. Zde je k zajištění kvalitních a účinných svalových kontrakcí třeba, aby byla síla magnetického impulzu dostatečně vysoká a dosáhla do potřebné hloubky.

Tedy v případě potřeby aktivních svalových kontrakcí (viz výše) je vysoká hodnota magnetické indukce i hustoty indukovaného proudu nezbytná. Aplikace impulzů o proudových hustotách v řádu až stovek A/m^2 však vzbuzuje obavy o bezpečnost pacienta. Co se týče mozku, je HIMS v této oblasti vysoce terapeuticky využívána a je dost informací a poznatků z jiných zdrojů. Stranou pozornosti však zůstávalo srdce s jeho elektrickým převodním systémem. Námi provedené animální experimenty však ukázaly, že předpokládané poruchy funkce elektricky aktivních biologických struktur lidského těla působením HIMS nemusí být až tak jisté. Radikální působení HIMS na srdce sus strofa (přes neotevřený hrudník zdravých mladých prasat) překvapivě nevyvolalo žádnou fatální odezvu, pouze byla následně zjištěna změna poměrů mezi nízko a vysokofrekvenční složkou variability srdeční frekvence, což svědčí pro excitaci sympatiku (viz námi publikovaná literatura):

> *HANÁKOVÁ,L., PRŮCHA,J., SOCHA,V., ŠTENGL,M., VAN BERGH,S.: Effect of High-Induction Magnetic Stimulation on Complex Heart Rate Variability of Sus Strofa Domesticus under General Anesthesia. Appl. Sci. 2020, 10, 589; doi:10.3390/app10020589*

Ovlivňování čistě degenerativních chronických stavů artropatií, dorzopatií, zvláště při artrózách, však zřejmě nevyžaduje až tak vysoké hodnoty amplitud impulzů magnetické indukce a tím i radikálních svalových kontrakcí, které mohou být v těchto případech někdy i kontraproduktivní, byť se zase lépe uplatní pro účely podpory prokrvení, přeměny disperzních soustav gel na sol, při podpoře odtoku lymfy apod. Zvýšená mechanická aktivita svalů evokovaná HIMS je však opět na druhé straně zřejmě faktorem, způsobujícím nižší než očekávané analgetické efekty terapie. Tato skutečnost se dobře projevuje v našich studiích, kde jsme uplatnili značně vysokou magnetickou indukci (2,5 – 3 T), ale relativně nízkou frekvenci (20 Hz) a poměrně dlouhý bifázický sinusoidální impulz, čímž jsme sice docilovali velmi dobrých percepčních i motorických efektů se zapojením většiny myofibril ve svalové tkáni nacházející se i ve větších hloubkách, ale současným bolestivým vjemem této fyzikální intervence jsme zřejmě snižovali výsledné subjektivní hodnocení ústupu bolesti samotnými pacienty.

Důležitá je ovšem nejen samotná velikost parametru ohodnocujícího subjektivní ústup bolesti, ale především statistická významnost výsledků. V případě započtení všech léčených pacientů při porovnání jejich výsledků s výsledky kontrolní skupiny jsme pomocí t-testu i pomocí z-testu (vhodnějšího pro větší soubory) vypočítali hladinu významnosti p = 0,03 pro t-test (t-test poskytoval méně příznivé výsledky a proto byl zvolen jako směrodatný).

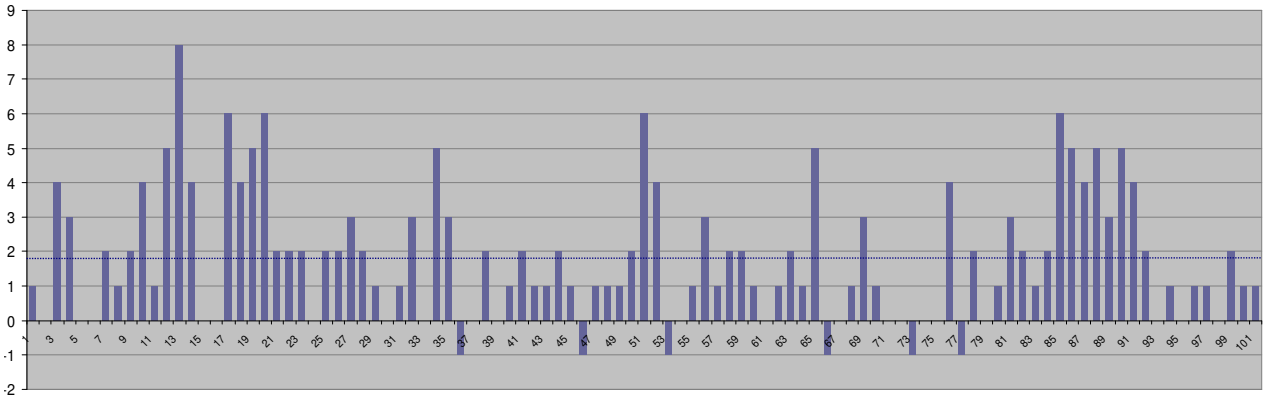
Rovněž obě dílčí multicentrické studie (HOL Luže-Košumberk a Therap Tilia Praha) poskytly signifikantní hladiny významnosti ($p = 0,04$ a $p = 0,03$). Pokud tyto studie dále rozdělíme na podskupiny muži – ženy, mladší – starší, dorzopatie – artropatie, pak se opět vesměs dopracujeme k signifikantním hladinám významnosti z intervalu 0,004 až 0,03. Hladina významnosti pro artropatie je však poněkud nižší ($p = 0,07$ HOL; $p = 0,08$ Therap Tilia). I při těchto hladinách významnosti lze však na statisticky významný ústup bolesti ještě racionálně usuzovat, i když je zde patrna nezanedbatelná pravděpodobnost vyšší analgetické účinnosti HIMS při léčbě dorzopatií. Tento názor podporuje i statisticky významný rozdíl mezi analgetickým účinkem při léčbě artropatií a dorzopatií v HOL. Signifikantnost tohoto rozdílu však nebyla v rozsahem větší studii v Therap Tilia Praha potvrzena.

Velice zajímavý je však výsledek analgetického působení HIMS na muže. Jak ve studii HOL ($p = 0,31$), tak ve studii Therap Tilia ($p = 0,23$) nebylo analgetické působení ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantní. Ovšem související výsledky (není potvrzen statisticky významný rozdíl mezi výsledky podskupiny ženy a podskupiny muži v obou zmíněných studiích; analgetický efekt pro ženy je přitom vysoce signifikantní) však statistickou nevýznamnost analgetického efektu procedur HIMS u mužů zpochybňují. Každopádně je analgetický efekt léčby u mužů nižší než u žen, což je patrné i na průměrných hodnotách v obou studiích. Zvláště ve větší studii Therap Tilia je to 1, 95 stupně VAS pro ženy a jen 1,67 stupně VAS pro muže. Přitom kontrolní skupina poskytuje procento zlepšení o průměrné hodnotě 0,92. Lze vyslovit hypotézu, že menší analgetická účinnost pro muže souvisí s jejich poněkud jiným vnímáním bolesti, kritičtějšími postoji k hodnocení i s jejich zvýšenou vnímavostí ke konjugovaným bolestivým vjemům percepce, vyvolávaným samotnou procedurou.

Co se týče rozdílnosti analgetického efektu mezi mladšími a staršími pacienty, zdá se, že lepších výsledků lze dosahovat u starších pacientů (průměrný ústup bolesti 1,90 stupě VAS, zatímco u mladších jen 1,77 stupně VAS). Tento rozdíl se však neukázal jako signifikantní. Zřetelně vyšší statistická významnost výsledku u starších pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou nám však dává důvod předpokládat, že analgetický efekt léčby bude u starších pacientů přece jen mírně vyšší. Tento výsledek může souviset s jasnou degenerativní etiopatogenezou u těchto starších pacientů, kde se lépe uplatní mechanismy působení HIMS, zatímco u mladších pacientů může být etiologie jejich potíží složitější.

V dalším textu budou podrobněji přiblíženy výsledky klinické studie ve zdravotnickém zařízení Therap Tilia Praha. Celkový přehled dosažených ústupů bolesti ve stupních škály

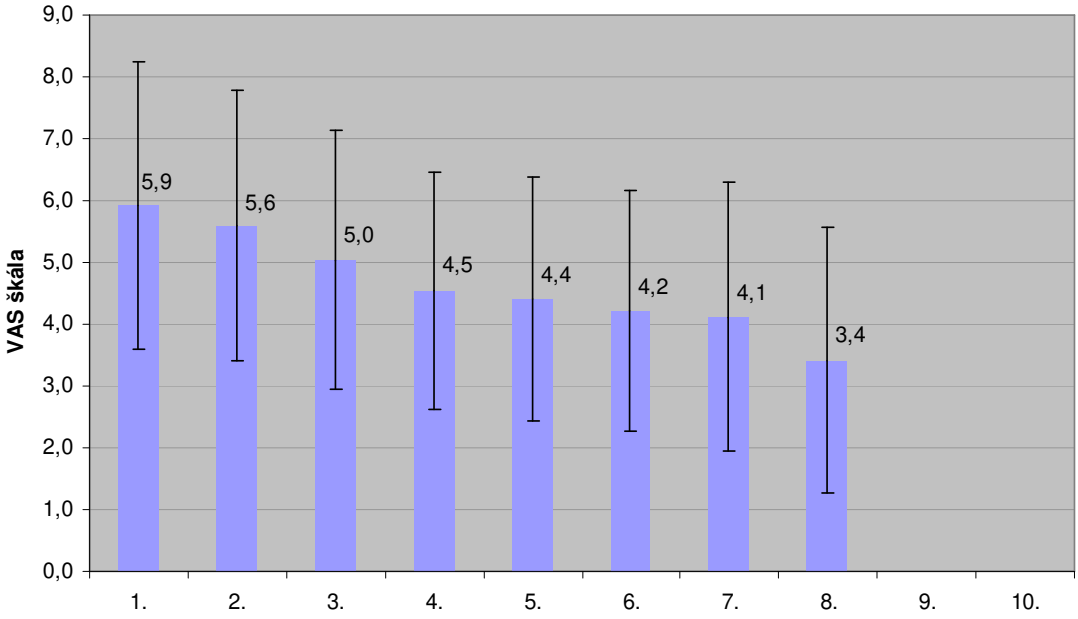
VAS při srovnání výchozí bolestivosti a stavu ihned po ukončení série procedur podává diagram na obrázku 47, průměrná hodnota je vyznačena vodorovnou čárkovanou linií.



Obr. 47: *Celkový přehled dosažených ústupů bolesti ve stupních škály VAS při srovnání výchozí bolestivosti a stavu ihned po ukončení série procedur*

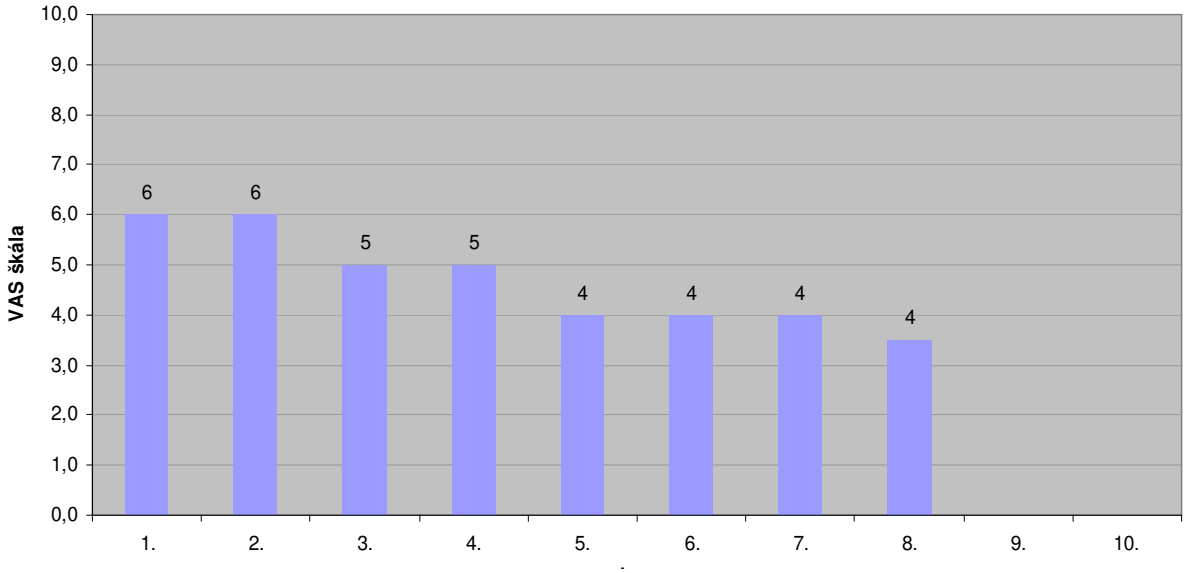
Je patrné, že výsledky dosažené pro jednotlivé pacienty jsou spojeny s dosti vysokým rozptylem a v nezanedbatelném počtu jsou zastoupeny i vynikající výsledky dosahující tří až osmi stupňů škály VAS. Rozdělení zjevně jen velmi málo odpovídá Gaussovu, proto pracujeme i s mediánem, který ovšem poskytuje nevysokou hodnotu 1,5.

Velmi důležitý je zjištěný časový průběh nástupu léčebného efektu. Pro střední hodnoty pacientem deklarovaného stupně bolestivosti podle VAS je vykreslen pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS na obr. 48. Je patrné, že k ústupu bolesti dochází postupně, víceméně lineárně, a je pravděpodobné, že by ústup bolesti mohl s podáváním ještě dalších procedur pokračovat.



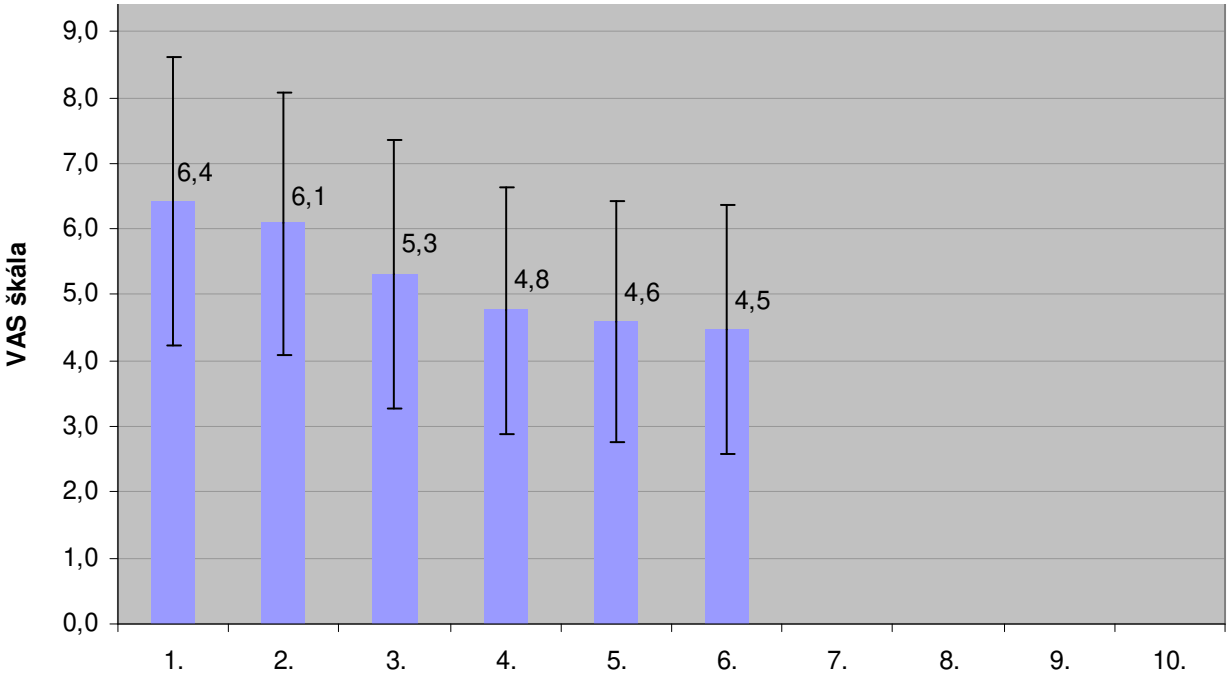
Obr. 48*: Střední hodnoty pacientem deklarovaného stupně bolestivosti podle VAS pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS*

Podobně se vyvíjí i medián (obr. 49):



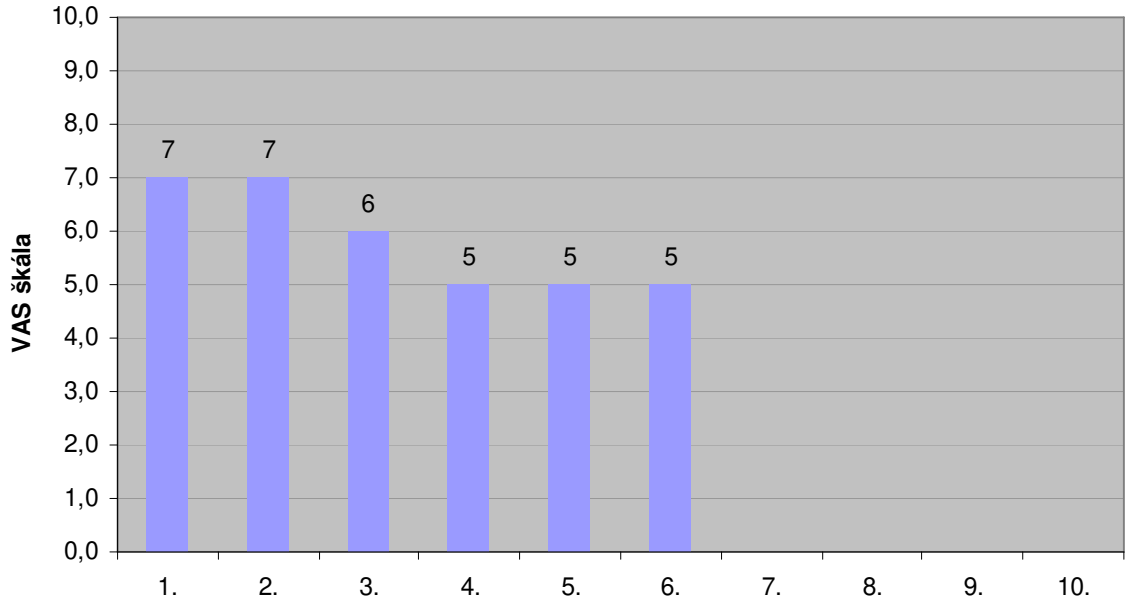
***Obr. 49**: Vývoj mediánu pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS*

Zvlášť vypočítané výsledky pro dorzopatie tuto hypotézu podporují, viz obr. č. 50:



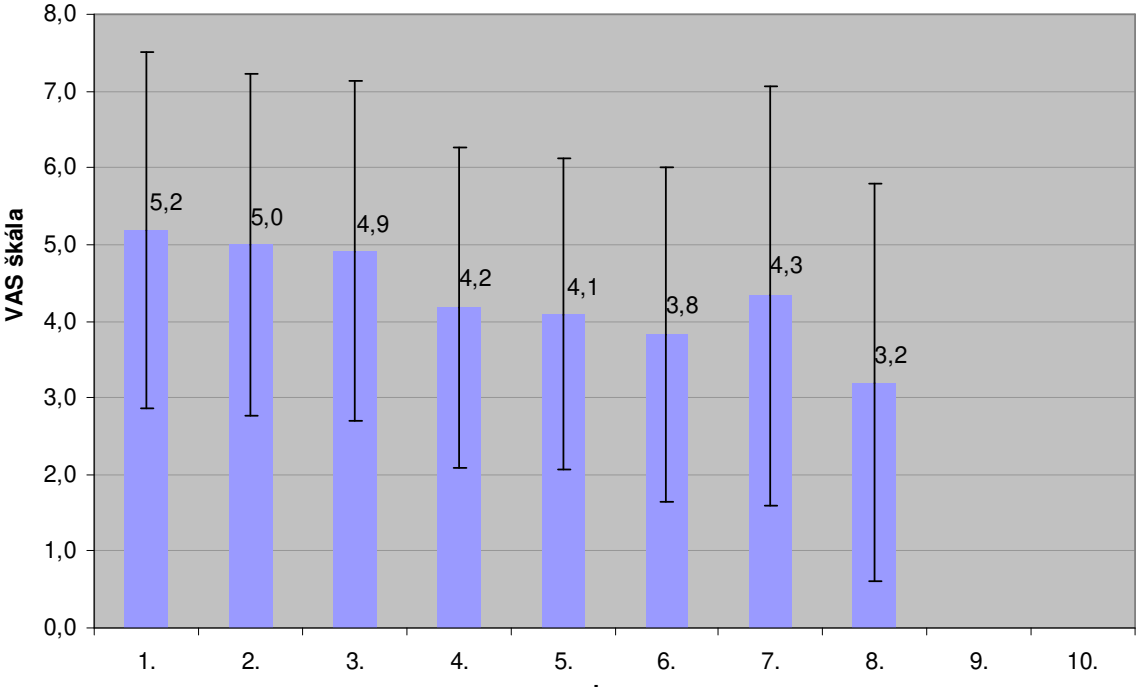
***Obr. 50:** Střední hodnoty pacientem deklarovaného stupně bolestivosti podle VAS pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS při dorzopatiích*

Vývoj mediánu pro pacienty s dorzopatiemi však není již tak přesvědčivý (obr. 51).



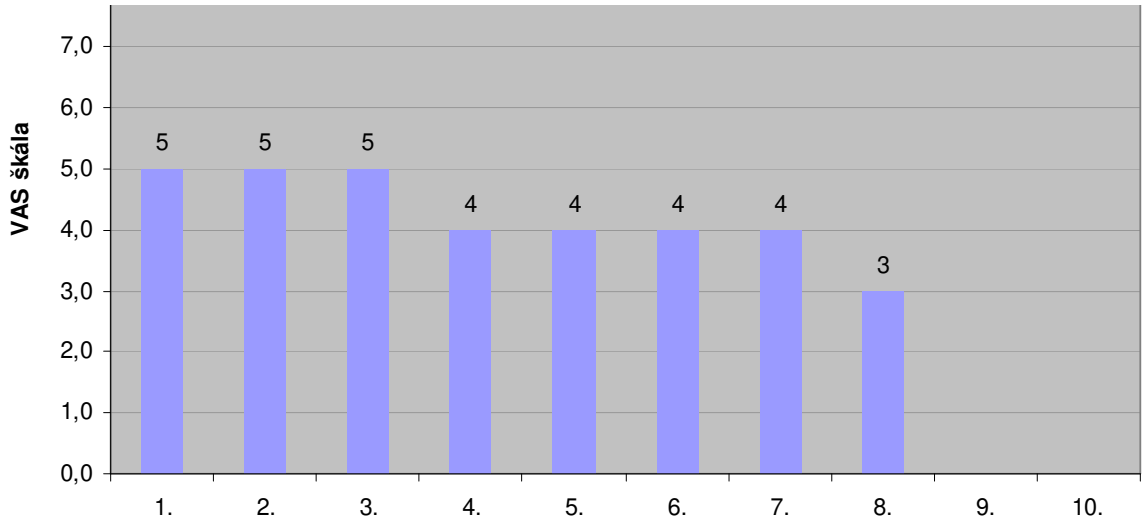
Obr. 51: *Vývoj mediánu pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS při dorzopatiích*

Grafy vystihující vývoj ústupu bolesti při léčbě artropatií vyznívají podobně, ale ve shodě s dosaženou nižší mírou analgetického efektu léčebný efekt nastupuje pomaleji a bolest neklesá tak zřetelně lineárně, rovněž rozptyl je vyšší (obr. 14).



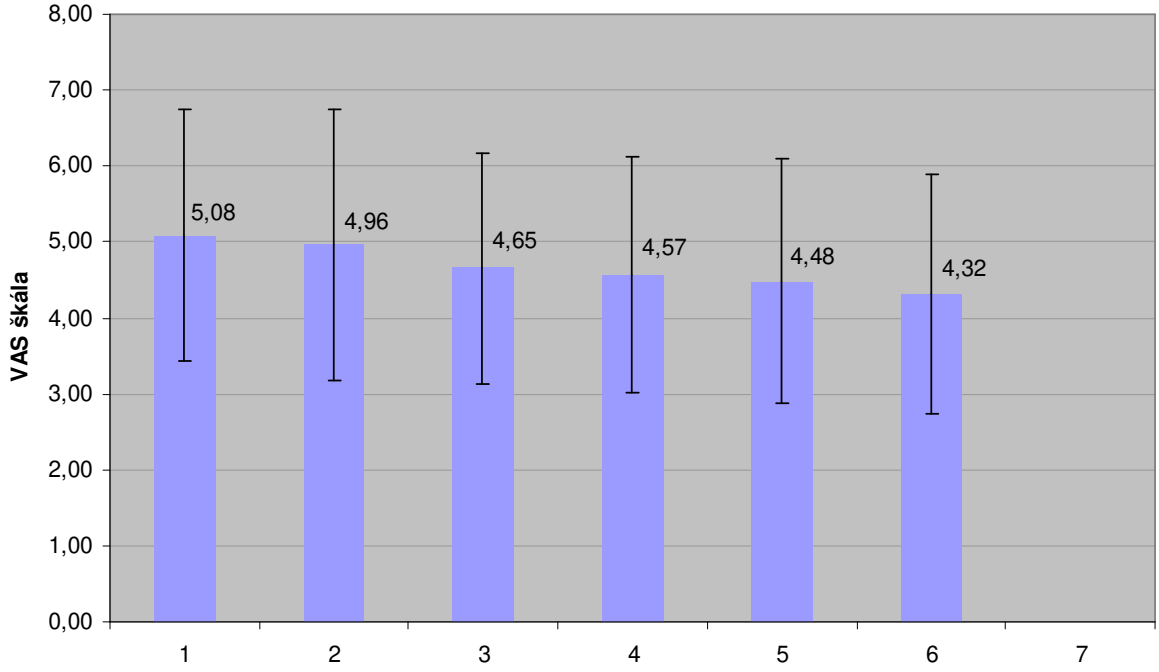
Obr. 52: *Střední hodnoty pacientem deklarovaného stupně bolestivosti podle VAS pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS při artropatiích*

Vývoj mediánu pro pacienty s artropatiemi rovněž poskytuje typický obraz postupného poklesu bolestivosti , ovšem pokles mediánu o dva stupně již vyžadoval 8 procedur, zatímco u dorzopatií k dosažení tohoto výsledku stačilo procedur 6 (obr. 53).

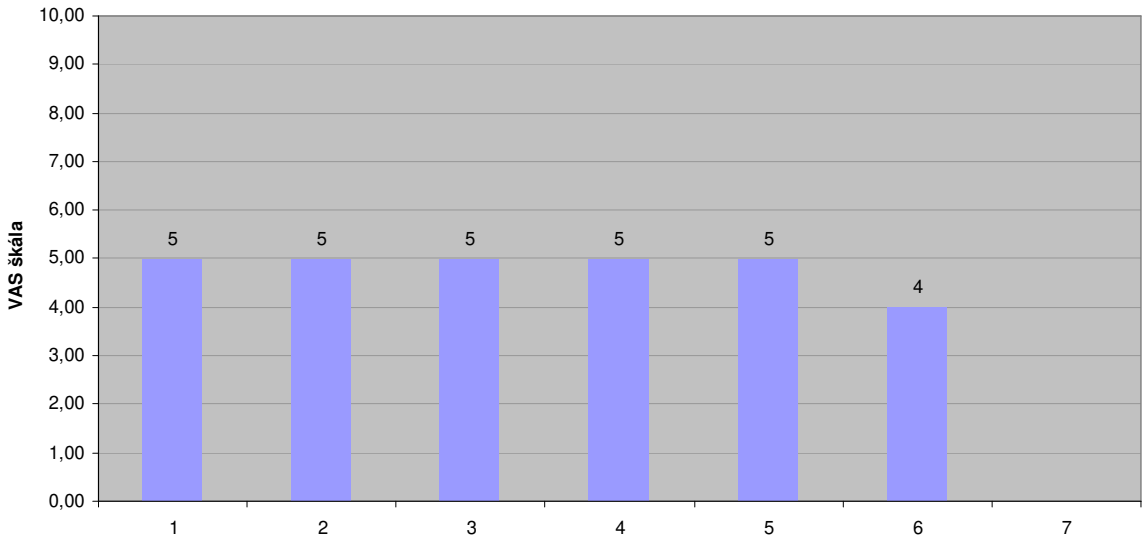


***Obr. 53**: Vývoj mediánu pro sérii osmi postupně podávaných procedur HIMS při artropatiích*

Pro dokreslení obrazu léčebného efektu v sérii podávaných procedur HIMS uvedeme ještě vývoj středních hodnot bolesti i vývoj mediánu bolesti podle stupnice VAS pro kontrolní skupinu, obrázky 54 a 55.



***Obr. 54**: Střední hodnoty pacientem deklarovaného stupně bolestivosti podle VAS pro sérii šesti postupně podávaných placebo procedur HIMS (artropatuie a dorsopatie)*



***Obr. 55**: Vývoj mediánu pro sérii šesti postupně podávaných placebo procedur HIMS při artropatiích a dorzopatiích (kontrolní skupina)*

Je zřejmé, že placebo efektem je způsoben pokles bolesti i v případě „sham“ aplikací vysoko-indukční magnetické stimulace. V případě středních hodnot je však ústup bolesti pouze mírný, i když rovněž postupný a lineární. Dosahuje zhruba poloviny efektu reálného působení HIMS, přičemž rozdíl mezi reálným efektem HIMS a efektem placeba je vysoce signifikantní. Medián se v zásadě nemění, až při poslední, šesté proceduře bylo zaznamenáno snížení, opět zhruba poloviční než při reálném působení HIMS.

3.4.1 Výsledky studia vlivu vysokoindukční magnetické stimulace na bolest při léčbě pacientů s degenerativními onemocněními pohybového aparátu s ohledem na aplikovanou magnetickou indukci

Tato studie se uskutečnila v Hamzově odborné léčebně v Luži - Košumberku. Certifikovaným přístrojem pro vysokoindukční magnetickou stimulaci typ *Saluter Moti* byly aplikovány procedury, a to jednak s vyšší hodnotou magnetické indukce (2 až 2,5 T) a tím i vyšší hodnotou amplitud indukovaných elektrických proudů, jednak s hodnotami magnetické indukce nižšími o hodnotách 1 až 1,5 T. Soubor zahrnoval 32 pacientů, dva z nich léčbu přerušili, jeden pro poruchy přístroje, po níž již odmítal spolupracovat (artróza kolene), druhý pro pocity dyskomfortu psychické povahy (strach) při podávání percepčně působící procedury na CTh oblast páteře (jediná aplikace). Tito pacienti nebyli dále hodnoceni.

Ostatní pacienti vyjadřovali spokojenost a často udávali zlepšení hybnosti v léčeném místě pohybového aparátu. Nežádoucí příhody nebyly zaznamenány. Bylo podáváno 15 procedur v sérii, aplikace každý den po dobu 10 minut.

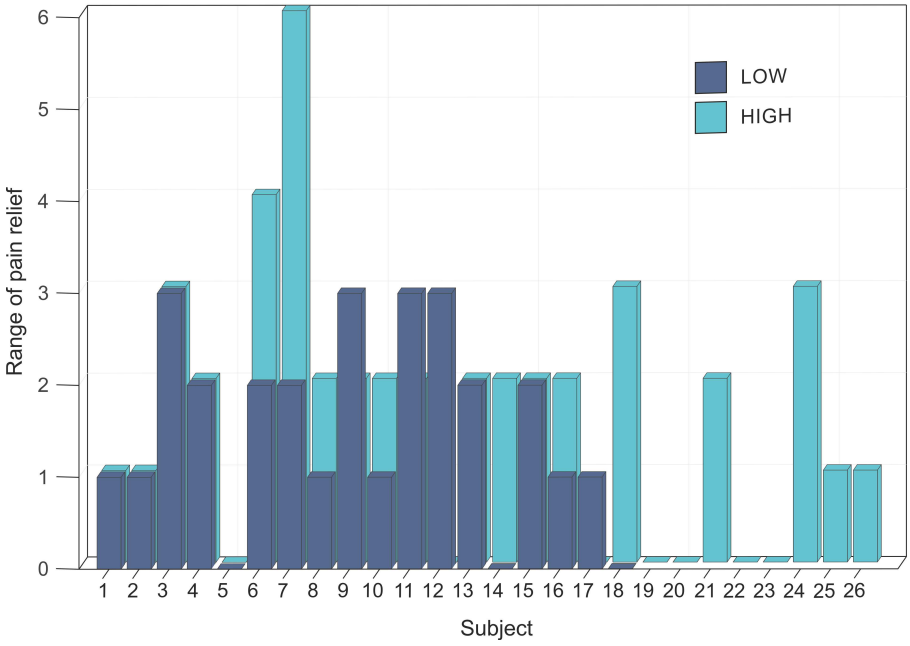
V 16 dokončených případech byly léčeny velké nosné klouby dolních končetin (14 pacientů kolenní, 2 pacienti kyčelní). Ve 13 dokončených případech byla léčena bederní páteř. Jeden pacient byl léčen pro degenerativní onemocnění ramenního kloubu, kde bylo dosaženo velmi dobrého výsledku (ústup bolesti z hodnoty 6 visual analogue scale, VAS, - na hodnotu 4 VAS spolu s objektivním zlepšením hybnosti v ramenním kloubu). Celkově vyhodnocovaných sérií procedur bylo 45. Mnozí pacienti byli léčeni zároveň na obou kolenních kloubech. Pak bylo vždy aplikováno na jedné straně 2 až 2,5 T, na druhé straně 1 až 1,5 T. Zdůrazněme, že v naší studii nebyly hodnoceny jednotlivé procedury, jak je tomu např. v (6), ale celé ukončené série procedur. Tabulka 1 udává základní deskriptivní statistické údaje:

		Intensity	
		HIGH	LOW
celkem	aritm. průměr	1,65	1,56
	SD (směrodatná odchylka)	1,44	1,04
	median	2	1,5
	st.významnost	N.S.	
koleno, kyčel	aritm. průměr	1,33	1,38
	SD (směrodatná odchylka)	1,29	0,87
	median	1	1
	st.významnost	N.S.	
páteř	aritm. průměr	2,33	2,5
	SD (směrodatná odchylka)	1,58	1,01
	median	2	3
	st.významnost	N.S.	
placebo	aritm. průměr	1	1
	SD (směrodatná odchylka)	0	0
	median	1	1
	st.význ. placebo - celkem	p = 0,003	

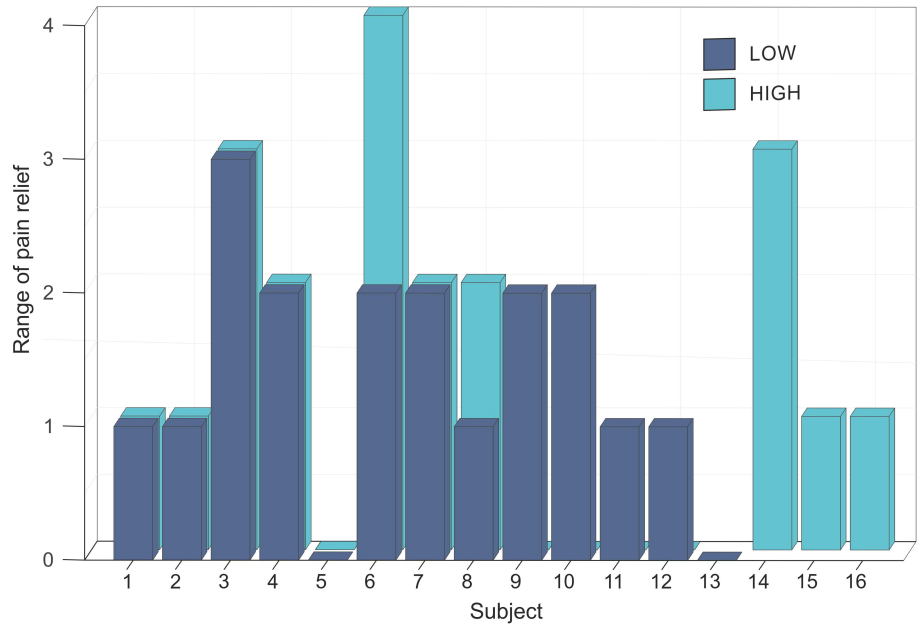
Tabulka 6: *Výsledky deskriptivní statistiky souboru 45 sérií procedur vysokoindukční magnetické stimulace u 29 pacientů. Procedury byly 10 minutové, podávané denně, celkem 15 procedur v sérii. Bolestivost hodnotil pacient před a po ukončení léčby pomocí standardní desetistupňové vizuální stupnice bolesti (VAS). Na hladině významnosti p=0,003 byla potvrzena účinnost léčby ve srovnání s placebem vyjádřeným ústupem bolesti o jeden stupeň VAS. Ústup bolesti hodnocený jedním škálovým bodem byl tedy považován za pouhé placebo. Mezi účinkem vyšších hodnot magnetické indukce (HIGH, 2 – 2,5 T) a nižších hodnot magnetické indukce (LOW, 1 – 1,5 T) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl.*

Je patrné, že účinek vysokoindukční magnetické stimulace podávané přístrojem *„Saluter Moti“* je vzhledem k palcebu (pro placebo byl zvolen ústup bolesti o jeden stupeň škály bolesti VAS) vysoce signifikantní (hladina významnosti p = 0,003). Bolest v průměru ustupovala o 1,6 stupně škály.

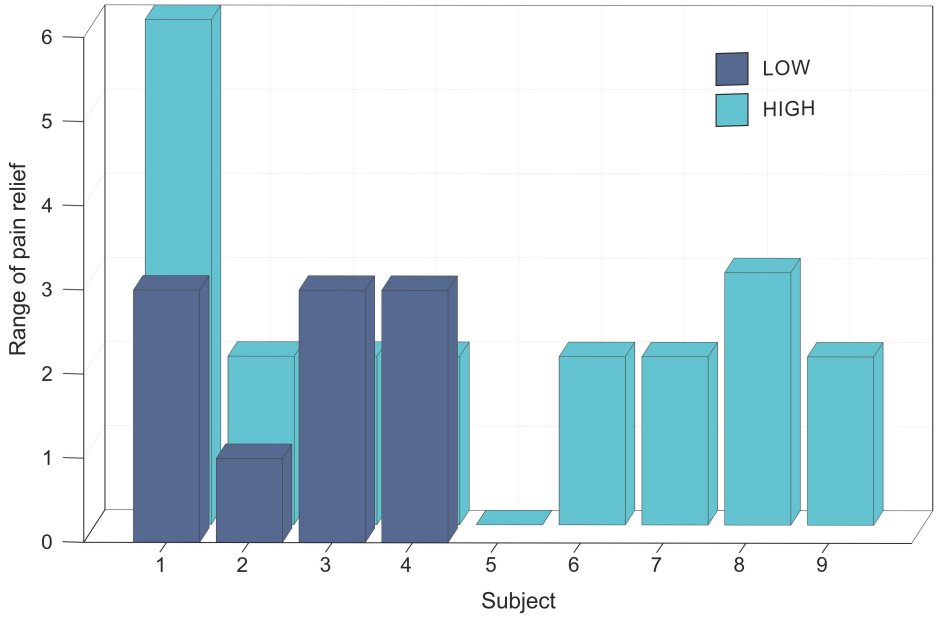
Mezi aplikací 2 T až 2,5 T a 1 T až 1,5 T nebyl v těchto indikacích zjištěn statisticky významný rozdíl, ačkoliv v grafické interpretaci výsledků 3D histogramy se zdá být lepší výsledek při vyšší magnetické indukci 2,5 T a tím i vyšších hodnotách proudových hustot indukovaných elektrických proudů. Signifikantně lepší účinek procedury se projevoval v aplikacích zaměřených na páteř (v lumbální oblasti). Výsledky detailně ilustrují sloupcové diagramy na obrázku 56.



Celkově



Art. genus



Vertebra col.

Obr. 56: *Sloupcové diagramy ústupu bolesti podle VAS. Světlemodré sloupce vyjadřují ústup bolesti při aplikaci vyšších hodnot magnetické indukce (HIGH, 2 – 2,5 T), tmavomodré sloupce vyjadřují ústup bolesti při aplikaci nižších hodnot magnetické indukce (LOW, 1 – 1,5 T). Každý sloupec přísluší jedné podané sérii procedur a zhodnocuje ústup bolesti po podání této série. Zvláště je vynesen diagram pro všechny podané série procedur, pro pacienty léčené s kolenní artrózou a pro pacienty léčené s vertebrogeními potížemi v bederní oblasti. U žádného z pacientů nedošlo ke zhoršení.*

Ve srovnání s prací (20), která s cílem uplatnit důsledky vrátkové i kódové teorie tlumení bolesti aplikovala vysokoindukční magnetickou stimulaci s vyššími frekvencemi 60 – 150 Hz, byla v naší studii aplikována frekvence 20 Hz, umožňující výrazné svalové kontrakce až do úrovně lehce vlnité svalové kontrakce, především s cílem příznivého ovlivnění měkkých tkání kolem léčených kloubů, zvýšení jejich elasticity, snížení svalového hypertonu, eliminace otoku (vliv na mikrosvalovou pumpu), případně efektů na buněčné úrovni popisovaných v předchozích částech této práce. Při použití této frekvence lze ještě uvažovat o vlivu na stimulaci produkce endorfinů a tím též na ústup bolesti. V souvislosti s motorickými i senzorickými efekty vysokoindukční magnetické stimulace nelze vyloučit ani vliv na fungování autonomního nervového systému, zejména ovlivněním sympatiku na spinální etáži, čemuž by odpovídaly i výsledky práce (19). Důležitý se zdá být tzv. disperzní efekt (přeměna želatinózní hmoty na kapalnější fázi a rozptýlení pohyblivých složek, zejména v intersticiu), popisovaný například v práci (12), který souvisí s motorickými efekty podávání vysokoindukční magnetické stimulace a jeho maximum lze předpokládat spíše při nižších frekvencích (10 až 20 Hz). Nižší frekvence při vysokoindukční magnetické stimulaci v indikacích bolestivých degenerativních onemocnění rovněž používali Poděbradský a Poděbradská (12), kteří pracovali s přístrojem typu *Salus Talent* a při ústupu algických

stavů muskuloskeletárního aparátu dosahovali příznivých výsledků (pokles bolestivosti po sérii procedur o 2,7 stupně škály VAS). Práce (10), která využívala přístroj pro vysoko-indukční magnetickou stimulaci typu *BTL-6000 Super Inductive System*, používá sice poněkud jinou metodiku analýzy dat, ale průměrný ústup bolesti podle VAS dosahuje stupně 1,5 škály VAS, v naší studii bylo dosaženo srovnatelné hodnoty 1,6. Šťastný a Prouza (20) ve své studii, provedené rovněž s přístrojem typu *6000 Super Inductive System*, aplikovali však na rozdíl od práce (6) převážně nízké frekvence (do 10 Hz), s nimiž dosáhli snížení bolesti z původní průměrné hodnoty 4,9 před první procedurou na 3,1 po poslední proceduře, tedy o 1,8 stupně VAS.

Výsledky naší i ostatních studií svědčí o analgetickém efektu vysokoindukční magnetické stimulace, dosahovaném jak s vyššími, tak i poněkud nižšími hodnotami magnetické indukce, jakož i s využitím vyšších i nižších frekvencí. V našich studidích bylo dosaženo 1,6 stupně VAS škály ústupu bolesti. Ve srovnání s tím je poněkud zarážející, že seriózní výzkum ústupu bolesti při postiženích muskuloskeletárního aparátu provedený na souboru 340 pacientů a předložený v pracích (11, 14) poukázal na průměrných 5 až 6 stupňů VAS škály ústupu bolesti. Vysvětlení tohoto markantního rozdílu je však poměrně snadné a spočívá v rozdílné metodice sběru dat při použití VAS. V práci (11) všichni pacienti označili svoji iniciální bolest (úroveň bolesti před podáváním procedur) stupněm 10, zatímco v práci (10), jakož i v této naší recentní studii, byla iniciální bolest ohodnocena pacientem subjektivně příslušným stupněm v rámci celé VAS (obvyklý postup). Pokud data z této předložené předběžné studie přepočítáme podle metodiky práce (11), pak průměrný ústup bolesti činí 3,3 stupně VAS (směrodatná odchylka 2,8). Při použití vyšších hodnot magnetické indukce činí takto přepočtený ústup bolesti 2,6 stupně, při použití nižších hodnot magnetické indukce dokonce 4,2 stupně. I po těchto přepočtech, které přibližují výsledky dosažené v ústupu bolesti při aplikaci distanční elektroléčby i vysoko-indukční magnetické stimulace vyznívá však analgetický účinek distanční (bezkontaktní) elektroléčby poněkud lépe.

Získané výsledky zároveň podporují hypotézu předpokládající, že v případech léčby degenerativních onemocnění pohybového aparátu, které jsou spojeny s potřebou svalové stimulace a svalových kontrakcí (jako je tomu například při fyzikální intervenci ligament a šlach – viz dále), požadavkem snížení svalového hypertonu nebo naopak požadavkem posílení ochablých svalů, účinné podpory perfuze, lokálního metabolismu a trofiky, případně regenerativních a reparativních procesů apod., je vysokoindukční magnetická stimulace účinnou metodou, v některých ohledech působící výrazněji než distanční elektroterapie. Rozdíl v léčebném účinku v indikacích souvisejících s degenerativními onemocněními pohybového aparátu u obou těchto metod není však zcela zásadní a ukazuje se, že zde není

nutno dosahovat extrémně vysokých hodnot proudových hustot indukovaných elektrických proudů, tedy používat v těchto indikacích nejvyšších hodnot magnetické indukce. Vysoké hodnoty magnetické indukce a tím i mimořádně vysoké hodnoty amplitud indukovaných elektrických proudů jsou naopak žádoucí a z hlediska maximální účinnosti nezbytné v případech, kdy se fyzikální intervencí snažíme docílit účinné myorelaxace, uvolnění hypertonických nebo spastických svalů, případně změn elastických vlastností šlach a vazů a viskoelastických účinků vůbec. Vysoké hodnoty magnetické indukce jsou rovněž nutné zvláště pro účinnou léčbu ochablosti svalstva pánevního dna i ochablosti jakýchkoliv jiných svalů, pro efektivní fyzikální intervenci při polyneuropatiích, při poruchách periferního prokrvení a při podpůrné léčbě následků iktů a úrazů míchy a mozku (hovoříme zde o periferních aplikacích).

4 Hlavní cíle terapie u dané diagnózy

Hlavními cíli uplatnění bezkontaktně indukovaných elektrických proudů vytvářených prostřednictvím vysokoindukční magnetické stimulace při léčebném ovlivňování příznaků osteoartritidy jsou:

- **potlačování bolesti,**
- **umožnění vyšší mobility postiženého jedince a**
- **snižování míry poškozování kloubní chrupavky (histopatologicko-morfologického nálezu) prostřednictvím zlepšené perfuze, tixotropních vlastností ovlivňovaných tkání a dokonce i přímým vlivem na mediátory zánětu.**

4.1 Podmínky a požadavky na spektrální vlastnosti vysokoindukční magnetické stimulace z hlediska bolesti

Aby však byla terapie účinná a přitom bezpečná a příjemná, aby působila nejen zlepšenou perfuzi a oxygenaci léčených tkání, nejen aktivní percepci a aktivní svalové kontrakce s jejich léčebným přínosem, ale také působila analgeticky a nikoliv bolestivě, je mimo jiné nutno splnit podmínku minimálního nebo žádného dráždění somatosenzitivních nervových vláken typu III (též označ. A-delta) a především typu IV (též označovány C), které vedou bolest.

Podle Howsonovy křivky by měla být doba rektangulárního proudového impulzu kratší než 0,5 ms, aby nebyla drážděna senzitivní vlákna bolesti typu IV, ba dokonce by se měla blížit až k ideální hranici pod 10 mikrosekund, kdy by nebyla dážděna ani senzitivní vlákna typu III. Tato druhá podmínka je technicky těžko splnitelná, navíc by její splnění zároveň omezilo možnost požadované percepce a svalové kontrakce, takže určitý pocit parestézií, respektive termestézií, někdy pacientem či probandem interpretovaných jako bolest, nelze při aplikaci HIMS bohužel zcela vyloučit. Ovšem splnění první podmínky (doba impulzu co nejvíce pod interval 0,5 ms) je nutno bezpodmínečně akceptovat.

Při našich studiích jsme aplikovali impulzy z certifikovaného přístroje firmy Embitron typu Saluter Moti o době trvání 400 mikrosec. (zkráceny oproti tržní verzi přístroje – přesto však dosti dlouhé), časový průběh impulzu indukujícího magnetického pole: bifázický sinusoidální pulz. Vývojově jsme ovšem navrhli a v buněčných i animálních studiích úspěšně vyzkoušeli unipolární půlsinusoidální pulz o době trvání 180 – 200 mikrosekund, kterým zcela vylučujeme dráždění C-nervů a omezujeme dráždění A-delta nervů.

Podle požadavků vyplývajících z **Lulliesova diagramu** je nutné, aby se frekvence harmonického (sinusového) stimulačního proudu pohybovala v intervalu 10^1 až 10^3 Hz s optimem 10^2 = 100 Hz. Pro dosažení analgetických efektů fyzikální intervence prostřednictvím HIMS s využitím endorfinové, vrátkové i kódové teorie je zároveň optimální interval alespoň od 10 Hz až do 150 Hz. Endorfinově účinnější frekvence pod 10 Hz mohou již působit bolest ve zvýšené míře, i když tyto frekvence manuály některých přístrojů pro HIMS doporučují. Frekvence pod 10 Hz mají tudíž smysluplný efekt pro podporu produkce endorfinů, ale jejich pocitové vnímání u HIMS je problematické. Přínos aplikace těchto frekvencí se spatřuje také v podpoře mikrosvalové pumpy, i když s tímto aspektem lze polemizovat, poněvadž klíčované vyšší frekvence (paket – pausa) mají rovněž vynikající svalově-motorický účinek, i když je pravda, že v době paketu aplikovaná vyšší frekvence již nedokáže vytvořit střídající se uvolňování a napínání svalových vláken (vlnitý tetanus) se specifickými efekty, ale jen „hladkou“ svalovou kontrakci. Podstatné tudíž je, co od fyzikální intervence v daném konkrétním případě očekáváme a co požadujeme. Mikromechanické efekty vyvolávané HIMS jsou zřejmě i důvodem disperzních účinků HIMS. Poněkud „rozmazaná“ hranice mezi vlnitým a hladkým stahem svalu se individuálně pohybuje mezi 20 až 25 Hz, což bylo našimi pokusy ověřeno. Proto také při většině našich studií jsme aplikovali 20 Hz. Podle dostupných studií se však významný rozdíl mezi analgetickým účinkem extrémně nízkých a vyšších frekvencí neshledává (viz dále).

V našich experimentech jsme kromě frekvence 20 Hz, používali i frekvence 72 Hz (tuto frekvenci jsme volili ve shodě s doporučeními a zkušenostmi z Bassettových indukčně vázaných proudů typu Single Pulze). V úspěšně vyvinutém zcela novém přístroji pro HIMS je možno ve spojení s aktivním chlazením aplikátoru dosahovat až 150 Hz. Tyto vyšší frekvence nevyvolávají tak velký integrál mechanické zátěže léčené tkáně. Budou tedy spíše vhodnější pro akutní bolestivé stavy, např. často citovaných 143 Hz, což je ve shodě s myorelaxační frekvencí Trabertových proudů, kterým je použití HIMS svým způsobem blízké svými percepčními a prahově motorickými účinky

Dále, **z Wyssova diagramu plyne**, že lineární nárůst excitačního proudu by se měl nacházet v intervalu 10^{-1} až 10^{+1} ms s optimem 10^{0} = 1 ms. Tato experimentálně zjištěná zákonitost dráždění somatosenzitivnívh aferentních nervů je další z podmínek zajišťujících dostatečný odstup dráždění neuronů typů Ib a II od nežádoucího dráždění neuronů typu III a IV. S určitou mírou přibližnosti lze vyhovět této podmínce - při současném akceptování dalších požadavků vycházejících z Lulliesova a Howsonova diagramu – zavedením náběžného úseku unipolárního půlsinusového impulzu s dobou trvání cca 100 mikrosekund = 10^{-1} ms, přičemž další zkracování této doby by bylo již kontraproduktivní, nehledě na to, že by bylo i obtížně technicky dosažitelné.

5 Faktory ovlivňující efekt terapie

Dosavadní výzkumy, jejichž výsledky jsou uváděny v této metodice, co se týče pacientů neprokazují žádné speciální faktory, které by přímo a signifikantně ovlivňovaly efekt terapie. Výsledky multicentrické klinické studie však naznačují, že by lepších analgetických efektů mohlo být dosahováno u starších pacientů a u žen.

Při podávání procedur aplikace indukovaných elektrických proudů je třeba velmi pečlivě klinicky zvažovat volbu apercepční nebo percepční, resp. nadprahově-motorické stimulace, tzn. aplikace proudových hustot v řádech jednotek, desítek nebo až stovek A/m^2. V našich studiích, na jejichž výsledcích je založena tato metodika, se neukázalo, že by vysoce percepční nebo nadprahově-motorická stimulace měla zásadně vyšší vliv na snižování míry poškozování kloubní chrupavky (tedy na histopatologicko-morfologický nález) a že by prokazovala lepší léčebný vliv na mediátory zánětu. Naopak v těchto aspektech byly jednoznačně úspěšnější indukované elektrické proudy nižších proudových hustot (v řádu jednotek A/m^2), ovšem s harmonickým časovým průběhem a amplitudovou modulací. Efekt

tohoto typu fyzikálních intervencí na reparativní mechanismy se potvrdil též v buněčných studiích. Ovšem s příznivý indukovaných elektrických na histopatologicko-morfologický nález a na mediátory zánětu jsme se setkávali i při aplikaci řádově vyšších hodnot proudových hustot, spíše při relativně vyšších frekvencích (72 Hz), ovšem tento efekt nerostl s hodnotou proudové hustoty, spíše naopak.

Z této zkušenosti vyplývá, že vyšší hodnoty proudových hustot indukovaných elektrických proudů je vhodné indikovat jen tam, kde percepční a zejména nadprahově-motorický účinek má konkrétní přínos. V úvahu připadá především ochablost svalů, svalové dysbalance, parézy a plegie, ale také stavy, kde přerušovaně ndukovaná „vlnitá“ svalová kontraktibilita povede ke zlepšení lokální periferní perfuze, zlepšení lymfatické drenáže (svalová pumpa), návratu tixotropních vlastností tkání k nornálu (ovlivnění viskoelastických vlastností) apod.

Samotné zvyšování intenzity indukovaných elektrických proudů může vést – zvláště ve spojení s nevhodně voleným frekvenčním spektrem – k bolestivým vjemům, které pak interferují a potenciálně snižují analgetický účinek vysokoindukční magnetické stimulace a odrazují pacienta od terapie.

6 Kontraindikace, rizika a potenciální vedlejší účinky metody

Vysokoindukční magnetická stimulace (s indukcí proudových hustot alespoň 1 A/m^2) je v zásadě účinná forma elektroléčby uskutečňované bez nutnosti galvanického kontaktu s tělem pacienta na základě účinku elektrických proudů indukovaných v léčených tkáních prostřednictvím časově proměnného nízkofrekvenčního magnetického pole. Jako každá opravdu účinná terapie má přirozeně své kontraindikace, rizika a možné vedlejší účinky. Poznatky o nich se přitom vyvíjejí; mohou se např. objevovat např. nové kontraindikace, nebo se naopak mohou některé současné kontraindikace ukázat jako bezpředmětné. Přirozenou povinností uživatele přístroje a odpovědné organizace je tudíž sledovat vývoj těchto poznatků po celou dobu životnosti a používání přístroje.

Kontraindikace, rizika a vedlejší účinky

- Kardiostimulátory, inzulínové a jiné elektronicky řízené lékové pumpy, implantované neurostimulátory, elektronické sluchové náhrady, mikročipy pro stimulaci n. vagus nebo intrakraniálně uložené v CNS, jakékoliv biotické elektronicky řízené implantáty nebo náhrady implantované v těle pacienta v místě účinného dosahu působení pole. Absolutně.
- Kovové kostní, kloubní a jiné implantáty v místech aplikace magnetické stimulace.
- Stenty v oblasti stimulace (u kovových absolutní kontraindikace, u nekovových hledisko předběžné opatrnosti).
- Gravidita (absolutně).
- Aplikace na oblast hlavy (relativní KI, absolutní KI při stavech po iktu nebo po operacích či závažných traumatických poškozeních mozku) .
- Aplikace na sinus caroticus.
- Aplikace na oblast srdce u pacientů s jakýmkoliv onemocněním srdce (i suspektně) absolutně, v ostatních případech zdravého srdce relativní KI..
- Tělíska intrauterinní (pro antikoncepci) obsahující kov, např. měděný, stříbrný, zlatý či zinkový drátek.

- Dětští pacienti (relativně, vzhled k riziku působení nízkofrekvenčního elektromagnetického pole na vyvíjející se organismus, vždy nutno lékařsky posoudit poměr míry rizika a přínosu terapie).
- Myastenia gravis (předběžná opatrnost).
- Osoby v těžkém nebo život ohrožujícím stavu (obecná kontraindikace), osoby s insuficiencí kardiorespirační, zvláště s poruchami rytmu (aplikace na trup či hlavu).
- Osoby se sklonem k záchvatovitým onemocněním (hypotonici, epileptici).
- Menstruace (lokální a dočasná aplikace)
- Obecně je třeba lékařsky zvážit veškeré aplikace magnetické vysokoindukční stimulace na oblast hlavy či velkých ganglií autonomního nervstva, zvláště ganglium stellatum, karotického sinu a na oblast srdce – zvláště pokud jsou v anamnéze arytmie, ischémie apod., dále na oblasti endokrinních žláz zvl. gonád.
- Uvedené kontraindikace platí pro veškerý obslužný personál, který by se nacházel v účinné vzdálenosti od aplikátoru.

Rizika

- Hlavním citovaným rizikem jakýchkoliv aplikací elektromagnetických polí je riziko podpory vzniku onkologických onemocnění. Vysokoindukční magnetická stimulace produkuje však pouze nízkofrekvenční signál, který je považován za méně rizikový bež-li signál vysokofrekvenční (např. mobily, bezdrátový přenos v počítačových sítích).
- Při rozumném zvážení uvedených kontraindikací jsou další možná zbytková rizika procedur vysokoindukční magnetické stimulace podle současných dostupných poznatků o jejich účincích zcela minimální. Lze pouze poukázat na hypoteticky vyslovené:
- Podráždění pokožky přiložením aplikátoru, zvláště pokud se při proceduře zvýší povrchová teplota aplikátoru ve styku s pokožkou – doporučuje se nepřikládat aplikátor těsně, ale ponechat malou mezeru mezi příložným povrchem aplikátoru a tělem (cca 1-3 mm).

- Únava svalů při jejich razantní stimulaci (opakované intenzivní kontrakce) spojená se zvýšenou bolestivostí namáhaných svalů.
- Zvýšení metabolické aktivity léčené tkáně se všemi možnými důsledky (dříve bylo uváděno teoreticky možné lokální hypoxické poškození v případě nedostatečnosti tepenného zásobování dané léčené lokality a při extrémním zvýšení její metabolické aktivity působením magnetoterapie – tento stav však v reálu nebyl nikdy pozorován).
- Riziko poklesu krevního tlaku během procedury a krátce po ní a z toho plynoucí riziko přechodné závratě a následného poranění pacienta případným pádem. Proto pozor:
- Při proceduře je nutno pacienta vhodně polohovat (vleže, vsedě, v supinační poloze - pololeže), preventivně omezit riziko jeho pádu a po ukončení procedury mu asistovat při vstávání. Případně striktně vyžadovat krátké následné setrvání v klidu po podané proceduře; u vážných případů i pod zdravotním dohledem.
- Závrať během procedury či po proceduře nebo pocity vegetativní lability však nemusí být vůbec v souvislosti s vlastní terapií, nýbrž mohou být důsledkem vnitřního napětí pacienta z aplikace jakési neznámé a tajuplné procedury, zvláště u psychicky labilních pacientů. Na toto riziko je nutno vždy myslet, pacientovi vše důkladně vysvětlit, případně psychicky labilního pacienta z léčby vyloučit.
- Závrať a pocit nejistoty po proceduře může být též vyvolán dlouhodobě strnulou polohou při terapii. Proto je vhodné, aby pacientu byla během případné delší procedury poskytnuta možnost alespoň minimálně pohybovat končetinami, procvičoval je a průběžně se lehce uvolňovat.
- Pacient by během procedury neměl přijímat tekutiny.

Vedlejší účinky

V odborné lékařské literatuře bylo vysloveno, že nízkofrekvenční elektromagnetická pole a jimi indukované elektrické proudy mohou:

- podpořit vznik a růst nádorů
- působit synergicky s antibiotiky a fenylbutazonem,
- působit antagonisticky se steroidy, nitráty, antagonisty vápníku a beta blokátory,
- zpomalovat efekt srdečních glykosidů.

- Dosud však nikdy nebyl prakticky hlášen výskyt těchto souvislostí.
- Nejdůležitějším vedlejším účinkem rehabilitačních a fyzikálně-léčebných procedur vysokoindukční magnetické stimulace pro pacienta však může být mírné zvýšení bolestivosti v místě podání po aplikaci první nebo několika prvních procedur. Tento efekt, známý z podávání většiny fyzikálně-léčebných procedur a nazývaný reaktivní fáze, je obvykle vysvětlován na základě mechanismu působení vznikajících superoxidů v léčených tkáních a je jedním z důkazů lokálního účinného působení terapie. Po přechodném zvýšení bolestivosti po jedné až třech prvních procedurách následuje většinou výrazné snížení bolesti a další příznivé efekty této fyzikální terapie. V případě percepčně a motoricky působící vysokoindukční magnetické stimulace může ke zvýšení bolesti přispět též namáhání opakovaně kontrahovaných svalů. V našich klinických studiích jsme tento obecně popisovaný jev nezaznamenali, naopak analgetický účinek terapie rostl proporcionálně s počtem podaných procedur.

Současné poznatky o podávání procedur vysokoindukční magnetické stimulace však svědčí spíše o okamžitém a v jednotlivých po sobě následujících procedurách léčebné série postupně narůstajícím analgetickém působení této přístrojové fyzikální terapie, přičemž reaktivní fáze u pacienta nebývá vůbec pozorována.

7 Dávkování procedur

Dávkování procedur vysokoindukční magnetické stimulace je vždy individuální, přičemž je třeba zohlednit léčebný prospěch i případná rizika. Doba procedury bývá obvykle 10 až 30 minut. V odůvodněných případech lze dobu jedné aplikace zkrátit i prodloužit. Zkušenosti ze studií provedených v rámci přípravy této metodiky svědčí spíše pro účinnost delších procedur, jednoznačně při nižších hodnotách indukovaných proudových hustot, které jsou v dotčených indikacích prokazatelně účinné, ale vyžadují právě delší dobu procedury.
V těchto případech se však dávkuje podprahově motoricky nebo apercepčně. Procedury jsou obvykle podávány denně (méně často obden) v sérii většinou 10 až 20 procedur s případným možným opakováním této série i několikrát ročně (obvykle 2 až 4 krát). Studie a jejich vyhodnocení ukázaly na skutečnost, že delší souvislé podávání série procedur přináší postupně vzrůstající analgetické účinky, a to i u vysokoindukční magnetické stimulace v užším slova smyslu. Lze tedy souvisle aplikovat i delší sérii procedur, pokud je zřejmý léčebný přínos a nehrozí-li žádná rizika.

8 Analýza rizik terapie

Určené použití a identifikace charakteristik vztahujících se k bezpečnosti přístrojů pro vysokoindukční magnetickou stimulaci

(dle ČSN EN ISO 14971 čl. 4.2, příloha C)

8.1 Určené použití přístrojů pro vysokindukční magnetickou stimulaci

Přístroje pro vysokoindukční magnetickou stimulaci jsou určeny pro fyzikálně léčebné procedury vysokoindukční magnetostimulace. Pro účely této metodiky za vysokoindukční magnetickou stimulaci považujeme vytváření indukovaných elektrických proudů v lidských tkáních, jejichž proudová hustota dosahuje v amplitudách alespoň hodnoty kolem 1 A/m2.

Tato metoda je založena na generování optimálních impulzů magnetických polí o vysoké magnetické indukci, jednotlivých nebo periodicky se opakujících, případně soustředěných ve skupinkách označovaných jako salvy, pakety čili bursty. Touto cestou jsou v léčených tkáních vytvářeny impulzy indukovaných elektrických proudů. Účelem přístrojů je, aby tyto impulzy byly léčeným organismem vnímány jako signály, které jsou schopny vyvolávat jak apercepční nespecifické projevy, nýbrž i senzorické percepční projevy, spočívající v aktivaci eferentních nervových drah, a dokonce i efekty svalově motorické. Těchto možností lze dle rozhodnutí lékaře v široké škále indikací léčebně využívat..

Riziková třída těchto zdravotnických prostředku podle direktivy EU MDD 93/42/EEC i podle MDR 2017/745 je IIa. Přístroje tedy předávají fyzikální energii indukovaných elektrických proudů potenciálně bezpečným způsobem. Tuto “bezpečnost” je však nutno vnímat v porovnání s fyzikálními energiemi ionizujícího záření, které předávají fyzikální energii vždy nebezpečným způsobem. Dále pak ve vztahu k účinkům vysokofrekvenčních elektromagnetických polí, které sice již nevytvářejí ionizující záření, nicméně mohou do lidských tkání předávat značné množství tepla nebo působit i jinými, dosud málo známými, biologickými účinky a v závislosti na frekvenci a intenzitě působení mají celou řadu potenciálních nebo i prokázaných negativních účinků. Indukované elektrické proudy produkované časově proměnnými nestacionárními magnetickými poli přístrojů pro vysokoindukční magnetickou stimualci ovšem patří jednoznačně k nízkofrekvenčním elektromagnetickým polím (viz doporučení komise ICNIRP) a s nimi spojená biologická rizika jsou menší než-li je tomu u elektromagnetických polí vysokofrekvenčních. Nicméně i zde je

celá řada hledisek předběžné opatrnosti a potenciálních či relativních kontraindikací (viz 6. kapitola této metodiky). Je skutečností, že současný stav poznání nám nedovoluje tvrdit, že dokonale známe všechna rizika aplikace nízkofrekvenčních elektromagnetických polí. I když tato metodika přináší určitý příspěvek k poznání biologických účinků těchto fyzikálních intervencí, nemůže zásadním způsobem změnit zbytkové riziko jejich klinických aplikací. Je tudíž na lékaři, aby vždy individuálně zvážil přínos této formy fyzikální terapie ve srovnání s jejími riziky, rozhodně menšími než u mnoha jiných léčebných metod, nikoliv však nulovými, přičemž je třeba uvážit i onu skutečnost, že současný stav poznání nedává a v zásadě nikdy nebude poskytovat zcela jednoznačné a vyčerpávající informace.

Z hlediska rizik podávání procedur aplikujících bezkontaktně indukované elektrické proudy je nutno přihlížet nejen k rizikům vyplývajícím z podstaty jejich biologických účinků, ale je třeba zohledňovat i jejich fyzikální parametry. Předložená metodika i četné vědecké práce poukazují na rozdílnost v účincích různých intenzit indukovaných elektrických proudů i jejich frekvenčního spektra. Indikující lékař by měl mít k dispozici dokonalou znalost o parametrech těchto aplikovaných fyzikálních agens, které se liší přístroj od přístroje i v rámci možností nastavení parametrů každého z jednotlivých zdravotnických prostředků. Poněvadž tato problematika může mnohdy přesahovat možnosti specialistů jednotlivých medicínských oborů aplikujících tuto fyzikální intervenci, doporučuje se daný aspekt řešit i ve spolupráci s příslušně kvalifikovanými a odborně erudovanými biofyziky nebo biomedicínsky či klinicky zaměřenými techniky.

8.2 Přehled deklarovaných rizik, jejich pravděpodobností, závažnosti a opatření na snížení rizika

Riziko R1

Nebezpečí nesprávné diagnózy a/nebo použití přístroje v rozporu s jeho určeným použitím. Riziko poškození pacienta nesprávným použitím.

Indikovat procedury podávání indukovaných elektrických proudů patří výlučně do kompetence příslušně kvalifikovaného lékaře, který je obeznámen se zdravotním stavem daného pacienta i s konkrétními fyzikálními parametry podávané léčebné intervence a který může zcela objektivně vyhodnotit poměr přínosu a rizik. Podávání procedury je možné minimálně jen pod dohledem kvalifikovaného fyzioterapeuta, ve výjimečných případech s nízkou úrovní rizik a při uplatnění léčby v domácím prostředí pak náležitě poučené osoby.

Pro obsluhu přístrojů a další osoby nacházející se v jejich blízkosti pak platí požadavky dle závazných doporučení ICNIRP (Mezinárodní doporučení pro ochranu před neionizujícím

zářením ICNIRP - International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection: Guidelines for limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic, and Electromagnetic Fields), zahrnuto v Nařízení vlády ČR č. 1/2008 Sb., respektive v direktivě EU 2004/40/ES. Pro zajímavost, u přístrojů v současnosti uvedených na trh a do používání ve zdravotnictví produkujících ta nejsilnější magnetické pole (2,5 – 3 T) a indukované elektrické proudy o proudových hustotách v řádu několika set A/m2 je tato vzdálenost pro tzv. “ostatní” osoby 1,7 až 2 metry, pro obsluhu poloviční. Za léčebně biologickou účinnou vzdálenost lze však považovat dosah maximálně kolem 30 cm od čela aplikátoru.

Riziko R2

Riziko překročení léčebné dávky a z toho vyplývající nežádoucí dopad na pacienta.

Obvyklé doby procedur jsou v trvání 10 – 30 minut denně při percepčních a nadprahově motorických účincích. Ovšem doba procedury se může prodloužit, procedura se může okamžitě nebo krátce po ukončení předchozí opakovat, a to i vícekrát po sobě. Je však třeba zvážit, že během doby procedury může aplikátor vytvářet silné percepční i svalově motorické efekty, čímž může pacienta nadměrně zatěžovat a vystavovat jej následným rizikům, mezi něž patří mj. i riziko otlaku dlouhodobě přiloženým aplikátorem nebo jeho tepelným působením, byť podlimitním (ČSN EN 60601-1, tabulka 24, nejvyšší přípustná teplota 43°C není na povrchu aplikátoru dosaženo ani po 24 hodinovém provozu s maximálními možnými parametry, produkujícími nejvyšší možné tepelné ztráty).

Při použití apercepčních indukovaných elektrických proudů nižších proudových hustot v řádech jednotek A/m2, avšak se specifickým frekvenčním spektrem (viz v této studii úspěšně klinicky se uplatněné harmonické, amplitudově modulované proudy) mohou být doby aplikace i velmi dlouhé, je nutno však vždy přihlížet k poměru rizik a přínosu.

Riziko R3

Riziko nežádoucí reakce na látky obsažené v zapouzdření příložné části.

I když je aplikace indukovaných elektrických proudů apercepční, je prováděna prostřednictvím speciální cívky zapouzdřené v aplikátoru, jehož povrch se může dostávat do styku s tělem pacienta. Musí být tedy prokazatelně vyroben z materiálu splňujícího požadavky na biokompatibilitu (ČSN EN ISO 10993-1 idt ISO 10993-1:2009), včetně zvážení intaknosti nebo sterilního či nesterilního krytí povrchu těla pacienta v místě aplikace, doby aplikace, frekvence opakování procedur, dosahované teploty aplikátoru apod.

Riziko R4.

Během procedury podávané přístrojem je dodávána elektromagnetická energie. Riziko poškození pacienta dodávanou elektromagnetickou energií.

Řešeno jako zásadní otázka v zásadě v celém textu této metodiky.

V důsledku rychlé a přesně definované časové změny magnetického pole o vysoké intenzitě vzniká v léčených tkáních zákmit indukovaného elektrického napětí a následně i zákmit indukovaného elektrického proudu. Výpočty i měřeními bylo zjištěno, že proudová hustota indukovaného elektrického proudu je mnohem vyšší, než-li je hustota indukovaného elektrického proudu obvyklá při podávání nízkoindukční pulzní magnetoterapie. Tím se mohou projevit zcela nové a klinicky požadované biologické účinky (viz v této metodice prokázaný vliv na histopatologicko-morfologické nálezy, vliv na mediátory zánětu, analgetické účinky vznikající již na buněčné úrovni somatosenzorických nervových buněk apod.) a při vyšších amplitudách proudových hustot může na nervových axonech vznikat dostatečně velký indukovaný napěťový spád, dovolující vytvoření a vedení elektrického vzruchu, postupujícího dále ve směru vedení nervového signálu axonem a dále pak až k nervosvalovému spojení vlastní motorické jednotky. Nejedná se tudíž o mechanismus vyvolání akčního potenciálu na buněčné membráně nervových buněk (na těle neuronu v předním rohu míšním) nebo svalových buněk, jak je někdy mylně interpretováno. Přístrojem pro vysokoindukční magnetickou stimulaci současných technických parametrů lze na membráně nervových buněk tloušťky přibližně 6 nm vyvolat napěťový spád přibližně 0,000 6 mV, což je o 3 -4 řády méně, než-li činí hodnota prahového potenciálu neuronu. Vysokoindukční magnetickou stimulací tedy nelze ovlivnit vznik samotného akčního potenciálu v těle neuronálních buněk, což je ovšem významný a pozitivní faktor svědčící pro principiální šetrnost a bezpečnost této fyzikálně-léčebné metody.

Ovšem, jak však bylo zmíněno, je spád indukovaného elektrického napětí v průběhu nervových axonů již dodatečně velký k tomu, aby na axonu vznikl a po axonu se šířil tento indukovaný vzruch, který poté, co dopěje k synapsi, zabezpečí další zcela přirozené šíření nervového vzruchu, případně již přímo motorickou reakci. Stejným mechanismem lze citlivě vyvolat i dráždění příslušných nervových zakončení (receptorů) a percepční léčebné efekty.

Lze očekávat výrazné léčebné efekty, a to nejen při funkčních onemocnění pohybového aparátu, ale zvláště též při zvláště při léčebném ovlivňování příznaků degenerativních (strukturálních) poruch pohybového aparátu, rovněž tak při poruchách perfuze v léčených tkáních, a to při výrazně kratších dobách trvání procedury, než-li při podávání pulzní magnetoterapie nebo i distanční elektroléčby, případně jiných přístrojových fyzikálně-

léčebných procedur. O těchto skutečnostech nadšeně informuje převážná většina odborných publikací i sdělení z klinické praxe.

V současné době je ve fyzikální léčbě využívána celá řada přístrojů pro léčbu nestacionárními, tedy časově proměnnými magnetickými poli různých parametrů a technické konstrukce. Všechny tyto přístroje v zásadě pracují s časově proměnným magnetickým tokem, obvykle pulzního, méně často střídavého průběhu, s frekvencemi obvykle z ELF oblasti (extra low frequency). Účinek samotného magnetického pole, ať již stacionárního či časově proměnného, je stále diskutabilní, i když není zcela vyloučen. Předpokládá se především působení Lorenzových a Ampérových sil, čili elektro-dynamických sil, spočívajících v ovlivnění pohybujících se elektricky nabitých částic a jejich proudů zevním magnetickým polem. Při charakteristických parametrech pohybu iontů ve tkáních a při uvážení velikosti magnetických indukcí magnetických polí používaných v léčbě se ovšem nezdá, že by byl tento mechanismus byl biologicky významný. Stejně tak není dosud obecně přijímána žádná z teorií, které se snaží vysvětlit biologické účinky časově proměnných magnetických, čili polí elektromagnetických, prostřednictvím štěpení energetických hladin radikálů, prostřednictvím ovlivnění slabých chemických vazeb, prostřednictvím resonance proteinů, jejich polarizace, ani prostřednictvím vybuzené oscilace elektricky nabitých částic a tím jejich stimulovaným přechodem přes membrány.

Přes množství publikovaných vědeckých prací zahrnujících tyto a další hypotézy se vědecky uznávané prameny zatím jasně přiklánějí výlučně k biologickým efektům indukovaných elektrických proudů. Biologicky hraniční efekty jsou přitom předpokládány od proudové hustoty tisícin ampéru na metr čtvereční. Klasická hojně rozšířená pulzní magnetoterapie pracuje řádově s hodnotami tisícin až setin ampéru na metr čtvereční. Přístroje pro tzv. distanční elektroterapii, které jsou konstruovány s úmyslem zvýraznit nesporný léčebný efekt indukovaných elektrických proudů, pracují s proudovými hustotami řádu desetin až 1 ampér na metr čtvereční. Přístroje pro percepční a motorickou magnetickou stimulaci však pracují s proudovými hustotami od 10 ampér na metr čtvereční až po stovky ampér na metr čtvereční, čímž se technickému srovnání s magnetoterapií a distanční elektroterapií zcela vymykají, viz tabulka 1 převzatá z mezinárodně uznávané směrnice ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection: Guidelines for limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic, and Electromagnetic Fields), která je impementována v legislativě Evropského společenství i většiny zemí světa a v české legislativě je představována Nařízením vlády č. 1/2008, Sb., o ochraně zdraví před neionizujícím zářením.

Proudová hustota indukovaných elektrických proudů (f < 100 kHz)	Projevy
A / m^2	
< 0,001	Nejsou zjišťovány žádné jednoznačně průkazné biologické projevy
0,001 – 0,01	Hraničně se již dají zjistit určité nespecifické biologické projevy.
0,01 – 0,1	Zjistitelné biologické efekty: Vizuální (magnetofosfény), potenciální možnost ovlivnění nervové soustavy, snazší hojení zlomenin, zjišťovány změny semipermeability membrán
0,1 - 1	Již výrazně zjistitelné biologické efekty, zatím bez dosažení prahu senzorického vjemu (vyvolání akčního potenciálu)
1 - 10	Dosahován práh senzorické a poté i motorické stimulace
> 10	Motorická stimulace, účinné působení na buňky tkání; možné extrasystoly, fibrilace, …

Tabulka 7: *Proudové hustoty elektrických proudů indukovaných ve tkáních časově proměnnými magnetickými (tedy elektromagnetickými) poli ve frekvenčním rozsahu do 100 kHz, dle směrnice ICNIRP.*

Biologická účinnost přístroje je tudíž mimo jiné plně podložena závěry směrnice ICNIRP (motorická stimulace neuromuskulárních jednotek, účinné působení na buňky tkání); ovšem na druhé straně je aplikace tak silných polí nepochybně spojena s určitými riziky, na která je třeba se soustředit při indikaci i při provádění procedury. Dosavadní zkušenosti však spíše nasvědčují tomu, že skutečná rizika jsou však minimální, často jen lokální nebo relativní, a že léčebný přínos aplikace indukovaných elektrických proudů prostřednictvím vysokoindukční magnetické stimulace s percepčními, resp. svalově-motorickými účinky představuje ve srovnání s apercepčními metodami fyzikální léčby v indikovaných případech přínos. Na druhé straně se ukázalo, že apercepční podávání indukovaných elektrických proudů o proudových hustotách alespoň kolem 1 A/m^2 s vhodným frekvenčním spektrem má prokazatelný účinek na řadu léčebně využitelných biologických procesů (vliv na mediátory zánětu, na histopatologicko-morfologický nález, na vznik signálů o bolesti přímo na úrovni receptorů somatosenzorických nervových buněk, vliv na migrační schopnost stromálních regenerativních buněk, vliv na viabilitu, proliferaci a metabolismus endoteliálních buněk apod.), jak bylo mj. ukázáno ve výzkumech provedených v rámci přípravy této předložené metodiky.

Riziko R5

Zdravotnický prostředek pro podávání procedur aplikujících indukované elektrické proudy vysokých proudových hustot může ovlivňovat okolní prostředí emisí elektromagnetického rušení. Z toho vyplývá nebezpečí ztráty funkce výrobků nalézajících se v jeho blízkosti.

Riziko výpadku činnosti okolních elektrických přístrojů. Dále pak:

Riziko vlivu elektromagnetického neionizujícího záření na obsluhu a ostatní osoby v blízkosti přístroje.

Certifikované přístroje pro vysokoindukční magnetickou stimulaci musí splňovat požadavky normy ČSN EN 60601-1 v části emise elektromagnetického rušení.

Co se týče rizika vlivu elektromagnetického neionizujícího záření na obsluhu a ostatní osoby, vychází se z požadavků ICNIRP implementovaných v Nařízení vlády ČR 1/2008 Sb. Tento aspekt byl již diskutován v jiných částech této analýzy. Hranice pro biologické účinky dle ICNIRP jsou dokonce překročeny o mnoho řádů. Tato skutečnost nás však nepřekvapuje, neboť u živých organismů se reakce na vnější fyzikální podněty uskutečňuje dle Weberova - Fechnerova zákona, tedy logaritmicky.

Weberův-Fechnerův zákon lze matematicky popsat například následujícím vztahem:

$$dS = k \cdot \frac{dI}{I} \quad .$$

Tento vztah lze upravit vyřešením příslušné diferenciální rovnice na známou formuli:

$$S = k \cdot \ln \frac{I}{I_0} \quad ,$$

kde S je biologická intenzita vjemu; k je konstanta;

I je fyzikální intenzita podnětu působícího na receptor;

Io je prahová intenzita, tedy absolutně nejnižší možná intenzita, jakou je schopný jedinec vnímat.

Aplikátor přístrojů je konstruován obvykle jako prstencová nebo ještě častěji Archimedova spirála, což zaručuje maximum magnetického pole nad plochou spirály (velmi důležité pro dostatečně hloubkový účinek) a zároveň je vznikající magnetické pole plošně dostatečně homogenní. Takovým řešením lze magnetickou stimulací ovlivnit relativně velký objem

léčených tkání, což je zvláště v léčebné rehabilitaci a léčbě příznaků onemocnění pohybového aparátu velmi potřebné. Směrem od roviny aplikátoru a zvláště kolmo na ní však z důvodů fyzikálních zákonitostí hodnota magnetické indukce, respektive intenzity magnetického pole přesto rychle ubývá. V ose cívky, kde je tento úbytek nejmenší, lze přibližně předpokládat pokles úměrný 3. mocnině vzdálenosti. Ve vzdálenosti 30 cm je již pole dostatečně slabé, aby se v něm neprojevovaly jakékoliv výrazné stimulační a percepční efekty, ovšem indukovaná proudová hustota je ještě minimálně 10krát vyšší než-li nejvyšší přípustná hodnota proudové hustoty pro zaměstnance a tím spíše pro ostatní osoby. Tyto skutečnosti implikují Riziko R6, které pro obsluhu zůstává jako zbytkové a na které musí být z hlediska obsluhy opravdu vysoce výkonných magnetických stimulátorů náležitě zhodnoceno.

Bezpečná vzdálenost podle legislativních opatření bývá u těchto vysoce výkonných přístrojů až ve vzdálenosti minimálně 1 až 2 metrů od aplikátoru, kde jsou indukované proudové hustoty již menší než 0,1 A/m^2.

Riziko R6:

Nebezpečí nesprávného používání přístrojů pro aplikaci indukovaných elektrických proudů vysokých proudových hustot

Přístroje pro aplikaci indukovaných elektrických proudů vysokých proudových hustot vyžadují vhodnou formou provedeného zaškolení uživatele a obsluhy. Touto vhodnou formou může být i seznámení se s návodem k obsluze, ale tento návod by musel splňovat mnohé požadavky, což zatím nebývá obvyklé, a uživatel by musel přijímat návodem poskytované informace se samostatným a plným porozuměním, což rovněž nelze ve všech případech předpokládat. Riziko nesprávného použití je tedy třeba eliminovat kvalitním zaškolováním uživatelů a obsluhy i jejich dalším trvalým vzděláváním prováděným na základě nejnovějších poznatků vědy a techniky.

Nepředpokládá se, že by příslušné zdravotnické prostředky byly samostatně používány osobami se zvláštními potřebami - bezpředmětné pro tuto analýzu.

Při konstrukci, certifikaci i používání příslušných zdravotnických prostředkl je nutno respektovat rovněž požadavky normy ČSN EN 60601-1:2007.

9 Literatura

1. BASSETT, C.A.L.: Beneficial effects of electromagnetic fields. (1993) Journal of Cellular Biochemistry, 51 (4), pp. 387-393.
2. BAJPAYEE, AMBIKA G., et al. "A rabbit model demonstrates the influence of cartilage thickness on intra - articular drug delivery and retention within cartilage." Journal of Orthopaedic Research 33.5 (2015): 660-667
3. BASSETT, C.A.L.: Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulzed electromagnetic fields (PEMFs). (1989) Critical reviews in biomedical engineering, 17 (5), pp. 451-529.
4. ČAPEK, F., PRŮCHA, J., SOCHA, V., HART, V., BURDA, H.: Directional orientation of pheasant chicks at the drinking dish and its potential for research on avian magnetoreception (2017). Folia Zoologica, 66 (3), pp. 175-182.
5. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection: ICNIRP guidelines for limiting exposure to time-varying electric and magnetic fields (1 Hz-100 kHz). Published in: Health Physics 99(6):818 - 836; 2010.
6. LI, F., YIN, Z., ZHOU, B., XUE, F., YANG, W., CHANG, R., ... & QIU, Y. (2015). Shikonin inhibits inflammatory responses in rabbit chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rabbit knee. International immunopharmacology, 29(2), 656-662.
7. MICHALEK, J., VRABLIKOVA, A., DARINSKAS, A., LUKAC, L., PRUCHA, J., SKOPALIK, J., TRAVNIK, J., CIBULKA, M., DUDASOVA, Z.: Stromal vascular fraction cell therapy for osteoarthritis in elderly: Multicenter case-control study (2018). Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma. Article in Press.
8. NAVRATIL, L., DYLEVSKY, I., PRUCHA, J., KRUSEK, J., DITTERT, I., AND VLACHOVA, V. (2019). Studium buněčných mechanismů působení vysokoindukčního elektromagnetického pole na periferní senzorické neurony. Československá fyziologie 68(1), 16-21.
9. LEE, P.B., KIM, Y.C., LIM, Y.J. et al. Efficacy of Pulzed Electromagnetic Therapy for Chronic Lower Back Pain: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study. The Journal of international medical research, 2006, 34(2):160-7. DOI: 10.1177/147323000603400205

10. PĚTIOKÝ, J., VÁŇA, Z., ŠUBERT, D., ŽARKOVIČ, D., PROUZA, O., BITTNER, V.: Výkonová indukční stimulace v léčbě alogických stavů muskuloskeletárního aparátu – pilotní studie (2016). Rehabilitace a fyzikální lékařství, 23, 2016, č. 4, s. 195-200.

11. PITR, K., PRŮCHA, J.: Regression of pain of the locomotor apparatus and other effects associated with application of distance electrotheraphy [Article@Ústup bolesti v oblasti pohybového aparátu a další efekty při podávání procedur distanční elektroléčby] (2001). Rehabilitace a Fyzikalni Lekarstvi, 8 (2), pp. 70-85.

12. PODĚBRADSKÝ, J., PODĚBRADSKÁ, R.: Clinical study of high-induction electromagnetic stimulator SALUS Talent (2010). Rehabilitation and Physical Medicine (on-line), 17, 2010, 3, s. 95-100.

13. PRŮCHA, J., DYLEVSKÝ, I., NAVRÁTIL, L., VLACHOVÁ, V., KRŮŠEK, J., DITTERT, I., SKOPALIK, J., KLAPALOVÁ, A., ŠTENGL, M., SOCHA, V. Přínosy základního, preklinického a klinického výzkumu k uplatnění indukovaných elektrických proudů v indikacích rehabilitační a fyzikální medicíny. Rehabilitace a fyzikální lékařství 2019, 26, 4.

14. PRŮCHA, J., HAVEL, V., PITR, K.: The physical conditions of the distant electrotherapy application in patients with metaloid endoprosthesis [Article@Fyzikální podmínky aplikace distanční elektroléčby u pacientů s endoprotézou] (2004). Rehabilitace a Fyzikalni Lekarstvi, 11 (4), pp. 184-188.

15. PRUCHA, J., KRUSEK, J., DITTERT, I., SINICA, V., KADKOVA, A., VLACHOVA, V.: Acute exposure to high-induction electromagnetic field affects activity of model peripheral sensory neurons (2018). Journal of Cellular and Molecular Medicine, 22 (2), pp. 1355-1362.

16. PRŮCHA, J., SKOPALIK, J., JUSTAN, I, PARÁK, T., GABRIELOVÁ, E, HÁNA, K., NAVRÁTIL, L. High Inductive Magnetic Stimuli and Their Effects on Mesenchymal Stromal Cells, Dendritic Cells, and Fibroblasts. Physiol. Res. 68 (Suppl. 4): S000-S000, 2019.

17. PRŮCHA, J., SKOPALIK, J., SOCHA, V., HANÁKOVÁ, L., KNOPFOVÁ, L., HÁNA, K.. Two types of high inductive electromagnetic stimulation and their different effects on endothelial cells. Physiol Res, roč. 68, 2019, č. 4, s. 611-622.

18. PRUCHA, J., SOCHA, V., SOCHOVA, V., HANAKOVA, L., STOJIC, S.: Effect of High-Induction Magnetic Stimulation on Elasticity of the Patellar Tendon (2018). Journal of Healthcare Engineering, 2018, art. no. 7172034.

19. SOCHA, V., SCHLENKER, J., HANA, K., SMRCKA, P., HANAKOVA, L., PRUCHA, J., SZABO, S., RIEDLBAUCHOVA, L., VOJTOVA, V.: Prediction of atrial fibrillation and its successful termination based on recurrence quantification analysis of ECG (2016). 39th International Conference on Telecommunications and Signal Processing, TSP, 2016, art. no. 7760898, pp. 365-369.

20. ŠŤASTNÝ, E., PROUZA, O.: Klinická studie aplikace vysokoindukčního elektromagnetického pole na bolestivé stavy (2016). Rehabilitace a fyzikální lékařství, 23, 2016, š. 3, s. 142-148.

21. UHER, E., SCHNEIDER, R., WEWALKA, M., SCHUHFRIED, O.: Pilot study of musculoskeletal diseases with low effecti-ve high-energy electromagnetic stimulation. Physical Medicine, Rehabilitation Medicine, 2012, 1, s. 22-30.

22. ZARKOVIC, D., KAZALAKOVA, K. (2016). Repetitive peripheral magnetic stimulation as pain management solution in musculoskeletal and neurological disorders - a pilot study. International Journal of Physiotherapy, 3(6), 671-675.