

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКОИНТЕНСИВНЫМ ИМПУЛЬСНЫМ ФОКУСИРОВАННЫМ УЛЬТРАЗВУКОМ *IN VIVO*

С.В. Буравков<sup>1</sup>, Е.М. Пономарчук<sup>1</sup>, Т.Д. Хохлова<sup>2</sup>, Я.-Н. Ванг<sup>2</sup>, В.А. Хохлова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

<sup>2</sup> Центр промышленного и медицинского ультразвука при лаборатории прикладной физики  
Университета штата Вашингтон, США, Сиэтл

В работе представлены результаты морфологического анализа результатов экспериментов по воздействию мощного фокусированного ультразвука на печень свиньи *in vivo* при разных параметрах импульсного ударноволнового облучения. После воздействия образцы ткани криофиксировали, срезы окрашивали гематоксилином и эозином и хлоридом нитросинего тетразолиевого для выявления активности NADH-диафоразы с целью определения зон термического поражения. Гистологически оценивали зоны фокуса повреждения и перифокальные области при трех режимах облучения: с преимущественным механическим, с комбинированным механическим и тепловым и преимущественно тепловым разрушением ткани. Показано, что режим с преимущественным механическим разрушением имеет намного более четкую демаркационную зону в отличие от остальных режимов. Обсуждаются вопросы, связанные с проявлением воспалительной реакции на ультразвуковое разрушение, изменениями ядер гепатоцитов в зоне механического разрушения, дальнейшей реабилитацией после использования разных режимов облучения и перспективы будущих экспериментов.

**Ключевые слова:** мощный фокусированный ультразвук, гистология печени свиньи, термическая абляция

Фокусированный ультразвук высокой интенсивности (high intensity focused ultrasound, HIFU) в настоящее время становится все более востребованным инструментом для неинвазивного хирургического лечения доброкачественных и злокачественных новообразований [6, 12]. Это связано с тем, что сфокусированные ультразвуковые волны, проходя через тело человека, вызывают локальное разрушение ткани в фокальной области пучка, не повреждая при этом окружающие ткани. Тем не менее механизм такого разрушения может быть разным и зависит от выбранного режима облучения. Сегодня в доклиническом и клиническом использовании HIFU широко используется вариант непрерывного ультразвукового облучения, которое приводит к локальному нагреванию и разрушению ткани в фокусе по типу термической абляции. Примерами являются лечение опухолей предстательной железы [5], печени [3] и поджелудочной железы [8].

Следует сказать, что к настоящему времени уже были выявлены важные ограничения использования теплового механизма воздействия ультразвука в неин-

вазивной хирургии. Так, диффузия тепла от нагреваемой области может приводить к перегреванию окружающих тканей, а охлаждение фокуса за счет перфузии усложняет абляцию вблизи крупных кровеносных сосудов. Кроме того, результатом такого воздействия является коагуляционный некроз или ожог облученного объема ткани, что приводит к достаточно долгому процессу реабилитации. Другие методы тепловой абляции – лазерная и радиочастотная катетерная абляция – инвазивны и не позволяют разрушать новообразования размером более 3–4 см, в то время как именно опухоли большого размера часто связаны с рецидивом заболевания [13]. Кроме того, возможности визуализации области теплового разрушения и контроля воздействия с использованием доступных ультразвуковых методов весьма ограничены.

В последнее время возрос интерес к использованию механического воздействия импульсного ультразвука, который не вызывает существенного локального нагревания ткани и получил название гистотрипсии [10]. Начиная с 2010 года в университете штата Вашингтон

совместно с учеными из МГУ имени М.В. Ломоносова разрабатывается один из таких новых подходов к механическому разрушению ткани – его назвали гистотрипсией с кипением. Этот метод использует ударно-волновые импульсы миллисекундной длительности, позволяющие периодически, в течение каждого из импульсов, достигать температуры кипения внутри фокальной области HIFU-пучка. Механическое разрушение ткани без теплового эффекта в этом случае достигается за счет взаимодействия ультразвука с парогазовой областью, создаваемой в фокусе. Физические механизмы этого процесса подробно описаны в работах [4, 15]. Основные исследования с применением данного метода и морфологический анализ получаемых разрушений проводились на образцах тканей *ex vivo* [2, 18].

Недавно были опубликованы результаты первых экспериментов, показывающие возможность использования режимов гистотрипсии с кипением на живой модели [9]. Основное внимание в этой работе было уделено сравнению разрушений, полученных в печени свиньи при одинаковых протоколах облучения *in vivo* и *ex vivo*, проведен и соответствующий сравнительный морфологический анализ разрушений, полученных в образцах ткани *in vivo* и *ex vivo* для режима механического разрушения [1]. Целью данной работы являлось детальное исследование гистологической структуры разрушений, вызванных в печени свиней *in vivo* при использовании режимов гистотрипсии с кипением с разными параметрами и, соответственно, различной степенью проявления механического и теплового эффекта в возникающих разрушениях.

### Материалы и методы

В доклинических экспериментах по облучению ткани печени были использованы пять свиней весом 50–60 килограммов [9]. Все работы проводились с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984), а также в соответствии с протоколом по уходу и использованию животных соответствующего комитета Университета штата Вашингтон (The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Washington, protocol number is 4200-01).

Перед началом эксперимента животных анестезировали тилетамин/золазепамом с последующей интубацией и ингаляционным наркозом изофлураном. Далее эксперименты проводились на открытой печени. Излучатель с радиусом кривизны 64 мм присоединяли к конусу, заполненному водой, который заканчивался акустически прозрачной мембраной, непосредственно контактирующей с печенью. К излучателю был подведен источник с акустической мощностью 240 Вт и рабочей частотой 2 МГц для создания ультразвуковой волны с амплитудой ударного фронта 87–102 МПа в фокусе. С помощью излучателя в течение 50 секунд генерировались импульсы длительностью от 1 до

100 мс с частотой повторения от 0,1 до 10 Гц либо генерировался один импульс длительностью 500 мс. Глубина фокуса в печени составляла около 1 см. Таким образом, исследовалась процедура гистотрипсии с кипением с разной степенью проявления тепловых эффектов, контролируемой различной длительностью и частотой повторения импульсов. Более подробно процедура проведения эксперимента описана в работе [9].

Спустя 2 часа после воздействия на ткань живого организма область поражения печени сразу иссекалась и мгновенно замораживалась в изопентановой бане, охлажденной сухим льдом. Далее на криомикротоме изготавливали срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином, обезживали в спиртах восходящей концентрации и монтировали под покровное стекло. Параллельно на криостатных срезах с помощью хлорида нитросинего тетразолиевого проводили выявление митохондриального фермента NADH-d (nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase), отсутствие активности которого, как показано ранее, является индикатором термического поражения [9, 11, 18].

Исследование полученных образцов и их фотографирование проводились на микроскопе Zeiss Axio Imager (Zeiss, Германия), захват изображений производился с помощью камеры AxioCam MRC5 (Zeiss, Германия) с разрешением 2584×1936 точек.

### Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании анализировались результаты, полученные для трех режимов импульсно-периодического воздействия фокусированного ультразвука, приводящих к механическому разрушению ткани печени с разной степенью проявления тепловых эффектов. Использовались импульсы длительностью 10 мс с частотой повторения 1 Гц (1 – механическое разрушение), длительностью 100 мс с частотой 0,1 Гц (2 – смешанное механическое и тепловое разрушение) и однократное облучение импульсом длительностью 500 мс (3 – чисто тепловое разрушение). Гистологический анализ проводили на криостатных срезах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 1 А), а оценку наличия или отсутствия теплового эффекта определяли при анализе криостатных срезов с реакцией на NADH-d (рис. 1 Б).

*Режим механического разрушения (10 мс, 1 Гц).* Макроскопически при таком воздействии на внешней поверхности печени видимые разрушения не выявлялись, однако при разрезе область фокуса выглядит как жидкая, признаки тепловой денатурации отсутствуют. При детальном изучении срезов, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 2 А, Б), обнаружено, что в объеме разрушения образуются полосчатые структуры, между которыми видны пустоты. В связи с тем, что ткань химически не фиксировалась (использовалась только криофиксация), образовавшиеся пустоты,

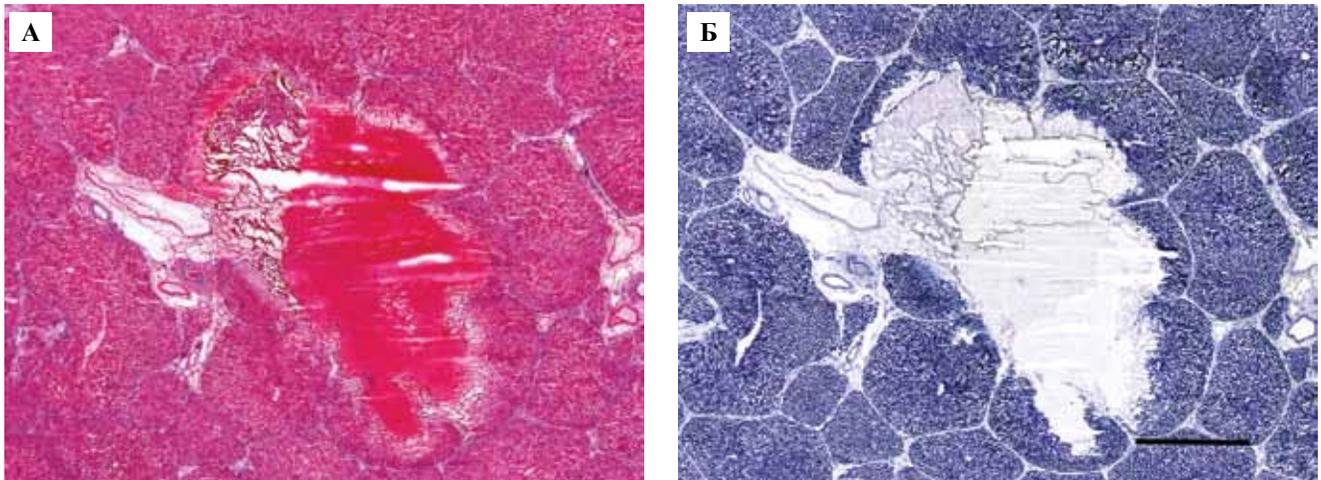


Рис. 1. Полное отсутствие окраски на NADH-d (Б) в центре повреждения печени свиньи при смешанном механическом и тепловом режиме воздействия мощным фокусированным ультразвуком. Часть фокуса повреждения сохраняет окраску на NADH-d, что свидетельствует о механическом разрушении, в то время как в центральной части окраска отсутствует (термическое разрушение). Криостатные срезы печени, окраска гематоксилином и эозином (А) и окраска на NADH-d (Б). Длина маркерной линии 500 мкм

по-видимому, являются результатом кристаллизации льда. Можно отметить четкую границу разделения поврежденной и неповрежденной ткани (рис. 2 В). В фокальной области при большом увеличении отмечаются отдельные сохраненные ядра гепатоцитов, однако они выглядят пикнотичными. Можно предположить, что при данном режиме происходит высвобождение большого количества нуклеаз и других активных веществ из разрушенных органелл и ядер, что может приводить к фрагментации ядер [16]. Таким образом, изменения в ядрах, сохранивших целостность в разжиженной ткани после гистотрипсии с кипением, открывают большие возможности для нового неинвазивного терапевтического подхода в лечении рака [14].

Стоит также отметить появление очагов лейкоцитарной инфильтрации в перифокальной области через 2 часа после воздействия (рис. 3), что, очевидно, является воспалительным ответом на альтерацию, вызванную ультразвуковым разрушением. Подобные ранние проявления воспалительной реакции в виде появления нейтрофилов также отмечались спустя час после ишемического повреждения почки [17], как и в четырехглавой мышце бедра через 45 минут после тренировки на беговой дорожке у испытуемых при 16-градусном отрицательном уклоне (3 раза по 15 минут с 5-минутным перерывом) [7].

*Режим со смешанным механическим и тепловым разрушением (100 мс, 0,1 Гц).* В области фокуса отмечались признаки теплового воздействия, однако основная область разрушения выглядела, как при режиме с чисто механическим разрушением. Следует сказать, что тепловое разрушение в той или иной степени всегда присутствует, задача в том, чтобы его минимизировать. В данном режиме в основном имеет место механическое разрушение с наличием островков теплового

(рис. 2 Г, Д). Области механического разрушения выглядят, как некие тяжи с промежутками между ними, в то время как тепловое разрушение представлено однородной эозинофильной областью. Это различие, по всей видимости, обусловлено тем, что механическое разрушение в большой степени представлено жидкой фазой, при криофиксации которой образуются кристаллы льда, что и обуславливает ее сетчатую структуру, в то время как тепловое разрушение представлено твердой фазой, что подтверждается макроскопически. Так же, как и при чисто механическом ультразвуковом разрушении, в фокусе отмечается наличие пикнотических ядер (рис. 2 Д). Следует особо отметить увеличение демаркационной зоны, отделяющей фокус разрушения от интактной ткани печени в перифокальной области (рис. 2 Е) с наличием значительного увеличения межклеточных пространств между гепатоцитами.

*Режим чисто теплового разрушения (однократное непрерывное облучение длительностью 500 мс).* При таком режиме наблюдается полная инактивация в фокусе фермента NADH-d, свидетельствующая о тепловом разрушении ткани. Макроскопически содержимое фокуса выглядит жестким и вакуолизированным, свойственным для теплового некроза. Хотя именно такой режим сейчас используется клинически, его недостатком является развитие теплового некроза с появлением трудно метаболизирующихся продуктов и развитием склероза ткани, что затрудняет процесс реабилитации после лечения. Видно, что фокус повреждения представлен в основном эозинофильным содержимым с наличием отдельных встречающихся ядер гепатоцитов (рис. 2 Ж, З). Таким образом, более длительное тепловое воздействие ультразвука меньшей амплитуды оказалось достаточным для денатурации цитоплазматических белков, но недостаточным для

их деструкции. Перифокальная зона в данном случае также существенно шире, чем при механическом разрушении (рис. 2 И), со значительным расширением межклеточных пространств.

### Заключение

В настоящее время развиваются методы неинвазивной ультразвуковой деструкции тканей и клеток с целью лечения таких распространенных заболеваний

как злокачественные новообразования разных тканей – печени, почек, головного мозга, предстательной железы и т.д. Новый метод, разработанный недавно учеными университета штата Вашингтон в Сиэтле и физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, основан на использовании мощного импульсного ультразвукового излучения, которое приводит к механическому разрушению ткани без эффектов теплового повреждения. Этот метод на-

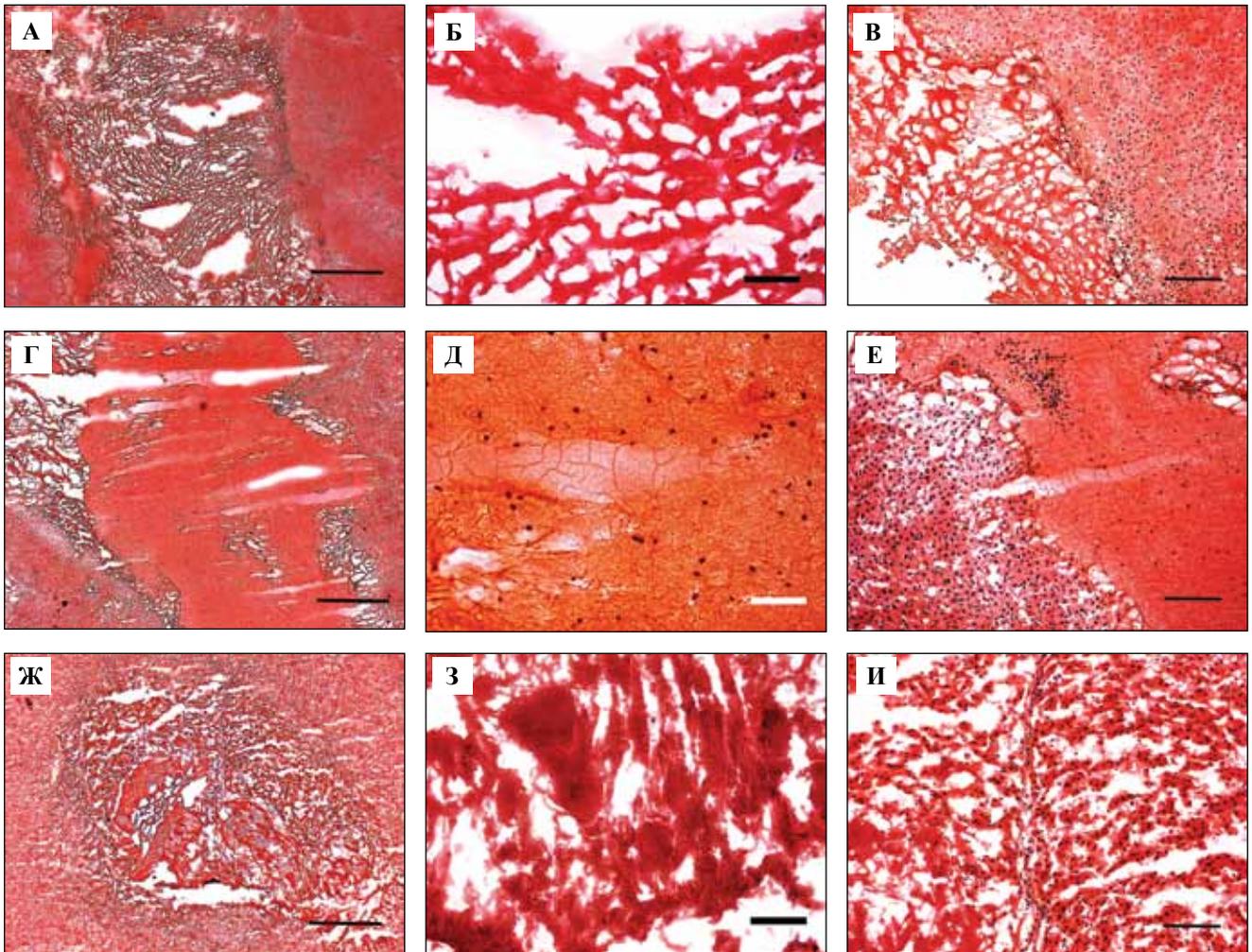


Рис. 2. Разрушение ткани печени свиней при разных режимах воздействия мощным фокусированным ультразвуком.

Окраска гематоксилином и эозином. Длина маркерной линии 500 мкм (А, Г, Ж), 50 мкм (Б, Д, З) и 100 мкм (В, Е, И).

Верхний ряд – фокус разрушения (А и Б) и перифокальная область (В) при механическом режиме воздействия ультразвука (10 мс, 1 Гц) на печень свиньи. Сетевидная структура фокуса обусловлена кристаллизацией льда при криофиксации (А). При большом увеличении в фокусе видны сохранившиеся ядра гепатоцитов (Б). В перифокальной области видна четкая граница между зоной разрушения и практически нормальной структурой печени (В).

Средний ряд – фокус разрушения (Г и Д) и перифокальная область (Е) при смешанном механическом и тепловом режиме воздействия ультразвука (100 мс, 0,1 Гц) на печень свиньи. Можно видеть области как механического, так и теплового разрушения. Перифокальная область не имеет столь выраженной четкой границы, как при механическом разрушении (Е).

Отмечаются значительные увеличения межклеточных пространств.

Нижний ряд – фокус разрушения (Ж и З) и перифокальная область (И) при тепловом воздействии ультразвука на печень свиньи (однократное непрерывное облучение длительностью 500 мсек). В этом режиме происходит преимущественно тепловое разрушение ткани печени. Фокус разрушения представлен эозинофильным содержимым с наличием сохранившихся ядер гепатоцитов (или их фрагментов) (З). В перифокальной области также отсутствует четкая граница и отмечаются увеличенные межклеточные пространства (И)

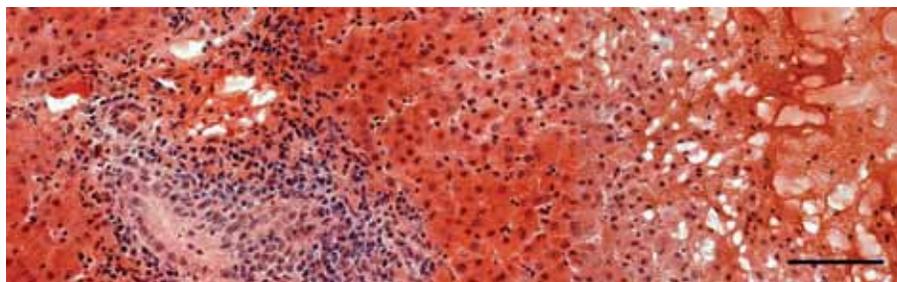


Рис. 3. Лейкоцитарная инфильтрация в перифокальной области при механическом воздействии (10 мсек, 1 Гц) на печень свиньи. В правой части отчетливо виден фокус разрушения. Длина маркерной линии 50 мкм

звали гистотрипсией с кипением и активно изучают с целью дальнейшего клинического использования.

В настоящей работе представлены данные светоптического исследования разных режимов импульсного воздействия высокоинтенсивного ультразвука на печень свиней *in vivo*. Показано, что при механическом режиме воздействия без видимого теплового повреждения происходит полная деструкция ткани в очаге поражения с очень узкой демаркационной зоной и сохранной структурой вне зоны воздействия. Тем не менее на световом уровне сложно сказать о степени разрушения. Для детализации этого в дальнейшем планируется провести электронномикроскопическое исследование тканей при различных режимах. По-видимому, это также позволит прояснить вопрос об изменениях в уцелевших ядрах. Очень важным направлением для будущих исследований является изучение отсроченных реакций организма на разные режимы ультразвуковой абляции. Следует также сказать, что по чувствительности к разрушающему воздействию ультразвука ткани сильно различаются, что тоже потребует исследований для отработки оптимальных режимов облучения для различных клинических применений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-02-00653 и гранта научной школы № НШ-7062.201.

### Литература

1. Пономарчук Е.М., Буравков С.В., Ванг Я.-Н., Хохлова Т.Д., Хохлова В.А. Морфологический анализ разрушений биологической ткани при облучении мощными фокусированными ультразвуковыми импульсами с ударными фронтами // Ученые записки физического факультета Московского университета. 2016. № 6. С. 164004.
2. Хохлова В.А., Ванг Я.-Н., Буравков С.В., Максвелл А.Д., Хохлова Т.Д., Лин Д.В., Сапожников О.А., Бэйли М.Р., Шейд Д.Р. Гистологический анализ механических разрушений в *ex vivo* почках человека и свиньи под действием высокоинтенсивного фокусированного ультразвука // Ученые записки физического факультета Московского университета. 2014. № 5. С. 145343.
3. Anzidei M., Napoli A., Sandolo F. et al. Magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation in abdominal moving organs: a feasibility study in selected cases of pancreatic and liver cancer // *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2014;37:1611–7.
4. Canney M.S., Khokhlova V.A., Bessonova O.V., Bailey M.R., Crum L.A. Shock-induced heating and millisecond boiling in gels and tissue due to high intensity focused ultrasound // *Ultrasound in Med. and Biol.* 2010;36(2):250. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2009.09.010.
5. Dickinson L., Arya M., Afzal N., Cathcart P., Charman S.C., Cornaby A. et al. Medium-term outcomes after whole-gland high-intensity focused ultrasound for the treatment of nonmetastatic prostate cancer from a multicentre registry cohort // *European Urology.* 2016;70(4):668–74.
6. Dubinsky T.J., Cuevas C., Dighe M.K., Kolokythas O., Hwang J.H. High-intensity focused ultrasound: Current potential and oncologic applications // *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190(1):191–9.
7. Fielding R.A., Manfredi T.J., Ding W., Fiataroni M.A., Evans W.J., Cannon J.G. Acute phase response in exercise III. Neutrophil and IL-1 $\beta$  accumulation in skeletal muscle // *Am J Physiol.* 1993;265(1):R166–72.
8. Khokhlova T.D., Hwang J.H. HIFU for palliative treatment of pancreatic cancer // *J. Gastrointest. Oncol.* 2011;2:175–84.
9. Khokhlova T.D., Wang Y.N., Simon J.C., Cunitz B.W., Starr F., Paun M., Crum L.A., Bailey M.R., Khokhlova V.A. Ultrasound-guided tissue fractionation by high intensity focused ultrasound in an *in vivo* porcine liver model // *PNAS.* 2014;111:8161–6.
10. Khokhlova V.A., Fowlkes J.B., Roberts W.W., Schade G.R., Xu Z., Khokhlova T.D., Hall T.L., Maxwell A.D., Wang Y.N., Cain C.A. Histotripsy methods in mechanical disintegration of tissue: Towards clinical applications // *Int J Hyperthermia.* 2015;31(2):145–62.
11. Neumann R.A., Knobler R.M., Pieczkowski F., Gebhard W. Enzyme histochemical analysis of cell viability after argon laser-induced coagulation necrosis of the skin // *J Am Acad Dermatol.* 1991;25:991–8.
12. Orsi F., Zhang L., Arnone P. et al. High-intensity focused ultrasound ablation: effective and safe therapy for solid tumors in difficult locations // *AJR Am J Roentgenol.* 2010;195:W245–52.
13. Psutka S.P., Feldman A.S., McDougal W.S., McGovern F.J., Mueller P., Gervais D.A. Long-term oncologic outcomes after radiofrequency ablation for T1 renal cell carcinoma // *Euro Urol.* 2013;63(3):486–92.
14. Saliev T., Loreto B., Feril L.B. Jr., Nabi G., Melzer A. Targeted manipulation of apoptotic pathways by using High Inten-

- sity Focused Ultrasound in cancer treatment // *Cancer Letters*. 2013;338:204–8.
15. Simon J.C., Sapozhnikov O.A., Khokhlova V.A., Wang Y.-N., Crum L.A., Bailey M.R. Ultrasonic atomization of tissue and its role in tissue fractionation by high intensity focused ultrasound // *Phys Med Biol*. 2012;57(23):8061–78.
  16. Toné S., Sugimoto K., Tanda K. et al. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis // *Exp Cell Res*. 2007;313(16):3635–44.
  17. Ysebaert D.K., De Greef K.E., Vercauteren S.R. et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury // *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1562–74.
  18. Wang Y.-N., Khokhlova T.D., Bailey M.R., Hwang J.H., Khokhlova V.A. Histological and biochemical analysis of mechanical and thermal bioeffects in boiling histotripsy lesions induced by high intensity focused ultrasound // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2013;39(3):424–38.

## MORPHOLOGICAL PICTURE OF PIG LIVER DAMAGE AFTER HIGH INTENSITY FOCUSED ULTRASOUND TREATMENT (HIFU) *IN VIVO*

*S.V. Buravkov, E.M. Ponomarchuk, T.D. Khokhlova, Yak-Nam Wang, V.A. Khokhlova*

This paper presents the results of morphological analysis of lesions generated by high intensity pulsed focused ultrasound (HIFU) in the porcine liver *in vivo* under different sonication parameters. After exposure, the tissue samples were rapidly cryofixed, sections were stained with hematoxylin-eosin and nitro blue tetrazolium chloride to reveal the activity of NADH-diaphorase for identification of the thermal destruction zone. The damaged focus area and adjacent perifocal region were histologically evaluated for three modes of sonication: with mainly mechanical disruption, with combined mechanical and thermal damage, and with predominantly thermal ablation. It is shown that treatment with a primary mechanical damage has more clear demarcation zone, unlike other modes. The problems of rehabilitation after HIFU using different modes, inflammatory response to ultrasound mechanical ablation, nuclei changes of hepatocytes in the mechanical lesion, and prospects for further experiments are discussed.

*Key words:* high intensity focused ultrasound, HIFU, porcine liver histology, thermal ablation

### Информация об авторах

Сергей Валентинович Буравков – докт. мед. наук, ведущий научный сотрудник кафедры экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 117192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 31, корп. 5. E-mail: sergey@wolf.ru

Пonomарчук Екатерина Максимовна – студентка 3-го курса физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2. E-mail: msu.ekaterina.ponomarchuk@gmail.com

Хохлова Татьяна Дмитриевна – канд. физ.-мат. наук, ассистент департамента гастроэнтерологии медицинской школы университета штата Вашингтон, Сиэтл, США. E-mail: tdk7@uw.edu

Як-Нам Ванг – Ph.D., старший научный сотрудник Центра промышленного и медицинского ультразвука Университета штата Вашингтон, Сиэтл, США. E-mail: ynwang@u.washington.edu

Хохлова Вера Александровна – докт. физ.-мат. наук, доцент кафедры акустики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2. E-mail: vera@acs366.phys.msu.ru

*Материал поступил в редакцию 23 марта 2017 года*