

ПИЛОТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ ПО НЕИНВАЗИВНОЙ НЕТЕПЛОВОЙ ДЕСТРУКЦИИ МУЦИНОЗНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА *EX VIVO* МЕТОДОМ ГИСТОТРИПСИИ С КИПЕНИЕМ

Е.М.Пономарчук¹, С.А.Цысарь¹, Д.Д.Чупова¹, П.А.Пестова¹, А.В.Квашенникова¹,
Н.В.Данилова¹, П.Г.Мальков¹, А.Л.Черняев^{2,3}, С.В.Буравков¹, В.А.Хохлова¹

¹МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ;

²ФГБУ НИИ пульмонологии ФМБА России, Москва, РФ;

³НИИМЧ им. акад. А.П.Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В.Петровского, Москва, РФ

Представлены результаты пилотного эксперимента, демонстрирующие возможность неинвазивной нетепловой деструкции муцинозной карциномы молочной железы человека *ex vivo* с помощью мощного импульсного фокусированного ультразвука методом гистотрипсии с кипением. Воздействие на целевой объём проводилось путём фокусировки последовательности 20 ультразвуковых импульсов с частотой 1.5 МГц, мощностью в импульсе 517 Вт, амплитудой ударного фронта в фокусе 103 МПа, длительностью 10 мс и периодом следования импульсов 1 с в каждый узел объёмной сетки 4×4×1 мм. Облучение визуализировалось с помощью УЗИ в В-режиме, полное время воздействия составило 21 мин. Гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином и по Массону показало отсутствие опухолевых комплексов в целевой области, подтверждающее деструкцию раковых клеток и их ядер в результате гистотрипсии с кипением.

Ключевые слова: медицинский ультразвук; рак молочной железы; гистотрипсия; неинвазивная хирургия

Высокоинтенсивный фокусированный ультразвук (high-intensity focused ultrasound — HIFU) широко применяется в решении задач неинвазивной хирургии [1] как альтернатива хирургическому вмешательству и малоинвазивным методам тепловой абляции, в том числе для лечения опухолей молочной железы [2,3]. Клинически используемые HIFU-методы основаны на тепловом воздействии ультразвука, вызывающем тепловой некроз ткани в фокусе ультразвукового пучка. Несмотря на успехи, они имеют определённые ограничения: диффузия тепла за пределы фокального пятна снижает точность абляции, надёжный контроль теплового воздействия возможен только с помощью методов МРТ, а рассасывание плотного объёма некротизированной ткани занимает долгое время [1]. Для преодоления этих ограничений в последнее время развивается новый HIFU-метод — гистотрипсия [4]. Метод позволяет механически

разрушать целевой объём ткани путём фокусировки более интенсивных (порядка 1 кВт/см²) коротких импульсов с ударными фронтами в фокусе, инициирующих эффекты кавитации, кипения и атомизации ткани в фокусе [4]. При этом кавитационные пузыри и паровые полости кипения в процессе воздействия являются сильными рассеивателями ультразвука, гиперэхогенными при УЗИ-визуализации в В-режиме во время облучения, а разрушенная в фокусе ткань становится жидкой и лишённой рассеивателей, поэтому предстаёт гипоехогенной на УЗИ после окончания процедуры и может быть легче и быстрее выведена из организма. Отмечается также, что метод гистотрипсии способен вызывать иммунный отклик организма в результате высвобождения антигенов опухоли в кровотоки и запускать таким образом процесс борьбы с прогрессированием новообразования [5]. В частности, один из видов гистотрипсии — гистотрипсия с кипением (ГК) — обладает рядом преимуществ перед другими видами и основан на использовании мощных импульсов миллисекундной длительности, вызывающих локальное вскипание

Адрес для корреспонденции: ponomarchuk.em14@physics.msu.ru. Пономарчук Е.М.

DOI 10.47056/1814-3490-2024-1-21-25

ткани в фокусе в течение каждого импульса и её механическое разрушение на субклеточные фрагменты [4].

В настоящее время метод ГК развивается для многих клинических приложений [4], в том числе для лечения РМЖ [6], однако до сих пор возможность механического разрушения РМЖ человека методами ГК не была продемонстрирована экспериментально.

Цель данной работы — проведение пилотного эксперимента по разрушению РМЖ человека *ex vivo* методом ГК.

Методика исследования

В качестве образца раковой опухоли молочной железы использовался аутопсийный материал от женщины 89 лет размером 5×6×6 см, полученный через 14 ч после смерти (согласие этического комитета не требуется). От аутопсийного образца опухоли отсекали часть (4.5×4×2.5 см) с сохранением окружающей жировой ткани молочной железы (рис. 1, а, б), через которую позже проводилось облучение. Образец опухоли погружали в PBS, подвергали двум циклам чередования дегазации (по 30 мин) и компрессии (по 15 мин), затем только дегазации в течение 1 ч и заключали в акустически прозрачный гель из 1.5% агарозы (UltraPure Agarose, Invitrogen) для удобства позиционирования образца при облучении.

Для ГК-воздействия образец опухоли в агарозном геле помещали в держатель, прикреплён-

ный к трёхмерной системе позиционирования (UMS3, Precision Acoustics), и погружали в бассейн с дегазированной водой, поддерживаемой при температуре 34°C (рис. 1, в). Облучение проводили с помощью фокусированного 12-элементного секторного ультразвукового излучателя с частотой 1.5 МГц, фокусным расстоянием 6 см, внешним диаметром 8 см и диаметром центрального отверстия 2 см. Излучатель ранее использовался в успешно проведённых экспериментах по гистотрипсии аденокарциномы предстательной железы человека *ex vivo* [7]. Планирование и контроль воздействия в режиме реального времени осуществляли с помощью УЗИ-датчика L7-4 (ATL, Philips), расположенного сбоку от образца. Плоскость визуализации совпадала с осью ГК-излучателя, а её центр был расположен в фокальной плоскости излучателя (рис. 1, в).

Целевой объём в образце опухоли облучался путём воздействия на узлы трёхмерной сетки, состоящей из двух слоёв, перпендикулярных оси излучателя, по 5×5 узлов в каждом слое с шагом 1 мм (рис. 1, в). Каждый узел облучался 20 импульсами, длительностью 10 мс каждый, с коэффициентом скважности 1% (т.е. с периодом следования импульсов 1 с). Такой режим типичен для ГК и позволяет избежать накопления тепла в целевом объёме [4]. Средняя глубина расположения фокуса в образце опухоли — $d=1$ см.

Уровень электрического напряжения на излучателе, необходимый для разрушения ткани

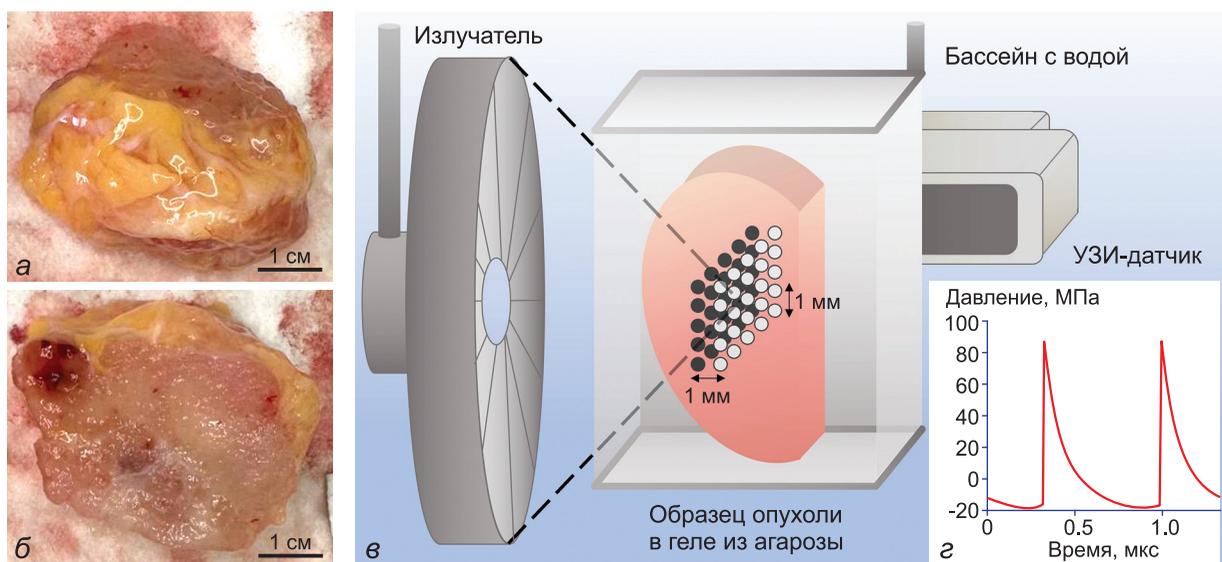


Рис. 1. Макроскопические фотографии аутопсийного образца опухоли молочной железы человека со стороны облучения (а) и противоположной облучению (б). Схема экспериментальной установки по получению объёмных разрушений в образце опухоли молочной железы *ex vivo* (в). Численно предсказанные два периода ультразвукового импульса в фокусе воздействия на средней глубине внутри образца опухоли молочной железы *ex vivo* (з).



РМЖ, определяли перед облучением путём фокусировки одиночных 10 мс импульсов в образец опухоли при увеличении напряжения до порогового значения ($U_0=160$ В), при котором появлялось гиперэхогенное пятно на УЗИ, указывающее на инициацию кипения ткани в фокусе. Облучение целевого объёма затем проводили при напряжении $U=200$ В, соответствующем акустической мощности в импульсе 517 Вт и превышающем пороговое напряжение U_0 на 25% для надёжного обеспечения деструкции ткани РМЖ. Оценку пиковых уровней акустического давления и амплитуды ударного фронта *in situ* при выбранном напряжении осуществляли с помощью численного моделирования в программном комплексе HIFU beam в плоскослоистой среде "вода—молочная железа" аналогично работе [7]. При моделировании использовали данные для акустических свойств ткани молочной железы [8,9]: скорость звука $c=1468$ м/с, плотность $\rho=1025$ кг/м³, коэффициент нелинейности $\beta=5.925$, коэффициент диффузии звука $\delta=4.33$ мм²/с, коэффициент поглощения $\alpha=0.11$ Нп/см на частоте 1.5 МГц, с показателем степени зависимости поглощения от частоты $\nu=1.1$. Рассчитанная таким образом форма ультразвуковой волны в фокусе пучка на средней глубине *in situ* приведена на рисунке 1, г. Полученные параметры волны в фокусе: пиковое положительное и отрицательное давления 87 и -19 МПа соответственно, амплитуда ударного фронта 103 МПа. Следуя стандартному методу расчёта нагрева ткани за счёт поглощения энергии ультразвуковых волн на ударных фронтах [4,10], получили, что при теплоёмкости единицы объёма ткани молочной железы $c_v=2.72$ МДж/(м³×К) [9] кипение в ткани достигается в течение 0.5 мс, т.е. внутри каждо-

го 10 мс импульса, что является необходимым условием метода ГК.

После окончания ГК-воздействия образец опухоли извлекали из агарозного геля, на его поверхности со стороны облучения отмечали ориентацию плоскости УЗИ-визуализации с помощью гистологических чернил (HistoSafe). Образец фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Labiko) в течение 4 нед, после чего разрезали на блоки толщиной 2 мм параллельно плоскости визуализации. Полученные блоки проводили в спиртах восходящей концентрации, парафинировали, иссекали на срезы толщиной 3 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином и по Массону. Полученные гистологические препараты анализировали два независимых эксперта-патологоанатома (инициалы Д.Н.В. и М.П.Г.) для определения гистологического типа опухоли и оценки результата ГК-воздействия.

Результаты исследования

До начала облучения образец опухоли молочной железы имел неоднородную экзогенность на УЗИ с гиперэхогенной окружающей жировой тканью молочной железы, через которую затем проводилось облучение (рис. 2, а). В процессе ГК-воздействия в фокусе пучка наблюдали появление гиперэхогенной области на УЗИ (рис. 2, б), типичной для метода ГК и указывающей на формирование пузырей кипения в месте воздействия. Облучение целевого объёма выполнялось в течение 21 мин, после чего в зоне воздействия наблюдали гипоэхогенную область на УЗИ (рис. 2, в), указывающую на ликвидацию ткани в результате ГК-воздействия. После фиксации образца в формалине при разрезе вдоль

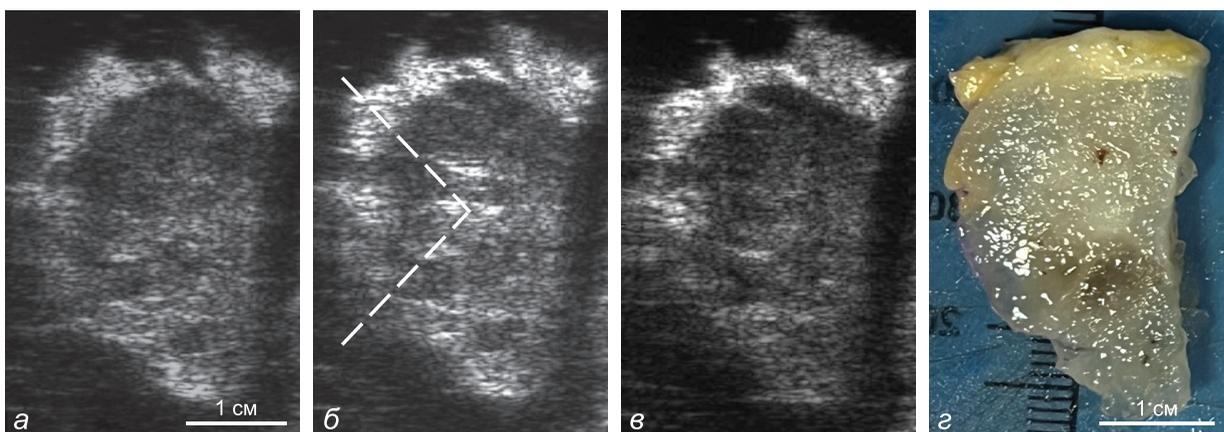


Рис. 2. УЗИ-снимки образца опухоли молочной железы *ex vivo* до (а), во время (б) и после (в) ГК-воздействия (пунктиром указана геометрия схождения ультразвукового пучка). Макропрепарат образца опухоли с ГК-разрушением, разрезанный вдоль плоскости УЗИ-визуализации после фиксации в формалине (г).

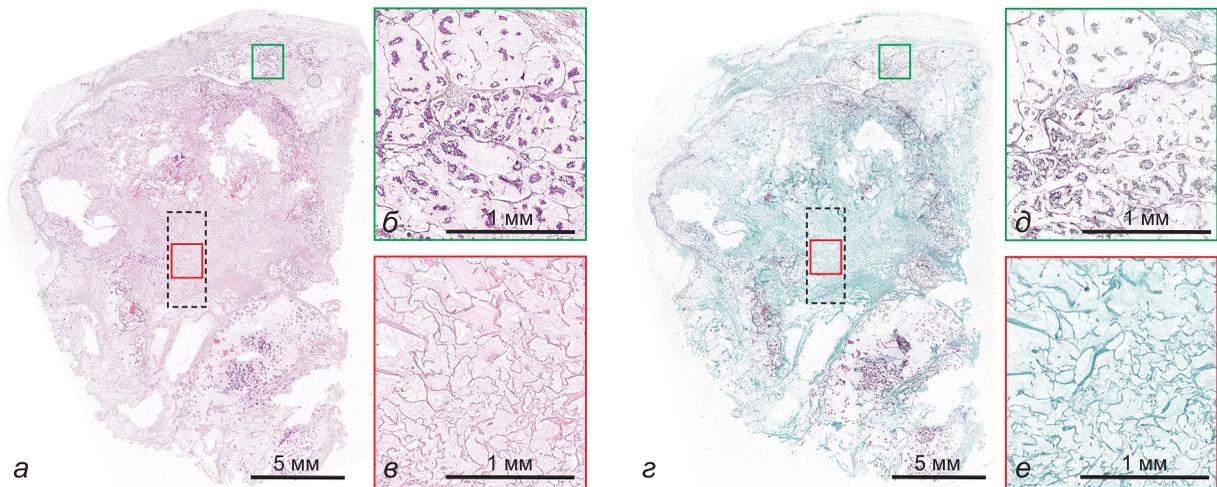


Рис. 3. Гистопрепараты муцинозной карциномы молочной железы человека с объёмным ГК-разрушением в центре. Окрашивание гематоксилином и эозином (а-е) и по Массону (з-е), объектив 20х.

Обзорный срез всего образца (а, з), область вне (б, д) и внутри (в, е) разрушения под большим увеличением. Пунктиром обозначена область ожидаемого разрушения (а, з).

плоскости визуализации наблюдали светлое пятно в области воздействия (рис. 2, з).

Гистологическое исследование образца опухоли молочной железы (рис. 3) вне области воздействия подтвердило наличие муцинозной (коллоидной) карциномы молочной железы: в фиброзной строме располагались крупные поля муцина ("озера слизи"), содержащие опухолевые комплексы криброзного и гнездового строения (рис. 3, б, д) [11, 12]. В области воздействия наблюдали повреждение фиброзных перегородок и отсутствие опухолевых комплексов (рис. 3, в, е), что свидетельствует о положительном эффекте ГК-воздействия, так как указывает на деструкцию злокачественных клеток и их ядер. Область, обеднённая опухолевыми комплексами, оказалась несколько больше зоны ожидаемого разрушения (рис. 3, а, з), что, вероятно, связано с подвижностью слизистой структуры опухоли во время облучения. Аналогичный эффект наблюдали при ГК-разрушении образцов гематом человека *in vitro* [10].

В результате проведённого эксперимента впервые показана возможность неинвазивного нетеплового (механического) разрушения целевого участка карциномы молочной железы человека *ex vivo* с помощью высокоинтенсивного импульсного ультразвукового воздействия методом ГК. Показана возможность планирования и контроля процесса разрушения *ex vivo* с помощью УЗИ-визуализации, что демонстрирует потенциал ГК как альтернативы тепловому HIFU-методу лечения РМЖ, более доступной и контролируемой методами УЗИ.

На основе полученных результатов планируется дальнейший набор статистики, а также от-

работка и оптимизация протоколов воздействия с целью развития метода ГК и его последующего использования в клинической практике.

Авторы выражают благодарность Т.И. Миленкович за помощь в подготовке образцов для облучения и С.А. Усмановой за подготовку гистологических препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФ (грант № 20-12-00145) и стипендии фонда "БАЗИС" (№ 20-2-10-10-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Elhelf I.A.S., Albahar H., Shah U., Oto A., Cressman E., Almekkawy M. High intensity focused ultrasound: The fundamentals, clinical applications and research trends // *Diagn. Interv. Imaging*. 2018. Vol. 99, N 6. P. 349-359. doi: 10.1016/j.diii.2018.03.001
2. Dahan M., Cortet M., Lafon C., Padilla F. Combination of focused ultrasound, immunotherapy, and chemotherapy: new perspectives in breast cancer therapy // *J. Ultrasound Med*. 2023. Vol. 42, N 3. P. 559-573. doi: 10.1002/jum.16053
3. Peek M.C.L., Wu F. High-intensity focused ultrasound in the treatment of breast tumours // *Ecancermedalscience*. 2018. Vol. 12. ID 794. doi: 10.3332/ecancer.2018.794
4. Williams R.P., Simon J.C., Khokhlova V.A., Sapozhnikov O.A., Khokhlova T.D. The histotripsy spectrum: differences and similarities in techniques and instrumentation // *Int. J. Hyperthermia*. 2023. Vol. 40, N 1. ID 2233720. doi: 10.1080/02656736.2023.2233720
5. Hendricks-Wenger A., Hutchison R., Vlaisavljevich E., Allen I.C. Immunological effects of histotripsy for cancer therapy // *Front. Oncol*. 2021. Vol. 11. ID 681629. doi: 10.3389/fonc.2021.681629
6. Pahk K.J., Shin C.H., Bae I.Y., Yang Y., Kim S.H., Pahk K., Kim H., Oh S.J. Boiling histotripsy-induced partial mechanical ablation modulates tumour microenvironment



- by promoting immunogenic cell death of cancers // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, N 1. ID 9050. doi: 10.1038/s41598-019-45542-z
7. *Rosnitskiy P.B., Tsysar S.A., Karzova M.M., Buravkov S.V., Malkov P.G., Danilova N.V., Ponomarchuk E.M., Sapozhnikov O.A., Khokhlova T.D., Schade G.R., Maxwell A.D., Wang Y.N., Kadrev A.V., Chernyaev A.L., Okhobotov D.A., Kamalov A.A., Khokhlova V.A.* Pilot ex vivo study on non-thermal ablation of human prostate adenocarcinoma tissue using boiling histotripsy // *Ultrasonics*. 2023. Vol. 133. ID 107029. doi: 10.1016/j.ultras.2023.107029
 8. *Duck F.A.* Acoustic properties of tissue at ultrasound frequencies // *Physical properties of tissue*. London, 1990. P. 73-135. doi: 10.1016/B978-0-12-222800-1.50008-5
 9. *Hasgall P.A., Di Gennaro F., Baumgartner C., Neufeld E., Lloyd B., Gosselin M.C., Payne D., Klingensböck A., Kuster N.* IT'IS Database for thermal and electromagnetic parameters of biological tissues, Version 4.1, Feb 22, 2022, doi: 10.13099/VIP21000-04-1. itis.swiss/database
 10. *Ponomarchuk E.M., Rosnitskiy P.B., Khokhlova T.D., Buravkov S.V., Tsysar S.A., Karzova M.M., Tumanova K.D., Kunturova A.V., Wang Y.N., Sapozhnikov O.A., Trakhtman P.E., Starostin N.N., Khokhlova V.A.* Ultrastructural analysis of volumetric histotripsy bio-effects in large human hematomas // *Ultrasound Med. Biol.* 2021. Vol. 47, N 9. P. 2608-2621. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.05.002
 11. *WHO Classification of Tumours*, 4th Edition, Volume 4 / Eds S.R.Lakhani, I.O.Ellis, S.J.Schnitt, P.H.Tan, M.J. van de Vijver. Lyon, 2012.
 12. *Зикиряходжаев А.Д., Сарибекян Э.К., Волченко Н.Н., Расказова Е.А., Суркова В.С., Идигова Р.М., Босиева А.Р.* Особенности дифференциальной диагностики слизистого и слизистого микропапиллярного рака молочной железы // *Онкология. Журнал им. П.А.Герцена*. 2019. Т. 8, № 6. С. 428-432. doi: 10.17116/onkolog20198061428

Получено 18.01.24