

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Петрищев Н.Н.¹, Семенов Д.Ю.¹, Цибин А.Ю.¹, Юкина Г.Ю.¹,
Беркович А.Е.², Бурсиан А.А.², Белянкин А.Б.², Сенчик К.Ю.²

Влияние выключения кровотока на характер повреждения вен при воздействии HIFU

¹ ФГБОУ ВО Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Л. Толстого, д. 6-8

² ФГАУ ВО Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург, Россия, Политехническая ул., д. 29

Цель — изучение в эксперименте влияния частичного выключения кровотока на развитие структурных изменений в стенке задней полой вены после воздействия высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (high-intensity focused ultrasound, HIFU). **Методика.** Параметры и режим воздействия: частота 1,65 МГц, интенсивность ультразвука в фокусе 13,6 кВт/см², площадь фокального пятна 1мм², воздействие непрерывное, длительность воздействия 3 с. **Результаты.** Сразу после HIFU воздействия во всех отделах стенки вены наблюдались характерные признаки термического повреждения. Через 1 нед. после облучения в той части вены, в которой сохранялся кровоток, структурные изменения в интиме, меди и адвентиции были минимальны, а через 4 нед. отсутствовали. В изолированном участке вены через неделю после воздействия HIFU наблюдалась частичная деэндотелизация, разрушение миоцитов, дезорганизация и консолидация коллагеновых волокон в адвентиции; через 4 нед. эндотелиальный слой восстанавливался, признаки повреждения меди и адвентиции сохранялись, но были менее выражены, чем через 1 нед. после облучения. **Заключение.** Выключение кровотока после воздействия на вену HIFU способствует развитию более стойких изменений в стенке вены. Компрессия вен, по-видимому, необходима для развития облитерации, при использовании HIFU-технологии.

Ключевые слова: высокоинтенсивный фокусированный ультразвук; вены; эндотелий; коллаген.

Для цитирования: Петрищев Н.Н., Семенов Д.Ю., Цибин А.Ю., Юкина Г.Ю., Беркович А.Е., Бурсиан А.А., Белянкин А.Б., Сенчик К.Ю. Влияние выключения кровотока на характер повреждения вен при воздействии HIFU. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 46—50.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.46-50

Для корреспонденции: Петрищев Николай Николаевич, доктор мед. наук, проф., Руководитель центра лазерной медицины ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: lasmed@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение о предоставлении субсидии № 14.578.21.0081 от 28.11.2014 г.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.12.2016

Petrishchev N.N.¹, Semenov D.U.¹, Tsibin A.U.¹, Yukina G.U.¹,
Berkovich A.E.², Bursian A.A.², Belyankin A.B.², Senchik K.U.²

Effekt of blood flow shutdown on the vein damage when exposed to HIFU

¹ FSEIH «PFStPSMU» Federal State Educational Institution of Higher Education «Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University» Russian Ministry of Health, 6-8, Tolstoy Str. St. Petersburg, 197022, Russia

² FSAEI «PGStPPU» Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University», Polytechnical St., 29, St. Petersburg, 195251, Russia

The purpose. In the study we investigated the impact of the partial blood flow shutdown on structural changes in the rabbit vena cava posterior wall after exposure to high-intensity focused ultrasound (HIFU). **Methods.** Ultrasound Exposure: frequency of 1.65 MHz, the ultrasound intensity in the focus of 13.6 kW/cm², the area of the focal spot 1 mm², continuous ultrasound, exposure for 3 seconds. **Results.** Immediately after HIFU exposure all layers of the vein wall showed characteristic signs of thermal damage. A week after exposure structural changes in the intima, media and adventitia was minimal in the part of vessel with preserved blood flow, and after 4 weeks the changes were not revealed. A week after HIFU exposure partial endothelium destruction, destruction of myocytes, disorganization and consolidation of collagen fibers of the adventitia were observed in an isolated segment of the vessel, and in 4 weeks endothelium restored and signs of damage in media and adventitia persisted, but were less obvious than in a week after exposure. **Conclusion.** The shutdown of blood flow after exposure to HIFU promotes persistent changes in the vein wall. Vein compression appears to be necessary for the obliteration of the vessel, when using HIFU-technology.

Keywords: high-intensity focused ultrasound — HIFU; vein; endothelium; collagen.

For citation: Petrishchev N.N., Semenov D.U., Tsibin A.U., Yukina G.U., Berkovich A.E., Bursian A.A., Belyankin A.B., Senchik K.U. Effekt of blood flow shutdown on the vein damage when exposed to HIFU. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal)*. 2017; 61(2): 46—50. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.46-50

For correspondence: Petrishchev N.N., doctor of Medical Sciences, professor, Director of Laser Center Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, 6-8, Tolstoy Str. St. Petersburg, 197022, Russian Federation, e-mail: lasmed@yandex.ru

Information about authors:

Petrishchev N.N., <http://orcid.org/0000-0003-4760-2394>

Semenov D.U., <http://orcid.org/0000-0003-2130-2940>

Tsibin A.U., <http://orcid.org/0000-0002-6345-7038>

Yukina G.U. <http://orcid.org/0000-0001-8888-4135>

Berkovich A.E., <http://orcid.org/0000-0001-5686-2994>

Bursian A.A., <http://orcid.org/0000-0003-1938-3323>

Belyankin A.B. <http://orcid.org/0000-0002-0969-0330>

Senchik K.U., <http://orcid.org/0000-0002-7562-8885>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (grant agreement № 14.578.21.0081 from 11.28.2014 г.)

Received 05.12.2016

Введение

В настоящее время для лечения варикозной болезни вен нижних конечностей широко применяются малоинвазивные методы — склеротерапия, радиочастотная и эндоваскулярная лазерная абляция. Однако даже эти минимально инвазивные методы требуют хирургического вмешательства, не исключая риск таких осложнений как флебиты, кровотечения, тромбоз, тромбоэмболии, изъязвление кожи и др. В последние годы все большее внимание уделяется изучению возможности использования высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (high-intensity focused ultrasound — HIFU) при венозной патологии.

Впервые применение высокоинтенсивного фокусированного ультразвука для индукции окклюзии сосудов путем тепловой коагуляции было показано в 1995 г. Delon-Martin С. и соавт. В экспериментальном исследовании на крысах, бедренные вены которых подвергались воздействию HIFU, авторы наблюдали тромбоокклюзию сосудов при отсутствии каких-либо повреждений окружающих тканей [1]. Окклюзия артерий и вен как эффект воздействия HIFU продемонстрирована и в ряде других экспериментальных исследований [2—4]. В последние годы основное внимание исследователей сконцентрировано на поиске режимов и условий воздействия HIFU на вены, которые позволят использовать эту технологию в клинике [5—9].

Основные механизмы действия HIFU на сосуды включают термические эффекты (нагревание свыше 60°C) и механические, связанные с кавитацией, акустическими микропотоками и т.д. В зависимости от параметров облучения эффекты воздействия HIFU на сосуды могут быть различными: образование окклюдированного и неокклюдированного тромба, разрыв, повреждение отдельных слоев сосудистой стенки без нарушения проходимости, облитерация [10]. HIFU-технология рассматривается как перспективная для лечения варикозной болезни вен, однако не получила широкого применения, так как остаются невыясненными условия определяющие оптимальный эффект [5, 11, 12]. Одним из таких условий является сохранность тока крови в вене, на которую воздействует HIFU.

Цель исследования — изучение влияния выключения кровотока на характер повреждения стенки вены при воздействии HIFU.

Методика

Эксперименты выполнены на кроликах-самцах Шиншилла (масса тела 2,5—3,0 кг). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Исследования проводились в соответствии с правилами лабораторной практики (приказ № 267 МЗ РФ от 19.06.2003) и одобрены локальным Этическим комитетом.

Под эндотрахеальной комбинированной анестезией выполняли верхне-срединную лапаротомию. Все петли тонкой и толстой кишок выводили из брюшной полости влево и укрывали влажной марлевой салфеткой. При этом открывается доступ к задней поллой вене (ЗПВ) на протяжении 4—5 см от нижнего края печени до бифуркации. На этом участке в нее впадают почечные вены, у мест их впадения расположены правый и левый надпочечники. Над ЗПВ рассекали париетальную брюшину, при необходимости остановки кровотока под вену подводили лигатуру. После контроля гемостаза и введения в брюшную полость канамицина рану послойно ушивали глухим швом.

Для визуализации кровотока и воздействия HIFU использовали описанный ранее лабораторный стенд, состоящий из ультразвукового блока (УБ), блока управления, устройства позиционирования [13]. УБ включает ультразвуковой диагностический линейный датчик и фокусирующий сферический силовой излучатель. Акустический контакт между УБ и объектом исследования обеспечивался за счет слоя эхогеля. Органы управления стенда позволяют варьировать длительность и интенсивность силового воздействия. Во всех опытах использовалось напряжение питания генератора силового излучателя 24 В, частота силового излучения 1,65 МГц, интенсивность ультразвука в фокальном пятне составляла 13,6 кВт/см².

Задняя полая вена у кролика обычно имеет диаметр около 10—12 мм, протяженность вены такого диаметра составляет 2—3 см. В процессе эксперимента сначала фокусировали HIFU на задней (дальней) стенке сосуда, а затем на передней (ближней), так как при повреждении передней стенки могут создаться изменения в ней, влияющие на распространение ультразвуковой волны. Учитывая, что HIFU в наших опытах дает точку поражения в фокусе диаметром 1 мм, нанося 25 точек, расположенных в 5 рядах с интервалом 1 мм по 5 точек в ряду с шагом 1 мм, мы повреждали площадку на стенке вены размером 5х5 мм. Две таких площадки, расположенные на задней и передней стенках, составляют 30% площади стенки участка вены, подвергавшегося воздействию.

Подвергнутые воздействию HIFU участки сосудов с окружающими тканями иссекали для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение суток, обезвоживали и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Bio-Optica, Италия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Германия) при увеличении в x100 и x400 раз. Фотосъемку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Результаты и обсуждение

В остром опыте сразу после воздействия HIFU на заднюю полую вену при сохраненном кровотоке наблюдались макроскопические изменения — сужение и побледнение сосуда, просвет сосуда был сохранен, при морфологическом исследовании в месте повреждения выявлены изменения во всех отделах стенки сосуда, мозаично выявлялись участки фибриноидного некроза. Эндотелий и субэндотелиальный слой отсутствовали на всем протяжении. Гладкие миоциты средней оболочки граничили непосредственно с кровью, их цитоплазма была гомогенизирована, границы клеток не прослеживались. Коллагеновые волокна представлялись дезорганизованными и набухшими, местами отмечалась их фрагментация и слипание. Коллагеновые волокна в адвентициальной оболочке также частично фрагментированы.

В хроническом эксперименте нам было необходимо остановить кровоток с целью создания условий для облитерации сосуда. Самый надежный способ остановки кровотока — перевязка сосуда, но при перевязке ЗПВ даже ниже впадения почечных вен кролики погибают. Для решения поставленной задачи выделяли заднюю полую вену в участке с максимальным диаметром сосуда (около 1 см), проводили необходимые экспериментальные действия, в том числе воздействие HIFU, и затем участок стенки сосуда, на которую воздействовали силовым ультразвуком, прошивали на 1/3 просвета на протяжении 1—1,5 см непрерывным швом атравматичной нерассасывающейся нитью 5-0 (prolene). Таким образом, отток крови по ЗПВ сохранялся, однако часть сосуда была выключена из кровотока.

Описанная выше операция была выполнена у 2 интактных кроликов без воздействия HIFU (контроль), 5 кроликам проводили облучение HIFU.

Контрольные кролики хорошо перенесли операцию и в течение 4 нед. наблюдения оставались живы, задние лапы не отекают, что свидетельствует о сохранении оттока крови. Под наркозом выполняли повторную лапаротомию, проводили осмотр задней поллой вены в области операции. В брюшной полости асцитической жидкости не обнаружено, сосуды брюшины не инъецированы, вена до места ушивания не расширена, стенка ее не утолщена, обычного цвета. В зоне ушитой ЗПВ развился спаечный процесс.

При гистологическом исследовании установлено, что в участке вены, с сохраненным кровотоком, эндотелий не изменился, медия представлена двумя слоями гладких миоцитов, в адвентиции волокнистая соединительная ткань с фибробластами и коллагеновыми волокнами без изменений. В изолированном от кровотока участке вен, эндотелий также сохранён, гладкие миоциты средней оболочки и волокнистая соединительная ткань адвентиции без видимых признаков

повреждения. Таким образом, длительное выключение части полых вен из кровотока (4 нед.) не привело к структурным изменениям в стенке сосуда.

Через 1 нед. после воздействия HIFU (опыты на 2 кроликах) в той части вены, в которой кровоток не был нарушен, эндотелий сохранен, гладкие миоциты меди и адвентиция не повреждены (рис. А).

В изолированном после облучения участке вены наблюдалась частичная дезэндотелизация, разрушение миоцитов средней оболочки, дезорганизация и консолидация коллагеновых пучков в адвентициальной оболочке (рис. Б). Несмотря на очевидные проявления повреждения интимы, тромбоз не развивался.

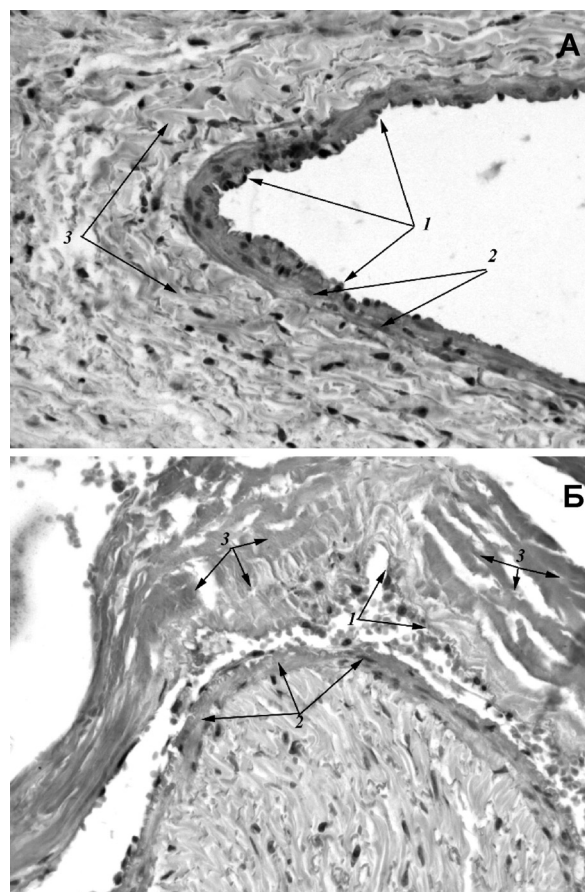
Через 1 мес. после воздействия HIFU на ЗПВ все 5 кроликов также оставались живы. В участке вены с сохранённым кровотоком эндотелий и базальная мембрана сохранены, медиа представлена 2 слоями гладких миоцитов без признаков нарушения. Коллагеновые волокна в адвентиции без видимых признаков дезорганизации. В участке вены с изолированным кровотоком через 1 мес. после воздействия HIFU, эндотелий и базальная мембрана также сохранены, структура гладких миоцитов меди нарушена: отсутствуют четкие границы клеток, ядра клеток не выявляются; коллагеновые волокна дезорганизованы, в некоторых зонах обнаруживается консолидация волокон. В адвентиции определяется незначительная дезорганизация коллагеновых волокон. В просвете этой части сосуда выявляются мелкие тромбы, неизмененные эритроциты. Несмотря на наличие признаков повреждения и спавшиеся стенки сосуда, облитерации вены не наблюдалось. Во всех случаях вокруг шовного материала выявляется периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация с гигантскими многоядерными клетками инородных тел.

Таким образом, в остром периоде после воздействия HIFU на заднюю полую вену кролика мы, как и другие авторы, наблюдали характерные структурные изменения во всех слоях стенки сосуда. Учитывая режим и параметры HIFU-воздействия, а также характер повреждения коллагена (дезорганизация и фрагментация коллагена, консолидация коллагеновых волокон) можно полагать, что в опытах доминировал термический эффект HIFU. Деструктивные изменения в интиме, меди и адвентиции были обратимы и через 1 и 4 нед. после облучения в той части вены, в которой сохранялся кровоток, признаки повреждения были минимальны, в то время, как в изолированном от кровотока участке вены они сохранились, хотя окклюзии не было. Особо следует отметить восстановление эндотелия. Отсутствие выраженного тромбоза, по-видимому, связано с включением физиологических механизмов тромболизиса.

Можно также предположить, что эффект HIFU-воздействия снижается в результате теплоотве-

дения по крови при сохраненном кровотоке. В связи с этим, вероятно, надо либо проводить воздействие на выключенном кровотоке, либо сдвигать точку максимальной температуры в сторону адвентиции.

Вопрос о том, может ли HIFU вызывать окклюзию вен в результате повреждения эндотелия остается открытым. В ряде экспериментальных исследований было показано, что изолированное повреждение эндотелия *in vivo* приводит к тромбозу только при наличии акустической кавитации и гиперкоагуляции. Более того, механическое повреждение эндотелия, индуцированное кавитацией, рассматривается рядом экспериментаторов как основной механизм окклюзии вен под действием HIFU [8, 11]. На наш взгляд, описанный выше, подход к объяснению окклюзирующего действия HIFU на вены не является исчерпывающим.



Участок вены с сохранённым кровотоком (А) и изолированным кровотоком (Б) через 1 нед. после воздействия на сосуд HIFU. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

А — 1 — эндотелий сохранён, 2 — гладкие миоциты меди не повреждены, 3 — адвентиция без признаков повреждения. Б — 1 — эндотелий местами отторгнут, местами сохранён; 2 — гладкие миоциты средней оболочки с одной стороны разрушены, с другой сохранены; 3 — определяется выраженная дезорганизация и консолидация коллагеновых пучков в адвентициальной оболочке; в просвете сосуда выявляются неповреждённые эритроциты.

Термическое действие HIFU на вены вызывает более стойкие изменения, чем только повреждение эндотелия и при определенных условиях, например при выключенном кровотоке, они являются малообратимыми. Именно эти изменения и присоединяющееся воспаление лежат в основе ремоделирования стенки вен, приводящего к окклюзии. Тромбообразование лишь способствует этому процессу. Сужение и уплотнение вены после воздействия HIFU может создать более благоприятные условия для функционирования венозных клапанов [5].

Задачи дальнейших исследований мы видим в оптимизации соотношения термического и механического эффектов HIFU для обеспечения эффективного воздействия на коллагеносодержащие структуры и эндотелий стенки вены.

Заключение

Сохранность кровотока влияет на степень выраженности структурных изменений в стенке вен после воздействия высокоинтенсивного фокусированного ультразвука. В изолированном от кровотока участке вены признаки повреждения миоцитов и дезорганизации коллагеновых волокон выявлялись через 4 нед. после облучения. Компрессия вен, по-видимому, необходима для развития облитерации при использовании HIFU-технологии.

References

1. Berkovich A.E., Bursian A.A., Senchik K.Yu., Petrishchev N.N., etc. The laboratory stand for a research of impact of the focused ultrasound of high intensity on vessels. *Meditsinskaya tekhnika*. 2016; 2: 16-9. (in Russian)
2. Petrishchev N.N.1, Tsibin A.U.1, Semenov D.U.1, Berkovich A.E.2, Yukina G.U.1, Blum N.M.1, Efimov A.N.1, Bursian A.A.2, Senchik K.U.2 Applying HIFU for the obliteration of the veins in the experiment. *Patologic-*

heskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. 2016; 60 (1): 89-93 (in Russian)

3. Angel Y.C, Pichardo S., Salomir R., Petrusca L. et al. Testing of a HIFU probe for the treatment of superficial venous insufficiency by using MRI. *Proceedings of the 28th IEEE EMBS Annual International Conference*. New York City. 2006; 1: 3533-6. (USA)

4. Delon-Martin C, Vogt C, Chignier E, et al. Venous thrombosis generation by means of high-intensity focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 1995; 21: 113-9.

5. Deepika Princess D., Mohan Jagannath, Biju Shalvin Y.J. Ultrasound Therapy for Varicose Vein. *International Research Journal of Medical Sciences*. 2013; 1(10): 22-5.

6. Fujiwara R, Sasaki K, Ishikawa T, et al. Arterial blood flow occlusion by high intensity focused ultrasound and histologic evaluation of its effect on arteries and surrounding tissues. *J. Med. Ultrasonics*. 2002; 29: 85-90.

7. Henderson PW, Lewis GK, Shaikh N, et al. A portable high-intensity focused ultrasound device for noninvasive venous ablation. *Journal of vascular surgery*. 2010; 51(3): 707-11.

8. Hwang JH, Zhou Y, Warren C, Brayman AA, Crum LA. Targeted venous occlusion using pulsed high-intensity focused ultrasound. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2010; 57: 37-40.

9. Hwang JH, Tu J, Brayman AA, Matula TJ, Crum LA. Correlation between inertial cavitation dose and endothelial cell damage in vivo. *Ultrasound Med. Biol.* 2006; 32: 1611- 19. (doi:10.1016/j. ultrasmedbio.2006.07.016)

10. Petrusca L., Salomir R., Miller R., Pichot O., Rata M., Cotton F., Chapeon J.-Y. Experimental investigation of thermal effects in HIFU-based external valvuloplasty with a nonspherical transducer, using high-resolution MR thermometry. *Phys. Med. Biol.* 2009; 54: 5123 — 38.

11. Rivens IH, Rowland IJ, Denbow M, Fisk NM, ter Haar GR, Leach MO. Vascular occlusion using focused ultrasound surgery for use in fetal medicine. *Eur. J. Ultrasound*. 1999; 9: 89-97.

12. Schultz-Haakh H, Li JK, Welkowitz W, Rosenberg N. Ultrasonic treatment of varicose veins. *Angiology*. 1989; 40: 129- 37. (doi:10.1177/000331 978904000208)

13. Shaw C. J., G. R. ter Haar, I. H. Rivens, D. A. Giusani, C. C. Lees. Pathophysiological mechanisms of high-intensity focused ultrasound-mediated vascular occlusion and relevance to non-invasive fetal surgery. *J. R. Soc. Interface*. 2014; 11: 20140029. doi.org/10.1098/rsif.2014.0029.

Сведения об авторах:

Семенов Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. общей хирургии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: Semenov_du@mail.ru;

Цибин Андрей Юрьевич, канд. мед. наук, доцент каф. общей хирургии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, e-mail: autsibin@yandex.ru;

Юкина Галина Юрьевна, канд. мед. наук, зав. лаб. патоморфологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, e-mail: ripson@inbox.ru

Беркович Александр Ефимович, зав. лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: aeberkovich@yandex.ru;

Бурсиан Андрей Арнольдович, гл. конструктор лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: bursian@mail.ru;

Белянкин Андрей Борисович, гл. инженер лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: anbel@mail.ru;

Сенчик Константин Юрьевич, доктор мед. наук, проф., консультант лаб. «Медицинская ультразвуковая аппаратура» ФГАОУ ВО СПбПУ, e-mail: senchik_kyu@spbstu.ru