

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Астахов Д.А.^{1,3}, Забозлаев Ф.Г.², Галямова А.Р.², Иванов Ю.В.^{1,2}, Дикова Т.С.⁴,
Сафонова В.М.⁴, Дыдыкин С.С.⁴, Нечунаев А.А.^{1,2}, Злобин А.И.^{1,2}, Панченков Д.Н.^{1,2,3}

Динамика морфологических изменений в ткани печени при необратимой электропорации в условиях возрастающей напряженности электрического поля

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства, 115682, Москва, Россия, ул. Ореховый бульвар, д. 28;

³ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» Федерального медико-биологического агентства России, 121165, Москва, Россия, ул. Студенческая, д. 40, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Необратимая электропорация – новый метод абляции тканей, используемый в лечении нерезектабельного рака. Имеется ряд публикаций, описывающих развитие клеточной гибели посредством апоптоза при применении технологии необратимой электропорации, однако динамика эффектов необратимой электропорации остается мало освещенной. **Цель исследования** – сравнительная оценка изменений в ткани печени и сосудах при необратимой электропорации вызванной токами возрастающей мощности и определение минимального порогового значения напряженности электрического поля, вызывающего формирование зоны необратимой нетермической электропорации посредством апоптоза клеток на равноудаленном расстоянии между электродами.

Методика. Исследование выполнено на 6-8-мес самцах белых беспородных крыс массой 240-330 г. Электропорации осуществлялась электродом состоящим из 2 рабочих игл. Животные выводились из эксперимента декапитацией на 1-е, 2-е; 3-и, 7-е и 14-е сут. 1–7 серии – последовательно повышалась напряженность электрического поля от 400 до 1000 В/см, с шагом 100 В/см. При неизменных параметрах: длительность серии импульсов 0,5 с, количество импульсов в серии 8, количество серий импульсов 225/мин, вид импульса – прямоугольный биполярный, длительность 1 импульса 8 мкс, максимальный импульсный ток 7 А. Морфологически оценивали состояние гепатоцитов, характер клеточной гибели. Для проведения морфометрического исследования использовали аппаратно-программный комплекс Nis-Elements AR 4.12.00 на базе исследовательского микроскопа NICON 50s, снабженного цифровой камерой NICON DS-Fi 1.

Результаты. При процедуре необратимой электропорации с напряженностью электрического поля от 400, до 1000 В/см с шагом в 100 В/см отмечалось нарастание гистопатологических признаков коагуляционного некроза от минимальных проявлений при мощности 400-600 В/см до начальных 700 В/см и грубых проявлений в, так называемой, «белой зоне» при 1000 В/см. При повышении напряженности более 900 В/см отмечалось преобладание некротических изменений над апоптотическими в межэлектродном пространстве. При низкой напряженности электрического поля 400–700 В/см в ряде репрезентативных образцов выявлялись скопления интактных жизнеспособных клеток без признаков повреждения.

Заключение. Проведенные исследования необратимой электропорации выявили комплекс изменений обусловленных термическим некрозом тканей в области расположения электродов. Морфологические признаки клеточной гибели посредством апоптоза продемонстрированы во всех сравниваемых группах, однако изменения носят сочетанный характер и вклад коагуляционных изменений нарастает по мере роста напряженности электрического поля. Минимально достаточная напряженность электрического поля, позволяющая получить апоптотические изменения клеток в ткани печени на всем протяжении между электродами соответствует 900 В/см, при которой процессы термического коагуляционного некроза не преобладают над апоптотическими изменениями.

Ключевые слова: необратимая электропорация; апоптоз; некроз; напряженность электрического поля; зона абляции ткани

Для цитирования: Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Иванов Ю.В., Дикова Т.С., Сафонова В.М., Дыдыкин С.С., Нечунаев А.А., Злобин А.И., Панченков Д.Н. Динамика морфологических изменений в ткани печени при необратимой электропорации в условиях возрастающей напряженности электрического поля. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 52–60.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.52-60

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Панченков Д.Н., Забозлаев Ф.Г.; сбор и обработка материала – Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Дикова Т.С., Сафонова В.М.; морфологическое исследование – Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р.; подготовка иллюстративного материала – Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Нечунаев А.А.; статистическая обработка – Астахов Д.А., Злобин А.И.; написание текста – Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Нечунаев А.А.; редактирование – Панченков Д.Н., Забозлаев Ф.Г., Иванов Ю.В., Дыдыкин С.С.

Для корреспонденции: Астахов Дмитрий Анатольевич, e-mail: astakhovd@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках Государственного задания (№ гос.регистрации проекта НИР: АААА-А20-120021890091-1)

Поступила 29.10.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Astakhov D.A.^{1,3}, Zabozev F.G.², Galyamova A.R.², Ivanov Yu.V.^{1,2}, Dikova T.S.⁴, Safonova V.M.⁴, Dydykin S.S.⁴, Nechunaev A.A.^{1,2}, Zlobin A.I.^{1,2}, Panchenkov D.N.^{1,2,3}

The dynamics of morphological changes in liver tissue during irreversible electroporation with electrical fields of increasing strength

¹ Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20, Bldg. 1, Moscow 127473, Russian Federation;

² Federal Research Clinical Center for Specialized Health Care and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Orekhovy Bulvar St. 28, Moscow 115682, Russian Federation;

³ Skobelkin State Scientific Center of Laser Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Studencheskaya St. 40, Bldg. 1, Moscow 121165, Russian Federation;

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bldg 2, Moscow 119991, Russian Federation

Introduction. Irreversible electroporation is a new technique for tissue ablation used in the treatment of unresectable cancer. The non-thermal mechanism of cell death occurs mainly through apoptosis rather than necrosis as induced by thermal ablation. A number of reports have described the development of apoptotic cell death in irreversible electroporation but the dynamics of this effect remains poorly understood. **The aim** of this study was to compare morphological changes in liver tissue and blood vessels exposed to irreversible electroporation with the electrical field of increasing strength and to determine the minimum threshold electric field strength that causes formation of a zone of irreversible nonthermal electroporation through apoptosis at an equal distance between the electrodes.

Methods. 7 series of experiments were performed on 140 white outbred male rats aged 6-8 months and weighing 240-330 g. An electrode consisting of 2 working needles was used for the experiments. Animals were decapitated on days 1, 2, 3, 7, and 14. In series 1-7, the electrical field strength was sequentially increased from 400 to 1000 V/cm with a step of 100 V/cm. With unchanged parameters, the duration of the pulse train was 0.5 sec, the number of pulses in the train was 8, the number of pulse trains was 225/min, the pulse type was rectangular bipolar, the duration of each pulse was 8 µs, and the maximum pulse current was 7 amps. The following morphological changes were assessed: fragmentation of cell nuclei, hyperbasophilia of nuclei, intussusception of cytoplasm, cell swelling, presence of apoptotic bodies, cell compression, phagocytosis of apoptotic cells, demarcation zone, ablation zone, lympho-leukocytic infiltration, expansion of sinusoids with venous congestion (+ dilatation; ++ severely expanded), thrombosis, hemorrhages (+ focal; ++ confluent), fatty degeneration of hepatocytes, protein degeneration of hepatocytes, discomplexation of hepatic cords, and coagulation necrosis.

Results. During the procedure of irreversible electroporation with an electric field strength from 400 to 1000 V/cm with a step of 100 V/cm, histopathological signs of coagulation necrosis increased from minimal at a strength of 400-600 V/cm to initial at 700 V/cm and to gross manifestations in the so-called «white zone» at 1000 V/cm. With an increase in the intensity to more than 900 V/cm, predominance of necrotic changes over apoptotic changes was observed in the interelectrode space. At a low electric field strength of 400-700 V/cm, aggregations of intact viable cells without signs of damage were detected in a number of representative samples. **Conclusion.** This study of irreversible electroporation revealed the presence of changes caused by tissue thermal necrosis in the area of electrode location. Morphological signs of cell death through apoptosis were observed in all groups; however, the changes were composite with the contribution of coagulation changes increasing with the increase in the electric field strength. The minimum effective strength of the electric field, which is sufficient to induce apoptotic changes in hepatic cells throughout the entire distance between the electrodes, corresponds to 900 V/cm, when the processes of thermal coagulation necrosis do not prevail over apoptotic changes.

Keywords: irreversible electroporation; apoptosis; necrosis; electric field strength; tissue ablation zone

For citation: Astakhov D.A., Zabozev F.G., Galyamova A. R., Ivanov Yu.V., Dikova T.S., Safonova V.M., Dydykin S.S., Nechunaev A.A., Zlobin A.I., Panchenkov D.N. The dynamics of morphological changes in liver tissue during irreversible electroporation with electrical fields of increasing strength. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 52–60. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.52-60

Author's contribution: research concept and design – Panchenkov D.N., Zabozaev F.G.; collection and processing of material – Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A.R., Dikova T.S., Safonova V.M.; morphological research – Zabozaev F.G., Galyamova A.R.; statistical processing – Astakhov D.A., Zlobin A.I.; text writing – Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A.R., Nechunaev A.A.; editing – Panchenkov D.N., Zabozaev F.G., Ivanov Yu.V., Dydykin S.S.

For correspondence: **Dmitry A. Astakhov**, Cand. of Sci. (Med.), Leading Research Fellow of the Laboratory of Minimally Invasive Surgery, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; 20, p. 1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russian Federation, e-mail: astakhovd@mail.ru

Financing. The work was carried out with financial support within the framework of the State Assignment (No. of state registration of the research project: AAAA-A20-120021890091-1)

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

Information about the authors:

Astakhov D.A., <https://orcid.org/0000-0002-8776-944X>

Zabozaev F.G., <https://orcid.org/0000-0002-7445-8319>

Ivanov Yu.V., <https://orcid.org/0000-0001-6209-4194>

Dikova T.S., <https://orcid.org/0000-0003-4174-6637>

Dydykin S.S., <https://orcid.org/0000-0002-1273-0356>

Nechunaev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2854-3109>

Zlobin A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8241-659X>

Panchenkov D.N., <https://orcid.org/0000-0001-8539-4392>

Received 29.10.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Необратимая электропорация — новая техника абляции, используемая в лечении нерезектабельных опухолей. Мощные микросекундные импульсы приводят к нарушению гомеостаза в клетках аблируемых тканей посредством пермеабиллизации, термического воздействия или их сочетания [1–8]. В противовес методам термической абляции, необратимая электропорация сохраняет окружающие ткани интактными, вызывая меньше коллатеральных повреждений и, таким образом, ведет к уменьшению побочных эффектов и более быстрому восстановлению [4–8]. Также, вследствие нетермического характера воздействия при необратимой электропорации, отсутствуют ограничения обусловленные так называемым эффектом радиатора, когда поток крови, обладающей более низкой температурой в крупных сосудах в зоне воздействия не позволяет достигнуть достаточной для абляции температуры вокруг сосудов, что приводит к сохранению жизнеспособных опухолевых клеток. Как следствие, необратимая электропорация имеет преимущества при лечении нерезектабельных опухолей и опухолей, не подлежащих термическим видам абляции. Необратимая электропорация обладает еще одним значительным преимуществом, которое основано на факте, что зона абляции имеет четкую очерченную границу — это позволяет обеспечить планирование процедуры абляции на основе математического ожидания. В настоящее время данная технология интенсивно исследуется для применения при опухолях поджелудочной железы, печени, мочевых путей, предстательной железы и др. [9–13]. Однако, консенсус о механиз-

ме действия необратимой электропорации до сих пор не достигнут. Неизвестно, вызваны ли указанные эффекты термическим или нетермическим механизмом, поскольку гистологическая оценка тканей подвергнутых процедуре необратимой электропорации описывает характеристики как некроза, так и апоптоза, выявляя признаки присущие этим механизмам гибели клеток [4–8]. Апоптоз клеток ассоциируется с регенерацией ткани и меньшим воспалительным ответом и потому является наиболее предпочтительным эффектом. Тем не менее, то, что необратимая электропорация вызывает сопутствующий коагуляционный некроз на некотором протяжении — установленный факт [6–8, 14, 15]. Это можно объяснить вторичными тепловыми эффектами необратимой электропорации, поскольку часть электрической энергии конвертируется в тепловую энергию при прохождении через ткани, обладающие определенным сопротивлением.

Ведущая парадигма применения необратимой электропорации в клинической практике строится на утверждении о нетермическом типе воздействия. Таким образом, характеристика потенциальных термических эффектов необратимой электропорации необходима для понимания вклада термического компонента и связанного с ним некроза аблируемой ткани и обеспечения планирования лечебной процедуры.

С учетом выше сказанного, целями данного исследования явилось проведение сравнительной морфологической оценки изменений в ткани печени и сосудах подвергнутых воздействию тока с заданными параме-

трами силы, частоты и длительности импульсов при повышающейся напряженности электрического поля. Определение минимального порогового значения напряженности электрического поля вызывающего формирование зоны необратимой нетепловой электропорации посредством апоптоза клеток на равноудаленном расстоянии между электродами.

Методика

Проведено 7 серий экспериментов. Исследования выполнено на 140 белых беспородных крысах самцах, приблизительно одного возраста (6–8 мес, массой 240–330 г. Все животные находились в одинаковых условиях стандартного вивария при постоянной температуре окружающей среды 23–26 °С, получали одинаковое питание, были прооперированы в одинаковых временных рамках. За 20 мин до процедуры электропорации производилась анестезия по стандартной методике с использованием ксилазина 2% и золетила (тилетомин). Мониторинг за вхождением животного в наркоз осуществлялся путем наблюдения за исчезновением ряда рефлексов. Во время наркоза следили за ритмом, частотой и глубиной дыхания, тонусом животного. В состоянии наркоза животное фиксировали к операционному столу и помещали в положение на спине на стерильной хирургической подложке. Передняя брюшная стенка рассекалась линейным разрезом по средней линии. Печень мобилизовывалась в рану стерильной салфеткой подведенной между задней диафрагмальной поверхностью печени и брюшной стенкой. В открытый сегмент печени вводились 2 центральные иглы на расстоянии 1 см на глубину 5 мм. Диаметр игл составлял 1,0 мм. Проводилась процедура электропорации. Исследование режима электропорации осуществлялось электродом состоящим из 2 рабочих игл. Животные выводились из эксперимента на 1-е; 2-е; 3-е; 7-е; 14-е сут декапитацией на гильотине. 1–7 серии – последовательно повышалась напряженность электрического поля от 400 до 1000 В/см. При неизменных параметрах: длительность серии импульсов 0,5 с, количество импульсов в серии 8, количество серий импульсов 225/мин, вид импульса – прямоугольный биполярный, длительность 1 импульса 8 мкс, максимальный импульсный ток 7 А.

Эксперимент выполняли с соблюдением принципов гуманности, и в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», согласованном с нормативными положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS No 123), в частности приложения А и статьи No5 Конвенции.

Исследование одобрено межвузовским комитетом по этике № 06-17.

Зоны абляции определялись посредством визуального осмотра и ручной пальпации. Тканевые блоки толщиной 3–5 мм нарезали параллельно ходу электродов и перпендикулярно плоскости абляции между электродами. Материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, подвергали проводке в тканевом гистопроцессоре MicromSTP 120 и заливали в парафиновую среду «Гистомикс» с использованием модульной системы заливки парафином TissueTek ® Tec 5. Депарафинированные срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, заключали в среду BioMount. При морфологическом исследовании срезов измеряли и фотографировали зоны абляции.

Для проведения морфометрического исследования использовался аппаратно-программный комплекс Nis-Elements AR 4.12.00 на базе исследовательского микроскопа NICON 50s, снабженного цифровой камерой NICON DS-Fi 1. Оценку удельного объема (V_i) зоны демаркации, зоны абляции, воспалительно-клеточной инфильтрации, венозного полнокровия синусоидов, паренхиматозных кровоизлияний производили при увеличении $\times 200$ с применением измерительной сетки Г.Г.Автандилова для цито-гистостереометрических исследований. Для каждого случая обрабатывали по 10 полей зрения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Stat-Soft Statistica 7.0». Сравнение независимых групп проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна-Уитни при 95 % уровне значимости.

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании отмечалась следующая динамика изменений.

400 В/см, 1-е сут – зона абляции (удельный объем $V_i = 16,38 \pm 1,06$) с признаками коагуляционного некроза гепатоцитов в области расположения электродов, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, со слабо выраженной неравномерной диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 2,16 \pm 0,11$), эктазированными полнокровными сосудами (удельный объем $V_i = 11,84 \pm 0,97$), формирующимися тромбами. Зона демаркации четкая без воспалительно-клеточной инфильтрации. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии – гидropическая дистрофия гепатоцитов, конденсация хроматина ядер. Цитоплазматическая оболочка неровная. (рис. 1).

400 В/см, 2-е, 3-и сут – картина прежняя. Из дополнительных изменений отмечается формирование тромбов в синусоидах области абляции.

400 Вольт/см, 7-е сут – зона абляции (удельный объем $V_i = 13,41 \pm 0,98$) с неравномерно выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов, гемолизом эритроцитов в разрушенных полнокровных синусоидах, выраженной неравномерной диффузной и очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 3,84 \pm 0,17$), с фиброзом зоны демаркации (удельный объем $V_i = 2,08 \pm 0,16$) с умеренной воспалительно-клеточной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией. Близлежащие и на периферии гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии.

400 Вольт/см, 14-е сут – зона абляции не определяется. Мелкий участок гепатоцитов с гиалиновокапель-

ной дистрофией, ядра гиперхромные, хроматин фрагментирован. Клетки сжаты, вокруг ядра образование типа «гало». Ядерная мембрана неровная.

Описанные ранне изменения при повышении напряженности электрического поля с 400 до 800 В/см носили схожий характер и отличались нарастанием выраженности признаков в динамике. Отмечалось постепенное увеличение удельного объема зоны абляции, очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрации. Помимо эктазии и полнокровия отмечено появление некротических изменений стенки кровеносных сосудов со сладжированием эритроцитов. Некротические изменения определяются в непосредственной близости к области введения электрода. 500 Вольт/см, 3-и сут – картина дополняется очаговыми кровоизлияниями. 600 Вольт/см, 3-и сут – при сохраняющихся описанных изменениях прослеживается конденсация хроматина ядер. Наиболее по-

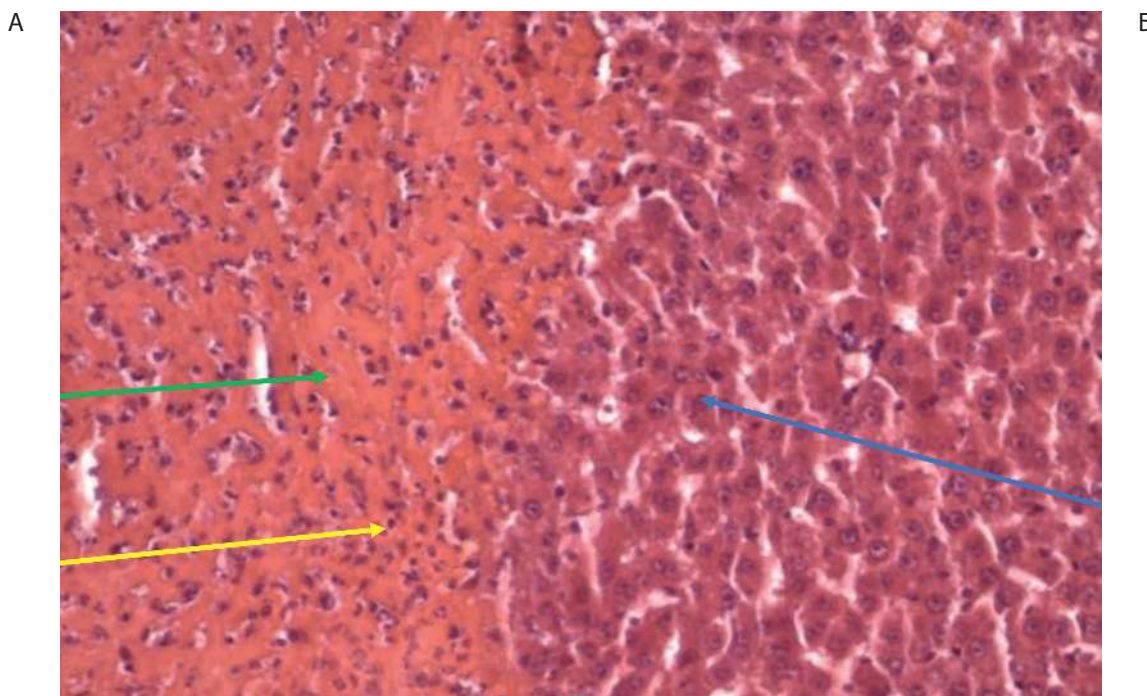


Рис. 1. Печень. Окраска гематоксилином и эозином, x 200, E 400 В/см. 1-е сут.

А – зона абляции (необратимой электропорации); Б – неизменная ткань печени

Наблюдается четкая граница раздела между аблированной тканью и нормальной тканью печени. Синяя стрелка – неизменные гепатоциты; зеленая стрелка – коагуляционный некроз; желтая стрелка – формирующаяся демаркационная зона с инфильтрацией лимфоцитами, полинуклеарными лейкоцитами.

Fig. 1. Liver. Staining with hematoxylin and eosin, x 200, E 400 V / cm.

A – ablation zone (irreversible electroporation); B – unchanged liver tissue There is a clear interface between ablated tissue and normal liver tissue. Blue arrow – unchanged hepatocytes; Green arrow – coagulative necrosis; Yellow arrow – the emerging demarcation zone with infiltration by lymphocytes, polynuclear leukocytes.

стоянным признаком, на протяжении всего периода наблюдения и после разрешения воспалительных явлений – была эктазия и полнокровие сосудов в зоне необратимой электропорации. Остаточные явления наблюдаемые на 7-е сут при напряженности 400-700 В/см и сохранявшиеся до 14-х сут при напряженности 800-1000 В/см характеризовались дискомплексацией печеночных балок. Отмечено, что в зоне необратимой электропорации по истечении периода наблюдения фиброзные изменения не определялись.

При повышении напряженности электрического поля до 900 В/см, 1-е сут – отмечена обширная зона абляции (удельный объем $V_i = 48,18 \pm 2,87$) с выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов, со сливными центральными участками колликации, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, умеренно выраженной неравномерной диффузной и очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 13,26 \pm 1,09$), эктазированными полнокровными сосудами с гомогенными некротически измененными

стенками (удельный объем $V_i = 14,31 \pm 1,18$). Обращало внимание сладжирование эритроцитов. Зона демаркации четкая (удельный объем $V_i = 8,75 \pm 0,95$) с умеренно выраженной воспалительноклеточной инфильтрацией. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии – гидropическая дистрофия гепатоцитов, конденсация хроматина ядер с четко различимым ядрышком. Цитоплазматическая оболочка неровная. Отдельно расположенные очаги коагуляционного некроза.

900 вольт/см, 2-е, 3-и сут – сохраняются описанные изменения, отмечается формирование эктазированных полнокровных сосудов (удельный объем $V_i = 15,37 \pm 1,35$) с очаговыми и сливными кровоизлияниями (удельный объем $V_i = 11,88 \pm 1,06$) (рис. 2).

900 /см, 7-е сут – обширная зона абляции (удельный объем $V_i = 40,86 \pm 2,71$), с выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов с распространенной колликацией, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, выраженной неравномер-

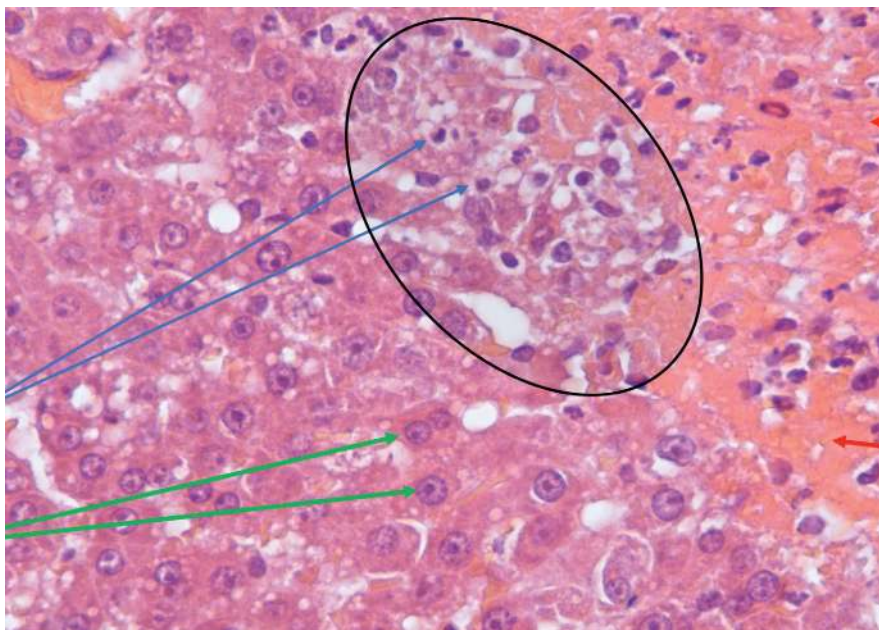


Рис. 2. Печень. Окраска гематоксилин эозин, х 400, E 900 В/см. 2-е сут.

Препарат печени с нарушенной структурой печеночных балок, гепатоциты их составляющие с вакуолизацией цитоплазмы, неравномерным кариопикнозом и фрагментацией хроматина единичных ядер (синие стрелки), циторексисом, полнокровием синусоидов с распространяющимися кровоизлияниями, лизисом эритроцитов в зонах некроза (красные стрелки), очаговой периваскулярной лимфоидной инфильтрацией. Зеленые стрелки – неизмененные гепатоциты. Контур – зона апоптоза

Fig. 2. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 400, E 900 V / cm. 2nd day. A liver specimen with a disturbed structure of the hepatic tracts, hepatocytes with vacuolization of the cytoplasm, uneven karyopycnosis and fragmentation of chromatin of single nuclei (blue arrows), cytorhexis, plethora of sinusoids with spreading hemorrhages, erythrocyte lysis in the areas of necrosis (red arrows), focal perivascular lymphoid infiltration. Green arrows are unchanged hepatocytes. Black contour – zone of apoptosis.

ной диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 14,89 \pm 1,83$), эктазированными полнокровными сосудами (удельный объем $V_i = 15,68 \pm 1,49$), очаговыми и сливными кровоизлияниями (удельный объем $V_i = 11,73 \pm 1,17$). Зона демаркации четкая, (удельный объем $V_i = 7,84 \pm 0,96$) с выраженной воспалительноклеточной инфильтрацией, гистиоцитарной инфильтрацией, разрастанием грануляционной ткани. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии с явлениями гидропической дистрофии, конденсация хроматина ядер (**рис. 3**).

900 В/см, 14-е сут – зона абляции не определяется. Дискомплексація печеночных балок с фрагментацией. Близлежащие и на периферии гепатоциты с эозинофильной цитоплазмой, явлениями гиалиновокапельной и гидропической дистрофии. Ядра гиперхромны с фрагментированным хроматином. Сосуды резко расширены, полнокровны.

Дальнейшее повышение напряженности электрического поля до 1000 вольт/см и выше характеризовалось нарастанием объема коагуляционного некроза, воспалительно-клеточных изменений с очаговыми и сливными кровоизлияниями (**рис. 4**). Выраженные изменения в виде эозинофилии цитоплазмы с явлениями гиалиновока-

пельной и гидропической дистрофии, гиперхромией ядер с фрагментацией хроматина персистировали до 14-х сут.

Таким образом, при процедуре необратимой электропорации с напряженностью электрического поля от 400 до 1000 В/см с шагом в 100 В/см отмечалось нарастание микроскопических признаков коагуляционного некроза от минимальных проявлений при мощности 400-600 до начальных 700 и грубых проявлений в так называемой «белой зоне» при 1000 В/см. Удельный объем зоны абляции статистически значимо увеличивался ($p < 0,001$). При более низких показателях напряженности электрического поля при необратимой электропорации отмечались такие изменения как набухание синусоидов, обезвоживание клеток и геморрагическое пропитывание ткани печени в области введения электродных игл. При повышении напряженности более 900 В/см отмечалось преобладание некротических изменений над апоптотическими в межэлектродном пространстве. Следует отметить, что при низкой напряженности электрического поля 400 – 700 В/см в ряде репрезентативных образцов выявлялись скопления интактных жизнеспособных клеток без признаков повреждений с минимальными показателями удельного объема воспалительной инфильтрации и кровоизлияний.

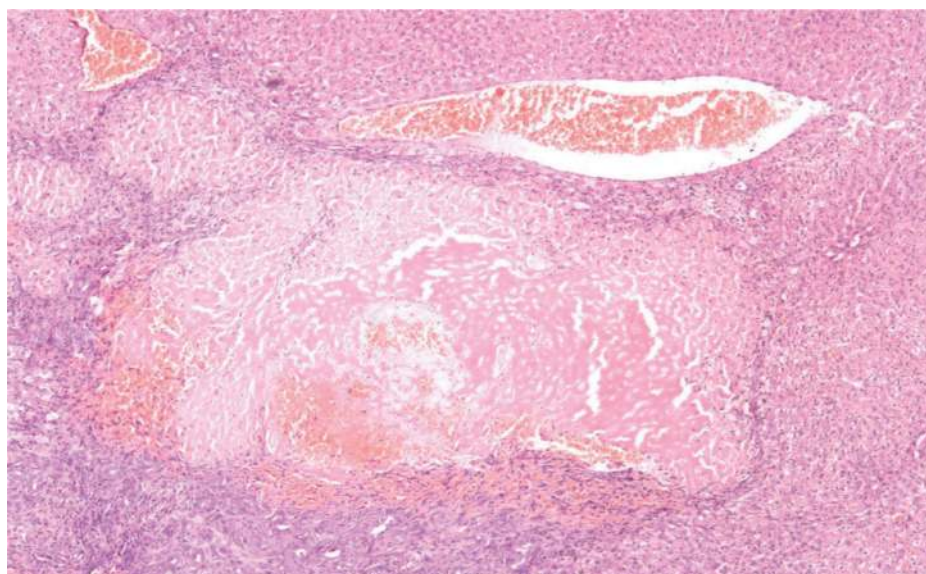


Рис. 3. Печень. Окраска гематоксилин эозин, x 40, E 900 В/см. Участок печени в области воздействия (7-е сут после проведения процедуры электропорации), на котором отмечается зона с массивными полями некроза, окруженного лимфо-гистиоцитарным воспалительноклеточным инфильтратом, сливными и очаговыми кровоизлияниями, полнокровными сосудами.

Fig. 3. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 40, E 900 V/cm. The liver sample in the area of exposure on the 7th day after the electroporation procedure, demonstrates the zone with massive fields of necrosis, surrounded by lympho-histiocytic inflammatory cell infiltrate, drainage and focal hemorrhages, plethoric vessels.

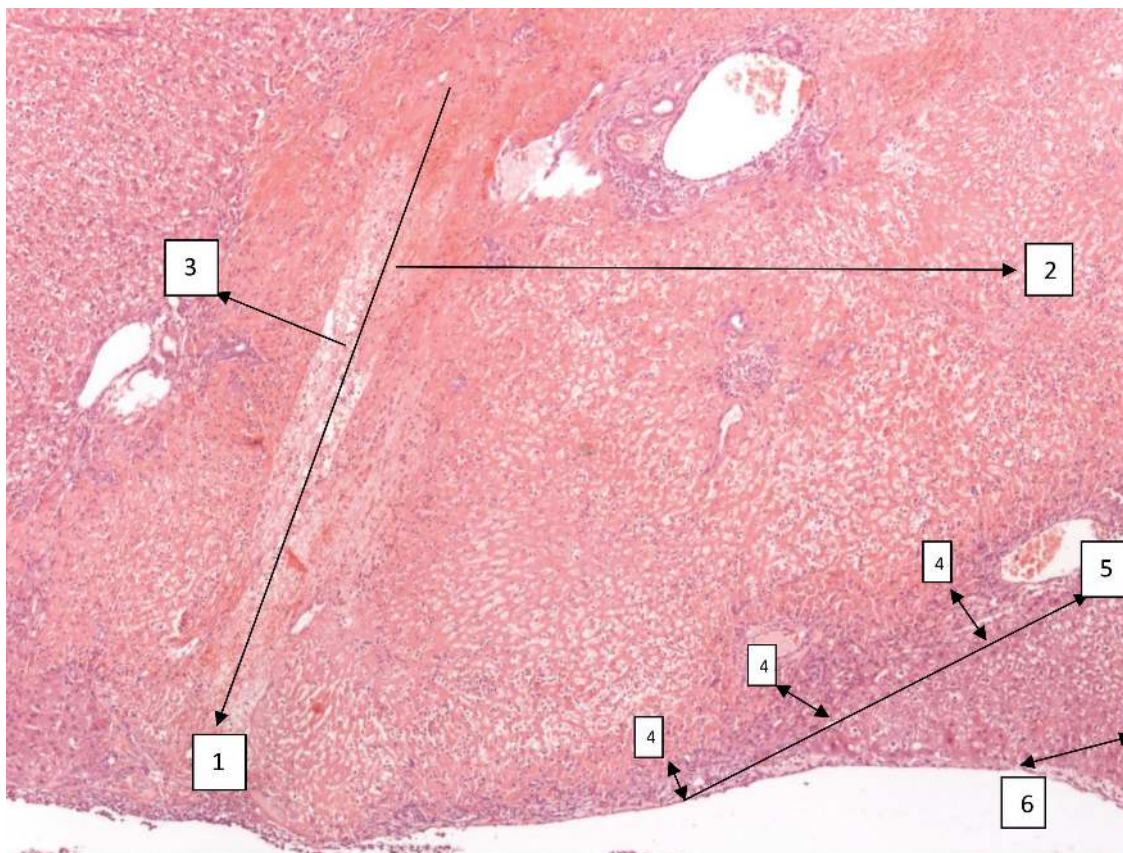


Рис. 4. Печень. Окраска гематоксилин эозин, х 40, E 1000 В/см.

1 – трек от электрода; 2 – направление до 2-го электрода (зона коагуляционного некроза и порации); 3 – зона коагуляционного некроза (электропорации) в направлении от электрода на периферию; 4 – лимфо-лейкоцитарная инфильтрация; 5 – область между некрозом и электропорацией; 6 – область восстановления нормальной структуры балок.

Fig. 4. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 40, E 1000 V / cm. 1 – track from the electrode; 2 – direction to the 2nd electrode (zone of coagulation necrosis and poration); 3 – zone of coagulation necrosis (electroporation) in the direction from the electrode to the periphery; 4 – lymph-leukocyte infiltration; 5 – area between necrosis and electroporation; 6 – area of restoration of the normal structure of beams.

Заключение

Полученные собственные предварительные экспериментальные данные выявили наличие изменений обусловленные термическим некрозом тканей в области расположения электродов. Механизм клеточной гибели посредством апоптоза также не вызывает сомнений, однако, справедливо заметить, что изменения носят сочетанный характер и вклад коагуляционных изменений нарастает по мере роста напряженности электрического поля. Исходя из полученных данных можно заключить, что минимально достаточная напряженность электрического поля, позволяющая получить апоптотические изменения клеток в ткани печени на всем протяжении между электродами соответ-

ствует 900 В/см, при которой процессы термического коагуляционного некроза не преобладают над апоптотическими изменениями.

Литература

(п.п. 1–8; 12–15 см. References)

- Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Пикунов Д.Ю., Забозлаев Ф.Г., Нечунаев А.А., Кочиева М.П. и др. Необратимая электропорация метастазов колоректального рака в печень с использованием системы “NANOKNIFE”. *Клиническая практика*. 2013; 13(1): 37–42.
- Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Соловьев Н.А., Астахов Д.А., Нечунаев А.А. Необратимая электропорация с использованием системы “nanoknife” в лечении рака поджелудочной железы (клиническое наблюдение). *Анналы хирургической гепатологии*. 2014; 19(1): 50–4.

11. Астахов Д.А., Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Шабловский О.Р., Кедрова А.Г., Соловьев Н.А. и др. Необратимая электропорация при местнораспространенном раке поджелудочной железы. *Анналы хирургической гепатологии*. 2018; 23(2): 59–68. DOI: 10.16931/1995-5464.2018259-68

References

1. Tarek M. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. J.* 2005; 88(6): 4045–4053. DOI:10.1529/biophysj.104.050617

2. Meaking W.S., Edgerton J., Wharton C.W., Meldrum R.A. Electroporation induced damage in mammalian cell DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; 1264: 357–362. DOI:10.1016/0167-4781(95)00177-8

3. Beebe S.J., Blackmore P.F., White J., Joshi R.P., Schoenbach K.H. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol. Meas.* 2004; 25: 1077–93.

4. Ben-David E., Appelbaum L., Sosna J., Nissenbaum I., Goldberg S.N. Characterization of irreversible electroporation ablation in vivo porcine liver. *AJR Am J Roentgenol.* 2012; 198(1): 62-8.

5. Sugimoto K., Moriyasu F., Kobayashi Y., et al. Assessment of various types of US findings after irreversible electroporation in porcine liver: comparison with radiofrequency ablation. *J Vasc Interv Radiol.* 2015; 26(2): 279-87.

6. Golberg A., Bruinisma B.G., Uygun B.E., Yarmush M.L. Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by “electric fields inks”. *Sci Rep.* 2015; 5: 8485.

7. van den Bos W., Scheffer H.J., Vogel J.A., et al. Thermal energy during irreversible electroporation and the influence of different ablation parameters. *J Vasc Interv Radiol.* 2016; 27(3): 433-43.

8. Lee Y.J., Lu DSK, Osuagwu F., Lassman C. Irreversible electroporation in porcine liver: short-and long-term effect on the hepatic veins and adjacent tissue by ct with pathological correlation. *Invest Radiol.* 2012; 47(11): 671-5.

9. Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Pikunov D.Yu., Zabolzaev F.G., Nechunaev A.A., Kochieva M.P., Aleksanyan G.B. Irreversible electroporation of colorectal liver metastases using “NANOK-NIFE” system. *Klinicheskaya praktika.* 2013; 13 (1): 37–42. (In Russian)

10. Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Soloviev N.A., Astakhov D.A., Nechunaev A.A. Irreversible electroporation using “NanoKnife” system in management of pancreatic cancer (case report). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii.* 2014; 19(1): 50–4. (In Russian)

11. Astakhov D.A., Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Shablovsky O.R., Kedrova A.G., Soloviev N.A., et al. Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii.* 2018; 23(2): 59–68. (In Russian) DOI: 10.16931/1995-5464.2018259-68

12. Liu Y., Xiong Z., Zhou W., Hua Y., Li C., Yao C. Percutaneous ultrasound-guided irreversible electroporation: a goat liver study. *Oncol Lett.* 2012; 4(3): 450-4.

13. Lee E.W., Chen C., Prieto V.E., Dry S.M., Loh C.T., Kee S.T. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation. *Radiology.* 2010; 255(2): 426-33.

14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.

15. Levin A.A., Klimov D.D., Vorotnikov A.A., Prokhorenko L.S., Poduraev Y.V., Nechunaev A.A., et al. The comparison of the process of manual and robotic positioning of the electrode performing radiofrequency ablation under the control of a surgical navigation system. *Scientific Reports.* 2020; 10(1): 8612. DOI: 10.1038/s41598-020-64472-9

Сведения об авторах:

Астахов Д.А., канд. мед. наук, доцент каф. хирургии и хирургических технологий; с ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; ст. науч. сотр. отделения лазерной онкологии и фотодинамической терапии, ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины им. О.К. Скобелкина»; **Заболзаев Ф.Г.**, доктор мед. наук, проф., зав. отд-нием патологической анатомии; гл. специалист по патологической анатомии, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Галямова А.Р.**, врач патологоанатом, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Иванов Ю.В.**, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА, зав. отд-нием хирургии; **Дикова Т.С.**, студент, курс-5, факультет – Лечебное дело: Международная школа «Медицина будущего»; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Сафонова В.М.**, студент, курс-5, факультет – Лечебное дело: Международная школа «Медицина будущего»; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Дыдыкин С.С.**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. оперативной хирургии и топографической анатомии; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Нечунаев А.А.**, канд. мед. наук, доцент кафедры хирургии и хирургических технологий¹, ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; врач хирург ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Злобин А.И.**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; врач хирург ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА **Панченков Д.Н.**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. хирургии и хирургических технологий, ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; зав. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД», ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; советник директора по инновационной деятельности ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» ФМБА России.