



МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

Физический факультет

На правах рукописи

Пономарчук Екатерина Максимовна

**Механическое разрушение биологических тканей
в фокусированных импульсно-периодических ударноволновых полях**

Специальность: 1.3.7. Акустика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук, доцент
Хохлова Вера Александровна

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Буравков Сергей Валентинович

МОСКВА – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1 Характеризация ударноволновых полей ультразвуковых излучателей с различными возможностями динамической фокусировки	17
§1.1 Секторные излучатели с фиксированными углами фокусировки.....	20
1.1.1 Калибровочные измерения в воде.....	21
1.1.2 Численное моделирование.....	22
1.1.3 Результаты.....	23
1.1.4 Выводы к параграфу §1.1.....	25
§1.2 Кольцевая фазированная решетка	26
1.2.2 Влияние электронного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей.....	30
1.2.3 Эффекты электронного и геометрического изменения угла фокусировки решетки	37
1.2.4 Обсуждение к параграфу §1.2.....	40
1.2.5 Выводы к параграфу §1.2.....	41
§1.3 Двумерная многоэлементная фазированная решетка.....	41
1.3.1 Параметры решетки	42
1.3.2 Характеризация поля решетки без смещения фокуса.....	42
1.3.3 Влияние продольного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей	44
1.3.4 Влияние поперечного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей	47
1.3.5 Выводы к параграфу §1.3.....	48
§1.4 Выводы к первой главе.....	48
Глава 2 Ликвидация крупных гематом как примера ткани с малой жесткостью	50
§2.1 Исследование упругих, микро- и ультраструктурных свойств модели гематомы человека	53
2.1.1 Измерение упругого модуля и ретракции гематом.....	53
2.1.2 Микро- и ультраструктурный анализ гематом	59
2.1.3 Выводы к параграфу §2.1.....	62
§2.2 Ликвидация модели гематомы <i>in vitro</i> ударноволновыми ультразвуковыми импульсами.....	63
2.2.1 Акустический эксперимент.....	63
2.2.2 Микро- и ультраструктурный анализ разрушений.....	65
2.2.3 Результаты.....	66
2.2.4 Выводы к параграфу §2.2.....	68
§2.3 Оптимизация траектории движения фокуса излучателя для получения объемных механических разрушений в биотканях с помощью ударноволновых импульсов.....	68
§2.4 Влияние длительности ударноволновых ультразвуковых импульсов на скорость и эффективность ликвидации гематомы человека <i>in vitro</i>	71
2.4.1 Акустический эксперимент.....	72
2.4.2 Микро- и ультраструктурный анализ эффективности разжижения гематом.....	74
2.4.3 Результаты.....	75
2.4.4 Выводы к параграфу §2.4.....	80
§2.5 Влияние упругости и степени ретракции гематомы человека <i>in vitro</i> на ее восприимчивость к ликвидации фокусированными ударноволновыми ультразвуковыми импульсами	81
2.5.1 Акустический эксперимент.....	81
2.5.2 Результаты.....	85
2.5.3 Выводы к параграфу §2.5.....	91

§2.6 Выводы ко второй главе.....	91
Глава 3 Разрушение ткани простаты человека как примера ткани с большой жесткостью	93
§3.1 Исследование упругих свойств ткани простаты человека <i>ex vivo</i>	94
3.1.1 Измерение упругого модуля предстательной железы человека.....	94
3.1.2 Результаты и выводы к параграфу §3.1.....	95
§3.2 Влияние длительности ударноволновых ультразвуковых импульсов на скорость и эффективность механического разрушения ткани предстательной железы человека <i>ex vivo</i>	96
3.2.1 Акустический эксперимент.....	96
3.2.2 Гистологический и ультраструктурный анализ разрушений.....	98
3.2.3 Результаты.....	98
3.2.4 Выводы к параграфу §3.2.....	101
§3.3 Разрушение опухоли простаты человека ударноволновыми ультразвуковыми импульсами	101
3.3.1 Акустический эксперимент.....	102
3.3.2 Гистологический анализ разрушений	103
3.3.3 Результаты.....	103
3.3.4 Выводы к параграфу §3.3.....	105
§3.4 Выводы к третьей главе.....	106
Глава 4 Развитие концепции механической дозы для биологических тканей различного типа	107
§4.1. Оптимизация траектории фокуса в поперечной плоскости.....	108
§4.2 Акустический эксперимент по развитию концепции механической дозы.....	112
§4.3 Количественный гистологический анализ разрушений	115
§4.4 Результаты количественного анализа разрушений.....	121
4.4.1 Скорость абляции ткани.....	122
4.4.2 Доля и структура недоразрушенной ткани.....	123
§4.5 Выводы к четвертой главе.....	126
Глава 5 Пороги безопасности при механическом разрушении мягких тканей рядом с газосодержащими органами на модели крупной гематомы рядом с воздушной границей	128
§5.1 Акустический эксперимент.....	131
§5.2 Численное моделирование ультразвуковых полей <i>in situ</i>	134
5.2.1. Постановка численного эксперимента	134
5.2.2. Оценка смещения ткани за счет радиационной силы	135
5.2.3. Корреляция разрушений с параметрами ультразвукового поля.....	136
§5.3 Результаты	137
5.3.1 Анализ высокоамплитудных разрушений в зависимости от угла фокусировки	137
5.3.2 Корреляция высокоамплитудных разрушений с параметрами поля.....	140
5.3.3 Низкоамплитудные пороги разрушения поверхности	143
5.3.4 Предсказание контуров безопасности вокруг фокуса по структуре ультразвукового поля..	143
§5.4 Выводы к пятой главе.....	147
Основные результаты и выводы.....	148
Благодарности.....	149
Публикации автора по теме диссертации.....	150
Список литературы.....	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Фокусированные пучки высокоинтенсивного ультразвука являются предметом многих современных исследований в области акустики, медицины и биоинженерии. Причиной этого является стремление современных разработок в области медицины и хирургии снизить инвазивность существующих методов операционного вмешательства с целью ограничить риск инфекции при разрезе, сократить период постоперационного восстановления, а также сделать операцию более широкодоступной. Инструментом для такого неинвазивного хирургического вмешательства может являться фокусированный ультразвук, который, проходя сквозь кожу, ткани и органы внутрь тела человека, способен вызывать локальное разрушение ткани в фокальной области пучка, не повреждая при этом окружающие ткани [1–7]. Идея использования ультразвука для терапевтического воздействия на биоткани появилась еще в середине XX века с работ братьев Фрай в США [1, 8, 9] и Бурова А.К. в СССР [2, 10]. В настоящее время наиболее востребованным вариантом использования ультразвуковых волн для терапии является их фокусировка на целевом участке внутри организма человека при достаточно высокой интенсивности ультразвука. Совокупность таких методов, использующих высокоинтенсивный фокусированный ультразвук, получила название HIFU – high intensity focused ultrasound [7, 11–14]. В отличие от существующих методов лазерной, крио- и радиочастотной катетерной абляции, HIFU-методы неинвазивны и позволяют разрушать объемы биологической ткани размером более 3–4 см³, в то время как именно опухоли большого размера часто связаны с рецидивом заболевания [15–17]. При этом механизм взаимодействия фокусированного ультразвука с биотканью существенным образом определяется параметрами акустической волны в фокусе.

Сегодня в доклиническом и клиническом использовании HIFU широко распространен вариант непрерывного ультразвукового облучения с интенсивностями ультразвука до 1 кВт/см², которое приводит к локальному нагреву и тепловой денатурации ткани в фокусе за счет поглощения ею ультразвуковой энергии фокусированного пучка. Тепловая неинвазивная хирургия с помощью HIFU нашла свое применение для лечения эссенциального тремора [18], костных метастазов [19], а также опухолей предстательной железы [20, 21], печени [22, 23], поджелудочной железы [24], матки [25], почек [26], молочной железы [27, 28], головного мозга [29] и других органов.

Несмотря на достигнутые к настоящему времени клинические успехи этого метода, следует сказать, что уже были выявлены важные ограничения использования теплового механизма воздействия ультразвука в неинвазивной хирургии. Так, диффузия тепла от нагреваемой области может приводить к перегреву окружающих тканей, а охлаждение фокуса за счет перфузии усложняет абляцию вблизи крупных кровеносных сосудов. Также, результатом такого

воздействия является коагуляционный некроз или ожог облученного объема ткани, что приводит к достаточно долгому процессу реабилитации. Кроме того, для визуализации такого теплового воздействия требуется использование дорогостоящих МРТ-установок, поскольку возможности контроля изменения температуры целевого участка с использованием доступных ультразвуковых методов весьма ограничены.

В связи с этим, в последнее время возрос интерес к использованию механического воздействия импульсного ультразвука с интенсивностями $\sim 1 \text{ кВт/см}^2$ в фокусе, при этом не вызывающего тепловой денатурации ткани. Один из таких методов был предложен в университете штата Мичиган в 2004 году и получил название гистотрипсии [30–32]. Метод гистотрипсии заключается в механическом разрушении целевого объема биоткани внутри организма человека путем чрескожной фокусировки на нем коротких повторяющихся высокоамплитудных ультразвуковых импульсов. Нелинейное искажение исходно гармонического профиля волны по мере ее распространения сквозь кожу, ткани и органы приводит к образованию ударных фронтов в фокальной области пучка [33, 34], что вызывает различные эффекты в ткани, зависящие от параметров импульсно-периодического воздействия.

В исторически первом предложенном в университете штата Мичиган типе гистотрипсии, названном кавитационной гистотрипсией, используются последовательности микросекундных ультразвуковых импульсов с высокими значениями пикового отрицательного давления ударного фронта в фокусе [35]. Такие импульсы вызывают образование пузырьковых облаков в фокальной области ультразвукового пучка, а периодическое сжатие и растяжение образующихся пузырьков механически разрушает биологическую ткань до субклеточных фрагментов. К настоящему моменту уже проводятся первые клинические испытания этого метода для лечения раковых опухолей печени [36, 37]. Однако стохастический характер процесса кавитации и необходимость создания очень высоких акустических давлений в фокусе излучателя являются значительными препятствиями во введении этого метода в клиническую практику [38].

В 2010 году совместно учеными из университета штата Вашингтон и МГУ имени М.В. Ломоносова был предложен альтернативный метод гистотрипсии – гистотрипсии с кипением (ГК), использующий менее интенсивные и более длинные (миллисекундные) ультразвуковые импульсы, также содержащие ударные фронты в фокальной области акустического пучка [32, 39]. Ударноволновые импульсы способны значительно ускорить процесс нагрева биоткани в фокусе, поскольку объемная скорость поглощения средой энергии ударных волн конечной амплитуды пропорциональна третьей степени амплитуды разрыва [34, 40, 41]. Ударные волны фокусируются в очень малый объем и могут вызывать локальное вскипание биологической ткани в фокальной области размером $\sim 100 \text{ мкм}$ в течение миллисекунд. За этот промежуток времени диффузия тепла от быстро нагреваемого нелинейного фокального

пятна не успевает распространиться на окружающие области [39]. Образующаяся за счет взрывного вскипания парогазовая полость расширяется до миллиметровых размеров и остывает. В результате размер образующейся в фокусе парогазовой полости заметно превышает размер нагреваемого фокального пятна в ударноволновом ультразвуковом пучке. Взаимодействие последующих приходящих ударных волн с парогазовой полостью включает в себя различные физические явления, не все из которых на данный момент до конца изучены: образование самой полости в биологической ткани, ее рост, приповерхностная кавитация, атомизация ткани на искривленной поверхности полости, образование микроструй и др. [42–45]. Между последовательными импульсами обычно выдерживается пауза, достаточная для предотвращения накопления тепла вне фокального пятна: коэффициент заполнения импульсного воздействия обычно выбирается менее 1%. Комбинация перечисленных механизмов приводит к механическому разрушению ткани до жидкого состояния.

Недавно также был предложен, так называемый, гибридный режим гистотрипсии, в котором используются последовательности субмиллисекундных импульсов, т.е. промежуточных между применяемыми в кавитационной гистотрипсии и в ГК [46]. Этот тип гистотрипсии уже был успешно опробован в тканях свиной печени, почки и сердца *ex vivo* и, вероятно, задействует комбинацию механизмов двух других видов гистотрипсии.

К преимуществам методов гистотрипсии для неинвазивной хирургии по сравнению с тепловым HIFU относится, например, возможность контроля процесса воздействия в режиме реального времени с помощью УЗИ-визуализации, более доступной и простой в обращении по сравнению с методами МРТ, используемыми для контроля температуры при тепловом HIFU. Такая возможность УЗИ-визуализации связана с тем, что в процессе разрушения ткани в методе гистотрипсии задействованы кавитационные пузыри и пузыри кипения, акустический импеданс которых сильно отличается от импеданса окружающих биологических тканей. В связи с этим, пузыри в процессе разрушения являются сильными отражателями диагностического ультразвука и видны на УЗИ-изображении яркими гиперэхогенными пятнами. После окончания воздействия ткань оказывается разрушена до состояния жидкости, в которой рассеиватели ультразвука практически отсутствуют, и потому разрушенная область видна на УЗИ в виде темной гипоэхогенной зоны, в то время как термически разрушенная ткань после тепловой HIFU-абляции практически не отличается на УЗИ от интактной ткани. Еще одним достоинством гистотрипсии перед тепловыми HIFU-приложениями является значительная локализованность воздействия, поскольку использующиеся короткие ультразвуковые импульсы подавляют неконтролируемую диффузию тепла от фокальной области на окружающие здоровые ткани. И наконец, еще одним преимуществом гистотрипсии перед тепловыми методами является потенциально более быстрое выведение жидких продуктов разрушения биоткани иммунной

системой организма, в отличие от плотной рубцовой ткани, в которую со временем превращается биоткань, подверженная тепловому некрозу.

При клиническом применении метода гистотрипсии для неинвазивного механического разрушения целевого объема ткани необходимо предварительное планирование облучения, подразумевающее умение предсказывать ожидаемые разрушения по факторам, влияющим на их форму и размеры. Несмотря на незавершенность исследования механизмов взаимодействия мощных ультразвуковых импульсов с биологическими тканями в методах гистотрипсии, уже известно, что результат воздействия может зависеть, например, от параметров акустического излучателя (таких, как его рабочая частота, угол фокусировки и др.), от протокола ультразвукового воздействия (например, амплитуды ударного фронта в фокусе, длительности используемых импульсов, их количества и др.), а также от свойств разрушаемой ткани (например, ее жесткости, под которой часто понимают сдвиговый модуль ткани или модуль Юнга) [32, 42, 43, 47–53]. Однако, актуальной остается задача многопараметрического анализа количественных связей между получаемыми разрушениями и влияющими на них вышеуказанными факторами для развития возможностей предсказания и планирования безопасного и эффективного клинического применения методов гистотрипсии, чему в широком смысле и посвящена настоящая диссертационная работа.

Для успешной реализации методов гистотрипсии необходимо, чтобы в создаваемых акустических полях формировались ударные волны с определенными амплитудами разрыва. Достижимые амплитуды ударного фронта в ультразвуковых полях в первую очередь определяются углом фокусировки создающего их излучателя, или, другими словами, его диафрагменным числом ($F\#$), определяемым как отношение фокусного расстояния излучателя к его апертуре [54–56]. При этом угол фокусировки излучателя может быть как фиксированным, так и изменяемым с помощью электронной фазировки многоэлементных решеток, что может вносить дополнительные эффекты в создаваемые ими акустические поля. В связи с этим, актуальной задачей также является характеристика ультразвуковых полей излучателей различного типа и геометрии и изучение ударноволновых условий в них, чему также посвящена часть диссертационной работы.

Цель и задачи работы

Целью диссертационной работы является характеристика импульсно-периодических ударноволновых фокусированных ультразвуковых полей различной геометрии и многопараметрический анализ вызываемых ими механических разрушений в биологических тканях различного типа, для дальнейшего практического применения в конкретных медицинских приложениях. В рамках указанной цели решались следующие **задачи**:

1. Численно на основе физического эксперимента охарактеризовать ударноволновые условия в полях ультразвуковых излучателей с различными возможностями динамической фокусировки. Разработать практические рекомендации о наиболее выигрышных способах изменения угла фокусировки акустических пучков для получения заданных параметров ударноволнового поля.

2. Экспериментально реализовать объемные механические разрушения методами гистотрипсии в модели гематомы человека как примере ткани с малой жесткостью. Определить жесткость модели гематомы по мере ее старения с применением методов индентометра и эластографии сдвиговой волной. Разработать протоколы импульсно-периодического воздействия для ускорения процесса разрушения и проанализировать полученные разрушения с помощью методов сканирующей электронной микроскопии. Разработать метод количественной оценки размеров оставшихся в жидком разрушении фрагментов фибриновой сети гематомы на ультраструктурном уровне. Определить влияние жесткости и степени ретракции модели гематомы на ее устойчивость к ликвификации методами гистотрипсии.

3. Экспериментально исследовать возможность механического разрушения ткани предстательной железы человека и злокачественной опухоли в ней как модели ткани с большой жесткостью методом гистотрипсии с кипением. Провести измерения и статистический анализ жесткости ткани предстательной железы, определить условия ее эффективного разрушения и проанализировать полученные разрушения с применением методов гистологического и ультраструктурного анализа.

4. Разработать концепцию механической дозы для метода гистотрипсии с кипением. Экспериментально определить количественную связь параметров ударноволнового импульсно-периодического воздействия и типа разрушаемой биологической ткани со скоростью и эффективностью ее механического разрушения. Разработать нейросетевой алгоритм для количественного гистологического анализа механических разрушений в биологических тканях разного типа. Разработать практические рекомендации по выбору механической дозы для эффективной деструкции мягких тканей разного типа.

5. Определить пороговые параметры фокусированных импульсно-периодических ультразвуковых полей различной геометрии, позволяющие обвести контуры зоны опасного расположения границы газосодержащих органов вблизи фокуса при гистотрипсии с кипением.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования в диссертационной работе являются нелинейные ударноволновые фокусированные ультразвуковые поля и биологические ткани различного типа (коагулированная кровь, ткань предстательной железы, миокарда и печени). Предметом исследования являются пространственно-временная структура и характеристики ударноволновых ультразвуковых

полей, упругие свойства биологических тканей, а также биоэффекты механического разрушения тканей в рассматриваемых ультразвуковых полях.

Методология исследования

Исследования, проведенные в диссертации, опираются как на классические, так и на новейшие труды российских и зарубежных ученых, посвященные проблемам взаимодействия нелинейных фокусированных ультразвуковых полей с различной пространственной структурой и ударными фронтами различной амплитуды в фокусе на разные по свойствам биологические ткани, а также уточняют и обобщают их.

Моделирование нелинейных аксиально-симметричных фокусированных акустических полей в работе основывалось на измерениях, проведенных с помощью капсульного и оптоволоконного гидрофонов, и реализовывалось в программном комплексе NIFU beam для численного решения уравнения Вестервельта. Необходимые модификации кода программного комплекса, анализ получаемых решений для акустических полей и представление результатов осуществлялось автором на языке программирования MATLAB.

В численных расчетах, а также физических экспериментах по облучению биологических тканей использовались фокусированные многоэлементные пьезоэлектрические преобразователи разного типа: три 12-элементных секторных излучателя с различными фиксированными углами фокусировки, 12-элементная фазированная кольцевая решетка, и 256-элементная спиральная фазированная решетка. Работа NIFU-преобразователей осуществлялась в мегагерцовом диапазоне частот. Планирование и контроль воздействия в реальном времени проводился с помощью датчиков ультразвуковой визуализации, также работающих в мегагерцовом диапазоне. Для управления мощными ультразвуковыми преобразователями и диагностическими датчиками использовалась исследовательская ультразвуковая система с открытой архитектурой Verasonics V1, а также генераторы сигналов, усилители мощности и осциллографы.

Исследование упругих свойств биологических тканей осуществлялось либо методом индентометра на установке, созданной на кафедре акустики физического факультета МГУ, либо методом эластографии сдвиговой волной с помощью системы Aixplorer Supersonic Imagine на базе отделения ультразвуковой диагностики МНОЦ МГУ. Гистологические, цитологические и ультраструктурные исследования проводились в сотрудничестве с отделом клинической патологии МНОЦ МГУ, Институтом морфологии человека РАМН, лабораторией электронной микроскопии биологического факультета МГУ, кафедрой экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ и Центром медицинского и промышленного ультразвука университета штата Вашингтон. Биологические материалы предоставлялись НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Институтом морфологии человека РАМН, а также несколькими животноводческими хозяйствами.

Научная новизна

1. На основе численных и физических экспериментов продемонстрированы различия в поведении ударноволновых параметров в полях ультразвуковых излучателей с различными возможностями динамической фокусировки. Разработаны рекомендации о наиболее выигрышных способах изменения угла фокусировки акустических пучков для достижения заданной амплитуды ударного фронта в фокусе.

2. На модели гематомы человека как примере ткани с малой жесткостью впервые показана зависимость восприимчивости ткани к механическому разрушению методами гистотрипсии от ее степени ретракции при постоянной жесткости. Впервые предложен и реализован метод количественной оценки размеров фрагментов разрушений гематом с применением сканирующей электронной микроскопии. С помощью предложенного метода показана возможность беспрепятственной аспирации ликвидированного содержимого гематомы, а также увеличения скорости разрушения в 8 раз при использовании субмиллисекундных импульсов.

3. Впервые проведено экспериментальное исследование на большой выборке образцов и продемонстрирована возможность механического разрушения доброкачественной и злокачественной опухолей предстательной железы человека методом гистотрипсии с кипением как примера ткани с большой жесткостью. Предложен и реализован способ увеличения скорости разрушения в два раза путем использования коротких ударноволновых импульсов.

4. Предложена концепция пороговой механической дозы, необходимой для механического разрушения ткани. Впервые экспериментально определена связь скорости и эффективности механической абляции биологических тканей с параметрами импульсно-периодического воздействия и типом разрушаемой ткани на примере тканей средней жесткости. Для этого разработан новый нейросетевой алгоритм количественного гистологического анализа механических разрушений в биотканях. Получены количественные оценки пороговой дозы для биологических тканей различного типа.

5. Впервые разработан метод и определены зоны опасного расположения поверхности газосодержащих органов вблизи фокуса ультразвуковых излучателей различной геометрии по численно предсказываемым параметрам акустического поля для режимов гистотрипсии с кипением.

Практическая значимость работы

1. Полученные в работе закономерности, наблюдаемые в нелинейных полях ультразвуковых излучателей с различными возможностями динамической фокусировки, и разработанные рекомендации для электронного и геометрического изменения угла фокусировки акустических пучков могут применяться в различных HIFU-приложениях, основанных на использовании нелинейных волн.

2. Показанная в работе зависимость устойчивости ткани к механическому разрушению от содержания жидкости в ней при постоянной жесткости расширяет понимание механизмов взаимодействия мощных фокусированных ультразвуковых пучков с биологическими тканями. Предложенный метод электронной микроскопии результата механического разрушения биоткани позволяет проводить количественную оценку его эффективности на ультраструктурном уровне. Продемонстрированная с помощью этого метода возможность ускорения ликвификации биологических тканей приближает методы гистотрипсии к их внедрению в клиническую практику.

3. Экспериментально продемонстрированная возможность механического разрушения ткани предстательной железы человека и злокачественной опухоли в ней расширяет спектр клинических приложений мощного фокусированного ультразвука в урологии.

4. Предложенная концепция механической дозы и разработанные рекомендации о ее применении для биологических тканей разного типа могут быть использованы на практике для планирования механического разрушения мягких тканей методом гистотрипсии с кипением. Разработанный нейросетевой алгоритм для количественного гистологического анализа механических разрушений в биотканях позволяет значительно ускорить процесс анализа разрушений, получаемых методом гистотрипсии с кипением.

5. Предложенный способ определения зоны опасного расположения свободной поверхности газосодержащих органов вблизи фокуса ультразвукового излучателя по численно предсказываемому акустическому полю потенциально расширяет возможности планирования безопасной процедуры механической деструкции биологических тканей при клиническом применении методов гистотрипсии.

Положения, выносимые на защиту

1. При электронном смещении фокуса многоэлементных фазированных решеток амплитуда ударного фронта в нем меняется значительно сильнее, чем амплитуда давления при линейной фокусировке (например, при смещении фокуса в сторону решетки с уменьшением давления в линейном поле на 10% амплитуда развитого разрыва увеличивается на 74%). Пред- и постфокальное электронное смещение фокуса приводит к образованию и увеличению в амплитуде, соответственно, пост- и предфокального побочного максимума, с возможным образованием ударных фронтов в постфокальной области. В связи с этим, геометрический способ управления углом фокусировки пучка, позволяющий избежать образования высокоамплитудных побочных максимумов и формирования ударных волн вне фокального пятна, является более предпочтительным по сравнению с электронным способом регулировки угла фокусировки фазированных решеток.

2. С помощью милли- и субмиллисекундных ударно-волновых ультразвуковых импульсов осуществимо неинвазивное механическое разрушение крупной гематомы человека до фрагментов с длиной, не превышающей 210 мкм, и потому не препятствующих их аспирации. Устойчивость гематомы к механическому разрушению определяется не только ее упругим модулем, но и степенью ретракции при постоянной жесткости. Использование субмиллисекундных импульсов по сравнению с миллисекундными позволяет ускорить процесс разрушения в 8 раз (до 2.62 мл/мин) без потери эффективности разрушения.

3. Механическое разрушение ткани предстательной железы человека, а также доброкачественных и злокачественных опухолей в ней осуществимо методом гистотрипсии с кипением и может быть ускорено как минимум в 2 раза путем использования более коротких импульсов (1-мс по сравнению с 10-мс импульсами).

4. Величина пороговой механической дозы как произведения длительности импульсов на их количество на фокус при условии инициации кипения ткани внутри каждого импульса зависит от типа ткани и длительности используемых импульсов. Пороговая механическая доза ниже при использовании коротких импульсов (1–2 мс), при этом длинные импульсы (5–10 мс) лучше разрушают структуру тканей с высоким содержанием упорядоченных коллагеновых структур.

5. При механическом разрушении тканей в непосредственной близости к газосодержащим органам, область их опасного расположения вблизи фокуса ультразвукового излучателя отличается от контуров типичных разрушений, получаемых вдали от воздушной границы, но может быть предсказана по структуре создаваемого ультразвукового поля и нанесена на УЗИ-изображение при планировании безопасного для окружающих органов облучения целевого участка методом гистотрипсии с кипением.

Достоверность результатов

Достоверность и обоснованность представленных в диссертационной работе результатов подтверждается проверочными численными и физическими экспериментами, а также соответствием результатов экспериментов априорной информации, теоретическим расчетам и результатам, полученным в работах других авторов.

Апробация работы

Результаты исследований, представленных в диссертации, докладывались и обсуждались на следующих профильных Всероссийских и международных конференциях: на XXIII, XXV, XXVI, XXIX и XXX Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов” (г. Москва, 11–15 апреля 2016 г., 9–13 апреля 2018 г., 8–12 апреля 2019 г., 11–22 апреля 2022 г., 10–21 апреля 2023 г.), на XV, XVI и XVII Всероссийских школах-семинарах «Волновые явления в неоднородных средах» имени А.П. Сухорукова (г. Можайск, 4–9 июня 2017

г., 27 мая – 1 июня 2018 г., 26–31 мая 2019 г.), на 3-ей Всероссийской акустической конференции (г. Санкт-Петербург, 21–25 сентября 2020 г.), на «Ломоносовских чтениях» 2020 и 2022 (г. Москва, 1–30 октября 2020 г., 15–22 апреля 2022 г.), на XXXIV и XXXV сессиях Российского акустического общества (г. Москва, 14–24 февраля 2022 г., 13–17 февраля 2023 г.), на 19-ом, 20-ом, 21-ом и 22-ом Международном симпозиуме по терапевтическому ультразвуку (г. Барселона, Испания, 13–15 июня 2019 г., г. Кёнджу, Южная Корея, 6–9 июня 2021 г., г. Торонто, Канада, 7 июня – 11 июля 2022 г., г. Лион, Франция, 17 – 20 апреля 2023 г.), 181-ой сессии Американского акустического общества (г. Сизтл, США, 29 ноября 3 декабря 2021 г.), а также на Зимней школе по терапевтическому ультразвуку (г. Лезуш, Франция, 3–8 марта 2019 г.) и обсуждалась на научных семинарах кафедры акустики физического факультета МГУ.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-02-00653а, 18-32-00683, 20-02-00210, 20-32-70142, РФФИ-ОНКО 17-54-33034, РНФ 20-12-00145, стипендий фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС», Президента РФ для обучения за рубежом в 2021/22 учебном году, Правительства РФ по приоритетным направлениям, НОШ МГУ «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» для аспирантов, а также Общества фокусированного ультразвука (FUSF Global Internship program и FUSF Cultivate the Next Generation Program) и Американского акустического общества (ASA International Student Grant).

Публикации

Основные результаты диссертации опубликованы в 38 печатных работах, в том числе в 8 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 статье в рецензируемом научном журнале из перечня ВАК РФ и 29 публикациях в сборниках трудов и тезисов конференций. Список работ автора приведен в конце диссертации перед списком литературы.

Личный вклад автора

Все представленные в диссертационной работе результаты получены автором лично или при его определяющем участии. Предлагаемые задачи и полученные результаты обсуждались совместно с научным руководителем и научным консультантом. Автором лично продумывалась и планировалась подавляющая часть описанных в работе экспериментов, выполняемых далее либо самостоятельно автором, либо совместно с сотрудниками и студентами лаборатории. Автором самостоятельно были найдены внешние организации, способные предоставлять исследуемые биологические материалы для описанных экспериментов, и было установлено сотрудничество с ними. Автором также лично были проведены все этапы компьютерного моделирования ультразвуковых полей, описываемых и исследуемых в работе, а также освоены и реализованы методы микро- и ультраструктурного анализа.

Непосредственно автором был написан оригинальный текст подавляющей части публикаций по представленным в диссертационной работе результатам. Финальная подготовка трудов к публикации проводилась совместно с соавторами, а представление их в редакцию журналов и переписка с редакторами и рецензентами для подавляющего большинства статей осуществлялась автором самостоятельно. Вклад автора в научных трудах [А1, А3, А5, А7–А9] составлял от 1 до 1/2; в научных трудах [А2, А4, А6] от 1/3 до 1/4.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти оригинальных глав, заключения и библиографии. Каждая глава включает в себя краткое введение с обзором литературы в рамках поставленной задачи, оригинальную часть и выводы. Общий объем работы составляет 170 страниц, 79 рисунков, 13 таблиц и 195 библиографических ссылок.

Содержание диссертации

Во Введении к диссертационной работе обосновывается актуальность, новизна и практическая значимость исследуемой проблемы, приводится краткий обзор литературы, сформулированы цели и задачи работы, а также описывается ее краткое содержание по главам.

Первая глава посвящена численным и физическим экспериментам по изучению условий формирования высокоамплитудных ударных фронтов в нелинейных ультразвуковых полях, создаваемых фокусированными многоэлементными излучателями с различными возможностями электронной фазировки и, соответственно, управления структурой и амплитудами создаваемых акустических полей. В предисловии к главе приводится обзор литературы, посвященной особенностям нелинейных фокусированных акустических полей различной структуры, влиянию угла фокусировки акустического пучка на структуру создаваемого им поля и ударноволновые условия в его фокусе, а также закономерностям, наблюдаемым в полях фазированных решеток. В §1.1 на примере трех 12-элементных секторных преобразователей с различными фиксированными углами фокусировки исследуется зависимость пространственной структуры и ударноволновых возможностей акустических пучков от их угла фокусировки. Возможность изменения угла фокусировки без необходимости использования нескольких излучателей появляется при рассмотрении фазированных решеток в §1.2 и §1.3. В §1.2 рассматривается 12-элементная кольцевая решетка с возможностью электронного смещения фокуса вдоль ее оси и, таким образом, изучается поведение нелинейного фокусированного поля фазированной решетки при электронном и геометрическом изменении ее угла фокусировки с последующей формулировкой соответствующих практических рекомендаций. В §1.3 добавляется возможность электронного смещения фокуса поперек оси акустического пучка при использовании 256-элементной спиральной решетки и изучения создаваемых ею ультразвуковых полей. Выводы к

главе 1 представлены в §1.4. Полученные в первой главе результаты характеристики полей различных излучателей используются далее в экспериментах, представленных во всех последующих главах диссертационной работы.

Глава 2 посвящена изучению воздействия мощных импульсных ультразвуковых пучков различной структуры и интенсивности на модель крупной гематомы человека как примера ткани с малой жесткостью. В предисловии к главе представлен обзор литературных источников, изучающих крупные гематомы человека как клиническую проблему, обсуждающих существующие и предлагаемые способы ее лечения, а также исследующих различные свойства гематом. В §2.1 экспериментально исследуются такие свойства рассматриваемой модели, как сдвиговой модуль, степень ретракции, микро- и ультраструктура, и их поведение с течением времени. Экспериментальная демонстрация возможности механического разрушения модели крупной гематомы с помощью фокусированных ударноволновых ультразвуковых импульсов и ультраструктурный анализ получаемого результата описывается в §2.2. В §2.3 изучается зависимость эффективности получения объемного разрушения гематомы от траектории перемещения фокуса внутри целевого объема вдоль оси излучателя и формулируются практические рекомендации. Результаты ускорения процесса разрушения путем использования более коротких акустических импульсов представлены в §2.4. Влияние свойств крупных гематом человека на их восприимчивость к ультразвуковому механическому разжижению экспериментально исследуется в §2.5. Выводы ко второй главе приведены §2.6.

Третья глава, на контрасте с предыдущей, рассматривает механическое воздействие ударноволновых импульсных пучков на модель ткани предстательной железы человека как примера ткани с большой жесткостью. В предисловии к главе объясняется актуальность рассмотрения такой модели ткани, приводится обзор литературы, посвященной сложностям механического разрушения этой ткани и изучению ее свойств. В экспериментах, описанных в этой главе, используются аутопсийные образцы простаты человека *ex vivo*. В §3.1 экспериментально исследуются их упругие свойства и обосновывается адекватность такой модели для дальнейших экспериментов. Далее в §3.2 представлены результаты исследования зависимости скорости и эффективности неинвазивного механического разрушения образцов предстательной железы человека от длительности используемых ударноволновых импульсов. В §3.3 впервые демонстрируется возможность механической деструкции раковой опухоли простаты человека с помощью миллисекундных ультразвуковых импульсов. В §3.4 приводятся выводы к третьей главе.

Четвертая глава посвящена разработке концепции пороговой механической дозы, необходимой для эффективной механической деструкции мягких биологических тканей. В предисловии к главе представлен обзор работ, посвященных уже установленной концепции дозы

теплового ультразвукового воздействия и представляющих известные на настоящий момент закономерности, наблюдаемые при механическом разрушении биологических тканей различного типа ультразвуком, а также предлагается концепция механической дозы. Предварительные эксперименты по изучению зависимости эффективности механического разрушения мягкой ткани от траектории движения фокуса поперек оси акустического пучка приведены в §4.1 с формулировкой соответствующих практических рекомендаций. В §4.2 описывается акустическая часть проведенной в работе серии экспериментов, направленных на определение связи скорости и эффективности механической деструкции биотканей с используемыми параметрами ультразвукового воздействия и типом разрушаемой ткани. Для количественной оценки скорости и эффективности оказанного воздействия в работе использовался гистологический анализ и разрабатывался нейросетевой алгоритм его реализации, описываемые в §4.3. Полученные таким образом результаты представлены в §4.4, а формулируемые из них выводы и практические рекомендации приводятся в §4.5.

Последняя глава работы посвящена исследованию возможностей планирования безопасного механического воздействия на мягкие биологические ткани вблизи воздухосодержащих органов, представляющих свободную поверхность для падающих акустических волн. В предисловии к главе приводится обзор литературы, посвященной изучению взаимосвязи формы и размеров механических повреждений биотканей от структуры вызывающих их акустических полей. В §5.1 описывается методика проведенной в работе серии акустических экспериментов по воздействию импульсными фокусированными ультразвуковыми пучками различной геометрии на модель крупной гематомы вблизи ее плоской границы с воздухом. Создаваемые в экспериментах ультразвуковые поля были численно смоделированы в §5.2 при учете их отражения от плоской воздушной границы. Корреляция результатов физического эксперимента и численного моделирования приведена в §5.3. Выводы к главе 5 сформулированы в §5.4.

В конце рукописи кратко сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы, благодарности, публикации автора и список литературы.

Глава 1

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ УДАРНОВОЛНОВЫХ ПОЛЕЙ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ ИЗЛУЧАТЕЛЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ДИНАМИЧЕСКОЙ ФОКУСИРОВКИ

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A1, A3].

Быстро растущий во всем мире интерес к использованию высокоинтенсивного фокусированного ультразвука (HIFU) для неинвазивных терапевтических и хирургических приложений, от гипертермии и тепловой абляции, уже используемых в клинической практике [57–59], до новых методов механической абляции, таких как гистотрипсия [31, 39, 42, 60], вызвало множество исследований как в области акустики, так и в биоинженерии. В основе всех HIFU-методов лежит способность ультразвуковых волн беспрепятственно распространяться через мягкие биологические ткани, что позволяет использовать их для неинвазивного воздействия на различные структуры внутри организма человека. Фокусировка ультразвукового пучка обычно осуществляется с помощью излучателя, находящегося вне тела человека через согласующую среду, например, воду или ультразвуковой гель, и достигаемый результат воздействия зависит от интенсивности ультразвуковой волны в фокусе пучка и выбранного режима облучения.

В частности, при достаточно низких интенсивностях ультразвуковой волны (до нескольких сотен Вт/см²), не приводящих к значительным нелинейным эффектам и, соответственно, формированию ударного фронта в фокусе, поглощение энергии волны и нагрев объемов ткани несильно отличается от случая линейной фокусировки [11, 61]. В результате нагрева ткани в фокальной области ультразвукового пучка и при достаточном времени поддержания ее температуры выше 43°C, происходит ее тепловой некроз, что лежит в основе, например, методов низкотемпературной гипертермии и высокотемпературной тепловой HIFU-абляции [62]. В случае гармонических волн, мощность тепловых источников прямо пропорциональна интенсивности ультразвуковой волны, т.е. квадрату акустического давления, а также коэффициенту поглощения ультразвука целевой тканью, который, в свою очередь, для мягких биологических тканей почти линейно зависит от частоты.

При более высоких интенсивностях ультразвука в фокусе (порядка и больше 1 кВт/см²) при его распространении через мягкие ткани начинают проявляться нелинейные эффекты, приводящие к сильному искажению профиля волны и формированию ударного фронта в фокальной области акустического пучка [40]. Поскольку поглощение ультразвуковой энергии увеличивается с частотой ультразвука, дополнительное тепловыделение в области фокуса пучка на формирующихся разрывах значительно увеличивает скорость нагрева ткани [34, 40, 41]. Это может приводить к возникновению различных эффектов, таких, например, как быстрое

локализованное вскипание биоткани или образование кавитационных пузырьков из-за сниженного порога кавитации нагретой ткани. Оба этих эффекта способны механически разрушать биологическую ткань и потому используются в новых методах неинвазивной хирургии, получивших общее название гистотрипсии [31].

Способность явления кавитации механически разрушать биологические ткани в терапевтических целях уже давно обсуждается в литературе и используется в медицинских HIFU-приложениях [9, 63, 64]. Этот эффект заключается в том, что помимо безынерционных осцилляций образовавшихся пузырьков в падающей акустической волне, при достаточной интенсивности поля может произойти резкий рост кавитационного облака и сильный инерционный коллапс пузырьков, в результате чего ткань разрушается комбинацией эффектов механического растяжения, возникающих ударных волн, микроструй и т.д. [65–68]. На этом основан метод гистотрипсии, впервые предложенный учеными университета штата Мичиган в 2004 году, и названный кавитационной гистотрипсией [30–32]. Основным механизмом в образовании мощного кавитационного облака считается отражение асимметричного за счет совместного действия нелинейных и дифракционных эффектов в фокусированных пучках ударного фронта с высоким пиковым положительным давлением от одиночного пузырька, приводящее к инверсии ее полярности и, в результате, формированию области очень высокого отрицательного давления, которое, в свою очередь, приводит к образованию и росту кавитационного облака [69]. В связи с этим, одним из ключевых параметров для реализации метода кавитационной гистотрипсии является амплитуда ударного фронта в падающей ультразвуковой волне, которая, как правило, должна превысить некоторое пороговое значение.

Другой тип гистотрипсии, предложенный в 2010 году совместно учеными из МГУ им. М.В. Ломоносова и университета штата Вашингтон, основан на еще одном эффекте, который может возникать в биологических тканях при фокусировке в них акустических пучков, содержащих ударные фронты в фокусе [39, 42]. Как уже было сказано, формирование ударных фронтов в ультразвуковом поле неразрывно связано с образованием в акустическом поле высших гармоник, энергия которых значительно быстрее поглощается тканью, т.к. коэффициент поглощения ультразвука растет с его частотой. При этом полное тепловыделение оказывается пропорционально третьей степени амплитуды ударного фронта [34, 40, 41]: $Q = \beta f_0 A_s^3 / (6c_0^4 \rho_0^2)$. Такое интенсивное поглощение энергии ультразвуковой волны биотканью способно нагреть ее до температуры кипения в течение нескольких миллисекунд. В результате локального вскипания биоткани и последующего взрывного роста и охлаждения пузыря кипения образуются парогазовые полости миллиметровых размеров, заполненные паром, которые представляют собой свободную границу для проходящих ударных волн. Это, в свою очередь, приводит к комбинации эффектов акустического фонтана из биоткани внутрь парогазового пузыря за счет

акустической радиационной силы, приповерхностной кавитации у границы пузыря и атомизации биоткани на мелкие фрагменты [43–45]. Такой тип гистотрипсии получил название гистотрипсии с кипением (ГК) [39, 42]. Поскольку в этом методе основным механизмом, запускающим каскад разрушительных эффектов в биоткани, является ее кипение, время достижения которого определяется скоростью тепловыделения при поглощении энергии ударных фронтов, то ключевым параметром для реализации метода гистотрипсии с кипением является амплитуда ударного фронта в профиле волны в фокусе пучка, третьей степени которой пропорциональна скорость тепловыделения.

Таким образом, для реализации методов гистотрипсии, которым посвящена настоящая диссертационная работа, необходимо контролировать и обеспечивать достижение определенных значений амплитуды ударного фронта в фокальной области ультразвукового пучка. При этом достижимые параметры акустической волны в фокусе пучка в первую очередь определяются его углом фокусировки, или же его диафрагменным числом ($F\#$), определяемым как отношение фокусного расстояния пучка к его апертуре [54–56]. Как правило, более сфокусированные излучатели (т.е. с большим углом фокусировки, или низким $F\#$) способны создавать более высокие уровни давления и амплитуды разрыва, но требуют более высокой акустической мощности для формирования ударных фронтов в фокусе за счет значительного уменьшения размера фокального пятна и тем самым области накопления нелинейных эффектов. Таким образом, использование излучателей с разными углами фокусировки позволяет контролировать достижимые амплитуды ударного фронта, необходимые для конкретного HIFU-приложения.

В качестве альтернативы излучателям с фиксированным углом фокусировки возможно использование многоэлементных фазированных решеток, которые позволяют осуществлять динамическую фокусировку за счет введения на отдельные элементы фазовых задержек, необходимых для смещения фокуса в целевую точку, отличную от геометрического фокуса [70–72]. Таким образом, электронное смещение фокуса вдоль оси решетки также может регулировать угол фокусировки и, тем самым, контролировать достижимые уровни давления и ударного фронта в фокусе. Однако известным недостатком электронного перемещения фокуса фазированных решеток является уменьшение амплитуды поля в фокусе и образование нежелательных побочных максимумов, которые при достаточной интенсивности могут привести к повреждению тканей за пределами целевой области [70, 72].

Ранее некоторые многоэлементные решетки, работающие в нелинейных режимах, были численно охарактеризованы для использования в различных терапевтических приложениях [71, 73–75]. Было показано, что при постфокальном смещении фокуса решетки уменьшается амплитуда давления в основном максимуме ее поля, при этом формируется предфокальный побочный максимум, смещающийся ближе к фокусу и увеличивающийся по амплитуде с

увеличением дальности смещения фокуса. При этом, однако, возможные нелинейные эффекты в побочном максимуме по-прежнему требуют тщательного рассмотрения, поскольку они могут привести к образованию ударных волн за пределами фокальной области и, как следствие, нежелательному повреждению присутствующих там биологических тканей.

Таким образом, целью настоящей главы диссертационной работы являлась характеристика фокусированных ультразвуковых полей различного типа и геометрии, использующихся далее в работе в экспериментах по гистотрипсии, а также исследование нелинейных эффектов и ударноволновых условий в фокусе и возможных побочных максимумах.

§1.1 Секторные излучатели с фиксированными углами фокусировки

В качестве примера ультразвуковых излучателей без возможности динамического смещения фокуса, в настоящем параграфе рассматриваются три секторных излучателя с различными фиксированными углами фокусировки, используемые далее для экспериментальных исследований в Главах 2, 3 и 5 настоящей диссертации. Характеризуются их линейные и нелинейные акустические поля путем комбинации гидрофонных измерений и численного моделирования, а также изучается влияние угла фокусировки на создаваемые акустические поля.

Рассматривались излучатели, работающие на частоте 1.5 МГц и состоявшие из 12 пьезоэлектрических элементов, расположенных на сферически вогнутой пластиковой линзе через акустически согласующий слой эпоксидной смолы. Излучатели имели почти одинаковую апертуру A , одинаковый диаметр O центрального отверстия для возможности крепления диагностического датчика, но разные радиусы кривизны F (т.е. фокусные расстояния) для задания различных углов фокусировки α и, соответственно, диафрагменных чисел: $F\# = 0.77, 1.02$ и 1.51 (Рис. 1.1, Табл. 1.1).

Характеризация акустических полей рассматриваемых излучателей проводилась путем комбинации гидрофонных измерений и численного моделирования уравнения Вестервельта с использованием приближения аксиально-

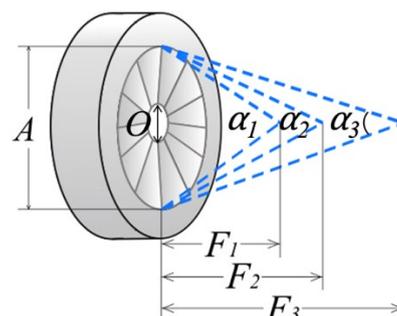


Рис. 1.1. Иллюстрация геометрии трех ультразвуковых излучателей с различными углами фокусировки: A – апертура, O – диаметр центрального отверстия, F_1, F_2, F_3 – фокусные расстояния, $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ – углы фокусировки.

	F , мм	A , мм	O , мм	$F\#$	α
Сильно-фокусированный	56.4	73	24	0.77	81°
Средне-фокусированный	76.8	75	24	1.02	58°
Слабо-фокусированный	118.1	78	24	1.51	39°

Табл. 1.1. Номинальные параметры трех рассматриваемых секторных излучателей: F – фокусное расстояние, A – апертура, O – диаметр центрального отверстия, $F\#$ – диафрагменное число ($F\# = F / A$), α – угол фокусировки, S – полная площадь поверхности сферического кольцевого сегмента излучателя.

симметричного эквивалентного излучателя с помощью программного комплекса HIFU beam [76, 77]. Программный комплекс был разработан в Лаборатории медицинского и промышленного ультразвука МГУ имени М.В. Ломоносова и позволяет моделировать нелинейные аксиально-симметричные фокусированные ультразвуковые поля, содержащие ударные фронты, на основе широкоугольного параболического представления уравнения Вестервелта. Номинальные геометрические параметры излучателей были известны (Табл. 1.1), однако корпус, а также поверхностные волны на излучателе ограничивают и искажают колебания их поверхности, приводя к формированию акустического поля, отличного от теоретически ожидаемого [78]. В связи с этим, сначала для каждого излучателя подбирались эффективные геометрические параметры эквивалентных одноэлементных излучателей с отверстием, а также соотношение подаваемого на излучатель напряжения в эксперименте и давления на его поверхности, которые затем использовались в качестве граничных условий при численном моделировании.

1.1.1 Калибровочные измерения в воде

Для каждого из трех излучателей калибровочные измерения акустических полей проводились в два этапа: в малоамплитудном линейном режиме с помощью капсульного гидрофона и в высокоамплитудном нелинейном режиме с помощью оптоволоконного гидрофона (Рис. 1.2а). Вода в измерительном бассейне предварительно дегазировалась в течение 1 часа с помощью системы очистки и дегазации воды Precision Acoustics WTS (Dorset, UK).

На этапе малоамплитудной характеристики излучателей измерялись распределения амплитуды акустического давления вдоль оси пучка и поперек нее в фокальной плоскости с использованием калиброванного капсульного гидрофона (HGL-0200 с предварительным усилителем АН-2020, полосой пропускания 1–20 МГц и апертурой 200 мкм, Onda Corp., Саннивейл, Калифорния) [56, 78]. Полученные экспериментальные распределения амплитуды

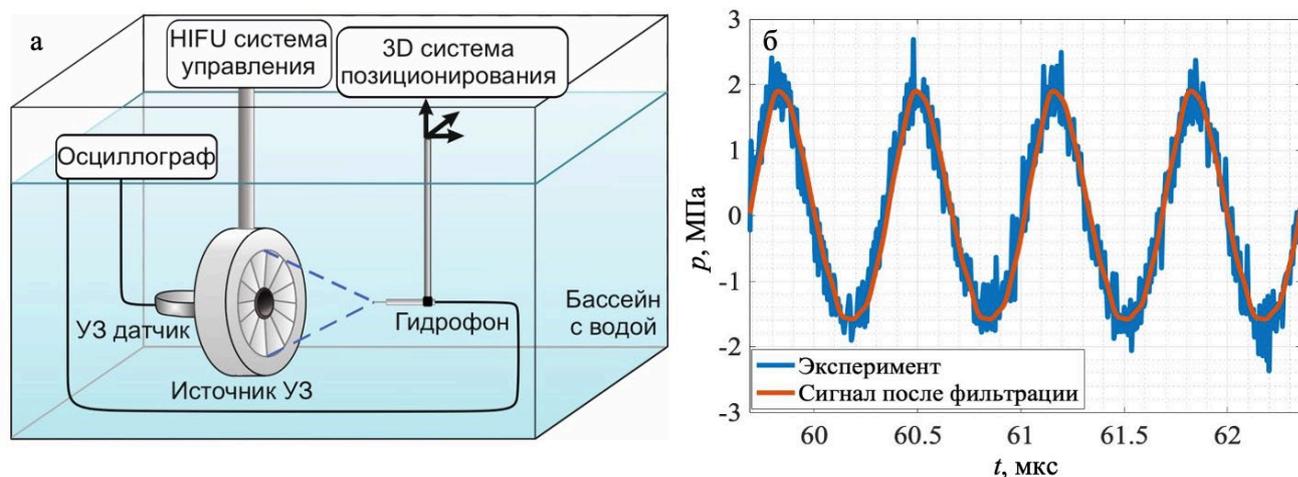


Рис. 1.2. (а) Схема экспериментальной установки для гидрофонных измерений. (б) Иллюстрация применения фильтрации экспериментального профиля волны для определения амплитуды давления.

давления в линейном режиме использовались далее для подбора геометрических параметров эквивалентного источника в численном моделировании, описанном п. 1.1.2.

На этапе высокоамплитудной характеристики излучателей с помощью оптоволоконного гидрофона (FOPH2000, диаметр оптического волокна 100 мкм, полоса пропускания 100 МГц, RP Acoustics, Лойтенбах, Германия) сначала определялось положение фокуса излучателя по максимуму пикового положительного давления на оси пучка. Расстояние от излучателя до точки фокуса определялось по задержке отраженного от расположенного в ней гидрофона акустического импульса, излучаемого вспомогательным ультразвуковым источником, закрепленным в центральной отверствии излучателя (Рис. 1.2а) и подключенным к цифровому осциллографу. В найденной точке фокуса измерялись формы волны давления при увеличивающемся напряжении на источнике. Из полученных экспериментальных форм волны определялись значения пикового положительного и отрицательного давлений, усредненные по четырем–пяти периодам в стационарной части импульса, в зависимости от подаваемого напряжения, и таким образом строились кривые насыщения. Поскольку при небольших амплитудах давления уровень шумов гидрофона (1–2 МПа) может быть сравним с полезным сигналом, на низких напряжениях для определения пиковых значений положительного и отрицательного давления использовалось усреднение сигнала по нескольким периодам в стационарной части импульса и фильтрация, пропускающая частоты, кратные основной (Рис. 1.2б). Полученные экспериментальные кривые насыщения использовались далее в п. 1.1.2 для определения соотношения между подаваемым на излучатель напряжением в эксперименте и амплитудой колебательной скорости (или, давления) на поверхности эквивалентного излучателя, используемого в качестве граничного условия при моделировании.

1.1.2 Численное моделирование

Численный расчет акустических полей трех рассматриваемых излучателей также включал два этапа (малоамплитудный и высокоамплитудный) и проводился в программном комплексе NIFU beam, решающем уравнение Вестервельта (1.1) для нелинейных аксиально-симметричных пучков в широкоугольном параболическом приближении [76, 77]:

$$\frac{\partial^2 p}{\partial \tau \partial z} = \frac{c_0}{2} \Delta p + \frac{\beta}{2\rho_0 c_0^3} \frac{\partial^2 p^2}{\partial \tau^2} + \frac{\delta}{2c_0^3} \frac{\partial^3 p}{\partial \tau^3} + L_a(p), \quad (1.1)$$

где p – акустическое давление, τ – время в бегущей системе координат, z – пространственная координата вдоль оси пучка, $\Delta p = \partial^2 p / \partial z^2 + \partial^2 p / \partial r^2 + \frac{1}{r} \partial p / \partial r$ – лапласиан в радиально-симметричном случае, ρ_0 , c_0 , β , δ – плотность, адиабатическая скорость звука, коэффициент нелинейности и коэффициент термовязкого поглощения в среде распространения, соответственно, и $L_a(p)$ – оператор, описывающий степенной закон поглощения и дисперсию.

На первом этапе численного моделирования рассчитывалось поле акустического давления вдоль и поперек оси пучка при линейной фокусировке (т.е. при низких амплитудах давления на излучателе p_0). Варьируя граничные условия (апертуру, фокусное расстояние, диаметр центрального отверстия и давление на излучателе), подбирались геометрические параметры каждого излучателя, близкие к номинальным, а также предварительное начальное давление на нем $p_0 = \rho c u_0$ таким образом, чтобы получаемые численные распределения давления наилучшим образом аппроксимировали измеренные с помощью капсульного гидрофона в п. 1.1.1. В линейном режиме также определялись размеры фокальной области по уровню -6 дБ и нулевому уровню давления, а также коэффициент усиления по давлению G , равный отношению амплитуд максимального давления в создаваемом поле p_{\max} и давления на излучателе p_0 .

На втором этапе численного расчета амплитуда давления на излучателе p_0 увеличивалась пропорционально увеличению напряжения V_0 на источнике в эксперименте. В точке максимального пикового положительного давления p^+ в режиме начала формирования разрыва определялись зависимости пиковых значений положительного p^+ и отрицательного p^- давлений от начального давления на источнике p_0 – т.е. теоретические кривые насыщения. В результате, коэффициент связи напряжения V_0 , подаваемого на излучатель в эксперименте, с давлением на поверхности эквивалентного излучателя p_0 определялся сопоставлением экспериментальных кривых насыщения с теоретическими в основном в квазилинейном режиме, поскольку экспериментально измеряемые пиковые давления в нелинейном фокусированном поле могут быть занижены за счет сравнимых размеров чувствительной зоны оптоволоконного гидрофона и ширины нелинейного фокального пятна. В точке максимального давления численно рассчитанных акустических полей при различных давлениях на излучателе p_0 также определялась амплитуда разрыва A_s как разность давлений между моментами времени не более 0.006 мкс друг от друга, в которых производная давления по времени уменьшается до 2.5% от ее максимального значения [54, 55, 79, 80]. По полученной зависимости амплитуды разрыва в фокусе A_s от амплитуды давления на излучателе p_0 были определены условия формирования развитого разрыва в фокусе каждого излучателя по максимуму отношения $A_s / p_0 = (A_s / p_0)_{\max}$, что также характеризуется равенством амплитуды разрыва пиковому положительному давлению: $A_s = p^+$. В найденном режиме развитого разрыва были также определены размеры формируемого фокального пятна излучателей по уровню -6 дБ и нулевому уровню пикового положительного давления, а также коэффициент усиления по давлению.

1.1.3 Результаты

Рис. 1.3а,б показывает хорошее соответствие между распределениями амплитуды давления при линейной фокусировке, полученными в эксперименте и путем численного моделирования с подобранными эффективными геометрическими параметрами эквивалентных излучателей. В

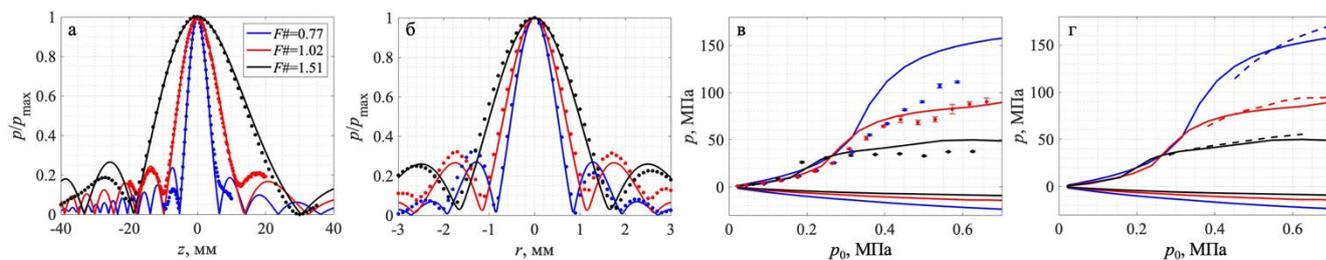


Рис. 1.3. (а–б) Нормированные распределения давления в линейном пучке вдоль оси (а) и поперек нее в фокальной плоскости (б), измеренные с помощью гидрофона в воде (символы) и рассчитанные численно (сплошные кривые). (в) Экспериментальные (символы) и теоретические (сплошные кривые) кривые насыщения пикового положительного (p^+) и отрицательного (p^-) давлений в зависимости от амплитуды давления на излучателе p_0 . (г) Теоретические кривые насыщения для p^+ , p^- и амплитуды разрыва A_s (пунктирные кривые) в фокусе. Результаты для излучателя с диафрагменным числом $F\# = 0.77$ показаны синим цветом, для $F\# = 1.02$ – красным, и для $F\# = 1.51$ – черным.

Табл. 1.2 можно видеть, что подобранные эффективные геометрические размеры излучателей близки к их номинальным параметрам, кроме центрального отверстия, эффективный диаметр которого превышает номинальный на 25%, что, вероятно, связано с экранированием значительной площади активной поверхности излучателя его корпусом.

На Рис. 1.3в видно хорошее соответствие экспериментальных и теоретических кривых насыщения в квазилинейном режиме при подобранном коэффициенте связи p_0 / V_0 на излучателе, а также ожидаемо заниженные значения амплитуды пикового положительного давления в эксперименте. Кривые насыщения на Рис. 1.3г показывают, что в полях более фокусированных излучателей ударные фронты образуются при более высоких давлениях на излучателе и имеют более высокие амплитуды (Табл. 1.3), что согласуется с литературными данными [56].

	Сильно-фокусированный			Средне-фокусированный			Слабо-фокусированный		
	Ном.	Эфф.	Отн.	Ном.	Эфф.	Отн.	Ном.	Эфф.	Отн.
F , мм	56.4	60	+6.4%	76.8	80	+4.2%	118.1	120	+1.7%
A , мм	73	72.7	-0.4%	75	71	-5.3%	78	75	-3.9%
O , мм	24	30	+25%	24	30	+25%	24	30	+25%
$F\#$	0.77	0.83	+7.8%	1.02	1.13	+10.8%	1.51	1.6	+6%
α ,	80.7	74.6	-7.6%	58.5	52.7	-10%	38.6	36.4	-5.7%
p_0 / V_0 , кПа / В	4.508			4.76			3.128		

Табл. 1.2. Номинальные параметры секторных излучателей и подобранные эффективные параметры эквивалентных им одноэлементных излучателей: F – фокусное расстояние, A – апертура, O – диаметр центрального отверстия, $F\#$ – диафрагменное число ($F\# = F / A$), α – угол фокусировки, p_0 – амплитуда давления на излучателе, V_0 – напряжение, экспериментально подаваемое на излучатель. В столбцах «Отн.» приведено относительное отличие эффективных параметров от номинальных.

		G		$\delta_{\parallel}(0)/(-6\text{дБ}), \text{мм}$		$\delta_{\perp}(0)/(-6\text{дБ}), \text{мм}$		$p_0^{\text{разв}}, \text{МПа}$	$W_0^{\text{разв}}, \text{Вт}$	$A_s^{\text{разв}}, \text{МПа}$
		p^+	p^-	p^+	p^-	p^+	p^-			
Сильно-фокусированный	Лин	67	63	11.7 / 6.9	11.7 / 7.1	1.7 / 1	1.7 / 1	0.54	381	143.5
	НЛ	267	37	12.7 / 4.2	12.2 / 8.9	1.7 / 0.3	1.8 / 1.5			
Средне-фокусированный	Лин	46	41	23.7 / 13.5	23.8 / 14.4	2.3 / 1.3	2.3 / 1.5	0.43	212	73.6
	НЛ	175	26	26 / 8.7	24.7 / 17.1	2.3 / 0.4	2.5 / 2			
Слабо-фокусированный	Лин	33	30	49.2 / 27.7	49.3 / 28.8	3.3 / 1.9	3.4 / 2.1	0.31	125	37.3
	НЛ	120	19	55.1 / 18.6	51.5 / 33.9	3.2 / 0.6	3.6 / 2.8			

Табл. 1.3. Параметры численно рассчитанных полей секторных излучателей при линейной фокусировке (Лин) и при нелинейной (НЛ) в режиме формирования развитого разрыва: G – коэффициент усиления по давлению, δ_{\parallel} и δ_{\perp} – продольный и поперечный размеры фокального пятна между нулями давления и по уровню спада давления на 6 дБ, $p_0^{\text{разв}}$ и $W_0^{\text{разв}}$ – амплитуда давления на поверхности излучателя и его акустическая мощность, необходимые для формирования в фокусе развитого разрыва с амплитудой $A_s^{\text{разв}}$.

Нелинейное насыщение акустических параметров пучка при этом также достигается при более высоких давлениях на излучателе и имеет большие амплитуды в более фокусированных пучках.

В Табл. 1.3 также приведены коэффициенты усиления по давлению и размеры фокального пятна излучателей с различными углами фокусировки в линейном случае и в режиме формирования развитого разрыва в фокусе. Двумерные распределения пикового положительного и отрицательного давлений приведены на Рис. 1.4. Видно, что вне зависимости от степени проявления нелинейных эффектов, более фокусированные излучатели формируют фокальное пятно меньших размеров как вдоль, так и поперек оси, с большим углом схождения боковых лепестков, что согласуется с литературой [56]. При формировании ударных фронтов в фокусе пучка область локализации пикового положительного давления, определяемая по уровню -6 дБ заметно уменьшается (на 33–39% и 68–70% вдоль и поперек оси, соответственно), в то время как область отрицательного давления, наоборот, увеличивается (на 18–25% и 33–50% вдоль и поперек оси, соответственно) (Рис. 1.4, Табл. 1.3). Кроме того, в режиме формирования развитого ударного фронта точка максимального давления не совпадает с геометрическим фокусом и расположена в предфокальной области, что также согласуется с литературой [81].

1.1.4 Выводы к параграфу §1.1

В настоящем параграфе на основе гидрофонных измерений были численно охарактеризованы поля трех 12-элементных секторных излучателей с различными фиксированными углами фокусировки путем подбора эквивалентных одноэлементных сферически-вогнутых излучателей с центральным отверстием. Исследовано влияние угла фокусировки на структуру малоамплитудного линейного ультразвукового поля, а также на условия формирования ударного фронта в профиле волны и нелинейного насыщения в фокусе

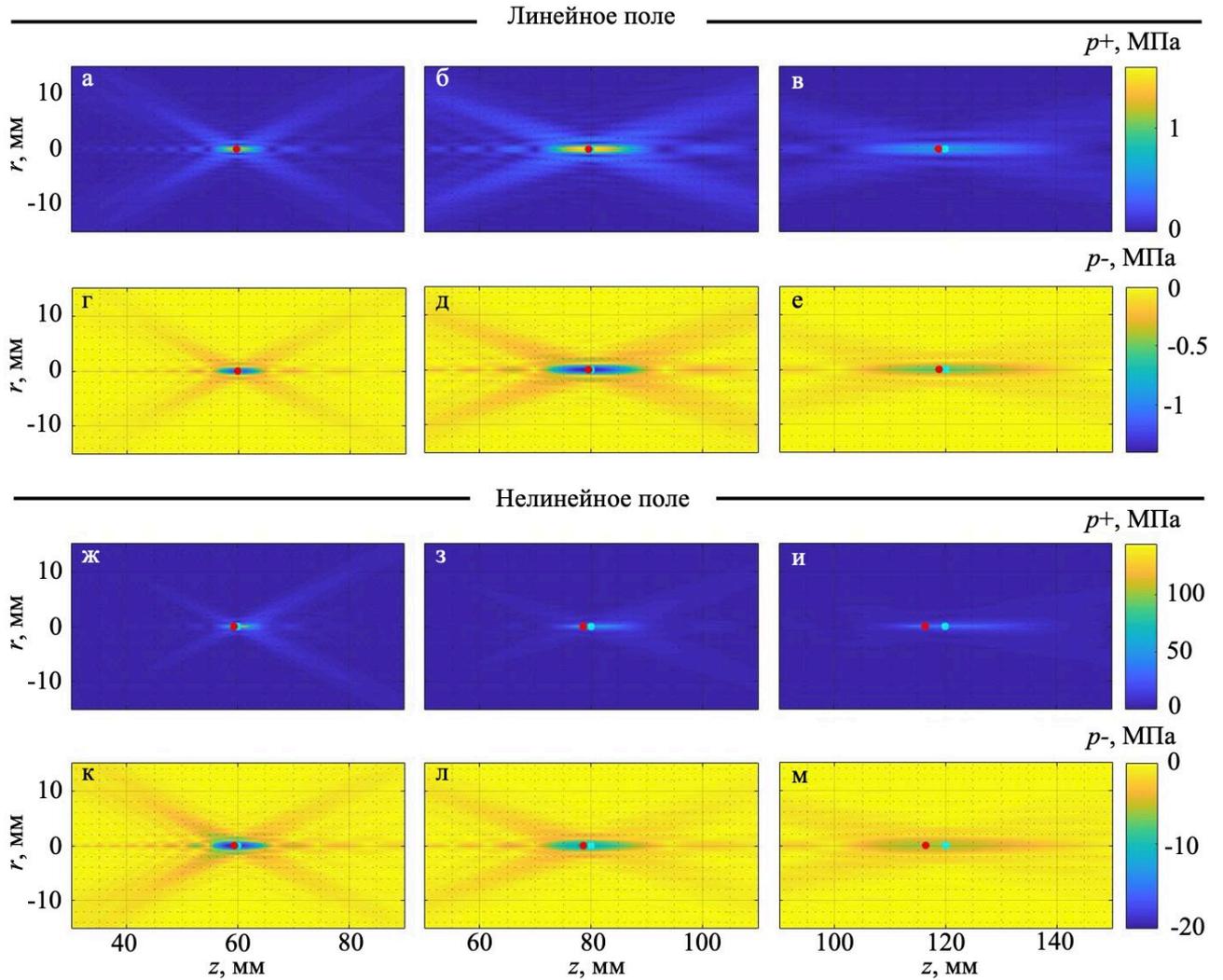


Рис. 1.4. Численно рассчитанные двумерные пространственные распределения пикового положительного (а–в, ж–и) и отрицательного (г–е, к–м) давлений в аксиальной плоскости при линейной фокусировке (а–е) и в режиме формирования развитого разрыва (ж–м). На каждом распределении указан геометрический фокус (голубая точка) и точка максимума положительного давления (красная точка). Излучатель расположен слева от каждого из распределений.

высокоамплитудного ультразвукового пучка. Показано, что в полях более фокусированных излучателей фокальное пятно имеет меньшие размеры в продольном и поперечном направлениях и больший угол схождения боковых лепестков. Для образования развитого разрыва в поле более фокусированных излучателей требуется более высокая мощность на излучателе, при этом амплитуда образующихся ударных фронтов и амплитуда их насыщения оказываются выше.

§1.2 Кольцевая фазированная решетка

Как уже было сказано в предисловии к настоящей главе, альтернативой ультразвуковым излучателям с фиксированным углом фокусировки могут служить многоэлементные фазированные решетки, позволяющие перемещать фокус акустического пучка электронным образом путем введения необходимых фазовых задержек на отдельные элементы решетки [70–

72]. В результате эффективный угол фокусировки решетки можно изменять динамически и тем самым контролировать структуру и достижимые амплитуды акустического поля. Помимо электронной регулировки угла фокусировки, в случае кольцевых аксиально-симметричных решеток его также можно изменять путем включения и отключения внешних элементов решетки, изменяя таким образом геометрически эффективную апертуру излучателя.

Два вышеупомянутых подхода к регулировке угла фокусировки с помощью многоэлементных решеток (т.е. электронное управление фокусом или включение/отключение элементов) принципиально различаются и потому требуют сравнительного анализа вносимых ими линейных и нелинейных эффектов. Целью этой части работы было численное исследование эффектов электронной и геометрической регулировки угла фокусировки фазированной решетки с точки зрения параметров ее линейного и нелинейного акустических полей.

В качестве примера фазированной решетки с возможностью электронного перемещения фокуса вдоль ее оси, в настоящем параграфе рассматривается 12-элементная кольцевая фазированная решетка, используемая далее для экспериментальных исследований, описанных в Главах 3–4 настоящей диссертации. Рассматриваемая решетка (Imasonic, France) работающая на частоте 2 МГц, состояла из 12 колец равной площади с расстоянием между ними 0.5 мм, расположенных на сферически вогнутой поверхности с апертурой 10 см, диаметром центрального отверстия 4 см и фокусным расстоянием 8 см (Рис. 1.5) [82]. Номинальные параметры решетки использовались в качестве граничного условия как для аналитических расчетов с помощью интеграла Рэлея [83, 84], так и для численного моделирования в широкоугольном параболическом приближении уравнения Вестервельта с помощью программного комплекса NIFU beam [76, 77].

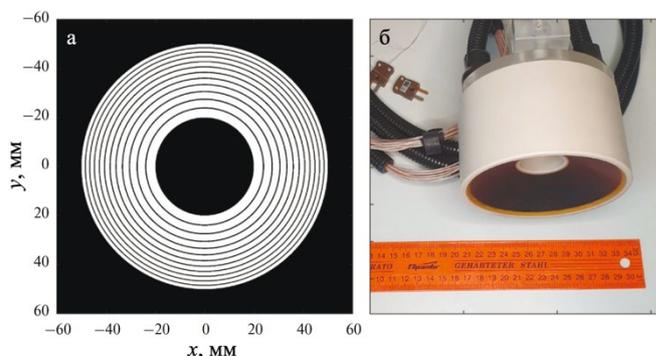


Рис. 1.5. Схема (а) и фотография (б) исследуемой кольцевой фазированной решетки [82].

1.2.1 Акустическая модель и ее обоснование

Методы

Как численные, так и аналитические расчеты акустического поля решетки проводились в приближении равномерности распределения амплитуды колебательной скорости u_0 на поверхности решетки. В связи с этим, для обоснования предложенного подхода к моделированию, основанного на широкоугольном приближении эффектов дифракции и предположении о равномерно колеблющейся поверхности решетки, ее линейное поле без смещения фокуса было смоделировано в программе NIFU beam, а также рассчитано

аналитически на основе интеграла Рэлея для сферически вогнутого излучателя [83, 84], и оба результата затем сравнивались с экспериментальными данными, полученными ранее в работе [82] методом акустической голографии.

Численное моделирование ультразвуковых полей, создаваемых различными конфигурациями решетки, проводилось с помощью программы NIFU beam, ранее использованной в §1.1 [76, 77]. Графический интерфейс программы позволяет отключать определенные кольца решетки путем обнуления амплитуды колебательной скорости их поверхности, а также осуществлять электронное управление фокусом путем автоматического расчета необходимых фаз на основе задержек сигналов, распространяющихся к фокусу от центра каждого кольца, определяемого как полусумма его внутреннего и внешнего зенитных углов. Акустические поля рассчитывались в двумерном пространственном окне с диапазоном [0; 160] мм вдоль оси, что составляет двойное фокусное расстояние, и радиальным диапазоном [-100; 100] мм. Шаг дискретизации вдоль и поперек оси составляли, соответственно, 0.05 мм и 0.025 мм. Все расчеты проводились в воде с акустическими параметрами, характерными для 19°C: скорость звука $c = 1479.2$ м/с, плотность $\rho = 997.8$ кг/м³, коэффициент нелинейности $\beta = 3.5$, коэффициент диффузии звука $\delta = 4.33$ мм²/с [85].

Аналитическое решение для распределения давления вдоль оси решетки $p(z)$ и поперек нее в фокальной плоскости $p(r)$ были получены из аналитического решения интеграла Рэлея для сферически вогнутого излучателя путем суперпозиции полей отдельных элементов решетки [83]:

$$p(z) = \sum_{m=1}^{12} -\frac{2i\rho c u_0}{1 - \frac{z}{F}} \exp\left(i\frac{k}{2}(L_m^{\max} + L_m^{\min})\right) \sin\left(\frac{k}{2}(L_m^{\max} - L_m^{\min})\right) \quad (1.2)$$

$$p(r) = \sum_{m=1}^{12} p_m(r) \quad (1.3)$$

$$p_m(r) = \frac{i\rho c u_0 F e^{-ikF}}{r} \{J_1(kr \sin\theta_m^{\max}) \sin\theta_m^{\max} - J_1(kr \sin\theta_m^{\min}) \sin\theta_m^{\min}\}$$

Здесь ρ – плотность воды, c – скорость звука в воде, u_0 – амплитуда нормальной компоненты колебательной скорости на поверхности решетки, $k = \omega/c$ – волновое число, ω – циклическая частота, F – фокусное расстояние, L_m^{\max} и L_m^{\min} – расстояния от рассматриваемой точки поля z до внешней и внутренней границы m -го элемента решетки, θ_m^{\min} и θ_m^{\max} – внешний и

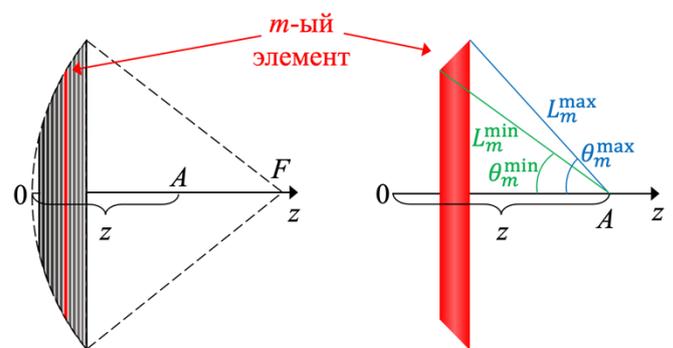


Рис. 1.6. Схема, иллюстрирующая параметры кольцевой решетки, используемые в аналитических расчетах (1.2)–(1.3).

внутренний зенитные углы m -го элемента (Рис. 1.6.), $J_1(\cdot)$ – функция Бесселя первого порядка.

Акустическое поле, создаваемое реальной решеткой, было рассчитано в работе [82] с помощью интеграла Рэля с граничным условием, восстановленным из данных акустической голографии. Распределения амплитуды давления вдоль оси и поперек нее в фокальной плоскости решетки при линейной фокусировке, полученные с помощью численного моделирования в программе NIFU beam, а также аналитического решения и данных голографии затем сравнивались для проверки адекватности акустической модели для дальнейших численных расчетов нелинейных полей решетки.

Результаты

Распределение амплитуды колебательной скорости u_0 , восстановленное из экспериментальных данных голографии [82], показано на Рис. 1.7 и является неравномерным по сравнению с приближением одинаковой амплитуды колебательной скорости на поверхности решетки, использованном при аналитических и численных расчетах полей рассматриваемой решетки.

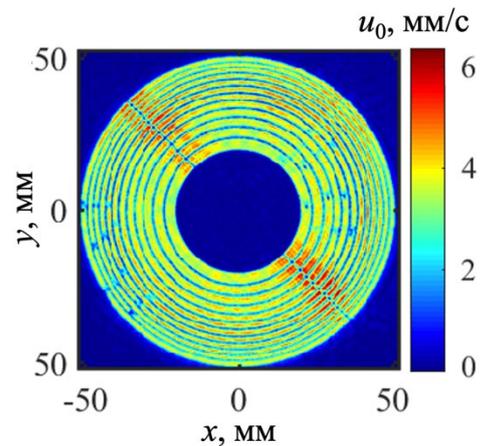


Рис. 1.7. Распределение амплитуды колебательной скорости u_0 на поверхности кольцевой решетки, восстановленное из данных акустической голографии [82]

Тем не менее, сравнение нормированных распределений амплитуды давления в линейном поле решетки (Рис. 1.8), полученных с помощью данных акустической голографии (точки), аналитического решения (черная пунктирная кривая) и численного моделирования в программе NIFU beam (серая сплошная кривая) показывает, что экспериментальные и аналитические кривые практически совпадают. Это свидетельствует

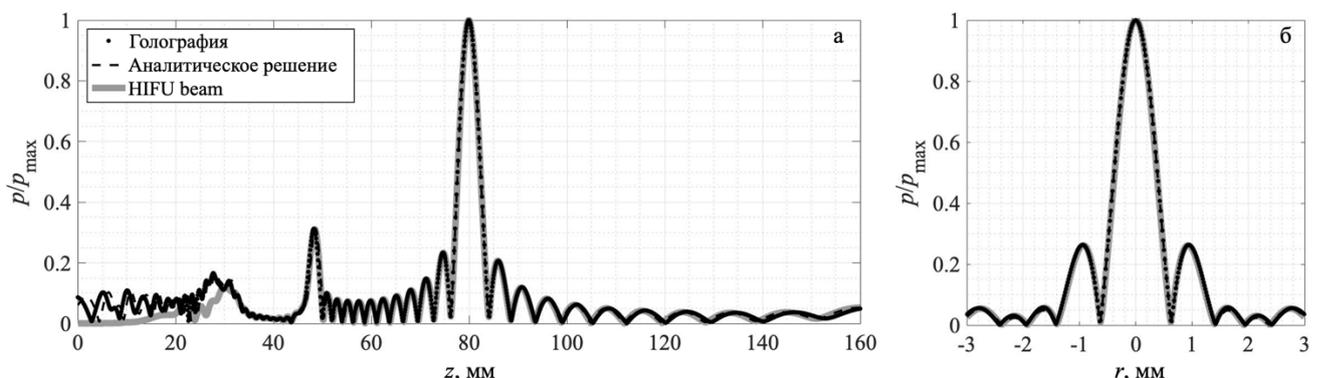


Рис. 1.8. Результаты проверки адекватности рассматриваемой акустической модели на примере линейного поля решетки. Нормированные распределения амплитуды давления вдоль оси решетки (а) и поперек нее в фокальной плоскости (б), полученные без смещения фокуса с помощью: данных акустической голографии (точки), аналитического решения (черная пунктирная кривая) и численного моделирования в программе NIFU beam (серая сплошная кривая).

об адекватности использования в моделировании приближения равномерного распределения колебательной скорости на поверхности решетки (Рис. 1.7). Результаты численного моделирования в программе NIFU beam также хорошо согласуются с аналитическим решением для линейного пучка, точно учитывающим дифракцию, что подтверждает высокую точность описания дифракционных эффектов с использованием широкоугольного параболического приближения. Значительное отличие численного решения от аналитических и экспериментальных кривых наблюдается лишь в ближнем поле решетки, что связано с использованием конечно-разностного подхода в программе NIFU beam и исходного поля с резкими краями. Однако, дальнейшее поле, включающее как фокальное пятно, так и предфокальный побочный максимум, которые могут внести основной вклад в накопление нелинейных эффектов при более высокой мощности решетки, полностью совпадают вне зависимости от способа расчета. Результаты также показывают, что даже без электронного смещения фокуса решетки в предфокальной области формируется побочный максимум с амплитудой, близкой к безопасному порогу в 31.6% от максимума давления в главном фокусе [70, 86].

Таким образом, практическое совпадение результатов, полученных при однородном граничном условии и широкоугольном параболическом приближении расчета дифракции для сильно фокусированного поля решетки, подтвердило возможность использования предложенного подхода для дальнейшего моделирования нелинейных полей решетки.

1.2.2 Влияние электронного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей

Методы

Для исследования влияния электронного смещения фокуса кольцевой фазированной решетки на создаваемое ей акустическое поле сначала было численно рассчитано ее линейное поле при 12-ти и 10-ти включенных внутренних элементах при различных смещениях фокуса, начиная от фокусировки в геометрическом фокусе и далее с шагом 0.1 мм до 25 мм по направлению к решетке или от нее. Для каждого положения фокуса были рассчитаны коэффициент усиления G поля в фокусе по давлению и отношение амплитуд давления в побочном и основном максимумах. Это позволило определить эффективные и безопасные диапазоны смещения фокуса решетки. Безопасный диапазон определялся в соответствии с общепринятым критерием, используемым в тепловых NIFU-приложениях: максимальная интенсивность в любом побочном максимуме решетки должна быть ниже 10% от максимальной интенсивности в основном максимуме (т.е. ниже 31.6% по амплитуде давления) [70, 86]. Такие пределы электронного смещения фокуса решетки будут далее называться «безопасными» пределами. Однако для нелинейных ультразвуковых приложений этот критерий может быть смягчен, поскольку в этих случаях вносимые биоэффекты обычно зависят не от интенсивности ультразвука, а от амплитуды ударного фронта, который формируется в фокусе за счет эффектов

нелинейного распространения ультразвуковой волны [31, 39, 42, 60]. Формирование ударного фронта в профиле волны в значительной степени зависит от величины акустического давления, поэтому ударный фронт, как правило, сначала формируется в основном максимуме поля, отсутствуя при этом в побочных максимумах с меньшей амплитудой.

Эффективное смещение фокуса в линейном поле обычно вводится в диапазоне, в котором амплитуда давления в смещенном фокусе падает не более чем на 10–20% по сравнению с максимально достижимым давлением, так как такой спад давления обычно может быть скомпенсирован путем соответствующего увеличения напряжения, подаваемого на излучатель [71, 75]. В этой работе эффективный диапазон смещения фокуса рассматривался по 10%-ому спаду амплитуды давления от максимального давления при фокусировке в геометрический фокус (т.е. около 15% от максимально достижимого давления). Такие пределы электронного смещения фокуса далее будут называться «эффективными» пределами. Таким образом, по результатам моделирования линейного поля решетки были определены безопасные и эффективные пределы электронного смещения ее фокуса, а также охарактеризованы ее линейные поля через параметры линейного усиления по давлению G , продольные ($\delta_{||}$) и поперечные (δ_{\perp}) размеры главного фокального максимума по нулевому уровню давления и по уровню -6 дБ от максимума.

Затем моделировались нелинейные акустические поля решетки при увеличении амплитуды давления $p_0 = \rho c u_0$ на ее поверхности до $p_0 = 0.675$ МПа при различных смещения фокуса внутри определенных ранее пределов. В зависимости от давления p_0 на решетке было проанализировано нелинейное искажение формы волны в основном и побочном максимумах, получены кривые насыщения для пикового положительного p^+ и отрицательного p^- давлений и амплитуды ударного фронта A_s , а также определены условия формирования развитого разрыва в фокусе, как было описано ранее в п. 1.1.

Результаты

В Табл. 1.4 приведены параметры всех численно смоделированных конфигураций решетки и соответствующие характерные параметры создаваемых линейных и нелинейных полей, в том числе для случаев, рассмотренных далее в п. 1.2.3.

Эффекты электронного смещения фокуса в линейном поле решетки

Рис. 1.9 иллюстрирует эффекты, проявляющиеся в линейных полях, создаваемых 12-элементной (I) и 10-элементной (II) кольцевой решеткой при электронном смещении фокуса вдоль ее оси. Рассмотренные конфигурации решетки существенно не различались, за исключением снижения коэффициента усиления в фокусе на 17% в случае 10-элементной решетки в связи с уменьшением ее активной площади также на 17% за счет отключения двух внешних колец. Получено, что пределы смещения фокуса в обеих конфигурациях практически одинаковы: безопасные пределы (сплошные синие и черные кривые на Рис. 1.9) составили [-12.8;

0.14] мм и [-12.6; 0.3] мм для 12- и 10-элементной решетки, соответственно; эффективные пределы (пунктирные красные и зеленые кривые на Рис. 1.9) составили [-19.5; 7.5] мм и [-19.7; 7.5] мм. Предфокальное смещение фокуса дальше $\Delta z = -4$ мм привело к образованию постфокального побочного максимума в пределах двойного фокусного расстояния, который увеличивался по амплитуде и смещался ближе к основному максимуму по мере увеличения смещения фокуса (синяя и красная кривые на Рис. 1.9). Аналогично, постфокальное смещение фокуса (зеленые кривые на Рис. 1.9) приводило к увеличению амплитуды предфокального максимума решетки, наблюдаемого в поле без смещения фокуса (черные кривые на Рис. 1.9), и смещало его ближе к основному максимуму. Такое поведение побочного максимума в поле фазированных решеток хорошо известно и согласуется с литературой [74]. При смещении фокуса до эффективных пределов, отношение амплитуды давления в побочном максимуме к давлению в основном максимуме также были похожи в обеих конфигурациях: 61–62% при предфокальном смещении (красные кривые на Рис. 1.9) и 57–58% при постфокальном смещении (зеленые кривые на Рис. 1.9). Коэффициент усиления по давлению достигает максимального значения при предфокальной фокусировке на $\Delta z = -8.5$ мм, но в остальном уменьшается с увеличением дальности смещения фокуса (Рис. 1.9в). Наибольшее увеличение коэффициента усиления составило 5.1% и 5.3% по сравнению со случаем без смещения для 12- и 10-элементной решеток,

	Параметры конфигурации					Параметры линейного поля			Развитый разрыв		
	N	Δz , мм	φ	$F\#$	$S_{\text{акт}}^2$, мм ²	G	$\delta_{\parallel}(0) / \delta_{\parallel}(-6\text{дБ})$, мм	$\delta_{\perp}(0) / \delta_{\perp}(-6\text{дБ})$, мм	$p_0^{\text{разв}}$, Мпа	$W_0^{\text{разв}}$, Вт	$A_s^{\text{разв}}$, Мпа
Эффекты электронного смещения фокуса	12	-19.5	99°	0.6	6247	96	5 / 3	1 / 0.6	0.675	964	237
		-12.8	89°	0.67		109	5.8 / 3.5	1.1 / 0.65	0.47	468	193
		0	77°	0.8		106	7.75 / 4.65	1.25 / 0.75	0.3	191	136
		+7.5	71°	0.88		96	9.1 / 5.42	1.34 / 0.8	0.32	217	121
Уменьш-е угла фок-ки	12	+7.5	71°	0.88	6247	96	9.1 / 5.42	1.34 / 0.8	0.32	217	121
	10	0		0.86	5206	88	9.4 / 5.65	1.3 / 0.8	0.32	181	122
Увелич-е угла фок-ки	12	0	77°	0.8	6247	106	7.75 / 4.65	1.25 / 0.75	0.3	191	136
	10	-7		0.79	5206	93	8.05 / 4.8	1.2 / 0.75	0.4	282	148

Табл. 1.4. Параметры численно исследованных конфигураций работы решетки и соответствующие характеристические параметры смоделированных полей. N – число активных элементов решетки, Δz – расстояние смещения фокуса (>0 при постфокальном смещении, <0 при предфокальном смещении), φ – угол фокусировки, $F\#$ – диафрагменное число, $S_{\text{акт}}$ – площадь активной поверхности, G – коэффициент усиления по давлению, δ_{\parallel} и δ_{\perp} – продольный и поперечный размеры фокального пятна по нулевому уровню давления и спаду давления на 6 дБ, $p_0^{\text{разв}}$ и $W_0^{\text{разв}}$ – давление на поверхности решетки и ее акустическая мощность, необходимые для формирования развитого разрыва в главном максимуме, $A_s^{\text{разв}}$ – амплитуда развитого разрыва в главном максимуме.

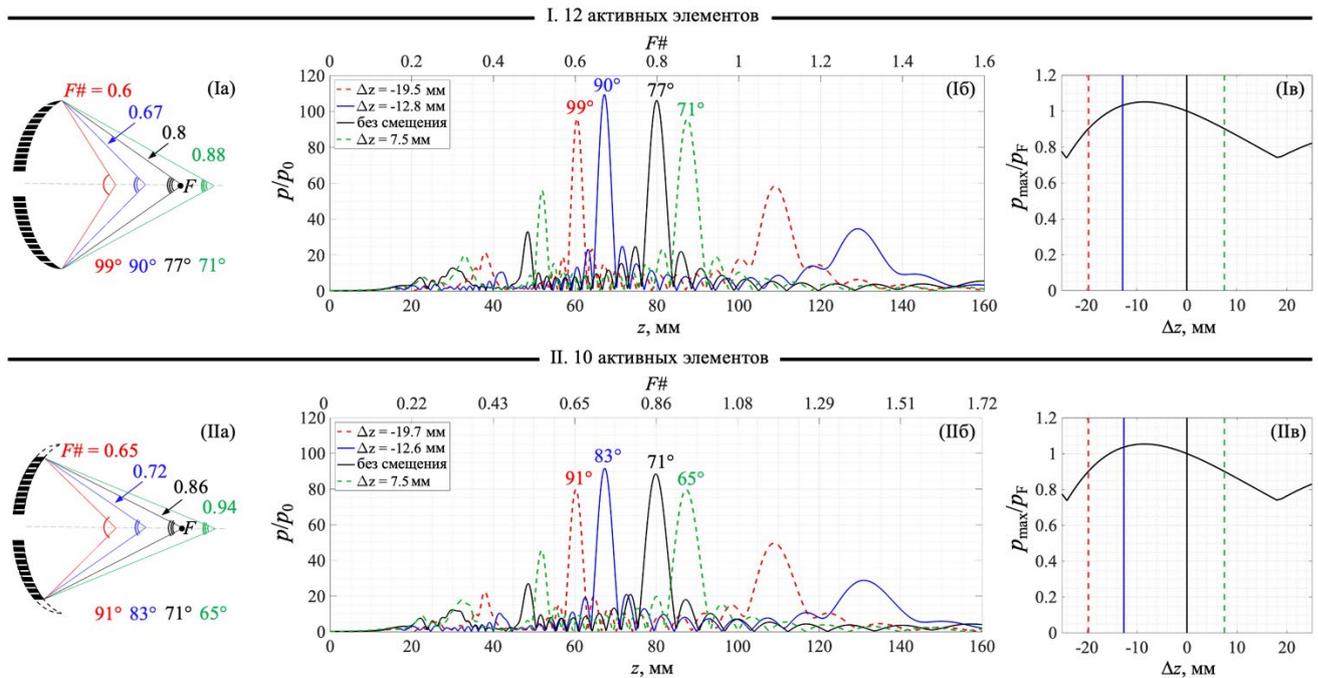


Рис. 1.9. Иллюстрация эффекта электронного смещения фокуса решетки на ее линейное поле со всеми 12-тью включенными элементами (I) и 10-тью внутренними включенными элементами (II). (а) Схема различных положений фокуса, смещенного электронным образом относительно геометрического фокуса F . (б) Аксиальные распределения амплитуды давления, нормированного на давление на излучателе p_0 , при различных положениях фокуса. Сплошные кривые соответствуют безопасным пределам смещения фокуса: предфокально (синим) и постфокально (черным). Пунктирные кривые соответствуют эффективным пределам смещения фокуса: предфокально (красным) и постфокально (зеленым). Соответствующие эффективные диафрагменные числа ($F\#$) приведены на верхней горизонтальной оси. (в) Отношение максимальной амплитуды давления в поле со смещенным фокусом (p_{\max}) к фокальному давлению без смещения фокуса (p_F) в зависимости от дальности смещения Δz . Вертикальные линии соответствуют пределам смещения фокуса, представленным на (а–б).

соответственно. При смещении фокуса дальше $\Delta z = -24$ мм (предфокально) или $\Delta z = 18$ мм (постфокально) амплитуда давления в побочном максимуме решетки превышала амплитуду давления в основном максимуме, о чем свидетельствует возрастающее отношение p_{\max}/p_F максимального давления в поле решетки (p_{\max}) к фокальному давлению без смещения фокуса (p_F), показанному на Рис. 1.9в. Размеры фокального пятна увеличивались как в продольном, так и в поперечном направлении при удалении фокуса от решетки и уменьшались при приближении к решетке (Табл. 1.4), что согласуется с теорией для одиночных излучателей с меньшими и большими углами фокусировки, соответственно [56, 75].

Эффекты предфокального смещения фокуса в нелинейном поле решетки

На Рис. 1.10 проиллюстрированы эффекты, проявляющиеся в нелинейных полях кольцевой решетки при всех работающих элементах в основном и побочном максимуме при электронном смещении ее фокуса. При постфокальном смещении (Рис. 1.10, I) до безопасного ($\Delta z = -12.8$ мм, синие кривые) и эффективного (-19.5 мм, красные кривые) пределов развитый разрыв в основном

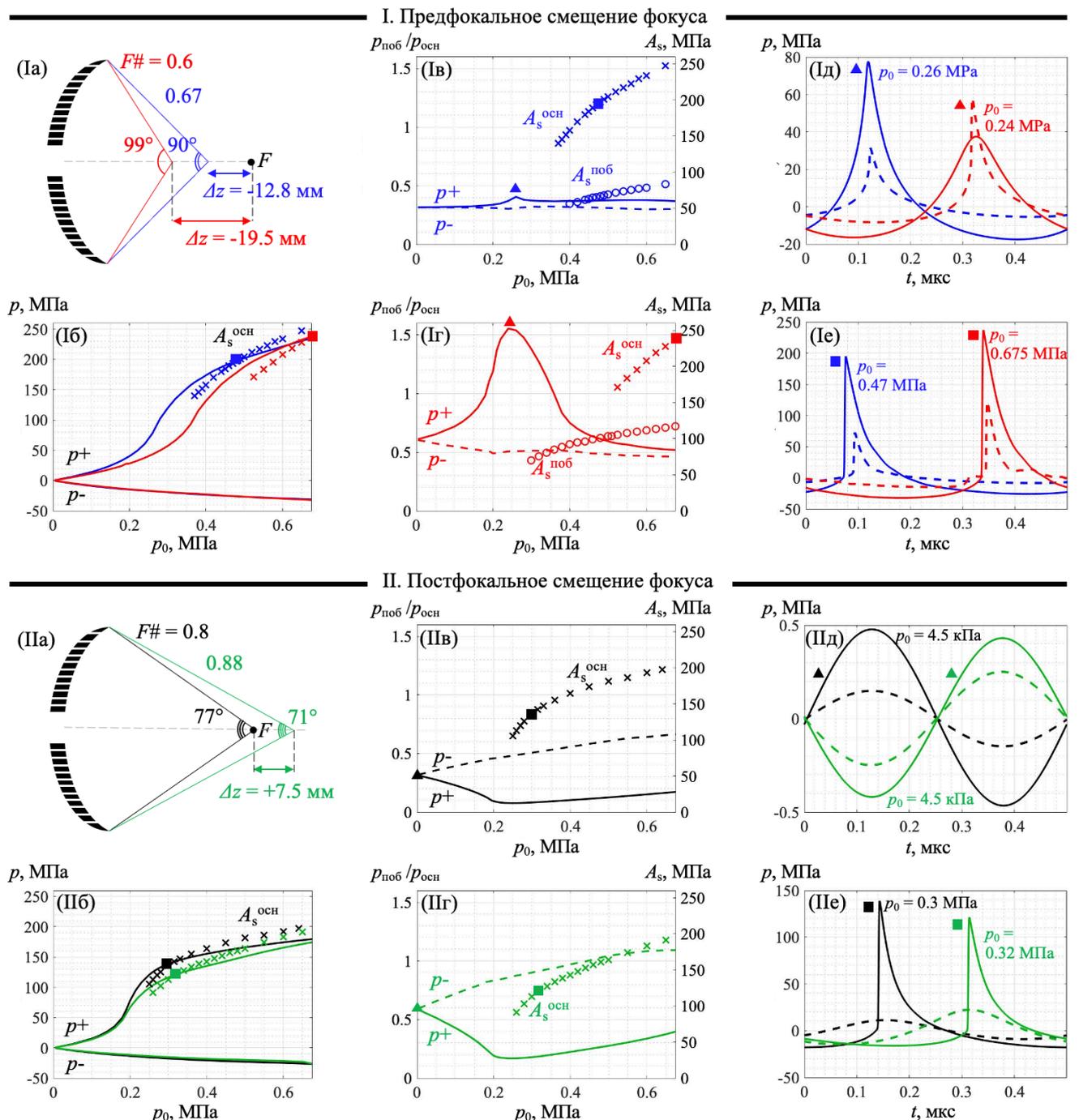


Рис. 1.10. Иллюстрация эффекта электронного смещения фокуса решетки на ее нелинейное поле при всех включенных элементах: (I) предфокальное и (II) постфокальное смещение фокуса. Цвета соответствуют предельным случаям смещения фокуса на Рис. 1.9: предфокальный (синий) и постфокальный (черный) безопасные пределы; предфокальный (красный) и постфокальный (зеленый) эффективные пределы. (а) Схема различных положений фокуса, смещенного электронным образом относительно геометрического фокуса F . (б) Кривые насыщения для пикового положительного ($p+$) и отрицательного ($p-$) давлений (сплошные кривые) и амплитуды ударного фронта A_s в основном максимуме (символы-крестики) в зависимости от амплитуды давления на решетке p_0 . (в,г) Отношение пикового положительного ($p+$, сплошная кривая) и отрицательного ($p-$, пунктирная кривая) давлений в побочном и основном максимуме, а также амплитуда ударного фронта в основном максимуме ($A_s^{\text{осн}}$, символы-крестики) и в побочном ($A_s^{\text{поб}}$, круглые символы) в зависимости от амплитуды давления на решетке p_0 . На левой вертикальной оси показаны значения отношения давлений, на правой вертикальной – значения амплитуды ударного фронта. (д–е) Формы волны в основном (сплошная кривая) и побочном

(пунктирная кривая) максимумах при давлении p_0 , соответствующем: (д) максимальному отношению пикового положительного давления в основном и побочном максимуме (треугольные символы на в,г); (е) – режиму формирования развитого разрыва в основном максимуме (квадратные символы на б–г). Формы волны смещены во времени для лучшего визуального разнесения на графиках.

максимуме (квадратные символы на Рис. 1.10,б) формировался при более высоком давлении на решетке ($p_0^{\text{разв}} = 0.675$ МПа по сравнению с 0.47 МПа) и имел большую амплитуду ($A_s^{\text{разв}} = 237$ МПа по сравнению с 193 МПа) в случае более сильной фокусировки (красный) по сравнению со слабой фокусировкой (синий) (Рис. 1.10, Iб; Табл. 1.4). Эти эффекты характерны для более фокусированных пучков [56], а также связаны с дополнительным спадом давления в поле решетки за счет электронного смещения фокуса (Рис. 1.9, Iв).

Сравнение нелинейных эффектов в основном и постфокальном максимумах для тех же двух предфокальных положений фокуса решетки показано на Рис. 1.10, Iв ($\Delta z = -12.8$ мм) и Рис. 1.10, Iг ($\Delta z = -19.5$ мм). А именно, представлено соотношение пикового положительного (p^+ , сплошная кривая) и отрицательного (p^- , пунктирная кривая) давлений в побочном максимуме к соответствующим значениям давлений в основном максимуме, а также амплитуды ударного фронта в основном ($A_s^{\text{осн}}$, символы-крестики) и побочном ($A_s^{\text{поб}}$, круглые символы) максимумах в зависимости от амплитуды давления на решетке p_0 . Пиковое отрицательное давление в побочном максимуме было меньше, чем в основном максимуме для обоих случаев предфокального смещения фокуса вне зависимости от амплитуды давления на решетке p_0 (пунктирные кривые на Рис. 1.10, Iв,г). Однако пиковое положительное давление в побочном максимуме при предфокальном смещении фокуса до эффективного предела ($\Delta z = -19.5$ мм) превышало давление в основном максимуме до 55% в определенном диапазоне давлений на решетке ($0.18 < p_0 < 0.36$ МПа) (Рис. 1.10, Iг). При таком положении фокуса максимальное отношение пикового положительного давления в побочном и основном максимуме (треугольные символы на Рис. 1.10, Iг) соответствовало началу формирования ударного фронта в постфокальном побочном максимуме решетки (пунктирная красная кривая на Рис. 1.10, Iд).

На Рис. 1.10, Iд,е показано нелинейное искажение формы волны в основном (сплошные кривые) и побочном (пунктирные кривые) максимумах поля для тех же двух случаев предфокального смещения фокуса решетки в двух репрезентативных режимах: в случае максимального отношения пикового положительного давления в побочном максимуме к давлению в основном максимуме (Рис. 1.10, Iд), и в случае формирования развитого разрыва в основном максимуме (Рис. 1.10, Iе). В первом случае (т.е. при максимальном отношении пиковых положительных давлений в побочном и основном максимумах – треугольные символы на Рис. 1.10, I) для обоих предфокальных положений фокуса (синие и красные формы волны), форма волны в побочном максимуме (пунктирные кривые на Рис. 1.10, Iд) имеют большую степень нелинейного искажения, чем в главном фокусе (сплошные кривые на Рис. 1.10, Iд). Это, по-

видимому, привело к дальнейшему формированию ударного фронта в побочном максимуме при увеличении амплитуды давления на решетке p_0 (круглые символы на Рис. 1.10, Ie). При этом, чем ближе к решетке был смещен фокус (красный случай по сравнению с синим), тем меньшая амплитуда давления источника p_0 требовалась для формирования ударного фронта в побочном максимуме. При предфокальном смещении фокуса до эффективного предела (Рис. 1.10, Ig, $\Delta z = -19.5$ мм) формирование ударного фронта в побочном максимуме достигалось при меньшей амплитуде давления на решетке (красные круглые символы), чем необходимо для его формирования в основном максимуме (красные символы-крестики). Однако в обоих случаях предфокального смещения фокуса амплитуда ударных волн в побочном максимуме была на 40–70% ниже, чем в основном максимуме (Рис. 1.10, Ib–г), в том числе в режиме формирования развитого разрыва в главном фокусе (Рис. 1.10, Ie). Также было установлено максимальное предфокальное смещение фокуса ($\Delta z = -4$ мм), при котором побочный максимум в пределах двойного фокусного расстояния не формируется.

Эффекты постфокального смещения фокуса в нелинейном поле решетки

При постфокальном смещении фокуса до эффективного предела ($\Delta z = 7.5$ мм, зеленые кривые на Рис. 1.10, II) развитый разрыв в основном максимуме формировался при несколько большей амплитуде давления на решетке p_0 (на 7%) по сравнению со случаем без смещения (квадратные символы на Рис. 1.10, IIб). Несмотря на кажущееся противоречие с закономерностями, типично наблюдаемыми для одноэлементных излучателей с меньшими углами фокусировки [56], это, вероятно, объясняется спадом амплитуды фокального давления при постфокальном смещении фокуса (Рис. 1.9в). В отличие от случая предфокального смещения фокуса, здесь пиковое положительное давление в побочном максимуме всегда было ниже, чем в основном, независимо от амплитуды давления на решетке p_0 (сплошные кривые на Рис. 1.10, IIв,г). Однако пиковое отрицательное давление в побочном максимуме превышало соответствующую величину в главном максимуме при давлениях на решетке выше $p_0 = 0.45$ МПа в случае постфокального смещения фокуса (пунктирная кривая на Рис. 1.10, IIг). В отличие от случая предфокального смещения фокуса, ударные волны в побочном максимуме не формировались ни при каких значениях давления на решетке p_0 : ни при максимальном отношении пикового положительного давления в побочном максимуме к основному (Рис. 1.10, IIд; треугольные символы на Рис. 1.10, IIв,г), ни в режиме формирования развитого разрыва в основном максимуме (Рис. 1.10, IIе; квадратные символы на Рис. 1.10, IIб–г).

1.2.3 Эффекты электронного и геометрического изменения угла фокусировки решетки

Методы

Уменьшение угла фокусировки

Для изучения эффекта уменьшения угла фокусировки с помощью электронного и геометрического подходов один и тот же фиксированный угол фокусировки 71° был реализован с помощью двух конфигураций кольцевой решетки. В электронном подходе фокус решетки со всеми работающими элементами был смещен постфокально до $\Delta z = +7.5$ мм (синяя конфигурация на Рис. 1.11, Ia). Геометрический подход заключался в отключении двух внешних колец решетки без электронного смещения ее фокуса (красная конфигурация на Рис. 1.11, Ia). Аналогично п. 1.2.2, в линейных полях двух конфигураций сравнивались коэффициенты усиления по давлению в фокусе G и размеры главного фокального лепестка (δ_{\parallel} и δ_{\perp}). Затем проводилось моделирование нелинейных полей решетки в двух ее конфигурациях при увеличении амплитуды давления на ее поверхности p_0 . В полученных таким образом нелинейных полях проводился анализ степени искажения формы волны в основном и побочном максимумах, а также сравнение кривых насыщения для пикового положительного p^+ и отрицательного p^- давлений и для амплитуды ударного фронта A_s . Также для обеих конфигураций были определены и сопоставлены ударноволновые условия в фокусе, аналогично п. 1.2.2.

Увеличение угла фокусировки

Для изучения эффекта увеличения угла фокусировки с помощью электронного и геометрического подходов один и тот же фиксированный угол фокусировки 77° был реализован с помощью двух следующих конфигураций кольцевой решетки. В электронном подходе два внешних элемента решетки были отключены, и фокус полученной 10-элементной решетки был смещен электронным образом предфокально на $\Delta z = -7$ мм (красная конфигурация на Рис. 1.11, IIa). Геометрическое установление угла фокусировки было реализовано путем включения всех элементов решетки без электронного смещения фокуса (синяя конфигурация на Рис. 1.11, IIa). Линейные и нелинейные поля двух конфигураций анализировались аналогично описанному выше случаю увеличения угла фокусировки.

Результаты

Уменьшение угла фокусировки

На Рис. 1.11(I) сравниваются два подхода, направленные на уменьшение угла фокусировки от 77° до 71° : постфокальное электронное смещение фокуса 12-элементной решетки (синим) и геометрическое уменьшение угла путем отключения двух внешних колец решетки (красным).

Графики на Рис. 1.11, Ib–г иллюстрируют влияние двух рассматриваемых подходов на создаваемое решеткой линейное поле. При одинаковой амплитуде давления на поверхности

решетки конфигурация с 10-тью включенными кольцами создавала поле с фокальным пятном тех же размеров, что и 12-элементная решетка с электронным смещением фокуса (Рис. 1.11, Iв–г; Табл. 1.4), однако с меньшим на 8% коэффициентом усилением по давлению G (Рис. 1.11, Iб; Табл. 1.4). Меньший коэффициент усиления, по-видимому, объясняется комбинацией эффектов

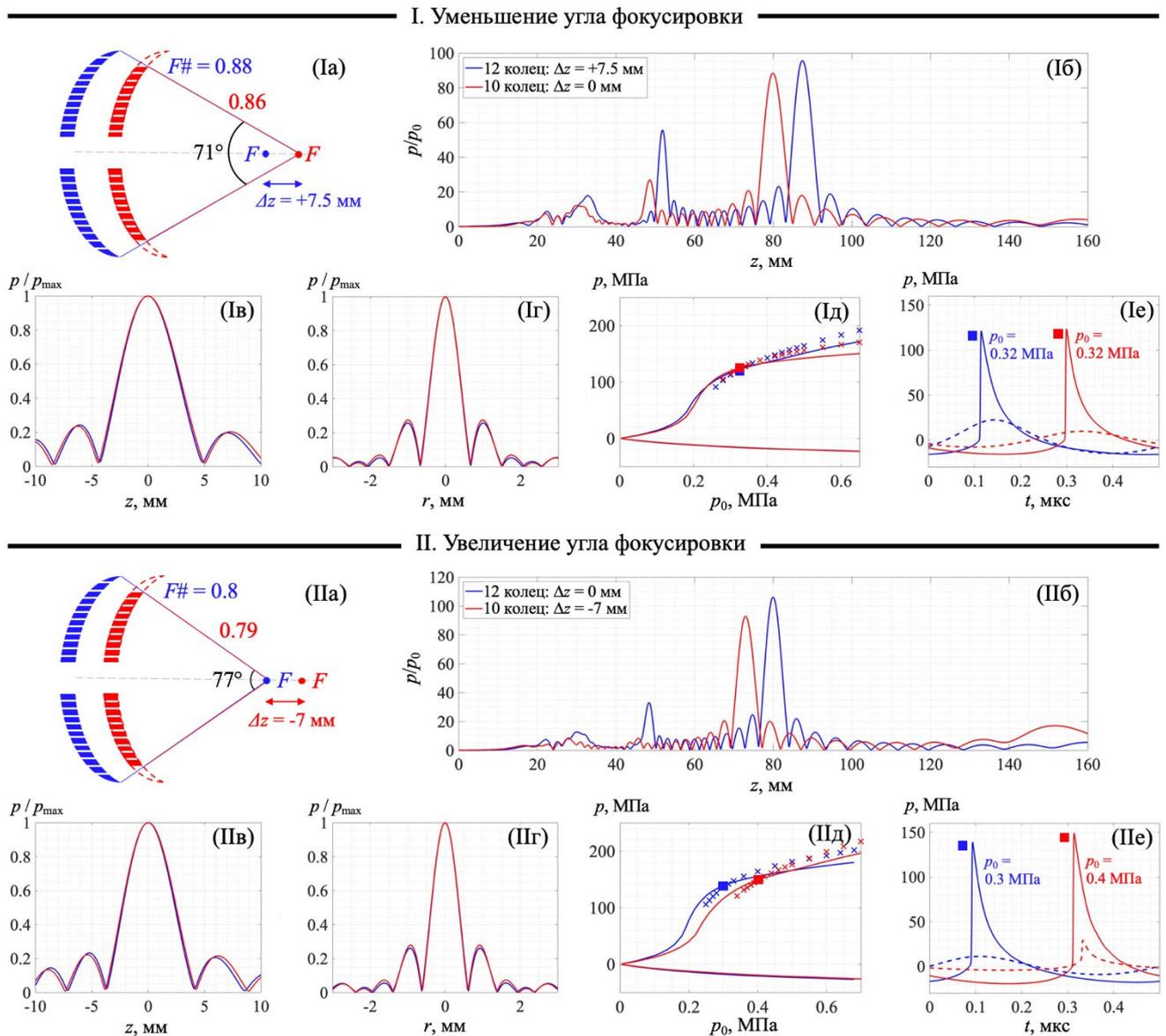


Рис. 1.11. Иллюстрация эффектов электронного и геометрического способов уменьшения (I) и увеличения (II) угла фокусировки кольцевой решетки. (а) Схема конфигураций кольцевой решетки с 12-тью (синим) и 10-тью (красным) включенными кольцами при различных положениях фокуса относительно геометрического фокуса F . (б) Аксиальное распределение амплитуды давления, нормированного на давление на поверхности решетки p_0 , при линейной фокусировке. (в,г) Нормированные на максимум распределения амплитуды давления в линейном режиме в окрестности точки максимального давления (0): (в) вдоль оси и (г) поперек нее в фокальной плоскости. (д) Нелинейные кривые насыщения для пикового положительного (p^+) и отрицательного (p^-) давлений (сплошные кривые) и амплитуды ударного фронта A_s (символы-крестики) в фокусе в зависимости от амплитуды давления на решетке p_0 . (е) Формы волны в основном (сплошная кривая) и побочном (пунктирная кривая) максимумах при значении p_0 , соответствующем формированию развитого разрыва в основном максимуме (квадратные символы на (д)).

уменьшения площади активной поверхности решетки на 17% за счет отключения двух внешних колец (Табл. 1.4) и спада амплитуды фокального давления 12-элементной решетки на 10% при постфокальном смещении ее фокуса (Рис. 1.9, Ив). На Рис. 1.11, Иб также видно, что при геометрическом подходе амплитуда давления в побочном максимуме относительно основного была заметно ниже, чем при электронном смещении фокуса (31% по сравнению с 58%).

Графики на Рис. 1.11. Ид–е иллюстрируют влияние двух рассмотренных подходов на создаваемое решеткой нелинейное поле. Как и ожидалось из результатов, полученных выше для постфокального смещения фокуса (Рис. 1.10, Пб), развитый разрыв в основном максимуме поля формировался при одинаковой амплитуде давления на решетке ($p_0 = 0.32$ МПа) при использовании обоих подходов, с несколько большей амплитудой ударного фронта в случае геометрического изменения угла фокусировки (квадратные символы на Рис. 1.11, Ид–е; Табл. 1.4). Однако нелинейное насыщение в этом случае достигалось при более низком пиковом положительном давлении. Рис. 1.11, Ие также показывает почти синусоидальное поведение формы волны в побочном максимуме (пунктирные кривые) при формировании развитого разрыва в основном фокусе (сплошные кривые) в обеих конфигурациях (квадратные символы на Рис. 1.11, Ие).

Увеличение угла фокусировки

На Рис. 1.11, II сравниваются два подхода, направленных на установку угла фокусировки на 77° : геометрическая установка угла за счет включения всех колец решетки (синим) и предфокальное электронное смещение фокуса 10-элементной решетки (красным). Было показано, что последняя конфигурация создавала фокальное пятно тех же размеров, что и 12-элементная решетка (Рис. 1.11, Пв–г; Табл. 1.4), с меньшим на 12% коэффициентом усиления по давлению в фокусе (Рис. 1.11, Пб; Табл. 1.4). Меньший коэффициент усиления в этом случае объясняется уменьшением площади активной поверхности решетки на 17% за счет отключения двух внешних элементов (Табл. 1.4), что перевешивает увеличение давления на 5% за счет предфокального смещения фокуса (Рис. 1.9в). Как и ожидалось из Рис. 1.10I для предфокального смещения фокуса, в линейном поле 10-элементной решетки с предфокально смещенным фокусом формировался постфокальный побочный максимум (Рис. 1.11, Пб) с очевидным нелинейным искажением формы волны при более высоких p_0 (красная пунктирная кривая на Рис. 1.11, Пе), что не наблюдалось в случае 12-элементной решетки без смещения фокуса (синяя пунктирная кривая на Рис. 1.11, Пе). Неожиданно для пучков с одинаковым углом фокусировки, развитый разрыв $A_s^{\text{разв}}$ в главном максимуме 10-элементной решетки с предфокально смещенным фокусом формировался при амплитуде давления на решетке $p_0^{\text{разв}}$ на 33% большей, чем в случае 12-элементной решетки без смещения фокуса, и имел на 9% большую амплитуду (Рис. 1.11, Пд–е;

Табл. 1.4). Этот результат, вероятно, объясняется меньшим на 12% коэффициентом усиления по давлению в линейном поле такой решетки (Рис. 1.11,Пб; Табл. 1.4).

1.2.4 Обсуждение к параграфу §1.2

Реализованные в этой части работы многопараметрические численные эксперименты показали, во-первых, что относительно большая ширина элементов решетки приводит к формированию сильного предфокального побочного максимума даже при фокусировке акустического пучка в геометрический фокус, что фактически полностью ограничивает возможность постфокальной динамической фокусировки без превышения термически безопасных пределов интенсивности в побочном максимуме. Однако для приложений, основанных на нелинейных эффектах и наличии ударных фронтов, тепловой критерий безопасности, введенный для линейной фокусировки, может быть ослаблен, и, соответственно, пределы смещения фокуса могут быть значительно расширены от $[-12.8; 0]$ мм до $[-19.5; +7.5]$ мм. При этом, однако, показано, что в случае предфокального смещения фокуса ударные фронты могут образовываться в постфокальном побочном максимуме, что может происходить при меньшей акустической мощности, чем требуется для формирования ударного фронта в основном фокусе. Это необходимо учитывать при разработке протоколов ультразвукового воздействия в нелинейном режиме с использованием электронной фазировки.

Еще одним эффектом, который необходимо учитывать при планировании воздействия со смещением фокуса фазированной решетки, является значительное изменение ударноволновых условий в фокусе при динамической фокусировке. В частности, например, по сравнению со случаем без фазировки, при смещении фокуса в сторону излучателя на 12.8 мм и 19.5 мм от геометрического фокуса, для формирования развитого разрыва требовалась акустическая мощность в 2.45 и 5 раз выше. При этом сам развитый разрыв имел на 42% и 74% большую амплитуду, чем в случае без смещения фокуса, что, соответственно, привело бы к увеличению скорости поглощения акустической энергии в 2.9 и 5.3 раза. Эти особенности, вызываемые электронной регулировкой фокуса фазированной решетки, также необходимо учитывать в нелинейных ультразвуковых приложениях.

Наконец, еще одним практическим результатом этой теоретической части работы стало сравнение электронного и геометрического способа регулировки угла фокусировки фазированной решетки. Для уменьшения угла фокусировки геометрический подход (т.е. отключение двух внешних элементов решетки) привел к формированию фокального пятна тех же размеров, что и электронный подход с постфокальным смещением фокуса, при этом предфокальный побочный максимум имел более низкую амплитуду давления, а развитый разрыв формировался только в главном максимуме при той же амплитуде на решетке и имел несколько большую амплитуду. Принимая во внимание меньшую амплитуду формируемого побочного

максимума, отключение внешних элементов кольцевой решетки можно считать более подходящим способом уменьшения ее угла фокусировки по сравнению с постфокальным электронным смещением фокуса решетки со всеми включенными элементами. Для увеличения угла фокусировки геометрический подход также оказался более выигрышным, чем электронный, поскольку он позволил избежать предфокального смещения фокуса решетки, которое может приводить к формированию малоамплитудных ударных фронтов вне главного фокуса пучка. При этом, однако, подход с электронной фазировкой может быть применим в вязких средах, таких как биологические ткани, которые могут подавить формирование ударных волн в постфокальной области поля решетки.

1.2.5 Выводы к параграфу §1.2

В настоящем параграфе численно изучались особенности ультразвуковых полей, создаваемых 12-элементной кольцевой фазированной решеткой с возможностью электронного смещения фокуса вдоль ее оси, при различных конфигурациях ее работы. Были проведены численные эксперименты по определению влияния электронного смещения фокуса на структуру и амплитуды создаваемых нелинейных полей, а также по изучению эффектов электронного и геометрического управления углом фокусировки решетки. Показано, что предфокальное электронное смещение фокуса решетки приводит к образованию и увеличению по амплитуде постфокального побочного максимума, а также формированию в нем ударных фронтов, в некоторых случаях даже при меньшей мощности, чем необходима для формирования разрыва в основном максимуме. Постфокальное электронное смещение фокуса приводит к образованию и увеличению по амплитуде предфокального побочного максимума, однако ударные волны в нем не формируются ни при каких рассмотренных мощностях излучателя. Показано также, что геометрический способ управления углом фокусировки ультразвукового пучка, т.е. включение/отключение внешних элементов кольцевой решетки, является более предпочтительным по сравнению с электронным смещением ее фокуса, поскольку позволяет избежать образования высокоамплитудных побочных максимумов и формирования ударных фронтов вне фокального пятна.

§1.3 Двумерная многоэлементная фазированная решетка

Еще одним типом ультразвуковых фазированных решеток, используемых как для диагностических, так и для терапевтических целей, являются двумерные многоэлементные решетки, которые, по сравнению с кольцевой решеткой, рассмотренной в предыдущем параграфе, позволяют электронное смещение фокуса не только вдоль оси решетки, но и поперек нее [72, 87–93]. Благодаря этому, такие решетки представляют особый интерес для клинических HIFU-приложений, поскольку могут позволить электронным образом

компенсировать сложное движение целевого участка, связанное с дыханием пациента. Кроме того, фазировка таких многоэлементных решеток может быть использована для коррекции aberrаций ультразвукового пучка, связанных с неоднородностями на пути его распространения от излучателя к целевому участку внутри тела пациента. Двумерные многоэлементные решетки также позволяют разрушать целевой объем ткани путем электронного перемещения фокуса внутри него, что значительно сокращает время воздействия по сравнению с механическим перемещением излучателя.

Одна из таких решеток, состоящая из 256 спирально расположенных элементов [94, 95], использовалась экспериментально в Главе 4 настоящей диссертационной работы. Ее линейные и нелинейные режимы работы при различных смещениях фокуса были подробно охарактеризованы в работе [75], что и будет описано в настоящем параграфе.

1.3.1 Параметры решетки

Исследуемая HIFU решетка (Imasonic, Франция) работала на частоте 1.5 МГц и представляла собой геометрически фокусированную решетку из 256 элементов с номинальным фокусным расстоянием 12 см, апертурой 14.4 см ($F\# = 0.83$) и диаметром центрального отверстия 4 см для соосного закрепления в нем ультразвукового диагностического датчика (Рис. 1.12а).

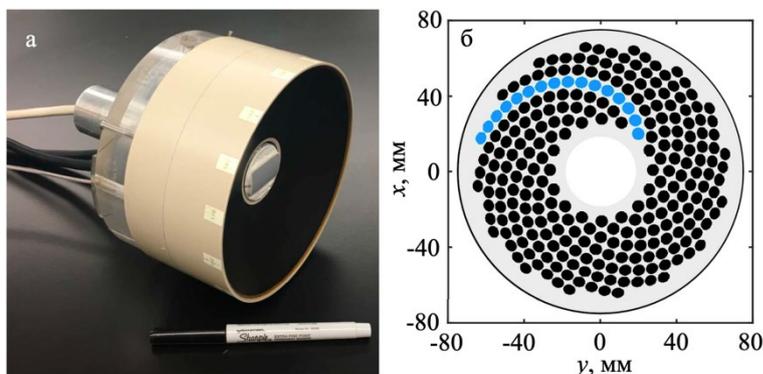


Рис. 1.12. (а) Фотография 256-элементной спиральной решетки с закрепленным в центральном отверстии УЗИ-датчиком (ATL Р6-3). (б) Двумерная проекция распределения элементов решетки на ее поверхности по 16 спиральям, одна из которых выделена синим. [75]

Элементы имели диаметр 7 мм каждый и были расположены на расстоянии 0.5 мм друг от друга по 16 спиральям (Рис. 1.12б). Такое непериодическое расположение элементов было выбрано с целью минимизировать побочные максимумы и при этом достичь максимального коэффициента заполнения площади решетки активными элементами. Решетка была специально спроектирована для абдоминальных приложений метода гистотрипсии с кипением таким образом, чтобы обеспечить возможность электронного смещения фокуса в достаточно широком диапазоне и при этом достигать высокоамплитудных ударных фронтов (>80 МПа) в фокусе без превышения технологических пределов решетки [94].

1.3.2 Характеризация поля решетки без смещения фокуса

Сначала в работе [75] поле решетки было охарактеризовано без смещения фокуса путем комбинации гидрофонных измерений и нелинейного численного моделирования [96].

Из комбинации гидрофонных измерений в воде при низких амплитудах давления капсульным ПВДФ гидрофоном (HGL-0085 с предусилителем AG-20×0, Onda Corporation, Саннивейл, Калифорния, США) и снятия акустической голограммы в плоскости поперек оси решетки в 40 мм перед ее фокусом (88 x 88 мм с шагом 0.5 мм) [96, 97] с помощью метода углового спектра было восстановлено распределение колебательной скорости на поверхности решетки (Рис. 1.13а,б), которое затем использовалось в качестве граничного условия в численном моделировании. Поле давления на оси решетки и поперек нее в фокальной плоскости при линейной фокусировке численно рассчитывалось с граничным условием, восстановленным из данных акустической голографии, а также с граничного условия в приближении идеальной решетки (т.е. с равномерным распределением колебательной скорости на ее поверхности), и сравнивалось с измерениями, сделанным с помощью гидрофона в свободном поле (Рис. 1.13в–д). Хорошее соответствие результатов моделирования и измерений подтвердило возможность использования данных акустической голографии в качестве граничного условия для последующего нелинейного моделирования.

Численное моделирование нелинейного трехмерного поля решетки проводилось при граничном условии, восстановленном из данных акустической голографии, при различных уровнях давления с помощью уравнения Вестервельта (1.1) согласно алгоритму, описанному в

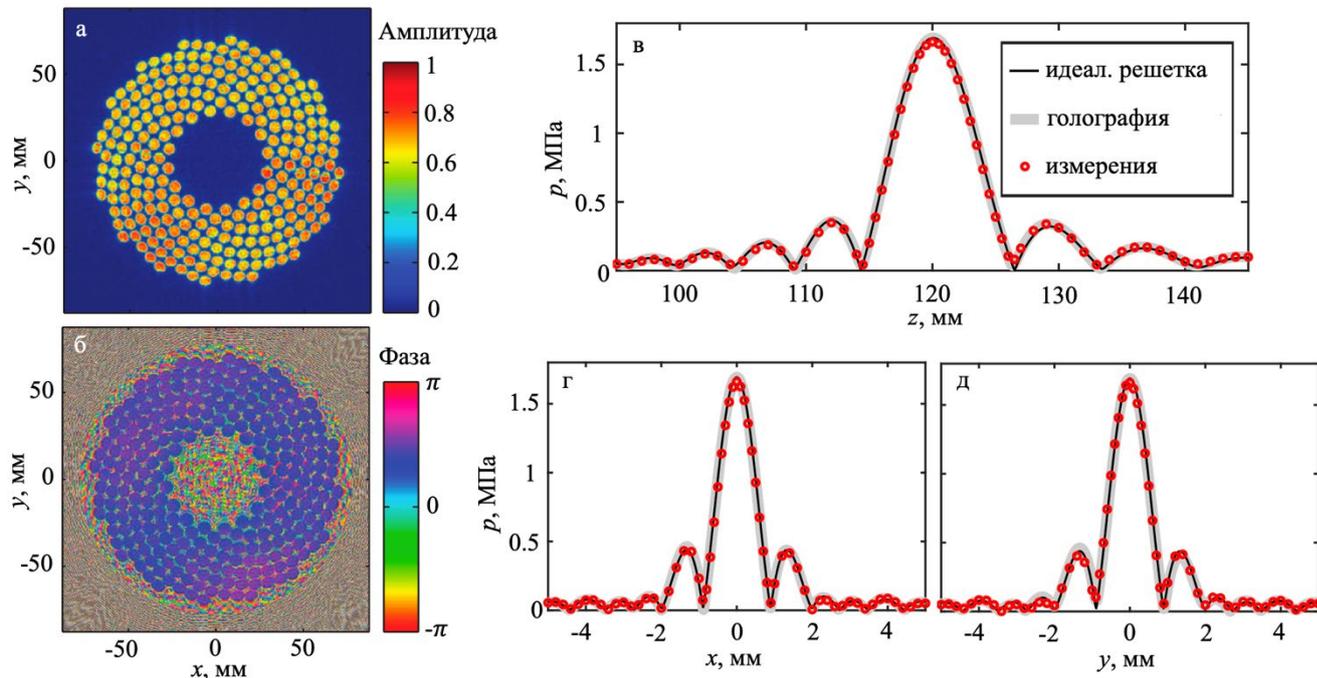


Рис. 1.13. (а,б) Распределения амплитуды (а) и фазы (б) нормальной компоненты колебательной скорости на поверхности решетки, восстановленные из данных акустической голографии. (в–д) Результаты линейной калибровки решетки – сравнение поля давления в окрестности фокуса вдоль оси (в) и поперек нее в фокальной плоскости (г,д), численно рассчитанные из идеальных граничных условий (черная кривая), из данных акустической голографии (серая кривая) и измеренные гидрофоном в свободном поле (красные символы). [75]

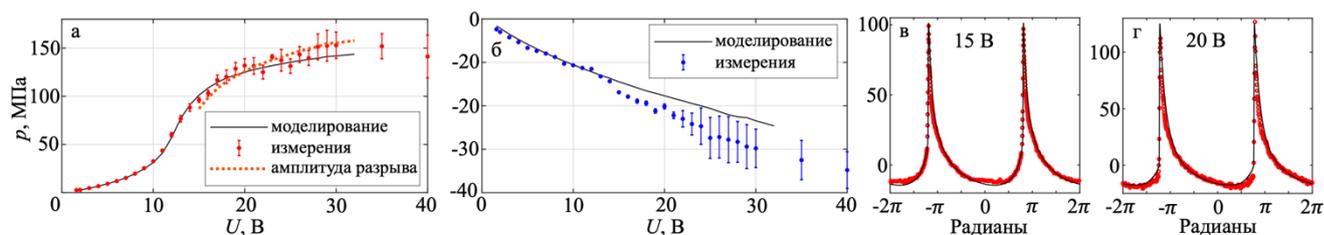


Рис. 1.14. Сравнение результатов нелинейного численного моделирования (сплошные кривые) и гидрофонных измерений (символы). (а,б) Зависимость пикового положительного (а) и отрицательного (б) давлений в фокусе от подаваемого напряжения U . Погрешности соответствуют стандартным отклонениям при усреднении по нескольким периодам. Амплитуда разрыва на (а) оценивалась из данных моделирования. (в,г) Волновые профили в фокусе в режиме образования ударного фронта с амплитудой 80 МПа (в) и в режиме формирования развитого разрыва (г) [75].

работах [55, 96, 98]. Полученные результаты сравнивались с измерениями оптоволоконным гидрофоном (FORN 2000, с полосой пропускания 100 МГц, RP Acoustics, Лойтенбах, Германия), выполненным в свободном поле в воде при увеличивающихся напряжениях на излучателе. В экспериментальных измерениях проводилось усреднение пиковых значений давлений по восьми периодам в стационарной области акустического импульса, достигаемой после 20 первых периодов. Сравнение кривых насыщения (т.е. зависимостей пиковых давлений от подаваемого напряжения), полученных с помощью моделирования и гидрофонных измерений, а также волновых профилей в фокусе приведено на Рис. 1.14. Результаты для пикового положительного давления хорошо согласуются в измерениях и моделировании при всех использованных напряжениях (Рис. 1.14а). Экспериментально измеренное пиковое отрицательное давление хорошо согласовывалось с результатами моделирования в диапазоне 1–15 В (Рис. 1.14б), однако при более высоких напряжениях погрешность его измерения значительно увеличивалась, вероятно, из-за кавитации на конце оптоволоконного гидрофона [99]. Было показано, что в поле исследуемой решетки без смещения ее фокуса ударный фронт с амплитудой 80 МПа (необходимой для генерации кипения в мягкой ткани в течение 5 мс) достигается при подаваемом напряжении 15 В (Рис. 1.14в), при этом развитый разрыв образуется при напряжении 20 В (Рис. 1.14г), а максимально достижимая амплитуда разрыва составляет 150 МПа и достигается при напряжении 35 В (Рис. 1.14а).

1.3.3 Влияние продольного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей

Возможности электронного смещения фокуса решетки исследовались в работе [75] для случаев как линейной, так и нелинейной фокусировки.

Низкоамплитудные измерения давления вдоль оси решетки проводились капсульным гидрофоном при напряжении 1.6 В при различных смещениях фокуса вдоль оси решетки с шагом 1 мм. Численное моделирование соответствующих полей проводилось в приближении идеальной решетки с номинальными геометрическими параметрами и равномерным распределением

колебательной скорости на ее поверхности в программной комплексе T-array, разработанным в нашей лаборатории для моделирования линейных полей решеток с круглыми элементами [100].

Полученная зависимость давления в смещенном фокусе от его положения вдоль оси, а также продольные распределения давления, соответствующие эффективным пределам смещения фокуса (по критерию спада давления на 10% от давления при фокусировке в геометрический фокус) представлены на Рис. 1.15а. Видно, что максимум давления достигается при небольшом предфокальном смещении фокуса на 4.5 мм, но в остальном уменьшается с увеличением смещения, что согласуется с результатами, полученными для кольцевой решетки в предыдущем параграфе. Падение давления на 10% происходит при электронном смещении фокуса на -14 мм в сторону решетки и на +10 мм от нее. Интересно отметить, что в исследуемой двумерной решетке, в отличие от кольцевой решетки, охарактеризованной в предыдущем параграфе, диапазон безопасного смещения фокуса, определяемый максимальным уровнем интенсивности в побочных максимумах менее 10% от интенсивности в смещенном фокусе (или менее 31.6% по давлению) [70, 86] оказался значительно шире (от -27 до +35 мм) по сравнению с диапазоном эффективного смещения фокуса (т.е. по спаду амплитуды давления на 10%), что связано с более аперриодическим расположением ее элементов, чем в кольцевой решетке. Как и ожидалось, поскольку электронное смещение фокуса решетки изменяет эффективный угол ее фокусировки,

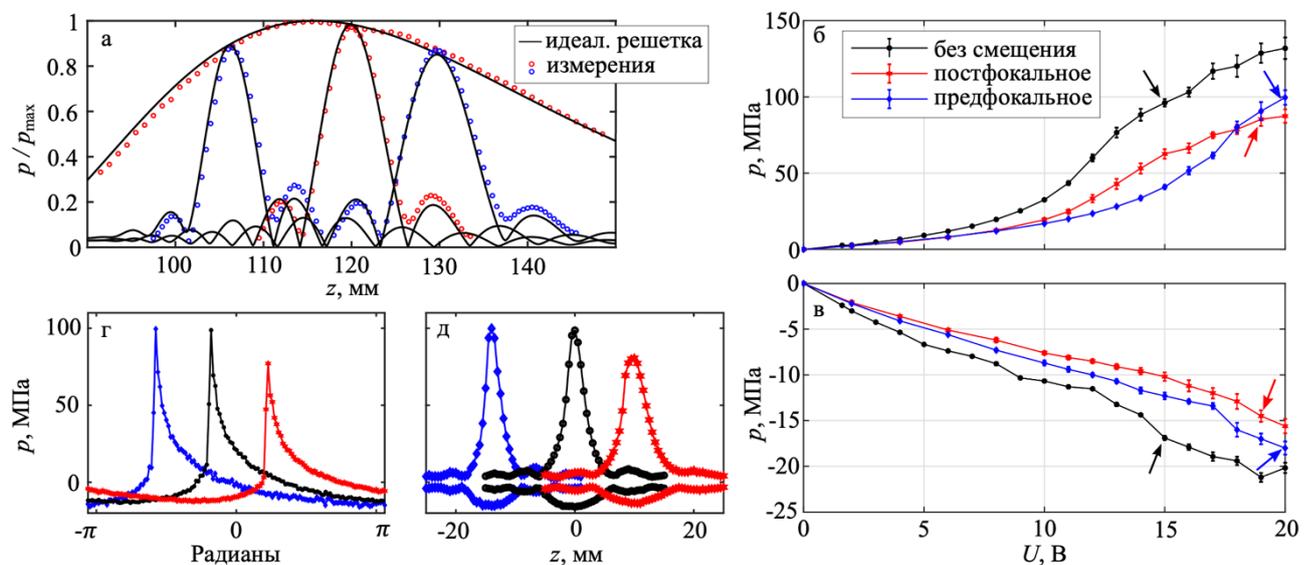


Рис. 1.15. (а) Результаты гидрофонных измерений (символы) и численного моделирования (сплошные кривые) для зависимости амплитуды давления в смещенном фокусе от его положения вдоль оси (огibaющая) и для трех аксиальных распределений давления без смещения фокуса и при его смещении до эффективных пределов. (б,в) Экспериментальные зависимости пикового положительного (б) и отрицательного (в) давлений в смещенном фокусе от подаваемого напряжения для трех положений фокуса. Погрешности соответствуют стандартным отклонениям при усреднении по нескольким периодам. Стрелками указаны режимы формирования ударного фронта с амплитудой 80 МПа. (г,д) Экспериментальные волновые профили без и со смещением фокуса (г) и аксиальные распределения пиковых давлений (д) в режимах, указанных стрелками на (б), (в) [75].

размеры фокального пятна изменяются соответствующим образом, особенно его длина, которая по уровню -6 дБ уменьшилась от 7.2 мм без смещения фокуса до 5.4 мм при предфокальном смещении фокуса, и увеличилась до 7.6 мм при постфокальном смещении (Рис. 1.15а).

Нелинейное поле решетки при электронном смещении ее фокуса до эффективных пределов (-14 и +10 мм) анализировалось только с помощью измерений, сделанных в свободном поле с помощью оптоволоконного гидрофона. Сначала при напряжении 15 В поле давления сканировалось для нахождения точки максимального положительного давления, в которой проводились дальнейшие измерения волновых профилей в диапазоне напряжений 2–20 В. В каждом профиле волны пиковые значения давлений усреднялись по нескольким периодам, количество которых было тем меньше, чем выше подаваемое напряжение, чтобы избежать влияния кавитации на конце гидрофона при высоких отрицательных давлениях. Полученные кривые насыщения без смещения фокуса и при его смещении вдоль оси представлены на Рис. 1.15б,в. Увеличение наклона кривой пикового положительного давления соответствует началу формирования ударных волн и начинается примерно при одном и том же напряжении без смещения фокуса (черные кривые) и при его постфокальном смещении (красные кривые). Это согласуется с результатами, полученными для кольцевой решетки в предыдущем параграфе, и объясняется конкуренцией двух эффектов: падения амплитуды давления при постфокальном смещении фокуса и увеличения фокального пятна и, соответственно, длины накопления нелинейных эффектов. При предфокальном смещении для формирования ударных волн требовалось большее напряжение, но достижимые пиковые значения давления при этом оказывались больше, чем в случае постфокального смещения, при напряжениях выше 19–20 В, что согласуется как с теорией для излучателей с большим углом фокусировки, так и с результатами, полученными в предыдущем параграфе для кольцевой решетки. Стрелками на Рис. 1.15б,в показаны режимы с формированием ударного фронта амплитудой 80 МПа (Рис. 1.15г), необходимой для инициации кипения в мягкой ткани в течение 5 мс при трех положениях фокуса. Видно, что в случае предфокального смещения фокуса разрыв уже является развитым, в отличие от двух других случаев фокусировки, однако пиковые давления в нем оказались ниже (на 13–15% для положительного и 15–19% для отрицательного давления). Аксиальные распределения пиковых давлений при трех рассматриваемых смещениях фокуса в нелинейной фокусировке (Рис. 1.15д) показывают, что так же, как для кольцевой решетки в предыдущем параграфе, длина фокального пятна отрицательного давления практически не изменяется при переходе в режим нелинейной фокусировки, а положительного давления значительно уменьшается (на 43–52%): 3.5 мм без смещения, 3 мм при предфокальном и 4.3 мм при постфокальном смещении фокуса (по уровню -6 дБ).

1.3.4 Влияние поперечного смещения фокуса на параметры линейного и нелинейного полей

Аналогично исследованию продольного смещения фокуса, измерения давления поперек оси решетки в фокальной плоскости проводились капсульным гидрофоном при напряжении 1.6 В при различных смещениях фокуса вдоль двух поперечных направлений с шагом 0.5 мм. Численное моделирование соответствующих полей проводилось аналогично случаю продольного смещения фокуса, описанному выше. Полученные зависимости давления в смещенном фокусе от его положения поперек оси, а также поперечные распределения давления, соответствующие эффективным пределам смещения фокуса, представлены на Рис. 1.16а,б. Диапазон эффективного смещения поперек оси оказался значительно уже, чем вдоль нее: ± 6 мм в обоих поперечных направлениях по сравнению с $[-14; +10]$ мм вдоль оси. Как и в случае продольного смещения, диапазон безопасного смещения поперек оси также оказался значительно шире (± 10 мм), чем диапазон эффективного смещения (± 6 мм). Однако, в отличие от случая продольного смещения, поперечное смещение фокуса не меняло форму фокального пятна, что согласуется с сохранением эффективного угла фокусировки при таком смещении.

Результаты гидрофонных измерений нелинейного поля решетки при поперечном смещении ее фокуса до эффективного предела (на 6 мм), выполненные аналогично п. 1.3.3, представлены на Рис. 1.16в–е. Как и в случае продольного смещения, пиковые давления при смещенном фокусе

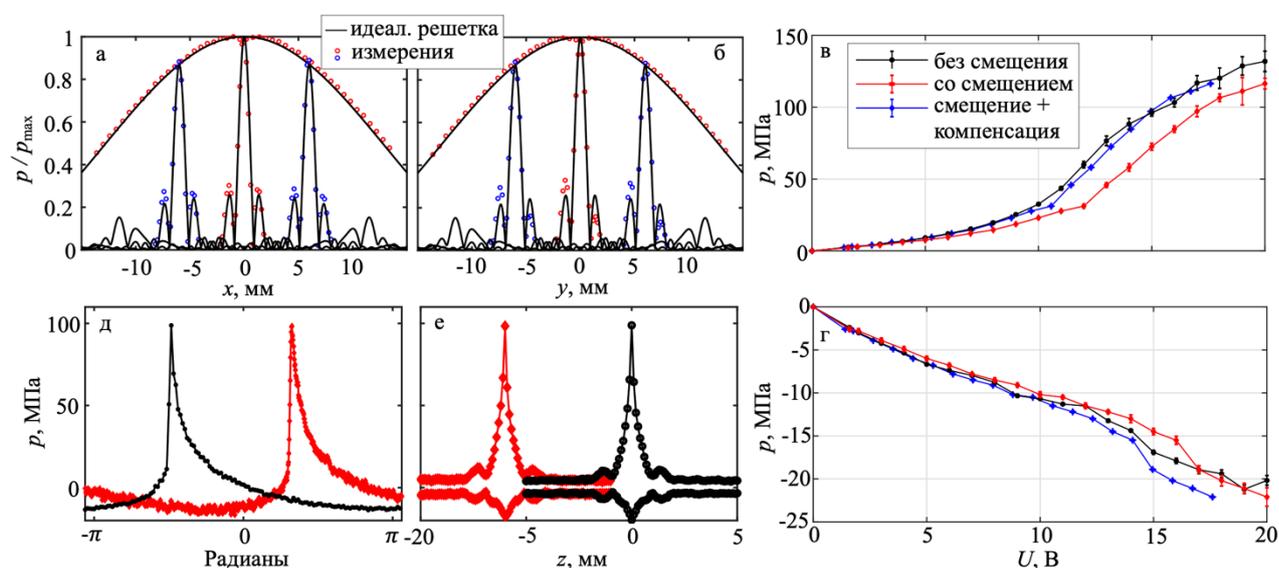


Рис. 1.16. (а,б) Результаты гидрофонных измерений (символы) и численного моделирования (сплошные кривые) для зависимости амплитуды давления в смещенном фокусе от его положения поперек оси (огibaющая) и для трех поперечных распределений давления без смещения фокуса и при его смещении до эффективных пределов. (в,г) Экспериментальные зависимости пикового положительного (в) и отрицательного (г) давлений в смещенном фокусе от подаваемого напряжения: без смещения (черным), со смещением (красным) и со смещением при компенсации напряжения (синим). Погрешности соответствуют стандартным отклонениям при усреднении по нескольким периодам. (д,е) Экспериментальные волновые профили без и со смещением фокуса с ударным фронтом в 80 МПа (д) и аксиальные распределения пиковых давлений (е) в режимах из (д). [75]

были меньше, чем без смещения вне зависимости от подаваемого напряжения (Рис. 1.16в,г). Однако, в отличие от случая продольного смещения, здесь это различие могло быть скомпенсировано соответствующим увеличением подаваемого напряжения с коэффициентом 0.9 (Рис. 1.16в,г, синяя кривая), чтобы компенсировать уменьшение эффективного коэффициента фокального усиления, наблюдаемое при линейной фокусировке (Рис. 1.16а,б). Таким образом, увеличение напряжения при смещении фокуса позволяло достичь той же амплитуды разрыва и пиковых давлений, как в случае без смещения (Рис. 1.16д), что значительно отличается от случая продольного смещения фокуса. Как и ожидалось в связи с сохранением эффективного угла фокусировки, формируемое фокальное пятно при поперечном смещении также не изменялось (Рис. 1.16е). По сравнению с линейной фокусировкой, ширина фокального пятна сохранялась для пикового отрицательного давления и уменьшалась на 0.4 мм для пикового положительного давления (по уровню -6 дБ).

1.3.5 Выводы к параграфу §1.3

В настоящем параграфе приведена акустическая характеристика 256-элементной спиральной решетки с возможностью двумерной электронной фазировки, выполненная в работе [75] с помощью комбинации численных и физических экспериментов. Показано, что диапазон эффективного аксиального смещения фокуса такой решетки значительно шире, чем у кольцевой решетки, охарактеризованной в предыдущем параграфе, особенно в рамках теплового критерия безопасности в связи с меньшим проявлением побочных максимумов из-за аперидического расположения элементов спиральной решетки. Также было показано, что смещение фокуса вдоль и поперек оси по-разному влияет на ударноволновые условия в смещенном фокусе. В частности, снижение амплитуд давления и ударного фронта при смещении поперек оси может быть скомпенсировано увеличением напряжения на излучателе пропорционально спаду давления в линейном поле, поскольку эффективный угол фокусировки акустического пучка при таком смещении фокуса не меняется. При продольном смещении фокуса наблюдались закономерности, полученные в §1.2 для кольцевой решетки и приводящие к непропорциональному изменению амплитуд давления и ударного фронта по сравнению с изменениями при линейной фокусировке.

§1.4 Выводы к первой главе

В настоящей главе с помощью комбинации гидрофонных измерений и численного моделирования на основе уравнения Вестервельта были охарактеризованы ультразвуковые поля экспериментально используемых далее в работе фокусированных излучателей с различными возможностями динамического управления их фокусом. Изучены различия в структуре соответствующих малоамплитудных акустических полей, а также в условиях нелинейного насыщения и формирования ударных волн в фокусе. Показано, что закономерности,

наблюдаемые в линейных и нелинейных акустических полях, создаваемых излучателями с различными фиксированными углами фокусировки, отличаются от наблюдаемых при задании угла фокусировки электронным смещением фокуса фазированной решетки. А именно, при динамической фокусировке возникают побочные максимумы с возможным формированием в них ударных фронтов при меньшей акустической мощности, чем необходимо для формирования ударного фронта в основном максимуме. Кроме того, было показано, что при электронном смещении фокуса амплитуда ударного фронта в нем меняется значительно сильнее, чем амплитуда давления в линейном поле. Например, при предфокальном смещении фокуса с падением давления в линейном поле на 10% амплитуда развитого разрыва в фокусе увеличивается на 74%. Полученные закономерности необходимо учитывать при использовании электронного смещения фокуса фазированных решеток для различных HIFU-приложений.

Рассмотренные и охарактеризованные в настоящей главе излучатели фокусированного ультразвука будут использованы в экспериментах, проведенных в данной работе и описанных в последующих главах настоящей диссертации, а именно секторные излучатели будут использованы в §§2.2–2.4 и Главах 3 и 5, кольцевая решетка – в §2.5 и спиральная решетка – в Главе 4.

Глава 2

ЛИКВИФИКАЦИЯ КРУПНЫХ ГЕМАТОМ КАК ПРИМЕРА ТКАНИ С МАЛОЙ ЖЕСТКОСТЬЮ

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A5, A6, A7].

Как уже было сказано ранее, эффективность механической деструкции биологических тканей с помощью ударно-волновых ультразвуковых импульсов зависит, помимо параметров воздействия, от типа и свойств разрушаемой ткани [47–49, 52, 53]. В частности, отклик среды на ультразвуковое механическое разрушение определяется ее упругими свойствами, поэтому различные типы биотканей по-разному устойчивы к гистотрипсии [42, 43, 47, 52], при этом наибольшую устойчивость показала соединительная ткань [53]. Основным из таких упругих параметров, определяющих чувствительность биологической ткани к механическому разрушению, является ее жесткость, под которой при характеристике биологической ткани обычно подразумевается ее модуль сдвига или модуль Юнга [52]. В частности, жесткие и/или прочные ткани, что часто подразумевает высокое содержание коллагена, обычно более устойчивы к механическому разрушению ультразвуком, т.е., как правило, для полноценного разрушения таких тканей требуется более длительное воздействие, более длинные ультразвуковые импульсы и большие амплитуды ударного фронта, при этом получаемые разрушения обычно оказываются меньших размеров [101–104]. Эта особенность тканей с высоким содержанием коллагена имеет клинические перспективы, поскольку многие применения HIFU требуют щадящего воздействия на близлежащие к области лечения тканевые структуры, такие как, например, кровеносные сосуды. Однако, это также и усложняет процесс планирования воздействия, поскольку различные по составу и структуре ткани по-разному восприимчивы к их разрушению ударно-волновыми ультразвуковыми импульсами.

Примером биологической ткани с малой жесткостью может служить модель крупной гематомы человека, представляющей скопление коагулированной крови в толще мягких тканей, возникающее при кровоизлиянии из поврежденных кровеносных сосудов в результате травмы или хирургического вмешательства [105]. В качестве одного из этапов гемостаза (т.е. остановки кровотечения организмом), в результате действия фермента тромбина на белок фибриноген, содержащийся в крови, образуется белок, называемый фибрином, который затем полимеризуется в фибриновые нити [106]. Эти нити объединяются в трехмерную сеть, которая удерживает в своих ячейках составляющие сгустка, в том числе клетки крови и жидкую плазму.

Лечение таких крупных (от ста миллилитров до нескольких литров) внесосудистых гематом, локализованных, например, в брюшной полости, представляет собой важную клиническую проблему. Сгусток крови, находясь в промежутках между органами, оказывает избыточное давление на эти органы, что может привести к синдрому сдавливания и органной

недостаточности. Высока и вероятность присоединения вторичной инфекции с нагноением гематомы. Стандартные методы лечения объемных гематом недостаточно эффективны: поддерживающая терапия неприменима для крупных глубоких гематом, ангиоэмболизация не подходит

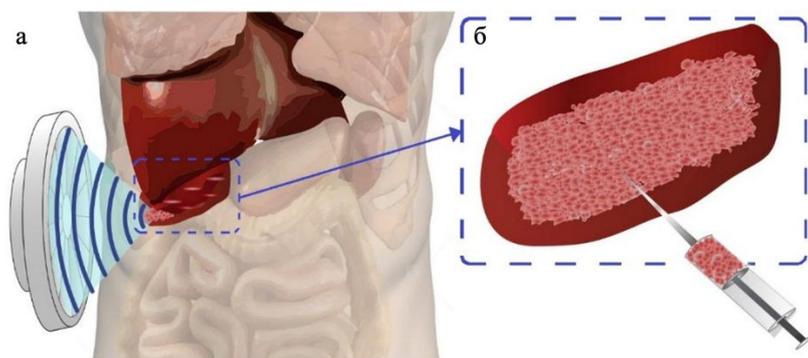


Рис. 2.1. Иллюстрация идеи применения мощного фокусированного ультразвука для разжижения и аспирации внесосудистых гематом на примере гематомы печени.

для крупных сосудов, а хирургическое удаление часто приводит к инфекциям и рецидивам [105]. Метод гистотрипсии может служить перспективным способом лечения таких крупных внесосудистых гематом, поскольку может позволить быструю и неинвазивную ликвидацию объема гематомы для последующей аспирации (т.е. удаления) разжиженного содержимого тонкой иглой (Рис. 2.1) [50, 107].

Помимо клинической актуальности исследования объемных гематом с точки зрения их ликвидации мощным ультразвуком, коагулированная кровь также является наиболее простым фантомом биологической ткани, удобным для лабораторных исследований [50]. Однородность таких образцов позволяет минимизировать эффекты аббераций и рассеяния, а мягкость образцов делает их наиболее восприимчивыми к механическому воздействию: разрушение достигается при меньшем количестве импульсов и имеет больший размер, чем для других биологических тканей как, например, простата, печень или сердце. В результате, получение объемных разрушений в образцах коагулированной крови осуществляется быстро и просто, поэтому на таких образцах удобно отрабатывать протоколы различных режимов гистотрипсии.

Для неинвазивного измерения упругости тканей в клинической практике обычно используется метод ультразвуковой эластографии [108]. Он основан на генерации сдвиговых напряжений или сдвиговых волн внутри исследуемой области и последующих измерениях вызванной напряжением деформации или скорости распространения сдвиговых волн. Компрессионная эластография крупных сгустков крови *in vivo* ранее была выполнена в работе [109] на примере гематом с максимальным диаметром от 5 до 28 мм. Однако, компрессионная эластография позволяет только качественные измерения упругости целевого участка относительно окружающих его тканей и не показывает абсолютных значений жесткости ткани. Для количественных измерений модуля сдвига в клинической практике используется метод эластографии сдвиговой волной (ЭСВ), который успешно применяется для диагностики, например, рака простаты [110–112] и рака молочной железы [113, 114]. Для крупных гематом в

брюшной полости *in vivo* метод ЭСВ еще не использовался, но появляются работы по использованию ЭСВ для исследования моделей крупных гематом *in vitro*. В работе [115] изучался процесс образования крупных (100 мл) сгустков крови свиньи *in vitro* с помощью метода ЭСВ. Также этот метод использовался в работе [52 (А6)] для исследования старения крупных (200 мл) сгустков говяжьей крови *in vitro*, где было показано, что модуль сдвига таких гематом не зависит от их возраста и степени ретракции в пределах 1 недели. Отметим, что изменение со временем упругих свойств крупных гематом и малых внутрисосудистых сгустков крови (тромбов) происходит по-разному. Так, в работах [116–118] было обнаружено, что для внутрисосудистых сгустков более высокая степень ретракции коррелирует с более высоким модулем упругости и приводит к более высокой устойчивости к тромболизису (т.е. разжижению тромбов).

Недавно были проведены успешные исследования по применению гистотрипсии для внутрисосудистого тромболизиса в сочетании с тромболитическими препаратами [116–118]. Однако крупные абдоминальные гематомы могут отличаться от внутрисосудистых тромбов по своим механическим свойствам из-за большего объема и различных условий образования и естественного прогрессирования. Например, измерения модуля сдвига, проведенные в работе [116] для небольших (6.5 мл) сгустков говяжьей крови *in vitro* оказались выше, чем полученные в работе [52] для крупных (200 мл) говяжьих гематом *in vitro*. Таким образом, механические свойства гематом большого объема отличаются от свойств внутрисосудистых тромбов малого размера и являются гораздо менее изученными.

Еще одним интересным наблюдением является зависимость восприимчивости мелких внутрисосудистых тромбов к тромболизису от их ультраструктурных свойств. В работе [119] было показано, что ретрагированные сгустки крови *in vitro* более устойчивы тромболизису и имеют большее поверхностное содержание фибрина и более высокую пористость по сравнению с не ретрагированными сгустками, но одинаковый средний диаметр нитей фибрина. Ультраструктура мелких тромбов и процесс их формирования изучены гораздо более подробно, чем для гематом большого объема [119–121]. В работе [122] с помощью ультраструктурного анализа хирургически извлеченной капсулы субдуральной гематомы в зависимости от ее возраста (от 15 суток и более) была показана постепенная замена фибриновой сети коллагеновыми волокнами, что коррелирует с результатами для мелких внутрисосудистых тромбов *in vivo* в работе [123]. Однако гематомы брюшной полости не склонны к образованию капсулы и недостаточно изучены на ультраструктурном уровне.

В связи с этим, в этой главе диссертационной работы изучаются упругие и ультраструктурные свойства модели крупной гематомы как примера наиболее мягкой биоткани, экспериментально реализуется ее ликвидация с помощью ударноволновых ультразвуковых импульсов в различных режимах гистотрипсии, отрабатываются протоколы воздействия для

ускорения процесса ликвификации, предлагается методика количественной оценки эффективности ликвификации на ультраструктурном уровне и исследуется зависимость устойчивости модели гематомы к ликвификации ультразвуком от ее упругого модуля, ультраструктуры и степени ретракции.

§2.1 Исследование упругих, микро- и ультраструктурных свойств модели гематомы человека

Как было сказано в предисловии к настоящей главе, устойчивость биологической ткани к ее механическому разрушению мощным фокусированным ультразвуком зависит от свойств разрушаемой ткани, в частности, от ее жесткости (модуля сдвига), состава и ультраструктуры. В качестве примера наиболее мягкой биоткани в этой главе рассматривается модель гематомы человека, которая представляет как актуальную клиническую проблему сама по себе, так и удобную модель биоткани для отработки протоколов метода гистотрипсии. Настоящий параграф будет посвящен исследованию упомянутых свойств модели крупной гематомы человека *in vitro*.

2.1.1 Измерение упругого модуля и ретракции гематом

Методы

Модуль сдвига крупных гематом человека *in vitro* измерялся в этой работе двумя методами: методом эластографии сдвиговой волной (ЭСВ) [124] и методом индентометра (вдавливания жесткого шарика) [125–128].

Измерения методом ЭСВ

Принцип метода ЭСВ для измерения модуля сдвига подробно изложен в работах [124, 129–131]. Идея метода заключается в использовании акустической радиационной силы диагностического ультразвукового пучка для генерации «толчка» на некоторой глубине в исследуемом материале и, как следствие, возбуждения расходящейся сдвиговой волны в направлении, перпендикулярном оси возбуждающего пучка (Рис. 2.2а). Прохождение сдвиговой волны через исследуемую область сопровождается смещением частиц среды, что отслеживается с помощью диагностических ультразвуковых пучков и позволяет оценить скорость ее распространения $c_{\text{сдвиг}}$. Скорость сдвиговой волны в некоторой среде напрямую связана с модулем сдвига μ этой среды через ее плотность ρ :

$$c_{\text{сдвиг}} = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}} \quad (2.1)$$

Таким образом, измерение скорости распространения сдвиговой волны в заданной области ткани позволяет оценить ее сдвиговой модуль, или же модуль Юнга E , который в приближении несжимаемой и однородно упругой среды, в три раза превышает сдвиговой модуль [130, 132] и является выходным параметром большинства ЭСВ-аппаратов.

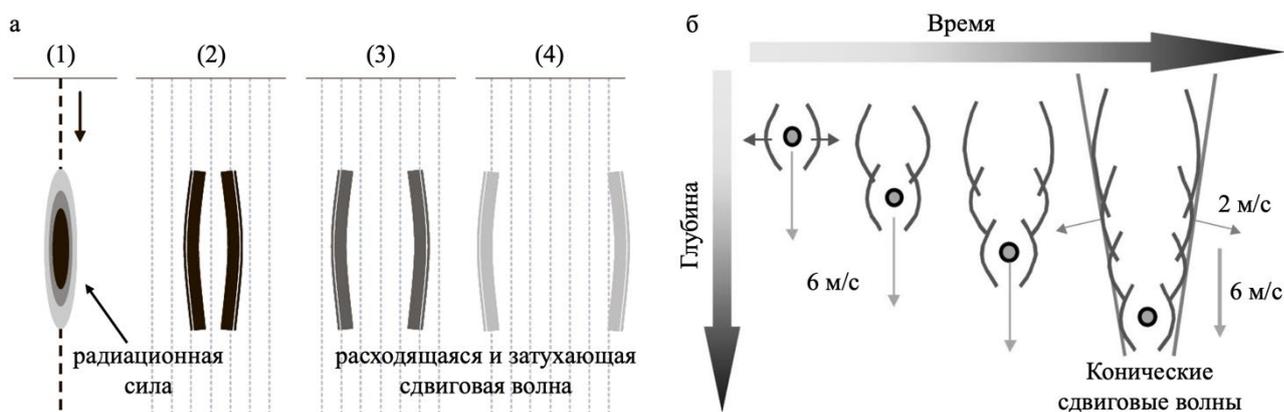


Рис. 2.2. Иллюстрации принципа метода эластографии сдвиговой волной (а) и его сверхзвуковой модификации (б). [129, 130]

В более новой модификации метода ЭСВ, называемой сверхзвуковой (Supersonic Shear wave Imaging – SSI), используется последовательная генерация нескольких «толчков» на увеличивающейся глубине, что эквивалентно движению источника «толчка» со скоростью, превышающей скорость медленных сдвиговых волн в исследуемой среде (Рис. 2.2б). В результате суперпозиция сдвиговых волн от всех фокусов приводит к формированию конуса Маха и, соответственно, распространению сдвиговых волн конической геометрии и значительно большей амплитуды, чем генерирует один отдельный «толчок». Таким образом, сдвиговая волна затухает на значительно большем расстоянии, и потому становится более легкой для детектирования и определения ее скорости. Именно этот метод ЭСВ реализован в аппарате Aixplorer (Supersonic Imagine, Франция), используемом далее в настоящей работе.

Для ЭСВ-измерений в качестве моделей гематом *in vitro* использовались сгустки человеческой крови четырех здоровых доноров-добровольцев, предоставленной НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева с антикоагулянтом ЦФД в соответствии с протоколом локального этического комитета (Правилами заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов). Кровь разливалась по 200 мл в полипропиленовые контейнеры с диаметром основания 8 см ($N=8$ образцов) и коагулировалась путем добавления 10% раствора хлорида кальция (ДальХимФарм, Россия) в соотношении 1:40 к объему крови при различных температурах, контролируемых термометром в пределах 6–10°C ($N=1$), 17–22°C ($N=1$) и 36–38°C ($N=6$).

Модуль сдвига образцов человеческой крови измерялся методом эластографии сдвиговой волной (ЭСВ) на базе МНОЦ МГУ сначала в процессе коагуляции крови в течение 120 минут после добавления коагулянта, и затем один раз в сутки до 8 дней хранения образовавшихся сгустков. Предполагалось, что модуль сдвига составляет одну треть от модуля Юнга, как обычно считается в мягких тканях [132]. Измерения осуществлялись с помощью ультразвукового сканера Aixplorer (Supersonic Imagine, Франция) и линейного датчика SL15-4. Для этого кровь наливалась

в полипропиленовый контейнер на резиновую подложку-поглотитель толщиной ~ 4 см. Датчик в полиэтиленовом чехле размещался на поверхности либо жидкой крови (Рис. 2.3а), либо получившегося сгустка (Рис. 2.3б). Распределение модуля сдвига в образце при коагуляции наблюдалось в области ~17х23 мм, внутри которой на участках с однородной структурой каждые 1–5 минут в течение первого часа и затем каждые 5–10 минут до конца наблюдений проводились три измерения вдоль одной вертикали на глубинах 0.8–2.1 см в круглых областях диаметром 3 мм. Далее образцы хранились при 2°C для аналогичных ежедневных измерений в течение 8 суток.

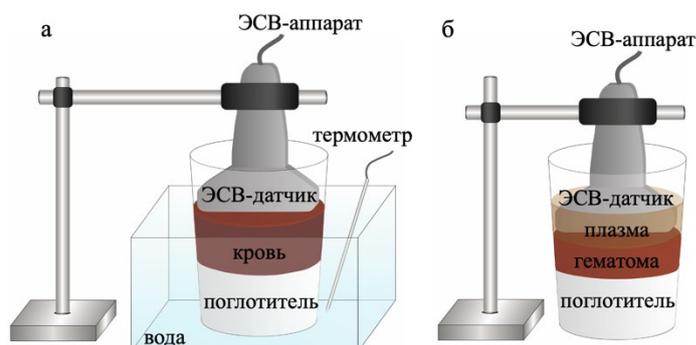


Рис. 2.3. Схема экспериментальной установки для измерения модуля сдвига (а) человеческой крови в процессе ее коагуляции и (б) человеческих гематом в процессе их хранения методом эластографии сдвиговой волной.

Измерения методом индентометра

Для измерения модуля сдвига методом индентометра образцы гематом человека *in vitro* были подготовлены двумя способами: в отсутствии коагулянта (т.е. коагулированные естественным путем) и с добавлением коагулянта. В первом наборе измерений свежая кровь без антикоагулянта была взята у здоровых доноров путем стерильной венепункции в соответствии с рекомендациями НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева. Кровь заливалась в цилиндрические полипропиленовые контейнеры (по 55 мл) и коагулировалась естественным путем при комнатной температуре в течение 3 часов (Рис. 2.4а). Во втором наборе измерений случайные единицы донорской крови, стабилизированные стандартным цитратным антикоагулянтом (ЦФД), были получены из отделения банка крови НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева и использованы без аутентификации. Кровь с антикоагулянтом заливалась в те же формы, дегазировалась в

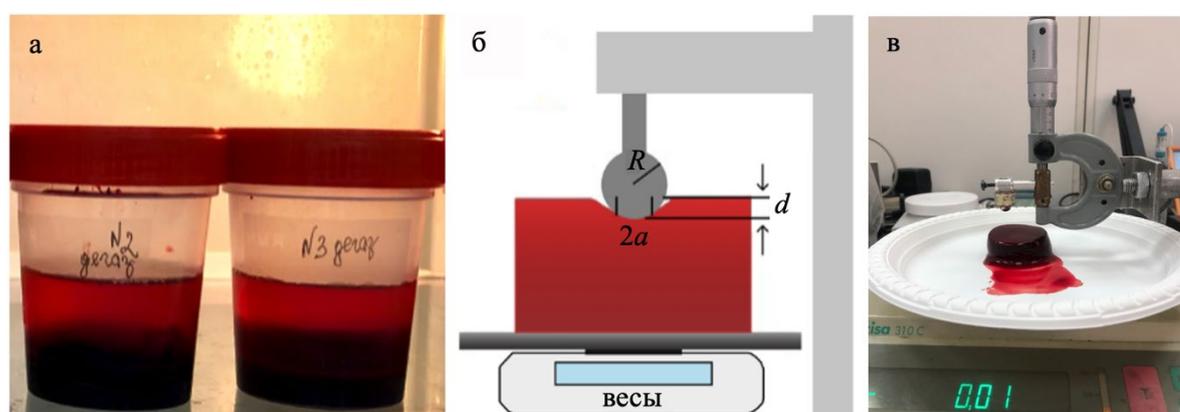


Рис. 2.4. (а) Снимок образцов человеческих гематом в пластиковых контейнерах с выделившейся из них плазмой. (б–в) Схема (б) и фотография (в) экспериментальной установки для измерения модуля сдвига человеческих гематом методом индентометра.

течение 1 часа, коагулировалась в термостате при температуре 37°C в течение 3 часов путем добавления коагулянта (10% раствора хлорида кальция, ДальХимФарм, Россия) в донорскую кровь в соотношении 1:40 к объему крови.

Модули сдвига образцов гематом измерялись с помощью изготовленного на заказ индентометра (Рис. 2.4б–в), в котором жесткий сферический индентор, прикрепленный к системе линейного позиционирования, использовался для смещения поверхности образца посредством непрерывного вдавливания (или сканирования индентором) поверхности исследуемого образца. Коэффициент Пуассона материала сгустка считался близким к 0.5, как обычно предполагается для мягких тканей [132], и, следовательно, модуль упругости (или модуль Юнга) предполагался в три раза большим модуля сдвига. Модуль сдвига был рассчитан из соотношения сил смещения для сферического индентора, которое может быть выражено аналитически при условии изотропности, линейной упругости и несжимаемости среды, а также малости радиуса контакта и смещения по сравнению с размером образца [126, 127]:

$$F^{\frac{2}{3}} = \left(\frac{16\mu}{3}\right)^{\frac{2}{3}} R^{\frac{1}{3}} d \quad (2.2)$$

Здесь F – сила давления со стороны индентора на поверхность образца, d – вызванное этой силой смещение поверхности образца (глубина внедрения индентора), R – радиус индентора, μ – модуль сдвига. В использованной в работе экспериментальной установке в качестве индентора использовался стальной шарик радиусом $R = 4$ мм, сила давления измерялась с помощью электронных весов (Precisa 310С, Швейцария), и максимальная глубина внедрения индентора не превышала 2 мм с шагом 0.1 мм. Далее образцы хранились при 2°C для аналогичных измерений через 3 и 7 суток хранения.

Измерение степени ретракции гематом

Для измерения степени ретракции использовалась отдельная группа рекальцифицированных гематом. Для этого кровь $n = 6$ других здоровых доноров с антикоагулянтом заливалась в пластиковые формы: по 50 мл для измерений в день коагуляции и по 175–200 мл на 5-й и 10-й день хранения. Плотность крови измерялась как отношение ее массы к объему перед инкубацией в термостате при 37°C в течение 1 часа. После нагрева образцы крови коагулировались в течение 1 часа при 37°C путем добавления 10% раствора хлорида кальция. Объем и вес ретрагированных гематом измерялись на 0, 5 и 10 сутки хранения для расчета их плотностей и степени ретракции. Степень ретракции рассчитывалась как отношение объема выделившейся плазмы к исходному объему крови до коагуляции. Эта группа образцов была также использована далее для экспериментов, описанных в §2.5.

Статистический анализ

Все измеренные величины были подвержены статистическому анализу согласно двухвыборочному гомоскедастическому *t*-критерию Стьюдента. Порог значимости был установлен на уровне $p = 0.05$.

Результаты

На Рис. 2.5 представлены репрезентативные ЭСВ-снимки одного из образцов крови в разные моменты времени в процессе ее коагуляции при 37°C. При жидком состоянии крови сдвиговый модуль практически равен нулю и неизмерим системой Aixplorer (Рис. 2.5а), что также наблюдалось в работе [115]. В жидком состоянии также наблюдались потоки крови под действием ЭСВ-«толчков» (Рис. 2.6а), которые позволили скоррелировать наблюдаемые позже артефакты в коагулированном состоянии, соответствующие искусственно завышенным значениям жесткости (Рис. 2.6б). В связи с этим, такие более жесткие линии на ЭСВ-изображениях считались артефактами, и избегались при измерениях эластичности сгустков.

Модуль сдвига становился измеримым через некоторый промежуток времени после добавления коагулянта, называемый здесь временем начала коагуляции. Коагуляция начиналась позже при более низкой температуре крови: при 6–10°C время начала коагуляции составляло 113 мин, при 17–22°C – 45 мин, а при 36–38 °C – 24–30 мин. Качественно, по мере коагуляции жесткость образцов сначала была однородно низкой (Рис. 2.5в), затем величина сдвигового модуля достигала максимума (Рис. 2.5г) а к окончанию наблюдений сгусток становился в среднем менее жестким и менее однородным (Рис. 2.5д).

Количественное измерение значений модуля сдвига в наиболее однородных участках образцов в процессе коагуляции показало, что значение сдвигового модуля достигало стационарного значения 0.53 ± 0.17 кПа (среднее по всем образцам) за 20–25 мин после начала коагуляции при температуре 37°C и сохранялось неизменным в пределах статистической погрешности до конца наблюдений (Рис. 2.7а).

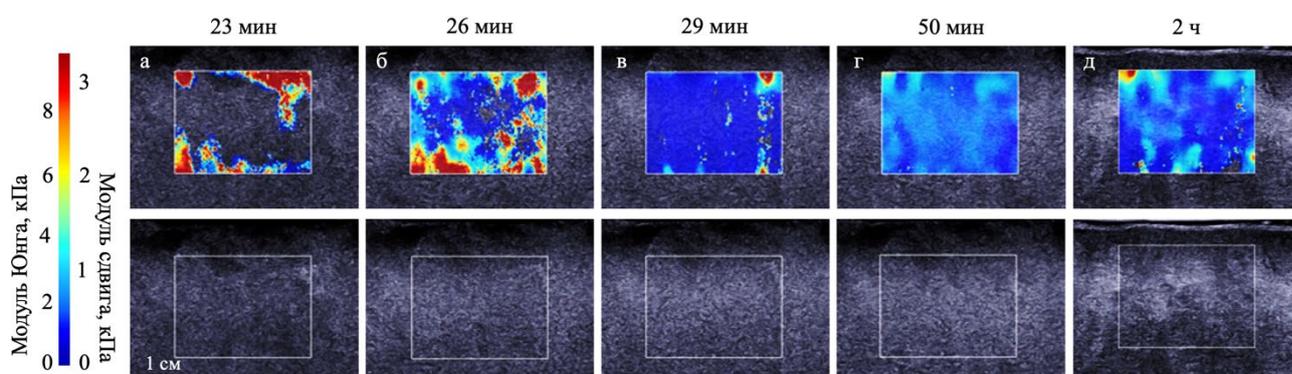


Рис. 2.5. Репрезентативные снимки в режиме ЭСВ (верхний ряд) и В-режиме (нижний ряд) одного из образцов крови в процессе ее коагуляции при 37°C, полученные с помощью системы Aixplorer в разные моменты времени от момента добавления коагулянта. Маркерная линия: 1 см.

Ежедневные ЭСВ-измерения показали, что значение модуля сдвига, достигнутое в день коагуляции, оставалось статистически неизменным в течение следующих 8 суток хранения гематом (черные столбцы на Рис. 2.7б). Измерения методом индентометра подтвердили результаты ЭСВ: модули сдвига как естественно коагулированной, так и рекальцифицированной крови оставались статистически одинаковыми в течение всей недели хранения гематом (серые символы на Рис. 2.7б).

Методом ЭСВ было показано отсутствие значительных изменений карты распределения жесткости (Рис. 2.8, верхний ряд) в течение 8 суток хранения, в то время как структура гематомы утратила свою однородность в течение первых суток хранения, вероятно, из-за воздействия ЭСВ во время коагуляции, и в дальнейшем оставалась неизменной, судя по УЗИ-снимкам в В-режиме (Рис. 2.8, нижний ряд).

Плотность крови, измеренная до начала коагуляции и усредненная по всем донорам, составила $1038 \pm 16 \text{ кг/м}^3$ (пунктирные линии на Рис. 2.9а,б). Плотности образовавшейся гематомы и выделившейся плазмы были близки к плотности крови (Рис. 2.9а,б) и оставались статистически постоянными в течение 8 суток хранения гематом. При этом по мере хранения образцы гематом испытывали статистически значимую ретракцию, т.е. уменьшение их объема по мере потери жидкости в виде плазмы крови (Рис. 2.9в). Наиболее заметное увеличение степени ретракции гематом наблюдалось после первых 5 суток хранения (в среднем от 38% до 55%), и лишь незначительное увеличение наблюдалось к 10-м суткам (на 2%).

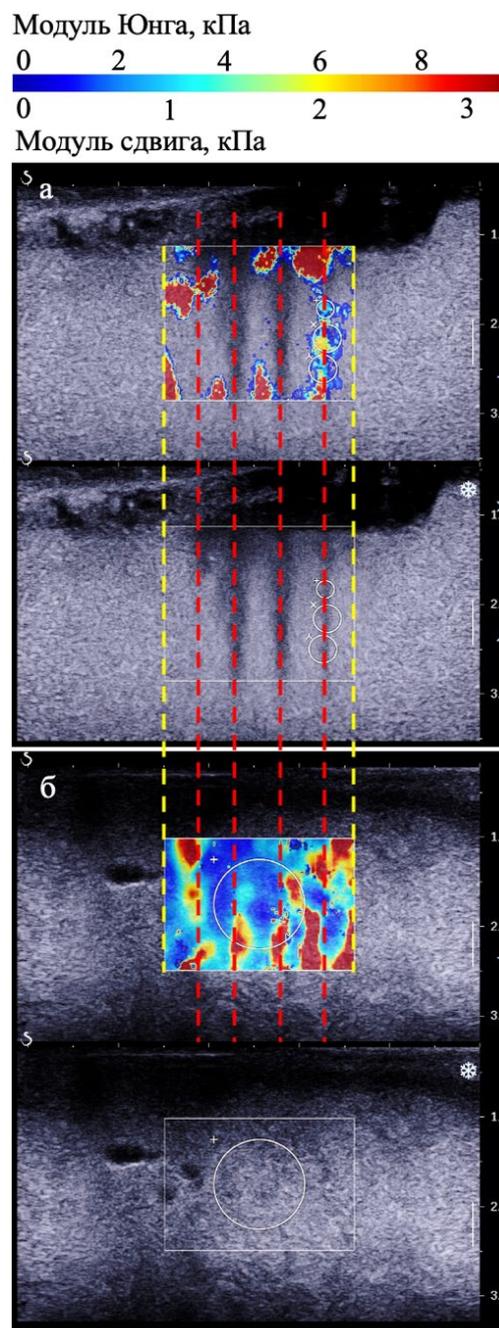


Рис. 2.6. Иллюстрация ЭСВ-«толчков», создающих артефакты при измерениях в гематоме. (а) ЭСВ-снимок жидкой крови с видимыми «толкающими» пучками (красные пунктирные линии). (б) ЭСВ-снимок свернувшейся крови с видимыми более жесткими линиями, коррелирующими с положением «толкающих» пучков.

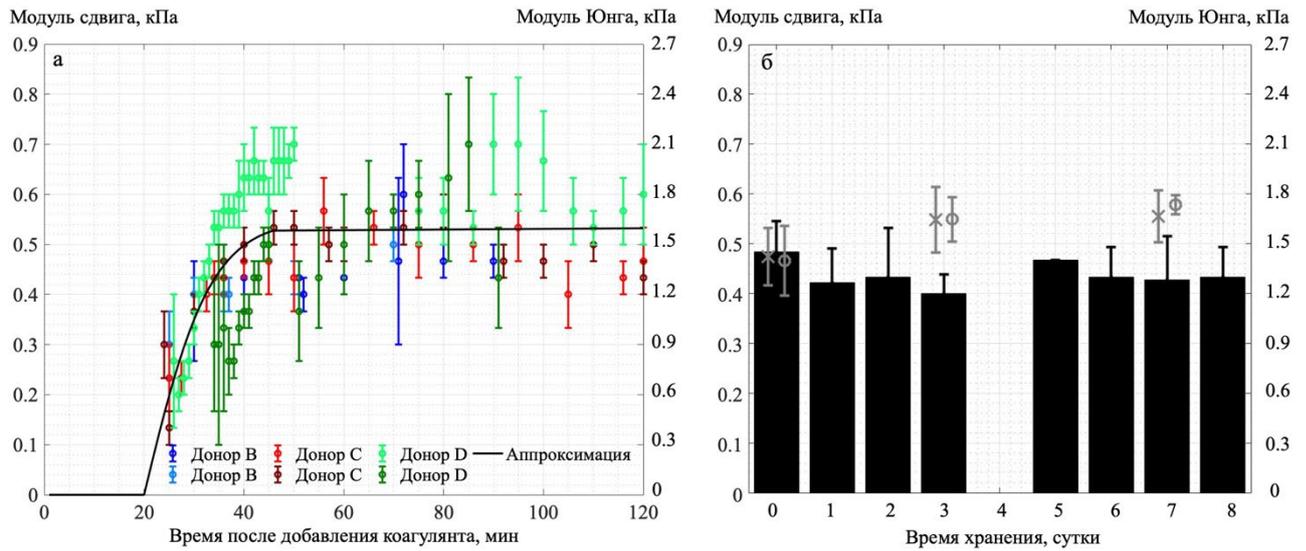


Рис. 2.7. Модуль сдвига (левая вертикальная ось) и модуль Юнга (правая вертикальная ось) образцов гематомы человека *in vitro* в зависимости от времени: (а) во время коагуляции при 37°C для каждого из $N = 6$ образцов (цветные символы), и аппроксимация этих результатов (черная кривая) по гиперболическому тангенсу (от 20 до 45 мин) и линейной функции (от 45 до 120 мин); (б) в течение 8 суток хранения, усредненные по всем образцам. Черные столбцы представляют результаты, полученные методом ЭСВ, серые символы – методом индентометра: символы-крестики – для рекальцифицированных гематом, круглые символы – для гематом, свернувшихся естественным образом. Данные представляют средние значения с погрешностями, равными стандартному отклонению.

2.1.2 Микро- и ультраструктурный анализ гематом

Методы

Для анализа структуры биологических образцов существует набор стандартных методик, различающихся по принципу работы, достижимому разрешению и цели анализа, в число которых входят, например, гистологическое исследование, цитологическое, иммуногистохимическое, конфокальная микроскопия, электронная микроскопия и др. В настоящей работе будут использованы четыре типа исследований: два на основе светового микроскопа (гистологический и цитологический анализ) и два с использованием электронного микроскопа (просвечивающая и

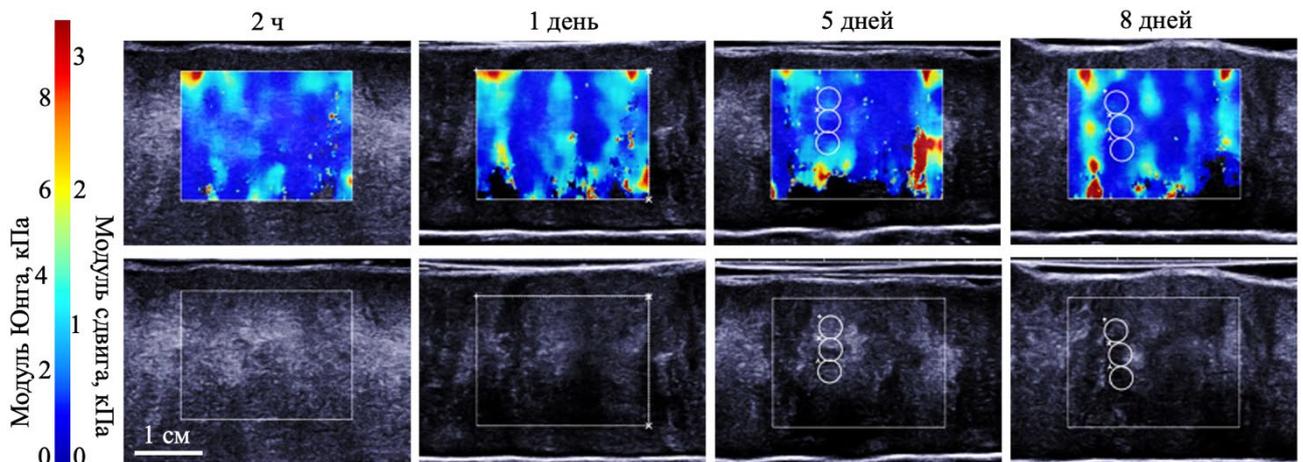


Рис. 2.8. Репрезентативные снимки в режиме ЭСВ (верхний ряд) и В-режиме (нижний ряд) на разные сутки хранения образца гематомы, подвергнувшегося ЭСВ во время коагуляции. Маркерная линия: 1 см.

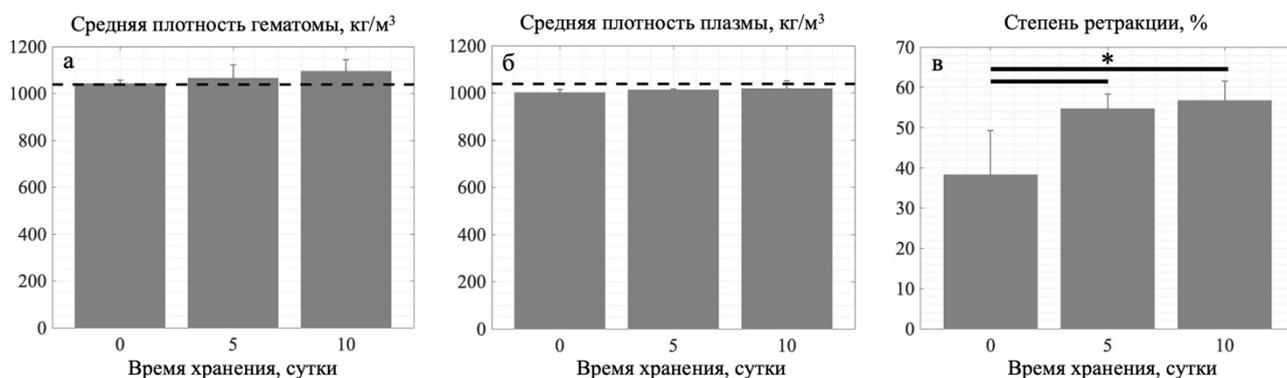


Рис. 2.9. Зависимость от времени хранения: (а) средней плотности гематом, (б) средней плотности выделившейся плазмы, (в) степени ретракции гематом, не подвергшихся ЭСВ. Пунктирные линии на (а) и (б) соответствуют плотности крови, усредненной по всем донорам, измеренной до начала коагуляции. Данные представляют средние значения с погрешностями, равными стандартному отклонению; * указывает на статистически значимое различие при $p < 0.05$.

сканирующая электронная микроскопия). Гистологическое исследование представляет собой анализ микронного среза биологического образца на предметном стекле на световом микроскопе после специального окрашивания среза для цветового дифференцирования тканей различного типа [133]. Такой тип анализа позволяет исследовать биологические образцы на тканевом уровне. Такой тип исследования будет использоваться далее в Главах 3 и 5 настоящей диссертации.

Поскольку клетки гематомы не связаны друг с другом на тканевом уровне, межклеточная связь в ней значительно слабее, чем в тканях различных органов, что сильно осложняет взятие целостного микронного среза гематомы для гистологического анализа. В связи с этим, в этой работе для анализа образцов гематом на микроскопическом уровне использовалось цитологическое исследование. Оно также включает в себя анализ образца на предметном стекле с помощью светового микроскопа, однако вместо гистологического среза подготавливается мазок на стекле также для последующего окрашивания. Такой тип исследования позволяет оценивать формы и состояния клеток в образце, что и было реализовано в этой части работы.

Для анализа образцов на ультраструктурном уровне может быть использована электронная микроскопия (ЭМ). Изображение в ЭМ формируется с помощью фокусированного пучка электронов путем детектирования либо вторичных электронов, генерируемых при взаимодействии падающего пучка с поверхностью объекта (в случае сканирующей электронной микроскопии, СЭМ), либо прошедшего пучка сквозь тонкий срез объекта (в случае просвечивающей электронной микроскопии, ПЭМ) [134]. Разрешающая способность электронного микроскопа в сотни раз превышает разрешающую способность светового микроскопа, и потому позволяет исследовать образцы на ультраструктурном уровне с максимальным разрешением порядка 0.15 нм. Для ПЭМ объектом исследования служит тонкий срез (~100 нм) изучаемого образца, поскольку он должен быть прозрачен для падающего пучка электронов, в то время как в СЭМ изучается поверхность образца, поэтому его толщина может

быть любой. Опять же, из-за неудобства взятия тонких срезов из образца гематомы, в настоящей части работы применялось СЭМ-исследование образцов гематом, а ПЭМ-анализ будет использован далее в Главе 3 настоящей диссертации.

Цитологический анализ

У каждого образца из двух групп гематом (использованных для ЭСВ-измерения или для измерения степени ретракции), ежедневно в течение 8 суток хранения производился забор небольшого фрагмента содержимого с помощью иглы 18G. Мазок капли содержимого наносился на поверхность предметного стекла (Рис. 2.10а), фиксировался в фиксаторе по Май-Грюнвальду, далее окрашивался по Романовскому-Гимзе и заключался под покровное стекло. Исследование и фотографирование полученных образцов проводилось на световом микроскопе Zeiss Axio Imager на базе факультета фундаментальной медицины МГУ (Рис. 2.10б).

Ультраструктурный анализ

Для СЭМ-исследования забор содержимого гематом производился по процедуре, аналогичной описанной выше для цитологического исследования. Далее капли содержимого наносились на тонкую стеклянную подложку диаметром 10 мм, фиксировались в 2.5% растворе глутаральдегида на 0.1 М фосфатно-солевом буфере, обезвоживались в возрастающих концентрациях этилового спирта, пропитывались в гексаметилдисилазане, далее высушивались на воздухе, монтировались на предметные столики (Рис. 2.10в) и напылялись золотом [135]. Дальнейшее исследование и фотографирование полученных образцов проводилось на сканирующем электронном микроскопе Camscan Series 4 в лаборатории биологического факультета МГУ (Рис. 2.10г).

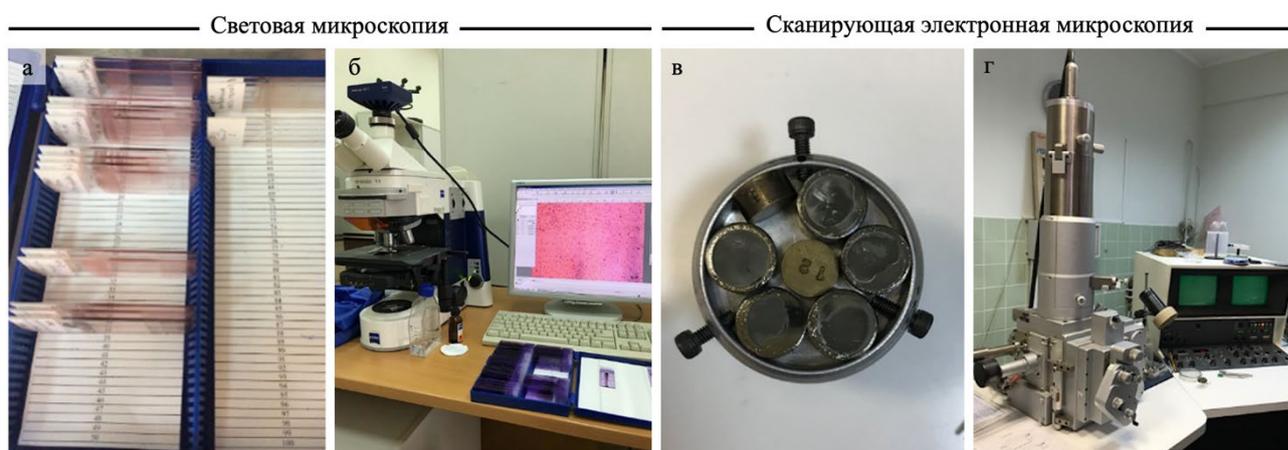


Рис. 2.10. Фотографии образцов (а, в) и установок (б, г) для цитологического исследования на световом микроскопе (а–б) и для сканирующей электронной микроскопии (в–г).

Результаты

На Рис. 2.11 представлены иллюстративные снимки содержимого гематом человека на 0, 1, 5 и 10 сутки хранения, полученные с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии. На цитологических снимках (верхний ряд) можно видеть, что в день коагуляции все пространство было заполнено нормальными клетками крови (в основном эритроцитами), однако по мере хранения гематомы эритроциты постепенно претерпевали эхиноцитоз (морфологическое изменение формы эритроцитов с появлением треугольных выростов на их поверхности), что согласуется с литературой [119] и было показано ранее автором диссертации в работе [136 (A7)].

На ультраструктурном уровне (Рис. 2.11, нижний ряд) также видно увеличивающуюся степень эхиноцитоза, однако ультраструктура фибриновой сети не претерпела каких-либо явных изменений в течение 8 суток хранения гематом с точки зрения толщины фибриновых нитей, количества узлов ветвления или пористости сети. Независимо от срока хранения в пределах каждого исследованного 10-мм фрагмента сгустка наблюдались участки, содержащие фибриновые волокна различной толщины, разветвленности и пористости, без выраженной зависимости от возраста гематомы.

2.1.3 Выводы к параграфу §2.1

В настоящем параграфе экспериментально исследованы сдвиговой модуль, микро- и ультраструктура крупных сгустков человеческой крови как модели гематомы человека *in vitro*.

Методом эластографии сдвиговой волной показано, что сдвиговой модуль человеческой крови в процессе ее коагуляции, скорость которой растет с температурой крови, увеличивается до предельного значения и сохраняется в течение 8 дней хранения образовавшихся сгустков. Полученные значения модуля сдвига образцов гематом были подтверждены методом

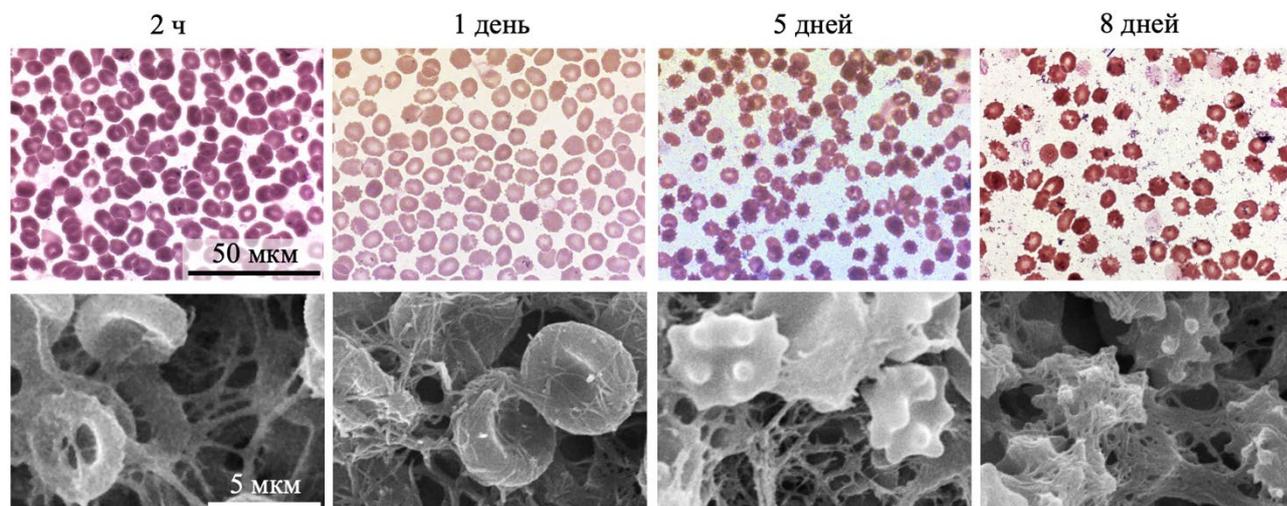


Рис. 2.11. Цитологические (верхний ряд) и СЭМ-снимки содержимого гематом через 2 часа, 1, 5 и 8 дней после коагуляции. Маркерная линия для цитологических снимков – 50 мкм, для СЭМ-снимков – 5 мкм.

индентометра и лежат в значительно более низком диапазоне, чем типичные значения модуля сдвига других тканей в организме человека [137]. Это позволяет считать модель гематомы человека *in vitro* примером ткани с малой упругостью (жесткостью). При неизменной упругости получаемых сгустков, по мере их хранения степень их ретракции увеличивается, т.е. уменьшается содержание жидкости в них, а анализ их ультраструктуры методом сканирующей электронной микроскопии показал, что клетки крови претерпевают эхиноцитоз (т.е. деформируются), однако ультраструктура фибриновой сети, сдерживающей сгусток в единое целое, остается неизменной.

§2.2 Ликвидация модели гематомы *in vitro* ударноволновыми ультразвуковыми импульсами

В настоящем параграфе импульсно-периодическое ударноволновое ультразвуковое воздействие будет экспериментально осуществлено для неинвазивной ликвидации модели крупной гематомы на примере коагулированной свиной крови с помощью 12-элементного секторного излучателя с $F\# = 0.77$, подробно охарактеризованного в §1.1. Для анализа результата ликвидации гематом здесь будет проведен ультраструктурный анализ содержимого разрушения с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Насколько осведомлен автор диссертации, эта работа показывает первое применение СЭМ для анализа содержимого разрушений, полученных в биологической ткани в режиме гистотрипсии.

2.2.1 Акустический эксперимент

В качестве модели крупной гематомы *in vitro* использовалась свиная кровь, полученная из животноводческого хозяйства, коагулированная естественным образом в контейнерах ~ 3 см x 5 см x 3 см и затем заключенная в 6% агаровый гель (Kotanyi, Австрия), который служил акустически прозрачным контейнером для упрощения манипуляции с образцами (Рис. 2.12а).

Акустический эксперимент проводился на установке, созданной в Лаборатории медицинского и промышленного ультразвука МГУ и представленной на Рис. 2.12б. Установка включала в себя 12-элементный секторный излучатель с диафрагменным числом $F\# = 0.77$,

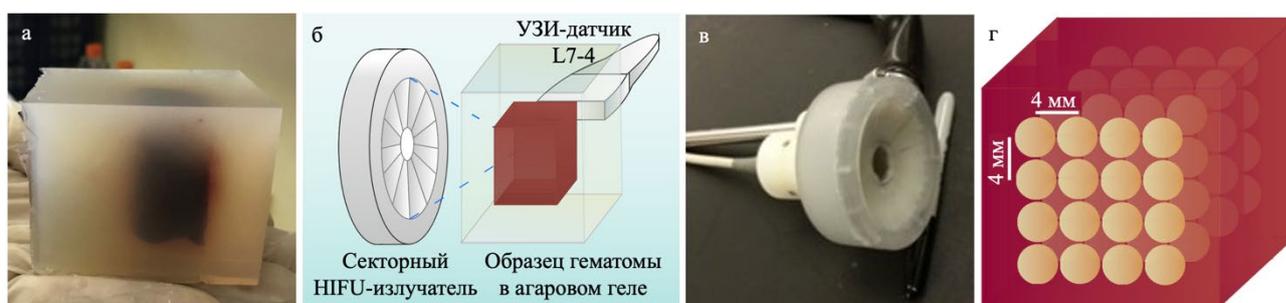


Рис. 2.12. (а) Образец гематомы в агаровом геле. (б) Схема экспериментальной установки по получению объемных разрушений в образцах гематом. (в) 12-элементный секторный излучатель с $F\# = 0.77$. (г) Геометрия получения объемного разрушения в образце гематомы.

работающий на частоте 1.5 МГц и охарактеризованный ранее в §1.1 (Рис. 2.12в), генератор, усилитель мощных импульсов [138], персональный компьютер и диагностический УЗИ-датчик L7-4 (Philips, Bothell, WA, USA), расположенный на расстоянии 0.5–15 мм от образца в аксиальной плоскости излучателя (Рис. 2.12б) и работающий под управлением исследовательской ультразвуковой системы Verasonics V1 (Redmond, WA, USA). Ультразвуковое воздействие проводилось в бассейне с дегазированной водой (Рис. 2.12б).

Импульсно-периодическое ультразвуковое воздействие осуществлялось в двух режимах гистотрипсии с кипением (ГК) с более короткими (Режим 1) и более длинными (Режим 2) импульсами при одинаковом коэффициенте заполнения 1% и количестве импульсов на точку $N_{\text{имп}} = 15$ (Рис. 2.13). В Режиме 1 длительность импульсов составляла 2.5 мс при напряжении на излучателе 188 В, а в Режиме 2 – 10 мс и 144 В, соответственно.

Соответствующие параметры акустического поля, создаваемого в гематоме, определялись с помощью численного моделирования в широкоугольном параболическом приближении уравнения Вестервельта (1.1) в программном комплексе NIFU beam. Моделирование осуществлялось в плоскостной среде «вода–гематома», для чего акустические параметры гематомы были взяты из литературы [50, 139, 140] и составляли, соответственно: скорость звука $c = 1585$ м/с, плотность $\rho = 1060$ кг/м³, коэффициент нелинейности $\beta = 3.5$, коэффициент диффузии звука $\delta = 4.33$ мм²/с, коэффициент поглощения $\alpha = 0.076$ Нп/см на частоте 1.5 МГц, с показателем степени зависимости поглощения от частоты $\nu = 1.1$.

При этом, согласно работам [39, 42], при высокой мощности тепловых источников в фокальной области, достаточной для достижения температуры кипения в фокусе в течение нескольких миллисекунд, диффузия тепла оказывает незначительное влияние, и ей можно пренебречь. В таком случае время до начала кипения может быть оценено как:

$$t_{\text{кип}} = \frac{\Delta T c_v 6 \rho^2 c^4}{\beta f_0 A_s^3}, \quad (2.3)$$

где $\Delta T = 77\text{К}$ – изменение температуры в гематоме до 100°C, $c_v = 3.71$ МДж/(м³·К) – теплоемкость единицы объема гематомы, $\rho = 1060$ кг/м³ – ее плотность, $c = 1585$ м/с – скорость звука в гематоме, $\beta = 4.15$ – коэффициент нелинейности, f_0 – частота ультразвука, A_s – амплитуда ударного фронта в фокусе в гематоме [50, 139, 140].

Таким образом, амплитуда ударного фронта в фокусе в гематоме в Режиме 1 составила $A_s \sim 130$ МПа, что соответствует инициации кипения в гематоме за время порядка $t_{\text{кип}} \sim 1.5$ мс, а в Режиме 2 – $A_s \sim 100$ МПа и $t_{\text{кип}} \sim 6.5$ мс, соответственно. Таким образом, в первом режиме использовались более высокие амплитуды разрыва и более короткие импульсы, что позволило сократить время воздействия в 4 раза при поддержании коэффициента заполнения равным 1%. Также оценка времени кипения показала, что ткань достигает температуры кипения в течение

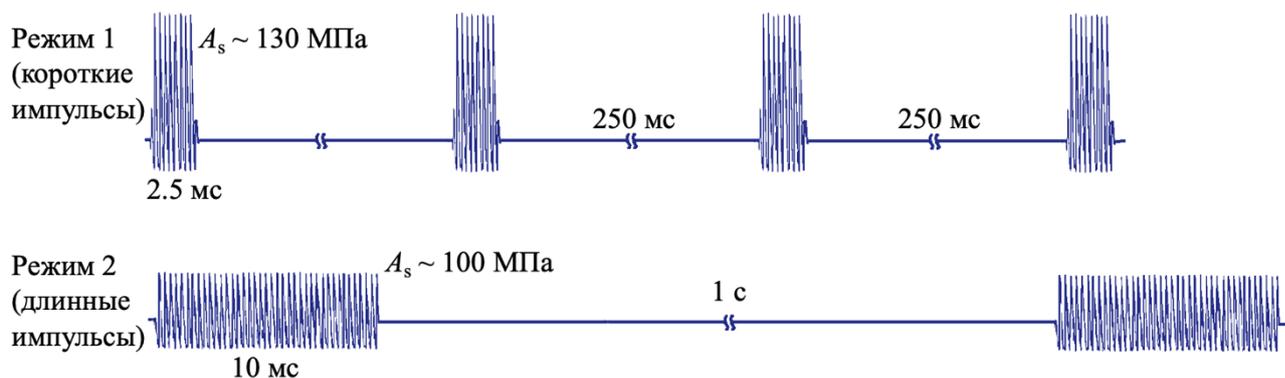


Рис. 2.13. Протоколы импульсно-периодического воздействия на образцы гематом в двух режимах гистотрипсии с кипением.

менее 65% от длительности каждого импульса, что удовлетворяет требованиям режима гистотрипсии с кипением. Инициация кипения также была подтверждена экспериментально по появлению гиперэхогенного пятна кипения на УЗИ-изображении после воздействия на материал гематомы одиночным ГК-импульсом.

Объемные разрушения получались путем поточечного облучения сетки из трех слоев, перпендикулярных оси излучателя, начиная от дальнего слоя. В каждом слое облучалось 4 x 4 фокуса с шагом 4 мм, с $N_{\text{имп}} = 15$ импульсами/фокус. Перемещение фокуса относительно образца гематомы реализовывалось путем механического перемещения образца с помощью трехмерной системы позиционирования (Precision Acoustics UMS3, Dorset, UK). После облучения разрушения визуализировались с помощью УЗИ-датчика в плоскости, перпендикулярной оси излучателя.

2.2.2 Микро- и ультраструктурный анализ разрушений

Для анализа результата ГК-воздействия и сравнения эффективности разрушений в двух исследуемых режимах в этой части работы проводилось цитологическое и ультраструктурное исследование содержимого полученных разрушений и его сравнение с содержимым интактной гематомы. Для этого после окончания ГК-воздействия производился забор небольшого фрагмента интактной части гематомы, а также ликвидированного содержимого объемного разрушения с помощью иглы 18G под УЗИ-контролем. Далее образцы подвергались соответствующей обработке, необходимой для цитологического или СЭМ-анализа, как было описано ранее в п. 2.1.2. Цитологический анализ проводился на факультете фундаментальной медицины МГУ с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager (Германия), захват изображений производился с помощью камеры AxioCam MRc5 с разрешением 2584x1936 точек. Электронная микроскопия полученных образцов проводилась на биологическом факультете МГУ с помощью микроскопа JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope (Япония).

2.2.3 Результаты

Оба исследуемых режима гистотрипсии с кипением привели к формированию однородных объемных разрушений с четкими границами, визуализируемых с помощью УЗИ как гипоэхогенные зоны, что свидетельствовало о потере внутренней структуры гематомы и ее ликвификации (Рис. 2.14а,г). Разрез разрушений в плоскости, перпендикулярной оси излучателя, подтвердил разрушение гематом до однородного жидкого состояния без видимого различия между реализованными ГК-режимами (Рис. 2.14.б–в, д–е).

На Рис. 2.15 представлены репрезентативные снимки содержимого крупной гематомы свиньи до и после ее ликвификации методом гистотрипсии с кипением в двух исследуемых режимах, полученные с помощью цитологического и ультраструктурного исследований. На фотографиях в левом столбце видно, что содержимое неразрушенного сгустка свиной крови представляет собой плотно расположенные эхиноциты (морфологически деформированные эритроциты), соединенные фибриновыми нитями (выделены окружностями на Рис. 2.15г) с активированными тромбоцитами. Проявление эхиноцитоза на таких ранних стадиях формирования сгустка, вероятно, связано с использованием электрического шока при

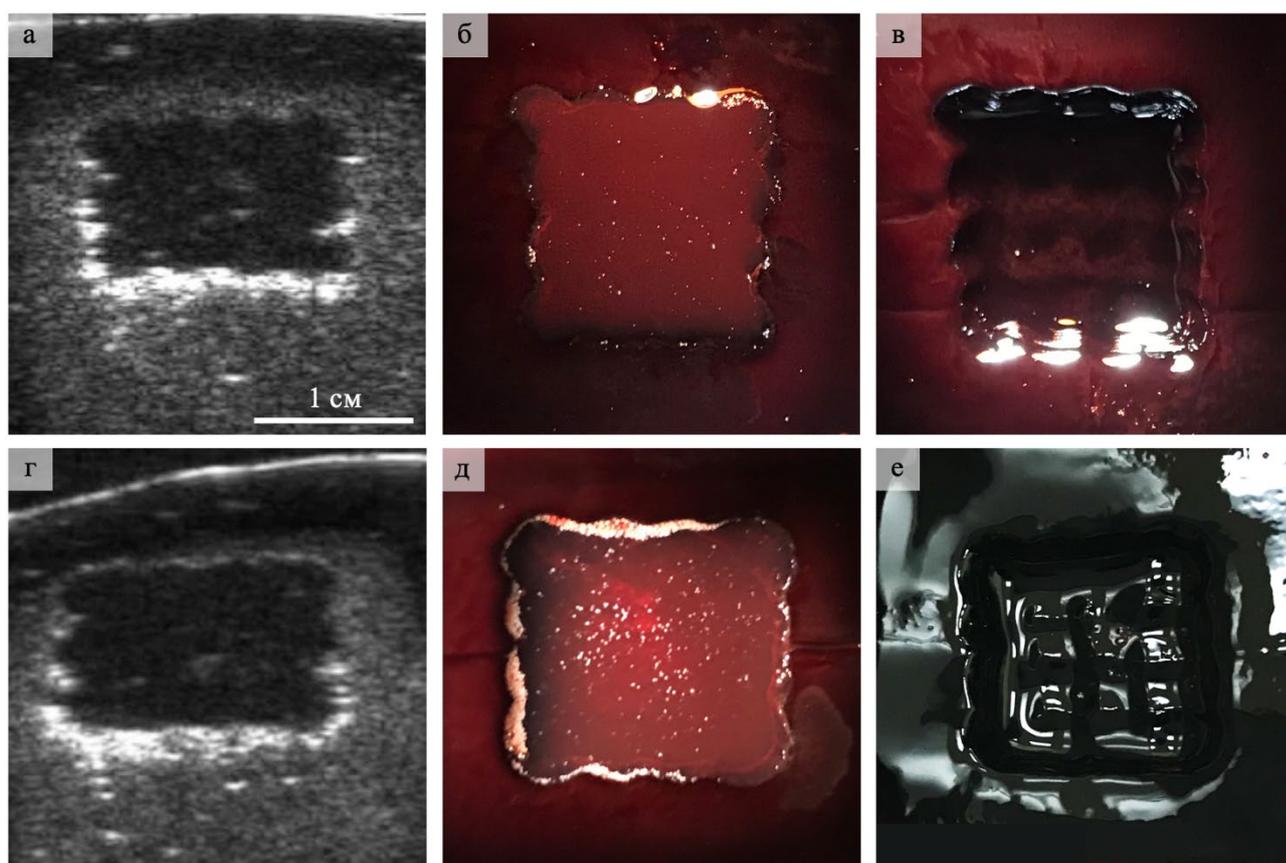


Рис. 2.14. УЗИ-снимки (а,г) и фотографии после разреза (б–в, д–е) объемных разрушений в плоскости, перпендикулярной оси излучателя, полученных в модели крупной гематомы свиньи *in vitro* в режиме гистотрипсии с кипением с помощью коротких (верхний ряд, 2.5 мс, $A_s \sim 130$ МПа) и длинных (нижний ряд, 10 мс, $A_s \sim 100$ МПа) ударноволновых импульсов. (б,д) Разрушения заполненные физиологическим раствором для лучшей визуализации, (в,е) без содержимого. Маркерная линия – 1 см.

умерщвлении животного перед взятием крови. Ранее в работе [141] было показано, что форма эритроцитов человека может изменяться при наложении электрического поля, а степень трансформации клеток напрямую зависит от силы и длительности электрических импульсов. Исследование структуры фибриновых нитей, соединяющих клетки, под большим увеличением позволило более детально увидеть покрывающую их глобулярную структуру с возможным присутствием эластина и активированных тромбоцитов (Рис. 2.15ж).

Световая микроскопия содержимого разрушения после ГК-воздействия показала, что в обоих режимах разрушения содержат только тени эхиноцитов, что является признаком разрушения кровяных клеток (Рис. 2.15б,в). СЭМ-анализ содержимого разрушения показал, что подавляющее большинство клеток крови в обоих режимах оказалось разрушено (Рис. 2.15д,е). Видно, что все пространство образцов заполнено наложенными остатками фибриновой сети. При

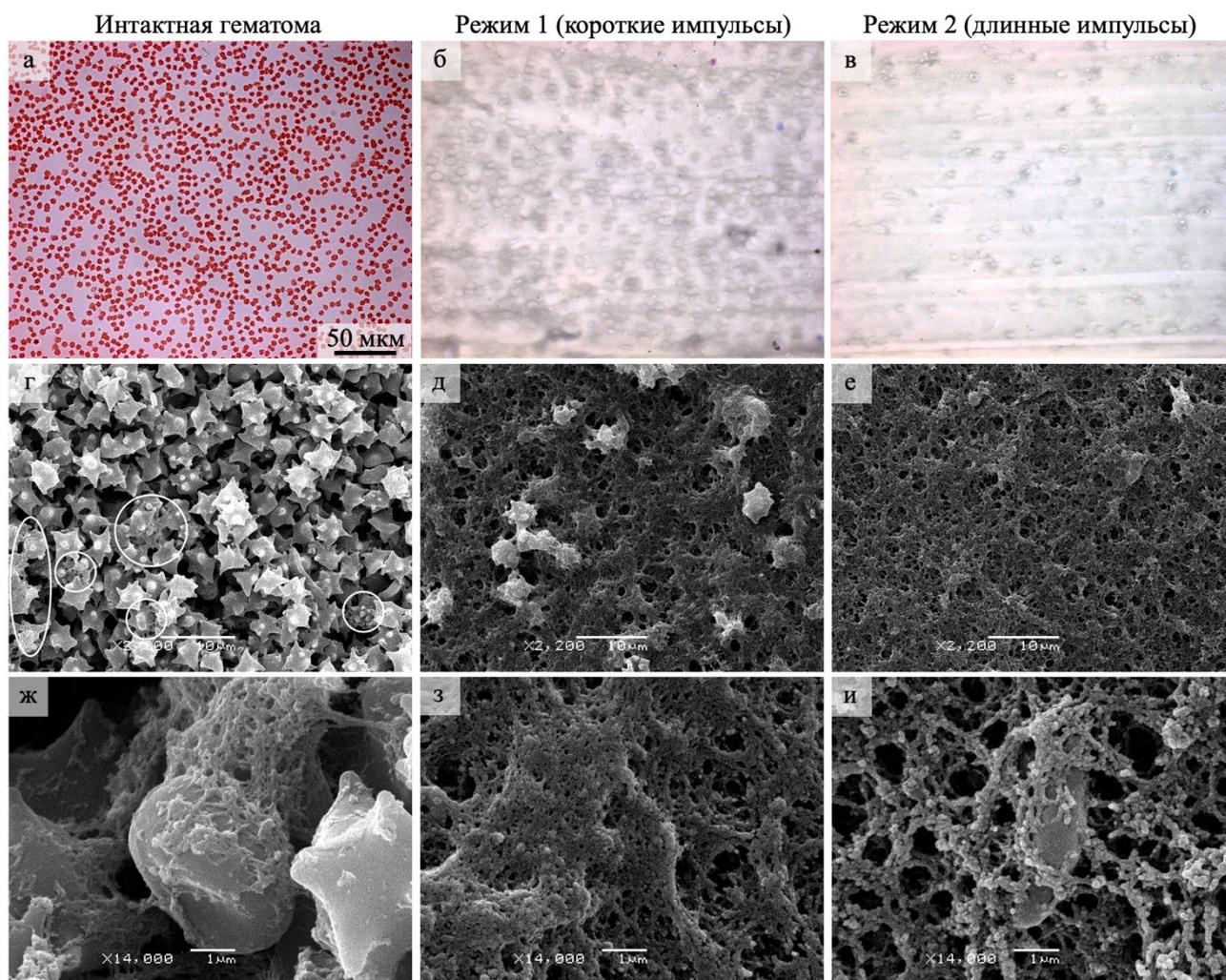


Рис. 2.15. Репрезентативные цитологические (а–в) и СЭМ (г–и) снимки содержимого интактной гематомы (а,г,ж) и объемного разрушения (б–в, д–е, з–и), полученных в модели крупной гематомы свиньи *in vitro* в режиме гистотрипсии с кипением с помощью коротких (средний столбец, 2.5 мс, $A_s \sim 130$ МПа) и длинных (правый столбец, 10 мс, $A_s \sim 100$ МПа) ударноволновых импульсов. Белыми окружностями на (г) выделены фибриновые нити, соединяющие клетки крови в сгусток. (а–в) Увеличение $\times 40$, маркерная линия – 50 мкм. (г–е) Увеличение $\times 2200$, маркерная линия – 10 мкм. (ж–и) Увеличение $\times 14000$, маркерная линия – 1 мкм.

большем увеличении можно увидеть, что фрагменты фибриновой сети частично разрушены – в ее микроструктуре образовались разрывы (Рис. 2.15з,и). При этом в случае воздействия короткими импульсами с большей амплитудой ударного фронта было выявлено присутствие более гладких участков в структуре поверхности фибриновой сети и ее возможного «спекания» (Рис. 2.15з). Это может свидетельствовать о начале проявления тепловых эффектов из-за достаточно высокой амплитуды ударного фронта. После воздействия менее интенсивными импульсами таких признаков не было обнаружено: структура фибрина была более гладкой, и пустоты между нитями больше (Рис. 2.15и).

2.2.4 Выводы к параграфу §2.2

Таким образом, в настоящем параграфе на модели естественно коагулированной свиной крови *in vitro* экспериментально показана возможность неинвазивного механического разжижения крупных гематом с помощью миллисекундных фокусированных ударноволновых ультразвуковых импульсов и его УЗИ-визуализации в режиме реального времени. Впервые проведен ультраструктурный анализ содержимого получаемых разрушений методами сканирующей электронной микроскопии в комбинации с цитологическим анализом на световом микроскопе. Было проведено сравнение результата воздействия с использованием коротких импульсов (2.5 мс) с высокой амплитудой ударного фронта в фокусе пучка (~ 130 МПа) и длинных импульсов (10 мс) с более низкой амплитудой разрыва (~ 100 МПа). Методами УЗИ, макро-, микро- и ультраструктурного анализа показано, что в обоих режимах воздействие высокоинтенсивными миллисекундными ультразвуковыми импульсами позволило механически разрушить подавляющее большинство клеток крови и разбить на фрагменты фибриновую сеть, сдерживающую клеточные элементы в сгустке. Это позволяет применять короткие импульсы с большей амплитудой разрыва для сокращения времени облучения. Однако при таком воздействии сканирующая электронная микроскопия выявила возможные признаки проявления тепловых эффектов, что позволяет дальнейшую оптимизацию высокоамплитудного режима с помощью еще более коротких импульсов, что будет осуществлено в следующем параграфе.

§2.3 Оптимизация траектории движения фокуса излучателя для получения объемных механических разрушений в биотканях с помощью ударноволновых импульсов

Облучение целевого объема биологической ткани в методе гистотрипсии обычно осуществляется путем генерации одиночных разрушений вдоль воображаемой пространственной сетки с шагом, достаточно малым для их слияния в одно объемное разрушение [102, 142]. Перемещение фокуса пучка между узлами сетки может осуществляться либо механически с помощью трехмерной системы позиционирования [102, 142], либо электронным образом при использовании фазированных решеток [92, 93], что позволяет сократить время

перехода фокуса между облучаемыми точками. При этом на скорость и эффективность гистотрипсии может влиять выбор траектории движения фокуса внутри целевого объема.

В связи с этим, целью этой части работы являлось изучение зависимости эффективности гистотрипсии от выбора траектории движения фокуса ультразвукового пучка вдоль и поперек его оси внутри облучаемого объема, и соответственно, формулировка практических рекомендаций для наиболее эффективного объемного механического разрушения целевого участка методом гистотрипсии.

Методы

В качестве модели мягкой биоткани использовались сгустки человеческой крови ($\sim 3 \times 3 \times 3 \text{ см}^3$), предварительно хранившейся с антикоагулянтом ЦФД и добавочным консервационным раствором САГМ, дегазированной в течение 1 часа и затем коагулированной раствором хлорида кальция при 37°C . Образцы коагулированной крови затем заключались в агаровый гель. Облучение проводилось на экспериментальной установке, описанной в §2.2, с помощью 12-элементного секторного излучателя с $F\# = 0.77$ (Рис. 2.16а), работающего на частоте 1.5 МГц и подробно охарактеризованного ранее в §1.1. Процесс облучения контролировался с помощью линейного УЗИ-датчика L7-4, расположенного перпендикулярно оси излучателя в его аксиальной плоскости для визуализации процесса воздействия.

Воздействие проводилось в режиме гибридной гистотрипсии импульсами длительностью 0.2 мс с коэффициентом заполнения 1% при максимально достижимом напряжении на

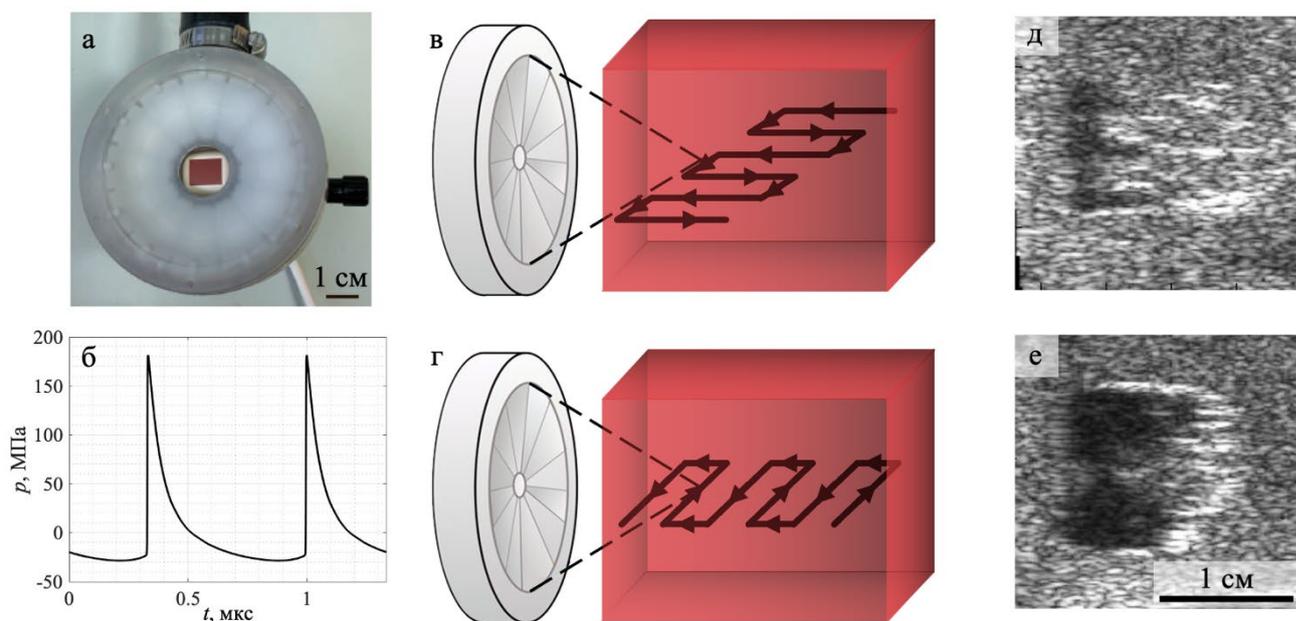


Рис. 2.16. (а) Фотография используемого секторного излучателя. (б) Предсказанный численно профиль ударной волны в фокусе на средней глубине (1 см) в гематоме. (в–г) Геометрия двух рассматриваемых траекторий на примере одного из слоев с прямоугольными меандрами вдоль (в) и поперек (г) оси излучателя. (д–е) УЗИ-снимки объемных разрушений, полученных при траектории движения фокуса, соответственно, вдоль (д) и поперек (е) оси излучателя. Маркерная линия: 1 см.

излучателе 210 В в стабильном режиме нелинейного насыщения. Форма волны на средней глубине фокуса в гематоме, соответствующая данному режиму и предсказанная по процедуре, описанной в §2.2, представлена на Рис. 2.16б. Соответствующие амплитуды пикового положительного и отрицательного давлений, а также ударного фронта составляли, соответственно, $p^+/p^-/A_s = 181/-29/202$ МПа. При этом оцененное по формуле (2.3) время до начала кипения в гематоме составило 0.24 мс, что сопоставимо с длительностью используемых импульсов 0.2 мс.

Генерация объемного разрушения реализовывалась путем облучения шести слоев, параллельных плоскости визуализации, в каждом из которых фокус излучателя в гематоме по мере излучения импульсов непрерывно перемещался со скоростью 1 см/с по одной из двух траекторий (Рис. 2.16в–г). В каждом слое траектория движения фокуса была изогнута в форме прямоугольного меандра с шагом 2 мм с более длинными участками длиной 1 см направленными либо вдоль (Рис. 2.16в), либо поперек (Рис. 2.16г) оси излучателя. Первая траектория была направлена на проверку эффекта взаимодействия возникающего в течение каждого импульса облака кипения с уже сформированным облаком на той же оси при предыдущих импульсах, что предположительно могло привести к увеличению скорости объемного разрушения. Вторая же траектория, наоборот, минимизировала пересечение ультразвукового пучка с уже образовавшимися облаками кипения, и потому перемещала фокус перпендикулярно оси, начиная от дальней области от излучателя в сторону него. В обоих случаях перемещение фокуса относительно образца гематомы реализовывалось путем механического перемещения образца с помощью трехмерной системы позиционирования.

Результаты

На Рис. 1.12д,е представлены результаты УЗИ-визуализации образцов гематом после их облучения субмиллисекундными ударноволновыми импульсами при движении фокуса по двум исследованным траекториям. Было показано, что траектория, направленная на взаимодействие образующихся облаков кипения друг с другом (т.е. с преимущественно продольным движением фокуса излучателя), не привела к слиянию участков меандров, параллельных оси излучателя (Рис. 1.12д). В каждом слое разрушенные гипоехогенные участки соответствовали только движению фокуса в сторону излучателя, что свидетельствует об экранировании формирующимся облаком кипения области последующего воздействия за ним при движении фокуса от излучателя, тем самым искажая акустическое поле в фокусе и снижая эффективность воздействия. При этом траектория, минимизирующая пересечение акустического пучка с образующимся облаком кипения (т.е. с преимущественно поперечным движением фокуса излучателя), успешно привела к формированию объемного разрушения с четкими границами, наблюдаемому на УЗИ в виде

гипоэхогенной области (Рис. 1.12e), что свидетельствует о разрушении структуры этой области сгустка до жидкого состояния.

Таким образом, в этой части работы с помощью одного из охарактеризованных ранее в §1.1 секторного излучателя было экспериментально показано, что при импульсно-периодическом ультразвуковом облучении некоторого объема в режиме гистотрипсии предпочтительным является движение фокуса акустического пучка в сторону излучателя, в связи с минимизацией возможного экранирования области воздействия образующимся облаком кипения.

Выводы

Таким образом, в настоящем параграфе была проведена оптимизация движения фокуса вдоль оси излучателя на модели крупной гематомы человека *in vitro* с помощью 12-элементного секторного излучателя. Методами ультразвуковой визуализации показано, что для генерации объемного разрушения фокус пучка должен двигаться по направлению к излучателю для эффективного слияния генерируемых одиночных механических разрушений, в отличие от движения фокуса от излучателя, приводящего к экранированию ультразвукового пучка образующимися в процессе воздействия кавитационными пузырьками и пузырями кипения.

§2.4 Влияние длительности ударноволновых ультразвуковых импульсов на скорость и эффективность ликвификации гематомы человека *in vitro*

Как было показано в §2.2, использование более коротких ударноволновых импульсов с более высокой амплитудой ударного фронта в фокусе акустического пучка, достаточной для инициации кипения биоткани внутри каждого импульса, может позволить значительно ускорить процесс механического разрушения биоткани методом гистотрипсии с кипением (ГК). Недавно был предложен промежуточный режим между ГК и кавитационной гистотрипсией, использующий субмиллисекундные импульсы и, предположительно, задействующий комбинацию механизмов двух других типов гистотрипсии [46]. В связи с этим, в этом параграфе экспериментально исследуется зависимость длительности ударноволновых ультразвуковых импульсов на скорость и эффективность ликвификации модели крупной гематомы человека в режимах гистотрипсии с кипением и промежуточной гистотрипсии, называемой здесь гибридной гистотрипсией.

Кроме того, поскольку при клиническом применении метода гистотрипсии для лечения гематом предполагается последующая аспирация разжиженного содержимого тонкой иглой, то важным вопросом в реализации этого метода является степень разрушения материала гематомы, а именно ее фибриновой сети, чтобы содержимое разрушения не препятствовало аспирации. В предыдущем параграфе ультраструктурный анализ содержимого объемных ГК-разрушений показал наслоенные участки разрушенной фибриновой сети, что не позволяет оценить размеры

ее фрагментов, оставшихся после воздействия. В работах [50, 143] были предприняты попытки оценить распределение размеров остаточных фрагментов после ликвификации образцов гематом методом гистотрипсии с помощью счетчика Коултера. Однако верхний предел измерительной системы в этих исследованиях составлял 70 мкм за счет необходимой предварительной фильтрации содержимого разрушения во избежание засорения измерительной системы. При этом размеры остающихся после гистотрипсии фрагментов могут оказываться и больше этого предела. В связи с этим, в этой части работы также предлагается способ количественной оценки размеров фрагментов, остающихся после ликвификации гематомы методами гистотрипсии, на ультраструктурном уровне с помощью сканирующей электронной микроскопии.

2.4.1 Акустический эксперимент

Модель гематомы человека

В качестве модели крупной гематомы человека *in vitro* использовалась рекальцифицированная кровь здоровых доноров, предоставленная сотрудниками НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева, стабилизированная антикоагулянтом ЦФД и добавочным консервационным раствором САГМ. Цельная кровь с антикоагулянтом хранилась в течение 1 суток при температуре +4°C до проведения экспериментов. На следующий день после взятия крови она разливалась в пластиковые контейнеры формы параллелепипеда (по 85 мл), дегазировалась в течение 1 часа при остаточном давлении 0.1 бар и коагулировалась с помощью 10% раствора хлорида кальция при 37°C в течение 1 часа. Для облегчения позиционирования образцов гематом перед облучением они заключались в контейнеры из агарового геля (Рис. 2.17а).

Экспериментальная установка

В этой части работы экспериментальная установка была аналогична описанной в §2.2 (Рис. 2.126). Облучение проводилось в бассейне с дегазированной водой с помощью 12-элементного секторного излучателя с $F\# = 0.77$, охарактеризованного ранее в §1.1 и питаемого

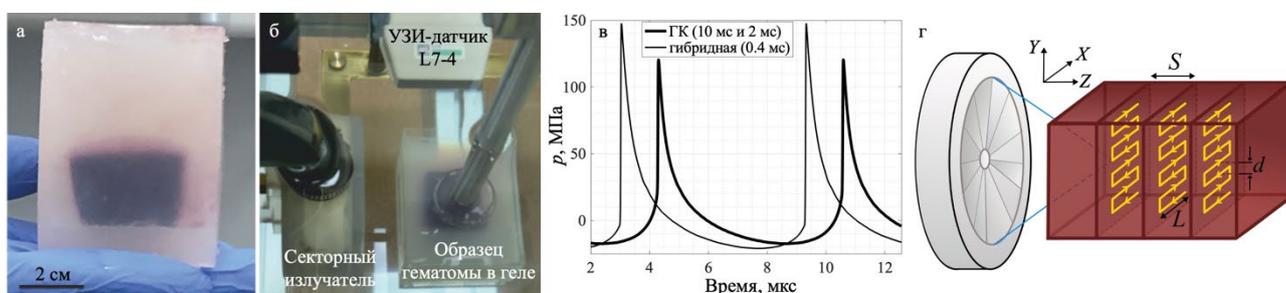


Рис. 2.17. (а) Образец гематомы человека в агаровом геле. Маркерная линия: 2 см. (б) Фотография экспериментальной установки для получения объемных разрушений в модели гематомы человека методом гистотрипсии. (в) Численно предсказанные формы волны в фокусе излучателя в гематоме для режима ГК и гибридной гистотрипсии. (г) Геометрия перемещения фокуса для получения объемного разрушения в гематоме.

усилителем мощных импульсов [138]. Линейный УЗИ-датчик L7-4 использовался для планирования и контроля воздействия в режиме реального времени (Рис. 2.176).

Протоколы импульсного воздействия

Для изучения влияния длительности импульсов на результат механической ликвификации гематом методом гистотрипсии, воздействие производилось по следующим трем протоколам (Табл. 2.1). Два протокола соответствовали режиму гистотрипсии с кипением (10-мс и 2-мс импульсы с коэффициентом заполнения 1%), каждый из которых был реализован в $n = 6$ образцах гематом. Третий протокол соответствовал режиму гибридной гистотрипсии: импульсы длительностью 0.4 мс, также с коэффициентом заполнения 1%. Таким образом, в этом экспериментальном режиме использовались субмиллисекундные импульсы, т.е. заметно более короткие, чем характерные для ГК, но значительно длиннее, чем обычно используются в методе кавитационной гистотрипсии. Этот режим был реализован $n = 9$ образцах гематом.

Для режима ГК необходимая акустическая мощность на излучателе была рассчитана, исходя из требования достижения кипения в материале гематомы в течение каждого импульса. Рассчитанная по процедуре, описанной в §2.2, амплитуда ударного фронта, минимально необходимая для реализации ГК-режимов, составила 57.5 и 98.3 МПа для 10-мс и 2-мс протоколов, соответственно. При этом, поскольку первые ударные волны со стабильным ударным фронтом, возникающие в поле используемого излучателя, имеют амплитуду >100 МПа (Рис. 1.3г), то для воздействия на гематомы в обоих режимах ГК была выбрана одинаковая мощность на излучателе, соответствующая амплитуде разрыва 101 МПа и времени кипения в гематоме ~ 1.85 мс, что подходит для обоих ГК-режимов. Количество импульсов на точку для ГК-режимов ($N_{\text{имп}} = 8$) было выбрано, исходя из известного роста размера ГК-разрушения с количеством импульсов вплоть до этого числа [51].

Для режима гибридной гистотрипсии использовалась максимально достижимая акустическая мощность на излучателе. Поскольку одиночные разрушения при более коротких импульсах обычно имеют меньший размер, то для режима гибридной гистотрипсии было выбрано большее количество импульсов на точку ($N_{\text{имп}} = 11$) путем предварительных

Режим	$F\#$	f_0 , МГц	$t_{\text{имп}}$, мс	$N_{\text{имп}}$	DC	W , Вт	$p^+ / p^- / A_s$, МПа	$t_{\text{кип}}$, мс
ГК	0.77	1.5	10	8	1%	239	120 / 17 / 101	1.85
гибридная			0.4					

Табл. 2.1. Параметры импульсно-периодического ультразвукового воздействия на модель гематомы человека в трех режимах гистотрипсии: $F\#$ – диафрагменное число, f_0 – частота ультразвука, $t_{\text{имп}}$ – длительность импульсов, $N_{\text{имп}}$ – количество импульсов на точку, DC – коэффициент заполнения, W – акустическая мощность, p^+ (p^-) – пиковое положительное (отрицательное) давления в фокусе в гематоме, A_s – амплитуда ударного фронта в фокусе в гематоме, $t_{\text{кип}}$ – время до начала кипения в гематоме.

экспериментов с целью достижения максимально возможной скорости объемного разрушения при условии эффективного слияния отдельных фокусов-разрушений.

Формы волны в фокусе *in situ* были предсказаны с помощью комбинации гидрофонных измерений и численного моделирования, подробно описанных в §1.1. Полученные формы волны и их параметры приведены, соответственно, на Рис. 2.17в и в Табл. 2.1. При этом формирование пузырькового облака в фокусе излучателя в обоих режимах подтверждалось экспериментально по появлению яркого гиперэхогенного пятна на УЗИ-визуализации в В-режиме после доставки либо одиночного ГК-импульса, либо нескольких 0.4-мс импульсов.

Геометрия получения объемных разрушений

Объемные разрушения (3–4 мл) в образцах гематом получались путем облучения нескольких плоскостей, перпендикулярных оси излучателя, начиная от дальней от излучателя, в каждой из которых фокус непрерывно перемещался по траектории прямоугольного меандра по мере излучения импульсов (Рис. 2.17г). Непрерывное движение фокуса в этой части работы использовалось с целью ускорить процесс ликвификации гематомы по сравнению с поточечным облучением целевого объема, использованного ранее в §2.2. Шаг меандра d и расстояние между слоями S подбирались эмпирически таким образом, чтобы одиночные разрушения (см. далее п. 2.4.3) от каждого положения фокуса сливались в единое объемное разрушение. Скорость перемещения фокуса вдоль длинной стороны меандра (v) рассчитывалась таким образом, чтобы на каждый фокус в линии было доставлено эквивалентное количество импульсов $N_{\text{имп}}$, считая, что фокусы расположены с таким же шагом d , как шаг меандра: $v = d / (t_{\text{имп}} \cdot 100 \cdot N_{\text{имп}})$.

Оценка скорости ликвификации

Длина и ширина полученных объемных разрушений (т.е. вдоль осей Z и X , см. Рис. 2.17г) сначала измерялись по УЗИ-снимкам в В-режиме через 5–10 минут после облучения, на которых ликвифицированная область гематомы была видна в виде гипоэхогенной зоны. Затем разрушения разрезались сначала в поперечной плоскости (XY), фотографировались и затем разрезались вдоль плоскости визуализации (XZ). В результате размеры разрушений по всем трем направления измерения по полученным фотографиям и сравнивались с результатами, полученными по УЗИ-снимкам. Приблизительный объем разрушения оценивался как произведение трех измеренных размеров и использовался для оценки скорости ликвификации через его отношение ко времени, затраченному на получение конкретного разрушения.

2.4.2 Микро- и ультраструктурный анализ эффективности разжижения гематом

Взятие образцов для анализа

Аналогично §2.2, в этой части работы проводились цитологическое и ультраструктурное исследования интактных гематом и содержимого объемных разрушений. В качестве

контрольных образцов интактной гематомы, от каждого сгустка забирался небольшой фрагмент с помощью иглы 18G сразу после окончания коагуляции крови и спустя 3 часа. С целью анализа содержимого объемных разрушений для каждого из трех протоколов воздействия случайным образом выбирались два разрушения для цитологического и ультраструктурного анализа. Из каждого разрушения после его разреза содержимое забиралось иглой 18G (с диаметром внутреннего отверстия ~ 0.9 мм), чтобы избежать попадания фрагментов интактной гематомы в отверстие иглы.

Подготовка к цитологическому анализу проводилась аналогично процедуре, описанной в п. 2.1.2. Для сканирующей электронной микроскопии из каждого разрушения забиралось по две капли содержимого, одна из которых подвергалась процедуре подготовки к СЭМ, как в п. 2.1.2, в то время как вторая капля использовалась для предложенного в этой работе метода количественной оценки размеров отдельных фрагментов в разрушениях, описанного ниже.

Количественный анализ остающихся фрагментов

Вторая капля растворялась либо в рН-нейтральном физиологическом растворе (ПанЭко, Россия), либо в дистиллированной воде в отношении 1:50 к растворителю. Ожидалось, что использование дистиллированной воды приведет к разрыву лейкоцитов и эритроцитов из-за пониженного осмотического давления в ней. Однако, интерес с точки зрения измерения фрагментов, остающихся в гематоме после ее ликвификации, представляют не клетки крови, размер которых обычно 6–8 мкм и которые не будут представлять опасность закупоривания иглы при аспирации, а фрагменты фибриновой сети, которые не должны были измениться при их разведении в воде. Оптимальная концентрация разбавления капли из разрушения водой или физраствором предварительно подбиралась экспериментально путем СЭМ-анализа образцов, разбавленных в отношении 1:25, 1:50, 1:75, 1:100, таким образом, чтобы даже самые крупные отдельные фрагменты фибриновой сети не наслаивались друг на друга. Разбавленное таким образом в оптимальном отношении (1:50) содержимое каждого разрушения наносилось на стеклянную подложку диаметром 10 мм и подготавливалось к СЭМ-анализу, аналогично п. 2.1.2. Каждый полученный образец исследовался с помощью СЭМ на наличие фрагментов, превышающих размер эритроцитов (более 20 мкм), чтобы исключить из рассмотрения клетки крови и измерять размеры только крупных фрагментов фибриновой сети. Эти фрагменты были сфотографированы (всего было получено 23 фотографии) и максимальный диаметр каждого фрагмента измерялся в графическом редакторе ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

2.4.3 Результаты

Одиночные разрушения

На Рис. 2.18 приведены УЗИ-снимки одиночных разрушений, полученные путем воздействия $N_{\text{имп}} = 8$ импульсами в режимах ГК и $N_{\text{имп}} = 11$ импульсами в режиме гибридной

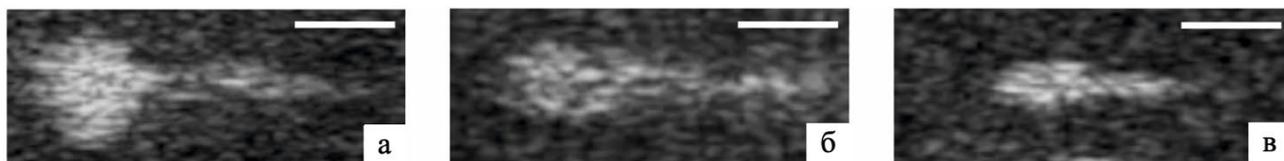


Рис. 2.18. УЗИ-снимки одиночных разрушений, полученных в результате воздействия (а) $N_{\text{имп}} = 8$ импульсами по 10 мс, (б) $N_{\text{имп}} = 8$ импульсами по 2 мс и (в) $N_{\text{имп}} = 11$ импульсами по 0.4 мс. HIFU-воздействие производится слева направо. Маркерные линии: 5 мм.

гистотрипсии. Одиночные ГК-разрушения имели типичную для ГК форму «головастика» (Рис. 2.18а–б) [50], в то время как более короткие (0.4-мс) импульсы привели к формированию одиночного разрушения меньших размеров (как в продольном, так и в поперечном направлении) и с более однородной толщиной по всей длине (Рис. 2.18в). По размерам полученных одиночных разрушений определялись оптимальные параметры геометрии (Табл. 2.1) и скорости движения фокуса для получения объемных разрушений путем слияния одиночных (Табл. 2.2).

Объемные разрушения

На Рис. 2.19 представлены репрезентативные УЗИ-снимки объемных разрушений спустя 5–10 минут после окончания воздействия и макрофотографии разрушений после их разреза для каждого из исследуемых режимов. При этом УЗИ-снимки (Рис. 2.19а–в) показывают аксиальное сечение разрушений (т.е. в плоскости XZ , содержащей акустическую ось излучателя, см. Рис. 2.17г), а макрофотографии (Рис. 2.19г–е) показывают поперечное сечение (т.е. в плоскости XY , перпендикулярной акустической оси излучателя, см. Рис. 2.17г). На УЗИ-снимках видно, что вне зависимости от протокола воздействия через 5–10 мин после окончания облучения объемные разрушения представляли собой гипоехогенные участки на УЗИ, т.е. были заполнены разжиженным содержимым гематомы. Причем УЗИ-снимок на Рис. 2.18в был сделан до того, как разрушенная область стала полностью гипоехогенной, чтобы проиллюстрировать, что образующиеся пузыри всегда были смещены к дальнему от излучателя краю разрушения, и потому растворялись позже, чем пузыри в ближней части разжиженного объема. Из-за неравномерной формы одиночных ГК-разрушений (формы «головастика») ближняя к излучателю часть разрушения слилась достаточно однородно, в то время как в дальней части можно наблюдать дискретные не слившиеся «хвосты» одиночных разрушений (отмечены белыми стрелками на Рис. 2.19а,б). Эта часть не до конца слившегося разрушения не включалась

Режим	$t_{\text{имп}}$, мс	v , мм/с	V , см ³	Время разрушения, мин	Скорость ликвидации, мл/мин
ГК	10	0.45	3.34	11	0.3
	2	1.1	3.56	5.23	0.68
гибридная	0.4	11	3.67	1.4	2.62

Табл. 2.2. Параметры экспериментально полученных объемных разрушений в модели крупной гематомы человека в трех режимах гистотрипсии: $t_{\text{имп}}$ – длительность импульсов, v – скорость движения фокуса излучателя, V – максимальный объем разрушения.

Гистотрипсия с кипением: 10 мс Гистотрипсия с кипением: 2 мс Гибридная гистотрипсия: 0.4 мс

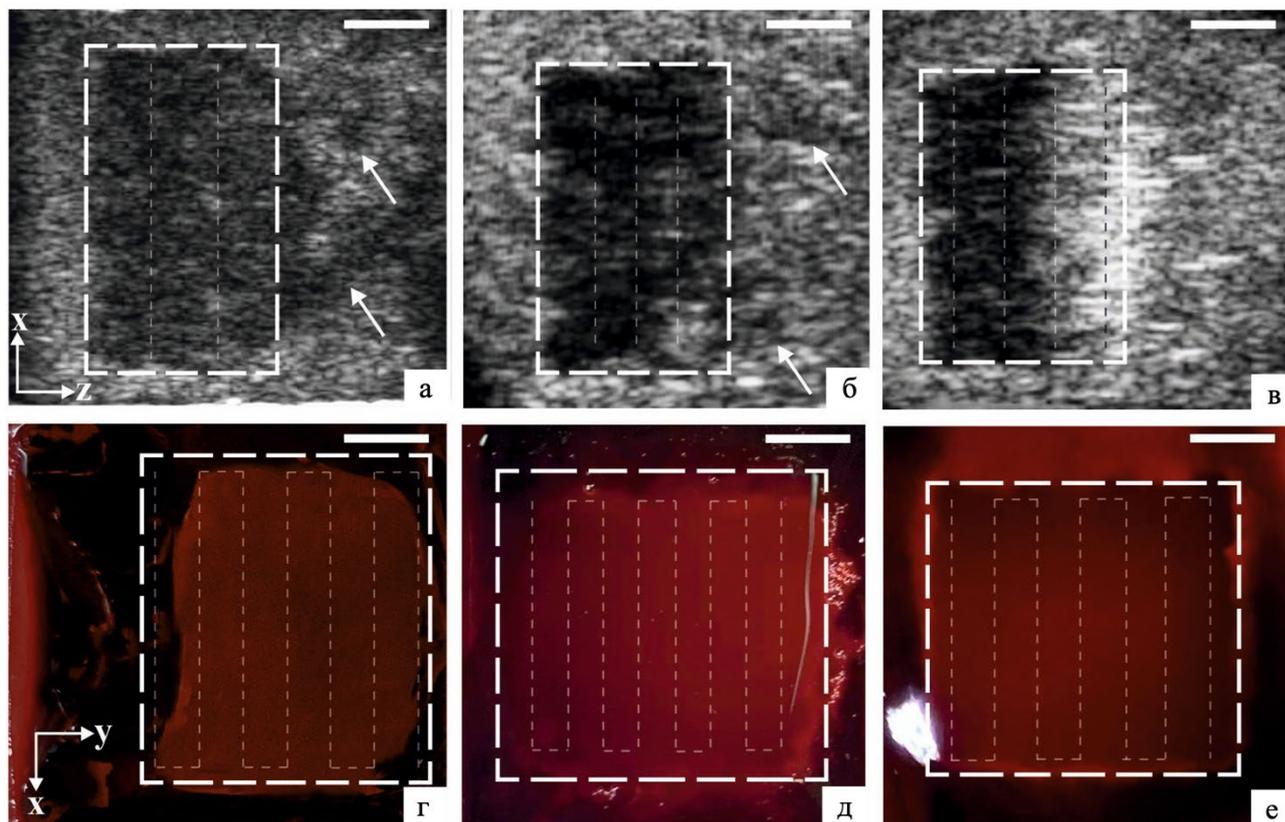


Рис. 2.19. УЗИ-снимки (а–в) и фотографии разреза (г–е) объемных разрушений, полученных в образцах гематомы человека в трех режимах гистотрипсии. HIFU-воздействие производится: (а–в) слева направо, (г–е) от наблюдателя. Объем разрушения выделен белыми пунктирными рамками. На УЗИ-снимках (а–в) тонким пунктиром показаны слои движения фокуса излучателя. На фотографиях разреза разрушений (г–е) тонким пунктиром показана траектория движения фокуса излучателя в каждом слое. Маркерные линии: 5 мм.

в общую оценку объема разрушения. Визуальных отличий в содержимом разрушений, полученных в разных режимах гистотрипсии, отмечено не было. Размеры разрушений, оцененные по УЗИ-снимкам и фотографиям после разреза согласовались между собой, и полученные в результате объемы разрушений представлены в Табл. 2.2.

Скорость ликвификации гематом в каждом из трех режимов гистотрипсии рассчитывалась по измеренным размерам разрушений и времени, затраченному на конкретное разрушение (Табл. 2.2). Максимальная скорость разжижения была достигнута при использовании субмиллисекундных импульсов (т.е. в режиме гибридной гистотрипсии) и составила 2.62 мл/мин, что более, чем в 5 раз превышает скорость ликвификации, полученную в работе [50] методом комбинации ГК и кавитационной гистотрипсии на частоте 1.5 МГц путем поточечного облучения целевого объема.

Цитологический анализ содержимого разрушений

Независимо от времени забора контрольного образца гематомы после ее коагуляции (сразу после или спустя 3 часа), образцы интактной гематомы на световой микроскопии состояли из

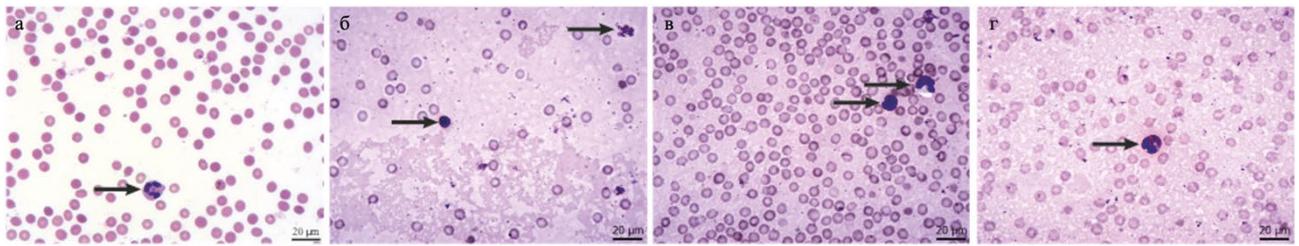


Рис. 2.20. Цитологические снимки интактной гематомы (а) и содержимого объемных разрушений (б–г), полученных в режимах гистотрипсии с импульсами длительностью 10 мс (б), 2 мс (в) и 0.4 мс (г). Маркерные линии: 20 мкм. Черными стрелками показаны лейкоциты: (а) интактные, (б–г) разрушенные. Розовый оттенок фона на (б–г) является признаком гемолиза.

плотно расположенных клеток крови (Рис. 2.20а). После ультразвукового воздействия, вне зависимости от режима гистотрипсии, в содержимом разрушения были выявлены нежизнеспособные тени эритроцитов и разрушенные лейкоциты с уплотненными ядрами и без клеточной оболочки (Рис. 2.20б–г). Розовый оттенок на заднем фоне, наблюдаемый в мазках содержимого после разрушений, указывает на наличие гемолиза (т.е. разрушения эритроцитов с выделением гемоглобина), вызванного ультразвуковым воздействием. Зависимости цитологической картины содержимого разрушений от режима гистотрипсии не было обнаружено.

СЭМ интактной гематомы

На Рис. 2.21 представлены СЭМ-снимки содержимого двух контрольных образцов интактной гематомы, взятых сразу после (а,в) и спустя 3 часа (б,г) после окончания коагуляции крови. Видно, что ультраструктура визуально свернувшейся крови изменилась в течение трех часов после коагуляции: нити фибрина между эритроцитами стали более отчетливо видны (указаны белыми стрелками). Эти изменения согласуются с работой [115], где было показано, что упругие свойства гематом меняются в течение первых 3 часов после начала коагуляции.

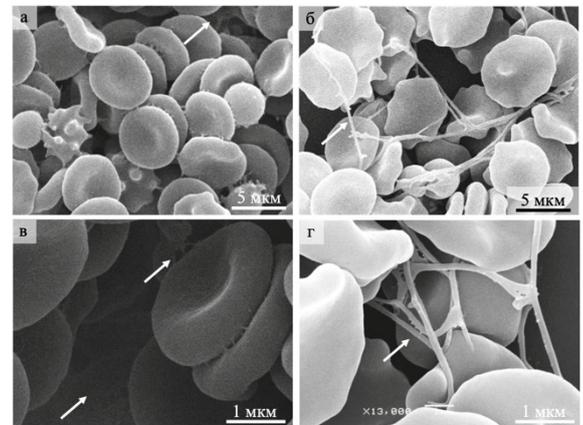


Рис. 2.21. СЭМ-снимки интактной гематомы сразу после окончания коагуляции (а,в) и через 3 часа после (б,г). Маркерные линии: (а,б) 5 мкм, (в,г) 1 мкм. Белыми стрелками показаны волокна фибрина, удерживающие клетки крови в гематоме.

СЭМ содержимого разрушений

Аналогично результатам из §2.2, СЭМ-анализ неразбавленного содержимого разрушений выявил многослойные остатки разрушенной фибриновой сети без видимой зависимости от использованного режима гистотрипсии (Рис. 2.22а–в). Более детальное увеличение также показало порванные фрагменты фибриновой сети, наложенные друг на друга (Рис. 2.22г–е).

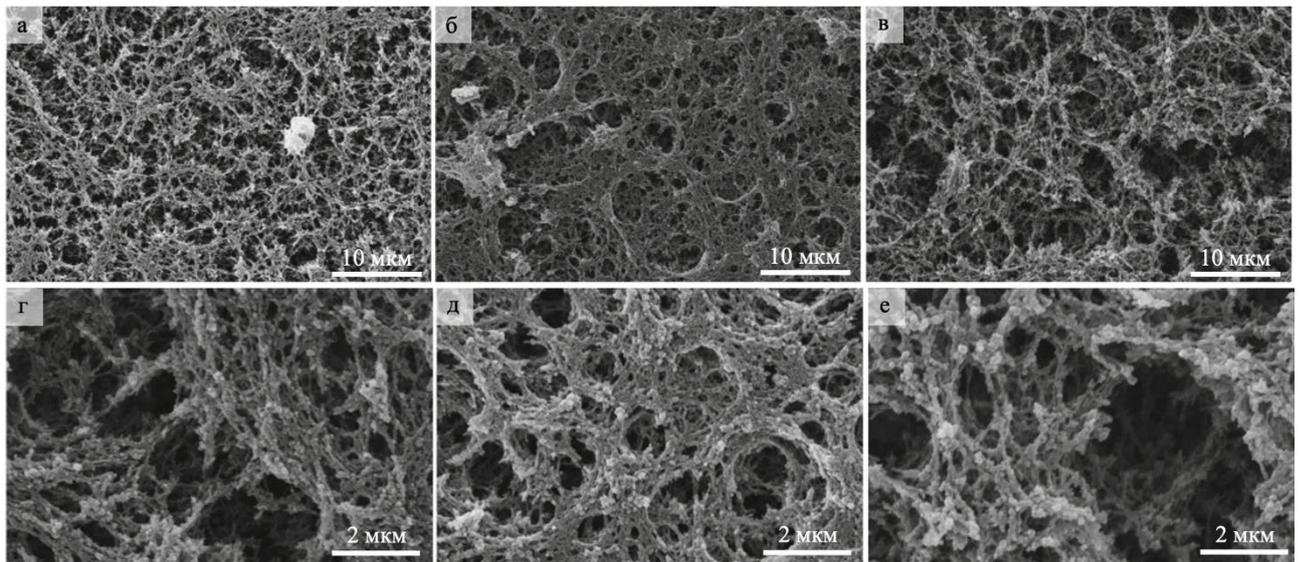


Рис. 2.22. Репрезентативные СЭМ-снимки содержимого разрушений в модели гематомы, полученных в режимах гистотрипсии с импульсами длительностью 10 мс (а,г), 2 мс (б,д) и 0.4 мс (в,е). Маркерные линии: (а–в) 10 мкм, (г–е) 2 мкм.

Оценка размеров оставшихся фрагментов

Разбавление содержимого разрушений в физиологическом растворе привело к необходимому эффекту разделения остаточных фрагментов гематомы в пространстве, однако побочным артефактом оказалась агрегация этих фрагментов к кристаллам соли (Рис. 2.23а,г), которые неизбежно присутствуют в физиологическом растворе, т.к. он представляет собой

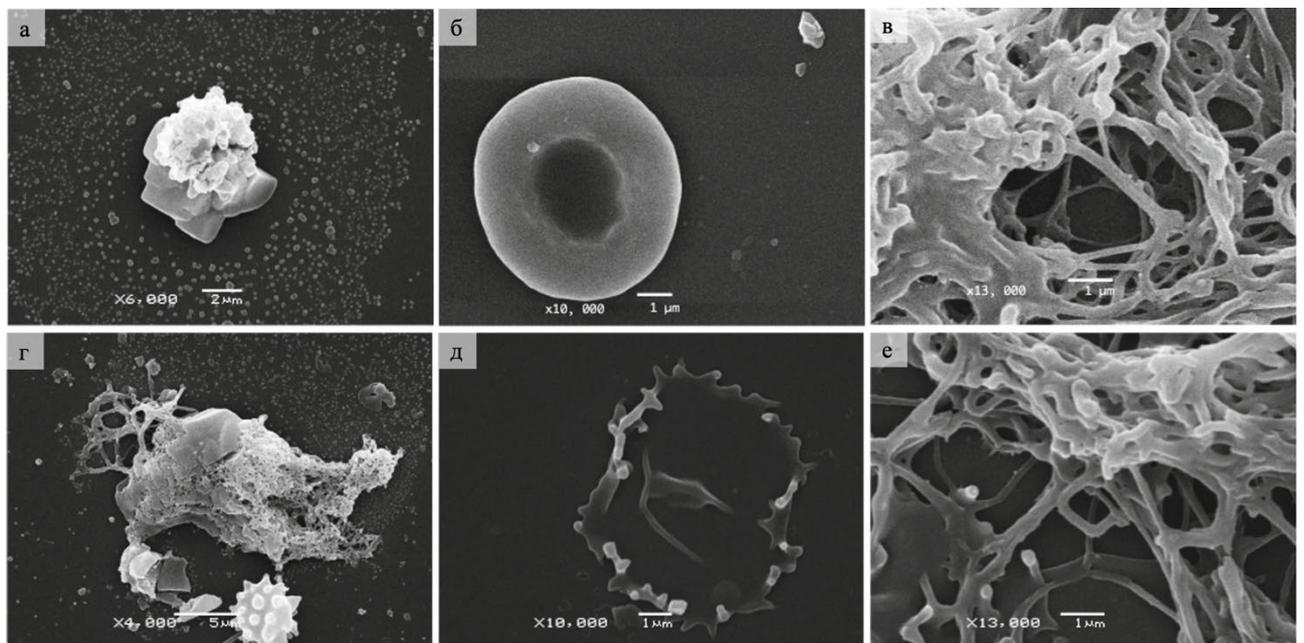


Рис. 2.23. Репрезентативные СЭМ-снимки содержимого разрушений, разведенного в физиологическом растворе (а–г) и в дистиллированной воде (д–е). (а, г) Артефакты кристаллов соли с агрегированными оставшимися фрагментами в содержимом, разведенном в физиологическом растворе. Эритроциты (б,д) и ультраструктура фибриновых нитей (в,е) после разведения в физиологическом растворе (б,в) и в дистиллированной воде (д,е). Маркерные линии: (а) 2 мкм, (б,в,д,е) 1 мкм, (г) 5 мкм.

Диапазон размеров	20–50 мкм	50–100 мкм	100–150 мкм
Количество фрагментов	17	7	4

Табл. 2.3. Распределение размеров фрагментов фибриновой сети, оставшихся после разрушения образцов гематом методами гистотрипсии вне зависимости от протокола воздействия.

фосфатно-солевой раствор. Такая агрегация фрагментов разрушения к кристаллам соли препятствовала адекватной оценке их размеров.

Избежать агрегации остатков фибриновой сети к кристаллам соли позволило разбавление содержимого разрушений в дистиллированной воде. Как и ожидалось, разница осмотического давления в клетках крови и в дистиллированной воде привела к разрыву клеток крови (Рис. 2.23д), чего не наблюдалось при разведении в физрастворе (Рис. 2.23б). Однако, ультраструктура фибриновых нитей не претерпела изменений (Рис. 2.23в,е), поэтому измерение размеров оставшихся фрагментов фибриновой сети осуществлялось в образцах содержимого разрушений, разведенных в дистиллированной воде.

На обзорном снимке одного из образцов разбавленного содержимого разрушения (Рис. 2.24а) видно, что большинство фрагментов, остающихся после разрушения гематомы методами гистотрипсии не превышают в длину 20 мкм, что согласуется с [50, 143], и не будут препятствовать аспирации содержимого разрушения тонкой иглой, внутренний диаметр которой обычно больше 150 мкм. Поэтому измерение размеров проводилось только для фрагментов длиной более 20 мкм, и полученное распределение размеров представлено в Табл. 2.3. Показано, что вне зависимости от режима гистотрипсии, наиболее крупные фрагменты фибрина (Рис. 2.24б,в), остающиеся после ликвификации гематомы, имели длину до 150 мкм, что меньше диаметра отверстия большинства медицинских игл.

2.4.4 Выводы к параграфу §2.4

Таким образом, в настоящем параграфе были экспериментально реализованы объемные механические разрушения в образцах крупных гематом человека *in vitro* с использованием миллисекундных и субмиллисекундных ударноволновых ультразвуковых импульсов. Объемная

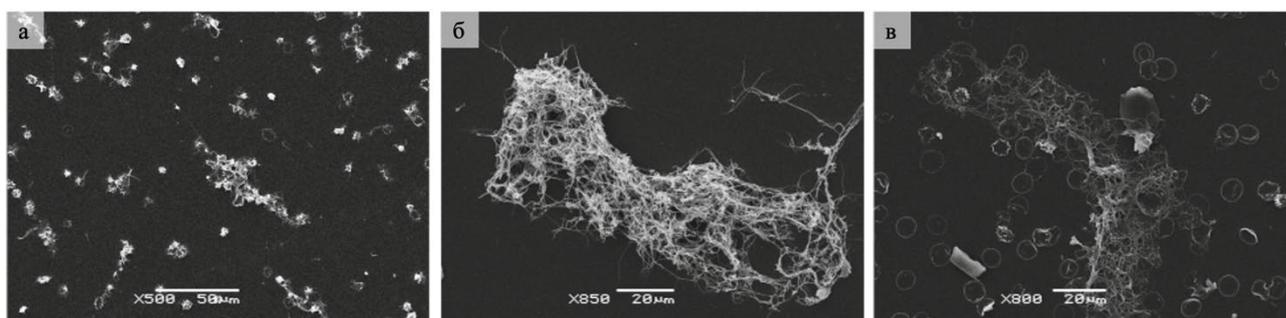


Рис. 2.24. Репрезентативные СЭМ-снимки содержимого разрушения, разбавленного дистиллированной водой: (а) обзорный снимок, (б,в) наиболее крупные оставшиеся фрагменты фибриновой сети. Маркерные линии: (а) 50 мкм, (б,в) 20 мкм.

скорость ликвификации гематомы оказалась до 8 раз выше при использовании более коротких импульсов (2.62 мл/мин) и, соответственно, более высоких амплитуд разрыва в фокусе. Предложенный в этом параграфе новый способ ультраструктурного анализа содержимого разрушений позволил оценить размеры отдельных фрагментов, остающихся после воздействия. Было показано, что вне зависимости от длительности импульсов большинство оставшихся фрагментов фибриновой сети имели размер до 20 мкм. При этом наиболее крупные фрагменты не превышали 150 мкм в длину, что меньше диаметра отверстия большинства медицинских игл.

Таким образом, было показано, что миллисекундные и субмиллисекундные ударноволновые ультразвуковые импульсы способны ликвидировать крупные гематомы человека до фрагментов, которые не будут препятствовать дальнейшей аспирации разжиженного содержимого гематом тонкой иглой при использовании большинства медицинских игл. При этом использование более коротких (субмиллисекундных) импульсов позволяет значительно ускорить процесс ликвификации при сохранении эффективности воздействия.

§2.5 Влияние упругости и степени ретракции гематомы человека *in vitro* на ее восприимчивость к ликвификации фокусированными ударноволновыми ультразвуковыми импульсами

Как было сказано в предисловии к настоящей главе, на сегодняшний день жесткость биологической ткани (т.е. ее модуль сдвига) рассматривается как основной параметр, характеризующий восприимчивость ткани к механическому разрушению. В связи с этим в §2.1 изучались упругие свойства модели гематомы человека по мере ее старения, и было показано, что в течение 8 суток хранения гематом их модуль сдвига остается неизменным. При этом гематомы претерпевают значительную ретракцию, т.е. их объем уменьшается по мере выделения из них жидкой плазмы, и таким образом содержание жидкости в них по мере старения уменьшается. При этом работы [43, 144] свидетельствуют о том, что содержание воды в разрушаемой ткани может быть более важным фактором, влияющим на устойчивость ткани к гистотрипсии, чем ее жесткость: повышенное содержание жидкости способствовало снижению устойчивости ткани к механическому разрушению. В связи с этим, интерес представляет исследование восприимчивости модели крупной гематомы человека к ее разрушению методом гистотрипсии по мере ее старения, при котором, как показано в §2.1, наблюдалось сохранение величины модуля сдвига и ультраструктуры, но увеличение степени ретракции.

2.5.1 Акустический эксперимент

Модель гематомы человека

В этой части работы использовались образцы гематом, степень ретракции которых измерялась в §2.1. Для этого человеческая кровь $n = 6$ доноров с антикоагулянтом разливалась

по полипропиленовым контейнерам формы параллелепипеда: по 50 мл для облучения в день коагуляции и по 175–200 мл для облучения через 5 и 10 суток хранения в коагулированном виде. Все образцы коагулировались добавлением 10% раствора хлорида кальция в термостате при 37°C в течение 1 часа, подвергались процедуре измерения плотности и степени ретракции (см. §2.1) и затем заключались в 6% агаровый гель и погружались в бассейн с дегазированной водой для облучения методом гистотрипсии (Рис. 2.25а). Образцы, предназначенные для облучения на 5 и 10 сутки ретракции, хранились при 2°C и в день облучения подвергались аналогичной процедуре определения их плотности, степени ретракции и подготовки к облучению.

Экспериментальная установка

Для акустического эксперимента в этой части работы использовалась кольцевая фазированная решетка (Рис. 2.25а), работающая на частоте 2 МГц и подробно охарактеризованная в §1.2. Планирование и контроль воздействия осуществлялось с помощью линейного УЗИ-датчика L7-4, расположенного в аксиальной плоскости кольцевой решетки (Рис. 2.25а). Параметры импульсно-периодического воздействия соответствовали двум режимам гистотрипсии – гистотрипсии с кипением (ГК, 2.5-мс импульсы) и гибридной гистотрипсии (0.2-мс импульсы) (Рис. 2.25б,в; Табл. 2.4).

Геометрия получения разрушений в гематоме

В этой части работы осуществлялось два типа разрушений в образцах гематом (Рис. 2.26): аксиально вытянутые разрушения в форме сигар (для исследования зависимости поперечного размера разрушений от степени ретракции гематом) и объемные разрушения путем слияния аксиально вытянутых (для исследования скорости и эффективности ликвидации гематом в зависимости от их степени ретракции).

В каждый день облучения (т.е. на 0-е, 5-е и 10-е сутки хранения гематом) было реализовано по $N = 5$ отдельных сигарообразных разрушений в гематомах $n = 4$ из 6 доноров: по две сигары в режиме ГК и по три сигары в режиме гибридной гистотрипсии. Каждая сигара была получена путем электронного смещения фокуса решетки вдоль ее оси по направлению к решетке между N_f точками-фокусами (Рис. 2.26а). Фокус смещался на $l = 6$ мм (+2 → -4 мм) в режиме ГК, и на

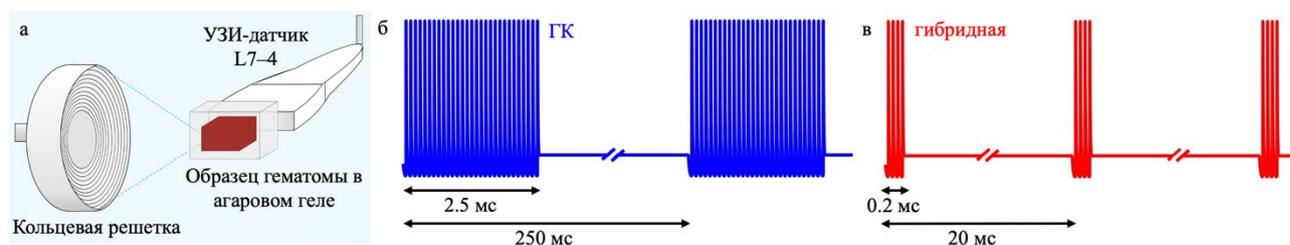


Рис. 2.25. (а) Схема экспериментальной установки по получению разрушений в гематомах методом гистотрипсии с помощью кольцевой фазированной решетки. (б–в) Протоколы импульсно-периодического воздействия в режиме гистотрипсии с кипением (б) и гибридной гистотрипсии (в).

Режим	f_0 , МГц	$t_{\text{имп}}$, мс	$N_{\text{имп}}$	DC	W , Вт	Δz , мм	$p^+ / p^- / A_s$, МПа	$t_{\text{кип}}$, мс
ГК	2	2.5	4	1%	1046	+2	198 / -31 / 222	0.13
						-4	228 / -35 / 257	0.09
гибридная	2	0.2	7	1%	1046	+4	189 / -31 / 212	0.15
							-6	240 / -36 / 267

Табл. 2.4. Параметры импульсно-периодического ультразвукового воздействия на модель гематомы человека в двух режимах гистотрипсии: f_0 – частота ультразвука, $t_{\text{имп}}$ – длительность импульсов, $N_{\text{имп}}$ – количество импульсов на точку, DC – коэффициент заполнения, W – акустическая мощность, Δz – крайнее смещение фокуса решетки (положительное при смещении от решетки, отрицательное – к решетке), p^+ (p^-) – пиковое положительное (отрицательное) давления в смещенном фокусе в гематоме, A_s и $t_{\text{кип}}$ – амплитуда ударного фронта и время до начала кипения в смещенном фокусе в гематоме.

$l = 10$ мм (+4 → -6 мм) в режиме гибридной гистотрипсии. Расстояние смещения фокуса l (Рис. 2.26) для каждого режима было выбрано таким образом, чтобы получить сигары одинаковой длины в обоих использованных режимах гистотрипсии. Средняя глубина фокуса в гематоме во всех случаях составляла 1.5 см. При смещении между крайними положениями фокуса количество $N_{\text{ф}}$ промежуточных точек-фокусов и количество $N_{\text{имп}}$ импульсов на каждую точку-фокус предварительно подбирались эмпирически таким образом, чтобы обеспечить насыщение размера сигар и одинаковую объемную скорость разжижения в обоих режимах гистотрипсии (Табл. 2.5). Расстояние L между сигарами (Рис. 2.26а) подбиралось так, чтобы предотвратить их слияние и обеспечить возможность измерения их ширины, которое осуществлялось по УЗИ-изображениям и фотографиям после разреза разрушений вдоль плоскости визуализации.

Объемные разрушения на 0-е, 5-е и 10-е сутки хранения гематом осуществлялись в сгустках крови $n = 2$ из 6 доноров: по одному объемному разрушению в каждом режиме для каждого донора. Получение объемных разрушений достигалось путем слияния $k \times m$ сигарообразных

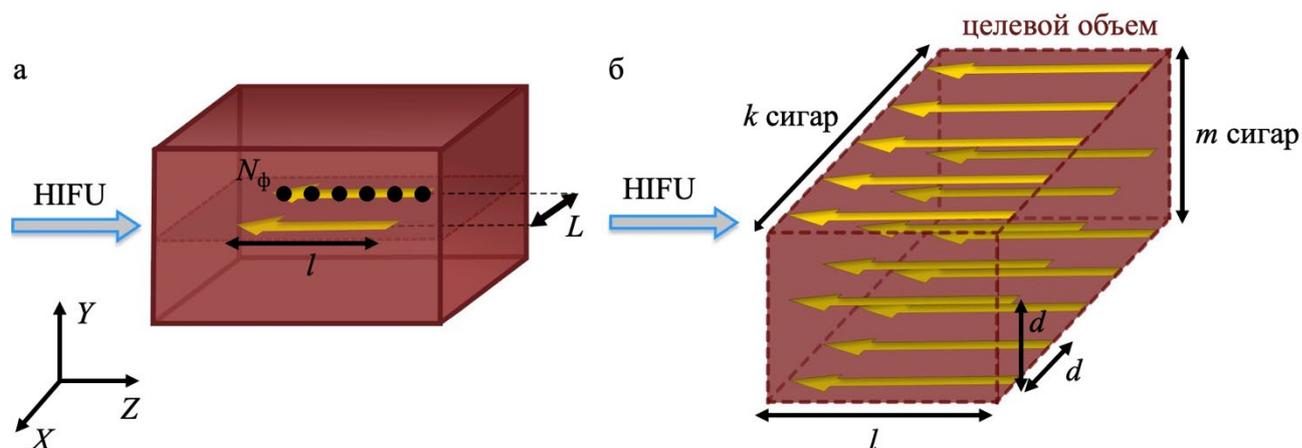


Рис. 2.26. Схемы траекторий перемещения фокуса. (а) Получение двух отдельных сигарообразных разрушений на расстоянии L друг от друга путем воздействия на $N_{\text{ф}}$ точек-фокусов вдоль линии длиной l . (б) Получение объемного разрушения путем слияния $k = 5$ на $m = 3$ сигарообразных разрушения длиной l каждое с шагом d между ними в поперечном направлении.

Режим	Сутки хранения	N отд. Сигар	l , мм	N_{ϕ}	L , мм	$k \times m$ сигар	d , мм
ГК	0	2	6	10	13	3 x 2	6
	5					7 x 5	3
	10					3 x 3	3
гибридная	0	3	10	18	8	5 x 3	3
	5					7 x 5	2
	10					6 x 6	2

Табл. 2.5. Геометрические параметры траектории движения фокуса из Рис. 2.26: N – количество одиночных сигар в одном образце, l – расстояние смещения фокуса для генерации каждой сигары, N_{ϕ} – количество фокусов на длину сигары, L – расстояние между отдельными сигарами для предотвращения их слияния, k и m – количество сигар вдоль оси X и Y в объемном разрушении, d – шаг вдоль осей X и Y между сигарами для их слияния в объемное разрушение.

разрушений с шагом d между ними, который подбирался по ширине отдельных сигарообразных разрушений для их эффективного слияния (Табл. 2.5). Количество сигар k и m в каждом направлении приведено в Табл. 2.5 и определялось размером каждого образца гематомы так, чтобы объемное разрушение полностью поместилось в образец. Полученные объемные разрушения фотографировались с помощью УЗИ и после их разреза вдоль плоскости визуализации. Размеры объемных разрушений измерялись по полученным фотографиям и использовались для оценки объема разрушения и соответствующей скорости ликвификации.

Перед генерацией разрушений в каждом образце гематомы сначала определялось пороговое напряжение на излучателе, необходимое для инициации кипения в гематоме в конкретном режиме. Для этого в фокус доставлялся либо одиночный ГК-импульс, либо несколько импульсов в режиме гибридной гистотрипсии при постепенно увеличивающемся напряжении до появления гиперэхогенного пятна на УЗИ-изображении, указывающего на образование пузырей в гематоме.

Статистический анализ

Полученные размеры разрушений и значения порогового напряжения сравнивались статистически между гематомами разного возраста согласно двухвыборочному гомоскедастическому t -критерию Стьюдента. Порог значимости был установлен на уровне $p = 0.05$.

Оценка ударноволновых параметров в гематоме

Для гарантированного обеспечения успешного разжижения гематом разного возраста в этих экспериментах использовалась максимально достижимая мощность усилителя, которая соответствовала напряжению в 190 В, подаваемому на решетку. На основе численной характеристики кольцевой решетки в воде, проведенной в §1.2, и аналогично процедуре моделирования поля *in situ*, описанному в §2.2, были проведены численные расчеты нелинейного поля решетки в плоскостной среде «вода–гематома–вода» с толщиной гематомы 4 см,

усредненной по всем исследованным образцам, с акустическими параметрами, приведенными в §2.2, кроме коэффициента поглощения, который на частоте 2 МГц составлял $\alpha = 0.104$ Нп/см.

Амплитуда давления на поверхности решетки, соответствующая рабочему напряжению в 190 В и необходимая в качестве граничного условия для численного моделирования, определялась из следующей процедуры калибровки. При различных напряжениях на решетке были проведены гидрофонные измерения аксиального поля давления при линейной фокусировке, и полученные распределения сравнивались с распределениями, рассчитанными теоретически на основе интеграла Рэля при различных амплитудах давления на поверхности решетки. Таким образом было получено соотношение между подаваемым на решетку напряжением и давлением на ее поверхности при наборе малых напряжений, и дальнейшая связь при высоких напряжениях между этими величинами предполагалась линейной.

Ультроструктурный анализ содержимого разрушений

Перед разрезом объемных разрушений производился забор нескольких капель разжиженного содержимого из каждого разрушения с помощью иглы 18G (диаметр отверстия ~ 0.9 мм) под контролем УЗИ. Одна капля содержимого наносилась на стеклянную подложку и подвергалась процедуре подготовки к СЭМ, как описано в §2.1. Другая капля содержимого разбавлялась дистиллированной водой в отношении 1:50 с целью разделения оставшихся фрагментов фибриновой сети для измерения их размеров, как описано в §2.4. Исследование образцов проводилось на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA (Токио, Япония). Каждый образец разбавленного содержимого разрушения исследовался на наличие оставшихся фрагментов длиной более 20 мкм, чтобы исключить из рассмотрения клетки крови, не представляющие опасности для закупоривания иглы при аспирации. Всего был обнаружен 131 фрагмент, и их максимальная длина измерялась с помощью графического редактора Figma.

2.5.2 Результаты

Ударноволновые параметры в гематоме

Полученные с помощью численного моделирования аксиальные распределения и профили ударной волны в несмещенном фокусе решетки в гематоме и при его крайних положениях представлены на Рис. 2.27а,б. Основные ударноволновые параметры и рассчитанное из амплитуды разрыва по формуле (2.3) время до начала кипения при различных положениях фокуса приведены в Табл. 2.4. Видно, что при всех положениях фокуса образовывался высокоамплитудный развитый разрыв, причем пиковые давления и амплитуда ударного фронта в фокусе увеличивались при электронном смещении фокуса в сторону излучателя (Табл. 2.4; Рис. 2.27а,б), что согласуется с результатами, полученными в §1.2. В частности, при смещении фокуса на 1 см (+4 \rightarrow -6 мм) к излучателю, амплитуда разрыва в фокусе увеличивалась на 26%

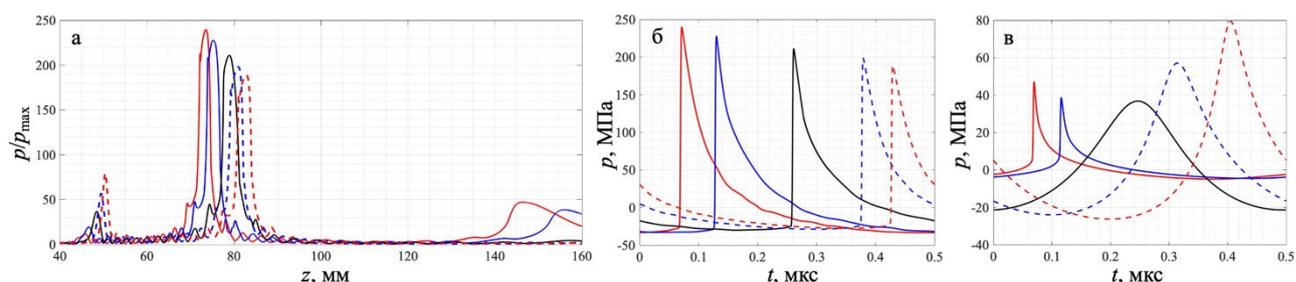


Рис. 2.27. Численно предсказанное нелинейное акустическое поле, созданное в образцах гематом при несмещенном фокусе (черным) и при его крайних положениях перед геометрическим фокусом (сплошные кривые) и за ним (пунктирные кривые) в режиме ГК (синим) и гибридной гистотрипсии (красным): (а) аксиальные распределения давления, (б,в) формы волны в основном (б) и побочном (в) максимумах.

(от 212 до 267 МПа). При этом оценка времени кипения подтвердила, что кипение в гематоме наступает внутри каждого импульса в обоих режимах гистотрипсии (Табл. 2.4). На Рис. 2.27а видно, что во всех экспериментально реализованных режимах гистотрипсии в акустическом поле решетки формировался побочный максимум, амплитуда которого составляла до 42% от амплитуды в основном максимуме. Постфокальный побочный максимум формировался при предфокальном смещении фокуса и содержал ударный фронт амплитудой до 50 МПа, в то время как предфокальный побочный максимум наблюдался при постфокальном смещении фокуса и не содержал ударной волны (Рис. 2.27в). Эти результаты согласуются с полученными в §1.2, в котором также была показана возможность формирования ударной волны в постфокальном побочном максимуме при предфокальном смещении фокуса. При этом поскольку в текущем эксперименте толщина гематомы в среднем составляла 4 см, а глубина несмещенного фокуса в ней – 15 мм, то все побочные максимумы находились вне образца гематомы и потому не могли вызывать в ней нежелательных повреждений вне фокальной области.

Сигарообразные разрушения

Пороговое напряжение, необходимое для инициации кипения в гематомах, статистически не зависело от возраста гематомы (Рис. 2.28а), в то время как ширина получаемых сигарообразных разрушений оказалась меньше в более старых, т.е. ретрагированных гематомах (Рис. 2.28б). Причем наиболее существенное уменьшение размеров сигар наблюдалось между свежekoагулированными гематомами и хранившимися в течение 5 суток (на 14% и 40% в режимах гибридной гистотрипсии и

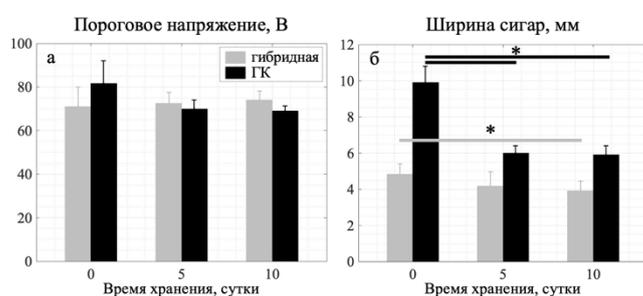


Рис. 2.28. Зависимость порогового напряжения (а) и поперечного размера сигарообразных разрушений (б), усредненных по всем донорам, от возраста гематомы. Данные представляют средние значения с погрешностями, равными стандартному отклонению, * указывает на статистически значимое различие при $p < 0.05$.

ГК, соответственно), с лишь незначительным уменьшением размеров к 10-м суткам хранения. Такое поведение размеров разрушений с возрастом гематом коррелирует с характером изменения их степени ретракции, которая оценивалась в §2.1 (Рис. 2.9в) и значительно увеличивалась только в течение первых пяти суток хранения гематом. Это указывает на корреляцию увеличивающейся степени ретракции гематом (т.е. снижения содержания жидкости в них) с уменьшением их восприимчивости к механическому разрушению. Эти результаты согласуются с работой [144], в которой наблюдалась пониженная активность кавитационных пузырьков и меньшая площадь кавитационного облака в обезвоженных фантомах биотканей. Основываясь на измеренных поперечных размерах одиночных сигар, шаг d между сигарами для получения объемных разрушений был выбран меньше для образцов, хранившихся в течение 5 и 10 суток (Табл. 2.5).

На Рис. 2.29 представлены отдельные сигарообразные разрушения на УЗИ-изображениях сразу после (верхний ряд) и спустя 1–3 часов (средний ряд) после окончания облучения, а также макроскопические фотографии разрушений после разреза в плоскости визуализации (нижний ряд). Как и ожидалось, во время воздействия разрушения выглядели гиперэхогенными на УЗИ из-за пузырей, образовавшихся внутри них и отражающих диагностический ультразвук (Рис. 2.29, верхний ряд). После того, как пузыри растворились, разрушения потеряли свою эхогенность и стали видны темными пустотами на УЗИ, что указывало на разжижение соответствующей части гематомы (Рис. 2.29, средний ряд). Как и ожидалось, сигарообразные разрушения в режиме ГК имели форму «головастика» (Рис. 2.29, 1а–1и). Разрушения в режиме

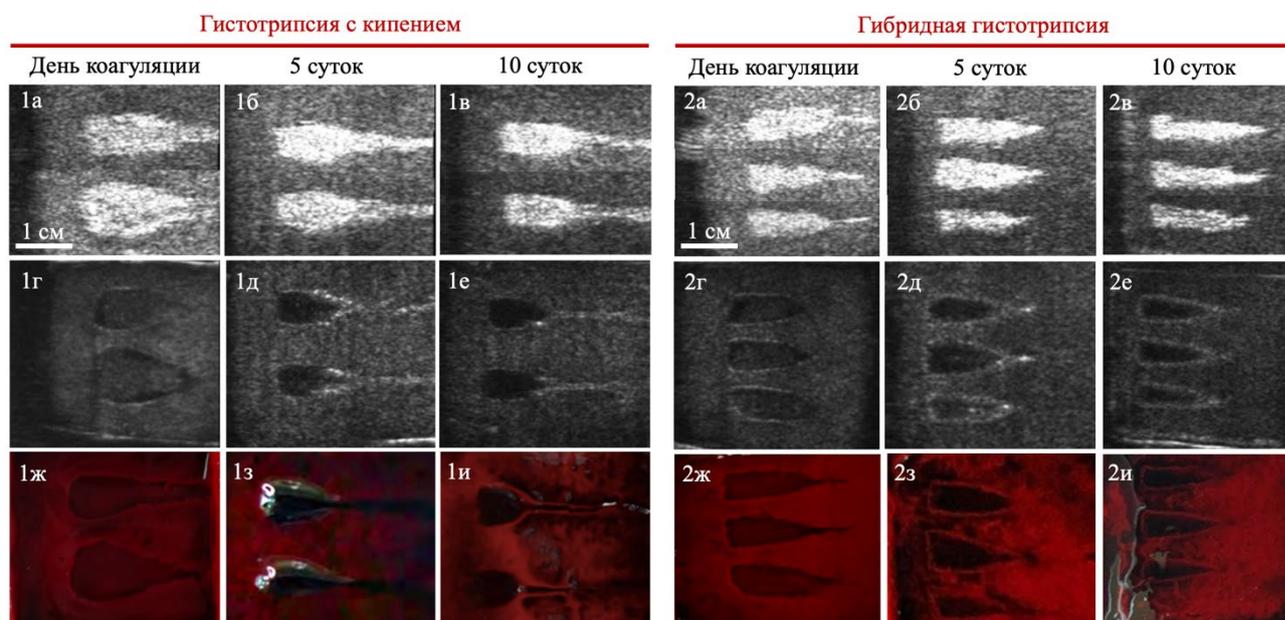


Рис. 2.29. Репрезентативные УЗИ-снимки (а–е) и фотографии после разреза (ж–и) сигарообразных разрушений, полученные в гематомах на 0-е, 5-е и 10-е сутки хранения в режимах ГК (1) и гибридной гистотрипсии (2): (а–в) через 5 секунд после окончания облучения, (г–е) через 1–3 часа после облучения, (ж–и) после разреза разрушений вдоль плоскости визуализации. Маркерная линия: 1 см. NIFU-воздействие производится слева направо.

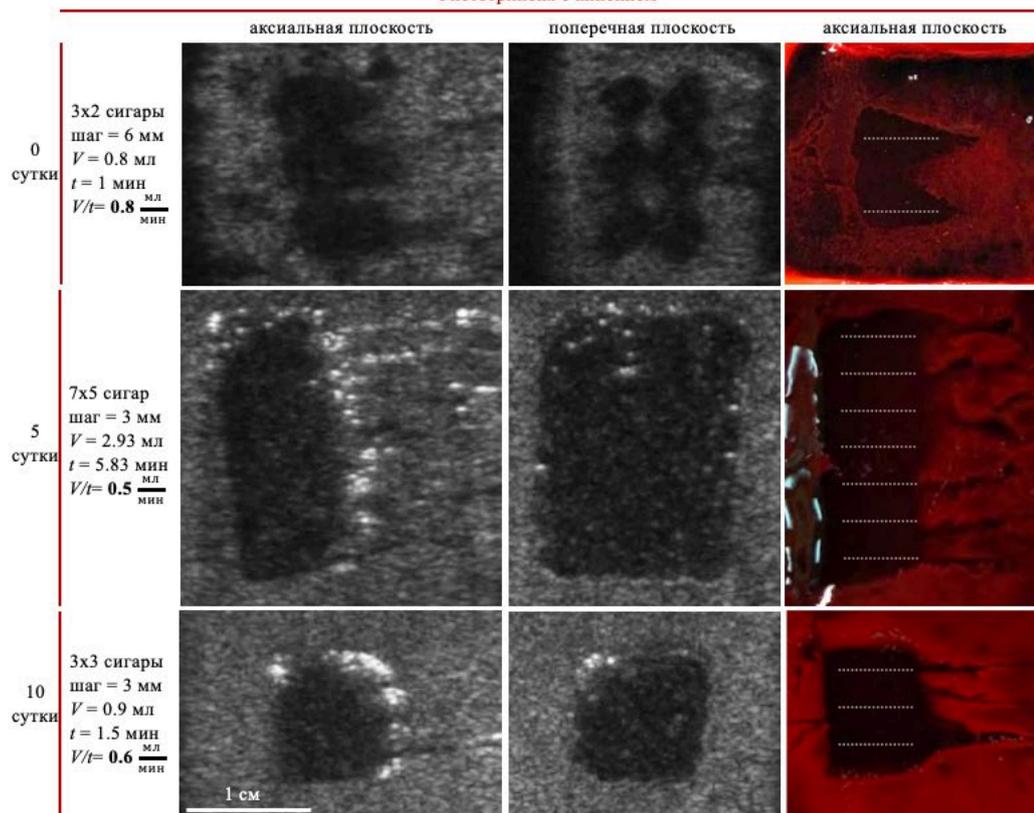
гибридной гистотрипсии имели более равномерную ширину по всей своей длине и были больше похожи на типично эллипсоидальные разрушения в режиме кавитационной гистотрипсии, но также обладали некоторыми признаками «хвоста головастика», характерного для ГК (Рис. 2.29, 2а-2и). Эти результаты согласуются с полученными в предыдущем параграфе и косвенно поддерживают гипотезу о том, что гибридная гистотрипсия включает механизмы ГК и кавитационной гистотрипсии. Разрушения на фотографиях после их разреза (Рис. 2.29, нижний ряд) хорошо согласуются по размеру и форме с наблюдаемыми с помощью УЗИ. Однако из-за возможного искажения образцов во время манипуляций и разреза поперечные размеры разрушений оценивались по УЗИ-снимкам, сделанным до каких-либо манипуляций с образцами (Рис. 2.29, средний ряд).

Стоит отметить, что зависимость размеров разрушений от возраста гематом, и соответственно, их степени ретракции оказалась более заметной в режиме ГК по сравнению с гибридной гистотрипсией. Предположительно, это связано с тем, что рост «головы» ГК-разрушения, вероятно, зависит от сопротивления ткани механическому воздействию в большей степени, чем формирование кавитационного облака, которое обычно ограничено фокальной областью акустического пучка.

Объемные разрушения

На Рис. 2.30 представлены основные параметры и фотографии объемных разрушений, полученных в образцах гематом разного возраста. Видно, что оба режима гистотрипсии привели к формированию однородных объемных разрушений с четкими краями и без видимых признаков теплового эффекта вне зависимости от возраста гематомы и режима воздействия. Поскольку объемные разрушения получались из разного количества отдельных сигарообразных разрушений в зависимости от размера и геометрии каждого образца гематомы (Табл. 2.5), то они имели разный объем, приведенный на Рис. 2.30. Скорость ликвификации при фиксированном протоколе воздействия оказалась выше в свежekoагулированных гематомах, т.е. с меньшей степенью ретракции и, соответственно, меньшим содержанием жидкости. Разрушения в гематомах на 5-е и 10-е сутки хранения показали одинаковую скорость абляции, что коррелирует с характером изменения размеров отдельных сигар (Рис. 2.28, 2.29). При этом максимальная скорость ликвификации (1.6 мл/мин) была получена при использовании режима гибридной гистотрипсии, что согласуется с результатами, полученными в предыдущем параграфе. Стоит отметить, что полученная скорость абляции оказалась ниже, чем в предыдущем параграфе, что объясняется обратной зависимостью размеров разрушений от частоты ультразвука [42, 145], которая в этой части работы составляла 2 МГц, тогда как в предыдущем параграфе использовался 1.5-МГц излучатель. В этой части работы использовалась кольцевая решетка с частотой 2 МГц в связи с ее возможностью электронного смещения фокуса, однако для гематом в брюшной полости более

Гистотрипсия с кипением



Гибридная гистотрипсия

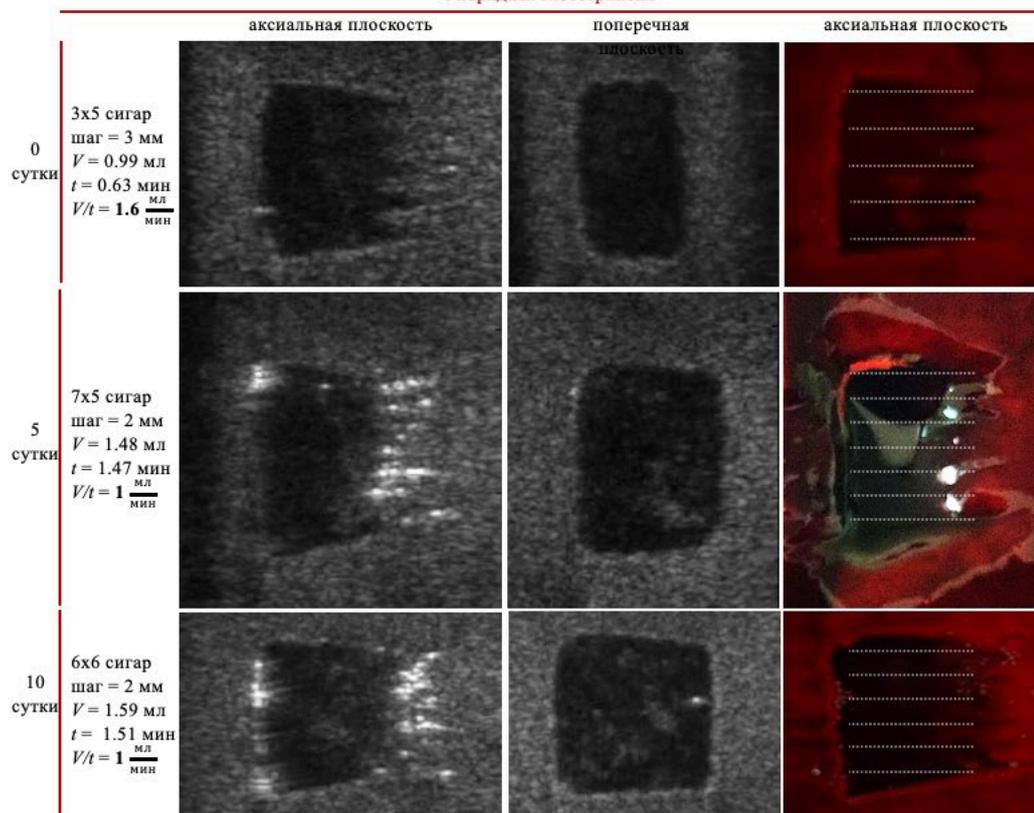


Рис. 2.30. Параметры объемных разрушений (длина l и количество сигар $k \times m$, шаг d между ними, оцененный разрушенный объем V , время получения разрушения t и рассчитанная скорость ликвификации V/t , см. Рис. 2.26б и Табл. 2.5), их УЗИ-снимки (в аксиальной и поперечной плоскостях) и фотографии после разреза для гематом разного возраста. Маркерная линия: 1 см. Белыми пунктирными линиями обозначены слои перемещения фокуса.

подходящими являются более высокие частоты ультразвука, использование которых обеспечивает более высокую скорость ликвификации.

На Рис. 2.31 представлена ультраструктура образцов гематом до и после ликвификации в двух режимах гистотрипсии. Контрольные СЭМ-снимки интактных гематом подтверждают увеличивающую степень эхиноцитоза и неизменную ультраструктуру нитей фибрина по мере старения гематом. После ликвификации подавляющая часть клеток крови была разрушена, и в образцах можно увидеть только многослойные фрагменты разрушенной фибриновой сети и единичные клетки крови. Количество оставшихся клеток крови качественно оказалось ниже в более старых гематомах, что вероятно связано с ослаблением деформированных клеток крови (эхиноцитов) и, соответственно, их меньшей устойчивости к механическому разрушению. В разжиженном содержимом разрушения встречались как участки чисто механического повреждения фибриновой сети (указаны буквой «М» на Рис. 2.31), так и с возможным проявлением тепловых эффектов (указаны буквой «Т» на Рис. 2.31), что, вероятно, связано с выбором чрезмерно высокой акустической мощности в этих экспериментах. Такие термически поврежденные участки в ГК-разрушениях чаще встречались в более старых (т.е. ретрагированных) гематомах. Однако, при гибридной гистотрипсии механические и тепловые эффекты были обнаружены во всех разрушениях независимо от возраста гематом.

Оценка размеров фрагментов фибриновой сети, остающихся в содержимом объемных разрушений, проведенная аналогично процедуре из предыдущего параграфа, показала, что доля

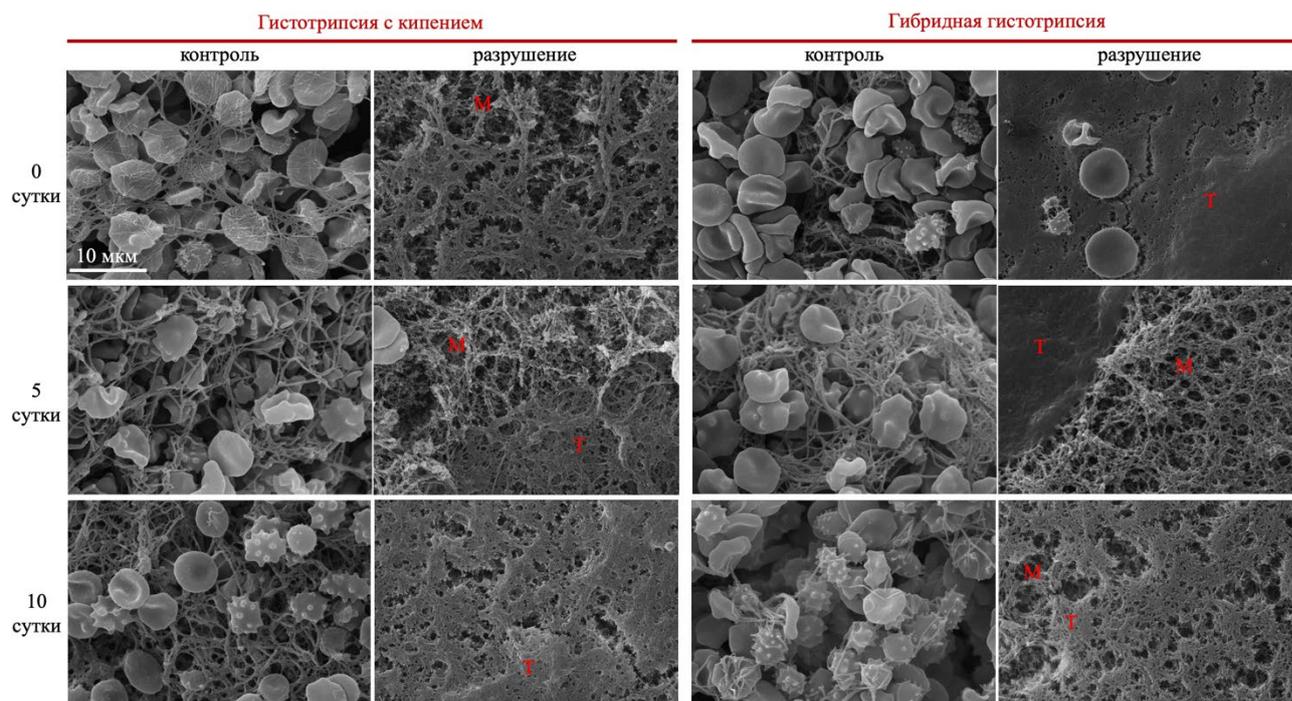


Рис. 2.31. СЭМ-снимки содержимого интактных гематом (контроль) и объемных разрушений в гематомах на 0-е, 5-е и 10-е сутки хранения. Красными буквами «М» отмечены области чисто механического разрушения, «Т» – возможные тепловые эффекты. Маркерная линия: 10 мкм.

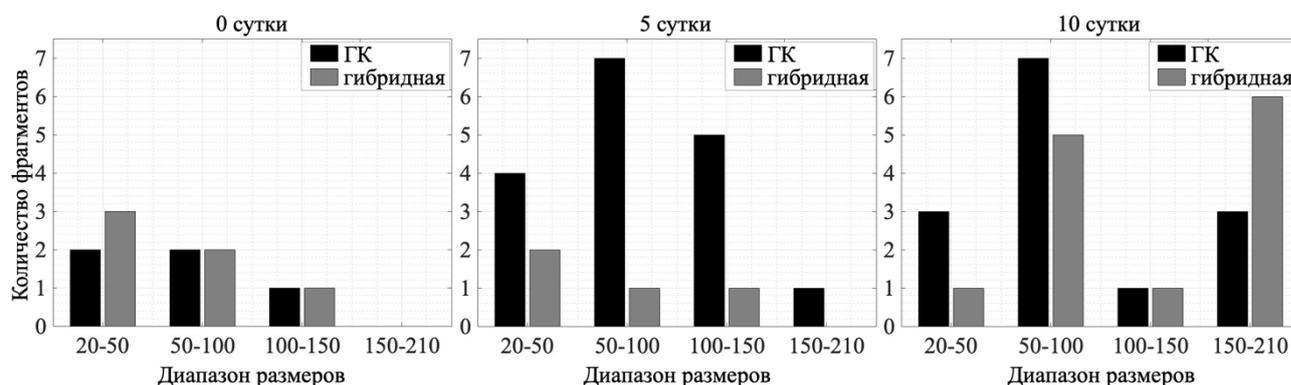


Рис. 2.32. Распределение размеров фрагментов фибриновой сети, больших 20 мкм в длину, оставшихся в содержимом разрушений, полученных в режиме ГК (черным) и гибридной гистотрипсии (серым) в гематомах на 0-е, 5-е и 10-е сутки хранения.

фрагментов, максимальная длина которых превышает 150 мкм, была выше для разрушений в более старых гематомах: их доля в разрушениях на 10-е сутки по сравнению со свежеекоагулированными гематомами увеличилась от 0 до 21% и от 0 до 46% в режимах ГК и гибридной гистотрипсии, соответственно (Рис. 2.32). Однако, в целом, независимо от протокола воздействия и возраста гематомы, подавляющее большинство оставшихся фрагментов имели максимальную длину менее 150 мкм, а максимальный размер не превышал 210 мкм, что меньше диаметра отверстия большинства медицинских игл, которые могут быть использованы для аспирации разжиженного содержимого гематом при клиническом применении методов гистотрипсии (например, иглы до 26G, т.е. с отверстием диаметром более 240 мкм).

2.5.3 Выводы к параграфу §2.5

Таким образом, в настоящем параграфе было экспериментально показано, что восприимчивость крупных гематом человека *in vitro* к их механическому разжижению высокоамплитудными ультразвуковыми импульсами при неизменном значении модуля сдвига обратно зависит от их степени ретракции, что, по-видимому, связано с содержанием в сгустках жидкости, которая снижает их устойчивость к механическому разрушению. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что восприимчивость биологической ткани к ее механическому разрушению ударноволновыми ультразвуковыми импульсами определяется не только ее макроскопическим модулем сдвига, но может также зависеть от содержания жидкости.

§2.6 Выводы ко второй главе

В настоящей главе на модели крупной гематомы человека как примере биологической ткани с малой жесткостью были исследованы возможности и закономерности ее неинвазивного механического разрушения ударноволновыми ультразвуковыми импульсами. Методами эластографии сдвиговой волной и индентометра были изучены упругие свойства (а именно, модуль сдвига) таких гематом и их изменение с течением времени. Методы световой и сканирующей электронной микроскопии были использованы для изучения микро- и

ультраструктуры модели гематомы человека. При этом было показано, что устойчивость гематом к их механическому разрушению увеличивается по мере уменьшения содержания жидкости в них при постоянном модуле сдвига и ультраструктуре фибриновой сети, сдерживающей компоненты сгустка в единое целое. Предложенным методом с использованием сканирующей электронной микроскопии было показано, что миллисекундные и субмиллисекундные ударноволновые ультразвуковые импульсы способны неинвазивно ликвидировать крупные гематомы человека на фрагменты менее 210 мкм в длину, что позволяет беспрепятственную аспирацию разжиженного содержимого гематом тонкой иглой. При этом объемная скорость ликвидации может быть значительно увеличена без потери эффективности путем использования более коротких (субмиллисекундных) импульсов при соответствующем увеличении мощности до достижения необходимых амплитуд ударного фронта в фокусе.

Глава 3

РАЗРУШЕНИЕ ТКАНИ ПРОСТАТЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ПРИМЕРА ТКАНИ С БОЛЬШОЙ ЖЕСТКОСТЬЮ

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [A2, A4, A9].

Как уже было сказано во Введении к настоящей диссертации, биологические ткани, разные по структуре и составу, проявляют различную устойчивость к их механическому разрушению ультразвуком [32, 42, 43, 48, 52, 53, 102]. В частности, на сегодняшний день основным параметром, определяющим отклик ткани к гистотрипсии, считается ее жесткость: более сложными для разрушения являются ткани с большой жесткостью, которые обычно также характеризуются высоким содержанием коллагена, например, стенки сосудов, капсулы органов, связки и сухожилия, и в том числе ткань предстательной железы (или, простаты). Простата человека представляет собой орган в мужском организме в центре таза ниже мочевого пузыря, через который проходит мочеиспускательный канал (уретра) [146]. Эта железа связана с половой функцией человека и участвует в механизме удержании мочи. Предстательная железа, как правило, имеет значительную фиброзно-мышечную строму с высоким содержанием коллагена [146], что делает ее наиболее жесткой тканью [147, 148] для разрушения методом гистотрипсии по сравнению с другими типичными целевыми тканями [137]. В частности, например, средний модуль Юнга в модели гематомы человека, измеренный в предыдущей главе этой диссертации, составлял порядка 1.6 кПа, в то время как диапазон значений жесткости ткани предстательной железы здорового пациента может быть от 15 до 30 кПа [147]. Кроме того, при развитии заболеваний простаты, таких, например, как ДГПЖ (доброкачественная гиперплазия (т.е. увеличение количества клеток) предстательной железы) или рак простаты, определенные зоны этой железы становятся жестче: модуль Юнга встречается в диапазоне от 30 до 180 кПа. Этот эффект активно используется для неинвазивной диагностики заболеваний простаты [110–112, 149, 150], однако еще больше осложняет механическое разрушение таких новообразований.

Метод гистотрипсии сейчас развивается в том числе для лечения как доброкачественных, так и злокачественных образований предстательной железы [151–155]. Первые попытки применения гистотрипсии для разрушения ткани простаты были осуществлены в режиме кавитационной гистотрипсии трансабдоминально на модели собаки *in vivo* и показали многообещающие результаты, демонстрирующие возможность успешного разрушения опухолей в простате, оставляя уретру интактной [156]. Однако, первые клинические испытания на людях по лечению ДГПЖ с трансперинеальной фокусировкой акустического пучка не показали объективного улучшения показателей работы предстательной железы [157]. Это, вероятно, было связано со значительно более высоким содержанием коллагена в ткани простаты человека, чем собаки, а также с ограниченным акустическим окном и слишком глубоким расположением

простаты для трансперинеального подхода, что, по-видимому, не позволяло достичь амплитуд ультразвукового поля в фокусе, необходимых для реализации режима кавитационной гистотрипсии. Однако, для режима гистотрипсии с кипением (ГК) требуются меньшие амплитуды ударной волны в фокусе, и, соответственно, меньшие углы фокусировки ультразвуковых пучков, что может позволить уменьшить излучатель до размеров, позволяющих трансректальный доступ к простате с менее ограниченным акустическим окном.

В связи с этим, целью этой части работы была экспериментальная проверка возможности механического разрушения ткани предстательной железы человека *ex vivo* и злокачественной опухоли в ней методом гистотрипсии с кипением как примера ткани с высокой жесткостью и оптимизация необходимой для этого дозы воздействия методами световой и электронной микроскопии.

§3.1 Исследование упругих свойств ткани простаты человека *ex vivo*

3.1.1 Измерение упругого модуля предстательной железы человека

В качестве образцов ткани предстательной железы человека *ex vivo* в настоящей работе использовались аутопсийные образцы простаты, получаемые путем посмертного вскрытия менее, чем через сутки после внезапной смерти. Адекватность отклика тканей *ex vivo* как модели живой ткани с точки зрения воздействия методом гистотрипсии была показана ранее автором в работе [158 (A9)]. Для того, чтобы проверить адекватность такой модели с точки зрения ее упругих свойств, жесткость $N = 8$ образцов аутопсийной ткани предстательной железы человека была проанализирована методом эластографии сдвиговой волны (ЭСВ).

ЭСВ-измерения проводились с помощью ультразвуковой системы Aixplorer (SuperSonic Imagine, Франция) линейным датчиком SL15-4. Последующее облучение образцов методом гистотрипсии обычно проводилось после их заключения в гель из агарозы, который значительно увеличивает артефакты на границах образцов с гелем на ЭСВ-измерениях, поэтому для минимизации таких артефактов образцы помещались в контейнер с дегазированным физраствором и измерялись с помощью ЭСВ до их заключения в гель. Каждый образец ткани помещался в физраствор на слой поглотителя из силиконовой резины, таким образом, чтобы ЭСВ-визуализация выполнялась с того же направления, что и последующее ГК-воздействие. Исследуемые области для количественных измерений выбирались в середине образцов вдали от артефактов. Для каждого измерения датчик удерживался в неподвижном положении в течение 4 секунд для стабилизации ЭСВ-изображения. На каждом изображении модуль Юнга измерялся в трех круглых областях диаметром 4 мм, расположенных на глубине 6, 12 и 18 мм в образце. Каждое измерение модуля Юнга осуществлялось три раза, из чего затем рассчитывалось среднее значение жесткости образца и стандартное отклонение.

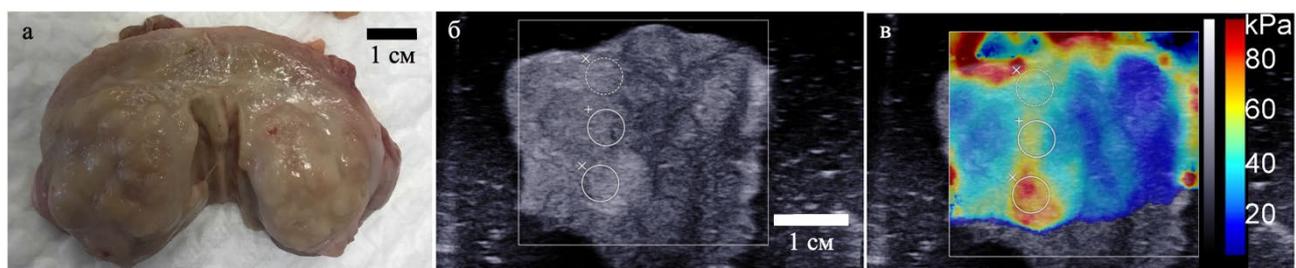


Рис. 3.1. (а) Фотография аутопсийного образца ткани предстательной железы человека *ex vivo*, использованного в экспериментах по гистотрипсии с кипением, с визуально идентифицируемой ДГПЖ. (б,в) Репрезентативные УЗИ- (б) и ЭСВ-снимки (в) образца простаты, показывающие значения модуля Юнга в диапазоне от 30 до 75 кПа.

3.1.2 Результаты и выводы к параграфу §3.1

Макроскопический осмотр и пальпация образцов простаты показали, что значительная часть образцов содержала ДГПЖ, что было ожидаемо, поскольку ДГПЖ является распространенным заболеванием предстательной железы у мужчин старше 50 лет. Один из таких образцов представлен на Рис. 3.1.

Измеренные значения модуля Юнга в аутопсийной ткани предстательной железы представлены в Табл. 3.1 и находились в пределах типичного диапазона, наблюдаемого клинически как для здоровой ткани простаты, так и для ДГПЖ и рака простаты [147, 150]. В частности, значения модуля Юнга варьировались от 11.9 до 91.7 кПа со средним значением 37.9 ± 22.2 кПа (Табл. 3.1). Репрезентативные УЗИ- и ЭСВ-снимки одного из образцов (Рис. 3.1б,в) иллюстрируют наблюдаемый диапазон жесткости ткани простаты.

Таким образом, в настоящем параграфе было показано, что жесткость аутопсийной ткани предстательной железы человека лежит в диапазоне значений, наблюдаемых клинически как для здоровой ткани простаты, так и для доброкачественных и злокачественных образований в ней. При этом измеренные значения модуля Юнга значительно превышают типичные показатели для других мягких тканей человека. Полученные результаты позволяют считать аутопсийную ткань простаты адекватной моделью для использования в экспериментах *ex vivo*, а также примером ткани с большой жесткостью для изучения закономерностей и отработки метода гистотрипсии.

Положение	Номер образца								Среднее
	1	2	3	4	5	6	7	8	
У поверхности	24.5	27.7	20.8	11.9	45.5	18.4	80.6	34.8	
В центре	29.8	23.6	12.6	19.8	47.8	16.6	82.7	55.2	
В глубине	40.7	38.4	24.3	26.7	59.6	21.9	54	91.7	
Среднее	31.7	29.9	19.2	19.4	51.0	19.0	72.4	60.6	37.9
(станд. откл.)	(6.7)	(6.3)	(4.9)	(6.0)	(6.2)	(2.2)	(13.1)	(23.5)	(22.2)

Табл. 3.1. Значения модуля Юнга (кПа), измеренные методом эластографии сдвиговой волной на трех глубинах в $N = 8$ образцах аутопсийной предстательной железы *ex vivo*.

§3.2 Влияние длительности ударноволновых ультразвуковых импульсов на скорость и эффективность механического разрушения ткани предстательной железы человека *ex vivo*

В этой части работы экспериментально демонстрируется возможность механического разрушения ткани предстательной железы человека *ex vivo* миллисекундными ударноволновыми ультразвуковыми импульсами (методом гистотрипсии с кипением) на модели аутопсийной ткани простаты, адекватность которой с точки зрения ее упругих свойств была показана в предыдущем параграфе.

3.2.1 Акустический эксперимент

Модель предстательной железы человека *ex vivo*

$N = 16$ образцов аутопсийной ткани предстательной железы человека (размером 4–15 см³) были получены путем посмертного вскрытия менее, чем через сутки после внезапной смерти пациентов, дегазированы в течение 1 часа в физиологическом растворе при остаточном давлении < 0.1 бар и заключены в 1% гель из агарозы (Рис. 3.2а), приготовленный путем смешивания порошка агарозы (UltraPure Agarose, Invitrogen) с дегазированной дистиллированной водой, для облегчения манипуляций образцов с помощью 3D системы позиционирования (Рис. 3.2в).

Экспериментальная установка

Облучение проводилось на экспериментальной установке (Рис. 3.2в), аналогичной реализованной в предыдущей главе, в бассейне с дегазированной водой с помощью 12-элементного секторного излучателя с диафрагменным числом $F\# = 0.77$ и частотой 1.5 МГц (Рис. 3.2б), подробно охарактеризованном в §1.1 и использованном экспериментально в §§2.2–

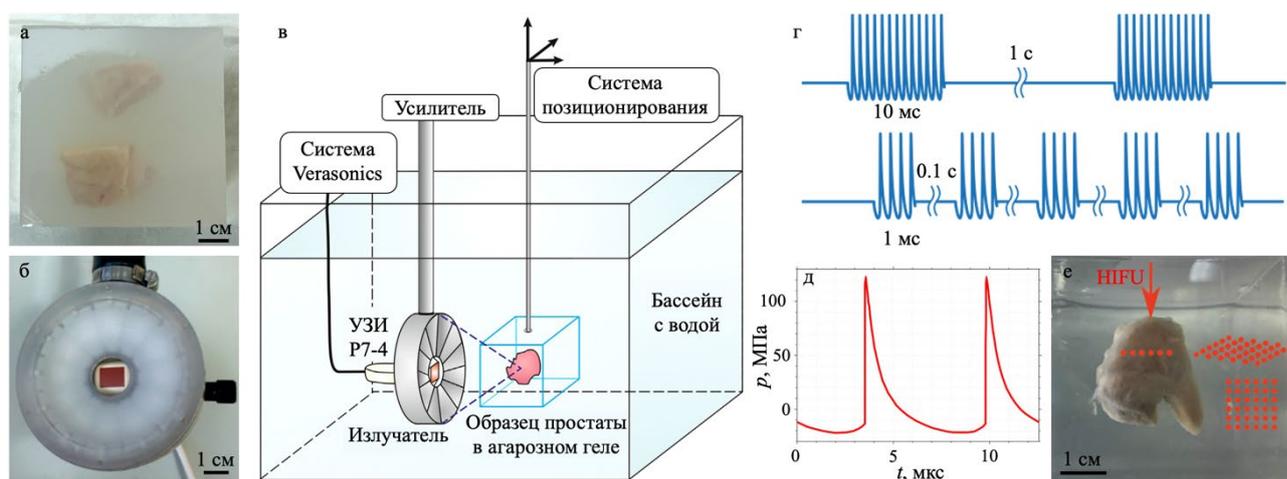


Рис. 3.2. (а) Образцы простаты *ex vivo* в агаровом геле. (б) Фотография используемого секторного излучателя с диагностическим датчиком Р7-4, закрепленным в центральном отверстии излучателя. (в) Схема экспериментальной установки для реализации механических разрушений в образцах предстательной железы *ex vivo* методом гистотрипсии с кипением. (г) Схема двух режимов импульсно-периодического воздействия. (д) Два периода формы волны в фокусе излучателя в простате, полученной путем численного моделирования. (е) Образец простаты в геле с нанесенной на него геометрией облучения одной из плоскостей. Маркерные линии: 1 см.

2.4. Контроль облучения проводился путем УЗИ-визуализации с помощью датчика P7-4, закрепленного в центральном отверстии излучателя, управляемого ультразвуковой системой Verasonics V1 и работавшего в В-режиме и режиме энергетического Доплера (Рис. 3.2б,в). Последовательность доплеровских импульсов для генерации изображения запускалась сразу после каждого ГК-импульса [159]. После окончания облучения также осуществлялись УЗИ-снимки в В-режиме для оценки результата разрушения.

Геометрия и протоколы облучения

Для получения объемных разрушений в образцах простаты воздействие производилось в узлы прямоугольной сетки, состоящей из 1–4 плоскостей с шагом 1 мм, перпендикулярных оси излучателя, в каждой из которой облучалось 2–11 фокусов с шагом 1–2 мм в зависимости от размера и геометрии образцов (Рис. 3.2е). Воздействие проводилось в двух режимах гистотрипсии с кипением: с импульсами длительностью 10 мс и 1 мс, по $N = 8$ образцов в каждом режиме (Рис. 3.2г). Поскольку коэффициент заполнения поддерживался равным 1% в обоих режимах, то воздействие более короткими импульсами позволяло сократить время, необходимое для получения разрушения, но требовало большего количества импульсов на точку. А именно, в режиме с 10-мс импульсами количество импульсов на каждый узел сетки варьировалось от 20 до 40, а в 1-мс режиме – от 75 до 150. При этом в каждом режиме $N = 4$ образца использовались для оптимизации геометрии облучения (шага между фокусами в плоскости и количества импульсов на точку) таким образом, чтобы получить однородные объемные разрушения за минимальное время. В результате в оставшихся $N = 4$ образцах на каждый режим облучение проводилось со следующими оптимальными параметрами: шаг между плоскостями и между фокусами в плоскости составлял 1 мм, 30 импульсов на точку использовалось в 10-мс режиме и 150 импульсов на точку – в 1-мс режиме.

Ударноволновые параметры в фокусе в простате

Чтобы обеспечить успешное разрушение ткани простаты во всех образцах, излучатель работал при максимально достижимом напряжении 210 В, которое обеспечивалось специально изготовленной управляющей системой, аналогичной описанной в работе [138]. Создаваемые при этом ударноволновые условия в фокусе излучателя в ткани простаты оценивались с помощью численного моделирования поля излучателя с граничными условиями, определенными в §1.1, в программном комплексе NIFU beam в плоскостной среде «вода–простата» с глубиной расположения фокуса в ткани 1 см. Акустические параметры воды и ткани предстательной железы были взяты из литературы [85] и составляли, соответственно: скорость звука $c = 1490.6$ и 1559.5 м/с, плотность $\rho = 997$ и 1045 кг/м³, коэффициент нелинейности $\beta = 3.5$ и 4.8 , коэффициент диффузии звука $\delta = 4.33$ мм²/с, коэффициент поглощения в ткани простаты $\alpha =$

0.14 дБ/см на частоте 1.5 МГц с показателем степени зависимости поглощения от частоты $\nu = 1.1$. Полученная таким образом форма волны в фокусе в простате представлена на Рис. 3.2д, а соответствующие амплитуды пикового положительного и отрицательного давлений, а также ударного фронта составили: $p^+ / p^- / A_s = 122 / -22 / 135$ МПа. Оценка времени кипения в ткани простаты по формуле (2.3) с акустическими параметрами ткани, указанными выше, и теплоемкостью единицы объема, равной $c_v = 3.45$ МДж/(м³·К) [160], показала, что инициация кипения должна достигаться за 0.6 мс, т.е. в течение каждого из импульсов в обоих режимах ГК. При этом экспериментальная проверка подобранного режима показала формирование пузырей в обоих протоколах, наблюдаемое как на УЗИ в В-режиме, так и в режиме доплеровской визуализации.

3.2.2 Гистологический и ультраструктурный анализ разрушений

Разрушения в первых $N = 4$ образцах в каждом режиме, использованных для оптимизации ГК-протоколов, разрезались пополам для макроскопического анализа получаемых разрушений и оценивались визуально. Затем в каждом из подобранных оптимальных протоколов $N = 2$ из 4 разрушений использовались для гистологического анализа [133]. Для этого образцы фиксировались в 10% нейтральном забуференном формалине, погружались в парафин, иссекались на срезы толщиной 3 мкм, окрашивались по Массону, помещались под покровное стекло и сканировались на цифровом сканере LEICA SCN400. Гистологическая окраска по Массону позволила окрасить соединительную ткань в ярко-синий цвет, ядра клеток – в багрово-красный, а цитоплазму клеток – в розовый. Оставшиеся $N = 2$ разрушения в каждом режиме разрезались пополам для макроскопического анализа и взятия содержимого для просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии (ПЭМ и СЭМ) (см. п. 2.1.2). Исследование ПЭМ- и СЭМ образцов проводилось, соответственно, на микроскопах JEOL JEM-1011 и JEOL JSM-6380LA (Япония).

3.2.3 Результаты

Получение объемных ГК-разрушений заняло от 5 до 33 минут в режиме 1-мс импульсов и от 10 до 60 минут в режиме 10-мс импульсов, в зависимости от количества облучаемых плоскостей (от 1 до 4) и количества точек в каждой плоскости (от 2 до 11). Во всех образцах во время ГК-воздействия наблюдалась гиперэхогенная область на УЗИ-изображениях в В-режиме (Рис. 3.3а). Формирующиеся пузыри в фокальной области также были видны с использованием энергетического доплеровского режима (Рис. 3.3б). Такой вид разрушений обычно сохранялся в течение 10–15 минут после окончания воздействия, и затем по мере растворения пузырей на месте разрушения наблюдалась гипоэхогенная область, что свидетельствовало об успешном разрушении ткани до жидкого состояния (Рис. 3.3в). Разжиженное содержимое разрушения

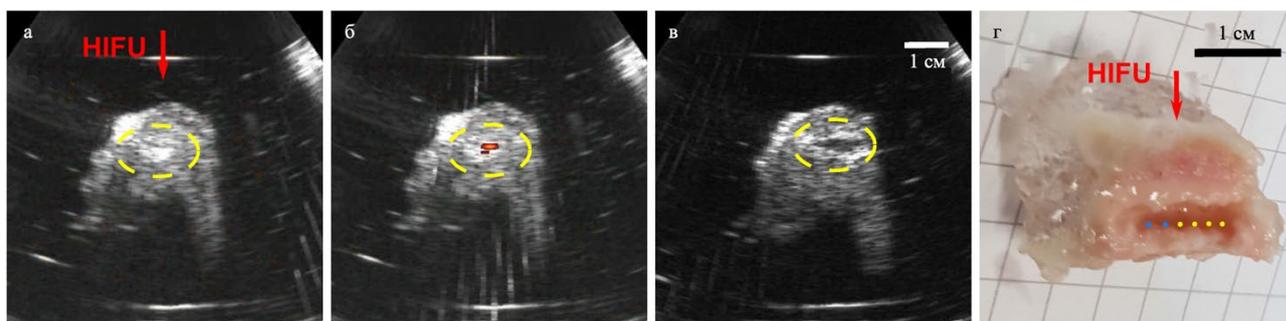


Рис. 3.3. Иллюстрация визуализации ГК-разрушения в ткани простаты *ex vivo* во время (а–б) и после (в–г) воздействия. (а) УЗИ-снимок в В-режиме с гиперэхогенной областью на месте воздействия и (б) изображение в режиме энергетического Доплера во время ГК-воздействия. (в) Образование гипоехогенной области на месте объемного ГК-разрушения через 15 минут после воздействия. (г) Фотография разреза ГК-разрушения, состоявшего из одной линии с шестью фокусам с шагом 2 мм. Два фокуса слева (синие точки) были разрушены с помощью 30 имп/фокус, и четыре фокуса справа (желтые точки) – 100 имп/фокус, что привело к большему размеру разрушений. Красной стрелкой указано направление ГК-воздействия. Маркерные линии: 1 см.

также наблюдалось и при макроскопическом анализе после разреза разрушения (Рис. 3.3г). Как и ожидалось, воздействие с большей дозой в 100 имп/фокус (желтые точки на Рис. 3.3г) привело к формированию более крупных разрушений по сравнению с воздействием 30 имп/фокус (синие точки на Рис. 3.3г).

Макроскопический анализ разрушений после разреза показал, что форма полученных разрушений хорошо согласовывалась с прямоугольной формой облучаемой сетки. В 10-мс режиме все размеры разрушений превышали размер сетки на 1.5 мм, а в 1-мс режиме – на 1 мм, что согласуется с известными закономерностями для одиночных ГК-разрушений. Визуальная оценка показала полную ликвидацию ткани в целевом объеме (Рис. 3.4а,б). При этом после воздействия более длинными импульсами (10 мс) вокруг образовавшейся полости наблюдается слегка побелевшая ткань (Рис. 3.4б), чего не наблюдалось после воздействия более короткими (1 мс) импульсами (Рис. 3.4а). Такое изменение цвета ткани является известным признаком теплового разрушения, возникающего при превышении определенной тепловой дозы денатурации белка [161–163]. Поскольку в этой части работы одинаковая акустическая мощность, использованная в обоих режимах, оказалась достаточной даже при использовании коротких импульсов, то для более длинных импульсов может быть использована меньшая мощность, что позволит избежать тепловых эффектов.

Гистологическое исследование показало формирование однородных разрушений в ткани простаты в обоих режимах с оставшимися фрагментами в центре разрушения, не превышающими 50 мкм (Рис. 3.4i–ii). Область полного разрушения клеточной структуры ткани простаты была окружена переходной зоной не полностью разрушенной ткани шириной менее 200 мкм, в которой наблюдались участки интактных мышечных и коллагеновых волокон (Рис. 3.4iii), что

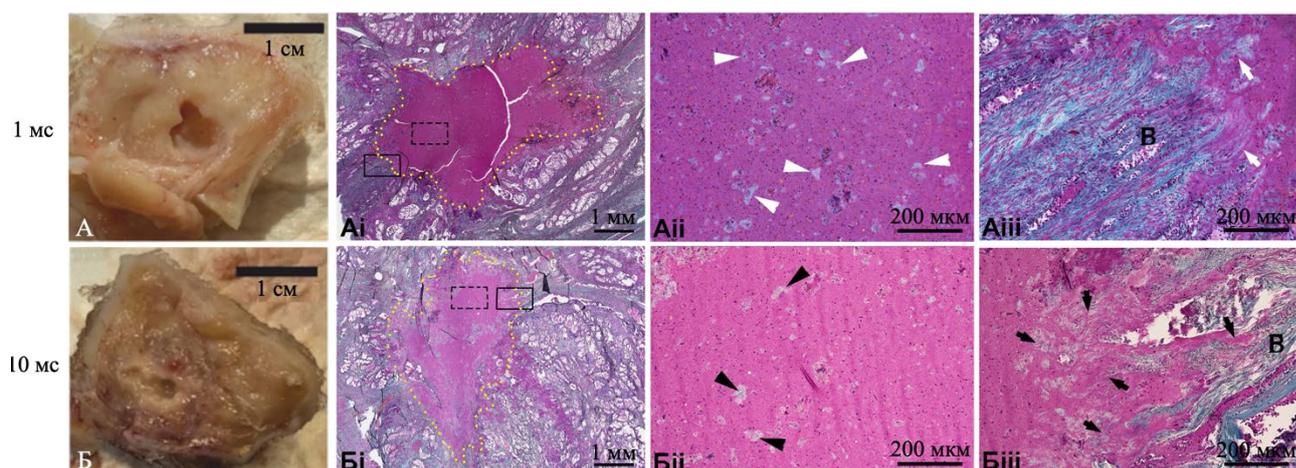


Рис. 3.4. Макроскопические фотографии (левый столбец) и гистологические снимки окрашенных по Массону срезов разрушений, полученных в ткани предстательной железы человека *ex vivo* методом гистотрипсии с кипением импульсами длительностью 1 мс (А) и 10 мс (Б). (i) Обзорные снимки ГК-разрушений, контур которых очерчен желтой пунктирной кривой. (ii) Содержимое разрушений (пунктирная черная рамка на i) под большим увеличением, иллюстрирующим однородное разрушение ткани в обоих режимах с оставшимися фрагментами <50 мкм (указаны стрелками). (iii) Область на границе разрушения (сплошная черная рамка на i) под большим увеличением, иллюстрирующим переходную область шириной <200 мкм, содержащую недоразрушенные коллагеновые и мышечные волокна (указаны стрелками) между разрушенной и здоровой тканью, содержащей интактные коллагеновые волокна («В»). Маркерные линии: (левый столбец) 1 см, (i) 1 мм, (ii–iii) 200 мкм.

согласуется с известной повышенной устойчивостью фиброзно-мышечной ткани к механическому разрушению.

Разные ГК-режимы привели к различной степени разрушения ткани простаты: после воздействия короткими (1 мс) импульсами оставшиеся фрагменты имели меньшие размеры (белые стрелки на Рис. 3.4), а переходная зона имела меньшую ширину. При этом, однако, использование более коротких импульсов потребовало большего количества импульсов на фокус (150 по сравнению с 30 имп/фокус) для достижения полной абляции ткани, но позволило двукратно увеличить скорость абляции. В частности, скорость разрушения составила $9 \pm 1.7 \text{ мм}^3/\text{мин}$ в режиме 1-мс импульсов и $4.5 \pm 0.7 \text{ мм}^3/\text{мин}$ в режиме 10-мс импульсов.

Электронная микроскопия содержимого полученных разрушений показала потерю клеточной структуры ткани простаты в обоих режимах ГК (Рис. 3.5). На ПЭМ-снимках наблюдаются разрушенные фрагменты с неразличимой клеточной структурой (Рис. 3.5а,в), однако после воздействия длинными импульсами (10 мс) наблюдались области с повышенной электронной плотностью (звездочки на Рис. 3.5в), что может свидетельствовать о некотором тепловом эффекте в разрушении [48]. На СЭМ-снимках можно видеть наслоенные остатки коллагеновых волокон, схоже с наблюдениями в Главе 2 после разрушения модели гематомы. При этом после воздействия длинными импульсами волокна коллагена оказались покрыты толстым слоем клеточных и белковых остатков (Рис. 3.5г), в то время как после коротких

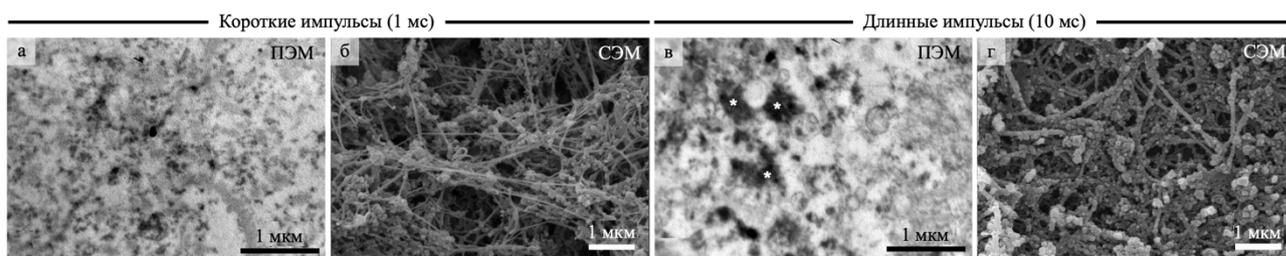


Рис. 3.5. ПЭМ- и СЭМ-снимки содержимого разрушений, полученных в ткани предстательной железы человека *ex vivo* методом гистотрипсии с кипением импульсами длительностью 1 мс (а,б) и 10 мс (в,г). Звездочками указаны области повышенной электронной плотности, что может свидетельствовать о возможных тепловых эффектах. Маркерные линии: 1 мкм.

импульсов волокна имели более тонкую и чистую фибриллярную структуру с отдельными глобулами клеточных и белковых остатков (Рис. 3.5б).

3.2.4 Выводы к параграфу §3.2

Таким образом, в настоящем параграфе была экспериментально продемонстрирована возможность механического разрушения ткани предстательной железы человека *ex vivo* миллисекундными (1 мс и 10 мс) ударноволновыми ультразвуковыми импульсами в режиме гистотрипсии с кипением на статистически значимом количестве образцов. Показано, что вызываемые разрушения визуализируемы с помощью УЗИ как в процессе воздействия, так и после его окончания. Методами гистологического анализа и электронной микроскопии подтверждена деструкция клеток простаты до фрагментов менее 50 мкм в длину с резкой демаркационной зоной между интактной и разрушенной тканью шириной менее 200 мкм. При этом использование более коротких импульсов (1 мс) позволило вдвое ускорить процесс абляции и получить разрушения с более четкой переходной зоной, меньшим размером остающихся клеточных фрагментов и минимальными проявлениями тепловых эффектов по сравнению с использованием более длинных (10 мс) импульсов.

§3.3 Разрушение опухоли простаты человека ударноволновыми ультразвуковыми импульсами

В предыдущем параграфе экспериментально была показана принципиальную возможность деструкции предстательной железы человека *ex vivo* методом гистотрипсии с кипением (ГК). Однако, как уже обсуждалось выше, новообразования в предстательной железе значительно увеличивают ее жесткость, особенно в случае злокачественных опухолей [147, 150], что может повысить устойчивость ткани простаты к ее механическому разрушению методом гистотрипсии. В связи с этим, целью этой части работы была экспериментальная демонстрация возможности разрушения раковой опухоли простаты *ex vivo* методом гистотрипсии с кипением.

3.3.1 Акустический эксперимент

Модель раковой опухоли предстательной железы человека *ex vivo*

Аутопсийная ткань предстательной железы *ex vivo* была получена спустя 19 часов после смерти анонимного пациента с прижизненным диагнозом доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) и рака простаты. Предстательная железа (Рис. 3.6а) была разрезана на две части для получения двух образцов периферической зоны простаты, в которой возникает большинство раковых опухолей предстательной железы [146]. Один образец (Рис. 3.6б) был помещен в дегазированный фосфатно-солевой буферный раствор и дополнительно дегазирован в течение 1.5 ч при остаточном давлении <0.1 бар. После дегазации образец заключался в 1.5% агарозный гель для удобства манипуляции и позиционирования (Рис. 3.6в). Другой образец служил контролем до разрушения, для чего фиксировался в формалине и подвергался подготовке к гистологическому анализу аналогично §3.2.

Экспериментальная установка и протокол облучения

Для облучения в режиме гистотрипсии с кипением образец в агарозном геле фиксировался в специальном держателе, крепился к системе позиционирования, и погружался в бассейн, наполненный дегазированной водой (Рис. 3.6в). В качестве источника фокусированного ультразвука использовался тот же 12-элементный секторный излучатель с $F\# = 0.77$ и частотой 1.5 МГц, охарактеризованный в §1.1 и использованный ранее в Главе 2 и §3.2. Воздействие осуществлялось под контролем двух УЗИ-датчиков (ATL, Philips, Bothell, WA, USA), каждый из которых управлялся отдельной ультразвуковой системой Verasonics V1. Один датчик (P7-4) был

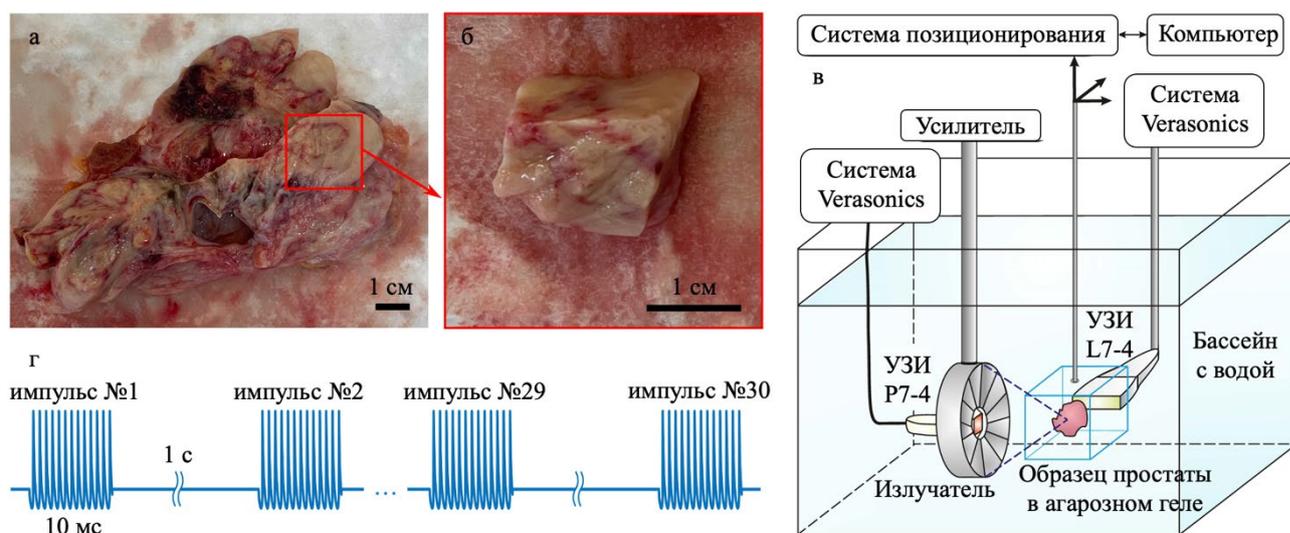


Рис. 3.6. (а–б) Фотографии (а) цельного аутопсийного образца ткани предстательной железы человека перед разрезом на части, и (б) разрезанного для ГК-облучения. (в) Схема экспериментальной установки для получения ГК-разрушения в образце простаты человека с раковой опухолью. (г) Протокол импульсно-периодического воздействия.

закреплен в центральном отверстии излучателя и имитировал предполагаемую клиническую реализацию метода ГК, а второй (L7-4) располагался сбоку от образца, позволяя более детальную визуализацию фокальной области в лабораторных условиях (Рис. 3.6в).

Объемное разрушение в образце простаты получалось путем поточечного воздействия на узлы прямоугольной сетки в плоскости, перпендикулярной оси излучателя, на глубине 10 мм в ткани. Сетка содержала 4×4 фокуса с шагом 1 мм, согласно оптимальной геометрии, подобранной в предыдущем параграфе. Таким образом, ожидаемый размер объемного разрушения составлял 4–4.5 мм в поперечном направлении и 1–1.5 мм в направлении оси излучателя. В качестве протокола воздействия был выбран стандартный режим гистотрипсии с кипением, проверенный в предыдущем параграфе: импульсы длительностью 10 мс, коэффициент заполнения 1%, 30 импульсов на каждый фокус, напряжение на излучателе 210 В (Рис. 3.6г). Численное моделирование в плоскостной среде «вода–простата», описанное в предыдущем параграфе, позволило определить амплитуды пикового положительного и отрицательного давлений, а также ударного фронта в фокусе в ткани: $p^+ / p^- / A_s = 122 / -22 / 135$ МПа, при этом предсказанное время кипения составляло 0.6 мс.

3.3.2 Гистологический анализ разрушений

Образец простаты после облучения вынимался из агарозного геля и помечался чернилами (HistoSafe, Россия) со стороны облучения для сохранения ориентации при подготовке к гистологическому анализу. Маркированный образец после разрушения и контрольный образец фиксировались в формалине в течение одной недели, разрезались на блоки толщиной 2 мм параллельно направлению облучения, погружались в парафин, иссекались на срезы толщиной 3 мкм, которые затем наносились на предметное стекло и окрашивались по Массону. Гистологические срезы образца с разрушением осуществлялись в центре разрушенного объема и на его краях. Полученные срезы оценивались сертифицированными патологоанатомами для подтверждения клинического диагноза и оценки полученного ГК-разрушения.

3.3.3 Результаты

На Рис. 3.7а представлен УЗИ-снимок полученного объемного разрушения спустя 15 минут после окончания воздействия. Гипоэхогенная область указывает на разрушение ткани в

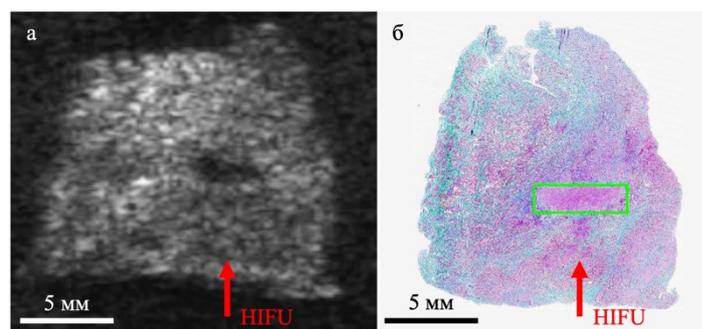


Рис. 3.7. Репрезентативные фотографии ГК-разрушения в простате человека с раковой опухолью, полученные с помощью УЗИ-датчика L7-4 (а) и гистологического анализа с окраской по Массону (б). Стрелками указано направление облучения. Прямоугольным контуром показана область воздействия.

фокальной области до жидкого состояния. На обзорном снимке гистологического среза, сделанного в центре разрушения (Рис. 3.7б), отчетливо видно полученное разрушение, размеры и форма которого согласуются с наблюдаемыми с помощью УЗИ.

При гистологическом исследовании контрольного образца сертифицированными патологоанатомами был подтвержден рак простаты, а именно была выявлена аденокарцинома предстательной железы

(Рис. 3.8) высокой степени злокачественности с оценкой по шкале Глисона $5 + 4 = 9$ [164]. Шкала Глисона представляет собой систему оценки потенциала злокачественности опухоли простаты для прогнозирования скорости ее роста и вероятности выявления метастазов: максимальный суммарный показатель равен 10 и соответствует сильно-злокачественной аденокарциноме. Аденокарцинома является самым распространенным видом онкологического заболевания предстательной железы и обычно развивается из железистого эпителия. Контрольный образец содержал крупные опухолевые гнезда, а также признаки гиперплазии и разрастания фиброно-мышечной стромы, характерные для ДГПЖ.

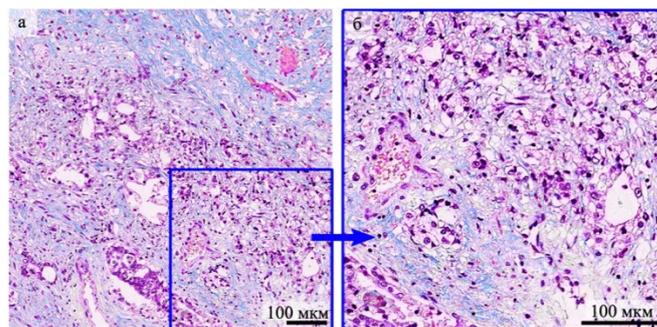


Рис. 3.8. Репрезентативные гистологические снимки контрольного образца, окрашенного по Массону, с аденокарциномой простаты высокой степени злокачественности, идентифицированной сертифицированным патологоанатомом. Маркерные линии: 100 мкм.

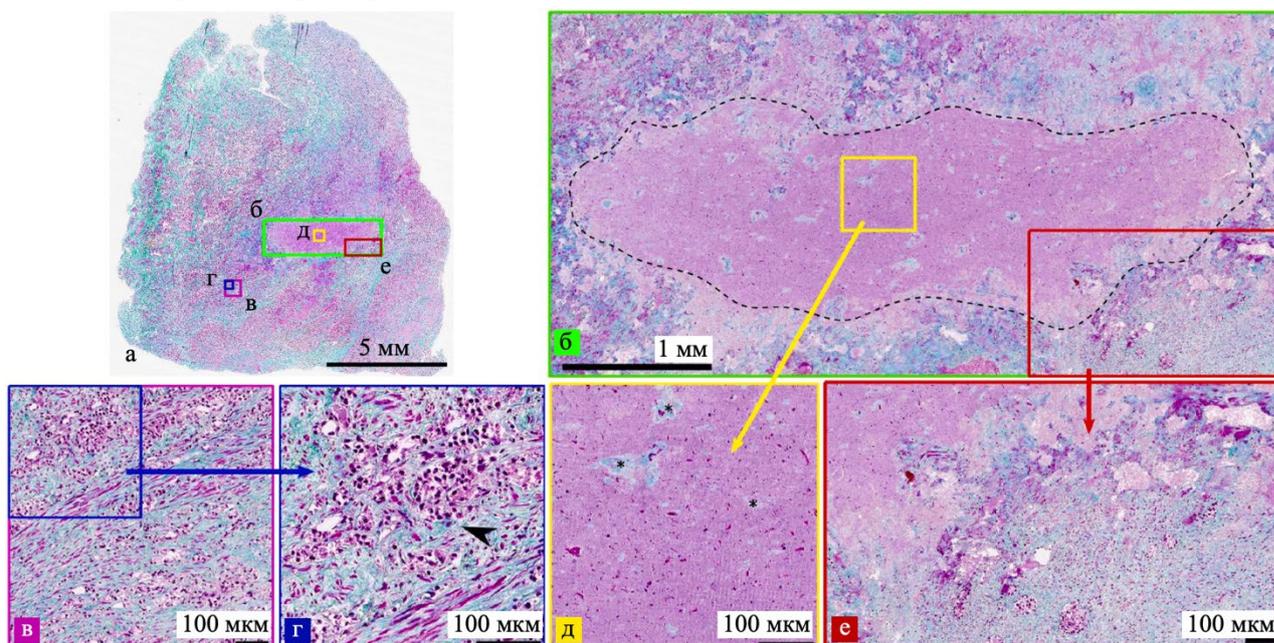


Рис. 3.9. Гистологические снимки окрашенного по Массону среза предстательной железы человека, содержащей аденокарциному, сделанного в центре ГК-разрушения (10-мс импульсы, 4×4 фокуса с шагом 1 мм, 30 имп/фокус). (а) Обзорный снимок образца простаты. (б) Область разрушения с контуром разрушения, выделенным желтым пунктиром. (в-г) Раковая ткань вне области воздействия (указана черной стрелкой). (д) Содержимое разрушения с интактными фрагментами волокон коллагена (указаны звездочками). (е) Переходная зона между разрушенной и интактной тканью.

В гистологическом срезе, сделанном в центре ГК-разрушения, видно полное поперечное сечение разрушения (Рис. 3.9а,б) и интактную раковую ткань рядом с зоной воздействия (Рис. 3.9в,г), что подтвердило наличие опухоли внутри разрушенного объема. Измеренные размеры разрушения составили приблизительно 1.5 мм и 4.5 мм, соответственно, вдоль и поперек оси излучателя, что согласуется с ожидаемыми результатами. Содержимое разрушения под большим увеличением выглядело однородно, без признаков клеточной структуры с отдельно встречающимися интактными фрагментами ядер и коллагеновых волокон (Рис. 3.8д). Переходная зона между полностью разрушенной и интактной тканью содержала фрагменты интактных коллагеновых и мышечных волокон размером 50–200 мкм, аналогично результатам из предыдущего параграфа, и имела ширину от 200 до 500 мкм (Рис. 3.9е).

На срезе, взятом на краю разрушения (Рис. 3.10), клетки опухоли вплотную прилегают к области разрушения, что отчетливо демонстрирует разрушение аденокарциномы методом гистотрипсии с кипением.

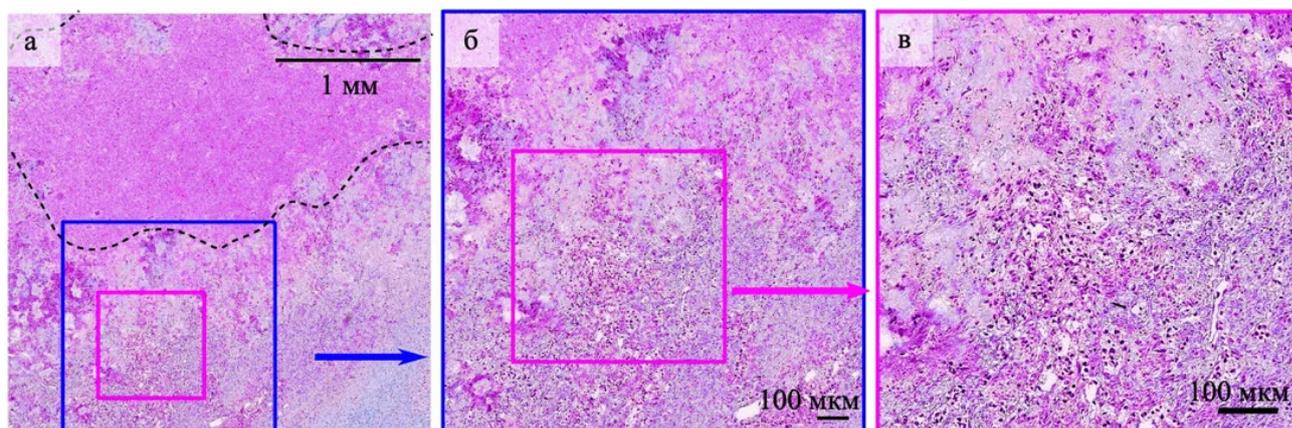


Рис. 3.10. Гистологические снимки окрашенного по Массону среза предстательной железы человека, содержащей аденокарциному, сделанного на краю ГК-разрушения (10-мс импульсы, 4 x 4 фокуса с шагом 1 мм, 30 имп/фокус), при разных увеличениях.

3.3.4 Выводы к параграфу §3.3

Таким образом, в настоящем параграфе была впервые экспериментально продемонстрирована и гистологически подтверждена возможность неинвазивного механического разрушения ткани опухоли предстательной железы человека *ex vivo* с помощью коротких (10 мс) ударно-волновых ультразвуковых импульсов методом гистотрипсии с кипением. Разрушение визуализировалось с помощью УЗИ и гистологически, имело ожидаемые размеры, и успешно привело к потере клеточной структуры как доброкачественной, так и злокачественной ткани предстательной железы.

§3.4 Выводы к третьей главе

В настоящей главе в качестве примера биологической ткани с большой жесткостью рассматривалась ткань предстательной железы человека и изучались закономерности ее механического разрушения ударноволновыми ультразвуковыми импульсами. Методом эластографии сдвиговой волной было показано, что аутопсийные образцы простаты человека, используемые для экспериментов в лабораторных условиях, могут служить адекватной моделью живой ткани простаты человека и рассматриваться в качестве модели жесткой биологической ткани для разрушения мощным фокусированным ультразвуком. Экспериментально продемонстрирована возможность неинвазивной деструкции ткани предстательной железы и раковой ткани в ней. Показано, что необходимая доза (т.е. количество импульсов на фокус при их фиксированной длительности) для механического разрушения жесткой ткани простаты в 4 раза превышает необходимую для мягкой модели гематомы. Методами гистологического анализа, а также просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии была показана возможность двукратного ускорения процесса абляции ткани простаты путем использования более коротких импульсов (1 мс) при условии достижения достаточной амплитуды ударного фронта в фокусе.

Глава 4

РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ДОЗЫ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

В данной главе используются материалы, опубликованные в работах [A10, A14–A15, A17].

Как уже обсуждалось ранее, на сегодняшний день известно, что разрушения, получаемые методом гистотрипсии с кипением (ГК) в биологических тканях, определяются как параметрами, вызывающими это разрушение (частота и амплитуда ультразвуковой волны, длительность и количество используемых импульсов и т.д.), так и свойствами самой разрушаемой ткани (в первую очередь, ее жесткостью) [32, 42, 43, 47–53]. А именно, в более жестких тканях (зачастую из-за высокого содержания коллагена) разрушения имеют меньший размер, что особенно важно при объемной ГК-абляции, когда фокус ультразвукового излучателя перемещается по некоторому целевому объему с определенным пространственным шагом или скоростью, которую необходимо оптимизировать таким образом, чтобы обеспечить слияние отдельных фокусов-разрушений и при этом максимизировать скорость абляции [75, 165]. Таким образом, для планирования ГК-воздействия в конкретном типе ткани актуальным является определение количественного показателя осуществленного воздействия – механической дозы ГК. Похожая концепция тепловой дозы основана на эффектах денатурации белка и успешно применяется в тепловых приложениях HIFU для планирования необходимого воздействия [62]. В работе [102] в качестве метрики ГК-дозы было предложено использовать количество импульсов, подаваемых в каждую точку-фокус вне зависимости от длительности импульсов при условии, что в течение каждого импульса инициируется кипение биоткани. В этих исследованиях действительно продемонстрирована одинаковая степень разрушения ткани внутри целевого объема свиных почек *in vivo* при одной и той же дозе (т.е. количестве импульсов на фокус), однако во всех случаях разрушение было неполноценным из-за слишком низкой выбранной дозы (5 имп/фокус).

В связи с этим, эта часть диссертационной работы была посвящена развитию концепции механической дозы путем количественного анализа взаимосвязи между параметрами объемной ГК-абляции и размером и степенью получаемых разрушений. В качестве концепции механической дозы здесь предлагается рассмотреть произведение таких параметров, как длительность импульсов и их количество на каждый фокус при условии инициации кипения ткани внутри каждого импульса, которое характеризует общую длительность облучения. Исследования проводились на двух типах тканей, отличающихся по составу и жесткости: ткань говяжьего миокарда (жесткая, но однородная, клеточная ткань) и ткань свиной печени (мягкая, но содержащая множественные коллагеновые структуры разного размера).

§4.1. Оптимизация траектории фокуса в поперечной плоскости

Прежде чем перейти к исследованиям, посвященным развитию концепции ГК-дозы, в этом параграфе проводится серия предварительных экспериментов, оптимизирующих траекторию движения фокуса внутри целевого объема при объемной ГК-абляции мягких биологических тканей. Как было показано в §2.3, для эффективной генерации объемных разрушений методом гистотрипсии рекомендуется осуществлять движение фокуса внутри целевого объема по направлению от более глубоких слоев в сторону излучателя с минимальным пересечением воздействующего акустического пучка и образующихся облаков кипения. В связи с этим, для еще большей минимизации экранирования участка воздействия генерируемыми пузырями кипения подходящей методикой облучения объема может считаться воздействие на отдельные слои-плоскости, перпендикулярные оси излучателя, начиная с наиболее глубокого слоя. Наиболее простым способом облучения такой плоскости является поточечное воздействие на узлы некоторой двумерной сетки в облучаемой плоскости. Однако, траектория движения фокуса вдоль узлов такой сетки может также оказывать влияния на результат воздействия. В частности, например, разнесение во времени импульсов, излучаемых в одну или соседние точки облучаемой сетки, может уменьшить накопление тепловых эффектов, нежелательных при использовании метода гистотрипсии, по сравнению с последовательным излучением всех планируемых импульсов в одну точку. Кроме того, частичное начальное разрушение разнесенных в пространстве точек предположительно может снизить общую прочность целевого объема ткани и тем самым уменьшить необходимое для достижения ликвидации количество импульсов на точку и ускорить процесс воздействия. С другой стороны, такое разнесение импульсов в пространстве и времени может, наоборот, снизить эффективность гистотрипсии, поскольку одного изолированного импульса на облучаемую точку может оказаться недостаточно для заметного повреждения ткани в области облучаемого узла сетки.

В связи с этим, целью этой части работы являлось изучение зависимости эффективности объемного разрушения в режиме гистотрипсии от выбора траектории движения фокуса акустического пучка внутри целевого объема ткани с разной степенью влияния последовательных импульсов друг на друга.

Методы

В качестве модели биоткани в этой части работы использовались образцы ткани говяжьего миокарда *ex vivo*, хранившиеся в холодильнике менее двух суток до начала процесса подготовки к облучению. Каждый образец перед облучением дегазировался в течение 1 часа, заключался в гель из агарозы и с помощью трехмерной системы позиционирования погружался в бассейн с деионизированной дегазированной водой (Рис. 4.1а).

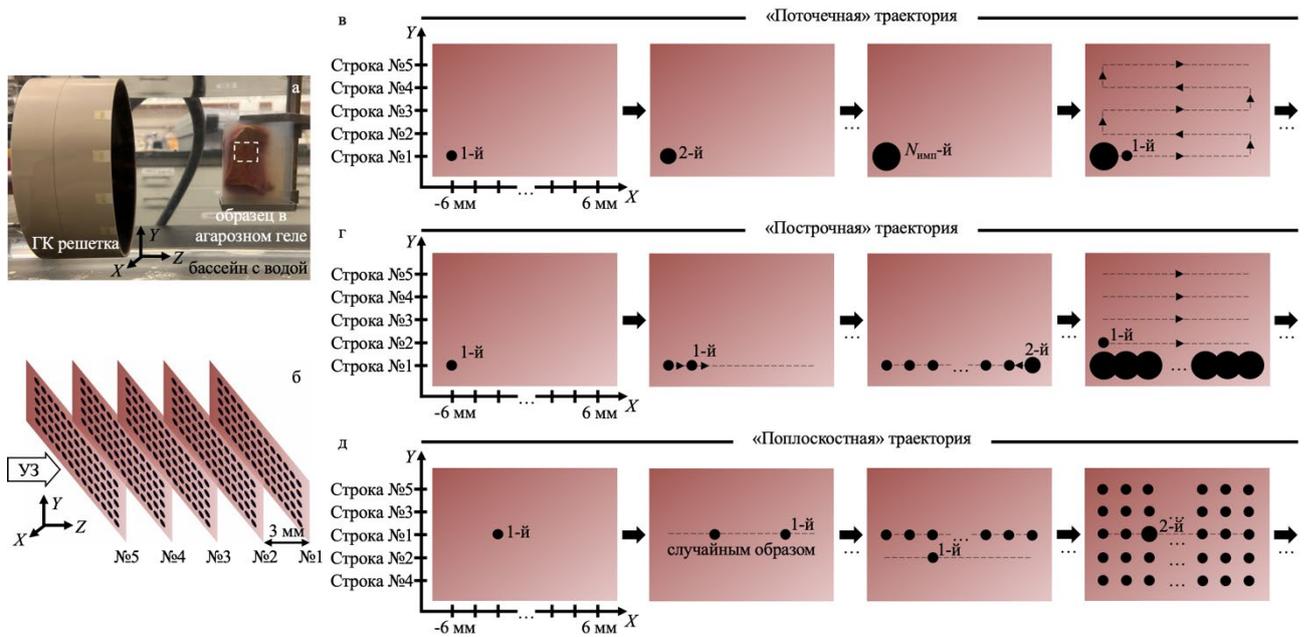


Рис. 4.1. (а) Фотография эксперимента по получению объемных ГК-разрушений в образцах говяжьего сердца *ex vivo*; белым пунктиром схематично указан разрушаемый объем, облучаемый по схеме (б). (б) Схема поточечного облучения объема, выделенного белым пунктиром в (а); номера внизу указывают порядок облучения плоскостей. Каждая плоскость облучалась ультразвуковым пучком, направленным слева направо, по одной из траекторий (в–д). (в–д) Пошаговая схема трех исследуемых траекторий облучения каждой плоскости: номер доставляемого в точку импульса обозначен как «1-й», «2-й» и т.д.

Разрушение целевого объема образцов ткани осуществлялось с помощью 256-элементной спиральной фазированной решетки, описанной в §1.1, работающей на частоте 1.5 МГц и контролируемой системой Verasonics V1 (Рис. 4.1а). Процесс воздействия контролировался с помощью УЗИ-пробы ЗРЕ Numanscan, расположенной в центральном отверстии фазированной решетки.

В каждом образце объем ткани разрушался поточно путем электронного перемещения фокуса ультразвуковой решетки между узлами трехмерной сетки 4 мм x 12 мм x 12 мм (Рис. 4.1б). Каждый узел облучался $N_{\text{имп}} = 3\text{--}10$ импульсами длительностью 10 мс, соответствующими режиму гистотрипсии с кипением (ГК), с коэффициентом заполнения 1% и амплитудой ударного фронта, достаточной для генерации кипения *in situ* в течение не более 50% от длительности импульса. Необходимая для этого акустическая мощность решетки подбиралась экспериментально по появлению сигнала пассивного детектора кавитации. Параметры в итоге создаваемого акустического поля в ткани миокарда были оценены путем комбинации численного моделирования, описанного для этой решетки в §1.1, и процедуры нелинейного дирейтинга [39, 166]. Метод нелинейного дирейтинга позволяет оценить напряжение ($V_{\text{вода}}$), подаваемое на излучатель, при котором создаваемое им нелинейное ультразвуковое поле в воде будет совпадать с полем, создаваемым при экспериментальном напряжении ($V_{\text{ткань}}$) на известной глубине d в биоткани с известным коэффициентом поглощения α :

$$V_{\text{вода}} = V_{\text{ткань}} \cdot e^{-\alpha d} \quad (4.1)$$

где в настоящей работе $d = 12$ мм – средняя глубина фокуса в ткани миокарда, $\alpha = 0.094$ Нп/см на частоте 1.5 МГц [145]. Оцененные таким образом параметры ударной волны в фокусе на средней глубине в ткани миокарда, а также время до начала кипения, рассчитанное по формуле (2.3), составляли, соответственно: $p^+/p^-/A_s = 109/15/99$ МПа и $t_{\text{кип}} = 1.9$ мс. Акустические параметры для оценки времени кипения были взяты из литературы [145]: $c_v = 3.94$ МДж/м³·К, $\rho = 1060$ кг/м³, $c = 1570$ м/с, $\beta = 4.1$. Оценка времени кипения подтвердила инициацию кипения в течение каждого 10-мс импульса, что также наблюдалось экспериментально по сигналу пассивного детектора кавитации.

Облучение проводилось в пяти плоскостях, перпендикулярных оси излучателя, начиная с дальней, с шагом 3 мм (Рис. 4.1б). При этом в каждой плоскости фокус перемещался по сетке из 13 x 5 фокусов с шагом 1 мм по одной из трех следующих траекторий. В первой траектории, в каждый узел доставлялось полное количество импульсов $N_{\text{имп}}$, затем фокус перемещался к соседнему узлу, заполняя каждую плоскость по траектории прямоугольного меандра (Рис. 4.1в). Такая траектория была названа «*точечной*», поскольку полное число импульсов $N_{\text{имп}}$ излучалось подряд в каждую точку перед облучением следующей точки. Во второй траектории, для уменьшения влияния каждого импульса на последующий, после доставки одного импульса в какой-то из узлов, фокус перемещался к соседнему узлу, в итоге повторяя $N_{\text{имп}}$ раз каждую строку из 13 фокусов, а затем переходя к следующей строке (Рис. 4.1г). Такая траектория была названа «*построчной*», поскольку полное число импульсов $N_{\text{имп}}$ излучалось в каждую строку перед облучением следующей. В третьей траектории, для еще большего ослабления влияния импульсов друг на друга, узлы в каждой из строк облучались одним импульсом случайным образом, затем фокус перемещался к следующей строке, начиная от центральной и далее в сторону удаления от оси излучателя, затем вся траектория на плоскости повторялась $N_{\text{имп}}$ раз (Рис. 4.1д). Такая траектория была названа «*неплоскостной*», поскольку все $N_{\text{имп}}$ импульсов доставлялись в каждую плоскость перед облучением следующей плоскости. Полученные разрушения анализировались по УЗИ-снимкам, сделанным спустя 10 минут после окончания воздействия, а также по фотографиям разрушений после их разреза вдоль плоскости УЗИ-визуализации.

Результаты

Все объемные разрушения после разреза вдоль оси излучателя вне зависимости от траектории и количества импульсов на точку были заполнены однородной непрозрачной разжиженной биотканью, легко удаляемой путем промывания физиологическим раствором. Заполнение образовавшейся полости разрушения физиологическим раствором позволило выявить оставшиеся тканевые структуры в объеме разрушения (Рис. 4.2). На Рис. 4.2 (первый

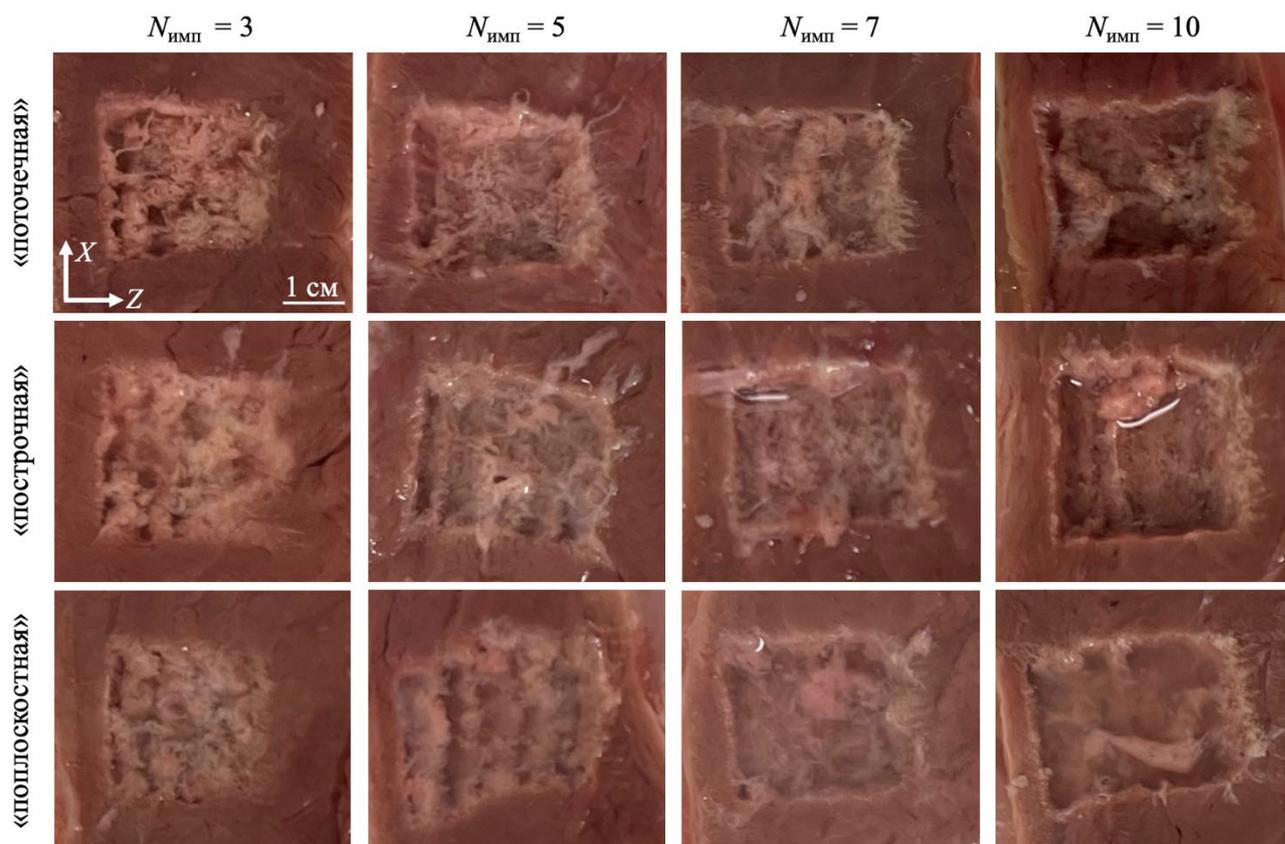


Рис. 4.2. Фотографии объемных ГК-разрушений в ткани говяжьего миокарда *ex vivo* после разреза вдоль оси излучателя при облучении объема по «поточечной» (верхний ряд), «построчной» (средний ряд) и «поплоскостной» (нижний ряд) траекториям, используя режимы облучения с $N_{\text{имп}} = 3$ (первый столбец), $N_{\text{имп}} = 5$ (второй столбец), $N_{\text{имп}} = 7$ (третий столбец), $N_{\text{имп}} = 10$ (четвертый столбец) импульсами на каждую облучаемую точку. ГК воздействие осуществлялось слева направо. Маркерная линия – 1 см.

столбец) видно, что при наименьшем количестве импульсов на узел ($N_{\text{имп}} = 3$), разнесение импульсов во времени (т.е. облучение по «построчной» и «поплоскостной» траекториям) привело к отсутствию разрушения первой облучаемой плоскости (дальней от излучателя) в отличие от доставки сразу всех импульсов в каждую точку (т.е. при «поточечной» траектории).

При этом использование режима с $N_{\text{имп}} = 3$ импульсами на облучаемую точку оказалось недостаточно для генерации однородного объемного разрушения для всех трех траекторий. При увеличении количества импульсов на точку ($N_{\text{имп}} = 5; 7; 10$) степень ликвидации при всех траекториях увеличивалась, дальняя от излучателя плоскость полноценно разрушалась, и

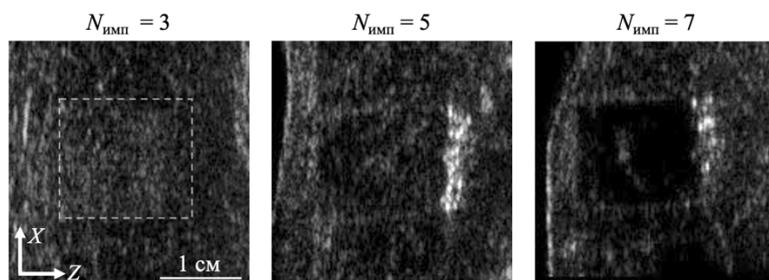


Рис. 4.3. УЗИ-фотографии ГК-разрушений в ткани говяжьего миокарда *ex vivo* спустя 10 минут после окончания облучения с варьируемым количеством импульсов на точку $N_{\text{имп}}$ при фиксированной траектории движения фокуса. Маркерная линия – 1 см.

различие между траекториями пропадало (Рис. 4.2, столбцы 2–4). Оставшиеся крупные тканевые структуры, однако, встречались после воздействия по любой из трех рассмотренных траекторий. Результаты макроскопического анализа после разреза разрушений согласуются с данными УЗИ-визуализации разрушений. На Рис. 4.3 видно, что $N_{\text{имп}} = 3$ импульса на точку оказалось недостаточно для генерации объемного разрушения, поскольку разрушаемый объем не потерял экзогенность после окончания воздействия, однако увеличение количества $N_{\text{имп}}$ импульсов на точку действительно приводит к значительному снижению экзогенности, а значит, и увеличению степени ликвификации биоткани.

Выводы

В настоящем параграфе были проведены экспериментальные исследования зависимости эффективности разрушения биоткани методом гистотрипсии с кипением от траектории движения фокуса ультразвукового пучка с различной степенью влияния последовательных ГК-импульсов друг на друга. Показано, что при генерации объемного разрушения, состоящего из нескольких слоев, перпендикулярных оси излучателя, при использовании недостаточного количества импульсов, посылаемых в каждое положение фокуса, разнесение импульсов во времени приводит к неполному разрушению первого облучаемого слоя (дальнего от излучателя). При достаточном количестве импульсов на точку ($N_{\text{имп}} > 5$ при использовании 10-мс ГК-импульсов), разнесение последовательных импульсов во времени не влияет на эффективность разрушения и, следовательно, может быть использовано для минимизации возможного накопления тепла, локализованного вокруг единичных фокусов при объемной ликвификации биотканей методом гистотрипсии с кипением. Именно такая траектория с разнесением последовательных импульсов во времени и будет использована далее в настоящей главе.

§4.2 Акустический эксперимент по развитию концепции механической дозы

Модели биотканей разного типа

ГК-разрушения реализовывались в образцах двух типов тканей *ex vivo* – свиной печени и говяжьим миокарде, которые хранились в холодильнике менее двух суток до момента облучения. Перед ГК-воздействием все образцы дегазировались в течение 1 часа и заключались в акустически прозрачный агарозный гель (5 см x 5 см x 8 см) для удобного манипулирования образцами с помощью трехмерной системы позиционирования (Рис. 4.4а). Образцы печени заключались в гель таким образом, чтобы воздействие производилось через капсулу печени, имитируя клиническую ситуацию.

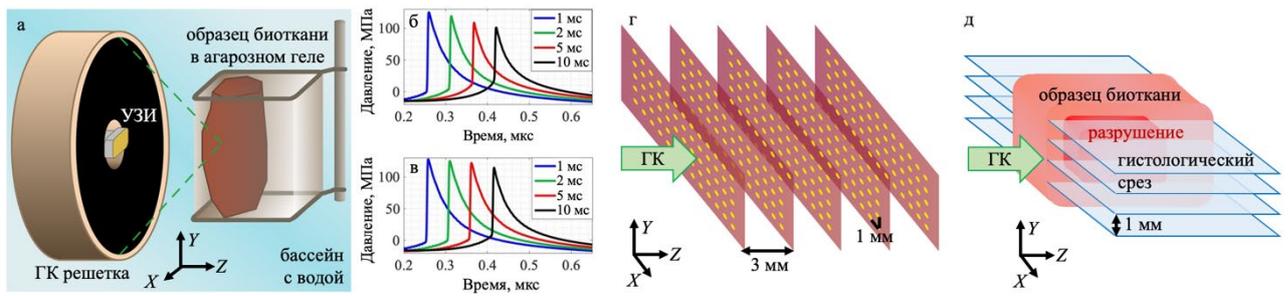


Рис. 4.4. (а) Схема реализации ГК-разрушений *ex vivo*. (б–в) Формы ударной волны в фокусе на средней глубине (12 мм) в свиной печени (б) и говяжьем миокарде (в) при среднем рабочем напряжении: для импульсов длительностью 1 мс (синяя кривая), 2 мс (зеленая кривая), 5 мс (красная кривая), 10 мс (черная кривая). (г) Геометрия поточечного облучения целевого объема для получения объемного разрушения. (д) Иллюстрация иссечения ГК-разрушения на гистологические срезы для 3D-реконструкции полного объема разрушения. ГК-воздействие на (а, г, д) производилось слева направо.

Генерация ГК-разрушений

Облучение образцов проводилось в бассейне с деионизированной дегазированной водой с помощью 256-элементной спиральной решетки, подробно охарактеризованной в §1.3, работающей на частоте 1.5 МГц и управляемой системой Verasonics V1 (Рис. 4.4а). Облучение велось под УЗИ-контролем с помощью пробы ЗРЕ Humanscan (Gyeonggi-do, Южная Корея), коаксиально закрепленной в центральном отверстии решетки (Рис. 4.4а). Варьировались следующие параметры ГК-воздействия (Табл. 4.1): длительность импульсов (в диапазоне 1 – 10 мс) и число импульсов на точку – $N_{\text{имп}}$ (в диапазоне 5–15). Коэффициент заполнения поддерживался равным 1%, поэтому частота повторения импульсов регулировалась в диапазоне 1–10 Гц в соответствии с длительностью используемых импульсов. Перед облучением, в каждом образце определялось пороговое напряжение на излучателе, необходимое для генерации кипения внутри планируемого импульса. Для этого использовались одиночные импульсы соответствующей длительности при возрастающем напряжении до момента образования яркого пятна на УЗИ, указывающего на вскипание ткани в фокальной области акустического пучка. Облучение затем проводилось при напряжении на 10% выше порогового.

Волновые профили в фокусе в ткани при каждом облучении (Рис. 4.4б–в) были получены из численного моделирования в воде, проведенного в §1.3, и процедуры нелинейного дирейтинга, описанной в предыдущем параграфе. Необходимые для дирейтинга значения коэффициента поглощения тканей на частоте 1.5 МГц были взяты из литературы [85, 102]: $\alpha = 0.052$ Нп/см в ткани свиной печени и $\alpha = 0.094$ Нп/см в ткани говяжьего миокарда. Амплитуды полученных ударных волн в ткани представлены в Табл. 4.1. Амплитуда разрыва использовалась для оценки времени достижения кипения ($t_{\text{кип}}$) по формуле (2.3), чтобы убедиться в достижении тканью температуры кипения в течение каждого из импульсов (Табл. 4.1). Акустические свойства тканей, необходимые для оценки времени кипения, были взяты из литературы [42, 85, 167, 168]:

Ткань	$t_{\text{имп}}$, мс	Частота повторения, Гц	$N_{\text{имп}}$	W , Вт	$p^+ / p^- / A_s$, МПа	$t_{\text{кип}}$, мс
Свиная печень	1	10	5	457	125.1 / -17.7 / 125.7	0.86
			10			
			15			
	2	5	5	368	119.1 / -16.6 / 115.6	1.1
			10			
			15			
	5	2	5	284	108.7 / -15.2 / 98.6	1.78
			10			
			15			
	10	1	5	251	101.2 / -14.5 / 87.1	2.58
			10			
			15			
Говяжий миокард	1	10	10	508	127.7 / -18.3 / 130.5	0.85
			15			
	2	5	5	457	125.1 / -17.7 / 125.7	0.95
			10			
	5	2	5	410	121.9 / -17.1 / 120.7	1.07
			10			
	10	1	5	323	114.4 / -15.9 / 107.9	1.5
			10			

Табл. 4.1. Протоколы воздействия для генерации объемных ГК-разрушений: $t_{\text{имп}}$ – длительность импульсов, $N_{\text{имп}}$ – количество импульсов на точку, W – акустическая мощность, p^+ (p^-) – пиковое положительное (отрицательное) давление на средней глубине фокуса в ткани (12 мм), A_s – амплитуда ударного фронта на средней глубине фокуса в ткани (12 мм), $t_{\text{кип}}$ – время до начала кипения в ткани.

плотность свиной печени $\rho = 1070 \text{ кг/м}^3$, скорость звука в ней $c = 1588 \text{ м/с}$, коэффициент нелинейности $\beta = 4.5$, теплоемкость единицы объема $c_v = 3.66 \text{ МДж/(м}^3 \cdot \text{К)}$; и для ткани говяжьего миокарда, соответственно, $\rho = 1060 \text{ кг/м}^3$, $c = 1570 \text{ м/с}$, $\beta = 4.1$, $c_v = 3.94 \text{ МДж/(м}^3 \cdot \text{К)}$.

Каждый протокол воздействия был реализован в $N = 2-4$ образцах. Объемные ГК-разрушения генерировались путем поточечного облучения пяти плоскостей, перпендикулярных оси излучателя, начиная с плоскости, дальней от излучателя (Рис. 4.1г). В каждой плоскости воздействие производилось в узлы двумерной сетки по «поплоскостной» траектории из предыдущего параграфа: 13×5 фокусов в каждой плоскости с шагом 1 мм облучались по $N_{\text{имп}}$ импульсов со случайной последовательностью точек в каждой линии из 13 точек, начиная с центральной и затем чередуя стороны и удаляясь от оси излучателя. Фокус решетки смещался вдоль облучаемой пространственной сетки электронным образом. Общее время облучения полной сетки ($12 \times 4 \times 12 \text{ мм}$, объем 0.576 мл) составило 2.7–81 мин в зависимости от протокола воздействия.

Полученные ГК-разрушения визуализировались и измерялись через 30 минут после окончания воздействия с помощью линейного датчика L14-5 (Sonix RP, Ultrasonix Medical Corporation, Канада) внутри бассейна с водой до каких-либо манипуляций с образцом (Рис. 4.5б,в). Объем каждого полученного разрушения зависел от протокола воздействия и типа ткани и оценивался либо по УЗИ-снимкам как произведение трех измеренных размеров

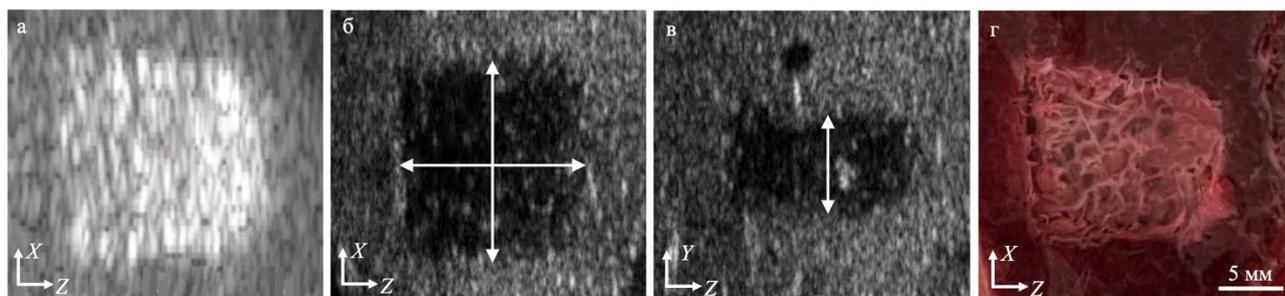


Рис. 4.5. (а–в) УЗИ-снимки объемных разрушений в ткани печени: (а) сразу после воздействия с помощью датчика, закрепленного в центре HIFU-решетки, (б–в) спустя 30 минут после окончания воздействия с помощью отдельного датчика L14-5. На (б–в) показан пример измерения размеров вдоль осей X и Z (б) и вдоль оси Y (в). (г) Макроскопический снимок объемного разрушения в ткани печени после разреза вдоль плоскости визуализации и заполнения его физиологическим раствором. Маркерная линии: 5 мм.

(Рис. 4.5б–в), либо по результатам гистологического анализа, описанного в следующем параграфе. По одному разрушению на каждый протокол использовалось для гистологического анализа, а оставшиеся 1–3 разрушения на каждый протокол были разрезаны вдоль плоскости визуализации, промыты физиологическим раствором и проанализированы макроскопически (Рис. 4.5г).

§4.3 Количественный гистологический анализ разрушений

Результат ГК-воздействия для всех протоколов и типов тканей оценивался на основе трех показателей: объемной скорости абляции, доли недоразрушенной ткани внутри объема разрушения и доли недоразрушенной коллагеновой ткани. Эти показатели оценивались на основе количественного гистологического анализа.

Для каждого протокола ГК-воздействия одно из разрушений фиксировалось в формалине, заключалось в парафин, иссекалось на гистологические срезы толщиной 5 мкм через весь объем разрушения с шагом 1 мм (Рис. 4.4д) и окрашивалось по Массону. Как уже говорилось в §3.2, окраска по Массону выделяет соединительную ткань ярко-синим цветом, ядра клеток – багрово-красным, а цитоплазму клеток – розовым. Окрашенные срезы оцифровывались при увеличении 4X на цифровом сканере LEICA SCN400 и анализировались количественно с точки зрения трех показателей эффективности ГК в зависимости от дозы воздействия.

Для ускорения процесса количественного гистологического анализа был разработан подход компьютерного зрения с использованием нейронной сети ResNet-18, обученной на сегментированных вручную гистологических срезах. Методы компьютерного зрения уже были успешно разработаны другими авторами для похожих целей, таких как классификация различных типов тканей [169], количественная оценка некроза тканей [170], выявление тепловых HIFU-разрушений [171], рака [172, 173], фиброза [174] и др. Однако механически разрушенная ткань значительно отличается по структуре от ткани, подвергшейся естественному или

тепловому некрозу, и потому требует специальной разработки нейросетевого подхода для быстрой и точной автоматизированной сегментации разрушений в режиме гистотрипсии.

Анализ разрушений в ткани свиной печени

Этапы количественного анализа объемных ГК-разрушений в ткани печени проиллюстрированы на Рис. 4.6 на примере репрезентативного гистологического среза, взятого из центра одного из разрушений. Сначала для каждого типа ткани оцифрованные срезы разрушений с наибольшей (10 мс, $N_{\text{имп}} = 10$) и наименьшей (1 мс, $N_{\text{имп}} = 5$) дозой воздействия подвергались ручной сегментации с помощью инструмента с открытым исходным кодом для разметки цифровых изображений CVAT (app.cvat.ai) на три класса: полностью разрушенная ткань (красные области на Рис. 4.6б), интактная (недоразрушенная) ткань внутри разрушения (зеленые области на Рис. 4.6б) и фон или интактная ткань вне разрушения (черные области на Рис. 4.6б). Затем четыре отсегментированных изображения разбивались на мелкие квадратные фрагменты по 40×40 мкм (16×16 пикселей). Каждый фрагмент классифицировался либо как класс «1» (полностью разрушенная ткань – красный), класс «2» (недоразрушенная ткань внутри

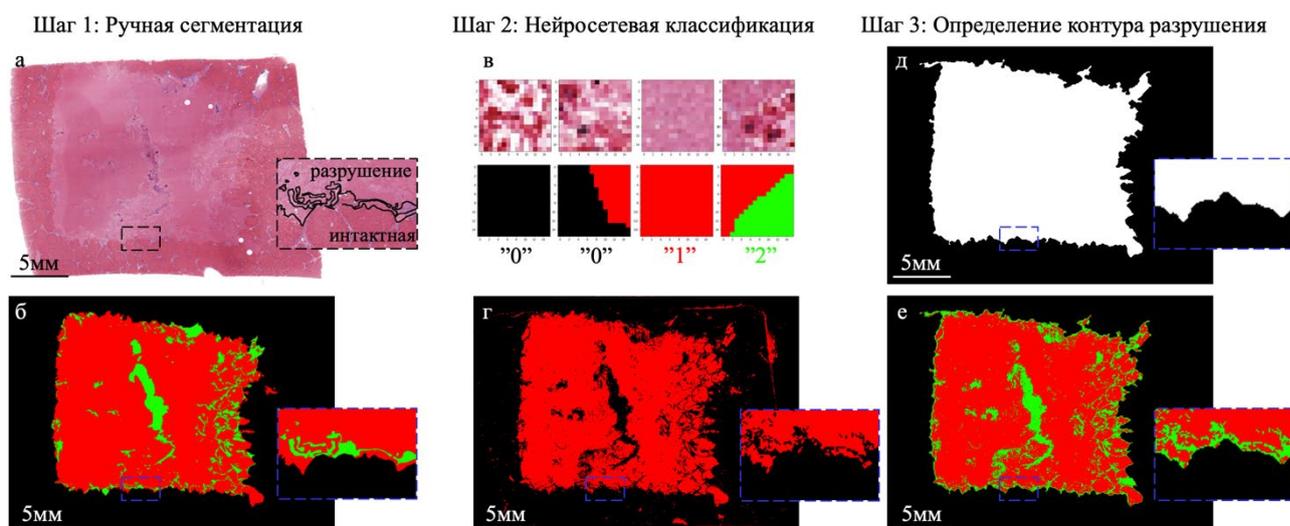


Рис. 4.6. Иллюстрация этапов количественного гистологического анализа объемных ГК-разрушений в ткани печени свиньи (ГК-воздействие осуществлялось слева). (а) Окрашенный по Массону гистологический срез из центра объемного разрушения. Пунктирной рамкой показана увеличенная область на границе разрушения, где черной кривой отмечен контур разрушения, выделенный при ручной сегментации. (б) Результирующая маска ручной трехклассовой сегментации: красные области – полностью разрушенная ткань, зеленые – интактная или недоразрушенная ткань внутри разрушения, черные – фон и интактная ткань вне разрушения. (в) Пример фрагментов датасета размером 40×40 мкм с присвоенными номерами классов: «0» – фон и интактная ткань вне разрушения, «1» – полностью разрушенная ткань; «2» – недоразрушенная ткань внутри разрушения. (г) Результирующая маска полностью разрушенной ткани после нейросетевой классификации до постобработки. (д) Результирующая маска всего разрушения (включая полностью разрушенную и недоразрушенную ткань) после постобработки. (е) Окончательная трехклассовая маска после постобработки, для сравнения с (б). В пунктирных рамках на (а–б, г–е) представлена одна и та же область на границе разрушения под большим увеличением. Маркерные линии на (а–б, г–е): 5 мм.

разрушения – зеленый), либо как класс «0» (фон или интактная ткань вне разрушения – черный), если площадь соответствующего цвета при ручной сегментации превышала 55% площади фрагмента (Рис. 4.6в). Оставшиеся неклассифицированные фрагменты не включались в рассмотрение. Датасет для обучения нейронной сети был составлен из 100000 фрагментов класса «0», 100000 фрагментов класса «1» и 34000 фрагментов класса «2». Полученный датасет разбивался на тренировочную и валидационную выборку случайным образом в отношении 80% : 20% от общего размера датасета. На полученном наборе данных обучалась нейронная сеть (НС) ResNet-18, и итоговая максимальная точность классификации (accuracy) достигла 97% (определяемая как отношение правильно размеченных фрагментов датасета к общему числу фрагментов). Выполнение кода, написанного на языке Python, и обучение нейросети осуществлялись на центральном процессоре (CPU) стационарного компьютера в программе Jupyter Notebook. Финальные параметры обучения были следующими: размер пакета (batch size) 20000 фрагментов, скорость обучения (learning rate) 0.002, число эпох 120. Использовался оптимизатор Adam, в качестве функции потерь была выбрана CrossEntropyLoss. Поскольку интактная ткань (зеленая на Рис. 4.6б) внутри разрушения была неотличима от интактной ткани вне разрушения (черная на Рис. 4.6б), классы «0» и «2» были объединены. Поэтому полученные маски НС (Рис. 4.6г) были двухцветными: красным цветом выделялась полностью разрушенная ткань, а черным – все остальное. При этом, чтобы исключить ошибочное выделение нейросетью межклеточного пространства как разрушенной ткани, изолированные единичные красные фрагменты автоматически удалялись из итоговых НС-масок. Некоторые дефекты гистологических срезов, такие как порезы и складки, пузырьки воздуха или дефекты окрашивания, корректировались в НС-масках вручную.

Полученные НС-маски (Рис. 4.6г) были подвержены постобработке с использованием библиотек компьютерного зрения MATLAB и Python для определения непрерывного внешнего контура разрушения, внутрь которого входила как полностью разрушенная ткань (красная), так и недоразрушенная ткань внутри разрушения (зеленая) (Рис. 4.6д). Для этого сначала определялись контуры всех кластеров в НС-масках (Рис. 4.6г), затем они морфологически расширялись (операцией дилатации) до оптимального расстояния, которое было подобрано эмпирически для каждого типа ткани таким образом, чтобы объединить все соседние кластеры. В полученных изображениях была выполнена операция заливки пустот и затем обратная морфологическая эрозия на то же оптимальное расстояние, что использовалось для операции расширения. Далее все полученные кластеры площадью менее 80% от площади самого крупного из них удалялись, чтобы оставить в рассмотрении только кластеры, содержащие разрушение, и исключить мелкие сосуды и межклеточное пространство за пределами разрушения, которые обычно неправильно классифицировались как полностью разрушенная ткань. Наконец,

наложение масок всего разрушения (Рис. 4.6д) и НС масок с полностью разрушенной тканью (Рис. 4.6г) для каждого гистологического среза позволило получить результат трехклассовой сегментации (Рис. 4.6е). Полученные трехклассовые маски (Рис. 4.6е) изображений, не использовавшихся для обучения нейросети, сравнивались с сегментированными вручную изображениями (Рис. 4.6б) для проверки точности разработанного нейросетевого алгоритма и оптимизации параметров датасета и обучения нейронной сети до достижения ошибки менее 3% от анализируемого изображения. Оптимизированный алгоритм затем применялся к остальным гистологическим срезам без предварительной ручной сегментации. Стоит отметить, что морфологические операции (расширение и эрозия), примененные к НС-маскам при их постобработке, привели к незначительному завышению площади разрушения и, как следствие, к ошибочному отображению дополнительного контура разрушения толщиной в один фрагмент (Рис. 4.6е, Рис. 4.7з). Вносимая ошибка, однако, находилась в пределах 3% от площади изображения и, таким образом, не превышала установленную пороговую ошибку.

После получения трехклассовых масок каждого разрушения, его объем оценивался из набора двумерных изображений путем интегрирования вдоль направления, перпендикулярного гистологическим срезам. Скорость абляции затем оценивалась как отношение объема всего разрушения ко времени облучения при каждом протоколе воздействия.

Другим показателем эффективности ГК-воздействия, помимо скорости разрушения, служила доля площади недоразрушенной ткани внутри разрушения. Этот параметр усреднялся для каждого разрушения по всем его гистологическим срезам, площадь разрушения в которых превышала 50% от наибольшего поперечного сечения разрушения.

Оценка разрушений в ткани говяжьего миокарда

В связи с различиями в клеточной структуре миокарда по сравнению с печенью, для ГК-разрушений в ткани говяжьего миокарда количественный гистологический анализ проводился путем бинарной классификации с помощью более крупных фрагментов размером 160×160 мкм (64×64 пикселя) (Рис. 4.7). Каждый фрагмент классифицировался либо как класс «1» (полностью разрушенная ткань – красный), если область красного цвета при ручной сегментации превышала 55% фрагмента, либо как класс «0» для остальных фрагментов. Датасет состоял из 23000 фрагментов каждого класса и также разбивался на тренировочную и валидационную выборку случайным образом в отношении 80% : 20% от общего размера датасета. Нейросеть затем обучалась на подобранном датасете до максимальной точности классификации 93%. Финальные параметры обучения мелкомасштабной нейросети были следующими: размер пакета (batch size) 2000 фрагментов, скорость обучения (learning rate) 0.0002, число эпох 130. Оптимизатор и функция потерь были выбраны такими же, как при разработке нейросети для ткани печени: Adam и CrossEntropyLoss, соответственно.

Однако из-за фибриллярной структуры ткани миокарда межклеточное пространство между мышечными волокнами часто неверно классифицировалось мелкомасштабной нейросетью как разрушенная ткань. Такие области часто располагались в непосредственной близости от разрушения (Рис. 4.7г) и могли ошибочно увеличивать его площадь при процедуре морфологической дилатации во время постобработки. Чтобы исключить такие области из мелкомасштабных НС-масок, нейросеть также была обучена на более крупных фрагментах размером 644×644 мкм (256×256 пикселей) для выделения исключительно областей интактной ткани (Рис. 4.7д). Финальные параметры обучения крупномасштабной нейросети: размер пакета

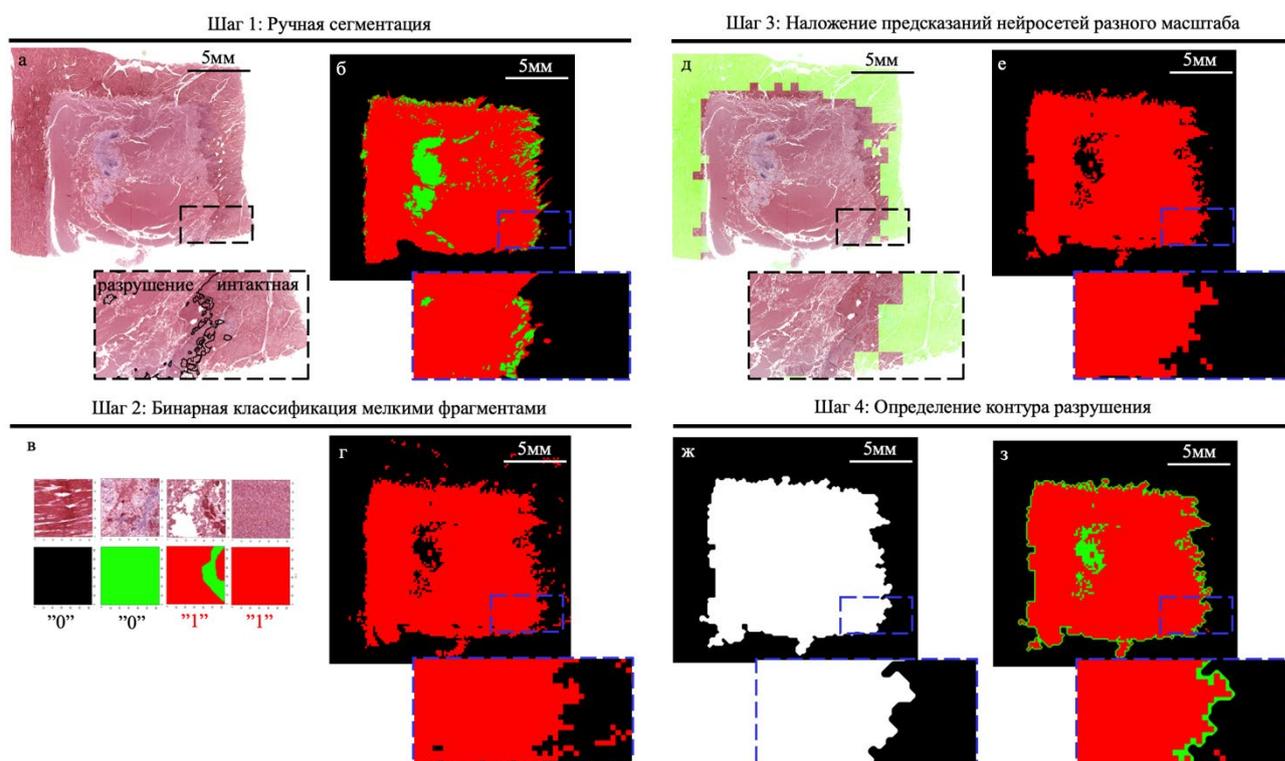


Рис. 4.7. Иллюстрация этапов количественного гистологического анализа объемных ГК-разрушений в ткани говяжьего миокарда (ГК-воздействие осуществлялось слева). (а) Окрашенный по Массону гистологический срез из центра объемного разрушения. Пунктирной рамкой показана увеличенная область на границе разрушения, где черной кривой отмечен контур разрушения, выделенный при ручной сегментации. (б) Результирующая маска ручной трехклассовой сегментации: красные области – полностью разрушенная ткань, зеленые – интактная или недоразрушенная ткань внутри разрушения, черные – фон и интактная ткань вне разрушения. (в) Пример фрагментов мелкомасштабного датасета с присвоенными номерами классов для бинарной классификации: «0» – фон, интактная и недоразрушенная ткань, «1» – полностью разрушенная ткань. (г) Результирующая маска полностью разрушенной ткани после мелкомасштабной (160×160 мкм) бинарной нейросетевой классификации до постобработки. (д) Маска интактной ткани после крупномасштабной (644×644 мкм) нейросетевой бинарной классификации, наложенная на гистологический срез (а). (е) Результирующая маска полностью разрушенной ткани после наложения масок нейросетей разного масштаба до постобработки. (ж) Результирующая маска всего разрушения (включая полностью разрушенную и недоразрушенную ткань) после постобработки. (з) Окончательная трехклассовая маска после постобработки, для сравнения с (б). В пунктирных рамках на (а–б, г–з) представлена одна и та же область на границе разрушения под большим увеличением. Маркерные линии на (а–б, г–з): 5 мм.

(batch size) 50 фрагментов, скорость обучения (learning rate) 0.0002, число эпох 130 (оптимизатор Adam, функция потерь CrossEntropyLoss). Полученные области здоровой ткани (Рис. 4.7д) затем были наложены на результаты мелкомасштабной сегментации (Рис. 4.7г) для получения НС-масок (Рис. 4.7е), использованных далее для последующей постобработки и проверки точности нейросетевого алгоритма (Рис. 4.7ж,з), аналогично процедурам, описанным для ткани печени.

Анализ коллагеновой ткани

Третьей метрикой эффективности ГК-воздействия, рассматриваемой в этой работе, служила доля коллагеновой ткани, остающейся после разрушения. Поскольку окрашивание гистологических срезов по Массону привело к выделению коллагеновых структур яркосиним/фиолетовым цветом, это позволило выявление коллагеновой ткани путем применения инструментов цветовой и пространственной фильтрации и обработки бинарных изображений в программе для анализа и обработки медико-биологических изображений Fiji (NIH, Bethesda, MD). Цветовая фильтрация выполнялась в цветовом пространстве HSB. Чтобы отделить ткань от фона гистологического изображения, применялся фильтр яркости с пределами 0–200 и процедура заливки пустот. Затем область ткани разделялась на разрушение и окружающую ткань (Рис. 4.8а) путем наложения НС-масок (таких, как Рис. 4.6д и 4.7ж) на изначальное гистологическое изображение (как Рис. 4.6а и 4.7а). В выделенных областях, соответственно, разрушения и окружающей ткани коллагеновая ткань выделялась с помощью цветowych и пространственных

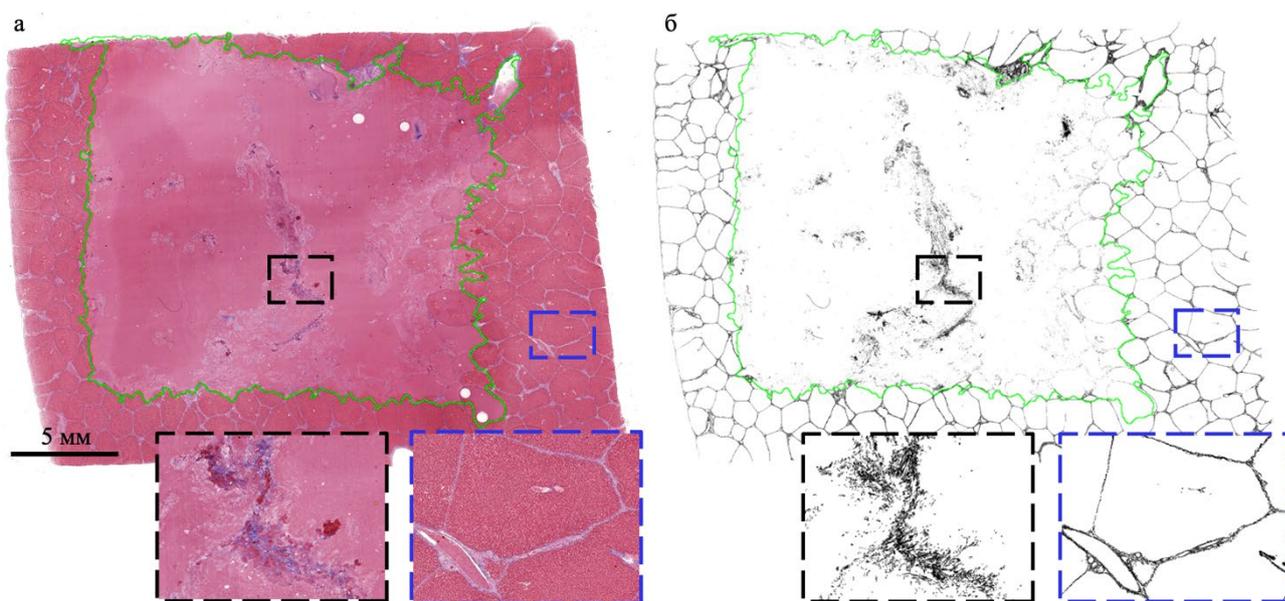


Рис. 4.8. Иллюстрация выделения коллагеновой ткани на примере среза печени свиньи (ГК-воздействие осуществлялось слева). (а) Окрашенный по Массону гистологический срез объемного разрушения в ткани свиной печени, где зеленой кривой отмечен контур разрушения, согласно маске всего разрушения на Рис. 4.6д. (б) Результат выделения коллагеновой ткани на изображении (а). В пунктирных рамках представлены области внутри разрушения (черным) и вне него (синим) под большим увеличением. Маркерная линия: 5 мм.

фильтров (Рис. 4.8б). Необходимые пределы цветового фильтра были определены путем анализа HSB-распределений изображений только коллагеновой ткани, отдельно выделенных вручную, и составляли, соответственно: [165–227; 0–255; 0–233] для свиной печени и [150–227; 0–255; 0–170] для ткани говяжьего миокарда. Пространственный фильтр был применен для исключения из рассмотрения ядер клеток, окрашенных по Массону в цвет, схожий с коллагеновой тканью. Нижний предел пространственного фильтра был определен путем ручного определения размера наименьших различимых ядер клеток и составил 95 мкм^2 (15 пикс^2) в обоих типах ткани. Это означало, что ядра клеток должны были выглядеть как квадраты со стороной 9.7 мкм , что согласуется диаметром клеток порядка 6.5 мкм в работах [175, 176], с учетом ограничений разрешения оцифровки, использованного в настоящей работе. Затем оценивалась доля коллагеновой ткани внутри и вокруг разрушения, и полученные значения делились друг на друга для оценки уменьшения количества коллагеновой ткани в результате ГК-воздействия. Полученное отношение усреднялось по всем срезам для каждого объемного разрушения и рассматривалось как третья метрика эффективности ГК, далее называемой долей оставшейся коллагеновой ткани. Для оценки этого соотношения в свиной печени доля коллагеновой ткани в норме (т.е. вокруг разрушения) рассматривалась для каждого гистологического среза отдельно. Однако, в ткани миокарда коллагеновые структуры наблюдались значительно реже и менее равномерно, в связи с чем доля коллагеновой ткани вне зоны разрушения усреднялась по всем доступным срезам миокарда, в том числе не содержащим разрушений.

Статистический анализ

Сравнение показателей эффективности ГК-воздействия для различных разрушений (а именно, доли недоразрушенной ткани и оставшейся коллагеновой ткани) проводилось согласно двустороннему двухвыборочному гомоскедастическому *t*-критерию Стьюдента с порогом значимости на уровне $p = 0.05$.

§4.4 Результаты количественного анализа разрушений

Все значения, полученные для площади всего разрушения (Рис. 4.9а) и площади полностью разрушенной ткани (Рис. 4.9б) с помощью

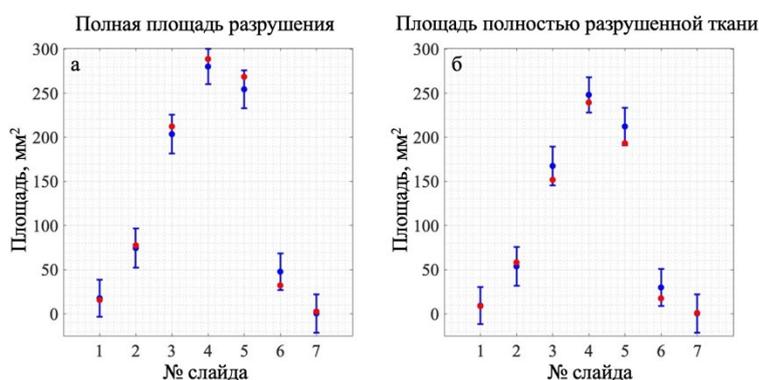


Рис. 4.9. Репрезентативные результаты ручной (синим) и нейросетевой (красным) оценки площади разрушения (а) и полностью разрушенной ткани (б) для всех гистологических срезов одного из разрушений, полученных в ткани свиной печени с наибольшей дозой воздействия (10 мс , $N_{\text{имп}} = 10$). Синими погрешностями указана целевая ошибка в 3% от соответствующего анализируемого гистологического слайда.

разработанного нейросетевого алгоритма, находились в пределах 3% от площади изображения, сегментированного вручную. Таким образом, далее все результаты на основе гистологического анализа были получены с использованием этого алгоритма. Рис. 4.9 также иллюстрирует диапазон возможных площадей разрушения, встречающихся на гистологических срезах, сделанных сквозь объем одного разрушения.

4.4.1 Скорость абляции ткани

На Рис. 4.10 представлена зависимость объема полученных разрушений и соответствующих скоростей абляции от параметров ГК-воздействия в ткани свиной печени (а,б) и говяжьего миокарда (в,г). Столбцы без заливки соответствуют объемам разрушений, оцененным по УЗИ-снимкам, а окрашенные столбцы – объемам, полученным по данным 3D-реконструкции гистологических срезов. Как видно на Рис. 4.10а, значения объемов разрушений, полученные из гистологического исследования, обычно на 40–50% ниже, чем объемы, оцененные по УЗИ, что связано с известным эффектом усадки гистологических образцов при фиксации в

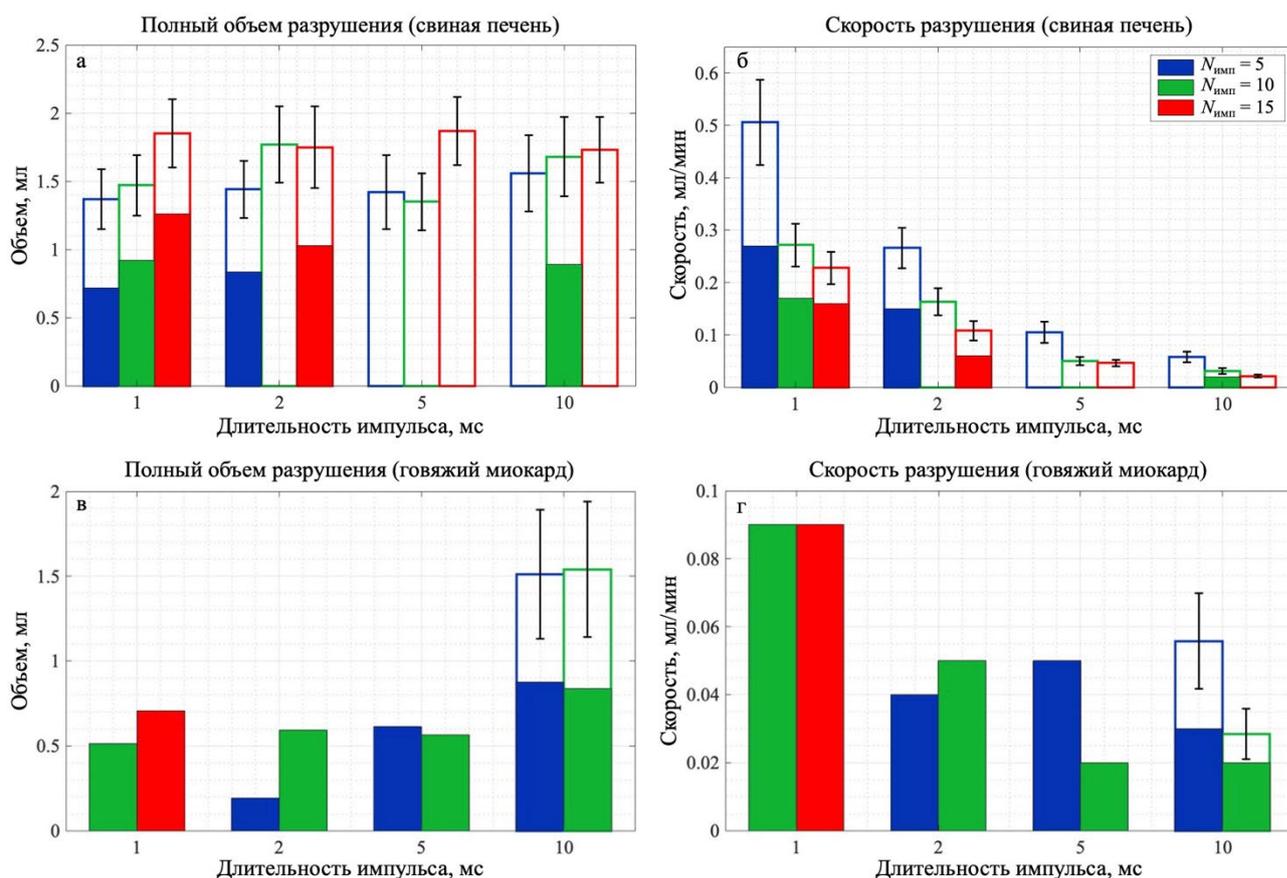


Рис. 4.10. Объем разрушений (а,в) и соответствующие значения скорости абляции (б,г), оцененные на основе 3D-реконструкции гистологических срезов (закрашенные столбцы) или по УЗИ-снимкам (столбцы без заливки), полученных в ткани печени свиньи (верхний ряд) и говяжьего миокарда (нижний ряд) при различных длительностях импульсов (горизонтальная ось) и количестве импульсов на фокус ($N_{имп}$): $N_{имп} = 5$ ррр (синим), $N_{имп} = 10$ (зеленым) и $N_{имп} = 15$ (красным). Для измерений, основанных на УЗИ-снимках, представлены косвенные погрешности оценки объема разрушений по трем измеренным размерам.

формалине [177]. Однако общая тенденция при этом сохраняется, что позволяет проводить сравнительный анализ параметров воздействия.

В ткани свиной печени (Рис. 4.10а) при наибольшей длительности импульсов (10 мс) разрушенный объем не зависел от количества импульсов на фокус в рассматриваемом диапазоне этого параметра ($N_{\text{имп}} = 5-15$) в пределах погрешности измерений. С уменьшением длительности импульсов разница в разрушенном объеме при варьировании $N_{\text{имп}}$ становилась более заметной. При этом из-за пропорционального увеличения частоты повторения импульсов, использование более коротких импульсов и их меньшего числа на фокус привело к значительно более высокой скорости абляции (Рис. 4.10б).

В ткани миокарда, как и в печени, гистологическая оценка объема разрушений показала значения на 40-50% ниже, чем полученные по УЗИ-снимкам (Рис. 4.10в). Разрушения в ткани сердца (Рис. 4.10в) были меньше, чем в ткани печени (Рис. 4.10а) при фиксированных параметрах воздействия. Например, было показано, что $N_{\text{имп}} = 5$ имп/фокус с длительностью 2 мс оказалось недостаточно для эффективного слияния сетки отдельных разрушений в миокарде (Рис. 4.10в), в то время как $N_{\text{имп}} = 5$ даже более коротких импульсов (длительностью 1 мс) было достаточно для равномерного разрушения ткани печени (Рис. 4.10а). При увеличении длительности импульсов и их количества на фокус разрушенный объем увеличивался, достигая насыщения (т.е. независимости от $N_{\text{имп}}$) при более длинных импульсах (5 и 10 мс), но статистически все же не различался для варьируемых протоколов облучения. Однако использование более коротких импульсов и их меньшего количества на точку позволило ускорить процесс абляции (Рис. 4.10г), аналогично наблюдениям в ткани печени.

4.4.2 Доля и структура недоразрушенной ткани

На Рис. 4.11 показаны результаты оценки двух других метрик эффективности ГК-воздействия, а именно общей доли недоразрушенной ткани (Рис. 4.11а,в) и доли оставшейся коллагеновой ткани (Рис. 4.11б,г). Средние значения общей доли недоразрушенной ткани (пунктирные линии на Рис. 4.11а,в) составили 27% и 18% для ткани печени и миокарда, соответственно, что оказалось ниже доли оставшейся коллагеновой ткани – 33% и 53%, соответственно (пунктирные линии на Рис. 4.11б,г). Этот результат количественно подтверждает известную качественную закономерность о повышенной устойчивости коллагеновой ткани к механическому разрушению методом ГК [48, 102]. С точки зрения доли оставшейся после разрушения ткани, свиная печень оказалась статистически нечувствительна к изменению параметров ГК-воздействия в пределах исследуемого диапазона (Рис. 4.11а,б), таким образом указывая на значительно меньшую пороговую дозу при использовании более коротких импульсов. В ткани миокарда результат ГК-воздействия различался более заметно для разных протоколов облучения (Рис. 4.11в,г). Использование более длинных импульсов и/или их

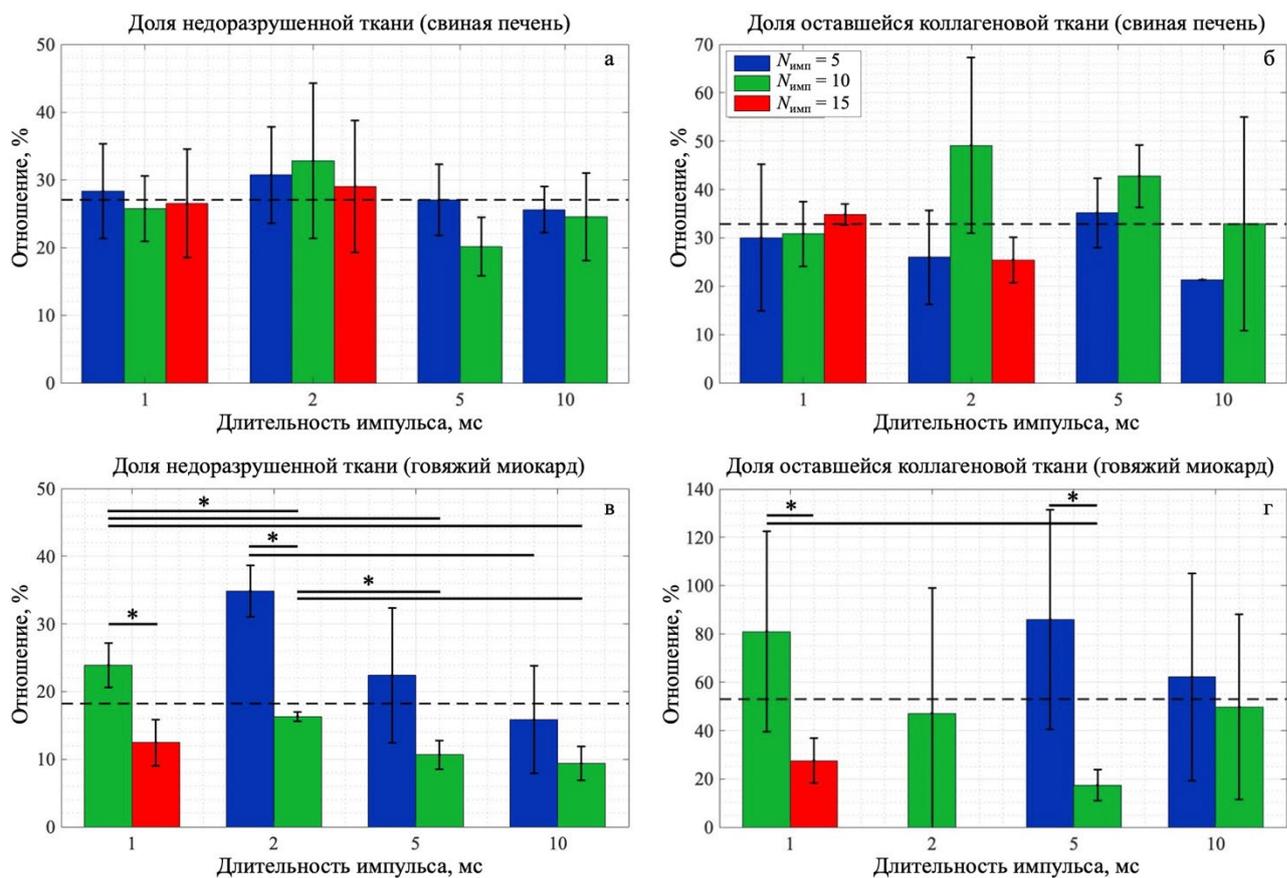


Рис. 4.11. Средние значения общей доли недоразрушенной ткани (а,в) и оставшейся коллагеновой ткани (б,г) в разрушениях, полученных в ткани печени свиньи (верхний ряд) и говяжьего миокарда (нижний ряд) при различных длительностях импульсов (горизонтальная ось) и количестве импульсов на фокус ($N_{имп}$): $N_{имп} = 5$ (синим), $N_{имп} = 10$ (зеленым) и $N_{имп} = 15$ (красным). Данные представляют средние значения с погрешностями, равными стандартному отклонению; * указывает на статистически значимое различие при $p < 0.05$. Пунктирной линией на каждой диаграмме представлено значение соответствующей величины, усредненное по всем столбцам диаграммы. Протокол (2 мс, $N_{имп} = 5$) оказался недостаточным для слияния отдельных разрушений в ткани миокарда и, следовательно, не был проанализирован на наличие коллагеновой ткани внутри разрушения.

большого количества на фокус привело к меньшей доле общей и коллагеновой оставшейся ткани после воздействия. Причем статистически одинаковую степень разрушения ткани было способно обеспечить как использование низкой механической дозы ($N_{имп} = 15$ имп/фокус с длительностью 1 мс), так и высокой ($N_{имп} = 10$ имп/фокус с длительностью 10 мс) (Рис. 4.11в,г), что опять же указывает на более низкую пороговую дозу при использовании более коротких импульсов.

Несмотря на независимость доли оставшейся ткани после разрушения свиной печени от параметров облучения, структура остающейся ткани заметно отличалась после воздействия короткими импульсами по сравнению с длинными (Рис. 4.12). Облучение ткани печени короткими импульсами (1–2 мс) привело к тому, что в объеме разрушения оставались более тонкие упорядоченные структуры ткани, такие как стенки печеночных долек (Рис. 4.12б–г). УЗИ-визуализация разрушений также показала остаточные экзогенные структуры после воздействия короткими импульсами (Рис. 4.12а, 4.13а). Использование более длинных импульсов (5–10 мс)

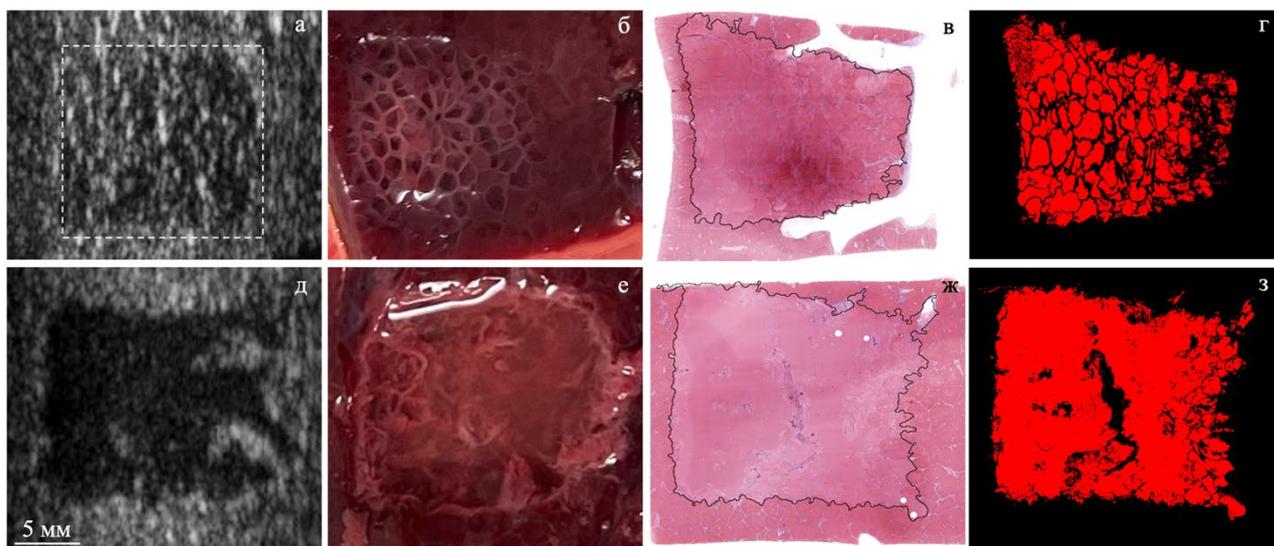


Рис. 4.12. Иллюстрация различной структуры остаточной ткани после объемного разрушения печени более короткими (а–г) и длинными (д–з) импульсами (HIFU-воздействие осуществлялось слева). (а,д) УЗИ-снимки разрушений через 30 минут после воздействия (датчиком L14-5). Пунктирной рамкой на (а) выделен контур объемного разрушения. (б,е) Макроскопические фотографии разрушений после разреза вдоль плоскости визуализации XZ и заполненных физиологическим раствором. (в,ж) Окрашенные по Массону гистологические срезы разрушений, где черной кривой отмечен контур разрушения, предсказанный нейросетевым алгоритмом после постобработки. (г,з) Маски полностью разрушенной ткани (красным) в разрушениях (в) и (ж). Маркерная линия: 5 мм.

позволяло разрушить такие мелкомасштабные тканевые структуры, в результате приводя к ликвификации целевого объема с встречающимися более крупными остаточными структурами, расположенными либо у границ разрушения (Рис. 4.12д,е), либо внутри его объема (Рис. 4.12ж,з, 4.13е–з). УЗИ-визуализация в таком случае показывала заметно более однородные и гипоехогенные разрушения (Рис. 4.12д, 4.13д) по сравнению с разрушениями, полученными короткими импульсами (Рис. 4.12а, 4.13а).

Повышенная устойчивость ткани миокарда к механическому разрушению, показанная путем гистологического анализа (Рис. 4.10), была также обнаружена макроскопически после разреза разрушений. А именно, некоторые из исследуемых протоколов облучения оказались недостаточными для эффективного слияния сетки разрушений в ткани миокарда (Рис. 4.13а–г), в то время как все протоколы воздействия привели к образованию объемных разрушений в ткани печени.

Таким образом, было показано, что в рамках предлагаемой концепции механической дозы как произведения длительности импульсов на их количество на фокус при условии инициации кипения ткани внутри каждого импульса, более короткие импульсы (1–2 мс) позволяют использовать меньшую дозу воздействия для достижения статистически идентичного результата в обоих типах ткани. При этом, однако, для инициации кипения в течение каждого короткого импульса требовалась более высокая акустическая мощность на излучателе (Табл. 4.1). Оценка общей акустической энергии, требующейся для достижения одинаковой степени разрушения, как

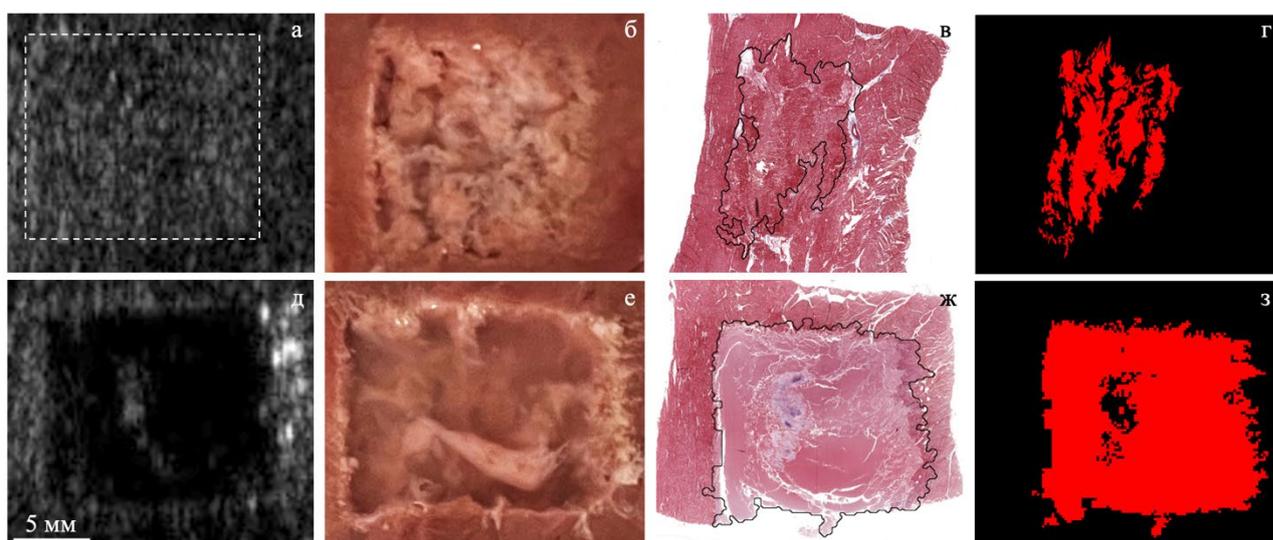


Рис. 4.13. Иллюстрация разрушений, полученных в ткани миокарда при недостаточной (а–г) и достаточной (д–з) дозах воздействия (HIFU-воздействие осуществлялось слева). (а,д) УЗИ-снимки разрушений через 30 минут после воздействия (датчиком L14-5). Пунктирной рамкой на (а) выделен контур объемного разрушения. (б,е) Макроскопические фотографии разрушений после разреза вдоль плоскости визуализации *XZ* и заполненных физиологическим раствором. (в,ж) Окрашенные по Массону гистологические срезы разрушений, где черной кривой отмечен контур разрушения, предсказанный нейросетевым алгоритмом после постобработки. (г,з) Маски полностью разрушенной ткани (красным) в разрушениях (в) и (ж). Маркерная линия: 5 мм.

произведения длительности импульсов, их количества на каждый фокус и акустической мощности, показала, что пороговая доза по энергии все равно оказывалась ниже при использовании более коротких импульсов. При этом, однако, импульсы разной длительности по-разному разрушают ткани с высоким содержанием коллагена, а именно только длинные импульсы (5–10 мс) были способны разрушить упорядоченные коллагеновые структуры в ткани печени. В ткани миокарда же, в которой содержание коллагена заметно ниже и не наблюдается упорядоченных прочных коллагеновых структур, одинаковая степень разрушения достигалась как короткими, так и длинными импульсами при условии достаточного количества импульсов на фокус и достаточной мощности для инициации кипения в течение каждого импульса.

§4.5 Выводы к четвертой главе

В настоящей главе была предложена и исследована концепция механической дозы ГК-воздействия как произведения длительности используемых импульсов на их количество, доставляемое в каждую точку-фокус пространственной сетки для получения объемного разрушения, при условии инициации кипения в течение каждого из импульсов. В частности, количественно исследована зависимость скорости и эффективности механического разрушения биологических тканей разного типа миллисекундными ударноволновыми ультразвуковыми импульсами от дозы воздействия и типа разрушаемой ткани. В качестве метрик, позволяющих оценить эффективность гистотрипсии с кипением, было предложено использовать объемную

скорость абляции, долю недоразрушенной ткани и долю оставшейся коллагеновой ткани внутри области воздействия. Экспериментально реализованные объемные разрушения, полученные в образцах свиной печени и говяжьего миокарда *ex vivo* при варьируемых протоколах воздействия, были подвержены количественному гистологическому анализу путем комбинации ручной сегментации изображений и разработки нейросетевого алгоритма. Показано, что предложенная концепция механической дозы зависит от типа разрушаемой ткани и длительности используемых импульсов. В частности, использование коротких импульсов (1–2 мс) позволило снизить пороговую механическую дозу для достижения одинаковой эффективности ГК-воздействия, однако требовало более высокой акустической мощности для инициации кипения в течение каждого импульса. Полная акустическая энергия излучателя, требующаяся при более коротких импульсах, все равно оказалась ниже. При этом рекомендуемая пороговая доза зависела от содержания коллагена в целевой ткани, а именно более длинные импульсы (5–10 мс) лучше разрушали структуру ткани с высоким содержанием упорядоченных коллагеновых структур.

Глава 5

ПОРОГИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ РАЗРУШЕНИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ РЯДОМ С ГАЗСОДЕРЖАЩИМИ ОРГАНАМИ НА МОДЕЛИ КРУПНОЙ ГЕМАТОМЫ РЯДОМ С ВОЗДУШНОЙ ГРАНИЦЕЙ

В данной главе используются материалы, опубликованные в статьях [А3, А8].

Как обсуждалось во Введении к настоящей диссертационной работе, взаимодействие мощного фокусированного ультразвука с биологической тканью в режиме гистотрипсии с кипением (ГК) включает в себя различные физические явления, не все из которых на данный момент до конца изучены: образование пузыря кипения в биологической ткани, его рост, атомизация ткани на искривленной поверхности газопаровой полости, приповерхностная кавитация, образование микроструй и др. Тем не менее, из последних данных в литературе уже хорошо известны основные механизмы и закономерности в формировании ГК-разрушений.

Типичное одиночное ГК-разрушение в толще биоткани вдали от воздушных границ, как уже было показано в Главе 2, имеет форму «головастика» и состоит из расположенной ближе к излучателю полости формы эллипсоида вращения («головы») и более узкой сужающейся постфокальной части, называемой «хвостом», переход между которыми, как правило, соответствует положению фокуса излучателя [31, 32, 42, 50, 145]. (Рис. 5.1а). Считается, что «голова» образуется за счет комбинации нескольких эффектов: кавитации перед поверхностью парогазового пузыря кипения, вызванной формированием локализованной области высокого отрицательного давления при отражении высокоамплитудных ударных волны от границы раздела ткань–пар; отрыва фрагментов ткани внутрь паровой полости; образования миниатюрного акустического фонтана на ближней к излучателю поверхности пузыря, т.е. струи фрагментов ткани, направленной в сторону распространения падающей волны; и потери устойчивости поверхности этой струи, приводящей к отрыву мелких фрагментов ткани – эффект акустической атомизации [43–45, 178]. Одним из предполагаемых механизмов формирования «хвоста» ГК-разрушения является упомянутая выше струя ликвидированной ткани внутрь

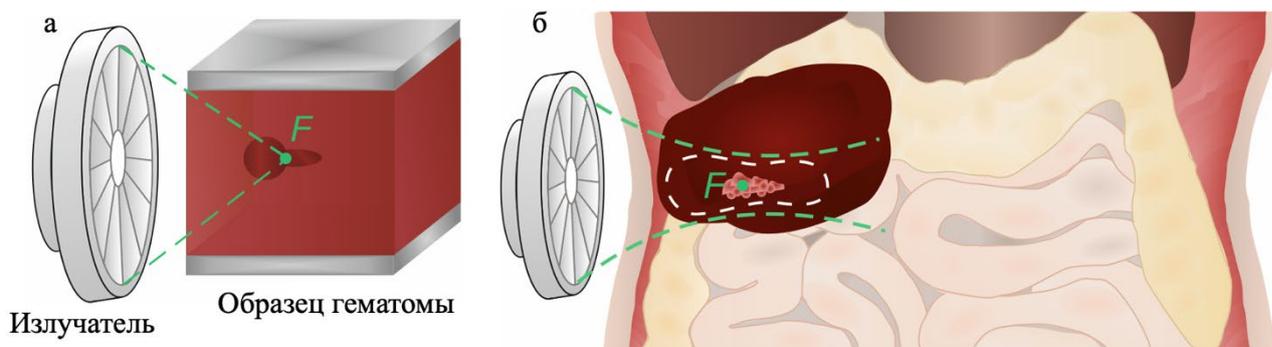


Рис. 5.1. (а) Схематичное изображение типичной формы одиночного ГК-разрушения, получаемого в толще мягких тканей. (б) Схематичное изображение ГК-разрушения в гематоме вблизи газосодержащих органов (кишечника), и контур опасной зоны (белый пунктир) вокруг фокуса пучка F (зеленая точка).

паровой полости, генерируемая радиационной силой фокусированного ультразвукового пучка. Эта высокоскоростная струя вырывается из ближней к излучателю поверхности паровой полости и ударяется о противоположную (дальнюю) поверхность полости, создавая в ткани канал – «хвост» ГК-разрушения [145]. Альтернативным объяснением образования «хвоста» является появление вторичных паровых пузырей в области за первым из-за дифракции падающего поля вокруг него [44].

Как уже обсуждалось в этой работе, форма и размер одиночного ГК-разрушения зависят от параметров излучателя (частоты и угла фокусировки), длительности используемых импульсов, механических свойств разрушаемой ткани и продолжительности воздействия, т.е. от количества подаваемых ГК-импульсов. В частности, в работах [42, 43, 50, 56] сообщалось, что размер одиночного ГК-разрушения увеличивался с количеством подаваемых импульсов до достижения насыщения после 5–20 импульсов, в зависимости от механических свойств ткани и длительности импульсов. Также было показано, что уменьшение рабочей частоты ультразвука приводит к увеличению размеров ГК-разрушений, что, однако, приводит к более высокой вероятности неблагоприятной префокальной кавитации, экранирующей фокальную область на частотах ниже 1.2 МГц [42, 145]. В работе [56] было также показано, что при больших углах фокусировки ультразвукового пучка «голова» ГК-разрушения получается более округлой (т.е. более широкой в поперечном направлении и более короткой в продольном направлении), а «хвост» оказывается более узким и коротким.

В соответствии с известной закономерностью влияния типа разрушаемой ткани, в частности ее модуля упругости и прочности, на форму и размер ГК-разрушения [32, 42, 43, 47–49, 52, 56], в работе [43] было показано, что пороги ультразвуковой атомизации ткани – одного из механизмов, участвующих в ГК, – также зависят от типа ткани. В частности, были получены пороговые значения интенсивности HIFU-пучка, необходимой для атомизации поверхности говяжьей печени и сгустков свиной крови при расположении фокуса излучателя на плоской поверхности раздела ткань–воздух, причем пороговая интенсивность для атомизации сгустков крови оказалась ниже, чем для ткани говяжьей печени.

В настоящее время ГК развивается для ряда клинических приложений, включая механическую абляцию опухолей, дезинфекцию абсцессов и разжижение крупных гематом для последующей тонкоигольной аспирации [50, 107, 179]. Все эти целевые ткани часто располагаются в брюшной полости, в непосредственной близости от газосодержащих органов, таких как желудок, кишечник и легкие. Известно, что высокоамплитудные волны в фокусированных пучках, падающие на границу газосодержащего органа, могут механически повредить ткань таких органов за счет атомизации на их мягкой границе [180]. Пороговое значение подповерхностного давления, приводящего к повреждению стенки газосодержащего

органа, точно неизвестно, однако поддержание давления ниже этого порога особенно важно при высокоамплитудном импульсном воздействии, таком как гистотрипсия с кипением.

В связи с этим, целью этой части диссертационной работы было связать геометрические параметры создаваемых в биоткани разрушений вблизи воздушной границы с параметрами вызывающего их акустического поля с целью определить контуры зоны опасного расположения границы газосодержащих органов вблизи фокуса ультразвукового излучателя (Рис. 5.1б). Поскольку, как уже обсуждалось в Главе 2, гематома является наиболее мягкой биологической тканью, а также удобной моделью биоткани для лабораторных исследований, в этой части работы безопасность ГК-воздействия для окружающих воздухосодержащих тканей исследовалась на модели крупной гематомы *in vitro*. Высокая чувствительность коагулированной крови к механическому разрушению позволяет считать модель гематомы наихудшим случаем воздействия на биологическую ткань вблизи воздушной границы, а получаемые результаты достаточно консервативными, чтобы считать их подходящими для случая воздействия на любую другую биологическую ткань.

Описанные в этой главе исследования состояли из двух частей. В первой части изучалось влияние угла фокусировки излучателя (или его $F\#$) и положения плоской границы гематома–воздух относительно фокуса излучателя на результат воздействия в высокоамплитудном режиме, характерном для ГК. При этом фокус помещался как с одной стороны от воздушной границы (т.е. внутри гематомы), так и с другой (т.е. за границей гематомы в воздухе). Стоит отметить, что при размещении фокуса внутри гематомы, т.е. перед воздушной границей, происходят стандартные процессы, участвующие в ГК-разрушении ткани. При этом образующиеся в фокусе пузыри пара и кавитационное облако частично или полностью экранируют акустическое поле и тем самым препятствуют атомизации постфокально расположенной поверхности гематомы. Однако «хвост» ГК-разрушения, который представляет собой высокоскоростную струю ликвидированного содержимого гематомы как часть механизма акустического микрофонтана, сталкивается с дальнейшей стороной парогазовой полости, создавая туннель к границе гематомы с воздухом и способствуя повреждению ее поверхности. И наоборот, когда фокус расположен за пределами образца, т.е. за границей гематома–воздух, основным механизмом повреждения поверхности предполагается ее атомизация под действием HIFU-поля.

Во второй части исследования изучалось влияние угла фокусировки излучателя на порог атомизации поверхности гематомы, также при различных положениях фокуса относительно границы гематома–воздух. Воздействие проводилось в низкоамплитудном режиме импульсами с длительностью, характерной для ГК, с постепенным повышением напряжения на излучателе до появления визуально наблюдаемого повреждения на поверхности гематомы. Полученное значение напряжения, и соответственно, отрицательного давления, считалось пороговым.

Пороги, определенные в первой и второй частях исследования, затем сравнивались для определения опасной зоны расположения воздушной границы вокруг фокуса излучателя.

§5.1 Акустический эксперимент

Модель гематомы in vitro

В качестве модели гематомы использовались образцы говяжьей крови, полученной в местном животноводческом хозяйстве, и затем хранившейся при температуре +5°C с антикоагулянтом ЦФД (#C7165; Millipore-Sigma, St. Louis, MO, USA) в соотношении объемов 9:1 в течение менее недели. Перед экспериментом кровь была дегазирована в течение 60–70 минут и затем коагулирована путем добавления 25 ммоль/л раствора хлорида кальция (#C3306; Millipore-Sigma) в контейнере в форме параллелепипеда. Длина и ширина формируемой гематомы составляли 5 см, а высота варьировалась от 2 до 4 см в зависимости от угла фокусировки излучателя, используемого для каждого образца, и ожидаемого положения фокуса, чтобы избежать экранирования фокуса стенками контейнера. Образцы гематом помещались в прозрачный пластмассовый контейнер с акустически прозрачным дном из полиэтилена, закреплялись в трехмерной системе позиционирования и частично погружались в бассейн с фильтрованной и деионизированной водой, предварительно также дегазированной в течение 60–70 минут. Нижняя горизонтальная грань гематомы находилась в воде, а верхняя грань контактировала с воздухом и служила исследуемой моделью воздушной границы ткани с поверхностью газосодержащего органа (Рис. 5.2а,б).

Экспериментальная установка

В этой части работы для исследования различных геометрий фокусированных ультразвуковых полей и их связи с получаемыми разрушениями, использовались три секторных излучателя с разными углами фокусировки (Рис. 5.2в, Табл. 5.1), подробно охарактеризованных в §1.1. Излучатель располагался в воде под образцом так, что волновой пучок распространялся снизу вверх и фокусировался либо в толщу образца, либо над ним (Рис. 5.2а,б). Расстояние между фокусом и свободной поверхностью ступки определялось по задержке отраженного от нее акустического импульса, излучаемого вспомогательным ультразвуковым источником в эхо-импульсном режиме (Panametrics PR5072, Waltham, MA, США), закрепленным в центральном отверстии ГК-излучателя (Рис. 5.2а,б) и подключенным к цифровому осциллографу (DSO-X 3034A, Keysight Technologies, Inc., Санта-Роза, Калифорния). Временная задержка, соответствующая расстоянию до фокуса и обратно, была предварительно записана во время гидрофонной характеристики излучателей в свободном поле в §1.1. Поправка к этой задержке, вносимая наличием слоя гематомы на пути ультразвуковой волны, учитывалась, исходя из

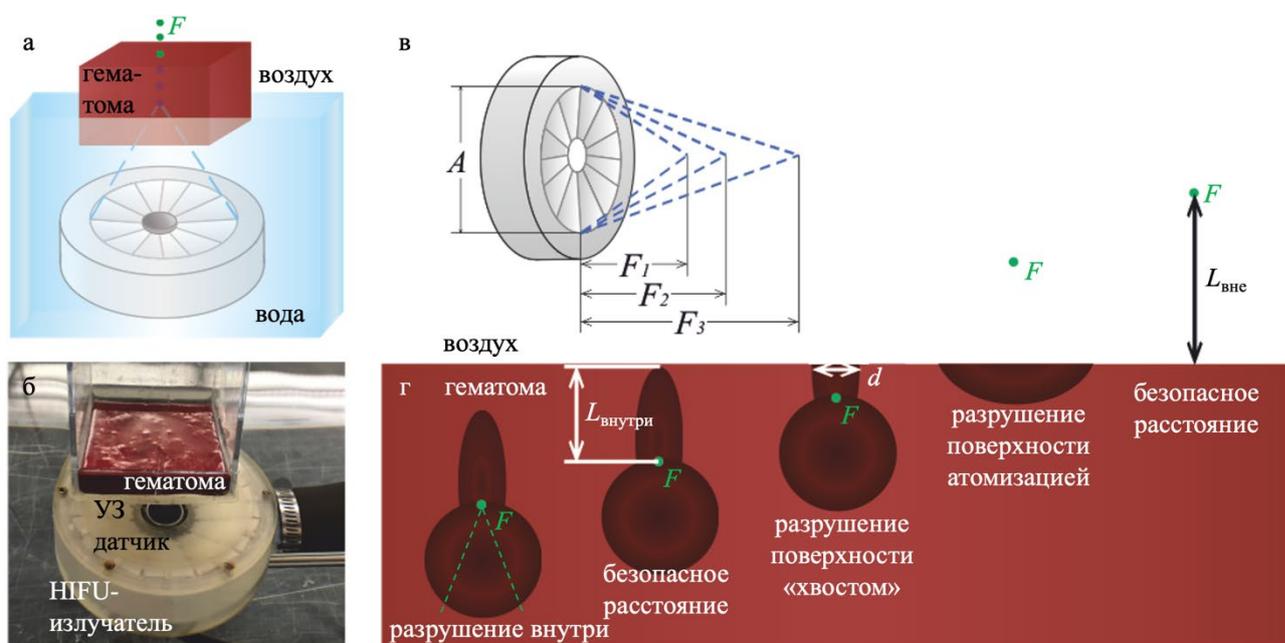


Рис. 5.2. Схема (а) и фотография (б) экспериментальной установки для исследования порогов механического повреждения границы раздела гематома–воздух. (в) Схематическое изображение трех используемых углов фокусировки секторных излучателей с фокусными расстояниями F_1 , F_2 , F_3 . (г) Иллюстрация повреждения поверхности гематомы при расположении фокуса пучка F (зеленая точка) вблизи границы гематома–воздух. $L_{\text{внутри}}$ и $L_{\text{вне}}$ – безопасные расстояния при фокусировке, соответственно, внутри и вне гематомы, d – диаметр разрушения на поверхности.

толщины каждого образца гематомы и скорости звука в воде ($c_{\text{вод}} = 1500$ м/с) и в говяжьей гематоме ($c_{\text{гем}} = 1560$ м/с), измеренной по методу из работы [181].

Различные положения фокуса излучателя относительно поверхности гематома–воздух достигались путем механического перемещения образца гематомы по вертикали с помощью автоматизированной системы трехмерного позиционирования (Velmex, Inc., Bloomfield, NY). Шаг между положениями фокуса составлял 1 мм для излучателей с $F\# = 0.77$ и 1.02 и 2 мм для излучателя с $F\# = 1.51$, начиная от 0 мм, что соответствовало расположению фокуса на свободной поверхности сгустка, и далее вниз (т.е. внутрь гематомы) или вверх (т.е. вне гематомы, в воздух). Каждое положение фокуса повторялось $n = 1-3$ раза.

Высокоамплитудные эксперименты

В первой серии экспериментов использовались параметры NIFU-воздействия (Табл. 5.1), характерные для ГК-разрушения мягких тканей (импульсы 10–20 мс с коэффициентом заполнения 1–2%), в таком режиме полностью развитого разрыва, что кипение ткани в фокусе достигалось в течение каждого импульса. При этом, поскольку из характеристики слабо-фокусированного излучателя с $F\# = 1.51$ в §1.1 было известно, что достижимые давления в его поле значительно ниже, чем в полях двух других излучателей (Рис. 1.3в), для него были выбраны более длинные ГК-импульсы (20-мс) для достижения условий инициации кипения внутри каждого импульса. Оценка параметров акустического поля в фокусе в гематоме и времени до

начала кипения (Табл. 5.1) описана далее в §5.2. Инициация кипения внутри гематомы подтверждалась экспериментально с помощью эхо-импульсного датчика. Фокус пучка располагался либо перед границей гематома–воздух (т.е. внутри гематомы), начиная с поверхности и до глубины ($L_{\text{внутри}}$), при которой ГК-разрушение полностью помещалось внутри образца; либо за воздушной границей (т.е. вне гематомы) в диапазоне от нуля до расстояния $L_{\text{вне}}$, которое не приводило к какому-либо визуально различимому повреждению поверхности сгустка (Рис. 5.2г). После ГК-воздействия поврежденная поверхность гематомы фотографировалась, затем полученные разрушения иссекались вдоль оси излучателя и тоже фотографировались для трехмерного анализа получаемых разрушений. Стоит отметить, что до ГК-воздействия поверхность сгустка не была идеально плоской и неизбежно имела некоторые неровности поверхности менее 1 мм в диаметре (как, например, на Рис. 5.2б). В связи с этим, поверхностные дефекты, обнаруженные после ГК-воздействия и сопоставимые по размерам и глубине с ранее существовавшими, было сложно различить визуально и однозначно отнести к результату воздействию, поэтому наличие дефектов глубиной и диаметром менее 1 мм расценивались как отсутствие повреждения поверхности гематомы.

Низкоамплитудные эксперименты

Во второй серии экспериментов фокус HIFU-пучка также помещался на контролируемых расстояниях до или после границы гематома–воздух, и те же три излучателя доставляли одиночные импульсы той же длительности, характерной для ГК и использованной в высокоамплитудных экспериментах выше (Табл. 5.1), но с низким и постепенно увеличивающимся напряжением на излучателе до тех пор, пока не возникало визуально различимого повреждения поверхности за счет акустической атомизации. Акустические поля, соответствующие найденному пороговому напряжению для каждого положения фокуса, определялись с помощью численного моделирования, описанного ниже в §5.2, и анализировались для определения порога атомизации поверхности в зависимости от положения фокуса относительно воздушной границы.

$F\#$	$\alpha, ^\circ$	$f_0, \text{МГц}$	$U, \text{В}$	$W, \text{Вт}$	$p^+ / p^- / A_s, \text{МПа}$	$t_{\text{имп}}, \text{мс}$	$N_{\text{имп}}$	DC	$t_{\text{кип}}, \text{мс}$	$I_{\text{спра}}, \text{кВт/см}^2$
0.77	81		110	320	134 / -19 / 119	10			0.8	43.7
1.02	58	1.5	130	442	87 / -14 / 95	10	30	1%	1.66	24.8
1.51	39		180	404	44 / -9 / 52	20		2%	10.3	8

Табл. 5.1. Параметры импульсно-периодического воздействия на границу гематома–воздух при высокоамплитудном определении порога разрушения поверхности гематомы: $F\#$ – диафрагменное число, α – угол фокусировки, f_0 – рабочая частота, U – напряжение на излучателе, W – акустическая мощность, p^+ (p^-) – пиковое положительное (отрицательное) давления на средней глубине фокуса в гематоме, A_s – амплитуда ударного фронта в фокусе в гематоме, $t_{\text{имп}}$ – длительность импульсов, $N_{\text{имп}}$ – количество импульсов на фокус, DC – коэффициент заполнения, $t_{\text{кип}}$ – время до начала кипения в гематоме, $I_{\text{спра}}$ – пространственная пиковая средняя интенсивность импульса на средней глубине фокуса в гематоме.

§5.2 Численное моделирование ультразвуковых полей *in situ*

5.2.1 Постановка численного эксперимента

Определенные в §1.1 параметры эквивалентных излучателей для используемых здесь реальных секторных излучателей были использованы в качестве граничного условия для численного расчета ультразвуковых полей в гематомах в широкоугольном параболическом приближении уравнения Вестервельта (1.1) в программном комплексе NIFU beam [76, 77].

Моделирование поля, создаваемого экспериментально в образцах гематом, проводилось в модели полубесконечного слоя коагулированной крови (Рис. 5.3а), ближайшая к излучателю граница которого смещалась в зависимости от положения фокуса относительно свободной поверхности так же, как в эксперименте перемещался образец с помощью системы позиционирования (Рис. 5.2). Акустические параметры говяжьей гематомы, необходимые для численных расчетов, были взяты из литературы: плотность $\rho = 1060 \text{ кг/м}^3$, коэффициент нелинейности $\beta = 4$, коэффициент диффузии звука $\delta = 4.33 \text{ мм}^2/\text{с}$ [50, 85, 140, 182]. Скорость продольных акустических волн $c_{\text{прод}} = 1560 \text{ м/с}$ и коэффициент поглощения в говяжьей гематоме на частоте 1.5 МГц $\alpha = 0.045 \text{ Нп/см}$ были измерены аналогично работе [181]. При этом коэффициент поглощения объемных говяжьих гематом оказался близок к значению для цельной крови [85, 182] и в несколько раз меньше соответствующего параметра для сгустков малых размеров диаметром 7–10 мм (моделей внутрисосудистых тромбов) [140, 182], что согласуется с предположением, которое обсуждалось в Главе 2, о различии механических свойств тромбов и крупных гематом в силу разного объема и механизмов формирования.

Оценка параметров акустического поля в фокусе в гематоме (Табл. 5.1) проводилась при расположении фокуса в гематоме на глубине, усредненной по всем экспериментам для каждого излучателя отдельно: 17, 20 и 25 мм для $F\# = 0.77, 1.02$ и 1.51 , соответственно. Время до начала

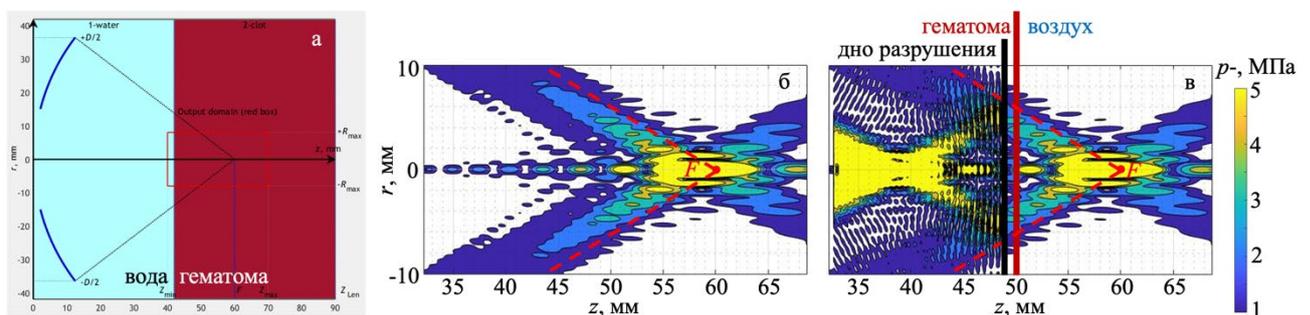


Рис. 5.3. (а) Иллюстрация графического интерфейса программного комплекса NIFU beam при постановке численного эксперимента для расчета акустического поля в полубесконечном слое коагулированной говяжьей крови. (б–в) Иллюстрация двумерного поля пикового отрицательного давления в аксиальной плоскости излучателя до (б) и после (в) отражения акустического поля от дна разрушения (черный вертикальный отрезок), вызванного атомизацией при расположении фокуса F (красная точка) в воздухе в 10 мм за поверхностью гематомы (бордовый вертикальный отрезок). Двумерные распределения пикового отрицательного давления показывают изолинии в 1, 2, 3, 4 и 5 МПа.

кипения в гематоме оценивалось по формуле (2.3) и приведено в Табл. 5.1. Необходимое для этого значение теплоемкости единицы объема говяжьей гематомы $c_v = 3.5$ МДж/(м³·К) было оценено как среднее значение между теплоемкостями человеческой и свиной коагулированной крови [140].

5.2.2 Оценка смещения ткани за счет радиационной силы

При планировании воздействия, а также при анализе получаемых ГК-разрушений в корреляции с создаваемым ультразвуковым полем, необходимо иметь в виду, что радиационная сила, оказываемая ультразвуком, вызывает смещение ткани вдоль оси пучка в виде сдвиговой волны, распространяющейся поперек этой оси [183, 184]. Максимальный сдвиг ткани вдоль оси пучка в зависимости от времени в пределах длительности импульса определяется амплитудой радиационной силы F_0 , характерным поперечным размером акустического пучка a и скоростью сдвиговых волн в среде $c_{\text{сдвиг}}$. При аппроксимации поперечного распределения радиационной силы в ультразвуковом пучке [183–185] функцией

$$\Phi(r) = \frac{F_0}{\left(1 + \frac{r^2}{a^2}\right)^{3/2}}, \quad (5.1)$$

смещение оценивается формулой:

$$u(t) = \frac{F_0}{2} \left(\frac{a}{c_{\text{сдвиг}}}\right)^2 \ln \left\{ 1 + \left(\frac{c_{\text{сдвиг}} t}{a}\right)^2 \right\}. \quad (5.2)$$

В работах [186, 187] было показано, что амплитуда радиационной силы связана с величиной максимальной объемной плотности мощности тепловых источников H_{max} в ультразвуковом пучке через параметры среды:

$$F_0 = \frac{H_{\text{max}}}{\rho c_{\text{прод}}}. \quad (5.3)$$

Для определения эффективного радиуса области локализации радиационной силы необходимо учесть, что причиной смещения среды является полная сила, действующая на все поперечное сечение пучка. Поэтому величина a рассчитывалась, исходя из равенства интегралов по поперечному сечению от нормированного поперечного распределения радиационной силы $\Phi(r) / F_0$ (5.1) и объемной плотности мощности тепловых источников $H(r) / H_{\text{max}}$:

$$\int_0^{\infty} 2\pi r dr \frac{\Phi(r)}{F_0} = 2\pi \int_0^{\infty} \frac{r dr}{\left(1 + \frac{r^2}{a^2}\right)^{3/2}} = 2\pi a^2 = \int_0^{\infty} 2\pi r dr \frac{H(r)}{H_{\text{max}}} \quad (5.4)$$

Откуда

$$a = \sqrt{\int_0^{\infty} r dr \frac{H(r)}{H_{\max}}} \quad (5.5)$$

Таким образом, эффективный радиус ультразвукового пучка рассчитывался по формуле (5.5), исходя из данных численного моделирования, описанных в §1.1, и составил $a = 0.06, 0.12$ и 0.24 мм для излучателей с $F\# = 0.75, 1.02$ и 1.51 соответственно.

Скорость сдвиговых волн в говяжьей гематоме рассчитывалась по формуле (2.1) через плотность коагулированной говяжьей крови и ее сдвиговый модуль μ , измеренный в этой части работы методом индентометра [125, 188], использованного ранее в §2.1, и составивший в среднем $\mu = 0.95$ кПа.

5.2.3 Корреляция разрушений с параметрами ультразвукового поля

В случае фокусировки внутри гематомы (т.е. до воздушной границы) и, соответственно, инициации кипения и повреждении поверхности «хвостом» ГК-разрушения, полученные разрушения, сфотографированные на поверхности гематомы и вдоль оси после их разреза, сравнивались со структурой падающего поля, численно рассчитанного как описано выше для каждого положения фокуса. В частности, для каждого разрушения измерялись продольная длина его «головы», диаметр поверхностного разрушения и, при генерации разрушения полностью в объеме, ширина образовавшегося «хвоста». Эти измерения сравнивались с размерами фокального пятна по нулям давления в падающем акустическом поле.

В отличие от фокусировки внутри гематомы, при которой в фокусе формировались пузыри кипения, экранировавшие падающее поле до воздушной границы и тем самым искажающие поле за ними, случай фокусировки вне гематомы (т.е. после воздушной границы) позволял корреляцию с параметрами нелинейного поля с учетом его отражения от границы гематома–воздух. Отражение акустического поля осуществлялось от свободной поверхности гематомы, соответствующей либо дну поверхностного разрушения, вызванного атомизацией, либо в случае отсутствия повреждения, от поверхности гематомы (Рис. 5.3б,в). При этом поверхность раздела гематома–воздух считалась акустически абсолютной мягкой границей для падающей волны. Отражение поля и соответствующее образование стоячих волн внутри гематомы осуществлялось методом мнимого источника [189]: на границе раздела гематома–воздух вводилось граничное условие в виде воображаемого источника инвертированного во времени поля, распространяющегося в направлении, противоположном реальному источнику. Интерференция падающего и отраженного акустического поля обеспечивала нулевое давление на границе раздела и образование квазистоячей волны в гематоме (Рис. 5.3в). Глубина и диаметр поверхностных разрушений, вызванных акустической атомизацией, сравнивались со структурой и амплитудами полученных полей с учетом его отражения для каждого положения фокуса. Для

этого в приповерхностном слое толщиной в четверть длины волны, т.е. в слое, включающем первый максимум стоячей волны, определялась плоскость, содержащая максимальное значение пикового отрицательного давления в результирующем поле квазистоячей волны. Распределение смоделированного пикового отрицательного давления в этой плоскости было наложено на контур экспериментально полученных поверхностных разрушений, и пиковое отрицательное давление на краю разрушения считалось порогом атомизации гематомы. Погрешность определения порогового давления, обусловленная неточностью измерения глубины и ширины поверхностного разрушения линейкой (0.5 мм), определялась путем варьирования размеров разрушения в пределах этой погрешности и соответствующего изменения давления в приповерхностном слое акустического поля.

Во второй серии экспериментов с низкоамплитудным повреждением поверхности гематомы максимальное значение пикового отрицательного давления (т.е. пороговое давление) определялось в слое толщиной в две длины волны под плоской границей гематома–воздух. Большая толщина приповерхностного слоя для случая с низкоамплитудными экспериментами по сравнению высокоамплитудным случаем была выбрана из-за большего размера фокального пятна при линейной фокусировке и, следовательно, большего масштаба изменения акустического давления. Погрешности определения порогового давления оценивались с учетом 10%-ной погрешности регулировки напряжения на излучателе и ее связи с пиковым давлением по кривым насыщения, полученным в §1.1.

§5.3 Результаты

5.3.1 Анализ высокоамплитудных разрушений в зависимости от угла фокусировки

На Рис. 5.4 представлены иллюстративные примеры поверхностных разрушений (верхний ряд) и их разреза вдоль оси (нижний ряд) для излучателя с $F\# = 1.02$ при расположении фокуса до границы раздела гематома–воздух, т.е. внутри гематомы при инициации кипения и повреждении поверхности «хвостом» ГК-разрушения (Рис. 5.4а), и за пределами воздушной границы, т.е. вне гематомы при повреждении поверхности атомизацией (Рис. 5.4б), до расстояний, при которых поверхность не повреждалась. Эти пред- и постфокальные расстояния, называемые здесь «безопасными расстояниями» ($L_{внутри}$ и $L_{вне}$), представлены в Табл. 5.2 и оказались больше для менее фокусированных излучателей. При расположении фокуса внутри образца и инициации кипения повреждение поверхности исчезало на меньших расстояниях ($L_{внутри}$), чем при расположении фокуса вне образца и атомизации поверхности ($L_{вне}$). Для наименее фокусированного излучателя (т.е. с наибольшим $F\# = 1.51$) было показано, что безопасное расстояние при фокусировке внутри гематомы составляло больше 16 мм, но точно не было определено экспериментально из-за чрезмерно большой толщины гематомы, необходимой

для генерации полноразмерного ГК-разрушения при значительной глубине фокуса внутри гематомы [51].

Как видно на Рис. 5.4а, в случае расположения фокуса перед воздушной границей, ГК-разрушения внутри гематом (нижний ряд) имели форму «головастика», типичную для ГК и указывающую на то, что поверхностное повреждение было вызвано потоком разрушенных фрагментов ткани, т.е. «хвостом» ГК-разрушения. Это также подтверждается круглой формой повреждения поверхности, вызванного таким потоком (Рис. 5.4а, верхний ряд), в отличие от более неправильной формы поверхностного разрушения, вызванного акустической атомизацией (Рис. 5.4б, верхний ряд, средняя фотография).

Форма разрушения также зависела от угла фокусировки излучателя (Табл. 5.2). Когда фокус был расположен внутри образца, менее сфокусированные излучатели создавали более узкие в поперечном направлении и вытянутые в продольном направлении ГК-разрушения, с большим диаметром разрушения на поверхности (Табл. 5.2). Когда фокус располагался за пределами гематомы в воздухе, разрушения, вызванные атомизацией при меньших углах фокусировки, были глубже, а их диаметр на поверхности гематомы оказывался меньше.

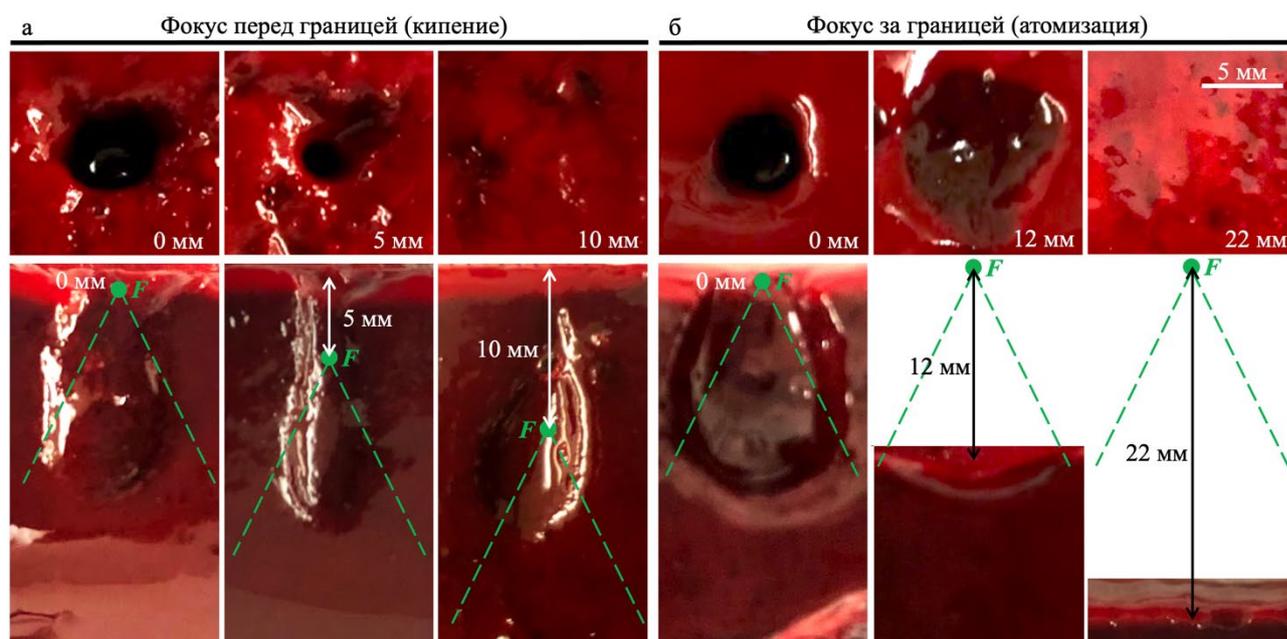


Рис. 5.4. Иллюстрация изменения диаметра поверхностного разрушения (верхний ряд) и его формы в аксиальной сечении (нижний ряд) в зависимости от расстояния между фокусом F (зеленая точка) и границей гематома–воздух на примере излучателя с $F\# = 1.02$. (а) Фокус расположен на поверхности (левый столбец), в 5 мм до поверхности (средний столбец) и на безопасном расстоянии $L_{\text{внутри}} = 10$ мм до поверхности (правый столбец). (б) Фокус расположен на поверхности (левый столбец), на расстоянии 12 мм за поверхностью (средний столбец) и на безопасном расстоянии $L_{\text{вне}} = 22$ мм от поверхности (правый столбец). Зеленым пунктиром отмечена геометрия падающего акустического пучка. NIFU-воздействие осуществлялось: (верхний ряд) на наблюдателя, (нижний ряд) снизу вверх. Маркерная линия: 5 мм.

$F\#$	$L_{\text{внутри}}, \text{ мм}$	$\Delta z_{\text{пост}}, \text{ мм}$	$L_{\text{вне}}, \text{ мм}$	$\langle l \rangle, \text{ мм}$	$\Delta z_{\text{пред}}, \text{ мм}$	$\langle d \rangle, \text{ мм}$	$\langle D \rangle, \text{ мм}$	$\Delta r, \text{ мм}$
0.83	7	6.45	18	8.2 ± 0.8	5.25	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.5	1.7
1.13	10	13.8	22	10.1 ± 1.3	9.9	2.41 ± 1.03	2.1 ± 0.5	2.3
1.6	>16	30.5	30	22.5 ± 0.7	18.7	5.7 ± 0.5	3.1 ± 1.1	3.34

Табл. 5.2. Сравнение размеров ГК-разрушений с параметрами численно рассчитанного падающего поля при линейной фокусировке: $F\#$ – диафрагменное число, $L_{\text{внутри}}$ и $L_{\text{вне}}$ – безопасные расстояния при фокусировке, соответственно, внутри и вне гематомы, $\Delta z_{\text{пост}}$ и $\Delta z_{\text{пред}}$ – расстояния от фокуса до первого пост- и предфокального нуля давления, $\langle l \rangle$ – средняя длина «головы» ГК-разрушения при расположении фокуса до воздушной границы (т.е. внутри гематомы), $\langle d \rangle$ – средний диаметр разрушения на поверхности при расположении фокуса внутри гематомы, а поверхности вне фокального пятна, $\langle D \rangle$ – средний диаметр «хвоста» ГК-разрушения при расположении фокуса внутри гематомы, Δr – ширина фокальной перетяжки между нулями давления.

На Рис. 5.5 показано сравнение среднего диаметра наблюдаемого поверхностного разрушения (диаметр d на Рис. 5.2г) с типичными ГК-разрушениями, получаемыми в толще гематомы вдали от ее границ (фотографии на фоне на Рис. 5.5). Видно, что предфокальное безопасное расстояние (отмеченное красным крестиком слева на каждом рисунке), полученное при фокусировке вне гематомы, оказалось значительно дальше от фокуса, чем граница «головы» типичного ГК-разрушения в объеме вдали от воздушных границ. Это результат указывает на различие механизмов атомизации плоской воздушной границы и искривленной поверхности парагазового пузыря, формируемого во время ГК. В то же время, постфокальное безопасное

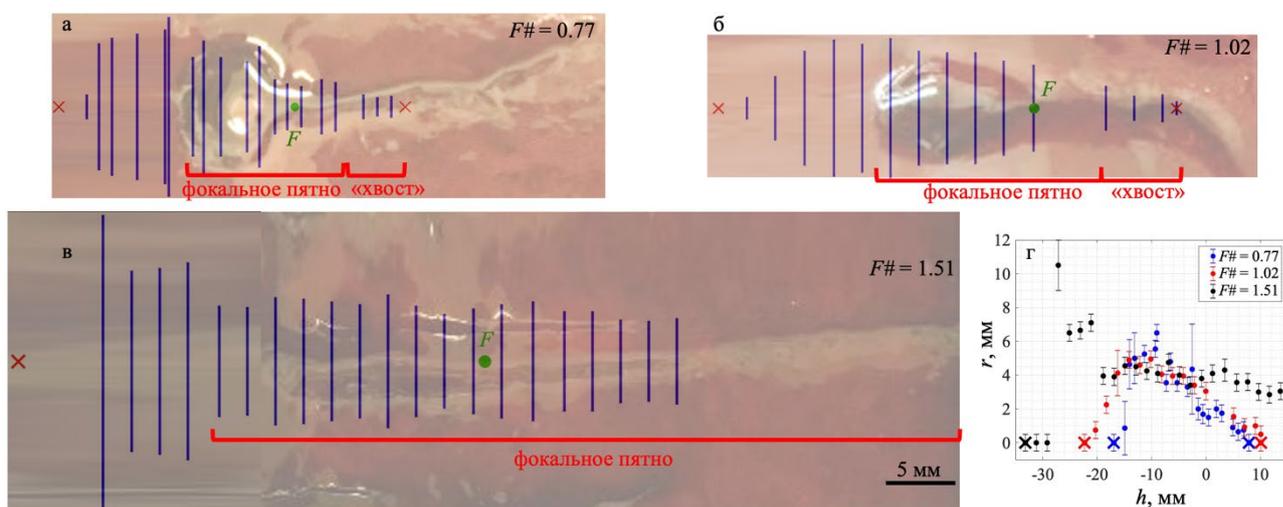


Рис. 5.5. (а–в) Средние диаметры разрушений на поверхности гематомы (синие вертикальные линии, обозначающие диаметр d с Рис. 5.2г) при разных положениях поверхности относительно фокуса излучателя F (зеленая точка), наложенные на фотографии типичных ГК-разрушений в объеме гематомы вдали от воздушных границ. Красными крестиками на (а–в) отмечены безопасные расстояния между фокусом и поверхностью. ИФУ-воздействие осуществлялось слева направо. Маркерная линия: 5 мм. (г) Средние радиусы разрушений на поверхности в зависимости от расстояния между фокусом и воздушной границей: фокус расположен в h мм до границы ($h < 0$, т.е. внутри гематомы) или за границей ($h > 0$, т.е. вне гематомы). Крестиками на (г) отмечены безопасные расстояния между фокусом и поверхностью. Погрешности учитывают стандартные отклонения и инструментальную погрешность линейки.

расстояние (отмеченное красным крестиком справа на каждом рисунке) оказалось, наоборот, меньше длины «хвоста» типичного ГК-разрушения в объеме, что, вероятно, связано с наличием поверхностного натяжения на границе гематомы и воздуха, сдерживающего поток разрушенной ткани, в отличие от случая генерации разрушения в объеме гематомы вдали от воздушных границ. Также было показано, что в пределах фокального пятна диаметр d разрушения на поверхности близок к ширине «головы» ГК-разрушения, что больше средней ширины поверхностного повреждения, когда поверхность находилась за пределами фокального пятна в постфокальной области (Рис. 5.5).

5.3.2 Корреляция высокоамплитудных разрушений с параметрами поля

Как видно из Табл. 5.2, постфокальное безопасное расстояние расположения границы (т.е. $L_{\text{внутри}}$, т.к. фокус при этом располагается внутри гематомы) близко к расстоянию от фокуса до первого постфокального нуля давления в численно рассчитанном линейном поле ($\Delta z_{\text{пост}}$), в то время как предфокальное безопасное расстояние (т.е. $L_{\text{вне}}$, т.к. фокус при этом находится вне гематомы) более чем в 2 раза превышает расстояние до первого предфокального нуля давления ($\Delta z_{\text{пред}}$). Однако это расстояние $\Delta z_{\text{пред}}$ коррелирует со средней длиной «головы» ГК-разрушения ($\langle l \rangle$), что согласуется с результатами для типичных ГК-разрушений в толще гематомы вдали от воздушной границы [51, 52]. Ширина «головы» ГК-разрушения не коррелировала с какими-либо параметрами акустического поля. Средний диаметр поверхностного разрушения $\langle d \rangle$, когда фокус находился внутри гематомы, но поверхность при этом находилась за пределами фокального пятна, коррелировал с шириной фокальной перетяжки Δr и средним диаметром «хвоста» ГК-разрушения $\langle D \rangle$ (Табл. 5.2). Для самого слабо-фокусированного излучателя средний диаметр повреждения на поверхности был больше, чем типичная ширина «хвоста» и фокальной перетяжки, что, вероятно, связано с тем, что поверхность все еще находилась в пределах фокального пятна даже на самом дальнем рассматриваемом расстоянии от фокуса и, следовательно, повреждалась не «хвостом» разрушения, а в том числе механизмами образования «головы» ГК-разрушения.

На Рис. 5.6 представлен иллюстративный пример (а–в) и обобщенные результаты (г) корреляции формы поверхностного разрушения с полем отрицательного давления в нелинейном акустическом поле, создаваемом в гематоме с учетом отражения от ее дна разрушения при расположении фокуса вне гематомы в воздухе. Оказалось, что границы поверхностных разрушений не выходили за изолинию в 4 МПа пикового отрицательного давления на дне разрушения. Это видно как при наложении поверхностных разрушений на поле квазистоячей волны (Рис. 5.6а–в), так и по радиусам поверхностных разрушений, которые были меньше, чем соответствующие радиусы изолинии пикового отрицательного давления в 4 МПа (Рис. 5.6г). Это значение пикового отрицательного давления в стоячей волне с учетом отражения в данном

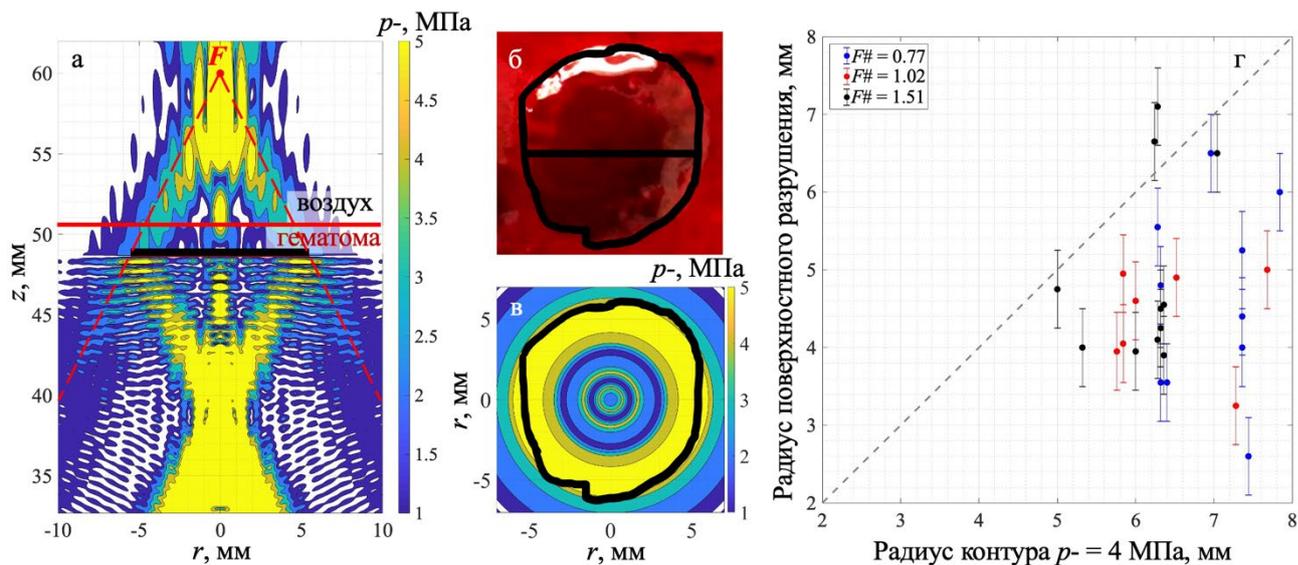


Рис. 5.6. Иллюстрация корреляции поверхностного разрушения, вызванного атомизацией, со структурой и амплитудами поля пикового отрицательного давления с учетом отражения: (а–в) на примере излучателя с $F\# = 0.77$ при расположении фокуса F (красная точка) в 10 мм за границей гематома–воздух; и (г) для всех излучателей при различных положениях фокуса. (а) Изолинии численно рассчитанного поля пикового отрицательного давления в 1, 2, 3, 4 и 5 МПа в аксиальной плоскости, с наложенным диаметром поверхностного разрушения (черная сплошная линия). Красным пунктиром отмечена геометрия падающего акустического пучка. (б) Диаметр и контур поверхностного разрушения (черные сплошные линии), наложенные на его макроскопическую фотографию. (в) Контур поверхностного разрушения (черная сплошная линия), наложенный на изолинии пикового отрицательного давления в 1, 2, 3, 4 и 5 МПа в плоскости его максимального значения, найденного в слое толщиной с четверть волны под дном разрушения. HIFU-воздействие осуществлялось: (а) снизу вверх, (б,в) на наблюдателя. Масштаб на (а–в) одинаков. (г) Диаметры поверхностных разрушений, полученных атомизацией поверхности при расположении фокуса за границей гематома–воздух (т.е. вне гематомы), в зависимости от радиуса изолинии пикового отрицательного давления в 4 МПа в плоскости его максимального значения, найденного в слое толщиной с четверть волны под дном разрушения. Пунктиром отмечена линия равенства величин по двум осям.

случае также соответствовало изолинии в 4 МПа размаха давления в падающем акустическом поле. Полученные значения давления считались порогом атомизации поверхности.

Пороговые значения отрицательного давления, приводящие к атомизации поверхности гематомы и определенные на основе корреляции ГК-разрушений с создаваемыми акустическими полями для всех положений фокуса вне гематомы, представлены на Рис. 5.7а. Видно, что пороговые значения зависели от положения фокуса относительно воздушной границы и, как правило, были выше для положений фокуса в пределах 10 мм от поверхности. Предположительно, это может быть связано с сильным искривлением поверхности гематомы силой радиационного давления, когда она находится в пределах фокальной области, что, как сообщалось в работе [43], может приводить к дополнительной фокусировке отраженной волны под искривленной поверхностью. Хотя точная высота искривления поверхности гематомы здесь не измерялась, оценка аксиального смещения ткани за счет радиационной силы по формуле (5.2)

показала, что, в пределах времени до начала кипения из Табл. 5.1, фокальная область и связанная с ней область разрушения заметно, порядка своего размера, растягиваются вдоль оси (на 2–4.5 мм), что могло повлиять на особенности наблюдаемой структуры разрушений и, соответственно, изменение структуры акустического поля (Рис. 5.7б). При этом численное моделирование нелинейного поля и его отражение в этой работе выполнялось для плоской стационарной поверхности раздела гематома–воздух и, таким образом, могло привести к ошибочно завышенным значениям давления. Кроме того, когда фокус находился вне гематомы, но в непосредственной близости от ее поверхности (до 4 мм), эхо-импульсный датчик фиксировал пузырьковую активность внутри аксиально смещенной ткани (звездочки на Рис. 5.7а), что свидетельствовало о генерации кипения и, соответственно, повреждении поверхности ГК-разрушением, а не атомизацией. В связи с упомянутыми выше ограничениями, пороговые значения атомизации были определены консервативно как наиболее низкие значения отрицательного давления, приводящие к повреждению поверхности гематомы при всех положениях фокуса (пунктирная рамка на Рис. 5.7а). Эти значения были одинаковыми для всех трех излучателей и варьировались в пределах 4–6 МПа, что близко к результатам, полученным в работе [43] при фокусировке на плоской границе раздела говяжьей гематомы и воздуха.

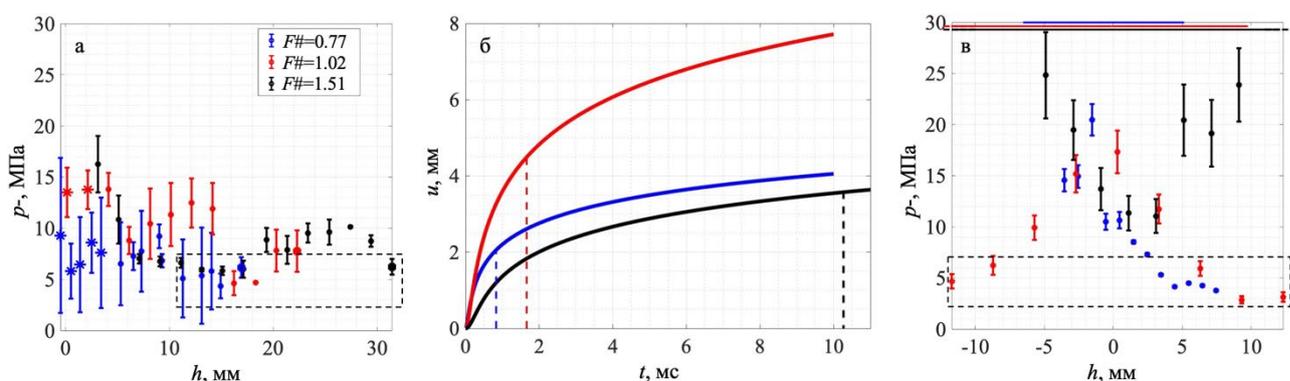


Рис. 5.7. (а) Пороговые значения пикового отрицательного давления (т.е. его максимальная амплитуда в стоячей волне в слое толщиной $\lambda/4$ под дном разрушения, вызванного атомизацией поверхности) в зависимости от расстояния h расположения фокуса за воздушной границей ($h > 0$). Звездочками указаны разрушения, вызванные «хвостом» ГК-разрушения при инициации кипения; квадратами указаны случаи расположения фокуса на безопасном расстоянии от воздушной границы; круглыми символами отмечены разрушения, вызванные атомизацией поверхности. В пунктирной рамке выделены наиболее низкие значения отрицательного давления, вызывающие повреждение поверхности гематомы. (б) Теоретическая оценка смещения ткани (сплошные кривые) в области фокуса под действием радиационной силы при расположении фокуса внутри сгустка крови в зависимости от времени воздействия в пределах длительности импульса. Пунктирными вертикальными отрезками отмечено время начала кипения. (в) Пороговые значения пикового отрицательного давления (т.е. его максимальная амплитуда в стоячей волне в слое толщиной 2λ под границей раздела гематома–воздух), приводящие к низкоамплитудному повреждению поверхности гематомы. Пунктирной рамкой выделены положения фокуса на краю или за пределами фокального пятна. Горизонтальными отрезками наверху графика (в) отмечено положение фокального пятна каждого из трех излучателей.

5.3.3 Низкоамплитудные пороги разрушения поверхности

Пороговые значения атомизации, определенные в низкоамплитудных экспериментах, представлены на Рис. 5.7в. Видно, что, как и в высокоамплитудном случае, пороговые значения давления сильно зависели от положения фокуса относительно поверхности гематомы, и для двух наиболее фокусированных излучателей эта зависимость имела хорошо выраженный максимум. Максимум соответствовал расположению фокуса на поверхности, а зависимость сглаживалась на расстояниях от фокуса, превышающих длину фокального пятна, которая указана для каждого излучателя горизонтальными линиями сверху Рис. 5.7в. Предположительно, эта зависимость может быть также вызвана подъемом и искривлением поверхности сгустка радиационной силой. Таким образом, пороговые значения учитывались только для положений поверхности гематомы за пределами фокального пятна (пунктирная рамка на Рис. 5.7в). Полученные пороговые пиковые отрицательные давления оказались в пределах 3–6 МПа, что согласуется с результатами высокоамплитудных экспериментов, приведенных выше в п. 5.3.2. Для самого слабо-фокусированного излучателя измеренные пороговые значения не показали такого же поведения и оказались выше, чем для двух других излучателей на больших расстояниях поверхности от фокуса. Это, скорее всего, связано с тем, что даже при самых дальних положениях поверхности от фокуса такого слабо-фокусированного излучателя, она все еще располагалась внутри его фокальной зоны (отмечена черной горизонтальной линией сверху Рис. 5.7в), что, вероятно, опять же приводило к искривлению поверхности гематомы и искажению уровней давления под ней. В связи с этим порог низкоамплитудного разрушения поверхности гематомы для излучателя с $F\# = 1.51$ не был определен.

5.3.4 Предсказание контуров безопасности вокруг фокуса по структуре ультразвукового поля

Результаты, описанные выше, позволили выделить зону вокруг фокуса, внутри которой расположение границы ткани с газосодержащими органами при облучении в режимах гистотрипсии может привести к их повреждению, на основании структуры акустического поля и типичных размеров ГК-разрушений в толще ткани вдали от воздушных границ (Рис. 5.8). В частности, на основании результатов из Рис. 5.6–5.7 контур опасной зоны в предфокальной области можно связать с изолинией пикового отрицательного давления в 4 МПа в стоячей волне, или же в 4 МПа по размаху давления в падающей волне. По результатам, представленным на Рис. 5.5 и в Табл. 5.2, контур опасной зоны в пределах фокального пятна определяется максимальной шириной типичного ГК-разрушения в объеме (зависящей от разрушаемой ткани и известной для нескольких типов ткани [42, 43, 50, 51, 107]), а в постфокальной зоне – шириной фокальной перетяжки и положением первого постфокального нуля давления. Поскольку безопасное расстояние для наименее фокусированного излучателя (с $F\# = 1.51$) не было определено, но было показано, что оно превышает 16 мм, при построении контура опасной зоны

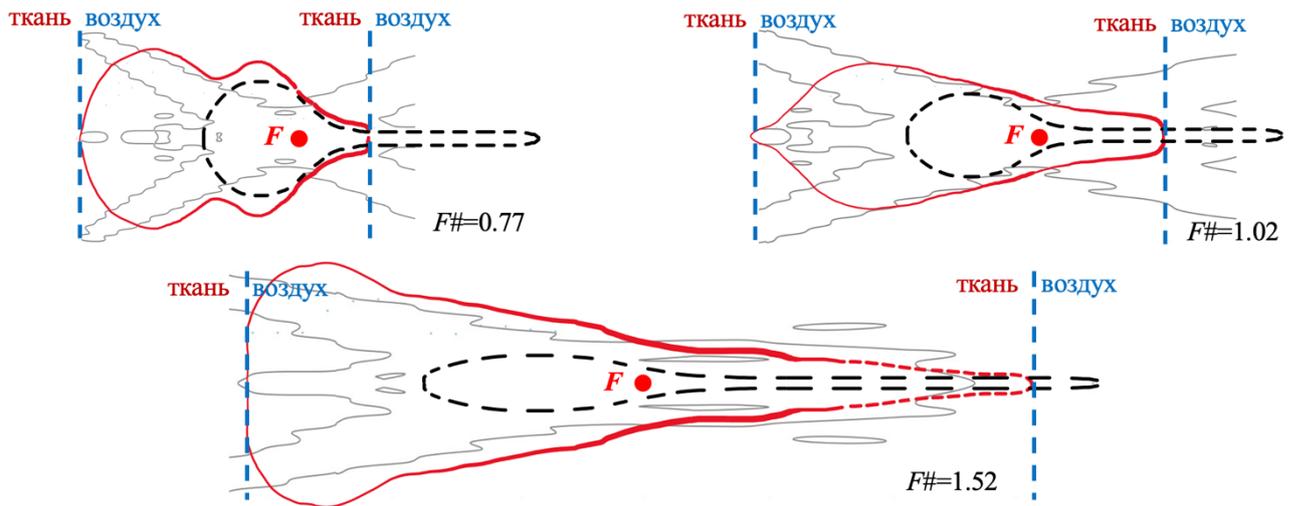


Рис. 5.8. Контур экспериментально определенной зоны опасного расположения границы гематомы с воздухом (красная кривая) вблизи геометрического фокуса излучателя F (красная точка) на фоне изолинии численно рассчитанного размаха давления в падающей волне в 4 МПа (тонкие черные кривые) и формы типичного ГК-разрушения в объеме гематомы вдали от воздушной границы (черная пунктирная кривая). HIFU-воздействие осуществляется слева направо. Синим вертикальным пунктиром показаны граничные положения поверхности раздела ткани и воздуха, расположение между которыми может привести к ее повреждению.

для этого излучателя использовались закономерности, установленные для двух других излучателей: контур строился по ширине фокальной перетяжки до первого постфокального нуля давления (пунктирный красный контур на Рис. 5.8).

Поскольку типичные ГК-излучатели и их акустические поля обычно аксиально-симметричны, то полученные разрушения и определенные на их основе контуры опасной зоны вблизи фокуса в этом исследовании также считались аксиально-симметричными. Таким образом, трехмерные зоны опасности, т.е. некоторого объема, в пределах которого следует избегать расположения воздухосодержащих органов во избежание их повреждения, могут быть получены вращением контуров на Рис. 5.8 вокруг оси излучателя. Стоит отметить, что полученные контуры опасной зоны не очерчивают ожидаемое разрушение, а определяют опасный объем, в пределах которого не должны присутствовать границы разрушаемой ткани с воздухосодержащими органами, чтобы избежать их повреждения.

Поскольку в этом исследовании контуры опасной зоны вокруг фокуса были получены с использованием конкретных протоколов ГК-воздействия, а, как обсуждалось во введении к этой главе, изменения частоты ультразвука, длительности импульсов, их количества на точку или частоты их повторений могут влиять на результат ГК-воздействия, то необходимо обсудить потенциальное влияние этих параметров облучения на полученные зоны опасности.

Рабочая частота излучателя. Частота в 1.5 МГц была выбрана здесь в качестве иллюстративного случая для абдоминальных HIFU-приложений в целом и ГК в частности, которые обычно используют диапазон 1–2 МГц [42, 47, 50, 60, 190–192] и наиболее опасны с

точки зрения близости к газосодержащим органам, таким как кишечник и легкие. В этом исследовании не рассматривалась зависимость порога атомизации и контура опасной зоны от частоты ультразвука, однако в работе [43] было показано, что пороги давления атомизации воды были одинаковыми в диапазоне частот 0.155–2 МГц, в связи с чем можно предположить, что полученные в этой части работы пороговые давления должны быть применимы и к другим частотам в этом диапазоне.

Угол фокусировки пучка. Все три излучателя с разными углами фокусировки ($F\#$ от 0.77 до 1.51), исследованные в этой части работы, создавали поверхностные разрушения в пределах контура пикового отрицательного давления в 4 МПа при предфокальном положении поверхности, в пределах ширины типичной «головы» ГК-разрушения при положении в фокальной области, и в пределах нуля давления при постфокальном положении воздушной границы (Рис. 5.8). Эти результаты позволяют сделать вывод, что установленные контуры опасной зоны применимы для любого угла фокусировки в исследуемом диапазоне, характерном для практических применений HIFU и ГК.

Количество импульсов для этого исследования было выбрано достаточно большим, чтобы достичь насыщения размера ГК-разрушения в любых тканях, исследованных в этом контексте. В связи с этим, можно рассчитывать, что использование большего числа импульсов не приведет к повреждению поверхности за пределами установленной опасной зоны, а использование меньшего количества импульсов приведет к повреждению поверхности внутри порогового контура. Это, в том числе, является одной из причин, по которой постановка эксперимента в этой части работы считалась наихудшим сценарием воздействия на мягкие ткани вблизи газосодержащих органов.

Тип ткани. Поскольку гематома представляет собой наиболее мягкую и потому легко разрушаемую модель ткани, можно предположить, что контуры опасной зоны для других биологических тканей будут меньше, чем полученные здесь для гематомы. Это также согласуется с рассмотрением в этой работе наиболее консервативной постановки эксперимента.

Длительность импульсов. В описанных здесь экспериментах использовались характерные для ГК длительности импульсов – 10 и 20 мс, однако, как было показано в предыдущих главах настоящей диссертации, ГК может осуществляться и при более коротких импульсах, 1–10 мс. Как было показано ранее как автором диссертации, так и в других работах, ГК-разрушения при более коротких импульсах всегда оказываются такими же или меньше, чем при более длинных импульсах [50, 107, 145]. Таким образом, можно ожидать, что контуры зоны опасности будут более узкими, чем полученные в этой работе, при использовании более коротких импульсов. В случае, наоборот, более длинных импульсов, чем рассмотренные в работе (например, 30–100 мс), ожидается, что, хотя пространственные размеры механического разрушения будут такими же

(как показано, например, в работе [49]), но на получаемом разрушении также будет сказываться проявление тепловых эффектов, что может привести к отличным пороговым значениям, чем были получены в этой работе.

Коэффициент заполнения. Здесь использовались типичные для ГК значения коэффициента заполнения в 1–2% для избежания проявления тепловых эффектов. Как было показано ранее в работе [48] и автором диссертации в работе [193 (A8)], при более высоких значениях этого параметра (5% и выше), стоит ожидать более выраженного теплового повреждения ткани и, соответственно, границы воздухосодержащего органа. Таким образом, определенные здесь пороги повреждения применимы только к низким коэффициентам заполнения (1–2%), которые вызывают исключительно механические разрушения.

Еще одной причиной, по которой рассматриваемую постановку эксперимента можно считать наиболее консервативным случаем воздействия на мягкие ткани рядом с воздухосодержащими органами, является то, что поверхность раздела ткань–воздух была плоской и ортогональной по отношению к падающему акустическому пучку, хотя это может быть не распространенным сценарием в практических клинических ситуациях. В случае наклонного падения пучка на границу раздела ткань–воздух конструктивная интерференция отраженной и падающей волн будет менее эффективной, в связи с чем пиковые давления в формирующейся стоячей волне будут ниже размаха давления в падающей волне. Соответственно, зона потенциального разрушения будет меньше, чем предсказываемая исходя из определенного здесь порога разрушения – 4 МПа размаха давления в падающей волне. Таким образом, постановка эксперимента в этом исследовании представляет собой наихудший сценарий с точки зрения угла падения на границу раздела ткани и воздуха.

Полученные в этой части работы результаты имеют практическую ценность для будущих клинических приложений гистотрипсии с кипением. В частности, на практике, при планировании воздействия в режиме реального времени, экспериментальное определение порога кипения по УЗИ-визуализации, как это делалось в Главах 2–4 настоящей диссертации, позволяет подтвердить достижение определенных амплитуд разрыва для кипения в течение установленного импульса, и тем самым дает представление о создаваемом акустическом поле *in situ*. Как только давление в фокальной области оказывается известно, контур размаха давления в 4 МПа (соответствующий контуру опасной зоны) может быть наложен на УЗИ-изображение целевого участка в предположении, что HIFU-пучок сохранил форму как в свободном поле, и использован для избежания воздухосодержащих структур внутри этой области при планировании воздействия. При этом для предсказания и минимизации aberrаций акустического пучка могут быть использованы развивающиеся сейчас процедуры коррекции aberrаций [88, 92, 93, 194], или же

акустическое поле *in situ* может быть предсказано на основе предоперационной компьютерной томографии [195].

§5.4 Выводы к пятой главе

В настоящей главе была проведена серия физических и численных экспериментов, посвященных безопасности импульсно-периодического ультразвукового воздействия на мягкие биологические ткани вблизи границы с газосодержащими органами. Наиболее опасный случай такого воздействия рассматривался на модели крупной гематомы *in vitro* с плоской воздушной границей. Корреляция экспериментально получаемых разрушений с численно рассчитанными ультразвуковыми полями, создаваемыми в эксперименте, показала, что область приповерхностного разрушения коррелирует с пространственной структурой поля и при этом отличается от типичных разрушений, получаемых в отсутствие воздушной границы вблизи фокуса воздействия. В частности, постфокальное безопасное расстояние расположения воздушной границы вблизи фокуса оказалось ближе, а предфокальное – дальше, чем границы типичного ГК-разрушения в толще биоткани вдали от воздушных границ. Полученные результаты позволили построить зоны опасного расположения границы ткани и воздуха вблизи фокуса излучателя, исходя из структуры создаваемого ультразвукового поля и типичных размеров ГК-разрушений в толще мягкой ткани. В частности, контур опасной зоны в предфокальной области можно построить по изолинии размаха давления в 4 МПа в падающей волне, в пределах фокального пятна – по максимальной ширине типичного ГК-разрушения в объеме, а в постфокальной области – по ширине фокальной перетяжки и положению первого постфокального нуля давления. При этом поскольку коагулированная кровь является наименее устойчивой к механическому разрушению по сравнению с другими биологическими тканями, а воздухосодержащие органы обычно окружены защитной оболочкой, полученные зоны опасности могут считаться достаточными при воздействии на произвольную биологическую ткань. Таким образом, предсказываемые по ультразвуковому полю контуры зоны опасности могут быть нанесены на УЗИ-изображение целевого участка в режиме реального времени и использованы для планирования безопасной для окружающих органов абляции целевого участка импульсным фокусированным ультразвуком.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В работе исследованы ударноволновые режимы фокусировки ультразвуковых полей различной геометрии, эффекты механического разрушения (гистотрипсии) биологических тканей с различной жесткостью в таких полях при импульсно-периодическом облучении и взаимосвязь скорости и эффективности разрушения со свойствами исследуемых тканей.

1. С использованием методов физического и численного экспериментов показано, что в полях фазированных решеток при электронном смещении фокуса вдоль оси пучка амплитуда ударного фронта в фокусе меняется значительно сильнее, чем амплитуда давления при линейной фокусировке (например, при смещении фокуса в сторону решетки с уменьшением давления в линейном поле на 10% амплитуда развитого разрыва увеличивается на 74%). Также геометрический способ регулировки угла фокусировки оказался предпочтительнее электронного, поскольку позволяет избежать формирования высокоамплитудных побочных максимумов и возможного образования в них ударных фронтов.

2. В модели гематомы человека как примере ткани с малой жесткостью измерены модули сдвига методами индентометра и эластографии сдвиговой волной и получены объемные разрушения в различных режимах гистотрипсии. Устойчивость гематом к механическому разрушению увеличивается со степенью ретракции при постоянной жесткости. Предложенный метод ультраструктурного анализа показал, что во всех режимах гистотрипсии происходит ликвидация гематом на фрагменты размером менее 210 мкм, что обеспечивает возможность их дальнейшей аспирации. Наибольшая скорость разрушения достигается при использовании импульсов субмиллисекундной длительности в гематомах с большим содержанием жидкости.

3. Экспериментально продемонстрирована возможность гистотрипсии тканей предстательной железы человека и злокачественной опухоли в ней как примера ткани с большой жесткостью. Показано, что необходимая доза для механического разрушения ткани простаты в 4 раза выше, чем гематомы, при этом наибольшая скорость разрушения также достигается с помощью более коротких импульсов при достаточной амплитуде ударного фронта в фокусе.

4. Предложена концепция механической дозы. Показано, что для разрушения тканей средней жесткости (печени и миокарда) требуется в 3 раза меньшая доза, чем для ткани простаты человека. Разработанный нейросетевой алгоритм количественного гистологического анализа показал, что пороговая доза ниже при использовании коротких (1–2 мс) импульсов, а длинные (5–10 мс) импульсы лучше разрушают структуру тканей с высоким содержанием коллагена.

5. Проведены физические и численные эксперименты по определению пороговых параметров акустического поля, позволяющих выделить пространственный объем вокруг фокуса, внутри которого расположение границы ткани с газосодержащими органами при облучении в режимах гистотрипсии может привести к их повреждению.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить слова благодарности своему научному руководителю, Вере Александровне Хохловой, за неиссякаемый запас энергии, бесконечное терпение, готовность помочь, выслушать и поддержать в любое время суток, а также за невероятное множество предоставленных возможностей для моего развития в качестве молодого ученого как в стенах факультета, так и в поездках на школы, конференции и стажировки. На протяжении всего моего обучения в университете ее энтузиазм, научный опыт и вера в результат служили мне примером, вдохновляли и давали силы двигаться вперед.

Отдельное спасибо хочется сказать моему научному консультанту и наставнику, Сергею Валентиновичу Буравкову, который первым познакомил меня с деятельностью экспериментатора и заразил невероятным интересом к работе на стыке медицины и физики. Огромная благодарность ему за подробные ответы на мои бесконечные вопросы в различных областях, без которых эта диссертация была бы невозможна, и, конечно, за поддержание во время работы легкой и дружеской атмосферы.

Хочу поблагодарить Олега Анатольевича Сапожникова за готовность и искреннее желание всегда уделить время на обсуждение любых вопросов, за талант простыми словами объяснить вещи любой сложности, а также за умение поддержать в трудную минуту, сохранить позитивный настрой и мотивировать к саморазвитию. Его эрудированность и начитанность всегда служили для меня недостижимым примером и источником вдохновения.

Я невероятно признательна всему коллективу Лаборатории медицинского и промышленного ультразвука МГУ за готовность помочь в любой момент и поддержание приятной атмосферы в лаборатории, благодаря чему в нее всегда хочется возвращаться. Особенно хотелось бы поблагодарить Сергея Алексеевича Цысая, Павла Росницкого, Марию Карзову, Анастасию Квашенникову и Ксению Туманову за их безграничное терпение, умение развеселить, поддержать и создать приятную атмосферу во время наших долгих экспериментов, без которых была бы невозможна эта диссертационная работа. Также большое спасибо Анастасии Бобиной, Арине Мироновой, Алине Богославской, Анне Кунтуровой, Полине Пестовой и Дарье Чуповой за их готовность всегда помочь в экспериментах. Отдельное спасибо Петру Викторовичу Юлдашеву за разработку программы NIFU beam, без которой была бы невозможна подавляющая часть настоящей работы. Я очень благодарна Алисе Крохмаль за готовность всегда поделиться опытом и за ее терпеливые ответы на мои бесконечные вопросы. Благодарю Дмитрия Николаева и Азамата Калоева за предоставление данных и подробные ответы на мои вопросы об акустической голографии. Спасибо Леониду Рафаиловичу Гаврилову за внимательное прочтение моих работ и ценные замечания.

Я искренне благодарна коллективу Центра медицинского и промышленного ультразвука университета шт. Вашингтон за передачу мне своего научного опыта и поддержание дружеской атмосферы во время работы и вне нее. Отдельное спасибо хочется сказать Татьяне Дмитриевне Хохловой, без которой была бы невозможна большая часть этой работы, за то, что приняла меня в лаборатории, терпеливо выделяла на меня свое время и всегда находила энергию поделиться своим опытом и обсудить все детали работы и не только.

Отдельно хочется поблагодарить А.В. Кадрова за его искреннее научное любопытство и готовность всегда выделить время на эксперименты. Большое спасибо А.Г. Богданову, Н.Н. Старостину, П.Е. Трахтману, П.Г. Малькову, Н.В. Даниловой, А.А. Камалову, Т.И. Миленкович, Д.А. Охоботову, А.Л. Черняеву, В.П. Черникову и В.А. Рожкову, без участия которых эксперименты этой работы не смогли бы состояться.

Благодарю весь коллектив кафедры акустики за неоценимый вклад их лекций и семинаров в мою научную работу и развитие меня как молодого ученого.

И, конечно, невероятная благодарность моим родителям и Юре за то, что всегда были рядом, верили в меня, неустанно помогали и не давали падать духом даже в самые трудные моменты.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:

- A1. **Ponomarchuk E.M.**, Yuldashev P.V., Nikolaeva D.A., Tsysar S.A., Mironova A.A., Khokhlova V.A. *Nonlinear ultrasound fields generated by an annular array with electronic and geometric adjustment of its focusing angle* // Acoustical Physics. 2023. Vol. 69. No. 4. P. 459–470. **IF = 0,8 (WoS)**
- A2. 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. P. 107029. **IF = 4,2 (WoS)**
- A3. **Ponomarchuk E.M.**, Hunter C., Song M., Khokhlova V.A., Sapozhnikov O.A., Yuldashev P.V., Khokhlova T.D. *Mechanical damage thresholds for hematomas near gas-containing bodies in pulsed HIFU fields* // Physics in Medicine and Biology. 2022. Vol. 67. No. 21. P. 215007. **IF = 3,5 (WoS)**
- A4. Khokhlova V.A., Rosnitskiy P.B., Tsysar S.A., Buravkov S.V., **Ponomarchuk E.M.**, Sapozhnikov O.A., Karzova M.M., Khokhlova T.D., Maxwell A.D., Wang Y.N., Kadrev A.V., Chernyaev A.L., Chernikov V.P., Okhobotov D.A., Kamalov A.A., Schade G.R. *Initial assessment of boiling histotripsy for mechanical ablation of ex vivo human prostate tissue* // Ultrasound in Medicine and Biology. 2022. Vol. 49. No. 1, P. 62–71. **IF = 2,9 (WoS)**
- A5. **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 in Medicine and Biology. 2021. Vol. 47. No. 9. P. 2608–2621. **IF = 2,9 (WoS)**
- A6. Khokhlova T.D., Kucewicz J.C., **Ponomarchuk E.M.**, Hunter C., Bruce M., Khokhlova V.A., Matula T.J., Monsky W. *Effect of stiffness of large extravascular hematomas on their susceptibility to boiling histotripsy liquefaction in vitro* // Ultrasound in Medicine and Biology. 2020. Vol. 46. No. 8. P. 2007–2016. **IF = 2,9 (WoS)**
- A7. Топчу К.Д., **Пономарчук Е.М.**, Кунтурова А.В., Росницкий П.Б., Хохлова Т.Д., Ванг Я.Н., Хохлова В.А., Буравков С.В. *Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2019. Т. 8. № 4. С. 42–48. **IF = 0,332 (Scopus)**
- A8. Буравков С.В., **Пономарчук Е.М.**, Хохлова Т.Д., Ванг Я.Н., Хохлова В.А. *Морфологические проявления повреждения печени свиньи при воздействии высокоинтенсивным импульсным фокусированным ультразвуком in vivo* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. Т. 6. № 3. С. 38–43. **IF = 0,332 (Scopus)**

Публикация в рецензируемом научном журнале из перечня ВАК РФ:

A9. **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. 2016. № 4. С. 164701. **IF = 0,074 (РИНЦ)**

Статьи в сборниках и тезисы докладов:

A10. **Ponomarchuk E.**, Song M., Thomas G., Khokhlova V., Khokhlova T. *Effects of focus steering trajectory on the efficiency of volumetric mechanical ablation of tissue using boiling histotripsy* // Abstract Book of the 22nd International Symposium of ISTU/6th European Symposium of EUFUS. Lyon, France, 2023.

A11. Khokhlova V., Rosnitskiy P., Tsysar S., Karzova M., Buravkov S., Danilova N., **Ponomarchuk E.**, Sapozhnikov O., Khokhlova T., Maxwell A., Wang Y.-N., Kadrev A., Chernyaev A., Schade G. *Boiling histotripsy ablation of ex vivo human prostate tissues with benign hyperplasia and adenocarcinoma* // Abstract Book of the 22nd International Symposium of ISTU/6th European Symposium of EUFUS. Lyon, France, 2023.

A12. Миронова А.А., **Пономарчук Е.М.**, Квашенникова А.В., Цысарь С.А., Хохлова В.А. *Численно-экспериментальная характеристика кольцевой фазированной решетки для режимов гистотрипсии с электронным смещением фокуса* // Сборник тезисов XXX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2023». Москва, 2022. С. 10–12.

A13. Богославская А.В., Пономарчук Е.М., Квашенникова А.В., Буравков С.В., Хохлова В.А. *Гистологический анализ изменений во времени фибриновой сети в модели гематомы человека in vitro* // Сборник тезисов XXX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2023». Москва, 2022. С. 144–146.

A14. **Пономарчук Е.М.**, Крохмаль А.А., Квашенникова А.В., Сонг М., Тома Ж., Ванг Я.Н., Хохлова В.А., Хохлова Т.Д. *Количественный анализ восприимчивости биологических тканей к механическому разрушению импульсным высокоинтенсивным фокусированным ультразвуком* // Сборник трудов XXXV Сессии Российского акустического общества. ГЕОС Москва, 2023. С. 784–789.

A15. Хохлова В.А., **Пономарчук Е.М.**, Сонг М., Тома Ж.П., Хохлова Т.Д. *Эффективность объёмной ликвидации биоткани мощным импульсным ультразвуком при различных траекториях перемещения фокуса* // Сборник трудов XXXV Сессии Российского акустического общества. ГЕОС Москва, 2023. С. 777–782.

A16. Росницкий П.Б., Цысарь С.А., Карзова М.М., Буравков С.В., Данилова Н.В., **Пономарчук Е.М.**, Юлдашев П.В., Сапожников О.А., Кадрев А.В., Черняев А.Л., Черников В.П., Охоботов Д.А., Камалов А.А., Хохлова В.А. *Неинвазивная механическая деструкция аденокарциномы*

- простаты человека ex vivo методом гистотрипсии с кипением* // Сборник трудов XXXV Сессии Российского акустического общества. ГЕОС Москва, 2023. С. 783–783.
- A17. **Ponomarchuk E.M.**, Krokhmal A.A., Tyurina A.V., Song M., Thomas G., Wang Y.N., Khokhlova V.A., Khokhlova T.D. *Quantitative assessment of tissue susceptibility to boiling histotripsy* // Abstract Book of the 21nd International Symposium of ISTU. Toronto, Canada, 2022. P2–6.
- A18. Tumanova K.D., **Ponomarchuk E.M.**, Kunturova A.V., Tyurina A.V., Kadrev A.V., Buravkov S.V., Khokhlova V.A. *Changes of mechanical and ultrastructural characteristics of in-vitro human hematomas over time* // Abstract Book of the 21nd International Symposium of ISTU. Toronto, Canada, 2022. P3–37.
- A19. **Пономарчук Е.М.**, Росницкий П.Б., Цысарь С.А., Карзова М.М., Тюрина А.В., Кадрев А.В., Буравков С.В., Трахтман П.Е., Старостин Н.Н., Сапожников О.А., Хохлова В.А. *Упругие свойства модели человеческой гематомы и ее разжижение импульсным фокусированным ультразвуком* // Сборник тезисов конференции «Ломоносовские чтения – 2022». Москва, 2022. С. 24–25.
- A20. Росницкий П.Б., Цысарь С.А., Карзова М.М., **Пономарчук Е.М.**, Тюрина А.В., Буравков С.В., Кадрев А.В., Хохлова Т.Д., Шейд Д.Р., Сапожников О.А., Максвелл А.Д., Черняев А.Л., Хохлова В.А. *Метод гистотрипсии с кипением для механической абляции опухолей простаты человека ex vivo* // Сборник тезисов конференции «Ломоносовские чтения – 2022». Москва, 2022. С. 204–205.
- A21. Миронова А.А., Тюрина А.В., **Пономарчук Е.М.** *Анализ фрагментов крупных гематом человека после их разжижения методом гистотрипсии* // Сборник тезисов XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2022». Москва, 2022. С. 6–8.
- A22. Соболева А.А., **Пономарчук Е.М.** *Методы оценки степени разрушения биологической ткани импульсным фокусированным ультразвуком* // Сборник тезисов XXIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2022». Москва, 2022. С. 12–14.
- A23. **Пономарчук Е.М.**, Росницкий П.Б., Цысарь С.А., Хохлова Т.Д., Карзова М.М., Тюрина А.В., Туманова К.Д., Кадрев А.В., Буравков С.В., Трахтман П.Е., Старостин Н.Н., Сапожников О.А., Хохлова В.А. *Упругие свойства модели человеческой гематомы и ее восприимчивость к ликвификации импульсным фокусированным ультразвуком* // Сборник трудов XXXIV сессии Российского акустического общества. Москва, 2022. С. 912–919.
- A24. **Ponomarchuk E.M.**, Rosnitskiy P.B., Tsysar S.A., Khokhlova T.D., Karzova M.M., Tyurina A.V., Tumanova K.D., Kadrev A.V., Buravkov S.V., Trakhtman P.E., Starostin N.N., Sapozhnikov O.A., Khokhlova V.A. *Elastic properties of human hematoma model and its sensitivity to histotripsy liquefaction (ASA meeting abstract)* // The Journal of the Acoustical Society of America. Seattle, USA, 2021. V. 150, N. 4. P. A84.

- A25. Rosnitskiy P.B., Tsysar S.A., Karzova M.M., **Ponomarchuk E.M.**, Tyurina A.V., Tumanova K.D., Buravkov S.V., Kadrev A.V., Khokhlova T.D., Schade G.R., Sapozhnikov O.A., Maxwell A., Chernyaev A., Khokhlova V.A. *Boiling histotripsy dose for mechanical ablation of human prostate tissues with different elastic properties (ASA meeting abstract)* // The Journal of the Acoustical Society of America. Seattle, USA, 2021, V. 150. N. 4. P. A85.
- A26. **Ponomarchuk E.M.**, Hunter C., Song M., Khokhlova V.A., Sapozhnikov O.A., Yuldashev P.V., Khokhlova T.D. *Safety margins of focus positioning during boiling histotripsy liquefaction of large hematomas adjacent to gas-containing organs* // Abstract Book of the 20th Annual International Symposium of ISTU. Gyeongju, South Korea, 2021. P.256.
- A27. **Пономарчук Е.М.**, Хохлова В.А., Сапожников О.А., Хантер К., Хохлова Т.Д. *Пороги акустической атомизации коагулированной крови в импульсных ультразвуковых пучках с различными углами фокусировки* // Сборник трудов III Всероссийской акустической конференции. Санкт-Петербург, 2020. С. 326–331.
- A28. **Пономарчук Е.М.**, Хохлова В.А., Сапожников О.А., Хантер К., Хохлова Т.Д. *Пороги акустической атомизации коагулированной крови в импульсных ультразвуковых пучках с различными углами фокусировки* // Программа III Всероссийской акустической конференции. Санкт-Петербург, 2020. С. 101–102.
- A29. Росницкий П.Б., Цысарь С.А., Буравков С.В., Карзова М.М., **Пономарчук Е.М.**, Сапожников О.А., Хохлова Т.Д., Максвелл А.Д., Кадрев А.В., Охоботов Д.А., Камалов А.А., Шейд Д.Р., Хохлова В.А. *Новый метод механического разрушения опухолей простаты с использованием импульсных ультразвуковых пучков* // Сборник трудов конференции «Ломоносовские чтения 2020». Москва, 2020. С. 62–64.
- A30. **Ponomarchuk E.M.**, Buravkov S.V., Rosnitskiy P.B., Tsysar S.A., Karzova M.M., Kunturova A.V., Topchu K.D., Sapozhnikov O.A., Khokhlova V.A. *Cytological and ultrastructural analysis of mechanically liquefied lesions generated using boiling histotripsy in a porcine model of hematoma ex vivo* // Abstract book of the 19th International Symposium of ISTU / 5th European Symposium of EUFUS. Barcelona, Spain, 2019. P. 51.
- A31. Tsysar S.A., Rosnitskiy P.B., Karzova M.M., **Ponomarchuk E.M.**, Sapozhnikov O.A., Khokhlova T.D., Maxwell A.D., Khokhlova V.A. *Fast volumetric liquefaction of large hematomas ex vivo using continuous HIFU focus translation* // Abstract book of the 19th International Symposium of ISTU / 5th European Symposium of EUFUS. Barcelona, Spain, 2019. P. 294.
- A32. Кунтурова А.В., Цысарь С.А., Росницкий П.Б., **Пономарчук Е.М.**, Топчу К.Д., Буравков С.В., Сапожников О.А., Хохлова В.А. *Влияние траектории движения фокуса ультразвукового излучателя на степень механического разрушения сгустка крови при импульсном ударноволновом воздействии* // Сборник трудов XVII Всероссийской школы-семинара «Физика и применение микроволн» имени А.П. Сухорукова («Волны-2019»). Можайск, 2019. С. 28–30.

- А33. Мелашенко М.Е., Багинский С.К., Яковлева А.М., Команова А.В., Бобина А.С., **Пономарчук Е.М.**, Буравков С.В. *Электронная микроскопия крови после осмотического шока и анализ коагуляции крови в капле и объеме // Сборник трудов XVII Всероссийской школы-семинара «Физика и применение микроволн» имени А.П. Сухорукова («Волны-2019»)*. Можайск, 2019. С. 128–131.
- А34. Топчу К.Д., **Пономарчук Е.М.**, Кунтурова А.В., Хохлова В.А., Буравков С.В. *Анализ влияния различных способов хранения клеток крови на их морфологические характеристики с течением времени // Сборник трудов XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019»*. Москва, 2019. С. 381–383.
- А35. **Пономарчук Е.М.**, Кунтурова А.В., Хохлова В.А., Буравков С.В. *Электронная микроскопия и цитологический анализ разрушений сгустка свиной крови ультразвуковыми импульсами // Сборник трудов XVI Всероссийской школы-семинара «Физика и применение микроволн» имени А.П. Сухорукова («Волны-2018»)*. Можайск, 2018. С. 49–52.
- А36. Кунтурова А.В., **Пономарчук Е.М.**, Хохлова В.А., Буравков С.В. *Электронная микроскопия механических разрушений сгустка крови свиньи, полученных с помощью фокусированного ультразвука // Сборник трудов XXV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2018»*. Москва, 2018. С. 288–290.
- А37. **Пономарчук Е.М.**, Хохлова В.А., Буравков С.В. *Гистологический анализ печени после воздействия мощным фокусированным ультразвуком методом гистотрипсии с кипением // Сборник трудов XV Всероссийской школы-семинара «Физика и применение микроволн» имени А.П. Сухорукова («Волны-2018»)*. Можайск, 2017. С. 28–30.
- А38. **Пономарчук Е.М.**, Хохлова В.А., Буравков С.В. *Морфологический анализ разрушений биологической ткани при облучении мощными фокусированными ультразвуковыми импульсами с ударными фронтами // Сборник трудов XXIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2016»*. Москва, 2016, С. 79–81.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fry W. J., Barnard J. W., Fry F. J., Brennan J.F. Ultrasonically produced localized selective lesions in the central nervous system // *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. 1955. V. 34. P. 413–423.
2. Буров А. К., Андреевская Г. Д. Воздействие ультразвуковых колебаний высокой интенсивности на злокачественные опухоли у животных и человека // *Доклады Академии Наук СССР*. 1956. Т. 106. С. 445–448.
3. Erikson K. R., Fry F. J., Jones J. P. Ultrasound in medicine – A review // *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics*. 1974. V. 21. N. 3. P. 144–170.
4. Sanghvi N. T., Hawes R. H. High-intensity focused ultrasound // *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*. 1994. V. 4. N. 2. P. 383–395.
5. ter Haar G. Ultrasound focal beam surgery // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 1995. V. 21. N. 9. P. 1089–1100.
6. Руденко О. В. Нелинейные волны: некоторые биомедицинские приложения // *Успехи физических наук*. 2007. Т. 177. № 4. С. 374–383.
7. Гаврилов Л. Р. Фокусированный ультразвук высокой интенсивности в медицине. Фазис Москва, 2013.
8. Fry F. J. Intense focused ultrasound in medicine. Some practical guiding physical principles from sound source to focal site in tissue // *European urology*. 1993. V. 23. P. 2–7.
9. Fry F. J., Sanghvi N. T., Foster R. S., Bihrl R., Hennige C. Ultrasound and microbubbles: their generation, detection and potential utilization in tissue and organ therapy—experimental // *Ultrasound in medicine and biology*. 1995. V. 21. N. 9. P. 1227–1237.
10. Буров В. А., Дмитриева Н. П., Руденко О. В. Нелинейный ультразвук: разрушение микроскопических биоконплексов и нетепловое воздействие на злокачественную опухоль // *Доклады Академии Наук СССР*. 2002, Т. 383. № 3. С. 401–404.
11. Бэйли М. Р., Хохлова В. А., Сапожников О. А., Каргл С. Г., Крам Л. А. Физические механизмы воздействия терапевтического ультразвука на биологическую ткань // *Акустический журнал*. 2003. Т. 49. № 4. С. 437–464.
12. Хилл К.Р., Бэмбер Дж., тер Хаар Г. (ред.) Ультразвук в медицине. Физические основы применения. Пер. с англ. Физматлит Москва, 2008.
13. Dubinsky T. J., Cuevas C., Dighe M. K., Kolokythas O., Hwang J. H. High-intensity focused ultrasound: Current potential and oncologic applications // *American Journal of Roentgenology*. 2008. V. 190. N. 1. P. 191–199.
14. Orsi F., Zhang L., Arnone P., Orgera G., Bonomo G., Vigna P. D., Monfardini L., Zhou K., Chen W., Wang Z., Veronesi U. High-intensity focused ultrasound ablation: effective and safe therapy for solid tumors in difficult locations // *American Journal of Roentgenology*. 2010. V. 195. N. 3. P. W245–W252.

15. Zhao Z., Wu F. Minimally-invasive thermal ablation of early-stage breast cancer: a systemic review // *European journal of surgical oncology*. 2010. V. 36, N. 12. P. 1149–1155.
16. 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 // *European Urology*. 2013. V. 63. N. 3. P. 486–492.
17. Peek M. C. L., Ahmed M., Napoli A., Usiskin S., Baker R., Douek M. Minimally invasive ablative techniques in the treatment of breast cancer: a systematic review and meta-analysis // *International journal of hyperthermia*. 2017. V. 33, N. 2, P. 191–202.
18. Elias W. J., Huss D., Voss T., Loomba J., Khaled M., Zadicario E., Frysinger R. C., Sperling S. A., Wylie S., Monteith S. J., Druzgal J., Shah B. B., Harrison M., Wintermark M. A pilot study of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor // *The New England Journal of Medicine*. 2013. V. 369. N. 7. P. 640–648.
19. Napoli A., Anzidei M., Marincola B. C., Brachetti G., Ciolina F., Cartocci G., Marsecano C., Zaccagna F., Marchetti L., Cortesi E., Catalano C. Primary pain palliation and local tumor control in bone metastases treated with magnetic resonance-guided focused ultrasound // *Investigative radiology*. 2013. V. 48, N. 6, P. 351–358.
20. Crouzet S., Chapelon J. Y., Rouviere O., Mege-Lechevallier F., Colombel M., Tonoli-Catez H., Martin X., Gelet A. Whole-gland ablation of localized prostate cancer with high-intensity focused ultrasound: oncologic outcomes and morbidity in 1002 patients // *European Urology*. 2014. V. 65. N. 5. P. 907 – 914.
21. Dickinson L., Arya M., Afzal N., Cathcart P., Charman S.C., Cornaby A., Hindley R. G., Lewi H., McCartan N., Moore C. M., Nathan S., Ogden C., Persad R., van der Meulen J., Weir S., Emberton M., Ahmed H. U. 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. V. 70. N. 4. P. 668–674.
22. Aubry J.-F., Pauly K. B., Moonen C., Haar G., Ries M., Salomir R., Sokka S., Sekins K. M., Shapira Y., Ye F., Huff-Simonin H., Eames M., Hananel A., Kassell N., Napoli A., Hwang J. H., Wu F., Zhang L., Melzer A., Kim Y. S., Gedroyc W. M. The road to clinical use of high-intensity focused ultrasound for liver cancer: technical and clinical consensus // *Journal of Therapeutic Ultrasound*. 2013. V. 1. N 1. 13.
23. Anzidei M., Napoli A., Sandolo F., Marincola B. C., Di Martino M., Berloco P., Bosco S., Bezzi M., Catalano C. Magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation in abdominal moving organs: a feasibility study in selected cases of pancreatic and liver cancer // *Cardiovascular and interventional radiology*. 2014. V. 37. N. 6. P. 1611–1617.
24. Khokhlova T. D., Hwang J. H. HIFU for palliative treatment of pancreatic cancer // *Journal of gastrointestinal oncology*. 2011a. V. 2. N. 3. P. 175–184.
25. Dorenberg E. J., Courivaud F., Ring E., Hald K., Jakobsen J. A., Fosse E., Hol P. K. Volumetric ablation of uterine fibroids using Sonalleve high-intensity focused ultrasound in a 3 Tesla scanner—first clinical

- assessment // *MITAT: official journal of the society for minimally invasive therapy*. 2013. V. 22. N. 2. P. 73–79.
26. Cranston D. A review of high intensity focused ultrasound in relation to the treatment of renal tumours and other malignancies // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015. V. 27. P. 654–658.
 27. Merckel L. G., Knuttel F. M., Deckers R., van Dalen T., Schubert G., Peters N. H., Weits T., van Diest P. J., Mali W. P., Vaessen P. H., van Gorp J. M., Moonen C. T., Bartels L. W., van den Bosch M. A. First clinical experience with a dedicated MRI-guided high-intensity focused ultrasound system for breast cancer ablation // *European Radiology*. 2016. V. 26. N. 11. P. 4037–4046.
 28. Knuttel F. M., van den Bosch M. A. Magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound ablation of breast cancer // *Therapeutic Ultrasound*. 2016. V. 880. P. 65–81.
 29. Coluccia D., Fandino J., Schwyzer L., O’Gorman R., Remonda L., Anon J., Martin E., Werner B. First noninvasive thermal ablation of a brain tumor with MR-guided focused ultrasound. *Journal of therapeutic ultrasound*. 2014. V. 2, 17.
 30. Xu Z., Ludomirsky A., Eun L. Y., Hall T. L., Tran B. C., Fowlkes J. B., Cain C. A. Controlled ultrasound tissue erosion // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2004. V. 51. N. 6. P. 726–736.
 31. Maxwell A., Sapozhnikov O., Bailey M., Crum L., Xu Z., Fowlkes B., Cain C., Khokhlova V. Disintegration of tissue using high intensity focused ultrasound: Two approaches that utilize shock waves // *Acoustics Today*. 2012. V. 8. N. 4. P. 24–36.
 32. 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 // *International journal of hyperthermia*. 2015. V. 31. N. 2. P. 145–162.
 33. Руденко О. В., Солюян С. И. Теоретические основы нелинейной акустики. Наука Москва, 1975.
 34. Hamilton M. F., Blackstock D. T. *Nonlinear acoustics*. Academic Press, 1998.
 35. Parsons J. E., Cain C. A., Abrams G. D., Fowlkes J. B. Pulsed cavitation ultrasound therapy for controlled tissue homogenization // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2006. V. 32. N. 1. P. 115–129.
 36. Vidal-Jove J., Serres X., Vlasisavljevich E., Cannata J., Duryea A., Miller R., Merino X., Velat M., Kam Y., Bolduan R., Amaral J., Hall T., Xu Z., Lee F. T. Jr, Ziemlewicz T. J. First-in-man histotripsy of hepatic tumors: the THERESA trial, a feasibility study // *International journal of hyperthermia*. 2022. V. 39. N. 1. P. 1115–1123.
 37. Wah T. M., Pech M., Thormann M., Serres X., Littler P., Stenberg B., Lenton J., Smith J., Wiggermann P., Planert M., Vidal-Jove J., Torzilli G., Solbiati L. A multi-centre, single arm, non-randomized, prospective European trial to evaluate the safety and efficacy of the Histosonics system in the treatment of primary and metastatic liver cancers (#HOPE4LIVER) // *Cardiovascular and interventional radiology*. 2023. V. 46. N. 2. P. 259–267.

38. Xu Z., Hall T. L., Fowlkes J. B., Cain C. A. Effects of acoustic parameters on bubble cloud dynamics in ultrasound tissue erosion (histotripsy) // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2007. V. 122. N. 1. P. 229–236.
39. 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 Medicine and Biology*. 2010. V. 36. N. 2. P. 250–267.
40. Руденко О. В. Мощный фокусированный ультразвук: нелинейные эффекты, возбуждение сдвиговых волн и медицинская диагностика // *Вестник Московского университета*. 1996. № 6. С. 18–32.
41. Филоненко Е. А., Хохлова В. А. Эффекты акустической нелинейности при терапевтическом воздействии мощного фокусированного ультразвука на биологическую ткань // *Акустический журнал*. 2001. Т. 47. № 4. С. 541–549.
42. Khokhlova T. D., Canney M. S., Khokhlova V. A., Sapozhnikov O. A., Crum L. A., Bailey M. R. Controlled tissue emulsification produced by high intensity focused ultrasound shock waves and millisecond boiling // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2011. V. 130. N. 5. P. 3498 – 3510.
43. 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 // *Physics in Medicine and Biology*. 2012. V. 57. N. 23. P. 8061–8078.
44. Pahk K. J., de Andrade M. O., Gelat P., Kim H., Saffari N. Mechanical damage induced by the appearance of rectified bubble growth in a viscoelastic medium during boiling histotripsy exposure // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2019. V. 53. P. 164–177.
45. Pahk K. J., Lee S., Gelat P., de Andrade M. O., Saffari N. The interaction of shockwaves with a vapour bubble in boiling histotripsy: The shock scattering effect // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021. V. 70. P. 105312.
46. Eranki A., Farr N., Partanen A., Sharma K. V., Rossi C. T., Rosenberg A. Z., Kim A., Oetgen M., Celik H., Woods D., Yarmolenko P. S., Kim P. C. W., Wood B. J. Mechanical fractionation of tissues using microsecond-long HIFU pulses on a clinical MR-HIFU system // *International journal of hyperthermia*. 2018. V. 34. N. 8. P. 1213–1224.
47. 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 and Biology*. 2013. V. 39. N. 3. P. 424–438.
48. Wang Y. N., Khokhlova T. D., Buravkov S., Chernikov V., Kreider W., Partanen A., Farr N., Maxwell A., Schade G.R., Khokhlova V.A. Mechanical decellularization of tissue volumes using boiling histotripsy // *Physics in Medicine and Biology*. 2018. V. 63. N. 23. P. 235023.
49. 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 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014. V. 111. N. 22. P. 8161–8166.
50. Khokhlova T. D., Monsky W.L., Haider Y.A., Maxwell A., Wang Y.-N., Matula T.J. Histotripsy liquefaction of large hematomas // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2016. V. 42. № 7. P. 1491–1498.
 51. Khokhlova T., Kuzcevic J., Hunter C., Maxwell A., Khokhlova V., Matula T., Monsky W. Boiling histotripsy liquefaction of large extravascular hematomas: in vitro optimization and device design considerations // *Abstract book of the 6th International Symposium on Focused Ultrasound*. 2018. P. 151–152.
 52. Khokhlova T. D., Kucewicz J. C., Ponomarchuk E. M., Hunter C., Bruce M., Khokhlova V. A., Matula T. J., Monsky W. Effect of stiffness of large extravascular hematomas on their susceptibility to boiling histotripsy liquefaction in vitro // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2020. V. 46. N. 8. P. 2007–2016.
 53. Vlaisavljevich E., Kim Y., Owens G., Roberts W., Cain C., Xu Z. Effects of tissue mechanical properties on susceptibility to histotripsy-induced tissue damage // *Physics in Medicine and Biology*. 2014. V. 59. N. 2. P. 253–270.
 54. Росницкий П. Б., Юлдашев П. В., Хохлова В. А. Влияние угловой апертуры медицинских ультразвуковых излучателей на параметры нелинейного ударно-волнового поля в фокусе // *Акустический журнал*. 2015. Т. 61. № 3. С. 325–332.
 55. Rosnitskiy P. B., Yuldashev P. V., Sapozhnikov O. A., Maxwell A. D., Kreider W., Bailey M. R., Khokhlova V. A. Design of HIFU transducers for generating specified nonlinear ultrasound fields // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2017. V. 64. N. 2. P. 374–390.
 56. Khokhlova T. D., Rosnitskiy P. B., Hunter C., Maxwell A. D., Kreider W., ter Haar G., Costa M., Sapozhnikov O.A., Khokhlova V.A. Dependence of inertial cavitation induced by high intensity focused ultrasound on transducer F-number and nonlinear waveform distortion // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2018. V. 144. N. 3. P. 1160–1169.
 57. Wu F., Wang Z. B., Chen W. Z., Zhu H., Bai J., Zou J. Z., Li K. Q., Jin C. B., Xie F. L., Su H. B. Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma // *Annals of surgical oncology*. 2004. V. 11. N. 12. P. 1061–1069.
 58. Haar G. T., Coussios C. High intensity focused ultrasound: physical principles and devices // *International journal of hyperthermia*. 2007. V. 23. N. 2. P. 89–104.
 59. Hesley G. K., Gorny K. R., Henrichsen T. L., Woodrum D. A., Brown D. L. A clinical review of focused ultrasound ablation with magnetic resonance guidance: an option for treating uterine fibroids // *Ultrasound quarterly*. 2008. V. 24. N. 2. P. 131–139.
 60. Xu, Z. Hall T. L., Vlaisavljevich E., Lee Jr F. T. Histotripsy: the first noninvasive, non-ionizing, non-thermal ablation technique based on ultrasound // *International journal of hyperthermia*. 2021. V. 38. N. 1. P. 561–575.

61. Fry W. J. Mechanism of acoustic absorption in tissue // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1950. V. 22. P. 867–876.
62. Sapareto S., Dewey W. Thermal dose determination in cancer therapy // *Journal of Radiation Oncology, Biology, and Physics*. 1984. V. 106. P. 787–800.
63. Schmitt F. O., Uhlemeyer B. The mechanism of the lethal effect of ultrasonic radiation // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1930. V. 27. N. 7. P. 626.
64. Lele P.P. Effects of ultrasound on “solid” mammalian tissues and tumors in vivo // *Ultrasound: Medical applications, biological effects and hazard potential* Plenum. New York. 1986. P. 275–306.
65. Crum L.A. Acoustic cavitation // *Proceedings of Ultrasonics Symposium*. 1982. V. 1. P. 1–11.
66. Vogel A., Lauterborn W. Acoustic transient generation by laser-produced cavitation bubbles near solid boundaries // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1988. V. 84. P. 719–731.
67. Chavier F., Chapelon J. Y., Gelet A., Cathignol D. Modeling of high-intensity focused ultrasound-induced lesions in the presence of cavitation bubbles // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2000. V. 108. P. 432–440.
68. Zhong P., Zhou Y., Zhu S. Dynamics of bubble oscillation in constrained media and mechanisms of vessel rupture in SWL // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2001. V. 27. P. 119–134.
69. Maxwell A. D., Wang T. Y., Cain C. A., Fowlkes J. B., Sapozhnikov O. A., Bailey M. R., Xu Z. Cavitation clouds created by shock scattering from bubbles during histotripsy // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2011. V. 130. N. 4. P. 1888–1898.
70. Gavrilov L. R., Hand J. A. A theoretical assessment of the relative performance of spherical phased arrays for ultrasound surgery. A theoretical assessment of the relative performance of spherical phased arrays for ultrasound surgery // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2000. V. 47. N. 1. P. 125–139.
71. Ильин С. А., Юлдашев П. В., Хохлова В. А., Гаврилов Л. Р., Росницкий П. Б., Сапожников О. А. Применение аналитического метода для оценки качества акустических полей при электронном перемещении фокуса многоэлементных терапевтических решеток // *Акустический журнал*. 2015. Т. 61. №. 1. С. 57–64.
72. Hynynen K., Jones R. M. Image-guided ultrasound phased arrays are a disruptive technology for non-invasive therapy // *Physics in Medicine and Biology*. 2016. V. 61. N. 17. P. R206–R248.
73. Wang M., Zhou Y. Simulation of non-linear acoustic field and thermal pattern of phased-array high-intensity focused ultrasound (HIFU) // *International journal of hyperthermia*. 2016. V. 32. N. 5. P. 569 – 582.
74. Wang M., Zhou Y. Numerical evaluation of the effect of electronically steering a phased array transducer: axially post-focal shifting // *International journal of hyperthermia*. 2017. V. 33. N. 7. P. 758–769.
75. Bawiec C. R., Khokhlova T. D., Sapozhnikov O. A., Rosnitskiy P. B., Cunitz B. W., Ghanem M. A., Hunter C., Kreider W., Schade G. R., Yuldashev P. V., Khokhlova V. A. A prototype therapy system

- for boiling histotripsy in abdominal targets based on a 256-element spiral array // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2021. V. 68. N. 5. P. 1496–1510.
76. Юлдашев П. В., Мездрохин И. С., Хохлова В. А. Моделирование высокоинтенсивных полей сильно фокусирующих ультразвуковых излучателей с использованием широкоугольного параболического приближения // *Акустический журнал*. 2018. Т. 64. №. 3. С. 318–329.
77. Yuldashev P. V., Karzova M. M., Kreider W., Rosnitskiy P. B., Sapozhnikov O. A., Khokhlova V. A. “HIFU beam:” a simulator for predicting axially symmetric nonlinear acoustic fields generated by focused transducers in a layered medium // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2021. V. 68. N. 9. P. 2837–2852.
78. Canney M. S., Bailey M. R., Crum L. A., Khokhlova V. A., Sapozhnikov O. A. Acoustic characterization of high intensity focused ultrasound fields: a combined measurement and modeling approach // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2008. V. 124. N. 4. P. 2406–2420.
79. Averiyarov M., Ollivier S., Khokhlova V., Blanc-Benon P. Random focusing of nonlinear acoustic N-waves in fully developed turbulence: laboratory scale experiment // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2011. V. 130. N. 6. P. 3595–3607.
80. Perez C., Chen H., Matula T. J., Karzova M., Khokhlova V. A. Acoustic field characterization of the Duolith: measurements and modelling of a clinical shock wave therapy device. // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2013. V. 134. N. 2. P. 1663–1674.
81. Бессонова О. В., Хохлова В. А., Бэйли М. Р., Кэнни М. С., Крам Л. А. Фокусировка мощных ультразвуковых пучков и предельные значения параметров разрывных волн // *Акустический журнал*. 2009. Т. 55. №. 4–5. С. 445–456.
82. Калоев А. З., Николаев Д. А., Хохлова В. А., Цысарь С. А., Сапожников О. А. Пространственная коррекция акустической голограммы для восстановления колебаний поверхности аксиально-симметричного ультразвукового излучателя // *Акустический журнал*. 2022. Т. 68. №. 1. С. 83–95.
83. O’Neil N. T. Theory of focusing radiators. // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1949. V. 21. N. 5. P. 516–526.
84. Катиньоль Д., Сапожников О. А. О применимости интеграла Рэля к расчету поля вогнутого фокусирующего излучателя. *Акустический журнал*. 1999. Т. 45. №. 6. С. 816–824.
85. Duck F. Physical properties of tissue: A comprehensive reference book. London: Academic Press. 1990.
86. Ebbini E. S., Cain C. A. A spherical-section ultrasound phased array applicator for deep localized hyperthermia // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1991. V. 38. N. 7. P. 634–643.
87. Partanen A., Tillander M., Yarmolenko P. S., Wood B. J., Dreher M. R., Kohler M. O. Reduction of peak acoustic pressure and shaping of heated region by use of multifoci sonications in MR-guided high-intensity focused ultrasound mediated mild hyperthermia // *Medical Physics*. 2013. V. 40. N. 1. P. 013301.

88. Macoskey J. J., Hall T. L., Sukovich J. R., Choi S. W., Ives K., Johnsen E., Cain C. A., Xu Z. Soft-tissue aberration correction for histotripsy // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2018. V. 65. N. 11. P. 2073–2085.
89. Schwenke M., Strehlow J., Demedts D., Haase S., Barrios Romero D., Rothlübbers S., von Dresky C., Zidowitz S., Georgii J., Mihcin S., Bezzi M., Tanner C., Sat G., Levy Y., Jenne J., Günther M., Melzer A., Preusser T. A focused ultrasound treatment system for moving targets (part I): generic system design and in-silico first-stage evaluation // *Journal of therapeutic ultrasound*. 2017. V. 5. N. 1. P. 20.
90. Wang H., Ebbini E. S., O'Donnell M., Cain C. A. Phase aberration correction and motion compensation for ultrasonic hyperthermia phased arrays: Experimental results // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 1994. V. 41. N. 1. P. 34–43.
91. Diodato A., Cafarelli A., Schiappacasse A., Tognarelli S., Ciuti G., Menciassi A. Motion compensation with skin contact control for high intensity focused ultrasound surgery in moving organs // *Physics in Medicine and Biology*. 2018. V. 63. N. 3. P. 035017.
92. Thomas G. P. L., Khokhlova T. D., Khokhlova V. A. // Partial respiratory motion compensation for abdominal extracorporeal boiling histotripsy treatments with a robotic arm // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2021. V. 68. N. 9. P. 2861–2870.
93. Thomas G. P. L., Khokhlova T. D., Sapozhnikov O. A., Wang Y. N., Totten S. I., Khokhlova V. A. In vivo aberration correction for transcutaneous HIFU therapy using a multielement array // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2022. V. 69. N. 10. P. 2955–2964.
94. Khokhlova V. A., Yuldashev P. V., Rosnitskiy P. B., Maxwell A. D., Kreider W., Bailey M. R., Sapozhnikov O. A. Design of HIFU transducers to generate specific nonlinear ultrasound fields // *Physics procedia*. 2016. V. 87. P. 132–138.
95. Ghanem M. A., Maxwell A. D., Kreider W., Cunitz B. W., Khokhlova V. A., Sapozhnikov O. A., Bailey M. R. Field characterization and compensation of vibrational nonuniformity for a 256-element focused ultrasound phased array // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2018. V. 65. N. 9. P. 1618–1630.
96. Kreider W., Yuldashev P. V., Sapozhnikov O. A., Farr N., Partanen A., Bailey M. R., Khokhlova V. A. Characterization of a multi-element clinical HIFU system using acoustic holography and nonlinear modeling // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2013. V. 60. N. 8. P. 1683–1698.
97. Sapozhnikov O. A., Tsysar S. A., Khokhlova V. A., Kreider W. Acoustic holography as a metrological tool for characterizing medical ultrasound sources and fields // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2015. V. 138. N. 3. P. 1515–1532.
98. Юлдашев П. В., Хохлова В. А. Моделирование трехмерных нелинейных полей ультразвуковых терапевтических решеток // *Акустический журнал*. 2011. Т. 5. № 3. С. 337–347.

99. Maxwell A. D., Cain C. A., Hall T. L., Fowlkes J. B., Xu Z. Probability of cavitation for single ultrasound pulses applied to tissues and tissue-mimicking materials. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2013. V. 39. N. 3. P. 449–465.
100. T-Array – Therapeutic Array Simulator. Accessed: 2015. [Online]. Available: <http://limu.msu.ru/product/3124/home?language=en>
101. Pahk K. J., Mohammad G. H., Malago M., Saffari N., Dhar D. K. A novel approach to ultrasound-mediated tissue decellularization and intra-hepatic cell delivery in rats // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2016. V. 42. N. 8. P. 1958–1967.
102. Khokhlova T. D., Schade G. R., Wang Y. N., Buravkov S. V., Chernikov V. P., Simon J. C., Starr F., Maxwell A. D., Bailey M. R., Kreider W., Khokhlova V. A. Pilot in vivo studies on transcutaneous boiling histotripsy in porcine liver and kidney // *Scientific Reports*. 2019. V. 27. N. 1. P. 20176.
103. Khokhlova V. A., Rosnitskiy P. B., Tsysar S. A., Buravkov S. V., Ponomarchuk E. M., Sapozhnikov O. A., Karzova M. M., Khokhlova T. D., Maxwell A. D., Wang Y. N., Kadrev A. V., Chernyaev A. L., Chernikov V. P., Okhobotov D. A., Kamalov A. A., Schade G. R. Initial assessment of boiling histotripsy for mechanical ablation of *ex vivo* human prostate tissue // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2023. V. 4. N. 1. P. 62–71.
104. Smallcomb M., Simon J. C. High intensity focused ultrasound atomization and erosion in healthy and tendinopathic tendons // *Physics in Medicine and Biology*. 2023. V. 68. N. 2. P. 025005.
105. Mondie C., Maguire N. J., Rentea R. M. (2022). Retroperitoneal hematoma // In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2022.
106. Пантелеев М. А., Синауридзе Е. И., Атауллаханов Ф. И. Свертывание крови: современные проблемы // *Клиническая онкогематология*. 2008. Т. 1. № 3. С. 259–265.
107. 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 in Medicine and Biology*. 2021, V. 47. N. 9. P. 2608–2621.
108. Bamber J., Cosgrove D., Dietrich C. F., Fromageau J., Bojunga J., Calliada F., Cantisani V., Correas J. M., D’Onofrio M., Drakonaki E. E., Fink M., Friedrich-Rust M., Gilja O. H., Havre R. F., Jenssen C., Klauser A. S., Ohlinger R., Saftoiu A., Schaefer F., Sporea I., Piscaglia F. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography. Part 1: Basic principles and technology // *Ultraschall in der Medizin*. 2013. V. 34. N. 2. P. 169–184.
109. Yusuf G., Konstantatou E., Sellars M. E., Huang D. Y., Sidhu P. S. Multiparametric sonography of testicular hematomas: features on grayscale, color doppler, and contrast-enhanced sonography and strain elastography // *Journal of ultrasound in medicine*. 2015. V. 34. N. 7. P. 1319–1328.
110. Gomez A., Rus G., Saffari N. Use of shear waves for diagnosis and ablation monitoring of prostate cancer: a feasibility study // *Journal of Physics: Conference Series*. 2016. V. 684. P. 012006.

111. Gandhi J., Zaidi S., Shah J., Joshi G., Khan S. A. The evolving role of shear wave elastography in the diagnosis and treatment of prostate cancer // *Ultrasound Quarterly*. 2018. V. 34. N. 4. P. 245–249.
112. Kamalov A. A., Kadrev A. V., Mitkova M. D., Mitkov V. V., Danilova N. V., Kamalov D. M., Sorokin N. I. Shear wave elastography guided targeted biopsy in the diagnosis of prostate cancer // *Urologiia*. 2020. V. 6. P. 106–113.
113. Youk J. H., Gweon H. M., Son E. J. Shear-wave elastography in breast ultrasonography: the state of the art // *Ultrasonography*. 2017. V. 36. N. 4. P. 300–309.
114. Yoo J., Seo B. K., Park, E. K., Kwon M., Jeong H., Cho K. R., Woo O. H., Song S. E., Cha J. Tumor stiffness measured by shear wave elastography correlates with tumor hypoxia as well as histologic biomarkers in breast cancer // *Cancer imaging*. 2020. V. 20. N. 1. P. 85.
115. Bernal M., Gennisson J. L., Flaud P., Tanter M. Shear wave elastography quantification of blood elasticity during clotting // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2012. V. 38. N. 12. P. 2218–2228.
116. Zhang X., Owens G. E., Cain C. A., Gurm H. S., Macoskey J., Xu Z. Histotripsy thrombolysis on retracted clots // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2016. V. 42. N. 8. P. 1903–1918.
117. Mercado-Shekhar K. P., Kleven R. T., Aponte Rivera H., Lewis R., Karani K. B., Vos H. J., Abruzzo T. A., Haworth K. J., Holland C. K. Effect of clot stiffness on recombinant tissue plasminogen activator lytic susceptibility in vitro // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2018. V. 44. N. 12. P. 2710–2727.
118. Bollen V., Hendley S. A., Paul J. D., Maxwell A. D., Haworth K. J., Holland C. K., Bader K. B. In vitro thrombolytic efficacy of single- and five-cycle histotripsy pulses and rt-PA // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2020. V. 46. N. 2. P. 336–349.
119. Sutton J. T., Ivancevich N. M., Perrin S. R. Jr., Vela D. C., Holland C. K. Clot retraction affects the extent of ultrasound-enhanced thrombolysis in an *ex vivo* porcine thrombosis model // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2013. V. 39. N. 5. P. 813–824.
120. Kawasaki J., Katori N., Kodaka M., Miyao H., Tanaka K. A. Electron microscopic evaluations of clot morphology during thrombelastography // *Anesthesia & Analgesia*. 2004. V. 99. N. 5. P. 1440–1444.
121. Bester J., Matshailwe C., Pretorius E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 β , IL-6 and IL-8 // *Cytokine*. 2018. V. 110. P. 237–242.
122. Moskala M., Goscinski I., Kaluza J., Polak J., Krupa M., Adamek D., Pitynski K., Miodonski A. J. Morphological aspects of the traumatic chronic subdural hematoma capsule: SEM studies // *Microscopy and Microanalysis*. 2007. V. 13. N. 3. P. 211–219.
123. Xie H., Kim K., Aglyamov S. R., Emelianov S. Y., O'Donnell M., Weitzel W. F., Wroblewski S. K., Myers D. D., Wakefield T. W., Rubin J. M. Correspondence of ultrasound elasticity imaging to direct mechanical measurement in aging DVT in rats // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2005. V. 31. P. 1351–1359.
124. Sarvazyan A. P., Rudenko O. V., Swanson S. D., Fowlkes J. B., Emelianov S. Y. Shear wave elasticity imaging: a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 1998. V. 24. P. 1419–1435.

125. Waters N. E. The indentation of thin rubber sheets by spherical indentors // *British Journal of Applied Physics*. 1965. V. 16. N. 4. P. 557–563.
126. Choi I., Shield R. T. Second-order effects in problems for a class of elastic materials // *Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Physik*. 1981 V. 32. P. 361–381.
127. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. В 10-ти т. Т. VII. Теория упругости. М.: Наука, 1987. 248 с.
128. Андреев В. Г., Крит Т. Б., Сапожников О. А. Стоячие волны в упругом слое, нагруженном конечной массой // *Акустический журнал*. 2010. Т. 56, № 2, С. 190–196.
129. Bercoff J., Tanter M., Fink M. Supersonic shear imaging: a new technique for soft tissue elasticity mapping // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2004. V. 51. N. 4. P. 396–409.
130. Hoskins P. R., Martin K., Thrush A. Diagnostic ultrasound. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
131. Руденко О. В., Сафонов Д. В., Рыхтик П. И., Гурбатов С. Н., Романов С. В. Физические основы эластографии. Часть 2. Эластография на сдвиговой волне // *Радиология – Практика*. 2014. Т. 46. №4. С. 62–72.
132. Szabo T. L. Diagnostic ultrasound imaging: Inside out. 2nd edition Waltham, MA: Academic Press. 2004.
133. Юрина Н.А., Радостина А.И. Гистология // М.: Медицина. 1995.
134. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. // М.: Мир, 1975.
135. Buravkov S. V., Chernikov V. P., Buravkova L. B. Simple method of specimen preparation for scanning electron microscopy // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011. V. 151. N. 3. P. 378–382.
136. Топчу К. Д., Пономарчук Е. М., Кунтурова А. В., Росницкий П. Б., Хохлова Т. Д., Ванг Я. Н., Хохлова В. А., Буравков С. В. Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019. Т. 8. № 4. С. 42–48.
137. Mueller S., Sandrin L. Liver stiffness: a novel parameter for the diagnosis of liver disease // *Hepatic medicine: evidence and research*. 2010. V. 2. P. 49–67.
138. Maxwell A. D., Yuldashev P. V., Kreider W., Khokhlova T. D., Schade G. R., Hall T. L., Sapozhnikov O. A., Bailey M. R., Khokhlova V. A. A prototype therapy system for transcutaneous application of boiling histotripsy // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2017. V. 64. N. 10. P. 1542–1557.
139. Shung K. K., Fei D. Y., Yuan Y. W., Reeves W. C. Ultrasonic characterization of blood during coagulation // *Journal of clinical ultrasound*. 1984. V. 12. N. 3. P. 147–153.
140. Nahirnyak V. M., Yoon S. W., Holland C. K. Acousto-mechanical and thermal properties of clotted blood // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2006. V. 119. N. 6. P. 3766–3772.

141. Henszen M. M., Weske M., Schwarz S., Haest C. W., Deuticke B. Electric field pulses induce reversible shape transformation of human erythrocytes // *Molecular Membrane Biology*. 1997. V. 14. N. 4. P. 195 – 204.
142. Eranki A., Farr N., Partanen A. V., Sharma K., Chen H., Rossi C. T., Kothapalli S. V., Oetgen M., Kim A. H., Negussie A., Woods D., Wood B. J., Kim P. C. W., Yarmolenko P. S. Boiling histotripsy lesion characterization on a clinical magnetic resonance imaging-guided high intensity focused ultrasound system // *PloS one*. 2017. V. 12. N 3. P. e0173867.
143. Li Y., Liu Y., Li R., Lu M., Wang X., Geng Y., Zhang Q., Wan M. Histotripsy liquefaction of large hematoma for intracerebral hemorrhage using millisecond-length ultrasound pulse groups combined with fundamental and second harmonic superposition: A preliminary study // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2020. V. 46. P. 1244–1257.
144. Elliott J., Simon J. C. Histotripsy bubble dynamics in elastic, anisotropic tissue-mimicking phantoms // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2023. V. 49. N. 3. P. 853–865.
145. Khokhlova T. D., Haider Y. A., Maxwell A. D., Kreider W., Bailey M. R., Khokhlova V. A. Dependence of boiling histotripsy treatment efficiency on HIFU frequency and focal pressure levels // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2017. V. 43. N. 9. P. 1975–1985.
146. Ittmann M. Anatomy and histology of the human and murine prostate // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018. V. 8. N. 5. P. a030346.
147. Barr R. G., Cosgrove D., Brock M., Cantisani V., Correas J. M., Postema A. W., Salomon G., Tsutsumi M., Xu H. X., Dietrich C. F. WFUMB guidelines and recommendations on the clinical use of ultrasound elastography: Part 5. Prostate // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2017. V. 43. N. 1. P. 27–48.
148. Ji Y., Ruan L., Ren W., Dun G., Liu J., Zhang Y., Wan Q. Stiffness of prostate gland measured by transrectal real-time shear wave elastography for detection of prostate cancer: a feasibility study // *The British journal of radiology*. 2019. V. 92. N. 1097. P. 20180970.
149. Correas J. M., Tissier A. M., Khairoune A., Vassiliu V., Méjean A., Hélénon O., Memo R., Barr R. G. Prostate cancer: diagnostic performance of real-time shear-wave elastography // *Radiology*. 2015. V. 275. N. 1. P. 280–289.
150. Rouvière O., Melodelim, C., Hoang Dinh A., Bratan F., Pagnoux G., Sanzalone T., Crouzet S., Colombel M., Mège-Lechevallier F., Souchon R. Stiffness of benign and malignant prostate tissue measured by shear-wave elastography: a preliminary study // *European radiology*. 2017. V. 27. N. 5. P. 1858–1866.
151. Hempel C. R., Hall T. L., Cain C. A., Fowlkes J. B., Xu Z., Roberts W. W. Histotripsy fractionation of prostate tissue: Local effects and systemic response in a canine model // *Journal of Urology*. 2011. V. 185. P. 1484–1489.
152. Schade G. R., Hall T. L., Roberts W. W. Urethral-sparing histotripsy of the prostate in a canine model // *Urology*. 2012a. V. 80. N. 3. P. 730–735.

153. Schade G. R., Keller J., Ives K., Cheng X., Rosol T. J., Keller E., Roberts W. W. Histotripsy focal ablation of implanted prostate tumor in an ACE-1 canine cancer model // *Journal of Urology*. 2012b. V. 188. N. 5. P. 1957–1964.
154. Хохлова В. А., Росницкий П. Б., Цысарь С. А., Буравков С. В., Сапожников О. А., Карзова М. М., Хохлова Т. Д., Максвелл А. Д., Гайфуллин Н. М., Кадрев А. В., Охоботов Д. А., Камалов А. А., Шейд Д. Р. Новый метод неинвазивного механического разрушения опухолей простаты с помощью импульсного фокусированного ультразвука // *Урология*. 2019. № 6. С. 67-73.
155. Dubinsky T. J., Khokhlova T. D., Khokhlova V., Schade G. R. Histotripsy: the next generation of high-intensity focused ultrasound for focal prostate cancer therapy // *Journal of ultrasound in medicine*. 2020. V. 39. N. 6. P. 1057–1067.
156. Hall T. L., Hempel C. R., Wojno K., Xu Z., Cain C. A., Roberts W. W. Histotripsy of the prostate: Dose effects in a chronic canine model. *Urology*. 2009. V. 74. N. 4. P. 932–937.
157. Schuster T. G., Wei J. T., Hendlin K., Jahnke R., Roberts W. W. Histotripsy treatment of benign prostatic enlargement using the Vortx Rx system: Initial human safety and efficacy outcomes // *Urology*. 2018. V. 114. P. 184–187.
158. 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*. 2016. № 4. С. 164701.
159. Li T., Chen H., Khokhlova T., Wang Y. N., Kreider W., He X., Hwang J. H. Passive cavitation detection during pulsed HIFU exposures of *ex vivo* tissues and *in vivo* mouse pancreatic tumors // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2014. V. 40. P. 1523–1534.
160. Patch S. K., Rao N., Kelly H., Jacobsohn K., See W. A. Specific heat capacity of freshly excised prostate specimens // *Physiological measurement*. 2011. V. 32. N. 11. P. N55–N64.
161. Wang Y. C., Chan T. C., Sahakian A. V. Real-time estimation of lesion depth and control of radiofrequency ablation within *ex vivo* animal tissues using a neural network // *International journal of hyperthermia*. 2018. V. 34. N. 7. P. 1104–1113.
162. Park S., Pham N. T., Huynh H. T., Kang H. W. Development of temperature controller-integrated portable HIFU driver for thermal coagulation // *Biomedical engineering online*. 2019. V. 18. N. 1. P. 77.
163. Zhou Y., Cunitz B. W., Dunmire B., Wang Y. N., Karl S. G., Warren C., Mitchell S., Hwang J. H. Characterization and *ex vivo* evaluation of an extracorporeal high-intensity focused ultrasound (HIFU) system // *Journal of applied clinical medical physics*. 2021. V. 22. N. 9. P. 345–359.
164. van Leenders G. J. L. H., van der Kwast T. H., Grignon D. J., Evans A. J., Kristiansen G., Kweldam C. F., Litjens G., McKenney J. K., Melamed J., Mottet N., Paner G. P., Samaratunga H., Schoots I. G., Simko J. P., Tsuzuki T., Varma M., Warren A. Y., Wheeler T. M., Williamson S. R., Iczkowski K. A., ISUP Grading Workshop Panel Members The 2019 International Society of Urological Pathology

- (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma // *The American journal of surgical pathology*. 2020. V. 44. N. 8. P. e87–e99.
165. Xu J., Bigelow T. A., Lee H. Effect of pulse repetition frequency and scan step size on the dimensions of the lesions formed in agar by HIFU histotripsy // *Ultrasonics*. 2013. V. 53. N. 4. P. 889–896.
166. Бессонова О.В., Хохлова В.А., Кэнни М.С., Бэйли М.Р., Крам Л.А. Метод определения параметров акустического поля в биологической ткани для терапевтических применений мощного фокусированного ультразвука // *Акустический журнал*. 2010. Т. 56. №. 3. С. 380–390.
167. Mohammadi A., Bianchi L., Asadi S., Saccomandi P. Measurement of *ex vivo* liver, brain and pancreas thermal properties as function of temperature // *Sensors*. 2021. 21(12). P. 4236.
168. Niehues S. M., Unger J. K., Malinowski M., Neymeyer J., Hamm B., Stockmann M. Liver volume measurement: reason of the difference between *in vivo* CT-volumetry and intraoperative *ex vivo* determination and how to cope it // *European Journal of Medical Research*. 2010. V. 15. N. 8. P. 345 – 350.
169. Brady L., Wang Y. N., Rombokas E., Ledoux W. R. Comparison of texture-based classification and deep learning for plantar soft tissue histology segmentation // *Computers in Biology and Medicine*. 2021. V 134. P. 104491.
170. Homeyer A., Schenk A., Arlt J., Dahmen U., Dirsch O., Hahn H. K. Practical quantification of necrosis in histological whole-slide images // *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 2013. V. 37. N. 4. P. 313–322.
171. Rangraz P., Behnam H., Shakhssalim N., Tavakkoli J. A feed-forward neural network algorithm to detect thermal lesions induced by high intensity focused ultrasound in tissue // *Journal of medical signals and sensors*. 2012. V. 2. N. 4. P. 192–202.
172. Li J., Sarma K. V., Chung Ho K., Gertych A., Knudsen B. S., Arnold C. W. A multi-scale U-Net for semantic segmentation of histological images from radical prostatectomies // *AMIA Annual Symposium proceedings*. 2018. P. 1140–1148.
173. Kalapahar A., Silva-Rodríguez J., Colomer A., López-Mir F., Naranjo V. Gleason grading of histology prostate images through semantic segmentation via residual U-Net // 2020 IEEE International Conference on Image Processing. 2020. P. 2501–2505.
174. Fu X, Liu T, Xiong Z, Smaill BH, Stiles MK, Zhao J. Segmentation of histological images and fibrosis identification with a convolutional neural network // *Computers in Biology and Medicine*. 2018. V. 98. P. 147–158.
175. Singh J., Sharma A., Sarma K., Suri S. Malik M. R. A quantitative histological study of the liver of pig (*Sus scrofa*) // *Indian Veterinary Journal*. 2017. V. 94. P. 14–16.
176. Larson A., Chin M. T. A method for cryopreservation and single nucleus RNA-sequencing of normal adult human interventricular septum myocardium tissue reveals cellular diversity and function // *BMC Medical Genomics*. 2021. V. 14. P. 161.

177. Tran T., Sundaram C. P., Bahler C. D., Eble J. N., Grignon D. J., Monn M. F., Simper N. B., Cheng L. Correcting the shrinkage effects of formalin fixation and tissue processing for renal tumors: toward standardization of pathological reporting of tumor size // *Journal of Cancer*. 2015. V. 6. N. 8. P. 759–766.
178. Simon J. C., Sapozhnikov O. A., Khokhlova V. A., Crum L. A., Bailey M. R. Ultrasonic atomization of liquids in drop-chain acoustic fountains // *Journal of Fluid Mechanics*. 2015. V. 766. P. 129–146
179. Matula T. J., Wang Y. N., Khokhlova T., Leotta D. F., Kucewicz J., Brayman A. A., Bruce M., Maxwell A. D., MacConaghy B. E., Thomas G., Chernikov V. P., Buravkov S. V., Khokhlova V. A., Richmond K., Chan K., Monsky W. Treating porcine abscesses with histotripsy: a pilot study. // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2021. V. 47. N. 3. P. 603–619.
180. Li J. J., Xu G. L., Gu M. F., Luo G. Y., Rong Z., Wu P. H., Xia J. C. Complications of high intensity focused ultrasound in patients with recurrent and metastatic abdominal tumors // *World Journal of Gastroenterology*. 2007. V. 13. P. 2747–2751
181. Hunter C., Sapozhnikov O. A., Maxwell A. D., Khokhlova V. A., Wang Y. N., MacConaghy B., Kreider W. An ultrasonic caliper device for measuring acoustic nonlinearity // *Physics Procedia*. 2016. V. 87. P. 93–98.
182. Grybauskas P., Kundrotas K., Sukackas V., Yaronis E. Ultrasonic digital interferometer for investigation of blood clotting // *Ultrasonics*. 1978. V. 16. P. 33–36
183. Андреев В. Г., Дмитриев В. Н., Пищальников Ю. А., Руденко О. В., Сапожников О. А., Сарвазян А. П. Наблюдение сдвиговой волны, возбужденной с помощью фокусированного ультразвука в резиноподобной среде // *Акустический журнал*. 1997. Т. 43. № 2. С. 149–155.
184. Пищальников Ю. А., Сапожников О. А., Синило Т. В. Повышение эффективности генерации сдвиговых волн в желатине при нелинейном поглощении фокусированного ультразвукового пучка // *Акустический журнал*. 2002. Т. 48. № 2. С. 253–259.
185. Poliachik S. L., Khokhlova T. D., Wang Y. N., Simon J. C., Bailey M. R. Pulsed focused ultrasound treatment of muscle mitigates paralysis-induced bone loss in the adjacent bone: a study in a mouse model // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2014. V. 40. N. 9. P. 2113–2124.
186. Sapozhnikov O. A. High-intensity ultrasonic waves in fluids: Nonlinear propagation and effects // *Power Ultrasonics. Applications of High-intensity Ultrasound*, ed. by Gallego-Juarez, J.A., and Graff, K.F., Chapter II, Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials (Elsevier, Cambridge). 2015. N. 66. P. 9–35.
187. Prieur F., Sapozhnikov, O. A. Modeling of the acoustic radiation force in elastography // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2017. V. 142. N. 2. P. 947–961.
188. Андреев В. Г., Ведерников А. В. Генерация и детектирование сдвиговых волн в резиноподобной среде с помощью сфокусированного ультразвука // *Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия*. 2001. № 1. С. 34–37.

189. Pierce A.D. Basic linear acoustics // Springer Handbook of Acoustics. 2014. 89. 2 edition. New York: Springer.
190. Vlasisavljevich E., Kim Y., Allen S., Owens G., Pelletier S., Cain C., Ives K., Xu Z. Image-guided non-invasive ultrasound liver ablation using histotripsy: feasibility study in an *in vivo* porcine model // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2013. V. 39. N. 8. P. 1398–1409
191. Vlasisavljevich E., Lin K. W., Maxwell A., Warnez M. T., Mancina L., Singh R., Putnam A. J., Fowlkes B., Johnsen E., Cain C., Xu Z. Effects of ultrasound frequency and tissue stiffness on the histotripsy intrinsic threshold for cavitation // *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2015. V. 41. N. 6. P. 1651–1667.
192. Knott E. A., Swietlik J. F., Longo K. C., Watson R. F., Green C. M., Abel E. J., Lubner M. G., Hinshaw J. L., Smolock A. R., Xu Z., Lee F. T. Jr., Ziemlewicz T. J. Robotically-assisted sonic therapy for renal ablation in a live porcine model: initial preclinical results // *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2019. V. 30. N. 8. P. 1293–1302
193. Буравков С. В., Пономарчук Е. М., Хохлова Т. Д., Ванг Я. Н., Хохлова В. А. Морфологические проявления повреждения печени свиньи при воздействии высокоинтенсивным импульсным фокусированным ультразвуком *in vivo* // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2017. Т. 6. №. 3. С. 38–43.
194. Yeats E., Gupta D., Xu Z., Hall T. L. Effects of phase aberration on transabdominal focusing for a large aperture, low *f*-number histotripsy transducer // *Physics in Medicine and Biology*. 2022. V. 67. N. 15.
195. Gu J., Jing Y. Modeling of wave propagation for medical ultrasound: a review // *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*. 2015. V. 62. N. 11. P. 1979–1992.