

УДК 523.222: 577.3

**НЕЛИНЕЙНЫЙ УЛЬТРАЗВУК:
РАЗРУШЕНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ БИОКОМПЛЕКСОВ
И НЕТЕПЛОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЗЛОКАЧЕСТВЕННУЮ ОПУХОЛЬ**

© 2002 г. В. А. Буров, Н. П. Дмитриева, член-корреспондент РАН О. В. Руденко

Поступило 06.12.2001 г.

Нарастающий интерес к проблеме выработки “универсальной” иммунной реакции организма на злокачественные клетки и заметное продвижение в этой области, достигнутое в последние годы [1], побуждают нас вернуться к результатам, полученным много лет назад в Лаборатории анизотропных структур АН СССР под руководством А.К. Букова [2–4]. Проводившиеся в этой лаборатории исследования были связаны с разработкой ультразвуковых источников мегагерцового диапазона высокой интенсивности, свыше 500 Вт/см^2 , в параллельном не фокусированном пучке и с использованием этого излучения для терапии раковых новообразований у животных, а позднее и человека. Здесь мы опускаем всю сравнительно недолгую (1950–1957 гг.) историю напряженных исследований, в результате которых был разработан полный комплекс аппаратуры: ряд радиочастотных генераторов выходной мощностью до 100 кВт (их разработка велась под руководством Ю.И. Китайгородского), а также большое количество излучателей на частоты от 350 кГц до 2 МГц на основе пьезокварцевых пластин диаметром до 120 мм. Наибольшее количество экспериментов проводилось на частоте 1.5 МГц при интенсивности в пучке $100\text{--}200 \text{ Вт/см}^2$ и длительности облучения 1–2 с. Использовалось также облучение в импульсном режиме при длительности излучения 400 мкс и периоде повторения 1600 мкс (общая длительность облучения 1–5 с). В этом случае мощность повышалась до 400 Вт/см^2 .

В качестве основной модели прививаемой животным опухоли был выбран штамм опухоли Броун–Пирс, отличающийся высокой степенью злокачественности. Животное (кролик) погибает от метастазов через 1–2 мес. после прививки, даже если яичко, в которое вводится прививаемая опухольная взвесь, удаляется спустя 1 ч. Облуче-

ние проводилось однократно на 8–11-й день после прививки. К этому времени опухолевые образования достигали существенного объема – около 40 см^3 . Кратковременность процесса озвучивания приводила к тому, что термический фактор воздействия (гипертермия) был исключен; это контролировалось различными способами, в том числе введением в опухоль термопары. На 15–20-й дни после озвучивания опухоль уменьшалась в объеме, а по истечении нескольких месяцев в 40–80% случаев рассасывалась; на ее месте возникал рубец, нередко происходило его обызвествление [5]. Наиболее важными, однако, представляются явления, связанные с ярко выраженной иммунной реакцией организма. Они заключались в рассасывании метастазов, не подвергавшихся непосредственному воздействию ультразвука. Эти метастазы в почках, глазах и т.д. нередко продолжали расти первое время после озвучивания, но позднее также рассасывались или (в случае метастазирования в почку) переставали прощупываться, а при вскрытии обнаруживался обычно обызвествленный рубец [6]. Повторная многократная прививка излеченных кроликов опухолевой взвесью не вызывала повторного заболевания [5, 7].

Микроскопическое исследование озвученной опухолевой ткани [8] в первые часы и дни после процедуры обычно не показывало на оптическом уровне заметных изменений в строении клеток, и лишь на последующих этапах, во время регрессивного процесса в опухоли, наблюдались яркие признаки дистрофии, дальнейшей деструкции и рассасывания ткани. Интересно, что в здоровой ткани подобных процессов не происходило. Электронно-микроскопические исследования показали, что воздействие ультразвука проявляется прежде всего в изменениях структуры митохондрий. Эти изменения относятся к разрывам и расслоению мембран, а позднее – к изменениям внутренней структуры митохондрий, их гомогенизации, создающей впечатление “опустошения”. Определенные изменения наблюдались и в ядрах опухолевых клеток [9].

*Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
Российской Академии наук, Москва*

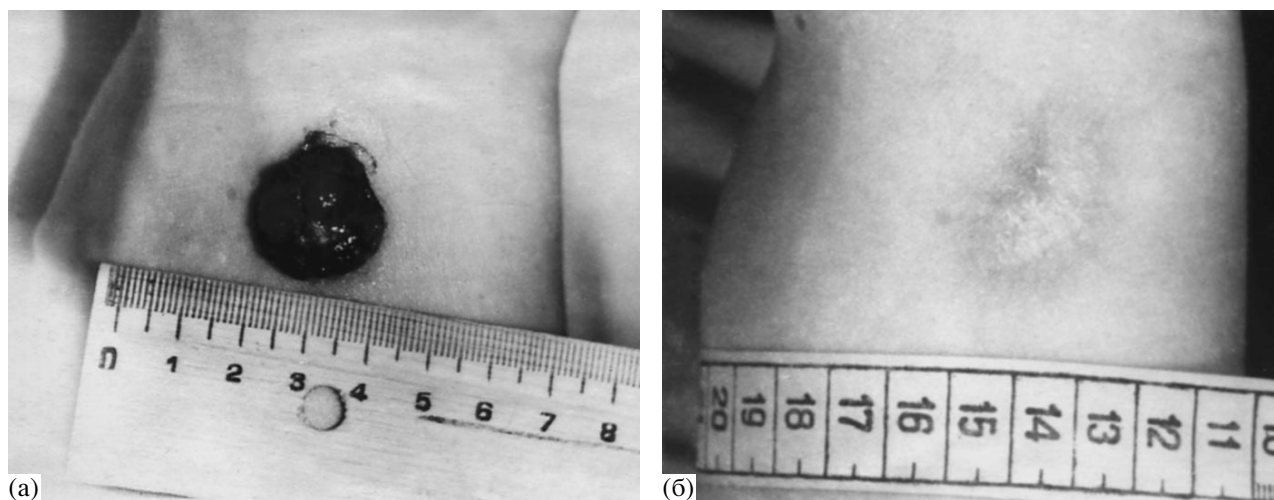


Рис. 1. а – первичная меланобластома на руке больного; б – рука того же больного после воздействия на опухоль ультразвуком высокой интенсивности.

Обнадёживающие результаты, полученные на животных, позволили принять решение о проведении клинических испытаний, которые проводились на базе клиники Института экспериментальной патологии и терапии рака (ИЭПИТР), руководимого Н.Н. Блохиным и реорганизованного впоследствии в Онкологический центр. Больным (их было около 10; в большинстве это были люди, пораженные меланомой, находящиеся на поздних стадиях заболевания) было предложено применение этого нового вида терапии. Несмотря на то, что не во всех случаях удалось добиться излечения (некоторые больные скончались от сопутствующих тяжелых заболеваний), в нескольких случаях было получено полное рассасывание меланомы [3] (рис. 1).

Изложенная коротко выше феноменология говорит о нетермическом воздействии использованного режима ультразвукового облучения. Эти результаты многократно повторялись, однако скоростная кончина А.К. Булова и стечение ряда объективных и субъективных обстоятельств привели к свертыванию этих работ.

Тем не менее последние результаты в области молекулярной биологии говорят о том, что всей совокупности наблюдавшихся фактов может быть предложено вполне правдоподобное объяснение. В [1] рассматривается роль фермента теломеразы в процессе выработки иммунной реакции организма, направленной против широкого перечня злокачественных опухолей. Теломераза, ответственная за регуляцию продолжительности жизни клетки [10], малоактивная в здоровых клетках, оказывается реактивированной в злокачественных клетках, обеспечивая рост опухолевой массы. Стимулированные теломеразой Т-лимфоциты вызывают лизис таких злокачественных

клеток, как клетки меланомы, подавление роста опухоли, не затрагивая жизненных функций здоровых клеток. Отмечается неспецифичность иммунной реакции, вызванной теломеразой. Есть все основания предположить, что воздействие мощного ультразвука вызывает поступление в организм содержащихся в злокачественных клетках ферментов, в том числе и теломеразы (возможно, специфическим образом видоизмененной, активизированной), вызывая, тем самым, ответную иммунную реакцию. В пользу этого обстоятельства говорит тот факт, что проводившиеся в Лаборатории анизотропных структур в 1956–1957 гг. опыты по созданию автовакцины были также результативны. Озвучивание велось в сосудах объемом 2–6 см³, представлявших собой параболический отражатель – концентратор, закрытый спереди стеклянной пластиной полуволновой толщины. Гомогенизированная и озвученная опухолевая масса затем центрифугировалась, и жидкая фракция вводилась животному, удаленная опухоль которого и подвергалась указанной обработке. Такая автовакцинация также приводила к приостановке злокачественного процесса и выздоровлению животного.

При анализе гистологических изменений в озвученных клетках отмечалось [9], что они оказываются заметными в первую очередь в клетках, находящихся на некотором удалении (1–2 см) от области, ближайшей к ультразвуковому излучателю. Возможно, это связано с тем, что на некотором расстоянии от излучателя в результате нелинейных процессов, сопровождающих распространение мощного ультразвука в жидкостях [11], из гармонической, вблизи излучателя, волны формируется волна пилообразной формы с узким передним фронтом, шириной $\sim 10^{-3}$ см. При мощностях около 150 Вт/см² и частоте 1.5 МГц это

расстояние составляет 3 см. Примерно на этом расстоянии и находилась центральная часть озвучиваемой опухоли.

Изменения в структуре макромолекул, мембран, ядер и субмикроскопических комплексов в клетке неоднократно наблюдались рядом авторов после облучения мощным ультразвуком в таких режимах, когда сильные тепловые и кавитационные разрушения были исключены [12, 13]. В качестве возможных механизмов назывались большие сдвиговые напряжения, возникающие в тонком акустическом погранслое вблизи твердых границ, силы трения между массивными макромолекулами и окружающей колеблющейся жидкостью, а также акустические микротечения [12, 13]. Влияние больших ускорений, испытываемых частицами среды в ультразвуковом поле (порядка $10^6 \cdot g$ при интенсивностях $I \sim 10^2$ Вт/см² на частотах $f \sim 1$ МГц) считалось несущественным, поскольку при длинах волн $\lambda \sim 1$ мм частицы размером $d \sim 1$ мкм должны двигаться как целое, не деформируясь. Однако прогрессивные нелинейные искажения волны приводят к формированию ударных фронтов, следующих один за другим периодически с частотой f , длительность которых [11]

$$t_{fr} = \frac{b}{\varepsilon} (2I\rho c)^{-1/2} \quad (1)$$

гораздо меньше периода $1/f$. Здесь b – эффективная вязкость, ε – нелинейность, ρ и c – плотность среды и скорость звука. Для излучателей, использовавшихся в лаборатории А.К. Бурова, оценка длительности фронта по формуле (1) дает для воды $3 \cdot 10^{-10}$ с; ширина фронта при этом 0.5 мкм, т.е. порядка d . Соответствующие градиенты давления вполне способны деформировать клетку и субклеточные структуры. Ускорение, испытываемое частицами на ударном фронте, достигает очень больших значений $10^9 \cdot g$. При таких скоростях нагружения высокоэластические свойства биологических структур не реализуются; они ведут себя как малоподатливый материал, разрушаясь при небольших величинах деформации. Кроме того, быстрое нагружение происходит периодически, с частотой 10^6 Гц, и нельзя исключить влияние накапливающихся усталостных повреждений. Разумеется, возможен и неожиданный биологический отклик на “новое” механическое воздействие, на которое живые системы не могли выработать защитную реакцию в процессе их эволюции.

Однако большие градиенты давления не обязательно должны присутствовать в структуре ультразвукового поля. Необходимо подчеркнуть, что даже при колебаниях клетки как целого внутри нее возникают резкие градиенты механического напряжения, обусловленные пространственной неоднородностью параметров, прежде всего

плотности и модуля сдвиговой упругости. Очевидность утверждения следует из рассмотрения простейшей модели биоструктуры в виде двух связанных шариков с массами m_1 и m_2 и различной плотностью, немного отличающейся (на ρ'_1 и ρ'_2) от плотности ρ_0 жидкости, осциллирующей вокруг них со скоростью $u_0(t)$. Учет лишь сопротивления при потенциальном обтекании [14] дает следующее выражение для силы, действующей на связь:

$$F = \frac{2}{3} \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \frac{|\rho'_1 - \rho'_2|}{\rho_0} \dot{u}_0(t). \quad (2)$$

Полагая радиус шариков R порядка 10 мкм и разность их плотностей $0.1\rho_0$, получим для напряжения $F/(\pi R^2)$ величину 10^9 дин/см², превышающую предел прочности клетки. Как известно, злокачественные клетки значительно более чувствительны к воздействию различных физических факторов, в том числе, к ультразвуку. При этом наиболее чувствительными внутриклеточными структурами оказываются митохондрии.

Рассмотрим теперь плоский слой микroneоднородной сплошной среды, колеблющейся под действием нелинейной акустической волны. Силы инерции вызывают локальные деформации в присутствии неоднородностей. Пусть толщина слоя вдоль оси x мала, и для быстрых продольных волн его можно считать сосредоточенной системой. Для медленных сдвиговых деформаций в приближении несжимаемой среды имеем

$$\mu \Delta U_i + \frac{\partial \mu}{\partial x_k} \left(\frac{\partial U_i}{\partial x_k} + \frac{\partial U_k}{\partial x_i} \right) = \rho_0(\mathbf{r}) \dot{u}_i(t). \quad (3)$$

Здесь μ – модуль сдвига, U_i – смещение, $\mathbf{r} = \{x_1 = x, x_2 = y\}$; $u_1 = u_0, u_2 = 0$. Для относительного удлинения элемента длины, т.е. деформации вдоль одной из осей (например, $\partial U_x / \partial x$ – вдоль оси x), получим из (3) уравнение Пуассона

$$\Delta \left(\mu \frac{\partial U_x}{\partial x} \right) = \frac{1}{2} \frac{\partial \rho_0}{\partial x} \dot{u}_0(t). \quad (4)$$

Если характерный масштаб изменения плотности равен d , а величина ее изменения ρ'_0 , то из (4) следует оценка

$$\left| \frac{\partial U_x}{\partial x} \right| \approx \frac{1}{2\mu} d \rho'_0 \dot{u}_0.$$

Биологические системы характеризуются малыми значениями модуля сдвига. Так, для белковых гелей $\mu \sim 10^3$ – 10^5 дин/см² [12]. Даже если принять значение $\mu = 10^6$ дин/см², характерное для мышечной ткани [15], а также $d \sim 1$ мкм, $\rho'_0 \sim 0.1$ г/см³, для деформации, вызываемой областью фронта,

получим величину порядка 10, выходящую за пределы применимости линейной теории упругости.

Эти оценки и модели, конечно, не являются строгими. Для развития представлений о механизмах ультразвукового разрушения биологических структур необходимы тщательный анализ имеющегося массива экспериментальных данных и проведение новых экспериментов. Однако важность проблемы и новые соображения относительно щадящего (нетотального) разрушения клеточных структур, способного вызвать иммунную реакцию, оправдывают, на наш взгляд, эту проблемную публикацию.

Работа выполнена при частичной поддержке грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 01-02-16282), "Научные школы" 00-15-96530 и CRDF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nair S. K., Heiser A., Wozkowski D. et al. // Nature Medicine. 2000. V. 6. № 8. P.1011-1017.
2. Буров А.К. // ДАН. 1956. Т.106. № 2. С. 239-241.
3. Буров А.К., Андреевская Г.Д. // ДАН. 1956. Т.106. № 3. С. 445-448.
4. Буров А.К. // Акуст. журн. 1958. Т. 4. № 4. С. 315-320.
5. Дмитриева Н.П. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1958. № 11. С. 97-102.
6. Дмитриева Н.П. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1957. № 11. С. 81-85.
7. Дмитриева Н.П. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1957. № 6. С. 60-62.
8. Дмитриева Н.П. // Вопр. онкологии. 1957. Т. 3. № 6. С. 688-693.
9. Дмитриева Н.П. // ДАН. 1960. Т. 132. № 1. С. 210-212.
10. Егоров Е.Е. // Молекулярная биология. 1997. Т. 31. № 1. С. 16-24.
11. Руденко О.В., Солуян С.И. Теоретические основы нелинейной акустики. М.: Наука, 1975. 287 с.
12. Эльпинер И.Е. Биофизика ультразвука. М.: Наука, 1973. 384 с.
13. Nyborg W.L. Physical Mechanisms for Biological Effects of Ultrasound. Rockville (Md): Bureau Radiol. Health, 1978. 150 с.
14. Ландау Л.Д., Лившиц Е.М. Гидродинамика. М.: Наука, 1986. 736 с.
15. Sarvazyan A.P., Rudenko O.V., Swanson S.D. et al. // Ultrasound in Med. and Biol. 1998. V. 24. № 9. P. 1419-1435.