

3. Everett H., Barry M., Sun X. et al. // J. Exp. Med. — 2002. — Vol. 196, N 9. — P. 1127—1140.
4. Galiègue S., Casellas P., Kramar A. et al. // Clin. Cancer Res. — 2004. — Vol. 10. — P. 2058—2064.
5. Gavish M., Laor N., Bidder M. et al. // Neuropsychopharmacology. — 1996. — Vol. 14, N 3. — P. 181—186.
6. Han Z., Slack R. S., Li W. et al. // J. Recept. Signal Transduct. Res. — 2003. — Vol. 23, N 2—3. — P. 225—238.
7. Johnson M. R., Marazziti D., Brawman-Mintzer O. et al. // Biol. Psychiatry. — 1998. — Vol. 43, N 4. — P. 306—309.
8. Kurumaji A., Nomoto H., Yamada K. et al. // Am. J. Med. Genet. — 2001. — Vol. 105, N 2. — P. 172—175.
9. Lin D., Chang Y. J., Strauss J. F. et al. // Genomics. — 1993. — Vol. 18, N 3. — P. 643—650.
10. Linehan W. M., Zbar B. // Cancer Cell. — 2004. — Vol. 6. — P. 223—228.
11. Maaser K., Grabowski P., Sutter A. P. et al. // Clin. Cancer Res. — 2002. — Vol. 8. — P. 3205—3209.
12. Molina A. M., Tickoo S. K., Ishill N. et al. // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27, N 15S. — P. 16017.
13. Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T. R. et al. // Trends Pharmacol. Sci. — 2006. — Vol. 27, N 8. — P. 402—409.
14. Patard J.-J., Kim H. L., Lam J. S. et al. // J. Clin. Oncol. — 2004. — Vol. 22, N 16. — P. 3316—3322.
15. Patard J.-J., Leray E., Rioux-Leclercq N. et al. // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, N 12. — P. 2763—2771.
16. Pignot G., Elie C., Conquy S. et al. // J. Urology. — 2007. — Vol. 69, N 2. — P. 230—235.
17. Ruff M. R., Pert C. B., Weber R. J. et al. // Science. — 1985. — Vol. 229. — P. 1281—1283.
18. Taliani S., Simorini F., Sergianni V. et al. // J. Med. Chem. — 2007. — Vol. 50, N 2. — P. 404—407.
19. Veenman L., Gavish M. // Pharmacol. Ther. — 2006. — Vol. 110, N 3. — P. 503—524.

Поступила 28.03.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616-006.04-685.831.015.2:[615.31:547.625]-092.9

Н. Б. Морозова¹, Р. И. Якубовская¹, В. И. Чиссов¹, В. М. Негримовский², О. А. Южакова²

ФОТОИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВНОСТЬ IN VIVO ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННОГО ФТАЛОЦИАНИНА ЦИНКА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

¹ФГБУ МНИОИ им. П. А. Герцена (дир. — акад. РАМН В. И. Чиссов) Минздравсоцразвития России; ²ФГУП ГНЦ НИОПИК (дир. — чл.-кор. РАН Г. Н. Ворожцов), Москва

Исследован *in vivo* замещенный фталоцианиновый комплекс холосенс в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований. Холосенс мгновенно накапливается в тканях опухолей мышей (карцинома легкого Льюис — LLC, аденокарцинома толстой кишки Colo26 — C26, саркома 37 — S37, меланома B16 — B16) с флуоресцентной контрастностью относительно окружающей ткани от 2 до 4 усл. ед. Максимум флуоресценции в опухоли с $\lambda_{\max} = 696,5$ нм регистрируется через 5—30 мин после введения. Холосенс обладает высокой фотоиндуцированной активностью относительно опухолей различного генеза. Использование эффективных режимов ФДТ (доза холосенса 0,5—1,0 мг/кг, интервал Δt 5—30 мин, плотность энергии 90—180 Дж/см²) позволяет добиться высоких результатов лечения: торможение роста опухоли составляет 81,8—98,6%, увеличение продолжительности жизни — 49,0—115,3%, критерий излеченности — 25,0—66,7%. Наиболее чувствительны к ФДТ с холосенсом опухоли LLC, C26 и S37. Холосенс является перспективным фотосенсибилизатором для ФДТ злокачественных новообразований, а также для антимикробной ФДТ.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, катионные фталоцианины, холосенс, локальная флуоресцентная спектроскопия, противоопухолевая эффективность

IN VIVO PHOTO-INDUCED ACTIVITY OF POSITIVELY CHARGED ZINC PHTHALOCYANINE USED FOR PHOTODYNAMIC THERAPY FOR MALIGNANCIES

N. B. Morozova¹, R. I. Yakubovskaya¹, V. I. Chissov¹, V. M. Negrimovsky², O. A. Yuzhakova²

¹P. A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Russian Agency for Medical Technologies; ²Research Institute of Organic Intermediates and Dyes, Moscow

The substituted phthalocyanine complex cholosens was *in vivo* investigated as a photosensitizer used in photodynamic therapy (PDT) for malignancies. Cholosens immediately accumulates in the tissues of murine tumors (Lewis lung carcinoma (LLC), colon adenocarcinoma 26 (C26), sarcoma 37 (S37), and melanoma B16) imaged by fluorescence to show contrast of tumor compared to adjacent tissue from 2 to 4 conventional units. The maximum tumor fluorescence the $\lambda_{\max} = 696.5$ nm is recorded 5-30 minutes after injection. Cholosens has a high photo-induced activity against tumors of different genesis. The use of effective PDT regimes (cholosens, 0.5-1.0 mg/kg; interval, Δt 5-30 min; energy density, 90-180 J/cm²) yields high treatment results: tumor growth suppression is 81.8-98.6%; higher survival rates are 49.0-115.3%; recovery index is 25.0-66.7%. LLC, C26, and S37 are most susceptible to PDT with cholosens. The later is a promising photosensitizer used in PDT for malignancies and for antimicrobial PDT.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, cationic phthalocyanines, cholosens, local fluorescence spectroscopy, antitumor efficacy

Метод фотодинамической терапии (ФДТ) основан на накоплении в опухолевой ткани введенного в организм фотосенсибилизатора (ФС), действие которого активируется локальным световым облучением и сопровождается генерацией активных форм кислорода, приводящих к гибели опухолевых клеток. В настоящее время проводится направленный поиск новых ФС с максимумом поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра, где обнаруживается большая проницаемость биологических тканей.

Среди перспективных для изучения классов красителей находятся фталоцианины. К достоинствам ФС этого класса относятся: относительно простая и дешевая технология производства, химическая стабильность, длинноволновый интенсивный максимум поглощения (более 670 нм), высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода (приблизительно 0,4–0,6) и величина экстинкции ($\epsilon > 100\,000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), что позволяет достигать максимального полного некроза (высокая цитотоксичность) [3, 5].

В настоящее время все большее внимание привлекают положительно заряженные фталоцианины, которые обладают высокой фотоиндуцированной активностью относительно как опухолей [7–10], так и патогенных микроорганизмов [4, 6].

Ранее нами был исследован ряд замещенных фталоцианинов цинка с положительными зарядами в боковой цепи [2, 11] и выявлена их высокая эффективность. Наиболее активным среди них оказалось холиновое производное (октакис[N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметиламмонийметил] фталоцианин цинка октахлорид) — холосенс, который наряду с высокой противоопухолевой активностью характеризовался выраженным противомикробным действием в отношении *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* и др. [4]. Отмечалось снижение множественности опытной бактериальной взвеси в 10^5 раз при использовании холосенса в концентрации 2 мкг/мл и облучении светодиодным источником (684 нм) мощностью 10 мВт/см² в течение 5 мин.

Настоящая работа посвящена изучению флюоресцентных свойств и фотоиндуцированной противоопухолевой активности холосенса в системе *in vivo*.

Фотосенсибилизатор холосенс (октакис[N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметиламмонийметил] фталоцианин цинка октахлорид) — ZnPcChol_8 синтезирован во ФГУП ГНЦ НИОПИК.

Для исследования *in vivo* субстанцию растворяли в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) до концентрации 0,01–0,1 мг/мл и вводили животным в дозах 0,1–1,0 мг/кг внутривенно.

В работе использовали мышей гибридов BDF₁ самок с привитыми опухолями: карцинома легкого Льюис (LLC) и меланома B16 (B16) по 10 мг опухолевой ткани на мыш; саркома 37 (S37) по $0,9 \cdot 10^6$ клеток на мыш и мышей линии Balb/c самок с привитой аденокарциномой толстой кишки Colo26 (C26) по $0,5 \cdot 10^6$ клеток на мыш. Инкуляцию опухолевых клеток проводили в объеме 0,05 мл подкожно в область икроножной мышцы с внешней стороны бедра.

Регистрацию флюоресценции проводили контактным способом на лазерном спектральном анализаторе

для флюоресцентной диагностики опухолей и контроля за ФДТ "ЛЭСА-06" (ТОО "БиоСпек", Россия). Флюоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера (длина волны генерации 632,8 нм, спектральный диапазон измерений 640–800 нм).

При возбуждении флюоресценции в красной области спектра интегральную интенсивность флюоресценции в диапазоне 641–724 нм нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния в ткани возбуждающего лазерного излучения ($\lambda_{\text{max}} = 632,8 \text{ нм}$), определяя, таким образом, нормированную флюоресценцию (ФН) тканей [1, 12].

Исследование осуществляли следующим образом: через различные интервалы времени после введения ФС (5 с; 5, 15, 30 мин; 1, 2, 4, 24, 48 и 72 ч) мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков и затем извлекали образцы различных тканей. Объектами исследования являлись опухолевая ткань, кожа, мышца. Измерение экзогенной флюоресценции тканей проводили *ex vivo* сразу после умерщвления животного. На каждый срок наблюдения исследовали материал, полученный от трех животных. Накопление ФС в тканях оценивали по максимальным значениям ФН при длине волны, соответствующей максимуму флюоресценции холосенса ($\lambda_{\text{max}} = 696,5 \text{ нм}$).

В ходе исследования рассчитывали флюоресцентную контрастность (ФК) как отношение ФН в опухоли к ФН в коже и мышце соответственно $\text{ФК}_1 = \text{ФН опухоль}/\text{ФН кожа}$, $\text{ФК}_2 = \text{ФН опухоль}/\text{ФН мышца}$.

Облучение проводили дистанционно на 7-й день роста опухоли у мышей. В качестве анестезии применяли раствор дроперидола в дозе 0,25 мг/мыш. День проведения ФДТ принимали за нулевой день фотодинамического воздействия.

Для облучения использовали светодиодный источник красного света с максимумом 685 нм (плотность мощности 100 мВт/см², плотность энергии 45, 90, 135 и 180 Дж/см²). Диаметр светового пятна 1 см, время облучения 7,5–30 мин. Интервал между введением ФС и облучением составлял 5, 15, 30 и 60 мин. Холосенс вводили животным внутривенно в дозах 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мг/кг.

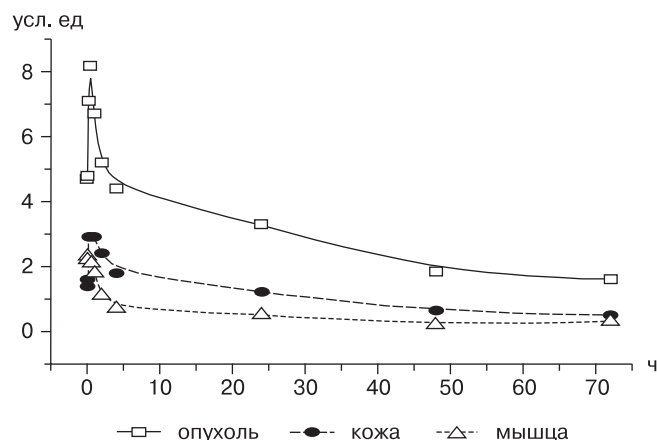
Оценку эффективности ФДТ проводили, используя общепринятые в экспериментальной онкологии критерии:

- торможение роста опухоли — $\text{TPO} = [(V_{\text{к}} - V_{\text{оп}})/V_{\text{к}}] \cdot 100\%$, где $V_{\text{оп}}$ и $V_{\text{к}}$ — объем опухоли в опытной и контрольной группах соответственно;
- увеличение продолжительности жизни — $\text{УПЖ} = [(\text{СПЖ}_{\text{оп}} - \text{СПЖ}_{\text{к}})/\text{СПЖ}_{\text{к}}] \cdot 100\%$, где $\text{СПЖ}_{\text{оп}}$ и $\text{СПЖ}_{\text{к}}$ — средняя продолжительность жизни в опытной и контрольной группах соответственно;
- критерий излеченности — $\text{КИ} = [N_{\text{и}}/N_{\text{о}}] \cdot 100\%$, где $N_{\text{и}}$ и $N_{\text{о}}$ — количество излеченных животных и общее количество животных в опытной группе соответственно.

Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = d_1 \cdot d_2 \cdot d_3$, где d_1 , d_2 и d_3 — три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, Origin 7.0. Линейные величины сравнивали по методу Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Минимальным терапевтическим эффектом считали $\text{TPO} \geq 50\%$, $\text{УПЖ} \geq 20\%$, $\text{КИ} \geq 20\%$.

Для корреспонденции: Морозова Наталья Борисовна — канд. биол. наук, науч. сотр. отд-ния модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии; 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3, тел.: (495)945-87-16



Уровни ФН ZnPcChol₈ в тканях мышей с опухолью LLC в интервале 5 с — 72 ч. Доза ZnPcChol₈ 1,0 мг/кг. Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера в диапазоне 400—800 нм.

Эффективность ФДТ определяется уровнем накопления красителя и особенностями его распределения в опухолевой и окружающих тканях, которые и были изучены на первом этапе работы методом локальной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) у животных с опухолями различного гистогенеза. Содержание мономерной формы фталоцианиновых красителей, способных инициировать фотоповреждение в тканях животных при облучении, отражает, как правило, уровень ФН в них.

Оценку флуоресценции холосенса проводили в первичных опухолях мышей различного гистогенеза (C26, LLC, S37, B16) и окружающих тканях.

Анализ полученных данных выявил общие закономерности в распределении холосенса в тканях у мышей с различными опухолями. Так, уровень ФН ФС в опухолевой ткани начинает быстро увеличиваться, достигая максимальных значений уже через 15—30 мин, и сохраняется в течение 60 мин после введения, что свидетельствует о быстром накоплении холосенса. В последующие сроки краситель выводится из опухолей с различной скоростью. Уровень ФН в опухолевых тканях через 72 ч снижается и составляет 19,5% от максимального значения (LLC). Наиболее длительно холосенс удерживается опухолью S37, быстрее выводится из опухоли B16.

В окружающей коже уровень ФН достигает максимума через 15 мин после введения и сохраняется в течение 60 мин. Через 72 ч уровень ФН в коже составляет 17,2% от максимального значения (LLC). Наиболее длительно

холосенс удерживает кожа, окружающая опухоль C26, для остальных опухолей выведение красителя происходит аналогично.

В окружающей мышечной ткани уровень ФН достигает максимума мгновенно и сохраняется на этом уровне в течение 60 мин. Из окружающей мышечной ткани краситель выводится быстро. Через 72 ч уровень ФН составляет 8,7% от максимального значения (LLC). Уровни ФН холосенса в опухоли и окружающих тканях представлены на рисунке (мышцы с опухолью LLC).

Величина ФК ($FK_1 = \frac{ФН_{опухоль}}{ФН_{кожа}}$ и $FK_2 = \frac{ФН_{опухоль}}{ФН_{мышца}}$) зависит от времени, прошедшего с момента введения препарата (табл. 1).

Показано, что ФС обладает тропностью к опухолевой ткани. Максимальное значение ФК относительно кожи (FK_1) регистрируется в интервале 5 с — 30 мин у животных с LLC ($2,3 \pm 0,4$ — $2,6 \pm 0,3$ усл. ед.) и S37 ($2,6 \pm 0,3$ — $4,4 \pm 1,0$ усл. ед.), 5 с — 24 ч у мышей с B16 ($2,6 \pm 0,5$ — $3,4 \pm 0,6$ усл. ед.) и 5 мин — 1 ч у животных с C26 ($2,0 \pm 0,2$ — $2,3 \pm 0,3$ усл. ед.).

Максимальное значение ФК относительно мышцы (FK_2) наблюдается в интервале 30 мин — 24 ч у мышей с опухолями LLC ($2,8 \pm 0,3$ — $3,3 \pm 0,4$ усл. ед.) и C26 ($3,5 \pm 0,3$ — $3,7 \pm 0,7$ усл. ед.), 1—24 ч у животных с B16 ($3,0 \pm 0,4$ — $3,7 \pm 0,9$ усл. ед.) и 4—72 ч у мышей с S37 ($4,3 \pm 0,9$ — $3,5 \pm 0,5$ усл. ед.).

Таким образом, показано, что опухоли C26, LLC, S37 и B16 накапливают ZnPcChol₈. Значение ФН зависит от времени после введения, достигая максимума во всех опухолях через 15—60 мин после введения и составляет от $6,7 \pm 0,6$ до $10,7 \pm 2,4$ усл. ед., а затем достаточно быстро снижается. FK_1 для исследованных опухолей близки по своим значениям и составляют в интервале 15—60 мин $2,0 \pm 0,2$ — $3,4 \pm 0,6$ усл. ед., а FK_2 — $2,2 \pm 0,4$ — $3,7 \pm 0,9$ усл. ед. Эти данные служат основой для оптимизации режимов ФДТ с холосенсом (см. рисунок, табл. 1).

Эффективность ФДТ изучена в мультипараметрической системе в зависимости от дозы холосенса, интервала между его введением и облучением (Δt) и плотности энергии. С целью установления интервала оптимальных доз ФС на модели LLC проводили оценку противоопухолевой эффективности в зависимости от дозы красителя (0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мг/кг) при постоянных интервалах времени между введением красителя и облучением ($\Delta t = 30$ мин) и плотности энергии (90 Дж/см²), которые были выбраны по результатам предварительных исследований.

Таблица 1

Флуоресцентная контрастность (ФК) холосенса в тканях опухолей

Опухоль	Показатель	ФК, усл. ед.								
		5 с	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	4 ч	24 ч	48 ч	72 ч
LLC	ФК ₁	$2,6 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
	ФК ₂	$1,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2$
C26	ФК ₁	$1,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
	ФК ₂	$1,4 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,3$
S37	ФК ₁	$4,4 \pm 1,0$	$3,4 \pm 0,7$	$2,6 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$4,2 \pm 1,1$	$4,2 \pm 1,5$	$3,9 \pm 0,8$
	ФК ₂	$3,8 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,5$	$4,2 \pm 2,0$	$4,3 \pm 1,7$	$4,3 \pm 0,9$
B16	ФК ₁	$2,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$
	ФК ₂	$1,8 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,6$	$2,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,9$	$3,4 \pm 0,8$	$3,0 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,7$

Примечание. Доза холосенса 1,0 мг/кг. Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера ($\lambda_{\text{max}} = 632,8$ нм) в диапазоне 400—800 нм. $FK_1 = \frac{ФН_{опухоль}}{ФН_{кожа}}$, $FK_2 = \frac{ФН_{опухоль}}{ФН_{мышца}}$.

Таблица 2

Влияние ФДТ с использованием холосенса на рост LLC в зависимости от дозы ФС (интервал Δt 30 мин, плотность энергии 90 Дж/см²)

Доза, мг/кг	V опухоли, см ³ (1) ТРО, % (2)	Срок наблюдения, сут						СПЖ, сут (1) УПЖ, % (2)	КИ, %
		до ФДТ	8	11	13	15	21		
Контроль	1	0,08 ± 0,02	0,49 ± 0,10	0,86 ± 0,17	1,33 ± 0,30	1,60 ± 0,36	3,53 ± 0,66	48,2 ± 4,6	0
Темновой контроль	1	0,08 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,92 ± 0,13	1,23 ± 0,24	1,64 ± 0,29	3,05 ± 0,36	49,8 ± 6,8	0
	2		12,2	-7,0	7,5	0	13,6	0	
0,1	1	0,07 ± 0,01	0,40 ± 0,06	0,66 ± 0,07	0,96 ± 0,15	1,30 ± 0,21	2,49 ± 0,45	51,2 ± 1,1	0
	2		18,4	23,3	27,8	18,7	29,5	6,2	
0,2	1	0,08 ± 0,01	0,38 ± 0,12	0,54 ± 0,17	0,84 ± 0,28	1,11 ± 0,47	2,34 ± 1,02	51,5 ± 2,8	0
	2		22,4	37,2	36,8	30,6	33,7	6,8	
0,5	1	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,24 ± 0,09	0,43 ± 0,13	0,63 ± 0,21	1,67 ± 0,44	53,0 ± 3,2	0
	2		71,4	72,1	67,7	60,6	52,7	10,0	
1,0	1	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,15 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,53 ± 0,25	71,8 ± 14,4	20
	2		89,8	90,7	88,7	88,8	85,0	49,0	

Примечание. Здесь и в табл. 3—5 плотность мощности 100 мВт/см². УПЖ и КИ оценены в интервале 120 сут для всех животных.

Противоопухолевая эффективность ФДТ с холосенсом зависит от дозы красителя (табл. 2). Увеличение дозы ZnPcChol₈ с 0,1 до 1,0 мг/кг приводит к увеличению ТРО соответственно с 18,4—29,5 до 85,0—90,7% во все сроки наблюдения (21 сут). УПЖ отмечено только при использовании дозы 1,0 мг/кг, оно составило 49,0%. При использовании более низких доз красителя (0,1, 0,2 и 0,5 мг/кг) значения УПЖ были биологически незначимы. Излеченность животных наблюдалась только при использовании дозы 1,0 мг/кг и составила 20,0%.

На следующем этапе проводили уточнение оптимального интервала Δt при проведении ФДТ с холосенсом. Полученные данные о биораспределении показали, что максимальное значение ФН в опухоли LLC регистрировалось через 5—60 мин после введения, поэтому для облучения были выбраны интервалы 5, 15, 30 и 60 мин после введения холосенса при постоянной дозе ФС 0,5 мг/кг и плотности энергии 90 Дж/см².

Противоопухолевая эффективность ФДТ с холосенсом у животных с опухолью LLC зависит от интервала между введением красителя и облучением (табл. 3). Уменьшение интервала Δt с 60 до 15 мин приводило к увеличению ТРО с 27,5—45,9 до 82,7—98,0% во все сроки наблюдения (21 сут). При дальнейшем сокращении интервала Δt до 5 мин ТРО во все сроки наблюдения несколько ниже, чем при облучении через 15 мин, и составляло 79,9—91,8%. КИ наблюдался только при интервалах Δt 5 и 15 мин и составлял 42,9 и 66,7% соответ-

ственно. Для тех же интервалов (Δt 5, 15 мин) средняя продолжительность жизни животных увеличивалась на 64,5 и 115,3% соответственно. Для других интервалов (Δt 30, 60 мин) значения УПЖ биологически незначимы (10,0, 9,1 соответственно).

С целью уточнения эффективных световых доз оценивали эффективность ФДТ с холосенсом в зависимости от плотности энергии (45, 90, 135 и 180 Дж/см²) при постоянной плотности мощности 100 мВт/см². Исследования проводили при использовании оптимальных величин интервала Δt (15 мин) и дозы красителя (0,5 мг/кг), выбранных на основе предыдущих исследований (табл. 4).

После облучения ни в одной из групп гибели животных не отмечено. Фотоактивность холосенса при использовании дозы 0,5 мг/кг и интервала Δt 15 мин с увеличением плотности энергии с 45 до 180 Дж/см² повышается. Терапевтический интервал плотности энергии составляет 90—180 Дж/см². Наиболее высокий противоопухолевый эффект отмечен при использовании плотности энергии 180 Дж/см². ТРО составляет 94,6—97,1%, КИ — 66,7%, СПЖ увеличивается на 109,1%.

Полученные результаты показали, что ФДТ с ZnPcChol₈ на модели LLC приводит к развитию отека с последующим формированием некротического струпа в зоне облучения, который исчезает через 4—10 сут в зависимости от режимов проведения ФДТ.

Проведенные исследования позволили определить для холосенса терапевтические режимы проведения

Таблица 3

Влияние ФДТ с использованием холосенса на рост LLC в зависимости от интервала Δt (доза ФС 0,5 мг/кг, плотность энергии 90 Дж/см²)

Интервал, мин	V опухоли, см ³ (1) ТРО, % (2)	Срок наблюдения, сут						СПЖ, сут (1) УПЖ, % (2)	КИ, %
		до ФДТ	8	11	13	15	21		
Контроль	1	0,08 ± 0,02	0,49 ± 0,10	0,86 ± 0,17	1,33 ± 0,30	1,60 ± 0,36	3,53 ± 0,66	48,2 ± 4,6	0
Темновой контроль	1	0,08 ± 0,01	0,41 ± 0,07	0,75 ± 0,13	1,11 ± 0,16	1,67 ± 0,25	2,93 ± 0,39	50,2 ± 2,5	0
	2		16,3	12,8	16,5	0	17,0	4,1	
5	1	0,09 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,11 ± 0,07	0,19 ± 0,11	0,29 ± 0,17	0,71 ± 0,39	79,3 ± 20,3	42,9
	2		91,8	87,2	85,7	81,9	79,9	64,5	
15	1	0,09 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,08 ± 0,08	0,13 ± 0,13	0,22 ± 0,25	0,61 ± 0,66	103,8 ± 19,0	66,7
	2		98,0	90,7	90,2	86,2	82,7	115,3	
30	1	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,05	0,24 ± 0,09	0,43 ± 0,13	0,63 ± 0,21	1,67 ± 0,44	53,0 ± 3,2	0
	2		71,4	72,1	67,7	60,6	52,7	10,0	
60	1	0,09 ± 0,02	0,28 ± 0,06	0,50 ± 0,17	0,73 ± 0,34	1,16 ± 0,46	2,34 ± 0,83	52,6 ± 2,2	0
	2		42,9	41,9	45,1	27,5	33,7	9,1	

Таблица 4

Влияние ФДТ с использованием холосенса на рост LLC в зависимости от плотности энергии (доза ФС 0,5 мг/кг, интервал Δt 15 мин)

Плотность энергии, Дж/см ²	V опухоли, см ³ (1) ТРО, % (2)	Сроки наблюдения, сут						СПЖ, сут (1) УПЖ, % (2)	КИ, %
		до ФДТ	7	10	12	14	19		
Контроль	1	0,07 ± 0,01	0,35 ± 0,10	0,56 ± 0,11	1,07 ± 0,24	1,62 ± 0,33	3,29 ± 0,65	45,9 ± 2,5	0
Контроль	1	0,07 ± 0,01	0,28 ± 0,08	0,50 ± 0,11	0,87 ± 0,20	1,46 ± 0,27	3,08 ± 0,20	45,8 ± 2,7	0
Облучение	2		20,0	10,7	18,7	9,9	6,4	0	
45	1	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,04	0,26 ± 0,06	0,40 ± 0,11	0,65 ± 0,14	1,37 ± 0,27	43,2 ± 3,4	0
	2		60,0	53,6	62,6	59,9	58,4	0	
90	1	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,09 ± 0,05	0,15 ± 0,06	0,26 ± 0,11	0,62 ± 0,26	71,3 ± 19,9	33,3
	2		85,7	83,9	86,0	83,9	81,2	55,3	
135	1	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,05	0,16 ± 0,09	0,39 ± 0,22	73,5 ± 19,0	33,3
	2		94,3	91,2	92,5	90,1	88,2	60,1	
180	1	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,07 ± 0,05	0,16 ± 0,13	96,0 ± 19,5	66,7
	2		97,1	94,6	95,3	95,7	95,1	109,1	

ФДТ: доза препарата 0,5—1,0 мг/кг, интервал Δt 15—30 мин, плотность энергии 90—180 Дж/см². Однако наиболее эффективной является доза 0,5 мг/кг, интервал Δt 15 мин при плотности энергии 90—180 Дж/см². Использование данных режимов ФДТ с холосенсом позволяет добиться высоких результатов при лечении опухоли LLC у мышей: ТРО составляет от 82,7 до 98,0%, УПЖ — 55,3—115,3%, КИ — 33,3—66,7%.

Для оценки эффективности на других опухолевых моделях — C26, S37 и B16 — были выбраны оптимальные условия на основании флюоресцентного анализа и с учетом эффективных доз холосенса, интервалов Δt и плотности энергии, отобранных на модели LLC (доза ФС 0,5 мг/кг, интервал Δt 15 мин и плотность энергии 90 Дж/см²) (табл. 5).

После проведенного облучения гибели животных отмечено не было. В течение нескольких часов наблюдалось развитие отека, который сохранялся 6—8 сут после ФДТ.

Противоопухолевая эффективность ФДТ с использованием ZnPcChol₈ в оптимальном режиме при всех опухолях оказалась высокой. ТРО во все сроки наблюдения (18 сут) составило 86,2—98,0% для LLC, 81,8—90,2% для C26, 92,1—98,6% для S37 и 51,4—80,9% для B16. Наибольшая эффективность ФДТ наблюдалась при LLC, C26 и S37: СПЖ увеличивалась соответственно на 115,3; 109,3 и 121,0%, КИ составил соответственно 66,7; 25 и 40%. При опухоли B16 излеченных животных выявлено не было, УПЖ биологически незначимо.

Заключение

Методом локальной флюоресцентной спектроскопии показано, что в различных опухолях мышей (LLC, C26, S37, B16) катионный ФС холосенс быстро накапливает-

ся и сохраняется в них в течение 60 мин после введения. Флюоресцентная контрастность относительно окружающей ткани составляет 2—4 усл. ед.

На модели LLC определены оптимальные условия проведения ФДТ с холосенсом: доза ФС 0,5—1,0 мг/кг, интервал Δt 5—30 мин, плотность энергии 90—180 Дж/см² (плотность мощности 100 мВт/см²). Использование данных режимов ФДТ позволяет добиться высоких результатов лечения с холосенсом: ТРО составляет 82,7—98,0%, УПЖ — 49,0—115,3%, КИ — 20,0—66,7%.

В отношении опухолей различного гистогенеза показана высокая противоопухолевая активность ФДТ с холосенсом при использовании оптимального режима проведения ФДТ. В зависимости от природы опухоли ТРО составляет от 51,4 до 98,6%, УПЖ — от 7,3 до 115,3%, КИ — от 0 до 66,7%. Наибольшую фотоактивность холосенс проявляет в отношении опухолей LLC, C26 и S37.

Использование для проведения ФДТ фотосенса и фталосенса (в качестве препаратов сравнения) в эффективных режимах позволяет получить у животных с опухолью LLC следующие результаты: для фотосенса (доза 2—5 мг/кг, интервал Δt 0,25—4 ч, плотность энергии 90—180 Дж/см²) ТРО — 81,2—100%, УПЖ — 46,5—53,9%, КИ — 14,0—20,0%; для фталосенса (доза 0,5 мг/кг, интервал Δt 2 ч, плотность энергии 90 Дж/см²) КИ составляет 100%.

Холосенс является перспективным ФС для ФДТ злокачественных новообразований. Учитывая, что ФДТ с холосенсом оказывает также выраженное прямое противомикробное действие [4], этот ФС можно использовать при интраоперационной ФДТ, в том числе у онкологических больных для профилактики послеоперационных осложнений.

Работа выполнена при финансовой поддержке правительства Москвы.

ЛИТЕРАТУРА

- Жаркова Н. Н. Лазерно-флюоресцентные исследования эффективности фотосенсибилизаторов в онкологической диагностике: Дис. ... канд. физ.-мат. наук. — М., 1992.
- Морозова Н. Б., Плутинская А. Д., Якубовская Р. И. и др. // Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. "Отечественные противоопухолевые препараты"; Рос. биотер. журн. — 2007. — № 1. — С. 22—23.
- Решетников А. В. // Материалы науч.-практ. конф. оториноларингологов ЦФО РФ "Лазерные технологии в оториноларингологии" / Под ред. В. Г. Зенгера, А. Н. Наседкина. — Тула, 2007.

Таблица 5

Влияние ФДТ с использованием холосенса на рост опухолей различного генеза при оптимальных условиях (доза ФС 0,5 мг/кг, интервал Δt 15 мин, плотность энергии 90 Дж/см²)

Опухоль	ТРО, %					УПЖ, %	КИ, %
	8 сут	11 сут	13 сут	15 сут	18 сут		
C26	90,2	86,0	89,2	86,2	81,8	109,3	25,0
S37	98,6	98,1	93,9	94,0	92,1	121,0	40,0
B16	76,8	80,9	76,5	68,7	51,4	7,3	0
LLC	98,0	90,7	90,2	86,2	88,7	115,3	66,7

4. Страховская М. Г., Кузьмин С. Г., Жуховицкий В. Г. // Материалы VI науч.-практ. конф. "Фармакологические и физические методы лечения в оториноларингологии". — 2008.
5. Calzavara-Pinton P. G., Venturini M., Sala R. // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2007. — Vol. 21, N 3. — P. 293—302.
6. Jori G. // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. — 2006. — Vol. 25, N 1—2. — P. 505—559.
7. Kuznetsova A. A., Lukyanets E. A., Solovyeva L. I. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2008. — Vol. 26, N 3. — P. 307—320.
8. Liu W., Jensen T. J., Fronczek F. R. et al. // J. Med. Chem. — 2005. — Vol. 48, N 4. — P. 1033—1041.
9. Pashkovskaya A. A., Maizlish V. E., Shaposhnikov G. P. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 2008. — Vol. 1778, N 2. — P. 541—548.
10. Wöhrle D., Iskander N., Grasczew G. et al. // Photochem. Photobiol. — 1990. — Vol. 51, N 3. — P. 351—356.
11. Yakubovskaya R. I., Morozova N. B., Plutinskaya A. D. et al. // Proceedings of the 6-th International congress of the world association of laser therapy. — Limassol (Cyprus), 2006. — P. 157—160.
12. Zharkova N. N., Kozlov D. N., Polivanov Yu. N. et al. // SPIE. — 1994. — Vol. 2328. — P. 196—201.

Поступила 08.02.10

© Л. А. МИТИНА, В. М. ХОМЯКОВ, 2012

УДК 616.33/34-006.04-073.432.1

Л. А. Митина, В. М. Хомяков, С. О. Степанов

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ПИЩЕВОДА, ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОЙ КИШКИ

ФГБУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена (дир. — акад. РАМН В. И. Чиссов) Минздравсоцразвития России

Проведено ультразвуковое исследование при опухолях пищеварительного тракта (опухоль пищевода была выявлена у 243 больных, желудка — у 606, ободочной кишки — у 226, прямой кишки — у 197, анального канала — у 26 больных). Разработана ультразвуковая семиотика опухолей пищеварительного тракта, изучены возможности ультразвукового метода в визуализации опухолей и определении их местной распространенности в зависимости от локализации опухоли. Показана высокая клиническая эффективность метода, изучены возможности использования трехмерной (3D) реконструкции при опухолях пищеварительного тракта.

Ключевые слова: ультразвуковая семиотика, рак кишки, рак желудка, интраполостное исследование

BASIC PRINCIPLES OF THE ULTRASOUND DIAGNOSIS OF ESOPHAGEAL, GASTRIC, AND COLON TUMORS

L. A. Mitina, V. M. Khomyakov, S. O. Stepanov

P. A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Ministry of Health and Social Development of Russia

Ultrasound studies were performed for tumors of the gastrointestinal tract (esophageal bullae in 243 patients, stomach in 606, colon in 226, rectum in 197, and anal canal in 26). An ultrasound semiotics of for gastrointestinal tract tumors was developed. The potentials of ultrasonography in imaging tumors and defining their local extent were studied in relation to the tumor site. The method showed its high clinical efficiency. The possibilities of using three-dimensional (3D) repair for gastrointestinal tumors were studied.

Key words: ultrasound semiotics, intestinal cancer, gastric cancer, intracavitary examination

Злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) занимают около 20% в структуре онкологической заболеваемости, оставаясь одной из основных причин смертности в онкологии [9]. В 2006 г. заболеваемость раком желудка составила 29,43 на 100 000 населения, раком пищевода — 4,96, раком ободочной и прямой кишки — 21,15 и 16,58 соответственно [7]. Несмотря на широкое применение современных методов диагностики, в частности эндоскопии, у большинства больных заболевание диагностируют уже на стадии местно-распространенного (T3—T4) процесса, при котором опухоль часто метастазирует, инфильтрирует смежные органы и характеризуется неблагоприятным прогнозом [1—3, 7].

В настоящее время наиболее очевидным способом улучшения отдаленных результатов лечения злокачественных опухолей ЖКТ является своевременная диагностика заболевания на ранней его стадии [4, 5]. Веду-

щую роль в первичной диагностике опухолей органов пищеварения играет фиброэндоскопическое исследование, позволяющее с высокой эффективностью выявлять, верифицировать злокачественные новообразования ЖКТ, проводить дифференциальную диагностику. В сочетании с гистологическим исследованием биоптата эндоскопическое исследование чаще всего позволяет установить правильный диагноз.

Большинство исследователей, занимающихся проблемами диагностики и лечения опухолей ЖКТ, традиционно относят ультразвуковой (УЗ) метод к вспомогательным, сводя его задачи к выявлению отдаленных метастазов и асцита [6, 10]. В зарубежной литературе базовыми методами уточняющей диагностики считают компьютерную или магнитно-резонансную томографию. Однако возможности УЗ-метода постоянно расширяются по мере совершенствования технического обеспечения, накопления клинического опыта, разработки ультразвуковой семиотики опухолевого поражения, что наряду с простотой и доступностью открывает новые перспективы использования его у больных с опухолями ЖКТ.

Для корреспонденции: Митина Лариса Анатольевна — д-р мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния ультразвуковой диагностики; 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3; e-mail: mnioi@mail.ru