

Противоопухолевая эффективность сонодинамической терапии с фотосенсибилизатором хлоринового ряда в эксперименте

Е.Л. Протопович, Д.А. Церковский

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»; Республика Беларусь, 223040 аг. Лесной

Контакты: Дмитрий Александрович Церковский tzerkovsky@mail.ru

Введение. Сонодинамическая терапия – одно из актуальных направлений научных исследований в экспериментальной онкологии. Метод основан на комбинированном применении фотосенсибилизирующих агентов и ультразвукового излучения с определенными параметрами. В результате такого взаимодействия происходит индуцирование сонохимических реакций и эффекта кавитации в опухолевой клетке. Следствием является ее гибель (апоптоз, аутофагия).

Цель исследования – изучение противоопухолевой эффективности сонодинамической терапии с фотосенсибилизатором (ФС) хлоринового ряда в эксперименте на лабораторных животных с перевивными опухолями.

Материалы и методы. Работа выполнена на 50 лабораторных животных (белые беспородные крысы) весом 250 ± 50 г. В качестве опухолевых моделей использовали лимфосаркому Плисса (ЛФС) и альвеолярный рак печени РС1 (РС1), перевитые подкожно. ФС хлоринового ряда (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь) вводился внутривенно в дозе 2,5 мг/кг. Локальное ультразвуковое воздействие осуществляли через 2,5–4 ч после введения ФС однократно с помощью аппарата для ультразвуковой терапии (УЗТ) Phyaction U (Гимна Уніфйу, Бельгия) с частотами 1,04 и 3 МГц, интенсивностью 2 Вт/см², продолжительностью 10 мин в непрерывном режиме. Для каждого из опухолевых штаммов исследование выполнялось на 25 лабораторных животных, распределенных на группы (по 5 особей): интактный контроль; УЗТ (1,04 МГц); УЗТ (3 МГц); ФС + УЗТ (1,04 МГц); ФС + УЗТ (3 МГц). Критериями оценки противоопухолевой эффективности были показатели динамики роста перевивных опухолей: средний объем опухолей (V_{cp} , см³), коэффициент торможения роста опухолей (ТРО, %), коэффициент абсолютного прироста опухолей (K) и частота полных регрессий через 60 сут после воздействий (%).

Результаты. Для ЛФС V_{cp} в исследуемых группах составил $32,72 \pm 7,23$; $26,81 \pm 1,06$; $14,80 \pm 5,08$; $9,37 \pm 6,05$ и $22,25 \pm 4,91$ см³ соответственно ($p < 0,05$). Коэффициент ТРО в опытных группах составил 20,27; 54,77; 71,36 и 31,99 % соответственно. Коэффициент K в исследуемых группах составил 21,64; 14,52; 6,12; 4,91 и 15,34 соответственно. Частота полных регрессий опухолей – 0, 20, 20, 40 и 0 % соответственно. Для РС1 V_{cp} в исследуемых группах составил $23,29 \pm 5,11$; $6,22 \pm 2,22$; $11,78 \pm 4,57$; $6,38 \pm 2,57$ и $13,06 \pm 3,53$ см³ соответственно ($p < 0,05$). Коэффициент ТРО в опытных группах составил 73,25; 49,42; 72,60 и 43,92 % соответственно. Коэффициент K в исследуемых группах составил 8,34; 1,11; 3,39; 2,91 и 5,05 соответственно. Частота полных регрессий опухолей – 0, 0, 0, 40 и 0 % соответственно.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о тенденции к увеличению противоопухолевой эффективности комбинированного применения ФС и сонодинамической терапии на различных по гистологической структуре и характеру роста перевивных опухолях, а также о перспективности дальнейших исследований соносенсибилизирующих свойств фотосенсибилизирующих агентов.

Ключевые слова: лабораторные животные, перевивные опухоли, сонодинамическая терапия, фотосенсибилизатор

Для цитирования: Протопович Е.Л., Церковский Д.А. Противоопухолевая эффективность сонодинамической терапии с фотосенсибилизатором хлоринового ряда в эксперименте. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(1):68–75. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-68-75.

Antitumor efficiency of sonodynamic therapy in combination with chlorine-based photosensitizer in experiments

Egor L. Protopovich, Dmitry A. Tzerkovsky

N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus; Lesnoy 223040, Republic Belarus

Contacts: Dmitry Alexandrovich Tzerkovsky tzerkovsky@mail.ru

Introduction. Sonodynamic therapy is a topical research area in experimental oncology. The method is based on the combined use of photosensitizing agents with ultrasonic radiation with certain parameters. The result of this interaction is the induction of sonochemical reactions and the effect of cavitation in the tumor cell. The consequence is its death (apoptosis, autophagy).

The study objective is to investigate the antitumor efficacy of sonodynamic therapy with a chlorine-based photosensitizer (PS) in an experiments on laboratory animals with transplantable tumors.

Materials and methods. The experimental study was performed on 50 white outbred rats weighing 250 ± 50 grams. Subcutaneously transplanted Pliss lymphosarcoma (PLS) and alveolar liver cancer RS1 (RS1) were used as tumor models. Chlorine-based PS (Belmedpreparaty, Republic Belarus) was injected intravenously at a dose of 2.5 mg/kg. The ultrasound sessions (US) were carried out 2.5–4 hours (depending on the tumor strain) after the administration of the PS using the device Phyaaction U (Gymna Yniphy, Belgium) with frequencies of 1.04 and 3 MHz, intensity of 2 W/cm² and duration of 10 minutes in continuous mode. For each of the tumor model the study was performed on 25 laboratory animals subdivided into groups of 5 individuals: intact control, US 1.04 MHz; US 3 MHz; PS + US 1.04 MHz and PS + US 3 MHz. The criteria for assessing the antitumor efficacy were indicators of the dynamics of the growth of transplanted tumors: average volume of tumors (V_{av} , cm³), the coefficient of tumor growth inhibition (TGI, %), coefficient of absolute growth of tumors (K) and the frequency of complete regressions 60 days after treatment (%).

Results. For PLS V_{av} in groups were 32.72 ± 7.23 ; 26.81 ± 1.06 ; 14.80 ± 5.08 ; 9.37 ± 6.05 and 22.25 ± 4.91 cm³, respectively ($p < 0.05$). The coefficients TGI in the experimental groups were 20.27; 54.77; 71.36 and 31.99 %, respectively. Indicators K in groups were 21.64; 14.52; 6.12; 4.91 and 15.34, respectively. The frequency of complete tumor regressions 60 days after the start of the experiment was 0, 20, 20, 40 and 0 %, respectively. For RS1 V_{av} in groups were 23.29 ± 5.11 ; 6.22 ± 2.22 ; 11.78 ± 4.57 ; 6.38 ± 2.57 and 13.06 ± 3.53 cm³, respectively ($p < 0.05$). The coefficient of TGI in the experimental groups were 73.25; 49.42; 72.60 и 43.92 %, respectively. Indicators K in groups were: 8.34; 1.11; 3.39; 2.91 и 5.05, respectively. The frequency of complete tumor regressions 60 days after the start of the experiment was 0, 0, 0, 40 and 0 %, respectively.

Conclusions. The data obtained indicate a trend towards an increase in the antitumor effectiveness of the combined use of PS and sonodynamic therapy on various histological structures and growth patterns of transplanted tumors, as well as the prospects for further studies of the sonosensitizing properties of photosensitizing agents.

Key words: laboratory animals, transplanted tumors, sonodynamic therapy, photosensitizer

For citation: Protopovich E.L., Tzerkovsky D.A. Antitumor efficiency of sonodynamic therapy in combination with chlorine-based photosensitizer in experiments. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(1):68–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-68-75.

Введение

Сонодинамическая терапия (СДТ) является актуальным направлением научных исследований в экспериментальной и клинической онкологии. По мнению ряда авторов, ультразвуковое (УЗ) излучение с частотой от 0,5 до 3 МГц и интенсивностью от 0,5 до 5 Вт/см² способно повышать цитотоксичность различных лекарственных средств, что связано с увеличением проницаемости клеточных мембран и реализацией эффектов кавитации, локальной УЗ-гипертермии и соно-индуцированного свободно-радикального окисления биологических структур опухолевой клетки [1]. В первую очередь к таким препаратам относят радиосенсибилизаторы (метронидазол, димексид и др.) и ряд химиопрепаратов (цисплатин, блеомицин, этопозид, адриамицин, 5-фторурацил и др.) [2].

В последние годы определенный интерес представляют исследования, направленные на изучение соносенсибилизирующих свойств фотосенсиби-

лизаторов (ФС), в основном применяемых для фотодинамической терапии в экспериментальных и клинических условиях. Первым ФС, соносенсибилизирующая активность которого была доказана в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, был гематопорфирин [3].

Предшествующие исследования в данном направлении, выполненные на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (Республика Беларусь), были направлены на изучение непосредственных результатов (оценка площадей некрозов и деструктивных изменений в опухолевой ткани) применения СДТ с данным ФС хлоринового ряда [4, 5]. Основной научной идеей данного исследования является изучение и доказательство новых свойств ФС хлоринового ряда в эксперименте *in vivo* на лабораторных животных с различными по характеру роста и гистологической структуре первичными опухолями на основании анализа отдаленных результатов

предложенных режимов воздействия. Предполагается, что цитотоксичность данного ФС будет значительно усиливаться под влиянием УЗ-излучения с определенными параметрами.

Цель исследования — изучение противоопухолевой эффективности СДТ с ФС хлоринового ряда в эксперименте на лабораторных животных с различными перевивными опухолями.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Пилотное исследование выполнено на 50 белых беспородных крысах обоих полов, полученных из вивария ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», с массой тела от 250 ± 50 г, в возрасте 2,5–3 мес. Длительность карантина перед включением в эксперимент составляла 14 сут. Лабораторные животные содержались в специальных клетках в стандартных условиях пищевого и питьевого рациона в соответствии с действующими нормами содержания экспериментальных животных. Условиями содержания были: 12-часовой режим освещения, температура 20–22 °С, влажность 50–60 %, индивидуальные клетки — по 5 особей в каждой. Показатели влажности, температуры, освещенности в помещении соответствовали действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию вивариев (Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные Постановлением главного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 № 131).

Опухолевый штамм. Штамм лимфосаркомы Плисса (ЛФС) был получен Г.Б. Плиссом в 1960 г. от крысы-самки, которая с рождения получала диету, содержащую 3,3-дихлорбензидин. Опухоль состоит из мелких и крупных лимфоидных клеток (лимфобластов) с высокой митотической активностью. Перевиваемость штамма составляет 75–100 %. Опухоль растет быстро. Продолжительность жизни лабораторных животных с перевивными опухолями варьирует от 12 до 95 сут [6].

Опухолевый штамм альвеолярного рака печени РС1 (РС1) был получен Л.Л. Малюгиной в 1956 г. при перевивке опухоли печени, индуцированной у крысы 2-ацетиламинофлюореном. Первичная опухоль имела строение гепатомы и холангиомы. При перевивках элементы гепатомы исчезли. В настоящее время опухоль имеет строение альвеолярного слизистого рака. Перевиваемость штамма составляет 90–100 %. Опухолевые клетки с явлениями ослизнения сгруппированы в виде ячеек, разделенных прослойками соединительной ткани. Опухоль растет медленно. Продолжительность жизни крыс после перевивки — до 75 сут [7].

Опухолевая модель. Опухолевую модель у лабораторных животных создавали путем подкожного пассивирования *in vivo*. Подкожная перевивка включала введение под кожу левой паховой области 0,5 мл 10 % взвеси опухолевых клеток в 0,6 % растворе Хенкса. Лабораторных животных с ЛФС включали в эксперимент на 7-е сутки после перевивки, с РС1 — на 21-е сутки после перевивки.

Этические аспекты. Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с международным законодательством и действующими в Республике Беларусь нормативными правовыми актами по проведению экспериментальных исследований с лабораторными животными, а именно:

- Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986) с изменениями в соответствии с положениями протокола (СЕД № 170 от 02.12.2005).
- Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (от 22.09.2010).
- Технический кодекс установившейся практики 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика» (GLP), утвержденный постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008.

Экспериментальные исследования соответствовали ряду принципов 3Rs, разработанных W.M. Russell и R.L. Berch (The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare, 1959 г.), а именно:

- reduction — сокращение количества используемых лабораторных животных в эксперименте;
- refinement — усовершенствование методики проведения эксперимента за счет применения обезболивающих и нетравматических методов.

Лабораторных животных вводили в наркоз (нейролептаналгезия: 0,005 % раствор фентанила + 0,25 % раствор дроперидола в соотношении 2:1, по 0,2 мл на 100 г массы тела внутримышечно). После окончания периода наблюдения за лабораторными животными их умерщвление выполнялось с помощью общепринятых методов эвтаназии (*aether pro narcosi*) с соблюдением гуманных методов обращения с лабораторными животными.

Фотосенсибилизатор. В качестве фотосенсибилизирующего агента использовали ФС хлоринового ряда «Фотолон» (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), представляющий собой тринатриевую соль хлорина еб с повидоном К17. ФС представлял собой порошок лиофилизированный для приготовления раствора для внутривенного введения в виде пористой массы зеленовато-черного цвета, 100 мг (регистрационный номер 16/11/886 от 08.11.2016).

Введение ФС осуществлялось следующим образом: после введения животных в наркоз (нейролептаналгезия) они фиксировались мягкими резиновыми фиксаторами к операционному столу и с помощью специального катетера проводилась катетеризация хвостовой вены с последующим осуществлением в условиях затемненного помещения внутривенной инфузии ФС в дозе 2,5 мг/кг (согласно инструкции по медицинскому применению).

Сеанс ультразвуковой терапии (УЗТ). Локальное УЗ-воздействие осуществляли однократно с помощью аппарата для УЗТ Phyaaction U (Gymna Yniphy, Бельгия) с рабочей частотой импульсов 1,04 и 3 МГц, интенсивностью импульсов 2 Вт/см² и продолжительностью 10 мин в непрерывном режиме после обработки поверхности экспериментальной опухоли специальным гелем. УЗ-воздействие начинали через 2,5–3 ч после введения ФС у лабораторных животных с опухолевым штаммом ЛФС и через 3,5–4 ч после введения ФС у лабораторных животных с опухолевым штаммом РС1.

Дизайн исследования. Все воздействия проводились на 7-е сутки после перевивки ЛФС и на 21-е сутки — для РС1, по достижении диаметра опухолевого узла не менее 4–5 мм. Для каждого из опухолевых штаммов исследование выполнялось на 25 лабораторных животных, случайным образом распределенных на группы по 5 особей:

- интактный контроль;
- УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см², 10 мин;
- УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см², 10 мин;
- ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см², 10 мин;
- ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см², 10 мин.

Критерии оценки противоопухолевой эффективности терапии. Оценку противоопухолевой эффективности воздействий осуществляли по показателям: динамика изменения объема опухоли (V), коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) и коэффициент торможения роста опухоли (ТРО).

Объем опухолей вычисляли по формуле:

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3,$$

где $d_{1,2,3}$ — 3 взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (см); $\pi/6 = 0,52$ — постоянная величина; V — объем опухоли (см³).

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{(V_t - V_0)}{V_0},$$

где: V_0 — исходный объем опухоли (до введения химиопрепарата); V_t — объем опухоли на определенный срок наблюдения.

Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{(V_k - V_0)}{V_k} \times 100,$$

где: V_k — средний объем опухоли в контрольной группе (см³); V_0 — средний объем опухоли в основной группе (см³).

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на перевивных опухолях у лабораторных животных были следующими (табл. 1) [8].

Таблица 1. Критерии оценки противоопухолевой эффективности терапии

Table 1. Criteria for evaluating antitumor efficacy of therapy

Критерий Criteria	Эффективность Efficacy
ТРО <20 % TGI <20 %	0
ТРО <20–50 % TGI <20–50 %	±
ТРО <51–80 % TGI <51–80 %	+
ТРО <81–90 % TGI <81–90 %	++
ТРО <91–100 % + <50 % полных регрессий TGI <91–100 % + <50 % complete response	+++
ТРО <91–100 % + >50 % полных регрессий TGI <91–100 % + >50 % complete response	++++

Примечание. ТРО — торможение роста опухоли.
Note. TGI — tumor growth inhibition.

Динамику роста перевивных опухолей регистрировали начиная с 7-х суток после перевивки опухолевого штамма ЛФС и с 21-х суток — для РС1 в течение 2 нед с интервалом 2–3 сут.

Частота полных регрессий оценивалась через 60 сут после перевивки и проведенных воздействий при отсутствии визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста (в процентах от общего количества лабораторных животных в группах) [8].

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка экспериментальных данных и графическое представление результатов проводились с помощью пакетов прикладных программ MS Excel 2010, Origin Pro (версия 7.0) и Statistica (версия 8.0). Для оценки достоверности различий использовали U -критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Перевиваемость опухолей ЛФС и РС1 у лабораторных животных составила 100 %.

В 1-й части экспериментального исследования на 25 лабораторных животных с перевивной опухолью ЛФС изучена противоопухолевая эффективность

Таблица 2. Показатели противоопухолевой эффективности ультразвуковой и сонодинамической терапии у лабораторных животных с перевивными опухолями (лимфосаркома Плисса)

Table 2. Indicators of the antitumor efficacy of ultrasound and sonodynamic therapy in laboratory animals with transplantable tumors (Pliss lymphosarcoma)

Группа Group	$V_{cp}, \text{см}^3$ $V_{av}, \text{см}^3$		K	TPO, % TGI, %	Частота полных регрессий опухолей, % Frequency of complete response, %
	На 1-е сутки On day 1	На 14-е сутки On day 14			
Интактный контроль Intact control	1,45 ± 0,23	32,72 ± 7,23	21,64	—	0
УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см ² , 10 мин US: 1.04 MHz, 2.0 W/cm ² , 10 min	1,73 ± 0,29	26,81 ± 1,06	14,52	20,27	20
УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см ² , 10 мин US: 3.0 MHz, 2.0 W/cm ² , 10 min	2,08 ± 0,31	14,80 ± 5,08*	6,12	54,77	20
ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см ² , 10 мин PS 2.5 mg/kg + US: 1.04 MHz, 2.0 W/cm ² , 10 min	1,59 ± 0,36	9,37 ± 6,05*	4,91	71,36	40
ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см ² , 10 мин PS 2.5 mg/kg + US: 3.0 MHz, 2.0 W/cm ² , 10 min	1,36 ± 0,29	22,25 ± 4,91	15,34	31,99	0

*Различия с интактным контролем статистически значимы, $p < 0,05$.

* Differences with intact control are statistically significant, $p < 0.05$.

Примечание. Здесь и в табл. 3: V_{cp} — средний объем опухолей; K — коэффициент абсолютного прироста опухоли; TPO — торможение роста опухоли; УЗТ — ультразвуковая терапия; ФС — фотосенсибилизатор.

Note. Here and in table 3: V_{av} — the average volume of tumors; K — coefficient of absolute tumor growth; TGI — tumor growth inhibition; US — ultrasound therapy; PS — photosensitizer.

СДТ с ФС согласно дизайну исследования. Результаты исследования представлены в табл. 2 и на рис. 1.

Применение УЗТ с частотой 3 МГц и интенсивностью 2 Вт/см² приводило к статистически значимому торможению роста перевивных опухолей ЛФС по сравнению с УЗТ с частотой 1,04 МГц и интенсивностью 2 Вт/см² (средний объем опухоли (V_{cp}): 14,80 ± 5,08 см³ против 26,81 ± 1,06 см³, $p = 0,041$). Однако предварительное введение ФС «Фотолон» с последующим сеансом УЗТ с частотами 1,04 и 3 МГц приводило к уменьшению V_{cp} : 22,25 ± 4,91 см³ (для 3 МГц) и 9,37 ± 6,05 см³ (для 1,04 МГц) ($p = 0,12$).

Стоит отметить, что при использовании УЗТ с частотой 1,04 МГц в группах с внутривенным введением ФС и без такового отмечено статистически значимое торможение роста перевивных опухолей (см. табл. 2, $p = 0,016$). А при использовании УЗТ с частотой 3 МГц в группах с внутривенным введением ФС и без такового отмечена обратная тенденция (см. табл. 2, $p = 0,31$).

Оптимальной схемой лечения является внутривенное введение ФС в дозе 2,5 мг/кг с последующим через 2,5–3 ч однократным воздействием УЗ-излучением с частотой 1,04 МГц и интенсивностью 2 Вт/см². Через 2 нед после реализации воздействий V_{cp} составил 9,37 ± 6,05 см³; коэффициент K — 4,91, TPO — 71,36 %, частота полных регрессий — 40 % (+).

Во 2-й части экспериментального исследования на 25 лабораторных животных с перевивной опухолью РС1 определены и изучены оцениваемые критерии

противоопухолевой эффективности предложенных воздействий согласно дизайну исследования (табл. 3, рис. 2).

Применение УЗТ с частотой 1,04 МГц и интенсивностью 2 Вт/см² приводило к торможению роста перевивных опухолей РС1 по сравнению с УЗТ с частотой 3 МГц и интенсивностью 2 Вт/см² (V_{cp} : 6,22 ± 2,22 см³ против 11,78 ± 4,57 см³, $p = 0,29$). Однако предварительное введение ФС «Фотолон» с последующим сеансом УЗТ с частотами 1,04 и 3 МГц приводило к уменьшению V_{cp} : 13,06 ± 3,53 см³ (для 3 МГц) и 6,38 ± 2,57 см³ (для 1,04 МГц) ($p = 0,15$).

Следует отметить, что при использовании УЗТ с частотой 1,04 МГц в группах с внутривенным введением ФС и без такового отмечены идентичные данные о торможении роста перевивных опухолей (см. табл. 3, $p = 0,96$). При использовании УЗТ с частотой 3 МГц в группах с внутривенным введением ФС и без такового отмечена такая же тенденция (см. табл. 3, $p = 0,83$).

Оптимальной схемой лечения лабораторных животных с опухолевым штаммом РС1 с наиболее эффективными показателями среднего объема опухолей ($V_{cp} = 6,38 ± 2,57$ см³), коэффициентов K (2,91) и TPO (72,60 %), а также частоты полных регрессий (40 %) является внутривенное введение ФС в дозе 2,5 мг/кг с последующим через 3,5–4 ч локальным УЗ-воздействием на опухоль с частотой 1,04 МГц, интенсивностью 2 Вт/см² и длительностью 10 мин (+). Дополнительно стоит отметить тот факт, что в группе

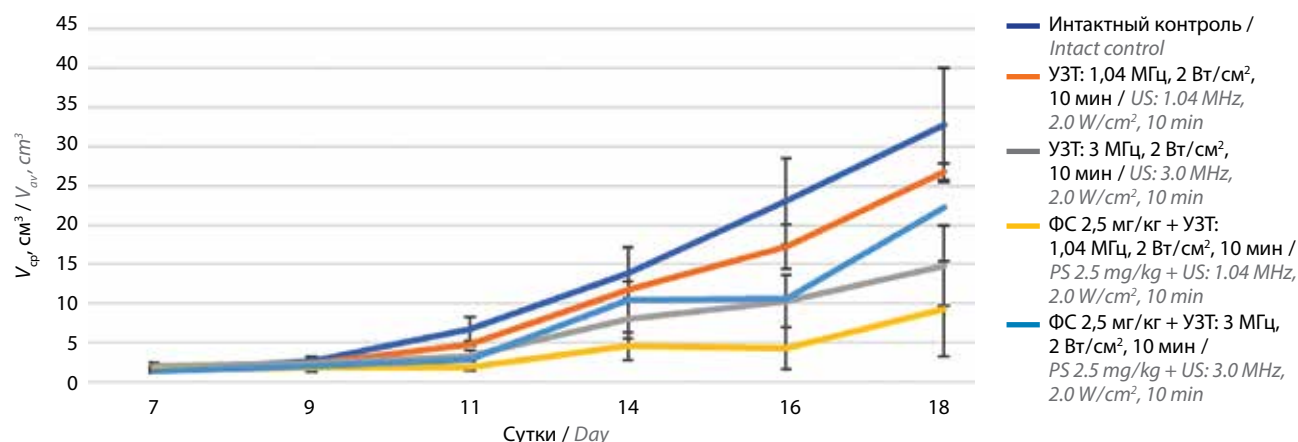


Рис. 1. Динамика среднего объема ($V_{\text{ср}}$) перививных опухолей (лимфосаркомы Плисса) в исследуемых группах после начала эксперимента. Здесь и на рис. 2: УЗТ – ультразвуковая терапия; ФС – фотосенсибилизатор

Fig. 1. Dynamics of the average volume (V_{av}) of grafted tumors (Plyss lymphosarcoma) in studied groups after the start of experiment. Here and on fig. 2: US – ultrasound therapy; PS – photosensitizer

Таблица 3. Показатели противоопухолевой эффективности ультразвуковой и сонодинамической терапии у лабораторных животных с перививными опухолями (альвеолярный рак печени PC1)

Table 3. Indicators of the antitumor efficacy of ultrasound and sonodynamic therapy in laboratory animals with transplantable tumors (alveolar liver cancer RSI)

Группа Group	$V_{\text{ср}}, \text{см}^3$ $V_{\text{av}}, \text{cm}^3$		К	ТРО, % TGI, %	Частота полных регрессий опухолей, % Frequency of complete response, %
	На 1-е сутки On day 1	На 14-е сутки On day 14			
Интактный контроль Intact control	2,49 ± 0,69	23,29 ± 5,11	8,34	—	0
УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см², 10 мин US: 1.04 MHz, 2.0 W/cm², 10 min	2,96 ± 0,47	6,22 ± 2,22*	1,11	73,25	0
УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см², 10 мин US: 3.0 MHz, 2.0 W/cm², 10 min	2,67 ± 0,79	11,78 ± 4,57*	3,39	49,42	0
ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 1,04 МГц, 2 Вт/см², 10 мин PS 2.5 mg/kg + US: 1.04 MHz, 2.0 W/cm², 10 min	2,63 ± 0,59	6,38 ± 2,57*	2,91	72,60	40
ФС 2,5 мг/кг + УЗТ: 3 МГц, 2 Вт/см², 10 мин PS 2.5 mg/kg + US: 3.0 MHz, 2.0 W/cm², 10 min	2,15 ± 0,89	13,06 ± 3,53*	5,05	43,92	0

*Различия с интактным контролем статистически значимы, $p < 0,05$.

* Differences with intact control are statistically significant, $p < 0.05$.

лабораторных животных, пролеченных с идентичными параметрами УЗ-воздействия без введения ФС, зарегистрированы аналогичные показатели: $6,22 \pm 2,22 \text{ см}^3$, 1,11 и 73,25 % соответственно. Вместе с тем частота полных регрессий пролеченных опухолей составила 0 %. Определение наиболее оптимальной схемы лечения в данном случае будет проводиться в перспективе в дальнейших дополнительных экспериментах.

Первым ФС, соносенсибилизирующая активность которого была доказана в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, был гематопорфирин [3].

На данный момент авторами из ряда исследовательских центров в странах Европы и Юго-Восточной Азии представлены результаты экспериментальных исследований по изучению соносенсибилизирующего эффекта различных классов фотосенсибилизирующих агентов [9–12]. Более подробная информация о результатах данных исследований представлена в нашей будущей публикации [1].

При интерпретации ключевых механизмов, лежащих в основе повреждения опухолевой клетки при комбинированном применении ФС и УЗТ, ученые приходят к выводу, что ведущим звеном в реализации

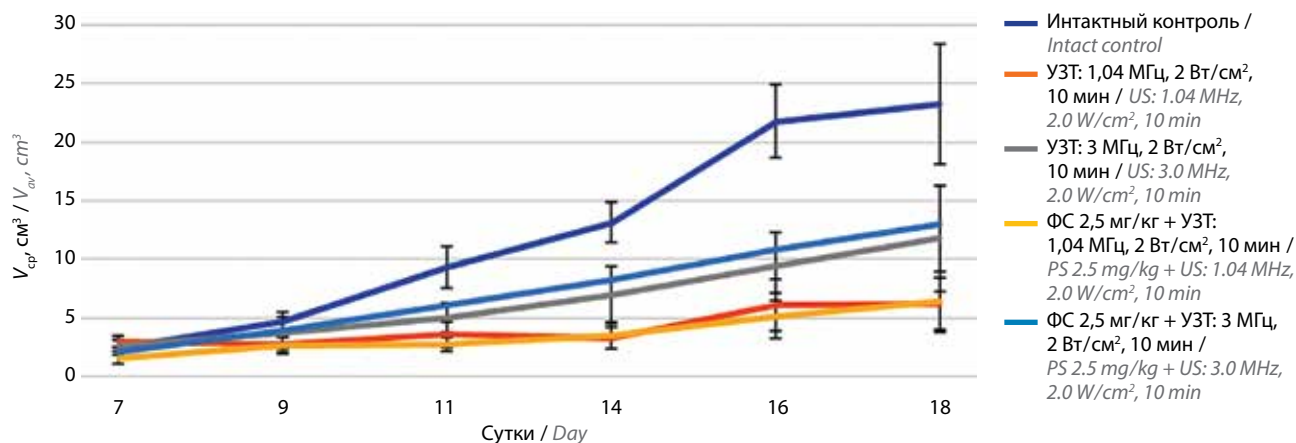


Рис. 2. Динамика среднего объема (V_{cp}) перевивных опухолей (альвеолярного рака печени PC1) в исследуемых группах после начала эксперимента
Fig. 2. Dynamics of the average volume (V_{av}) of grafted tumors (alveolar liver cancer RS1) in studied groups after the start of experiment

противоопухолевого эффекта УЗ-излучения, переводящего молекулу ФС из основного состояния в возбужденное, являются активные формы кислорода (супероксид-анион (O_2^-), гидроксил-радикал ($\cdot OH$), гидроген-пероксид (H_2O_2)), образование которых потенцирует развитие каскада физико-химических процессов, приводящих к летальным повреждениям таких клеточных компонентов, как цитоплазматические мембраны и гранулярная эндоплазматическая сеть [13, 14]. Обладая высоким окислительным потенциалом, активные формы кислорода взаимодействуют с липидами мембран органелл опухолевой клетки с образованием продуктов окисления, дестабилизацией и последующим разрушением клетки в целом. Следствием реализации окислительного стресс-синдрома являются апоптоз и аутофагия [15].

Заключение

Полученные на основании анализа непосредственных и отдаленных результатов экспериментального исследования пилотные данные свидетельствуют о наличии тенденции к более выраженному торможению роста перевивных опухолей с различной гистологической структурой при использовании схемы комбинированного лечения, включающей применение ФС с последующим проведением сеансов УЗТ, по сравнению с УЗТ в монорежиме. Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод, что реализация данного экспериментального исследования в дальнейшем является перспективной и актуальной для экспериментальной онкологии. С целью оптимизации режимов УЗТ с ФС хлоринового ряда экспериментальные исследования на лабораторных животных с перевивными опухолями в дальнейшем будут продолжены.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tzerkovsky D.A., Protopovich E.L., Stupak D.S. Sonodynamic and sonophotodynamic therapy in oncology. *Biomedical Photonics* 2019;8(2):31–46. DOI: 10.24931/2413-9432-2019-8-2-31-46.
2. Rosenthal I., Sostaric J.Z., Riesz P. Sonodynamic therapy – a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason Sonochem* 2004;11(6):349–63. DOI: 10.1016/j.ultrasonch.2004.03.004.
3. Yumita T., Nishigaki T., Umemura K., Umemura S.I. Synergetic effect of ultrasound and hematoporphyrin on sarcoma 180. *Jpn J Cancer Res* 1990;81(3):304–8. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1990.tb02565.x.
4. Tzerkovsky D.A., Alexandrova E.N., Chalau V.N., Istomin Yu.P. Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies with photolon on a glioma C6 tumor model. *Exp Oncol* 2012;34(4):332–5.
5. Церковский Д.А., Александрова Е.Н., Чалов В.Н., Истомин Ю.П. Соно-фотодинамическая терапия с фотолоном саркомы М-1 крыс. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):29–31. [Tzerkovsky D.A., Alexandrova E.N., Chalau V.N., Istomin Yu.P. Sono-photodynamic therapy for sarcoma M1 in rats. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2012;11(4):29–31. (In Russ.)].
6. Лимфосаркома Плисса (электронный ресурс). Режим доступа: http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/LSP/. Дата доступа: 22.10.2020. [Pliss Limfosarkoma (electronic resource). Access mode:

- http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/LSP/. Access date: 22.10.2020. (In Russ.).
- Холангиома (альвеолярный рак печени PC1) (электронный ресурс). Режим доступа: http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/rs1/. Дата доступа: 22.10.2020. [Holangioma (al'veolyarniy rak pecheni RS1) (electronic resource). Access mode: http://www.bionco.ru/methods/exp_chemotherapy/strains/char_strains/rs1/. Access date: 22.10.2020. (In Russ.)].
 - Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 637–651 [Treshalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodological guidelines for the study of antitumor activity of pharmacological substances. In: Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow: Meditsina, 2005. С. 637–651. (In Russ.)].
 - Jia Y., Wang X., Liu Q. et al. Sonodynamic action of hypocrellin B triggers cell apoptosis of breast cancer cells involving caspase pathway. *Ultrasonics* 2017;73:154–61. DOI: 10.1016/j.ultras.2016.09.013.
 - Shen J., Cao S., Sun X. et al. Sinoporphyrin sodium-mediated sonodynamic therapy inhibits RIP3 expression and induces apoptosis in the H446 small cell lung cancer cell line. *Cell Physiol Biochem* 2018;51(6): 2938–54. DOI: 10.1159/000496045.
 - Lia E., Sunc Y., Lu G. et al. Sinoporphyrin sodium based sonodynamic therapy induces anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma and activates p53/caspase 3 axis. *Int J Biochem Cell Biol* 2019;113:104–14. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.01.009.
 - Prada F., Sheybani N., Franzini A. et al. Fluorescein-mediated sonodynamic therapy in a rat glioma model. *J Neurooncol* 2020;148(3):445–54. DOI: 10.1007/s11060-020-03536-2.
 - Costley D., McEwan C., Fowley C. et al. Treating cancer with sonodynamic therapy: a review. *Int J Hyperthermia* 2015;32(2):107–17. DOI: 10.3109/02656736.2014.992484.
 - Escoffre J.M., Bouakaz A.B. *Therapeutic ultrasound*. Switzerland: Springer, 2016. 459 p.
 - McHale A.P., Callan J.F., Nomikou N. et al. Sonodynamic therapy: concept, mechanism and application to cancer treatment. *Adv Exp Med Biol* 2016;880:429–50. DOI: 10.1007/978-3-319-22536-4_22.

Вклад авторов

Е.Л. Протопович: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Д.А. Церковский: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи.

Author's contribution

E.L. Protopovich: development of research design, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;

D.A. Tzerkovsky: development of research design; review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Л. Протопович / E.L. Protopovich: <https://orcid.org/0000-0002-7513-1545>

Д.А. Церковский / D.A. Tzerkovsky: <https://orcid.org/0000-0001-7444-7997>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Национальной академии наук Беларуси (грант № M19M-137, 2019–2021 гг.).

Financing. The work was performed with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research of the National Academy of Sciences of Belarus (grant No. M19M-137, 2019–2021).

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 26.10.2021. Принята к публикации: 14.02.2022.

Article submitted: 26.10.2021. Accepted for publication: 14.02.2022.