

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ФОМИНА СВЕТЛАНА ВИКТОРОВНА

**УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕЧЕНИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭХОКОНТРАСТНЫХ ПРЕПАРАТОВ
НА ОСНОВЕ ГЕКСАФТОРИДА СЕРЫ**

14.01.13 – лучевая диагностика, лучевая терапия

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,

профессор Завадовская В.Д.

доктор медицинских наук Чуринов А.А.

Томск 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Контрастные препараты в ультразвуковой диагностике	12
1.2 Показания для использования эхоконтрастных препаратов	17
1.3 Характеристика современных эхоконтрастных препаратов.....	25
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1 Клинические исследования	33
2.2 Лабораторные методы исследования	37
2.3 Экспериментальные исследования специфической активности.....	37
2.4 Исследование фармакокинетики	44
2.5 Изучение безопасности лекарственного средства	48
2.5.1 Изучение острой токсичности лекарственного средства	48
2.5.2 Изучение хронической токсичности лекарственного средства.....	49
2.6 Методы математической обработки полученных результатов	51
Глава 3 Результаты собственных исследований	52
3.1 Результаты клинических исследований.....	52
3.1.1 Результаты нативного УЗИ пациентов онкологического профиля...	52
3.1.2 Результаты УЗИ пациентов онкологического профиля в условиях контрастного усиления	53
3.2 Результаты экспериментальных исследований.....	63
3.2.1 Исследование в эксперименте с 1-й группой животных (белые беспородные крысы без очагового поражения печени)	63
3.2.2 Исследование в эксперименте со 2-й группой животных (белые беспородные крысы с очаговым поражением печени)	64
3.2.3 Исследование в эксперименте с 3-й группой животных (свиньи с очаговым поражением печени)	66
3.2.4 Исследование в эксперименте с 4-й группой животных (кролики без очагового поражения печени)	67

3.2.5 Исследование в эксперименте с 5-й группой животных (кролики с очаговым поражением печени).....	69
3.3 Результаты гистологических исследований	72
3.4 Результаты исследований фармакокинетики	73
3.4.1 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после однократного внутривенного введения в эффективной дозе.....	73
3.4.2 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в эффективной дозе.....	74
3.4.3 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после многократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг	76
3.5 Результаты исследований безопасности лекарственного средства	78
3.5.1 Результаты исследования острой токсичности	78
3.5.2 Результаты исследования хронической токсичности.....	78
Глава 4 Обсуждение результатов исследования	85
Выводы	97
Практические рекомендации.....	98
Список сокращений.....	99
Список литературы	100

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Современная лучевая диагностика неразрывно связана с использованием контрастных препаратов – йодсодержащих в рутинной рентгенодиагностике и компьютерной томографии (КТ) и препаратов, изменяющих магнитные свойства тканей, – парамагнетиков – в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Проникая адекватно кровотоку в исследуемые органы и ткани, эти препараты улучшают визуализацию, что достигается путем повышения плотности тканей при использовании рентгеноконтрастных препаратов или усилением сигнала тканей при использовании парамагнетиков.

Ультразвуковая диагностика не является исключением, и сегодня в мировой клинической практике использование искусственного контрастирования при ультразвуковом исследовании (УЗИ) стало обязательным условием исследований больных практически любого клинического профиля при постоянном совершенствовании и разработке новых эхоконтрастных препаратов (ЭКП) [50, 51, 64, 80, 82, 116, 131].

Принцип повышения качества изображения при использовании эхоконтрастного препарата состоит во введении в кровь пациента газосодержащей суспензии, которая усиливает отражение ультразвуковых волн, в результате чего повышается чувствительность метода в регистрации магистрального и органного кровотока [112, 131, 132].

Использование эхоконтрастных препаратов необходимо для решения широкого спектра диагностических задач в различных направлениях современной клинической медицины, и в первую очередь для ранней и точной диагностики, а также дифференциальной диагностики очаговых образований печени [36, 50, 51, 104, 105, 106, 115, 134].

Ультразвуковое исследование является первой модальностью в лучевом диагностическом алгоритме при исследовании печени с целью

обнаружения очаговых образований органа. Характер контрастирования патологического субстрата представляет собой существенный дифференциально-диагностический критерий в установлении конкретной нозологической формы поражения печени, что реализуется с йодсодержащими препаратами при КТ и гадолиниевыми комплексами при МРТ [30, 32, 34, 43, 50].

В полной мере это относится и к ультразвуковому контрастному исследованию, которое в сравнении с нативным исследованием увеличивает диагностическую точность метода до 92–95% и становится сопоставимым с томографическими методами исследования – КТ и МРТ [26, 27, 29, 43, 50].

Распространенным препаратом для контрастного усиления в ультразвуковой диагностике является SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария), который представляет собой микропузырьки гексафторида серы диаметром менее 8 мкм (средний размер пузырьков 2,5 мкм), стабилизированные мембраной из поверхностно-активных фосфолипидов [90, 107, 113, 133].

Ультразвуковое исследование с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) имеет широкие показания в современной клинической медицине, однако в первую очередь это диагностика очаговых образований в печени – выявление гепатоцеллюлярного рака (ГПЦР) и метастатического поражения.

Библиографические данные свидетельствуют об активном изучении возможностей контрастного усиления с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) в гепатологии, в частности в определении характера кровотока ГПЦР, даже в маленьких узелках – до 2 см в диаметре [32, 35, 46, 47, 50, 51, 56]. Существуют данные о том, что определение характера васкуляризации опухолей при УЗИ с контрастным усилением SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) сопоставимо с особенностями контрастного усиления при других модальностях лучевой диагностики – КТ и МРТ [26, 27, 43, 56].

Однако в отечественной клинической практике эхоконтрастные препараты, в том числе SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария), были

зарегистрированы только в 2014 году и не имели до этого широкого применения, что приводило к отсутствию важного звена в диагностическом алгоритме исследования больных.

Многочисленные данные об эффективности контрастного усиления (КУ) в выявлении и дифференциальной диагностике патологических образований в печени обуславливают целесообразность дальнейших исследований по разработке и совершенствованию ультразвуковых контрастных препаратов.

Степень разработанности

В настоящее время имеется большое количество преимущественно зарубежных публикаций, посвященных использованию контрастного усиления в ультразвуковой диагностике с указанием на высокую информативность в выявлении воспалительных и неопластических процессов. При этом основным объектом исследования является печень [32, 44, 50, 51, 80].

Однако, несмотря на большую проработанность этого вопроса по мере накопления клинического материала определились очевидные не решенные окончательно проблемы. В частности остаются дискуссионными вопросы о характере васкуляризации и отличии контрастного усиления гиперваскулярных и гиповаскулярных метастазов. Остаются сложности дифференциальной диагностики очаговых образований на фоне диффузных изменений печени, проблема одномоментной визуализации очаговых образований в различные фазы контрастного усиления [75, 78, 109, 131, 133].

Несмотря на наличие хорошо зарекомендовавших себя диагностических ЭКП (по типу SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария)), за рубежом продолжают исследования по разработке новых эхоконтрастных препаратов, обладающих органоспецифичностью, а также ЭКП с удлинением времени контрастного усиления, что требует поиска для газосодержащих микросфер оптимальной стабилизирующей системы [113, 116, 118, 131, 132, 133].

В России эхоконтрастный препарат SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) зарегистрирован только в 2014 году, а разработки по синтезу отечественных эхоконтрастных препаратов отсутствуют. В то же время наличие доступных и высокоэффективных ЭКП будет способствовать выявляемости широкого спектра заболеваний, снижению инвалидизации и решению тем самым ряда актуальных медико-социальных проблем. Все вышесказанное и определяет необходимость выполнения настоящего исследования.

Цель работы

Повышение диагностической информативности ультразвукового исследования печени путем использования контрастного усиления, включая первый отечественный аналог эхоконтрастного препарата на основе гексафторида серы.

Задачи исследования

1. Оценить диагностическую эффективность эхоконтрастного препарата гексафторида серы, зарегистрированного в РФ, для дифференциальной диагностики очаговых поражений печени у больных онкологического профиля.
2. Оценить характер васкуляризации метастатических очагов печени у пациентов онкологического профиля.
3. Используя биологическую модель очагового поражения печени, обосновать применение отечественного эхоконтрастного препарата для выявления очаговых образований печени.
4. Провести доклиническое исследование общей токсичности и фармакокинетики отечественного эхоконтрастного препарата.

Научная новизна

- Установлены особенности визуализации вторичных очаговых образований печени после контрастного усиления в зависимости от характера васкуляризации и фазы исследования.

- Впервые аргументирована эффективность ультразвукового исследования с использованием отечественного эхоконтрастного препарата на основе гексафторида серы на модели очагового поражения паренхиматозных органов.

- Показано, что новый состав поверхностно-активных веществ, использованных в качестве основы стабилизирующей системы эхоконтрастного препарата, повышает информативность ультразвукового исследования путем получения усиленного и длительного (до 4 мин) контрастного ультразвукового изображения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты выполненного исследования свидетельствуют о том, что повышение эффективности ультразвуковой диагностики вторичных очаговых образований печени достигается путем контрастного усиления. Использование эхоконтрастного препарата позволяет оценить характер васкуляризации очаговых образований печени и повысить выявляемость очагов, имеющих изоэхогенную структуру.

На основании выполненного исследования автором предложены методические подходы для одновременного выявления множественных очаговых образований в артериальную фазу исследования.

В условиях экспериментальной модели показано, что разработанный отечественный эхоконтрастный препарат на основе гексафторида серы с новой стабилизирующей системой, распределяясь в органе адекватно кровотоку, повышает контрастность печени, обеспечивает выявление патологических очаговых структур и не оказывает токсического воздействия на ткани и органы экспериментальных животных.

Полученные результаты клинико-экспериментальной работы обосновывают перспективность исследований, направленных на разработку и внедрение в клиническую практику отечественных эхоконтрастных препаратов.

Методология и методы исследования

В основе методологии диссертационной работы – современные теоретические и практические основы отечественной и зарубежной лучевой диагностики и фармакологии.

Диссертационное исследование выполнялось в несколько этапов с использованием клинических, экспериментальных, инструментальных аналитических и статистических методов.

На первом этапе изучалась отечественная и зарубежная литература, посвященная использованию контрастного усиления в ультразвуковой диагностике и применяемых для этого лекарственных средств.

На втором – клинико-инструментальном этапе работы – был выполнен анализ диагностической эффективности контрастного усиления с использованием зарегистрированного в РФ эхоконтрастного препарата в диагностике метастатического поражения печени у больных онкологического профиля.

Установленное при этом повышение диагностической эффективности эхоконтрастного усиления обосновывает третий – экспериментально-инструментальный этап работы, который включал оценку диагностической эффективности первого отечественного эхоконтрастного препарата путем ультразвукового исследования биологической модели очаговых образований печени, а также оценку безопасности при применении у лабораторных животных.

Положения, выносимые на защиту

1. Эхоконтрастный препарат на основе гексафторида серы (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария)) повышает диагностическую эффективность ультразвукового исследования печени у больных онкологического профиля.

2. Отечественный эхоконтрастный препарат на основе гексафторида серы и новой стабилизирующей системы повышает контрастность печени, распределяется в очаговых образованиях печени согласно кровотоку.

3. Использование отечественного эхоконтрастного препарата не вызывает токсического воздействия на внутренние органы экспериментальных животных.

Личное участие

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, формулировании цели и задач работы.

Автором лично разработаны дизайн исследования, методический подход к выполнению диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в постановке методики ультразвукового исследования печени с эхоконтрастным препаратом и проведение данного вида исследований 35 пациентам с онкологическими заболеваниями, в оценке результатов контрастного усиления печени у данных больных, заполнении регистрационных карт, создании базы данных, обработке полученного материала. Соискатель лично участвовал в проведении экспериментальной работы, а именно – в разработке дизайна эксперимента, в проведении оперативных вмешательств у экспериментальных животных в качестве ассистента, в разработке химического состава образца контрастного препарата, в проведении ультразвуковых исследований печени животным с использованием отечественного контрастного препарата, в оценке характера контрастного усиления печени, в анализе и обработке полученных результатов, в том числе, полученных при оценке безопасности изученного контрастного препарата.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на V съезде врачей ультразвуковой диагностики Сибирского Федерального округа (г. Кемерово, 2009); на II съезде врачей лучевой диагностики Сибири (г. Томск, 2012); городском обществе рентгенологов (г. Томск, 2013); на III съезде врачей лучевой диагностики Сибирского Федерального округа

(г. Красноярск, 2014); на IX всероссийском национальном конгрессе лучевых диагностов и терапевтов «Радиология-2015» (г. Москва, 2015).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 4 статьи в журналах, рецензируемых ВАК, 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц, иллюстрирована 31 рисунком и состоит из введения, обзора литературы (первая глава), материала и методов исследования (вторая глава), результатов собственных исследований (третья глава), обсуждения (четвертая глава), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 139 источников, из которых 24 на русском и 115 на иностранных языках.

Внедрение результатов

Результаты исследования применяются в работе отделений ультразвуковой диагностики клиник ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, в учебном процессе кафедры лучевой диагностики и лучевой терапии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Контрастные препараты в ультразвуковой диагностике

Ведущая роль в выявлении заболеваемости населения принадлежит методам лучевого исследования, среди которых ультразвуковое исследование занимает в России одну из приоритетных позиций [8, 15, 16, 17, 19, 20].

Востребованность ультразвукового метода в качестве современного способа визуальной диагностики обусловлена широкой экономической доступностью для всех слоев населения, отсутствием инвазивности и лучевой нагрузки на пациента и одновременно высокой диагностической эффективностью. Спектр патологических состояний, для диагностики которых используется сонография, чрезвычайно широк. Традиционно это прежде всего онкологические, кардиологические, гинекологические заболевания. В последние десятилетия расширилась область применения ультразвукового исследования и сонография стала неотъемлемой частью исследования органов желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата и органов грудной клетки [8, 14, 15, 23, 50, 51, 64, 80, 82, 116, 131].

В основе метода лежит получение изображения различных органов и систем, включая сосудистую сеть, на основании характера отражения ультразвукового луча от тканей с различным акустическим сопротивлением. Ткани, обладающие высоким акустическим сопротивлением, плохо проводят ультразвуковые волны и хорошо их отражают в виде гиперэхогенных структур. И напротив, ткани, имеющие низкое акустическое сопротивление, хорошо проводят ультразвуковые волны, соответственно плохо их отражают и визуализируются как анэхогенные структуры [8, 14, 15, 23].

Обязательным компонентом современного ультразвукового исследования является использование доплеровского режима. Эффект Доплера заключается в изменении частоты ультразвукового сигнала при отражении от движущегося субстрата относительно первоначальной частоты

посланного сигнала. Развитие технологии цветового доплеровского картирования (ЦДК) значительно расширило возможности ультразвукового исследования и позволило оценивать степень кровоснабжения органов в диагностике ишемии, воспалительного и опухолевых процессов. В клинической практике это нашло применение в первую очередь в кардиологии и ангиологии, а также в других клинических дисциплинах [8, 14, 15, 23].

За последние десятилетия в постоянно совершенствующейся ультразвуковой диагностике произошли, по сути, революционные изменения, перевернувшие устоявшиеся представления о диагностических возможностях ультразвука. С разработкой диагностических приборов нового поколения – сканеров экспертного класса, новых методик ультразвукового исследования, получивших название «тканевая гармоника», «вторая гармоника», «энергетический доплер», «эластография», «микрокальцинаты», методики по постпроцессорному трехмерному преобразованию изображения появилась возможность получать диагностические изображения мельчайших анатомических деталей, а также тока крови на уровне капилляров [8, 13, 15, 23].

Современная лучевая диагностика неразрывно связана с использованием контрастных препаратов – йодсодержащих в рутинной рентгенодиагностике и компьютерной томографии и препаратов, изменяющих магнитные свойства тканей, – парамагнетиков – в магнитно-резонансной томографии. Проникая адекватно кровотоку в исследуемые органы и ткани, эти препараты улучшают визуализацию, что достигается путем повышения плотности тканей при использовании рентгеноконтрастных препаратов или усилением сигнала тканей при использовании парамагнетиков [2, 4, 7, 8, 14, 15, 17, 18, 19, 23].

Ультразвуковое исследование не является исключением. Впервые искусственное контрастирование было применено при исследовании камер сердца в 1973 году Pravin V. Shan и R. Gramiak. После открытия способности

микропузырьков газа усиливать ультразвуковой сигнал началось быстрое развитие эхоконтрастных препаратов [15, 16, 20].

Сегодня в мировой клинической практике использование контрастного усиления при ультразвуковом исследовании является обязательным условием диагностики больных практически любого клинического профиля при постоянном совершенствовании и разработке новых ЭКП [15, 16].

Принцип повышения качества изображения при использовании эхоконтрастных веществ состоит во введении в кровь пациента суспензии, содержащей микропузырьки газа, которые усиливают отражение ультразвуковых волн. Диаметр пузырьков сопоставим с диаметром легочных капилляров [112, 113, 131, 132].

Использование контрастного усиления в ультразвуковой диагностике не только повысило эффективность метода в установлении многочисленных патологических состояний, но и изменило статус метода УЗИ. Принцип контрастного усиления в ультразвуковой диагностике базируется на двух основных положениях – наличии ультразвукового контрастного агента и соответствующего программного обеспечения для обработки изображений [112, 113, 131, 132].

Самые первые образцы ЭКП представляли собой смесь физиологического раствора с перекисью водорода, воздухом, углекислым газом. Эти субстанции не могли пройти через сосуды малого круга кровообращения и достигали и обеспечивали изображение только правых камер сердца [16, 112]. В дальнейшем было выделено несколько классов ЭКП. Препарат первого поколения Echovist (galactose) Germany – представлял собой смесь простых микропузырьков газа с галактозой и обладал коротким временем визуализации [16, 18, 113].

Второе поколение ЭКП (Levovist (galactose), Schering, Germany; SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария)) – это микропузырьки, стабилизируемые различными веществами, поверхность которых выполнена из фосфолипидов, альбумина или полимеров. Средний диаметр

микропузырьков второго поколения ЭКП меньше 8 мкм, что гарантирует прохождение ЭКП через малый круг кровообращения и достижение ими различных органов. ЭКП второго поколения характеризуются более длительным временем визуализации ввиду их низкой растворимости в воде и высокой степени отражения [16, 68, 90, 92, 112, 113, 129, 131, 132].

Наличие микрочастиц (пузырьков газа) в контрастных препаратах обеспечивает эхоусиливающий эффект путем рассеивания энергии ультразвука в разных направлениях. Возрастание акустического сопротивления ведет к увеличению силы эхосигнала, регистрируемого от кровотока и изображения тканей в режиме серой шкалы. Подобное усиление эхосигнала особенно актуально при наличии так называемых изоэхогенных образований, когда детали исследуемой структуры не являются достаточно отличимыми от окружающей ткани при ультразвуковом изображении [112, 113, 116, 131, 132].

Взаимодействие ЭКП с ультразвуковой волной определяется энергией излучателя. При низкой акустической энергии (низком механическом индексе) отражение ультразвуковой волны приводит к усилению эхосигнала. При более высоких мощностях происходит разрушение пузырьков и генерация высокого, но преходящего эффекта усиления отражения и повышения эхогенности [112, 113].

Высокие акустические мощности позволяют осуществлять прерывистое сканирование очага патологии (участка-очага поражения) во время различных фаз контрастного усиления [14, 15, 16, 23] .

С другой стороны, контраст-специфические технологии при низких акустических мощностях не вызывают разрушения ЭКП в акустическом поле и сканирование происходит непрерывно. Подобные (неразрушающие) технологии требуют использования ЭКП второго поколения, которые способны отражать ультразвуковую волну при низкой акустической мощности [16, 112, 113].

При исследовании ЭКП вводится парентерально в периферическую вену. Когда микропузырьки поступают в зону интереса (очаг патологии, который является акустическим полем) по микро- и макроциркуляторному руслу, они взаимодействуют с акустической волной и начинают генерировать основное количество нелинейных сигналов, в то время как собственно ткани очага поражения или не генерируют нелинейные сигналы, или генерируют их в небольшом количестве [15, 16, 112, 113].

Таким образом достигается улучшение соотношения «сигнал – шум», вследствие чего ЭКП можно использовать для повышения выявляемости очага поражения, а также в качестве индикатора отображения микро- и макроциркуляции, в том числе для отображения особенностей сосудистой морфологии в опухолях при быстро и интенсивно наступающем контрастном усилении [15, 16, 112, 113, 131, 132].

ЭКП являются безопасными контрастными веществами с очень низкой вероятностью анафилактической реакции (1 : 7000 пациентов, 0,014%) по сравнению с частотой анафилактических реакций при КТ (0,035–0,095 %) [112, 113, 131, 132, 136].

Тем не менее, как и при использовании всех лекарственных и диагностических препаратов (препаратов медицинского назначения) должны соблюдаться меры предосторожности для некоторых групп пациентов. В основном это относится к группе пациентов кардиологического профиля с наличием в анамнезе недавно перенесенного инфаркта миокарда и интервенционной коронарографии, повторяющихся эпизодов стенокардии в последнюю перед исследованием с ЭКП неделю, сердечной недостаточности, легочно-сердечной недостаточности и т.д. [91, 112, 113, 131, 132, 133, 136].

В Соединенных Штатах в связи с принятыми и недавно модифицированными правилами по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) определенное время были введены ограничения и меры предосторожности при использовании таких препаратов, как Definity (perflutren), Lantheus Medical, Billerica, MA, USA; Luminity

(octafluoropropane), Lantheus Medical, Billerica, MA, USA и Optison (perflutren protein-type A microspheres), USP в эхокардиографии [113, 118, 133, 136]. Однако во всем мире ЭКП считаются безопасными препаратами медицинского назначения и широко применяются при многочисленных показаниях [91, 112, 113, 131, 132, 133, 136].

Чрезвычайно важным преимуществом этих препаратов является то, что они не выводятся почками, тем самым исключается их влияние на функцию почек. Поэтому ЭКП могут безопасно вводиться пациентам с почечной недостаточностью, включая ситуации с отсутствием лабораторных показателей функции почек. Кроме того, методы с применением ЭКП превосходят КТ и МРТ в установлении гиперваскуляризации образования в артериальную фазу благодаря отображению данной фазы в реальном масштабе времени, подтверждают эффект «вымывания» из злокачественных образований [43, 91, 131, 134].

Таким образом, в настоящее время ЭКП на основе микропузырьков одобрены для визуальных исследований в более чем 50 странах, являются безопасными и практически не имеют тяжелых побочных реакций по сравнению с контрастными препаратами, используемыми при КТ [91, 112, 113, 131, 132, 136].

В силу перечисленных преимуществ УЗИ (CEUS) с контрастным усилением становится методом выбора в ситуациях, когда необходимо оценить перфузию органа, а КТ или МРТ не могут быть выполнены по ряду причин [91, 112, 113, 131, 132].

1.2 Показания для использования эхоконтрастных препаратов

Основные показания для использования ЭКП:

- подтверждение/исключение случайно выявленных образований при нативном УЗИ;

- выявление поражений или подозрение на наличие поражений, выявленных при нативном УЗИ, у пациентов онкологического профиля в качестве метода, альтернативного КТ или МРТ;
- необходимость исследования с контрастным усилением при наличии противопоказаний для контрастного усиления при КТ или МРТ;
- неопределенные данные визуальной картины КТ или МРТ;
- неопределенные результаты цитологии/гистологии;
- низкие показатели специфичности и чувствительности нативного УЗИ в определении образований при жировом гепатозе печени и при глубоко расположенных образованиях.

Поскольку ЭКП распределяются по сосудам и являются индикатором кровотока патологических образований, то принцип выявления субстрата зависит от его гипер- или гиповаскуляризации по сравнению с васкуляризацией окружающих тканей. Поэтому после контрастирования очаг может иметь повышенную или пониженную эхогенность. Уточнение природы образований зависит от морфологической особенности микро- и макроциркуляции, скорости и интенсивности поступления контрастного агента. Распределение эхоконтрастного препарата в артериальную, портальную и позднюю фазы позволяет повысить диагностическую эффективность метода в дифференцировке доброкачественности кистозных и солидных образований [30, 32, 33, 34, 46, 80].

Одним из основных показаний для использования ЭКП является диагностика (выявление) изоэхогенных очагов паренхиматозных органов, дифференциальная диагностика их доброкачественной или злокачественной природы [50, 51, 64, 68, 69, 80].

Наибольшее распространение эта проблема приобрела в гепатологии [68, 69, 71, 75, 90, 94].

Очаговые поражения печени включают большое число как доброкачественных, так и злокачественных – первичных и вторичных – образований: гемангиомы, узловую фибронодулярную гиперплазию печени,

аденому, гепатоцеллюлярную карциному и метастатическое поражения. Сложность их выявления обусловлена малыми размерами (в пределах 1–3 мм) и изоэхогенностью (одинаковым акустическим сопротивлением с окружающими тканями). Кроме того, трудности диагностики усугубляются расположением образований в сложной для выявления анатомической локализации печени (например, рядом с диафрагмальным куполом) [85, 89, 90, 99, 103, 111, 123].

Так, гемангиома печени сопровождается центрипетальным (от периферии к центру) характером поступления контрастного препарата, повышением эхогенности в артериальную фазу и сохранением ее в портальную и позднюю фазы. Для фибронодулярной гиперплазии характерно устойчивое повышение эхогенности в портальную и позднюю фазу с наличием (формирование анэхогенного «рубца») в ранние фазы контрастирования, с поздним поступлением ЭКП в зону фиброваскулярной ткани (фибронодулярная гиперплазия, гемангиома) [64, 84, 89, 90].

Повышение эхогенности в аортальную фазу с последующим снижением эхогенности в позднюю фазу («вымывание» контрастного препарата) характерно в большей степени для злокачественных опухолей, таких как гепатоцеллюлярная карцинома (ГПЦК), метастатическое поражение [46, 52, 56, 111].

Метастазы характеризуются быстрым ростом, различной плотностью ткани и, следовательно, разной эхогенностью при нативном УЗИ. Наибольшую сложность при диагностике вызывают изоэхогенные метастазы, которые практически не отличаются от окружающих тканей, метастазы размером до 2 см, а также расположенные на глубине более 9 см. Строению сосудистой стенки свойственна хаотичность, наличие анастомозов, шунтов, незрелость формирования слоев стенки. Исследования в доплеровском режиме, эластография не выявляют специфических признаков изменений кровотока. Новые возможности в данном аспекте открывают ЭКП. В зарубежных публикациях представлено большое количество данных

о результативности ЭКП в диагностике метастазов. Все единогласны в высокой диагностической точности контрастного усиления в сравнении с нативным УЗИ, которая увеличивается до 92–95% и становится сопоставимой с КТ, МРТ [43, 47, 56, 62, 65]. При введении контрастного средства метастазы реагируют снижением эхогенности в портальную (35–120 с) и позднюю (более 120 с) фазы, формируется эффект раннего вымывания, так называемый дефект. При введении препарата SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) регистрируется васкуляризация в раннюю артериальную сосудистую фазу (10–35 с), гипervasкулярные метастазы имеют повышенную эхогенность, а гиповаскулярные – сниженную эхогенность, точность диагностики метастазов достигает 95% [59, 68, 90, 91, 102].

Тем не менее, остается ряд нерешенных вопросов об особенностях визуализации метастазов различных нозологических форм злокачественных новообразований, о характере васкуляризации и различиях в контрастном усилении гипер- и гиповаскулярных метастазов. Существуют сложности в дифференциальной диагностике очаговых образований на фоне диффузных изменений, например при циррозе или жировой инфильтрации ткани печени. Размер образований играет большую роль, диагностическая точность КУ очагов менее 2 см ниже и составляет не более 75–80%. Остается открытой проблема использования КУ в дифференциальной диагностике метастазов от первичного неопластического очага. Решение этих вопросов актуально для пациентов онкологического профиля в процессе или после лечения новообразования [47, 75, 95, 114, 120].

Достаточно частыми и серьезными по клиническим последствиям являются абсцессы печени. Локальные воспалительные процессы в печени могут сформировать группу солидных объемных образований, имитирующих опухоли [44, 51, 71, 104].

Инфицированные гранулемы печени гистологически состоят из эпителиоидных клеток или макрофагов, окруженных венчиком моноклеарных клеток. Они, как правило, вызваны паразитарной, туберкулезной или грибковой инфекцией.

При нативном исследовании печеночные абсцессы манифестируют как солидные гипоэхогенные, или слабо дифференцируемые, или абсолютно изоэхогенные узелки [8, 15, 44, 71, 104].

После контрастирования наблюдается периферическое повышение эхогенности без центрального накопления (усиления) в 94% поражений, повышение эхогенности перегородок в 69% и усиление эхогенности паренхимы печени в артериальную фазу в 63%. Вместе с тем, имеются данные о том, что более чем 50% поражений становятся гипоэхогенными в воротную фазу контрастирования. Несмотря на то что в целом картина абсцесса и воспалительных псевдоопухолей в ряде случаев не является специфичной, выявляемость воспалительных очаговых образований печени повышается на фоне контрастного усиления [44, 51, 71, 90, 104].

В литературе подчеркивается, что УЗИ с контрастным усилением повышает выявляемость небольших очаговых поражений по сравнению с нативным исследованием, а также говорится о превосходстве или сопоставимости возможностей ЭКП относительно рентгеноконтрастных препаратов при КТ в обнаружении образований в пределах 1–2 мм [47, 51, 54, 62, 89, 90].

Использование ЭКП востребовано и при исследовании желчевыводящих путей. Основными показаниями для оценки состояния желчных путей посредством УЗИ с контрастным усилением являются дифференциальная диагностика опухоли (карциномы) желчного пузыря и неподвижных желчных осадков или хронического холецистита с утолщенной стенки желчного пузыря, дифференциальная диагностика внутрипеченочной холангиокарциномы и других опухолей печени – гепатоцеллюлярной карциномы или метастазов печени [69, 71, 121].

Очень важным в хирургической патологии желчных путей является определение местоположения дренажного катетера по отношению к желчным путям в послеоперационном периоде и в процессе паллиативного лечения злокачественных процессов с наличием обструкции желчных

протоколов. Ультразвуковое исследование с ЭКП сопоставимо с другими методами лучевого исследования (ретроградная холангиопанкреатография, МР-холангиопанкреатография) в случае определения уровня стеноза [69, 71, 90, 121].

УЗИ с контрастным усилением поджелудочной железы рекомендуется для точных измерений протяженности участков ее поражения и их взаимоотношений с прилежащими сосудами; для характеристики локальных поражений (особенно аденокарциномы протока железы, нейроэндокринной опухоли и очагового (фокального) панкреатита); дифференциальной диагностики псевдокист и кистозных опухолей поджелудочной железы; дифференциации васкуляризированных и не васкуляризированных компонентов поражения [69, 78]. ЭКП также могут быть полезны в определении эффективности лечения патологических состояний, в том числе после химиотерапии [70, 71, 112].

Основное направление использования ЭКП в урологии касается дифференциальной диагностики очаговых образований почек. При этом, так же как и в гепатологии, особый интерес вызывают изоэхогенные солидные образования небольших размеров [29, 38, 53, 55, 86, 88, 125]. УЗИ с контрастным усилением можно выполнять у больных со сниженной функцией почек, обструкцией мочевыводящих путей. Можно использовать его для характеристики кистозно-измененных почек, выявления почечной ишемии, травматических повреждений, визуализации стеноза почечной артерии, тромбоза сосудов почки. Так же как и при исследовании печени, актуальным является установление инфицированных очагов в почках – абсцессов [29, 51, 86, 125, 139].

УЗИ с контрастным усилением позволяет оценить в реальном времени контрастирование образования почек в артериальную фазу, устраняя проблему аппаратной регистрации при КТ и МРТ артериальной фазы. Так, появились публикации, в которых описываются положительные результаты выявления гиперваскуляризации субстрата в артериальную фазу в случаях,

когда КТ или МРТ давали ложноотрицательный результат из-за неадекватного выбора времени артериальной фазы [29, 38, 53, 55, 86, 88, 125].

Востребованным органом для выявления очаговых образований следует считать селезенку. УЗИ с ЭКП дает чрезвычайно важную информацию о состоянии «забытого органа» при диагностике онкологических (метастазы, гипоехогенные после контрастного усиления), гематологических, инфекционных, метаболических заболеваний, портальной гипертензии и других очаговых и диффузных заболеваниях. УЗИ с ЭКП используется при абдоминальной травме для уточнения места разрыва селезенки, способствует дифференциальной диагностике кист, гемангиом. Гемангиома представляет собой наиболее частое доброкачественное солидное образование селезенки. Кавернозная гемангиома может выглядеть как диффузное центрипетальное и интенсивное контрастное усиление [59, 129, 135]. Особо необходимо отметить использование ЭКП в диагностике абсцессов селезенки. Абсцесс селезенки возникает, как правило, в результате гематогенного заноса инфекционного агента.

Микроабсцессы селезенки могут иметь место при бактериальном эндокардите, осложненном течении гематомы или инфаркта [59, 129, 135]. При УЗИ с ЭКП наблюдается гиперэхогенное усиление по периферии абсцесса, по ходу перегородок, но при отсутствии накопления в полости абсцесса, в зоне некротических масс [59, 129, 135]. Инфаркт селезенки при контрастном усилении выглядит как полностью анэхогенный участок (не накапливающий контрастный препарат) при визуализации прерывистости хода артерии в артериальную [59, 129, 135].

ЭКП могут также использоваться для оценки активности болезни Крона, для этого исследуется степень контрастного усиления стенки кишки [71].

Кроме того, контрастное усиление в УЗИ применяется для дифференциальной диагностики внутриабдоминального абсцесса/флегмоны и воспалительного поражения стенок кишечника при болезни Крона [72, 90].

Безусловной сферой применения ЭКП является патология органов малого таза у женщин и мужчин. Наряду с применением контрастного усиления для дифференциации образований малого таза Zhou X.D. et al. (2007) использовали ЭКП для оценки результатов высокоинтенсивной фокусированной ультразвуковой абляции миом матки, при этом МРТ служила эталоном для сравнения. Диагностическая точность УЗИ с контрастным усилением составила 100% [63, 85, 90, 133].

Tang J. et al. (2008) обнаружили, что злокачественные гипозхогенные узелки в периферической зоне предстательной железы накапливают ЭКП раньше и интенсивнее, что отчетливо определялось при трансректальном исследовании. Гипозхогенные участки поражения в периферической зоне, не накапливающие контрастное вещество, в большей степени характерны для доброкачественных образований [63, 85, 133].

В литературе имеются сообщения об использовании ЭКП в диагностике тупой травмы живота. В этих ситуациях ЭКП могут использоваться в качестве индикатора кровотока и для обнаружения локализации кровотечения и гематомы у пациентов с травмой живота [48, 60].

В качестве еще одной ургентной ситуации, когда используется ЭКП, описывается установление с высокой степенью точности недостаточности трансплантата после эндоваскулярного лечения расслаивающейся аневризмы аорты [61, 74, 122].

Использование УЗИ с контрастированием утвердилось и в ревматологии для оценки состояния синовиальной оболочки [40, 105].

Таким образом, анализ литературных источников свидетельствует о широком применении контрастного усиления в ультразвуковом исследовании в мировой клинической практике.

Распределяясь по магистральным и периферическим сосудам, являясь индикатором микроциркуляции органа, ЭКП обеспечивают визуализацию патологических образований, в том числе опухолевых и воспалительных, которые при нативном исследовании сливаются с окружающими тканями.

Преимущества ультразвукового контрастного усиления обусловлены возможностью получения артериальной фазы контрастирования органа в реальном времени, что не всегда удается оптимально выполнить технически при КТ или МРТ. Поскольку ЭКП не элиминируются почками, их можно применять у пациентов с почечной недостаточностью [90, 91, 112, 131, 132, 133, 136].

Возможность регистрации изображения кровотока в органе в артериальную, портальную и отсроченную фазы делает ультразвуковое исследование с контрастным усилением сопоставимым с КТ- и МРТ-ангиографией, а в ряде случаев альтернативным этим методам диагностики [43, 90, 91, 112, 131, 132, 133, 136].

1.3 Характеристика современных эхоконтрастных препаратов

В современной ультразвуковой диагностике используется ряд эхоконтрастных препаратов (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария); Sonazoid (perflubutane), Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония; Definity (perflutren), Lantheus Medical, Billerica, MA, USA; Luminity (octafluoropropane), Lantheus Medical, Billerica, MA, USA; Optison (perflutren protein-type A microspheres), USP), среди которых наиболее широкое распространение имеют SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) и Sonazoid (perflubutane), Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония.

Одним из первых контрастных веществ второго поколения, используемых для диагностики рака печени, был Levovist (galactose), Schering, Germany. Однако это средство имело определенные ограничения [93, 129, 133, 134]. Для получения изображения органа при использовании

Levovist (galactose), Schering, Germany требовалась высокая акустическая мощность, которая разрушала микропузырьки. Широкополосные высокочастотные сигналы, генерируемые в результате разрушения микропузырьков, создают преходящий эффект усиления изображения за счет эхосигналов как от микропузырьков, так и от исследуемых тканей. Подобная техника получения преходящего изображения затрудняет исследование в артериальную фазу контрастирования. Кроме того, Levovist (galactose), Schering, Germany имеет ограничения в выявлении маленьких образований. Наименьший размер очаговых образований, определяемых с помощью Levovist (galactose), Schering, Germany, находится в диапазоне от 3 до 5 см в диаметре [93, 129, 133, 134].

К достоинствам данного ЭКП можно отнести его фагоцитирование клетками ретикулоэндотелиальной системы, что повышает выявляемость гепатоцеллюлярного рака печени [93, 129, 133, 134].

Однако такими свойствами обладает современный препарат Sonazoid (perflubutane), Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония, а для обеспечения оценки васкуляризации образований различной локализации в артериальную фазу при низкоэнергетическом, не разрушающем микропузырьки УЗ-сканировании используется препарат SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. В настоящее время производство Levovist прекращено.

Препарат второго поколения SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария), был произведен в 2001 г. (лицензирован в Европе, Китае, Индии, Корее).

SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) представляет собой микропузырьки гексафторида серы диаметром менее 8 мкм (средний размер пузырьков 2,5 мкм), стабилизированные мембраной из поверхностно-активных фосфолипидов [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. Физико-химические составляющие SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) позволяют получать изображения в реальном времени при низкой акустической мощности.

SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) – это контрастное вещество, которое является индикатором микроциркуляции исследуемого образования. Наряду с возможностью отображения артериальной и портальной фаз, SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) обеспечивает регистрацию микроциркуляции органа в позднюю паренхиматозную фазу (1–3 мин) [61]. Оценка кровотока и постконтрастного изображения органа осуществляется по следующим параметрам: контрастное усиление в раннюю артериальную фазу (через 10–20 с после инъекции ЭКП), контрастное усиление через 60 с после инъекции ЭКП и контрастное усиление через 120–180 с после инъекции ЭКП. Контрастное усиление окружающих паренхиматозных тканей расценивалось в качестве референтной базы *in vivo* [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. Многочисленные исследования показали, что УЗИ с использованием SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) имеет высокую разрешающую способность в определении характера кровотока ГПЦР даже в маленьких узелках – до 2 см в диаметре [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. Существуют данные о том, что определение характера васкуляризации опухолей при УЗИ с контрастным усилением препаратом SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) сопоставимо с динамической КТ [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128].

В отличие от Levovist (galactose) Schering, Germany, выявляемость васкуляризации образования при SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) не зависит от размера опухоли.

УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) имеет широкие показания в современной клинической медицине. Прежде всего это диагностика очаговых образований в печени, в первую очередь выявление ГПЦР и метастатического поражения. Наряду с возможностью обнаружения образований маленьких размеров, УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) по аналогии с другими современными модальностями лучевой диагностики – КТ и МРТ – регистрирует при ГПЦР гипervasкуляризацию в ранней артериальной сосудистой фазе и гиповаскуляризацию в портальную и

паренхиматозную фазы исследования. Гиповаскуляризация ГПЦР в поздних стадиях вызвана вымыванием контрастного вещества из опухоли вследствие перфузии окружающей паренхимы печени.

SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) регистрирует гипер- и гиповаскуляризацию в ранней артериальной сосудистой фазе и гиповаскуляризацию в портальную и паренхиматозную фазы исследования, диагностическая точность достигает 90% [62, 83].

В связи с тем что специфичность контрастного усиления с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) в выявлении очаговых заболеваний печени достигает 83%, а в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных образований повышается до 90%, ряд авторов настоятельно рекомендуют использовать контрастное усиление с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) в первом ряду методов для диагностики очаговых поражений печени [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. Как и при исследовании печени, SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) с аналогичной эффективностью используется для исследования селезенки [59, 135].

Распространенным показанием для использования ЭКП являются патологические состояния почек. Наряду с выявлением и дифференциальной диагностикой очаговых образований почек, методику контрастного усиления с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) можно использовать в исследовании детей с пузырно-мочеточниковыми и везикоуретеральными рефлюксами в качестве надежного и безопасного с позиций лучевой нагрузки метода. Поэтому УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) должно быть включено в диагностический алгоритм исследования детей с инфекцией мочевых путей [59, 68, 97, 112, 117, 127, 128]. Трансабдоминальное УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) используется для различения злокачественных и доброкачественных масс в надпочечниках. Были получены результаты, указывающие на то, что раннее и неоднородное контрастирование можно расценивать в качестве критерия для подозрения на наличие злокачественного новообразования [38, 53, 125].

Кроме того, трансабдоминальное исследование с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) позволяет оценить активность болезни Крона на основании степени контрастного усиления стенки кишки [72].

Чрезвычайно важной областью применения УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) является оценка степени контрастирования и характера васкуляризации атеросклеротических бляшек сонных артерий как возможного показателя их нестабильности и предиктора их разрыва, а также для более точного определения процента стеноза [66, 74].

УЗИ с SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) нашло применение при патологии костно-мышечной системы, в частности для оценки активности псориатрического артрита (ПА) на основании определения степени васкуляризации синовия, а также для определения костно-мышечной микроциркуляции у больных сахарным диабетом [40, 105].

Из заявленных на рынке диагностических ЭКП SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) получил наибольшее распространение в клинической практике. Он имеет самое разнообразное по анатомическим локализациям и патологическим состояниям применение. Однако при исследовании печени с целью диагностики первичного рака и метастазов этот препарат уступает по эффективности Sonazoid (perflubutane), Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония ввиду отсутствия визуализации органа в постваскулярную отсроченную фазу. Преимуществом Sonazoid (perflubutane) Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония является то, что он фагоцитируется клетками ретикулоэндотелиальной системы и обладает высокой специфичностью в диагностике рака печени, однако этот ЭКП имеет ограничения в выявлении глубоко расположенных (свыше 9 см от передней брюшной стенки) образований [82, 87, 100, 116, 130].

В России отечественные ЭКП отсутствуют, зарубежные препараты не нашли широкого применения в связи с высокой стоимостью, следствием чего явилось снижение их поставок в нашу страну. Разработки отечественных ЭКП ведутся в двух направлениях.

Первое направление – системы адресной доставки, а именно пассивный направленный транспорт (облегченное проникновение через естественные барьеры) и специфическая доставка («узнавание» патологической ткани), что отвечает мировому уровню развития исследований в этой области. Существуют работы российских ученых по использованию фосфолипидных частиц, липосом и фуллеренов в качестве контейнеров для доставки фармакологических препаратов, использованию суспензии частиц ультрадисперсных и однородных нанопорошков оксидов металлов для визуализации сердца и сосудов [4, 5, 7]. Также есть работы по проектированию систем доставки на основе магнитных наночастиц, но такие работы выполняются в соавторстве с зарубежными исследователями [4].

Препараты второго направления в основе содержат микрокапсулы, состоящие из пузырька какого-либо газа, стабилизированного различными способами, которые обеспечивают взвешенное состояние газовых пузырьков, без их конгломерации. Основной проблемой при создании этих препаратов является обеспечение стабильности газовой микрокапсулы, поскольку время ее жизни определяет время контрастирования, наблюдаемого при исследовании [112]. Стабильность газовой микрокапсулы зависит от природы используемого газа и химического состава стабилизирующей его оболочки. При выборе газовой составляющей контрастного препарата, обеспечивающей продолжительное время жизни микрокапсулы, важным фактором является растворимость газа в воде. Высокая растворимость газа увеличивает диффузию его молекул из защитной оболочки и, как следствие, ускоряет разрушение микрокапсулы. Поэтому наиболее предпочтительными являются газы, обладающие минимальной растворимостью в воде и низким коэффициентом диффузии. Этим требованиям отвечают перфторуглеводороды и гексафторид серы. Кроме того, низкая растворимость этих газов обеспечивает их не токсичность. Как известно, для стабилизации дисперсных систем «газ – жидкость» применяют высокомолекулярные соединения, поверхностно-активные вещества

различной природы, которые, адсорбируясь на поверхности раздела газ – жидкость, уменьшают поверхностное натяжение. Гидрофобность перфторуглеводородов и гексафторида серы обуславливает химический состав защитной оболочки [68, 112, 113].

Таким образом, в мировой клинической практике использование ЭКП при ультразвуковом исследовании стало обязательным условием исследования больных практически любого клинического профиля при постоянном совершенствовании и разработке новых ЭКП. Использование контрастных препаратов позволяет повысить чувствительность, специфичность и диагностическую точность ультразвукового исследования.

Несмотря на большое количество зарубежных исследований, посвященных результатам применения эхоконтрастного усиления в онкологической практике, остается ряд не решенных окончательно вопросов об особенностях визуализации метастазов различных нозологических форм злокачественных новообразований, о характере васкуляризации и отличии контрастного усиления гипер- и гиповаскулярных метастазов. Не преодолены сложности дифференциальной диагностики очаговых образований на фоне диффузных изменений, например при циррозе или жировой инфильтрации ткани печени. Размер образований играет большую роль, диагностическая точность КУ очагов менее 2 см ниже и составляет не более 75–80%. Остается открытой проблема применения КУ в дифференциальной диагностике метастазов от первичного неопластического очага. Решение этих вопросов актуально для пациентов онкологического профиля в процессе или после лечения новообразования.

Из заявленных на рынке диагностических ЭКП SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) получил наибольшее распространение в клинической практике. Однако он не обладает органоспецифичностью в диагностике первичного рака печени и уступает препарату Sonazoid (perflubutane), Daiichi Sankyo Co, Ltd, Япония, который фагоцитируется клетками ретикулоэндотелиальной системы и позволяет визуализировать

поствазкулярную отсроченную фазу. Ограничением в использовании Sonazoid является отсутствие возможности визуализировать глубоко расположенные (более 9 см от передней брюшной стенки) образования. Современные научные исследования направлены на синтез новых ЭКП, обладающих органоспецифичностью, длительным временем контрастирования, обеспечивающих визуализацию глубоко расположенных тканей.

В России отечественные ЭКП отсутствуют, ведутся разработки по двум направлениям относительно систем адресной доставки: пассивный направленный транспорт (облегченное проникновение через естественные барьеры) и специфическая доставка («узнавание» патологической ткани). В структуре данных препаратов содержатся микрочастицы из газового пузырька, окруженного мембраной из стабилизирующих веществ, или микрочастицы нанопорошков оксидов металлов / магнитных наночастиц.

Разработка и внедрение отечественных ЭКП приведет к развитию важного звена в диагностической цепи исследования широкого спектра патологий, представляющих угрозу для жизни больного, особенно новообразований различной природы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Клинические исследования

Клинические исследования включали пациентов с верифицированным диагнозом онкологического заболевания и метастатическим поражением печени. Все пациенты находились на диспансерном учете или стационарном лечении в ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ТООД) в период с 2013 по 2015 гг., проходили плановые лабораторно-инструментальные исследования.

Критерии включения в группу:

- больные в возрасте от 45 до 80 лет, с установленным диагнозом рака молочной железы, колоректального рака, рака другой локализации;
- наличие установленного или исключенного по данным МРТ метастатического поражения печени;
- отсутствие противопоказаний к проведению МРТ;
- отсутствие противопоказаний к ЭКП на основе гексафторида серы;
- наличие информированного согласия пациента.

Критерии исключения из группы:

- пациенты с отсутствием верифицированного диагноза рака молочной железы, колоректального рака, рака другой локализации;
- неопределенная картина очагового поражения печени по данным МРТ;
- наличие противопоказаний к проведению МРТ;
- наличие противопоказаний к ЭКП на основе гексафторида серы;
- отсутствие информированного согласия пациента.

Пациент считался включенным в исследование после подписания информированного согласия. Информированное согласие подписывалось до сбора какой-либо информации для исследования. Оригинал подписанного согласия хранился у исследователя. Второй экземпляр передавался пациенту.

Форма информированного согласия и протокол клинического исследования были утверждены локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 2 от 23.10.2006) согласно местным нормативным требованиям.

Для характеристики онкологического заболевания использовалась рабочая классификация TNM (2009 г.), в которой учитывалось распространенность злокачественного процесса (T), степень распространения по отношению к лимфоузлам (N) и присутствие или отсутствие отдаленных метастазов (M).

Характеристика клинического материала

Всего исследовано 35 пациентов (13 мужчин и 22 женщины; средний возраст $66,1 \pm 12,3$ года) с установленным диагнозом онкологического заболевания (рак молочной железы, колоректальный и рак другой локализации), T3-4N0-1M0-1 стадии.

В таблице 1 представлена характеристика пациентов по нозологическим формам.

Таблица 1. Характеристика пациентов по нозологическим формам (n=35)

Характеристика	Пациенты раком молочной железы	Пациенты колоректальным раком	Пациенты раком другой локализации
Число	8/35 (23%)	12/35 (34%)	15/35 (43%)
Мужчины	-	7/35 (20%)	6/35 (17%)
Женщины	8/35 (23%)	5/35 (14%)	9/35 (26%)
Средний возраст	$68,2 \pm 13,4$	$66 \pm 11,4$	$64 \pm 12,1$

Из них у 8 больных диагностирован рак молочной железы (РМЖ) (средний возраст $68,2 \pm 13,4$). Пяти пациенткам было выполнено оперативное лечение в объеме секторальной резекции (n=2) и мастэктомии (n=3), дополненное курсом химиотерапии в адъювантном режиме. Трем больным с обширным лимфогенным метастазированием проведена лучевая терапия, с последующими курсами химиотерапии.

У 12 больных верифицированы различные морфологические варианты колоректального рака (средний возраст $66 \pm 11,4$). Оперативное лечение 7 пациентам выполнено в объеме гемиколонэктомии. В виду наличия у 9 пациентов метастатического поражения печени, им проведена от 2 до 6 курсов химиотерапии. Лучевая терапия проведена 4 пациентам.

Группу пациентов с опухолями других локализаций составили 15 человек (средний возраст $64 \pm 12,1$). У них были морфологически верифицированы: рак желудка ($n=5$), опухоль поджелудочной железы ($n=1$), гепатоцеллюлярный рак печени ($n=2$), рак надпочечников ($n=3$), рак яичников ($n=4$). Больные данной группы имели выраженную местную распространенность опухолевого процесса и наличие гематогенных метастазов, получили от 2 до 6 курсов химиотерапии.

Все пациенты находились на динамическом наблюдении, УЗИ лимфатических узлов и органов брюшной полости выполнялось 1 раз в 3 месяца в течении 1 года, 1 раз в 6 месяцев в течении двух лет, 1 раз в год в последующие годы.

С целью решения поставленной задачи в процессе обследования больных применялись методики клинического, инструментального и лабораторного исследования.

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости проведено всем пациентам. Исследование выполнялось на аппаратах фирмы Toshiba Aplio 300 и Toshiba Aplio 400 конвексным датчиком частотой 3,5–8 МГц в В-режиме и при использовании ЦДК, энергетического доплеровского картирования (ЭДК). Допплеровская частота 3,5–5 МГц. В качестве контрастного препарата использовали препарат на основе гексафторида серы (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария), приготовленный согласно инструкции производителя. Объем однократно вводимой дозы препарата составлял 2 мл. При ультразвуковом исследовании с контрастным препаратом использовали опцию Contrast Harmonic Imaging (CHI).

Первоначально исследование паренхимы печени проводили в В-режиме. Оценивали контуры, размеры печени, структуру желчных протоков, сосудов, эхогенность ткани печени в сравнении с эхогенностью паренхимы правой почки, структуру ткани на предмет наличия очаговых образований. При обнаружении новообразований определяли их размеры, топографическое расположение, четкость и ровность контуров, эхогенность относительно окружающей ткани, однородность структуры, степень васкуляризации, окружающие ткани на предмет их вовлеченности в процесс. Кроме того, проводили оценку желчного пузыря, желчевыводящих путей, сосудистой системы, наличия увеличенных и измененных лимфатических узлов, структуры поджелудочной железы.

Затем проводили исследование с использованием контрастного препарата на основе гексафторида серы (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария). ЭКП на основе гексафторида серы относится к неспецифичным контрастным препаратам для ультразвуковых исследований. Суспензию контрастного вещества (микропузырьков) готовили путем добавления к содержимому флакона через пробку 5 мл растворителя. После этого флакон энергично встряхивали в течение нескольких секунд до тех пор, пока лиофилизат полностью не растворялся. Необходимый объем суспензии (2 мл) забирали шприцем и вводили пациенту в периферическую вену. В ходе исследования регистрировали три фазы контрастирования: артериальную (10–35 с), портальную (35–120 с) и позднюю (120–360 с). После введения контрастного препарата оценивали: общее время контрастирования, полноту окрашивания всех сегментов ткани печени, визуализацию очаговых образований во всех фазах, эхогенность и ее изменение с течением времени (скорость вымывания) относительно неизменной паренхимы, контуры образований, размер, структуру, степень вовлеченности окружающих тканей.

Магнитно-резонансная томография

В качестве референтного метода была выполнена магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением 35 больным. Исследование

гепатобилиарной системы пациентов было выполнено на МР-томографах (Excelart Vantage 1,5T; Toshiba Medical Systems Europe) в трех стандартных сечениях — аксиальном, сагиттальном, корональном, толщиной среза 3-5 мм, с использованием последовательностей T1-ВИ, T2-ВИ, T2*-ВИ, FSat с болюсным введением контрастного средства в объеме 15 мл.

2.2 Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования проводились всем пациентам при поступлении в стационар или поликлиническое отделение ТООД.

Выполнялся общий анализ мочи, гематологический и биохимический анализ крови.

Исследование периферической крови проводилось в виде развернутого анализа, определялись такие показатели, как лейкоциты, СОЭ, уровень С-реактивного белка.

2.3 Экспериментальные исследования специфической активности

Экспериментальная часть состояла из исследований специфической активности (эффективности) нового отечественного ЭКП *in vitro* в стационарной системе и на животных, исследований фармакокинетики и токсичности на экспериментальных животных. Алгоритм исследования специфической активности (эффективности) на экспериментальных животных проводили согласно схеме № 3. Область исследования – ткань печени. Содержание животных и экспериментальное исследование осуществлялись в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); приказом МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г.; ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Москва, 2012).

Исследуемый ЭКП представлял собой гетерогенную систему «газ – жидкость», состоящую из микропузырьков, содержащих слабо растворимый газ гексафторид серы (SF_6) и гибкую, мобильную мембрану. Для создания мембраны, обеспечивающей поддержание пузырьков газа во взвешенном состоянии, использовался лецитин, состоящий из смеси фосфолипидов. Фосфолипиды имеют амфифильную структуру с преобладанием гидрофобной части, имеющей сродство к поверхности газовой составляющей микрокапсулы. В качестве гидрофильного компонента защитной оболочки, родственной к внешней водной среде, было использовано высокомолекулярное соединение полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000, что реализует два защитных фактора, обеспечивающих стабильность микропузырька. Новые компоненты, инозитол и холин, повышают стабильность (растворимость) глицериновой части и гидрофильной части, что значительно увеличивает стабильность мембраны. Инновационность подхода заключается в составе стабилизирующей системы, которая улучшает контрастные свойства препарата. В качестве стерильной среды использовали физиологический раствор. Стандартная препаративная форма имела вид сухого порошка, которую перед использованием восстанавливали стерильной средой посредством добавления среды в ампулу или шприц с сухим порошком и встряхивания в течение 10–20 с до образования изотонической или изотонической суспензии микрочастиц (рисунок 1). В результате раствор представлял собой гомогенизированную суспензию молочно-белого цвета. Средний размер микрочастиц составлял меньше 8 мкм. Исследуемый ЭКП защищен патентом РФ № 2485976 «Контрастное средство для ультразвуковой диагностики», приоритет от 17 мая 2011 г. Решение о выдаче 14.01.2013.

Стационарная система представляет собой пластиковый контейнер емкостью 50 мл, в который помещаются все компоненты ЭКП и взбалтываются в течение 20 с (рисунок 2). Приготовленный раствор подвергался ультразвуковому исследованию в В-режиме с регистрацией факта повышения эхогенности, оценкой эхоструктуры ЭКП и времени сохранения контрастности.



Рисунок 1 – Эхоконтрастный препарат

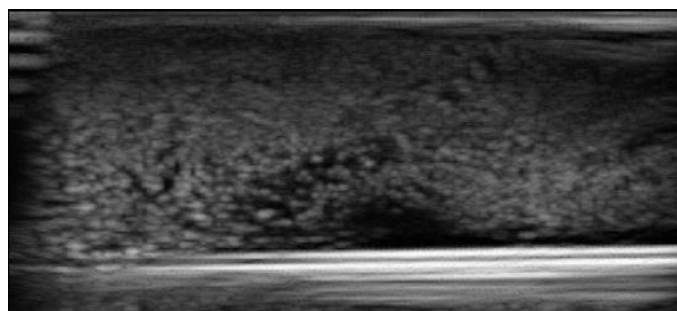


Рисунок 2 – Эхоконтрастный препарат в стационарной системе

Для оценки степени эхогенности ЭКП при нативном УЗИ применяли метод построения стандартной гистограммы в программе ImageM с фиксированием показателя интенсивности эхогенности. В качестве сравнения использовали воду с добавлением воздуха. Разница интенсивности эхогенности 30% и более считалась нами достоверной.

Исследование специфической активности (эффективности) проводили на 38 белых аутбредных (беспородных) крысах (самцах), 36 кроликах породы шиншилла (самцах, самках) и 3 свиньях (самцах).

Первая группа включала белых беспородных крыс-самцов без очагового поражения печени ($n = 23$, $m = 250\text{--}350$ г), вторая группа – белых беспородных крыс с очаговым поражением печени ($n = 15$, $m = 250\text{--}350$ г), третья группа – свиней мясной породы с очаговым поражением печени ($n = 3$, $m = 11\text{--}14$ кг), четвертая группа – кроликов-самцов ($n = 9$, $m = 1500\text{--}1700$ г) и самок ($n = 9$, $m = 1500\text{--}1700$ г) без очагового поражения печени,

пятая группа – кроликов-самцов ($n = 9$, $m = 1500\text{--}1700$ г) и самок ($n = 9$, $m = 1500\text{--}1700$ г) с очаговым поражением печени. ЭКП белым беспородным крысам вводили в хвостовую вену, кроликам и свиньям мясной породы – в ушную вену. Объем введения составил крысам 0,5 мл, кроликам 1 мл, свиньям 2 мл (рисунок 3).

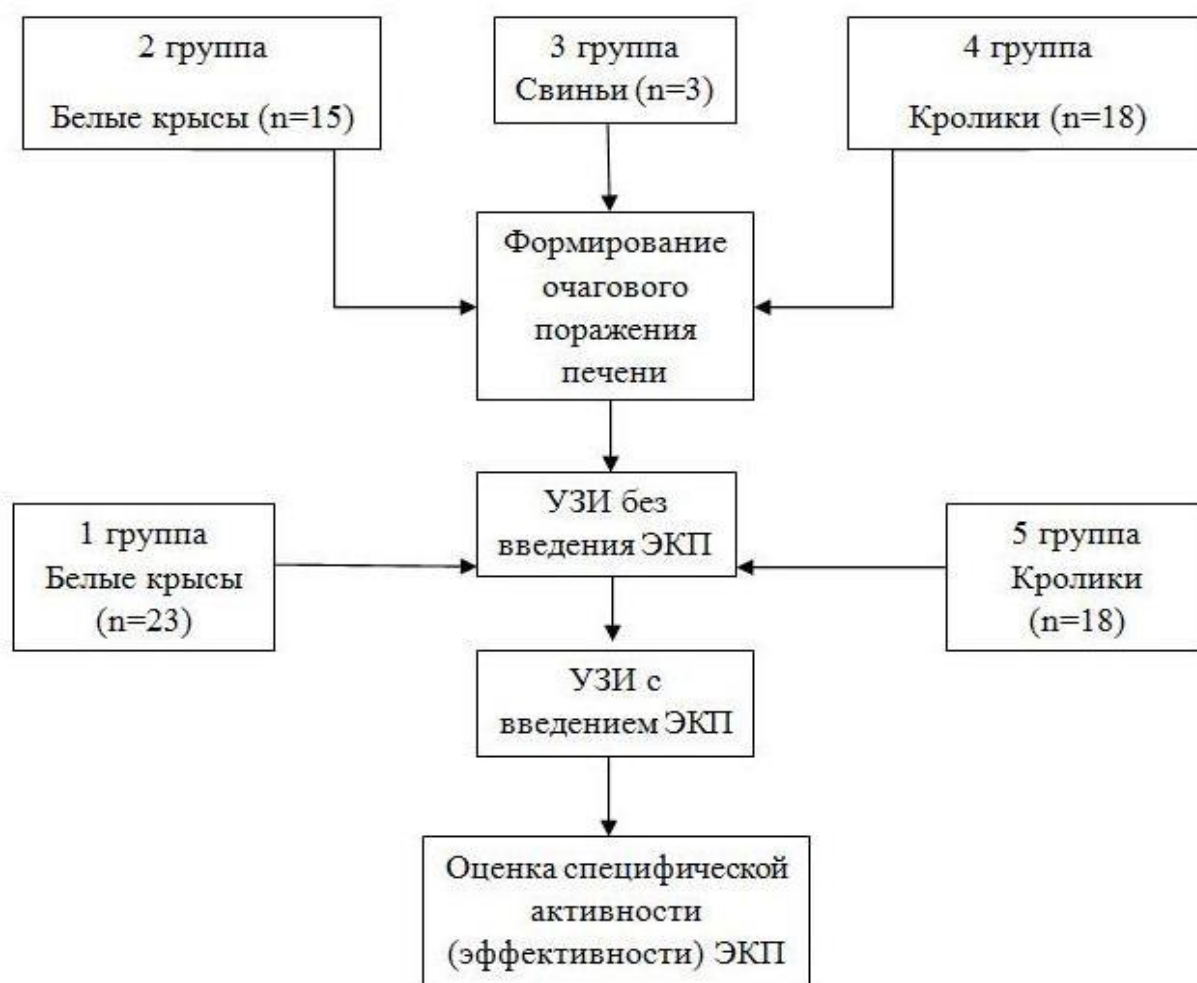


Рисунок 3 – Схема исследования специфической активности (эффективности) отечественного ЭКП

Оперативное вмешательство проводилось в условиях экспериментальной операционной лаборатории под наркозом с использованием препарата Золетил 100, вводимого из расчета 7–25 мг/кг. Выполнялась верхнесрединная лапаротомия с ревизией органов брюшной полости и травматизацией ткани печени путем внедрения в ткань инородного

тела и формирования абсцесса. В качестве способа формирования абсцесса печени за основу нами была взята известная модель (патент SU 1518827 / М.С. Арикьянц, А.Г. Тышко, А.Ф. Макеев, Л.Н. Волынец). Рана в печени не ушивалась. Передняя брюшная стенка ушивалась послойно наглухо. В качестве инородного тела у крыс использовали деревянную щепку, загрязненную *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл. Кроликам внедряли ватный шарик, пропитанный *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл.

У свиней моделировали два вида очаговых поражений. В первом варианте внедряли в правую долю печени силиконовый шарик 25×25 мм на глубину 2,5–3 см, заполненный физиологическим раствором. Второе очаговое поражение сформировали в правой доле печени на глубине 1,5–2 см путем локальной травматизации ткани острым предметом с введением 2 мл микробной взвеси, которая представляла собой *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл (рисунки 4, 5). Через 7–14 суток после операции проводили УЗИ зоны оперативных вмешательств.

Кроликам выполняли одно очаговое поражение печени путем введения в ткань печени инородного тела, загрязненного микробной взвесью (рисунки 6, 7). Микробная взвесь представляла собой смесь культур: *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл. Через 7–14 суток после операции проводили УЗИ зоны оперативных вмешательств.

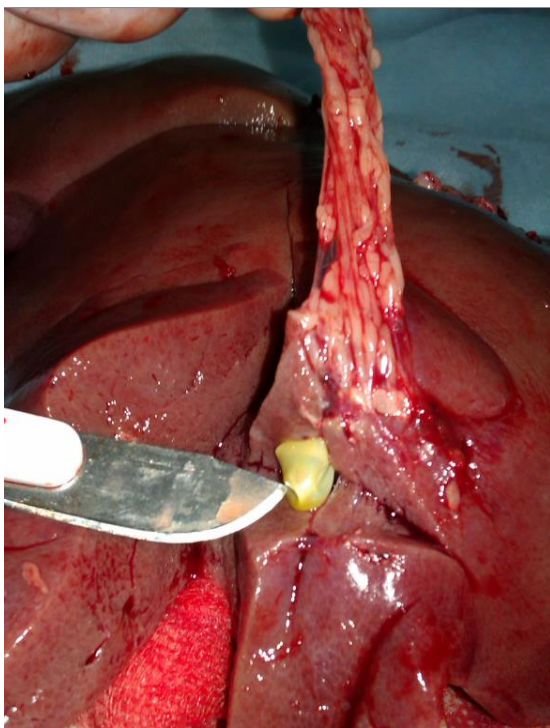


Рисунок 4 – Формирование очаговых образований в печени свиньи (силиконовый шарик)

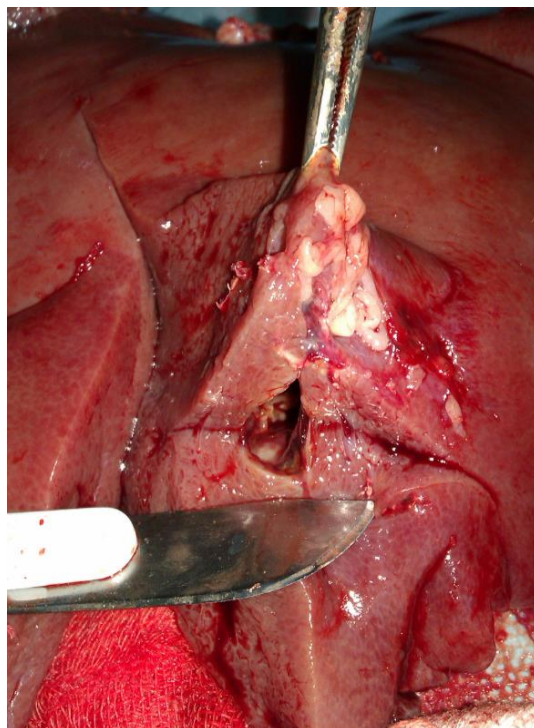


Рисунок 5 – Формирование очаговых образований в печени свиньи (полость)



Рисунок 6 – Формирование очаговых образований в печени кролика



Рисунок 7 – Формирование очаговых образований в печени кролика (внедрение в ткань печени микробного инородного тела)

Ультразвуковое исследование проводили на УЗ сканерах UltraSonix SP, Toshiba Aplio 400 линейным датчиком частотой 9–14 МГц, конвексным датчиком частотой 3,5–8 МГц.

Всем животным выполняли нативное УЗИ в В-режиме без введения отечественного ЭКП с акустической мощностью 1,6. УЗИ с отечественным ЭКП проводили в В-режиме с акустической мощностью 0,6, а также с использованием опции Contrast Harmonic Imaging (CHI) с акустической мощностью 0,6.

УЗИ в В-режиме включало оценку структуры очага, интенсивности его эхогенности, размеров, места расположения, ровности и четкости контура, самого очага, структуры окружающих тканей. Оценка и регистрацию показателя интенсивности эхогенности ткани проводили путем построения гистограммы в пакете ImageM. В режиме контрастного усиления оценивали общее время контрастного усиления ткани печени, изменения интенсивности контрастного усиления в артериальную, портальную и позднюю фазы, изменение интенсивности контрастного усиления очагового поражения в различные фазы в сравнении с окружающей тканью.

Лабораторные исследования осуществлялись всем животным. Выполнялся общий анализ мочи, гематологический и биохимический анализ крови. Исследование периферической крови проводилось в виде развернутого анализа в лаборатории. Определялись показатели, характеризующие степень воспаления, такие как лейкоцитоз, СОЭ, уровень С-реактивного белка.

Выведение животных из эксперимента проводили гуманным методом через 7–14 суток после операции.

Для гистологического исследования забор органов осуществляли после остановки сердца в течение 20–25 мин. Извлекались фрагменты печени в непосредственной близости от инородного тела и на удалении от него, фрагменты ткани легкого и почки брали случайным выбором. Материал фиксировали в 10% формалине, обезвоживали в изопропанолу и заливали

в парафиновую смесь. Из парафиновых блоков на микротоме готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

2.4 Исследование фармакокинетики

Доклиническое исследование фармакокинетики нового ультразвукового контрастного средства выполнялось на базе ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (согласно ГК № 14.N08.12.0027).

Исследование фармакокинетики включало:

- количественное определение лекарственного средства на основе гексафторида серы (ГС) в плазме крови крыс и кроликов;
- оценку концентрации ГС в плазме/сыворотке крови крыс/кроликов после однократного внутривенного введения в эффективной дозе;
- оценку концентраций ГС в плазме/сыворотке крови кроликов после курсового (7 дней) внутривенного введения в эффективной дозе для определения возможности накопления препарата;
- расчет фармакокинетических показателей.

Пути введения препарата и дозы лекарственного средства. Лиофилизат изучаемого контрастного средства растворяли в 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида, гексафторида серы было не менее 0,5 мкл/мл. Лекарственное средство вводили животным однократно в дозе 15 мкл/кг крысам и 4 мкл/кг кроликам. Кроликам также вводили три уровня доз: 4, 6 и 8 мкл/кг. Для исследования фармакокинетики лекарственное средство вводили однократно внутривенно двум видам животных (крысы и кролики) и многократно внутривенно (в течение 7 дней) кроликам.

Экспериментальные животные. Эксперименты проводились на 74 половозрелых конвенциональных аутбредных крысах (возраст 3 месяца, масса тела 290–320 г) стока CD разводки отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга и 6 лабораторных

кроликах (возраст 2 месяца, масса тела 2,3–2,5 кг), полученных из ЛПХ (личное подсобное хозяйство) «Барин», Томская область, Кривошеинский район, село Петровка (ветеринарное свидетельство 270 № 0029128 от 13 апреля 2015 г.).

Кролики находились в стандартных металлических клетках по одной особи. Температура воздуха в виварии 20–23 °С, влажность не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

Крысы содержались в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки по пять особей в клетке в открытом режиме. Размер клеток 57,5×35×18,5 см. Температура воздуха в виварии 20–23 °С, влажность не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

Содержание животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), и правилам лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н).

Аналитическое оборудование. Количественное определение препарата ГС в биологических образцах животных проводили чувствительным, избирательным и точным ГХ/МС-методом. Исследование выполнялось с использованием газового хроматографа с масс-селективным детектором Agilent 7860.

Состав аналитической системы: газовый хроматограф с масс-селективным детектором Agilent 7860, колонка HP-MS5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Хроматографический анализ проводили в изотермическом режиме при +50 °С. Детектирование осуществляли в режиме селективного ионного мониторинга.

Дизайн исследования. В исследовании использовались в качестве основных животных 74 крысы – самцы со средней массой тела 300 г. В качестве второго вида животных использовались 6 кроликов – самцы со средней массой тела 2500 г. Опытным животным (крысы) препарат вводили внутривенно болюсно (струйно) в хвостовую вену, кроликам – в ушную вену. В качестве основного биологического материала использовали плазму крови.

При отборе образцов биологический материал помещался в вакутейнеры цитратные, в которые предварительно был добавлен гептан (1 мл с добавкой внутреннего стандарта – толуола 0,00005 мкл/мл), после чего вакутейнеры помещались в морозильную камеру. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре, аликвоту гептана помещали в вials автосемплера и добавляли стандартный раствор гексафторида серы (0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл).

Методы исследования. Изучение фармакокинетики лекарственного вещества проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У., 2005).

Важнейшим элементом фармакокинетического изучения фармакологического средства является исследование динамики изменения его концентрации в крови, поэтому плазма крови рассматривалась в качестве основного вида биоматериала.

Условия хроматографического анализа. Количественное определение препарата в плазме крови проводили с помощью чувствительного, избирательного и точного ГХ/МС-метода. Детектирование осуществляли в режиме селективного ионного мониторинга. Условия хроматографического анализа и масс-спектрометрического детектирования были оптимизированы для обеспечения максимальной чувствительности детектора.

Пробоподготовка калибровочных образцов. Калибровочные кривые строились по результатам анализа стандартных образцов с концентрациями 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 мкл/мл на основе регрессионного анализа.

По результатам проведенных испытаний было установлено, что расчетные значения калибровочных стандартов соответствовали критериям приемлемости в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,5 мкл/мл (обладали требуемой точностью и сходимостью). Калибровочные кривые, построенные на основе регрессионного анализа, имели усредненный коэффициент детерминации (r^2) $\geq 0,9990$.

Методика количественного определения препарата на основе гексафторида серы в плазме. Образцы плазмы крыс/кроликов объемом 1000 мкл или 1 г навески органов и тканей помещали в пластиковые пробирки, содержащие 1 мл гептана, после чего пробирки закрывались герметичной крышкой и помещались в морозильную камеру на хранение при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Оценка фармакокинетических параметров. Расчет фармакокинетических параметров препарата ГС в плазме крови крыс и кроликов проводили модельным способом путем построения двучастевых моделей. Расчет фармакокинетических параметров ГС в тканях и органах крыс проводили модельно независимым методом статистических моментов. В ходе исследования рассчитывались следующие фармакокинетические параметры:

- 1) максимальное экспериментальное значение концентрации лекарственного средства в плазме крови (органе/ткани) после однократного введения ГС – $C_{\max}$;
- 2) площадь под экспериментальной кривой концентрации ГС в плазме крови за исследуемый период – AUC_{0-t} ;
- 3) общий клиренс – Cl ;
- 4) кажущийся объем распределения ГС – V_d ;
- 5) период полувыведения ГС – $T_{1/2}$;
- 6) среднее время удерживания ГС в организме – MRT ;
- 7) константа элиминации – k_{el} ;
- 8) тканевая доступность – $f_{\text{тк}}$.

2.5 Изучение безопасности лекарственного средства

Доклиническое исследование острой и хронической токсичности ГС выполнялось на базе НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ (согласно ГК № 14.N08.12.0027). Исследование проводилось в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова (2013).

2.5.1 Изучение острой токсичности лекарственного средства

Изучение острой токсичности лекарственного средства (ЛС) было проведено на 70 аутбредных мышах линии CD-1 и 70 аутбредных крысах линии CD обоего пола.

Наблюдение за экспериментальными животными осуществлялось ежедневно в утренние часы в течение 14 дней. В качестве параметров острой токсичности рассматривались изменение массы тела на 14-е сутки после введения препарата, число павших и выживших животных, продолжительность жизни. В ходе эксперимента следили за их поведением, внешним видом, двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители. Наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья и смертности проводилось один раз в день.

Суспензию ультразвукового контрастного средства приготавливали непосредственно перед введением, для чего во флакон с помощью шприца вводили 5 мл 0,9% раствора натрия хлорида и встряхивали в течение 1 мин.

В остром эксперименте ЛС на основе гексафторида серы вводили мышам и крысам однократно. При внутривенном введении мыши получали 5, 10 и 20 мл/кг суспензии, крысы – 2,5, 5 и 10 мл/кг. При внутрибрюшинном введении мыши получали 10, 20 и 40 мл/кг, крысы – 6, 12,5 и 20 мл/кг. Контрольные животные получали физиологический раствор при соответствующем способе введения.

2.5.2 Изучение хронической токсичности лекарственного средства

Изучение хронической токсичности ЛС проведено на 40 аутбредных крысах линии CD разводки отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга и 24 кроликах породы шиншилла, самцах и самках. Кролики получены из ЛПХ «Барин», Томская область, Кривошеинский район, село Петровка (ветеринарное свидетельство 270 № 0029128). Крысы находились в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки по пять особей в клетке в открытом режиме. Размер клеток 57,5×35×18,5 см. Температура воздуха в виварии 20–23 °С, влажность не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

В хроническом эксперименте ЛС на основе гексафторида серы вводили крысам внутрибрюшинно, кроликам внутривенно один раз в день на протяжении 60 дней. Введение препарата осуществлялось утром с 10:00 до 11:00. Крысы получали 0,5, 2,5 и 5 мл/кг (1 терапевтическая доза (ТД), 5 ТД и 10 ТД) исследуемого ЛС внутрибрюшинно в виде суспензии на 0,9% растворе натрия хлорида. Контрольные животные получали соответствующий объем 0,9% раствора натрия хлорида. Группы были сформированы по 5 животных одного пола.

В ходе прижизненной фазы исследования у животных регистрировали клинические признаки возможной интоксикации, вес тела. Крысы подвергались эвтаназии через 60 дней введения, затем выполнялись измерения гематологических показателей периферической крови, биохимический анализ сыворотки крови, гистология органов: головного мозга, тимуса, сердца, легких, печени, поджелудочной железы, селезенки, надпочечников, почек, тонкого и толстого кишечника, желудка, щитовидной железы, семенников/яичников, матки, предстательной железы и мочевого пузыря.

Кролики получали 0,25 и 1,25 мл/кг (1 и 5 ТД в пересчете с крысы на кролика с учетом коэффициента пересчета доз по Freireich et al., 1966) исследуемого ЛС внутривенно в виде суспензии на 0,9% растворе натрия хлорида. Контрольные животные получали соответствующий объем 0,9% раствора натрия хлорида. Группы были сформированы по 4 животных одного пола. Кролики находились в стандартных металлических клетках по одной особи. Температура воздуха в виварии 20–23 °С, влажность не более 50%, объем воздухообмена (вытяжка:приток) – 8:10, световой режим (день:ночь) – 1:1. Кормление животных осуществлялось дважды в день.

Через 60 дней введения ЛС у кроликов исследовали биохимические показатели сыворотки крови и показатели периферической крови, а также выполняли гистологию органов: головного мозга, тимуса, сердца, легких, печени, поджелудочной железы, селезенки, надпочечников, почки, тонкого и толстого кишечника, желудка, щитовидной железы, семенников/яичников, матки, мочевого пузыря.

Клинический осмотр проводили визуально еженедельно в течение первого месяца, 1 раз в 2 недели в последующие месяцы до окончания эксперимента. Оценивался характер экскреции, состояние шерсти, кожных покровов, слизистых оболочек, аппетит, дыхание, подвижность, нервно-мышечная возбудимость, походка, агрессивность, миоз/мидриаз/экзофтальм и другие признаки отклонения от здоровья.

Все манипуляции с животными получили одобрение этической комиссии по гуманному обращению с животными НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга. Содержание животных и исследование с их участием осуществлялись в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), и правилами лабораторной практики в Российской Федерации.

2.6 Методы математической обработки полученных результатов

Для анализа полученных результатов использовались стандартные программы Excel и Statistica 9.0, SPSS 12.0.

Применялись методы статистического и системного анализа качественных и количественных данных. Для описания качественных данных использовали относительные и абсолютные частоты, для их сравнения – критерий хи-квадрат и критерий Фишера с учетом условий применения критериев. Для описания количественных данных использовали 25-й, 75-й процентиля и медиану, для сравнения групп – непараметрические критерии Манна – Уитни и Крускала – Уоллиса с учетом условий применения. Для поиска взаимосвязи проводили корреляционный анализ методом Спирмена. Уровень значимости при анализе $p < 0,05$.

Для оценки эффективности диагностических тестов рассчитывали ряд операционных характеристик: чувствительность, специфичность, диагностическую точность, прогностическую ценность положительного результата, прогностическую ценность отрицательного результата.

Глава 3 Результаты собственных исследований

3.1 Результаты клинических исследований

УЗИ является основным и ведущим методом исследования онкологических больных.

В нашем клиническом исследовании принимали участие больные (n=35) раком молочной железы, колоректальным раком и раком других локализаций, средний возраст $66,1 \pm 12,3$ года.

3.1.1 Результаты нативного УЗИ пациентов онкологического профиля

Результаты УЗИ в В-режиме представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика показателей нативного УЗИ исследуемых пациентов

Характеристика		Количество пациентов
Гепатомегалия		8/35
Диффузные изменения печени		32/35
Очаговые образования печени	гиперэхогенные	4/35
	гипоэхогенные	3/35
	изоэхогенные	14/35
	анэхогенные	0/35
	всего	21/35
Размеры образований	до 30 мм	8/35
	более 30 мм	13/35
Количество очаговых образований	не более 3	13/35
	более 3	8/35
Эхогенность паренхимы печени	повышена	7/35
	не изменена	28/35
Желчевыводящая система (расширение протоков, конкременты, полипы)	изменена	13/35
	не изменена	22/35

Увеличение размеров печени в В-режиме выявлено у 8 пациентов, повышение эхогенности печени – у 7 пациентов, диффузные изменения

паренхимы печени в виде неоднородности структуры, а также неровность контуров отмечались практически у всех больных. Патология желчевыводящей системы, а именно расширение желчных протоков, наличие конкрементов и полипов в желчном пузыре выявлено у 13 пациентов.

Все очаговые образования печени изначально расценивались нами как вторичное (метастатическое) поражение.

В ходе исследования у 21 пациента были выявлены очаговые образования, гиперэхогенные у 4 пациентов, гипоехогенные у 3 пациентов, изоэхогенные у 14 пациентов, у 13 из них в количестве менее 3 и у 8 больных количество образований было более 3. Размеры выявленных образований варьировали в широком диапазоне – от 5 до 100 мм.

При анализе таких показателей, как размер печени, наличие диффузной неоднородности и повышение эхогенности паренхимы, а также патологии желчевыводящей системы выявлено преобладание пациентов с диффузными изменениями печени без изменения эхогенности.

У большинства пациентов было обнаружено менее 3 очаговых образований. По эхогенности отмечено большее число изоэхогенных образований, для которых характерно небольшое количество стромального компонента, что свойственно низкодифференцированным формам. Размер образований варьировал от 5 до 100 мм. Контуров большинства из них были неровные и нечеткие, структура визуализировалась слабо, у 2 пациентов лоцировался жидкостный компонент.

3.1.2 Результаты УЗИ пациентов онкологического профиля в условиях контрастного усиления

Ультразвуковая картина ткани печени при введении контрастного препарата на основе гексафторида серы представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика показателей контрастного усиления при УЗИ исследуемых пациентов

Характеристика		Количество пациентов
Эхогенность образований	гиперэхогенные	2/35
	гипоэхогенные	19/35
	изоэхогенные	1/35
	анэхогенные	2/35
	всего	24/35
Дополнительные очаги	2–5 мм	5/35
Размеры образований	до 30 мм	20/35
	более 30 мм	4/35
Количество образований	не более 3	3/35
	более 3	21/35
Метастатическое поражение		19/35
Доброкачественные образования		5/35
Выявлены только с ЭКП		3/35
Количество пациентов с выявленными метастазами при МРТ		20/35

В нашем исследовании выявлены очаговые образования у 24 пациентов, из них у 5 диагностированы образования доброкачественной природы, у 19 – злокачественные образования (метастазы). Контуры образований сохранили неровный, но приобрели четкий характер, что повысило точность измерения их размеров. Структура образований у 22 пациентов имела неоднородный характер, у 2 – однородный гомогенный вид. Образования до 30 мм были обнаружены у 20 пациентов, у 4 пациентов образования имели размер более 30 мм, у 5 больных дополнительно выявлены образования малых размеров – от 2 до 5 мм, не видимые при нативном УЗИ. Меньше 3 образований обнаружено у 3 пациентов, у 21 пациента количество образований было более 3.

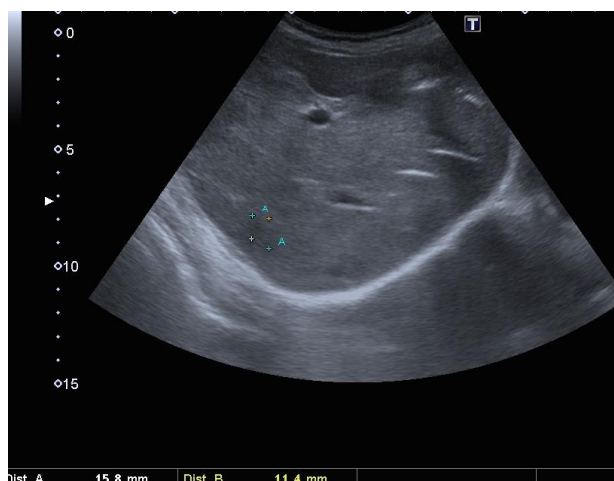
При введении контрастного препарата на основе гексафторида серы и использовании опции Contrast Harmonic Imaging момент контрастного усиления был зарегистрирован с 5–8-й с. Артериальная фаза фиксировалась с 10–35-й с, ткань печени визуализировалась высокоэхогенной, портальная фаза длилась с 35-й по 120-ю с, сохраняла высокую эхогенность, поздняя

фаза регистрировалась после 120-й с, высокая экзогенность ткани после 250–300-й с начинала постепенно снижаться. Общее время контрастирования составило от 360 до 480 с.

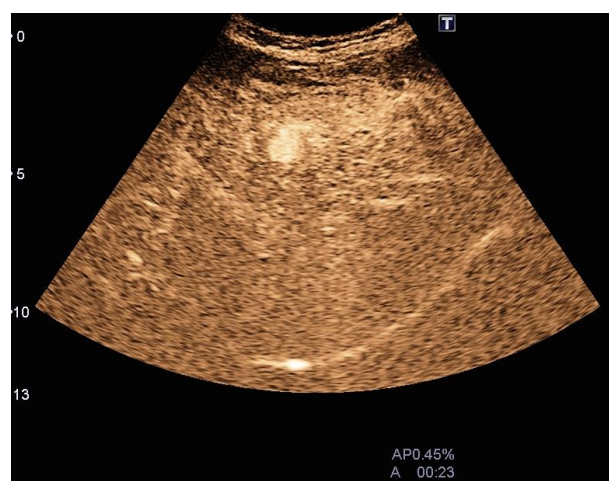
Очаговые образования при введении контрастного препарата на основе гексафторида серы имели различную контрастность, что связано с архитектурой сосудистого строения, так как органом-мишенью данного препарата являются сосуды циркуляторного русла разного порядка.

В артериальную фазу (10–35 с) у 2 пациентов выявлено усиление контрастирования очаговых образований на фоне более низкой контрастности окружающей паренхимы. В портальную фазу (35–120 с) у этих пациентов отмечалось снижение степени контрастности очаговых образований и нарастание контрастности окружающей паренхимы. В позднюю фазу (более 120 с) контрастное усиление в очаговых образованиях уже не лоцировалось, контрастность окружающей паренхимы снижалась. Данная картина соответствует гиперваскулярным метастазам (рисунок 8).

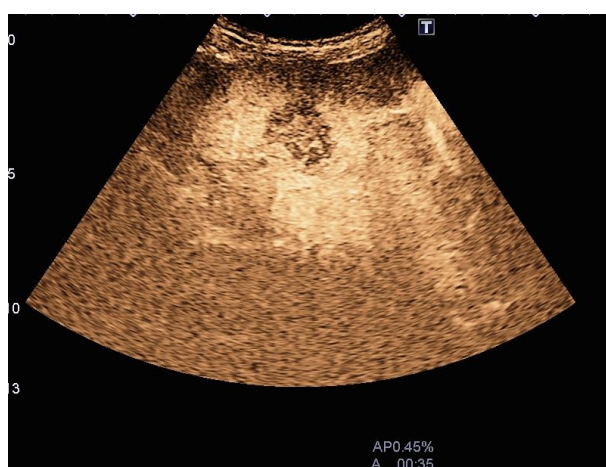
У 17 пациентов в артериальную фазу (10–35 с) отмечена слабая визуализация очаговых образований на фоне быстро возникающего контрастирования паренхимы печени. В портальную фазу (35–120 с) контрастирование печени повысилось и улучшилась визуализация очаговых образований в виде гипоехогенных структур. В позднюю фазу (более 120 с) фиксировалась отчетливая визуализация очагов в виде гипоехогенных образований на фоне медленного снижения контрастирования печени. Данная картина соответствует гиповаскулярным метастазам (рисунок 9).



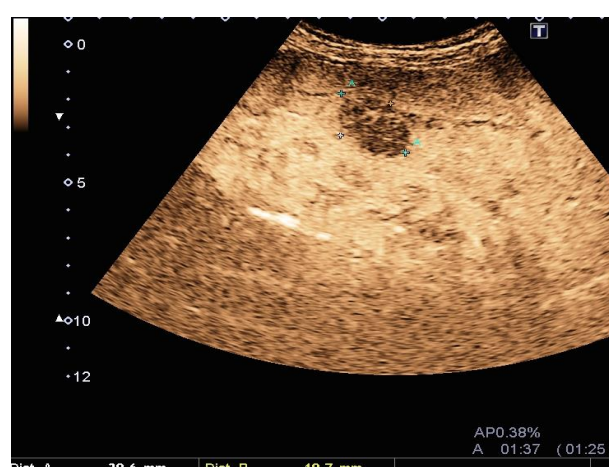
a



б



в



г

Рисунок 8 – Эхограммы гиперэхогенного метастаза печени в В-режиме (*a*) и после КУ в артериальную (*б*), портальную (*в*), позднюю (*г*) фазы исследования:

- a* – изоэхогенное образование в сегменте S7 (очаг?);
- б* – артериальная фаза (0:23) – гиперэхогенное образование в сегменте S4 на фоне поступления контрастного вещества;
- в* – портальная фаза (00:35) – снижение контрастности очагового образования в сегменте S4 за счет эффекта раннего «вымывания»;
- г* – поздняя фаза (01:37) – интенсивное снижение контрастности очагового образования в сегменте S4 на фоне высокой контрастности печени

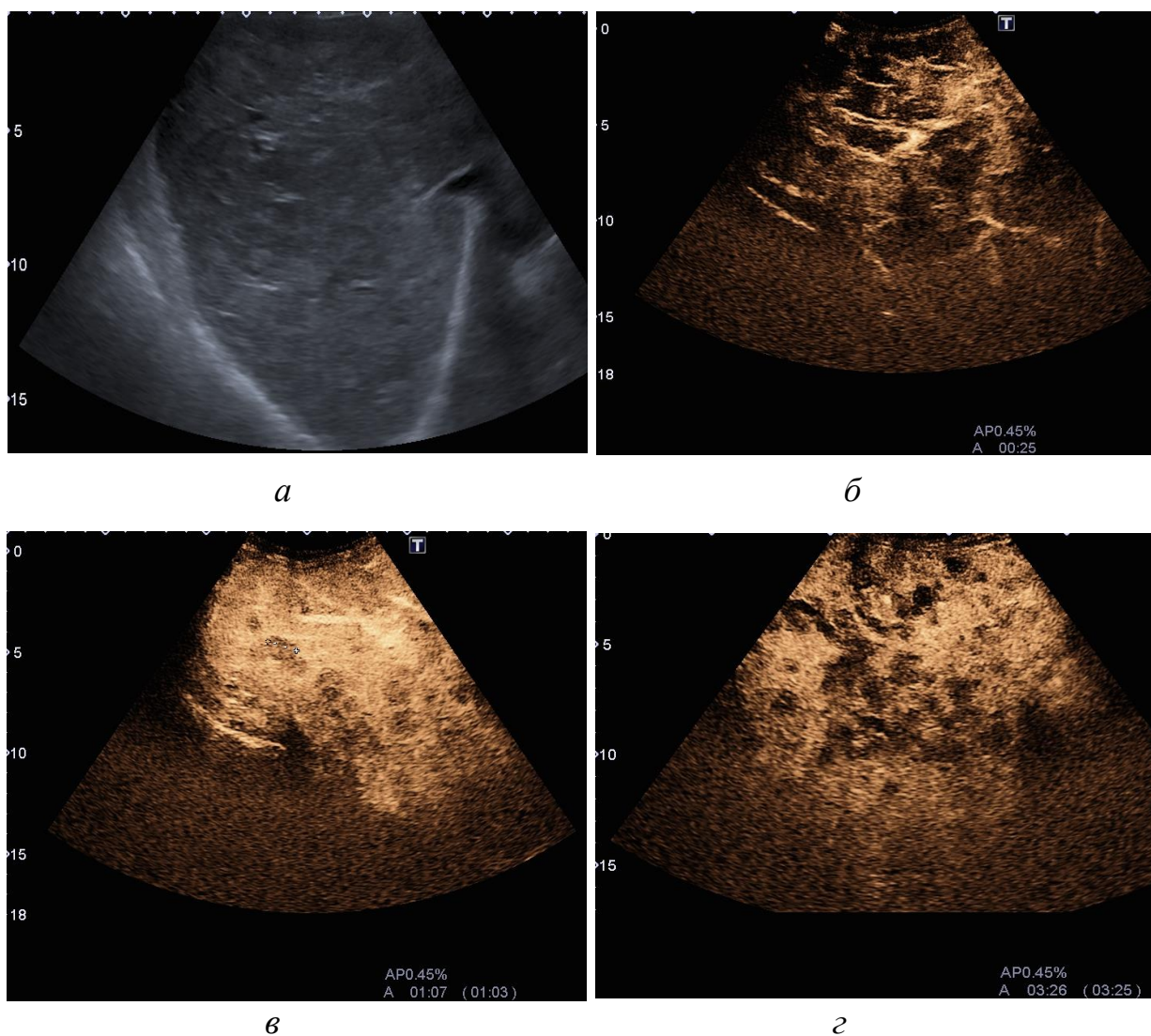


Рисунок 9 – Эхограммы множественных гиповаскулярных метастазов печени в В-режиме (*а*) и после КУ в артериальную (*б*), портальную (*в*), позднюю (*г*) фазы исследований: *а* – множественные изоэхогенные образования; *б* – артериальная фаза (00:25) – множественные гипозоногенные участки неправильной формы на фоне поступления контрастного вещества; *в* – портальная фаза (01:03) – множественные гипозоногенные округлые образования на фоне повышенной контрастности печени; *г* – поздняя фаза (03:26) – множественные гипозоногенные округлые очаги на фоне снижения контрастности печени

У 2 пациентов в артериальную фазу (10–35 с) выявлено усиление контрастирования очагового образования малых размеров (до 2 см) на фоне более низкой контрастности окружающей паренхимы. В портальную фазу (35–120 с) отмечалось снижение степени контрастности очагового

образования и нарастание контрастности окружающей паренхимы. В позднюю фазу (более 120 с) контрастное усиление очагового образования сохранялось высоким, контрастность окружающей паренхимы снижалась. Данная картина соответствует гемангиомам (рисунок 10).

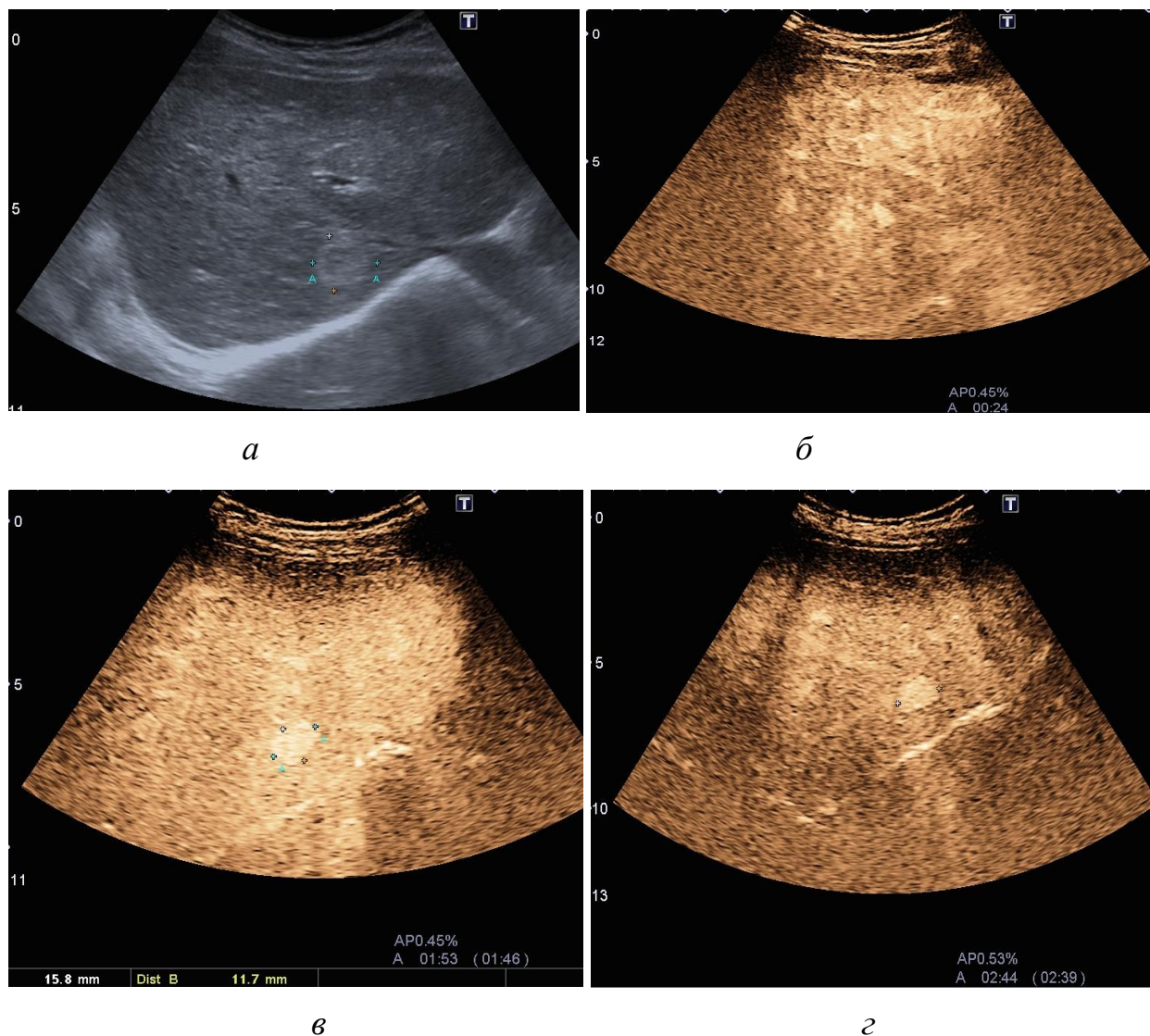


Рисунок 10 – Эхограммы гемангиомы печени в В-режиме (а) и при КУ в артериальную (б), портальную (в), позднюю (г) фазы исследования:
 а – изоэхогенное образование округлой формы в сегменте S1;
 б – артериальная фаза (0:24) – нарастание контрастности очагового округлого образования в сегменте S1; в – портальная фаза (01:53) – очаговое округлое образование высокой контрастности в сегменте S1 на фоне более низкой контрастности печени; г – поздняя фаза (2:44) – сохранение высокой контрастности очагового образования в сегменте S1 на фоне снижающейся контрастности печени

У 2 пациентов в артериальную фазу (10–35 с) определялись анэхогенные образования малых размеров (до 2 см) на фоне нарастающей контрастности печени. В портальную (35–120 с) и позднюю (более 120 с) фазы анэхогенные образования сохраняли свою эхогенность и не контрастировались. Данная картина соответствует кистам (рисунок 11).

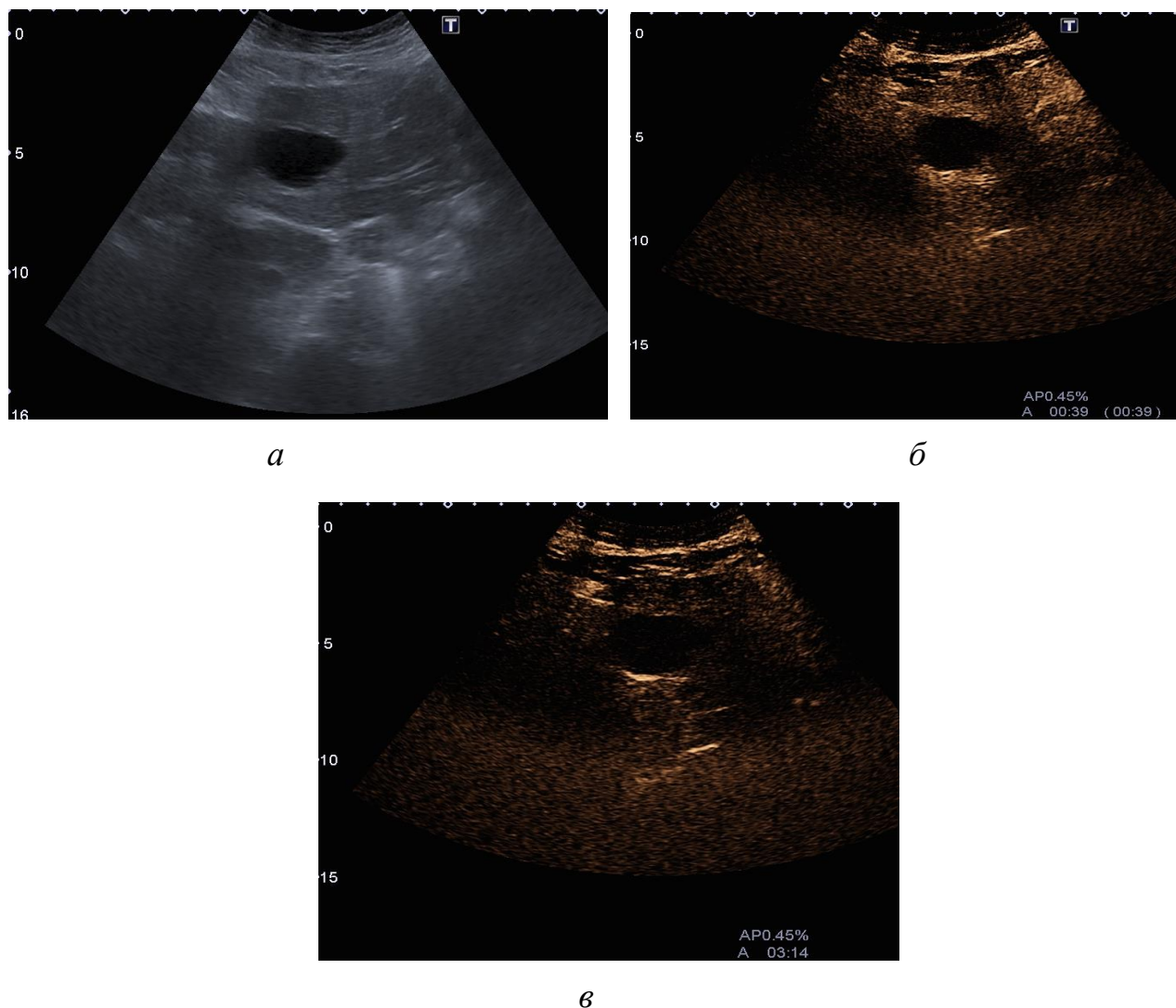


Рисунок 11 – Эхограммы кисты печени в В-режиме (*а*) и при КУ в артериальную (*б*) и позднюю (*в*) фазы исследования:
а – анэхогенное образование в левой доле с нечетким внутренним контуром;
б – артериальная фаза (0:39) – неконтрастное округлое образование в левой доле с четким внутренним контуром на фоне поступления контрастного препарата;
в – поздняя фаза (3:14) – неконтрастное округлое образование в левой доле с четким внутренним контуром на фоне снижения контрастности печени

У одного пациента в артериальную фазу (10–35 с) выявлено изоэхогенное образование с гипоехогенным ободком средним размером до 3 см, которое контрастировалось аналогично окружающей паренхиме. В портальную фазу (35–120 с) образование плохо визуализировалось, эхогенность его и окружающей паренхимы была высокой. В позднюю фазу (более 120 с) контрастность образования увеличилась за счет более медленного вымывания из центра к периферии. Данная картина соответствует фибронодулярной гиперплазии (рисунок 12).

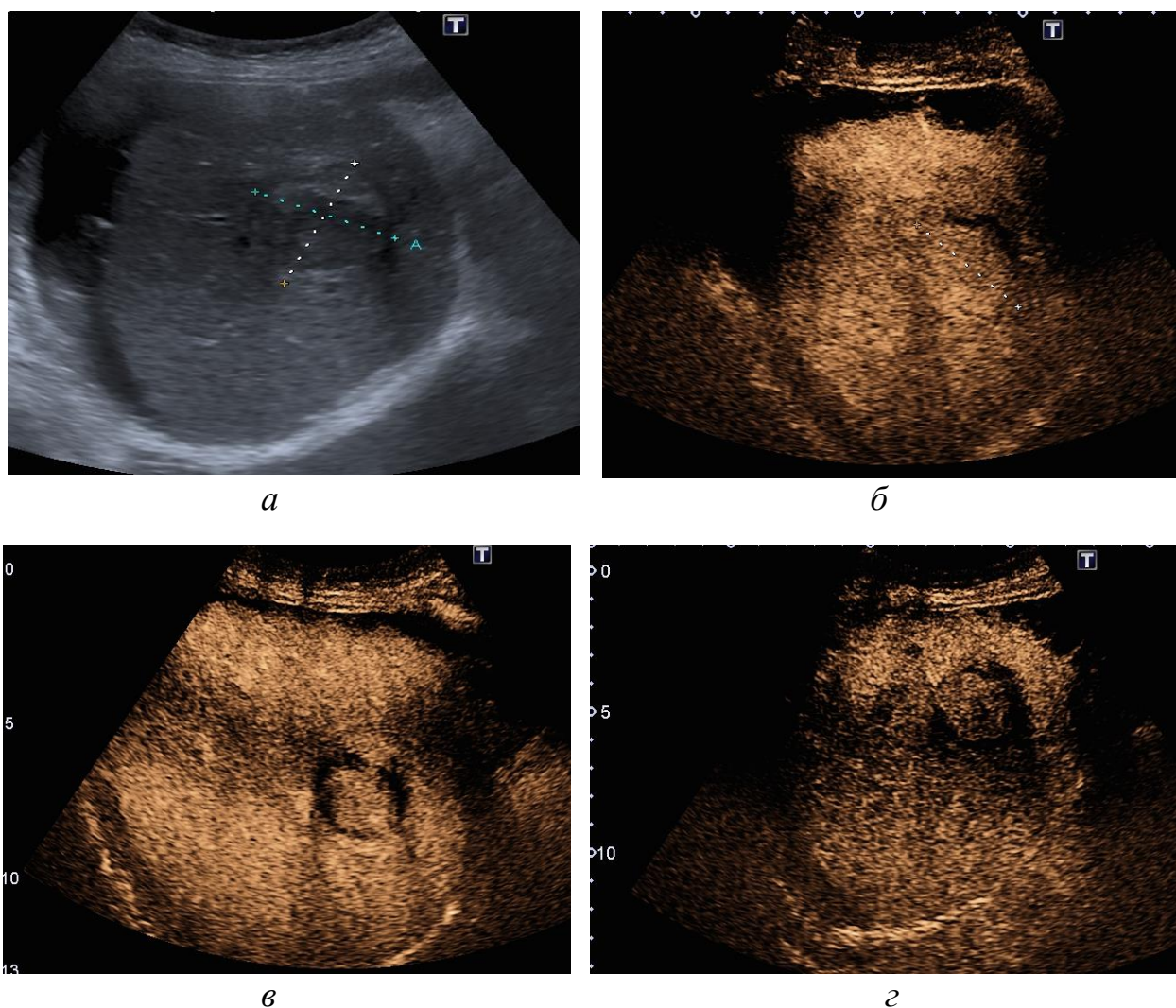


Рисунок 12 – Эхограммы фибронодулярной гиперплазии печени в В-режиме (а) и при КУ в артериальную (б), портальную (в), позднюю (г) фазы исследования: а – изоэхогенное образование с неровными контурами и неоднородной структурой; б – артериальная фаза (0:30) – нарастание контрастности очагового образования и печени; в – портальная фаза (01:10) –

формирование в очаге участка повышенной контрастности – «рубца», по периферии неконтрастного ободка; 2 – поздняя фаза (3:20) – снижение контрастности очага и печени

Таким образом, в ходе исследования у 19 пациентов независимо от первичного очага при введении ЭКП были выявлены метастазы, у 3 пациентов не видимые при нативном исследовании. У всех метастазов получена идентичная УЗ-картина низкой эхогенности в портальную (35–120 с) и позднюю (более 120 с) фазы. Это обусловлено особенностями строения сосудистой стенки, для которой характерны хаотичность, незавершенность формирования слоев, наличие множества анастомозов, артериовенозных шунтов. Контур метастазов при введении ЭКП на основе гексафторида серы сохранили неровный и приобрели более четкий вид. Структура визуализировалась значительно лучше, у большинства имела неоднородный характер (см. рисунок 9).

Доброкачественные образования при введении ЭКП на основе гексафторида серы визуализировались у 5 пациентов (см. таблицу 3).

Мы провели сравнение полученных результатов нативного и постконтрастного УЗИ (таблица 4).

При сравнении В-режима и режима КУ с применением препарата на основе гексафторида серы по количеству выявленных пациентов с метастатическим поражением статистически значимое различие получено не было ($p=0,874$). Это связано с тем, что все образования, выявленные в В-режиме, подозревались нами как метастазы. Использование КУ позволило обнаружить значимо большее количество пациентов с образованиями средних размеров – до 30 мм ($p=0,053$), а также пациентов с образованиями в количестве больше 3 ($p=0,041$), что позволяет говорить об установлении преобладания множественных образований до 30 мм в исследуемой группе. Также нам удалось выявить дополнительные образования малых размеров, не видимые при нативном исследовании (см. таблицу 4).

Таблица 4 – Сравнение показателей нативного и постконтрастного УЗИ

Характеристика		В-режим	КУ	p
Эхогенность образований	гиперэхогенные	4/35	2/35	0,720
	гипоэхогенные	3/35	19/35	0,005
	изоэхогенные	14/35	1/35	0,005
	анэхогенные	0/35	2/35	0,498
	всего	21/35	24/35	0,874
Дополнительные очаги	2–5 мм	0/35	5/35	0,088
Размеры образований	до 30 мм	8/35	20/35	0,053
	более 30 мм	13/35	4/35	0,089
Количество образований	не более 3	13/35	3/35	0,059
	более 3	8/35	21/35	0,041
Метастатическое поражение		16/35	19/35	0,835
Доброкачественные образования		0/35	5/35	0,088
Выявлены только с ЭКП		0/35	3/35	0,268
Количество пациентов с выявленными метастазами при МРТ		20/35		

В результате сопоставления УЗ-картины печени у больных при нативном исследовании с данными МРТ с контрастным веществом (как референтного метода) было получено 16 ИП, 5 ЛП, 10 ИО, 4 ЛО результатов. При сопоставлении данных УЗИ с КУ и МРТ с контрастным веществом получено 19 ИП, 1 ЛП, 14 ИО, 1 ЛО результата. Чувствительность, специфичность, диагностическая точность, прогностическая ценность положительного результата и прогностическая ценность отрицательного результата составили при нативном исследовании соответственно 80, 66, 73, 76 и 71%, при КУ соответственно 95, 93, 94, 95 и 93% (таблица 5).

Введение ЭКП повысило чувствительность, специфичность, диагностическую точность, прогностическую ценность положительного результата и прогностическую ценность отрицательного результата УЗИ в выявлении метастатического поражения печени на 17, 26, 21, 14 и 29% соответственно.

Таблица 5 – Характеристика диагностической эффективности УЗИ при нативном исследовании и КУ

Методы исследования	Показатели диагностической эффективности, %				
	Se	Sp	De	PV+	PV-
УЗИ в В-режиме	80	66	73	76	71
УЗИ с ЭКП на основе гексафторида серы	95	93	94	95	93

3.2 Результаты экспериментальных исследований

Экспериментальные исследования проводились в стационарной системе и на животных (крысы, свиньи, кролики).

В ходе ультразвукового исследования отечественного ЭКП в стационарной системе была получена гомогенная, мелкодисперсная суспензия повышенной эхогенности – медиана показателя интенсивности эхогенности составила 90%, эффект контрастного усиления сохранялся на протяжении 3–4 мин с последующим снижением. В качестве сравнения использовали смесь воды и атмосферного воздуха, полученную взбалтыванием в контейнере, время контрастирования составило 1–1,5 мин.

3.2.1 Исследование в эксперименте с 1-й группой животных (белые беспородные крысы без очагового поражения печени)

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости без введения ЭКП у экспериментальных животных 1-й группы на эхограммах визуализировалась изоэхогенная паренхима печени, однородная по структуре, трабекулярные структуры в виде сосудов были представлены до 2-го порядка. Медиана показателя интенсивности эхогенности составляла 69% (рисунок 13). При внутривенном введении ЭКП эхогенность ткани печени повышалась, появлялась детализация трабекулярных структур до 3–4-го порядка за счет визуализации сосудов мелкого калибра, медиана показателя интенсивности эхогенности составляла 89% (рисунок 14). Общее время контрастирования составило 3 мин. Полученный эффект появлялся за

счет усиления рассеивания ультразвуковых волн при их отражении от микропузырьков гексафторида серы, стабилизированных фосфолипидами, опосредованного возрастания силы обратного акустического сигнала и его фиксации.

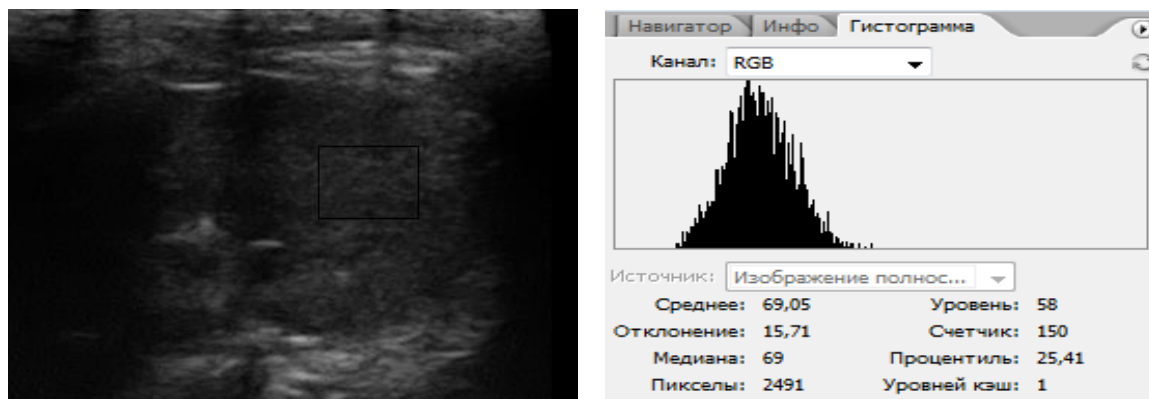


Рисунок 13 – Эхограмма ткани печени крысы до введения эхоконтрастного препарата

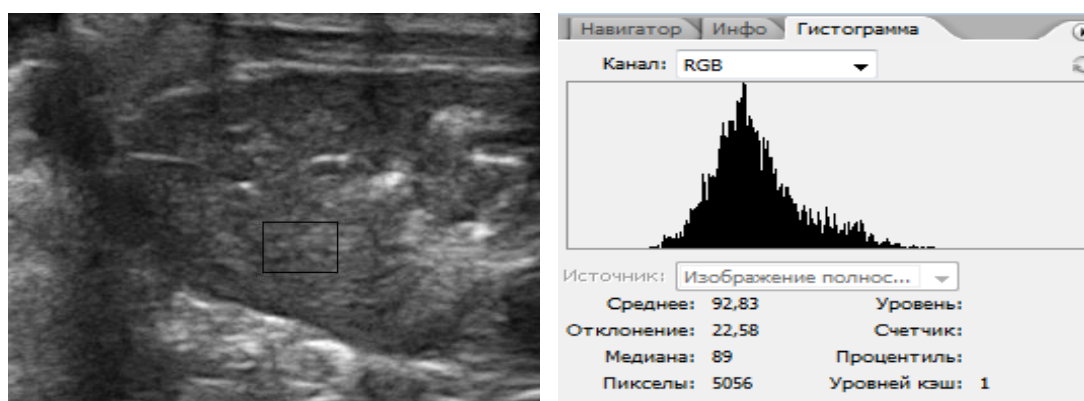


Рисунок 14 – Эхограмма ткани печени крысы после введения эхоконтрастного препарата

3.2.2 Исследование в эксперименте со 2-й группой животных (белые беспородные крысы с очаговым поражением печени)

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости у животных 2-й группы без введения ЭКП на эхограммах печени визуализировались очаговые образования в виде гиперэхогенных структур (инородные тела) с гипоехогенным ободком по периметру толщиной 1–2 мм, контуры очаговых образований ровные, нечеткие. Медиана показателя

интенсивности эхогенности составляла 66% (рисунок 15). При внутривенном введении ЭКП на эхограмме отмечалось повышение эхогенности паренхимы печени, структура ткани приобретала зернистый характер, медиана показателя интенсивности эхогенности составляла 102%. Общее время контрастирования составило в среднем 3 мин 40 с. Очаговые образования визуализировались как гиперэхогенные структуры (инородные тела) с анэхогенной зоной по периметру толщиной до 1 мм (жидкость), за которой следовала зона сниженной эхогенности толщиной до 3 мм (зона отека). Контур приобретал ровный и четкий характер, повышалась контрастность образований (рисунок 16).

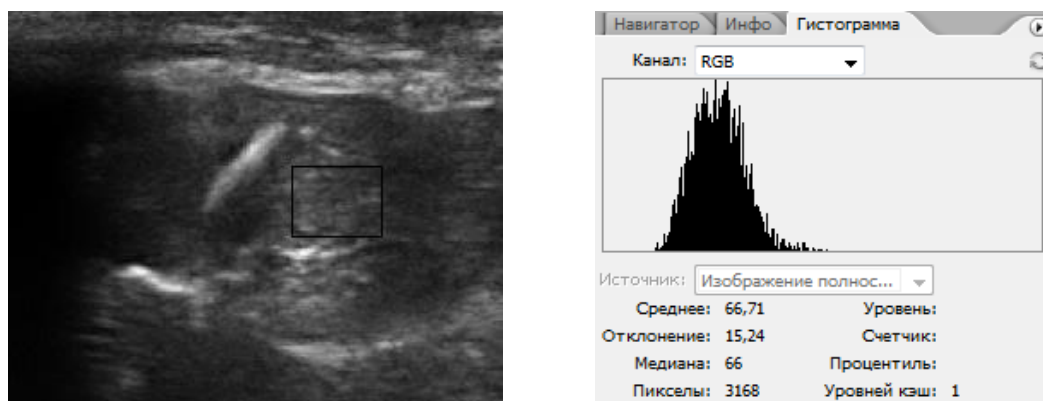


Рисунок 15 – Эхограмма ткани печени крысы до введения эхоконтрастного препарата

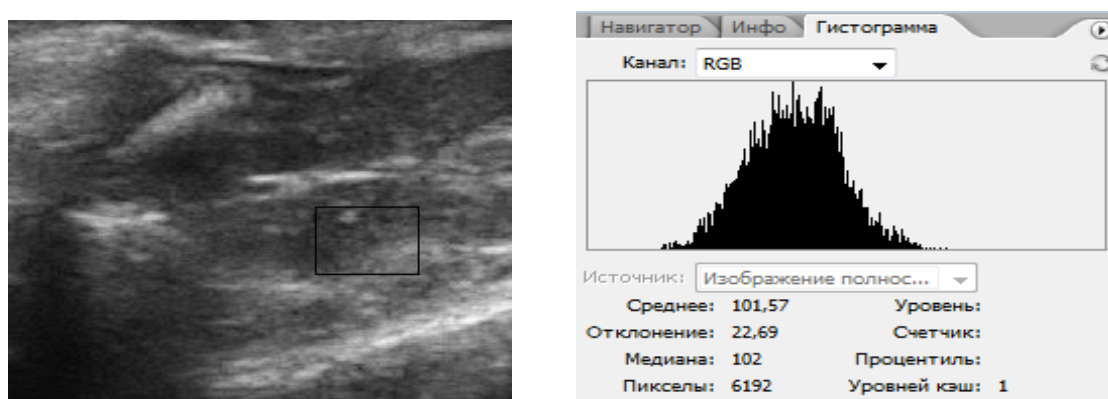


Рисунок 16 – Эхограмма ткани печени крысы после введения эхоконтрастного препарата

3.2.3 Исследование в эксперименте с 3-й группой животных (свиньи с очаговым поражением печени)

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости у животных 3-й группы без введения ЭКП на эхограммах печени визуализировались два очаговых образования. Первые представляли собой анэхогенные структуры диаметром 2–2,5 см, шаровидной формы (силиконовые шарики, заполненный физ.раствором), с однородным содержимым, на глубине 3–3,5 см, с ровными нечеткими контурами и хорошей контрастностью. Вторые образования, расположенное на глубине 1–2 см, были практически изоэхогенными, неоднородными по структуре, с неровными нечеткими контурами и плохой дифференцировкой от окружающей паренхимы, с низкой контрастностью. По периметру образований визуализировалась гипоэхогенная зона толщиной до 2 мм. Исходная медиана показателя интенсивности эхогенности составляла 63% (рисунок 17). После введения ЭКП на эхограммах отмечалось повышение эхогенности паренхимы печени. Улучшалась детализация внутренней структуры очагов. Границы приобретали более четкий и ровный характер. Повышалась контрастность визуализации образований. Медиана показателя интенсивности эхогенности составляла 99%. Общее время контрастирования составило в среднем 4 мин (рисунок 18). Первые образования визуализировались как анэхогенные структуры диаметром 2–2,5 см, шаровидной формы, с однородным содержимым, с ровными, четкими контурами и высокой контрастностью. Вторые образования визуализировались как неоднородные изоэхогенные структуры с жидкостным компонентом. Контур образований становились более четкими, контрастность более высокой.

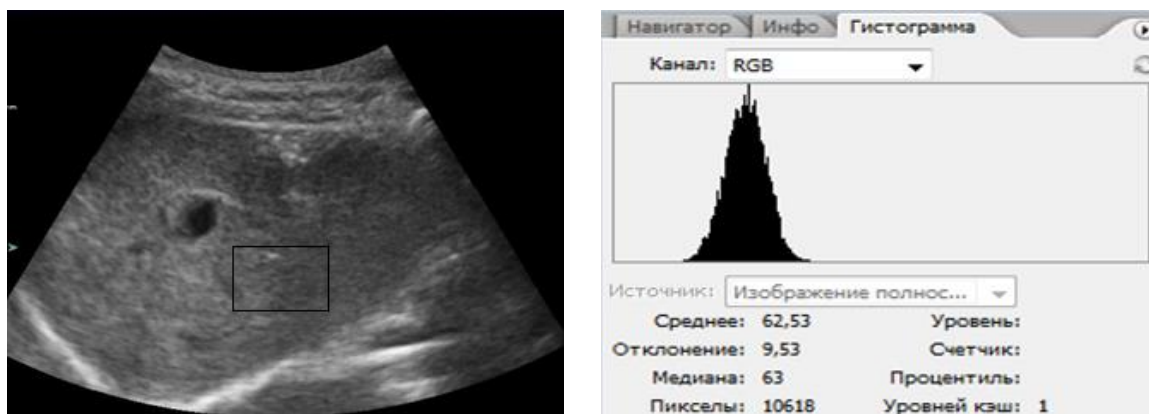


Рисунок 17 – Эхограмма ткани печени свиньи
до введения эхоконтрастного препарата



Рисунок 18 – Эхограмма ткани печени свиньи
после введения эхоконтрастного препарата

3.2.4 Исследование в эксперименте с 4-й группой животных (кролики без очагового поражения печени)

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости у животных 4-й группы без введения ЭКП проводили в В-режиме, исследование с отечественным ЭКП выполняли с использованием опции Contrast Harmonic Imaging. В В-режиме на эхограммах визуализировалась изоэхогенная паренхима печени, однородная по структуре, трабекулярные структуры в виде сосудов прослеживались до 2-го порядка (рисунок 19). После введения ЭКП на эхограммах с 4-й с отмечалось проявление сосудистого рисунка по мере поступления контрастного вещества с постепенным повышением

эхогенности паренхимы, максимальный эффект достигал к 20-й с (рисунки 20–22). Общее время контрастирования отечественного ЭКП составило в среднем 3 мин 30 с. В ходе исследования визуализировались все три фазы (артериальная, портальная, поздняя).

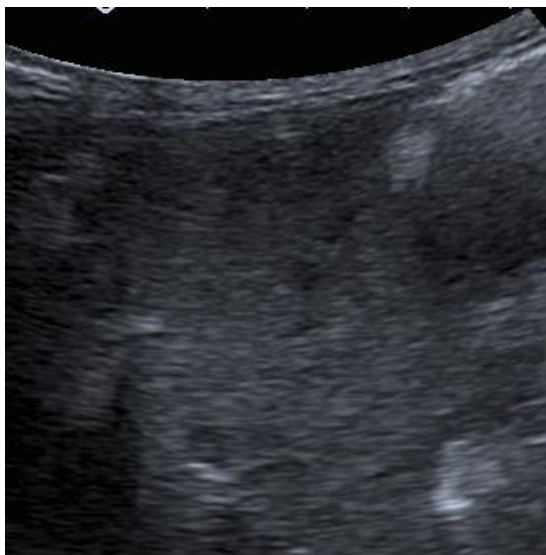


Рисунок 19 – Эхограмма ткани печени кролика до введения эхоконтрастного препарата



Рисунок 20 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, артериальная фаза (15 с)



Рисунок 21 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, портальная фаза (50 с)



Рисунок 22 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, поздняя фаза (210 с)

3.2.5 Исследование в эксперименте с 5-й группой животных (кролики с очаговым поражением печени)

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости у животных 5-й группы без введения ЭКП проводили в В-режиме, исследование с ЭКП выполняли с использованием опции Contrast Harmonic Imaging. В В-режиме на эхограммах печени визуализировались изоэхогенные образования размером 22–35 мм с тонким гипоэхогенным ободком, с умеренно разнородной структурой, с неровными и нечеткими контурами (рисунок 23). После введения ЭКП на эхограммах отмечалось повышение эхогенности паренхимы печени. Очаговые образования размером 15–31 мм визуализировались гипоэхогенными на протяжении всех фаз контрастирования (артериальной, портальной, поздней) на фоне повышающейся и снижающейся эхогенности печени. По периферии образований визуализировался гиперэхогенный ободок, зона грануляции. Контуры образований приобретали более четкий характер, контрастность образования повышалась (рисунки 24–26). Общее время контрастирования составило в среднем 3 мин 10 с.

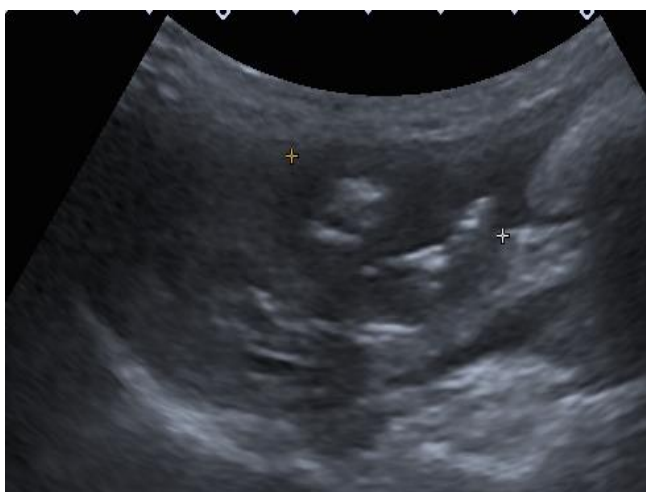


Рисунок 23 – Эхограмма ткани печени кролика до введения эхоконтрастного препарата

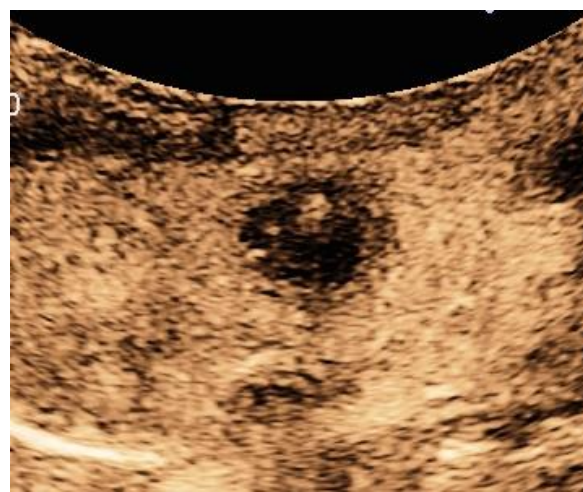


Рисунок 24 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, артериальная фаза (15 с)



Рисунок 25 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, портальная фаза (50 с)



Рисунок 26 – Эхограмма ткани печени кролика после введения эхоконтрастного препарата, поздняя фаза (210 с)

В ходе исследования при введении ЭКП у всех животных отмечалось повышение эхогенности паренхимы. Момент контрастирования регистрировался с 4-й с, достигая максимального эффекта к 20-й с. Общее время контрастирования составило 3–4 мин. Очаговые образования при контрастировании визуализировались как гипо- и анэхогенные, значительно улучшалась визуализация внутренней структуры, контуры прослеживались более четко, повышалась контрастность визуализации, размеры становились более точными.

В результате оценки изменения интенсивности эхогенности ткани печени после введения ЭКП у 3 групп животных (крысы, свиньи) мы получили статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение интенсивности эхогенности от 24 до 37 % (рисунок 27). У групп 4 и 5 (кролики) при использовании опции Contrast Garmonic Imaging после введения ЭКП был зарегистрирован факт контрастного усиления. Эффект контрастирования фиксировался с 4-й с и достигал максимума к 20-й с. Общее время контрастирования составило 3–4 мин (рисунок 28). Введение отечественного ЭКП животным с очаговыми поражениями печени позволило улучшить визуализацию очаговых образований, особенно изоэхогенной природы,

детализировать внутреннюю структуру, четко определить границы задействованных в процесс воспаления тканей.

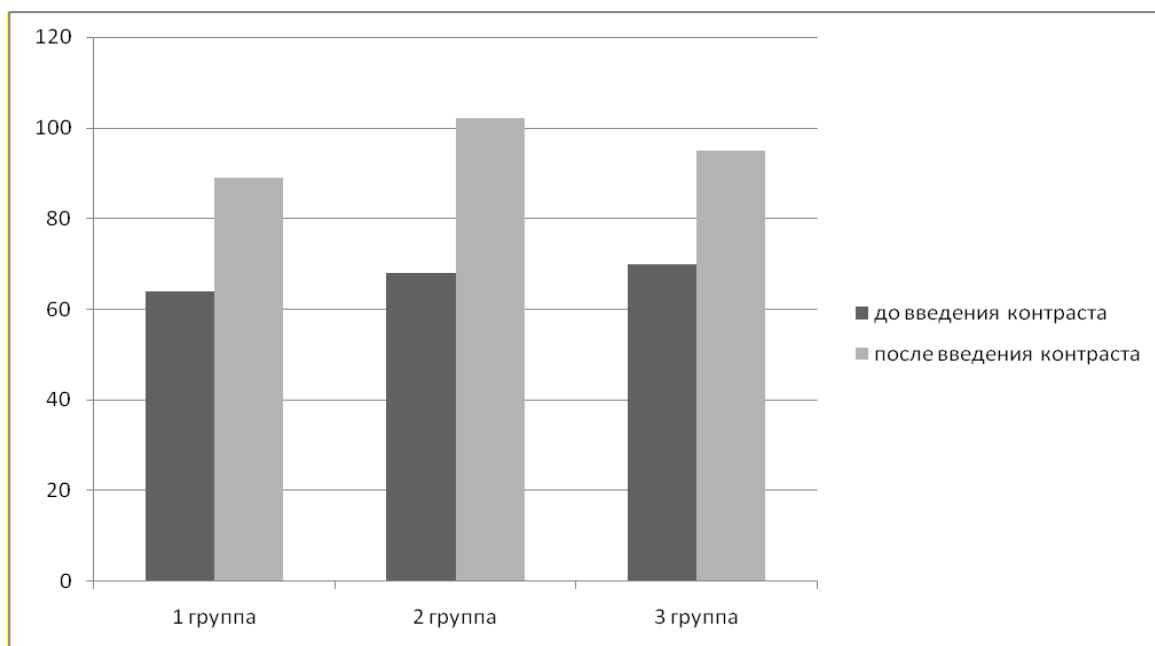


Рисунок 27 – Изменение интенсивности эхогенности паренхимы печени с введением эхоконтрастного препарата



Рисунок 28 – Изменение интенсивности эхогенности паренхимы печени с введением эхоконтрастного препарата

3.3 Результаты гистологических исследований

При гистологическом исследовании очаговых поражений у всех животных на 7-е сутки отмечалось резкое расширение синусоидных капилляров с единичными эритроцитами в участках, удаленных от очага воздействия. Вблизи очага воздействия синусоидные капилляры гиперемированы. Гепатоциты в состоянии гидропической дистрофии. Портальные отделы долек, примыкающих к очагу поражения, инфильтрированы сегментоядерными клетками. На 14-е сутки в зоне поражения определялись поля некротизированных гепатоцитов, инфильтрация сегментоядерными клетками, участки фиброза и общего отека. Четко определялась граница зоны некроза и прилежащих участков паренхимы. В пограничной области отмечались скопления фибробластоподобных клеток и участки фиброза (рисунок 29).

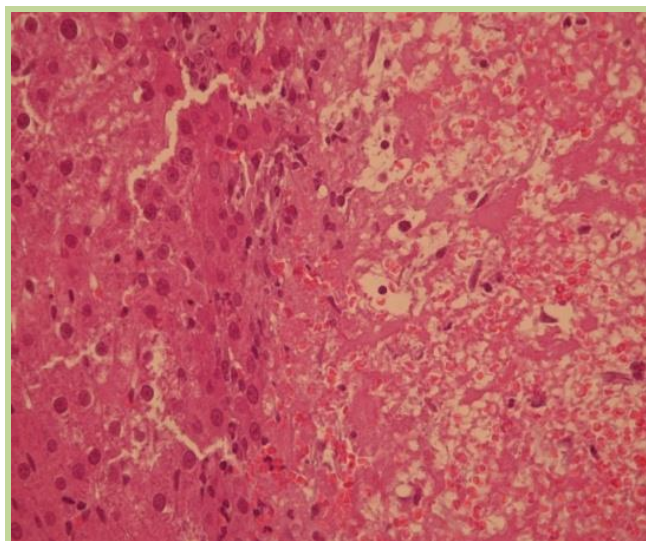


Рисунок 29 – Пограничный участок.
Четко определяется граница зоны некроза
и прилежащих участков паренхимы
(окраска гематоксилином и эозином)

3.4 Результаты исследований фармакокинетики

3.4.1 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после однократного внутривенного введения в эффективной дозе

Результаты определения концентрации лекарственного средства в плазме крови кроликов после однократного внутривенного введения представлены в таблице 6, его фармакокинетика – в таблице 7.

Таблица 6 – Концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

№№	Время, ч						
	0,050	0,083	0,167	0,250	0,333	0,500	0,750
1	184,304	64,386	20,643	4,370	0,000	0,000	0,000
2	181,880	64,963	21,220	4,600	0,000	0,000	0,000
3	180,841	67,272	21,913	4,370	0,000	0,000	0,000
4	180,751	62,850	20,880	4,280	0,000	0,000	0,000
5	178,143	68,120	21,320	4,550	0,000	0,000	0,000
6	179,093	64,650	21,870	4,170	0,000	0,000	0,000
Mean	180,84	65,37	21,31	4,39	0,00	0,00	0,00
SD	2,16	1,96	0,51	0,16	0,00	0,00	0,00
CV%	1,17	3,04	2,48	3,71			

Таблица 7 – Параметры фармакокинетики гексафторида серы у кроликов после внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

№№	C ₀ , нл/мл	AUC _{0-∞} , нл·ч/мл	V _d , мл/кг	CL, мл/(кг·ч)	MRT, мин	k _{el} , ч ⁻¹	T _{1/2} , мин
1	369,53	22,76	10,82	175,76	3,38	17,76	2,34
2	361,2	22,55	11,07	177,39	3,44	17,45	2,38
3	375,22	23,03	10,66	173,69	3,39	17,71	2,35
4	362,57	22,36	11,03	178,90	3,39	17,71	2,35
5	366,91	22,72	10,90	176,02	3,42	17,53	2,37
6	370,99	22,68	10,78	176,38	3,37	17,81	2,33
Mean	367,74	22,68	10,88	176,36	3,40	17,66	2,35
SD	5,29	0,22	0,16	1,74	0,03	0,14	0,02
CV%	1,43	0,98	1,44	0,99	0,80	0,79	0,80

При изучении фармакокинетического профиля ГС была обнаружена одна фаза снижения концентрации вещества. Концентрация ГС равномерно снижалась до минимально определяемого уровня в течение 10–15 мин. Полупериод элиминации составил 2,35 мин.

Величина кажущегося объема распределения центральной камеры составляла около 10 мл на 1 кг массы тела животных, что немного меньше значения объема плазмы крови кроликов.

Значение среднего времени удерживания MRT (3,4 мин) свидетельствует о быстром выведении его из организма.

3.4.2 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в эффективной дозе

Результаты оценки концентраций ГС в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения приведены в таблице 8 и на рисунке 30, его фармакокинетика – в таблице 9.

Таблица 8 – Концентрации гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного болюсного внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

№№	Время, ч							
	0,050	0,083	0,1667	0,25	0,333	0,5	0,75	1
1	9,82	5,61	3,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	9,65	5,63	3,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	9,85	5,81	3,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	10,00	5,48	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	9,62	5,38	3,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	9,57	5,53	3,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mean	9,75	5,58	3,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SD	0,16	0,15	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CV%	1,67	2,60	1,73					

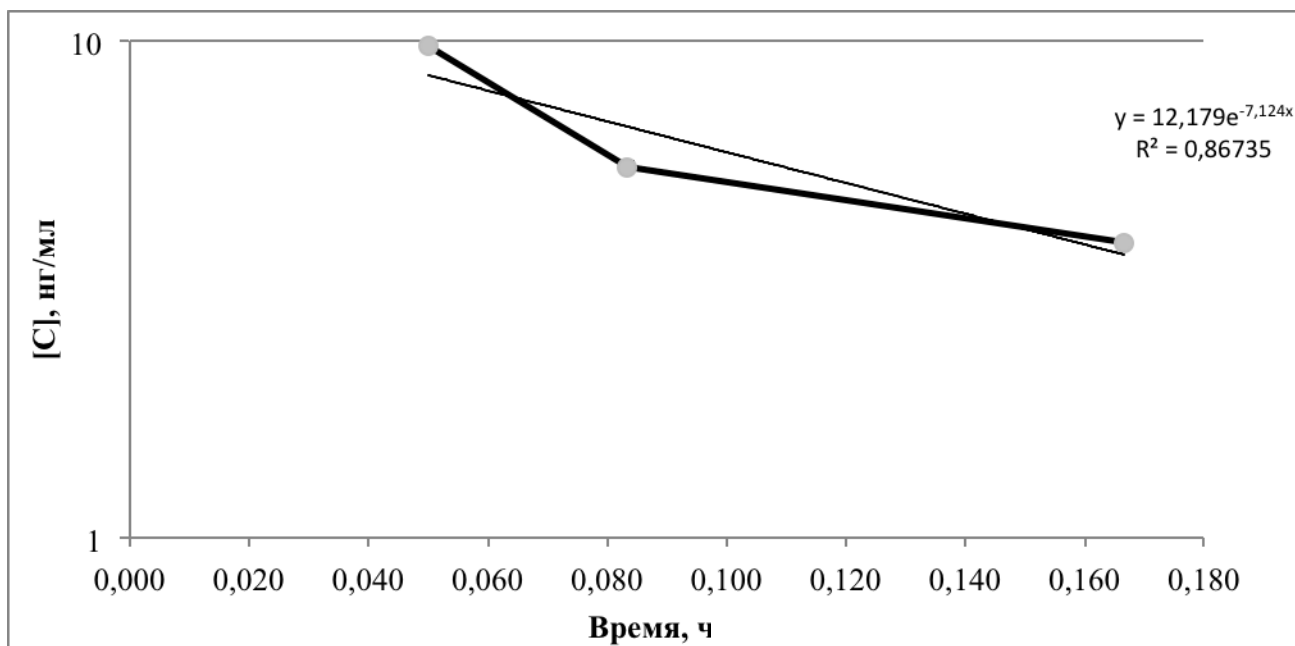


Рисунок 30 – Усредненный фармакокинетический профиль гексафторида серы в плазме крови крыс после однократного внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

Таблица 9 – Параметры фармакокинетики гексафторида серы у крыс после внутривенного введения в дозе 15 мкл/кг

№№	C ₀ , нл/мл	AUC _{0-t} , нл·ч/мл	V _d , мл/кг	CL, мл/(кг·ч)	MRT, мин	k _{el} , ч ⁻¹	T _{1/2} , мин
Mean	12,18	1,36	1231,63	11007,38	8,42	7,12	5,84

При изучении фармакокинетического профиля ГС в плазме крови крыс также была обнаружена одна фаза снижения концентрации вещества, в течение 10 мин происходило резкое снижение концентрации ГС. Полупериод элиминации составил 5,8 мин. Значение среднего времени удерживания MRT 8,42 мин свидетельствует о быстром выведении его из организма.

3.4.3 Оценка концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после многократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

Оценку возможной кумуляции лекарственного средства проводили на модели многократного (7 раз) введения препарата кроликам в дозе 4 мкл/кг с интервалом 24 часа. После седьмого введения препарата оценивали его концентрацию в плазме крови животных и рассчитывали фармакокинетические параметры. Результаты количественной оценки концентрации препарата в плазме крови кроликов после однократного введения представлены в таблице 6, а при курсовом введении (7 дней) – в таблице 10. Усредненные фармакокинетические кривые лекарственного средства при однократном и многократном введении показаны на рисунке 31. Фармакокинетические параметры после однократного введения препарата представлены в таблице 7, а после многократного – в таблице 11. Статистически значимых различий между фармакокинетическими параметрами после однократного и многократного введения не выявлено.

Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии эффекта кумуляции лекарственного средства при многократном введении.

Таблица 10 – Концентрации гексафторида серы в плазме крови кроликов после многократного болюсного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

№№	Время, ч						
	0,050	0,083	0,167	0,250	0,333	0,500	0,750
1	178,508	63,464	21,247	4,530	0,000	0,000	0,000
2	184,770	70,063	20,242	4,696	0,000	0,000	0,000
3	179,341	67,721	20,510	4,086	0,000	0,000	0,000
4	181,889	66,419	20,952	4,369	0,000	0,000	0,000
5	180,288	68,310	20,971	4,283	0,000	0,000	0,000
6	179,579	61,519	20,428	4,464	0,000	0,000	0,000
Mean	180,73	66,25	20,72	4,40	0,00	0,00	0,00
SD	2,28	3,20	0,39	0,21	0,00	0,00	0,00
CV%	1,28	5,04	1,83	4,65			

Таблица 11 – Параметры фармакокинетики гексафторида серы в плазме крови кроликов после многократного болюсного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг

№№	C ₀ , нг/мл	AUC _{0-∞} , нг·ч/мл	V _d , мл/кг	CL, мл/(кг·ч)	MRT, мин	k _{el} , ч ⁻¹	T _{1/2} , мин
1	353,72	22,13	11,31	180,74	3,45	17,40	2,39
2	376,72	23,28	10,62	171,81	3,40	17,64	2,36
3	382,12	23,03	10,47	173,72	3,32	18,09	2,30
4	372,79	22,88	10,73	174,80	3,38	17,76	2,34
5	379,17	23,08	10,55	173,31	3,36	17,88	2,33
6	350,03	21,90	11,43	182,68	3,43	17,47	2,38
Mean	369,09	22,72	10,85	176,18	3,39	17,71	2,35
SD	13,73	0,56	0,41	4,44	0,05	0,26	0,03
CV%	3,88	2,55	3,64	2,45	1,43	1,49	1,43

Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови кроликов после многократного внутривенного введения в дозе 4 мкл/кг представлен на рисунке 31.

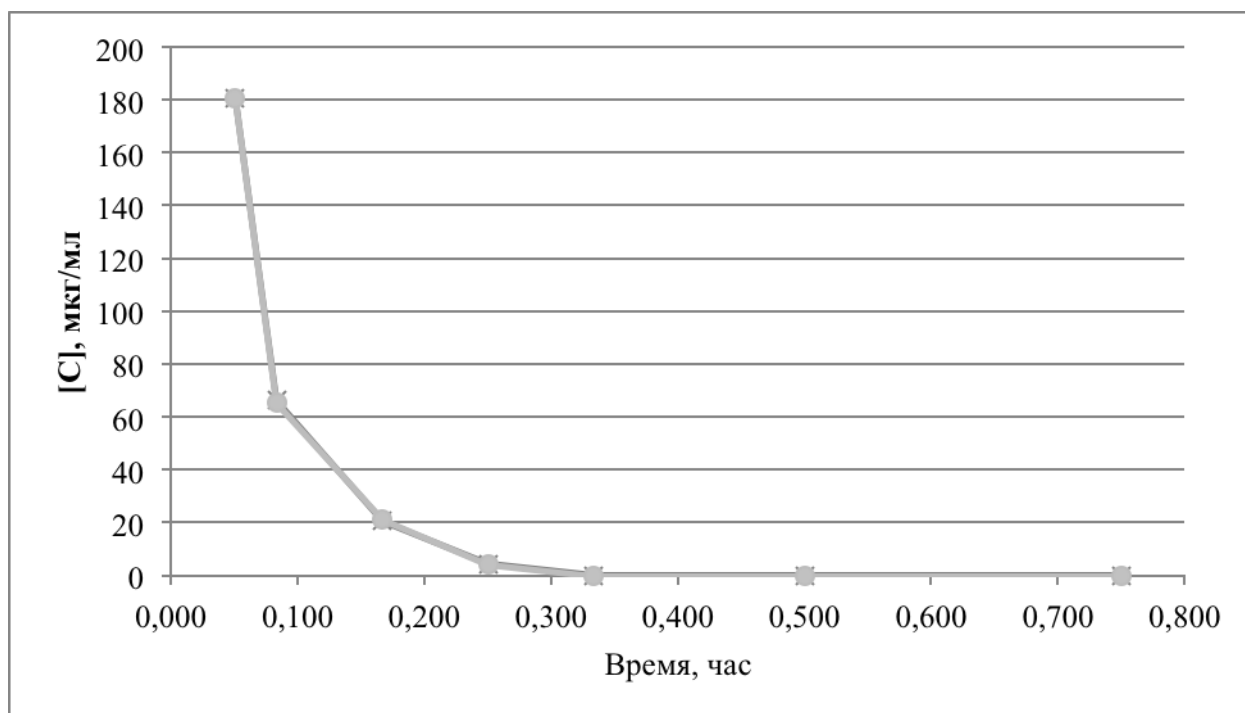


Рисунок 31 – Усредненный фармакокинетический профиль лекарственного средства в плазме крови кроликов после многократного внутривенного введения гексафторида серы в дозе 4 мкл/кг

3.5 Результаты исследований безопасности лекарственного средства

Проведено исследование острой и хронической токсичности с оценкой местно-раздражающего действия ЛС на основе гексафторида серы при внутрибрюшинном и внутривенном введении самцам и самкам мышей CD-1, внутрибрюшинном введении аутбредным крысам CD и внутривенном введении кроликам в течение 60 дней.

3.5.1 Результаты исследования острой токсичности

Изучение острой токсичности было проведено на 70 мышах CD-1 и 70 аутбредных крысах CD, на самцах и самках отдельно. Использовались два пути введения (внутрибрюшинный и внутривенный) и следующие дозы: для мышей при внутрибрюшинном введении – 10, 20, 40 мл/кг, при внутривенном введении – 5, 10, 20 мл/кг; для крыс при внутрибрюшинном введении – 6, 12,5, 25 мл/кг, при внутривенном введении – 2,5, 5, 10 мл/кг. В результате было показано, что ЛС на основе гексафторида серы в максимально допустимом для данного пути введения объеме не приводит к гибели и не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении за ними в течение 14 дней.

Введение ЛС крысам и мышам в максимально возможном объеме не привело к гибели животных, что не позволило применить пробит-анализ для вычисления ЛД₅₀. Макроскопическое исследование при вскрытии всех выживших животных на 14-е сутки после введения ЛС не выявило какой-либо патологии внутренних органов.

3.5.2 Результаты исследования хронической токсичности

Изучение хронической токсичности проведено на 40 аутбредных крысах CD и 24 кроликах породы шиншилла, самцах и самках отдельно. В эксперименте на крысах были исследованы терапевтическая доза (0,5 мл/кг)

и дозы, в 5 (2,5 мл/кг) и 10 (5,0 мл/кг) раз превышающие терапевтическую, при внутрибрюшинном введении в течение 60 дней. На кроликах были исследованы терапевтическая доза (0,25 мл/кг) и доза, в 5 (1,25 мл/кг) раз превышающая терапевтическую, при внутривенном введении в течение 60 дней.

По результатам изучения хронической токсичности ЛС на основе гексафторида серы при введении крысам и кроликам в указанных дозах в течение 60 дней не отмечено гибели животных и каких-либо патологических изменений их общего состояния, динамики общей массы тела и функциональной активности изученных внутренних органов и систем. Клиническое наблюдение за животными не выявило каких-либо патологических признаков в течение всего периода наблюдений.

Анализ результатов проведенного исследования показателей периферической крови у крыс-самцов и крыс-самок на 60-й день внутрибрюшинного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы в изученных дозах не выявил изменений этих показателей в экспериментальных группах по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах (таблицы 12, 13).

Таблица 12 – Состояние периферической крови крыс-самцов через 60 дней введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5 мл/кг	Контроль
Эритроциты, Т/л	10,0 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 0,3
Общее количество лейкоцитов, Г/л	15,1 $\pm$ 1,1	12,7 $\pm$ 1,4	11,7 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 1,4
Тромбоциты, Г/л	1592 $\pm$ 166	1544 $\pm$ 107	1688 $\pm$ 103	1474 $\pm$ 52
Гемоглобин, г/дл	17,9 $\pm$ 0,8	18,4 $\pm$ 0,9	16,2 $\pm$ 1,4	18,3 $\pm$ 0,4
СОЭ, мм/ч	0,50 $\pm$ 0,32	0,60 $\pm$ 0,40	0,04 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,20
Гематокрит, %	37,7 $\pm$ 1,7	38,8 $\pm$ 2,0	35,0 $\pm$ 3,0	38,3 $\pm$ 0,9

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5 мл/кг	Контроль
Палочкоядерные нейтрофилы, Г/л	0,07±0,04	0,00±0,00	0,03±0,03	0,05±0,04
Сегментоядерные нейтрофилы, Г/л	2,9±0,2	2,8±0,4	2,5±0,2	2,7±0,6
Эозинофилы, Г/л	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,5±0,2
Лимфоциты, Г/л	11,2±1,0	8,8±1,1	8,1±0,6	10,5±1,3
Моноциты, Г/л	0,6±0,2	0,7±0,2	0,8±0,1	0,5±0,2

Таблица 13 – Состояние периферической крови крыс-самок через 60 дней введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $X \pm m$

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5 мл/кг	Контроль
Эритроциты, Т/л	8,6±0,2	8,4±0,4	8,3±0,4	8,5±0,2
Общее количество лейкоцитов, Г/л	7,7±0,7	7,4±1,9	11,4±1,2	9,0±0,6
Тромбоциты, Г/л	1498±145	1751±257	1419±124	1470±153
Гемоглобин, г/дл	16,3±0,4	16,1±0,4	15,8±0,6	16,5±0,2
СОЭ, мм/ч	0,20±0,12	0,40±0,24	0,04±0,02	0,42±0,40
Гематокрит, %	34,5±0,8	31,2±0,6	33,2±1,4	33,3±0,7
Палочкоядерные нейтрофилы, Г/л	0,03±0,02	0,01±0,01	0,07±0,03	0,03±0,03
Сегментоядерные нейтрофилы, Г/л	1,8±0,2	1,5±0,4	2,1±0,1	2,0±0,3
Эозинофилы, Г/л	0,1±0,04	0,3±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1
Лимфоциты, Г/л	5,3±0,5	5,0±1,2	8,4±1,2	6,4±0,7
Моноциты, Г/л	0,4±0,1	0,5±0,2	0,5±0,1	0,3±0,1

Анализ результатов исследования периферической крови кроликов через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы в дозах 0,25 мл/кг, 1,25 мл/кг также не выявил изменений изученных показателей в экспериментальных группах (таблицы 14, 15).

Таблица 14 – Состояние периферической крови кроликов-самцов через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,25 мл/кг	1,25 мл/кг	Контроль
Эритроциты, Т/л	7,3±0,3	7,2±0,3	6,8±0,7
Общее число лейкоцитов, Г/л	9,5±0,5	10,7±1,3	9,0±0,7
Тромбоциты, Г/л	545±93	420±31	390±44
Гемоглобин, г/дл	14,4±0,7	14,9±1,0	15,1±0,6
СОЭ, мм/ч	0,25±0,25	0,53±0,49	0,03±0,03
Гематокрит, %	33,9±1,2	35,6±0,5	37,0±1,7
Палочкоядерные нейтрофилы, Г/л	0,12±0,05	0,04±0,02	0,08±0,03
Сегментоядерные нейтрофилы, Г/л	2,4±0,3	2,5±0,5	3,0±0,4
Эозинофилы, Г/л	0,2±0,1	0,1±0,05	0,3±0,1
Лимфоциты, Г/л	6,4±0,2	7,6±1,2	5,3±0,7
Моноциты, Г/л	0,3±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1

Таблица 15 – Состояние периферической крови кроликов-самок через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,25 мл/кг	1,25 мл/кг	Контроль
Эритроциты, Т/л	6,8±0,3	7,3±0,5	6,8±0,3
Общее число лейкоцитов, Г/л	7,4±0,8	8,0±0,4	8,6±0,9
Тромбоциты, Г/л	439±88	387±23	563±64
Гемоглобин, г/дл	13,7±0,5	15,1±0,9	13,5±0,6
СОЭ, мм/ч	0,05±0,03	0,52±0,49	0,03±0,03
Гематокрит, %	35,4±1,2	38,6±2,1	34,9±1,4
Палочкоядерные нейтрофилы, Г/л	0,04±0,02	0,00±0,00	0,02±0,02
Сегментоядерные нейтрофилы, Г/л	2,9±0,7	2,1±0,3	2,3±0,5
Эозинофилы, Г/л	0,1±0,04	0,1±0,05	0,1±0,04
Лимфоциты, Г/л	3,9±0,4	5,7±0,1	5,8±1,4
Моноциты, Г/л	0,2±0,1	0,1±0,05	0,2±0,04

В результате проведенных биохимических исследований установлено, что показатели сыворотки крови у крыс-самцов и крыс-самок на 60-й день внутрибрюшинного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы в дозах 0,5; 2,5; 5 мл/кг практически не отличаются от контрольных значений (таблицы 16, 17).

Таблица 16 – Биохимические показатели крови крыс-самцов через 60 дней введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5,0 мл/кг	Контроль
АлАТ, мккат/л	0,29±0,03	0,24±0,02	0,27±0,03	0,30±0,02
АсАТ, мккат/л	0,28±0,02	0,27±0,01	0,27±0,01	0,29±0,01
ЩФ, Е/л	271,56±11,92	236,22±16,97	266,98±13,16	247,02±14,48
Глюкоза, ммоль/л	7,35±0,58	6,77±0,16	6,54±0,60	7,09±0,32
Мочевина, ммоль/л	3,97±0,29	4,60±0,25	4,45±0,26	4,50±0,43
Креатинин, мкмоль/л	140,52±4,19	136,56±3,42	128,16±5,44	142,68±4,21
Белок, г/л	75,65±2,20	81,57±1,48	64,95±6,49	77,50±2,99
Холестерин, ммоль/л	0,90±0,05	0,88±0,04	1,00±0,09	0,86±0,01
Билирубин, мкмоль/л	3,64±0,36	3,35±0,50	4,19±0,47	4,14±0,50
Триглицериды, ммоль/л	1,48±0,42	1,26±0,23	1,01±0,22	1,51±0,18

Таблица 17 – Биохимические показатели крови крыс-самок через 60 дней введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5,0 мл/кг	Контроль
АлАТ, мккат/л	0,52±0,04	0,44±0,01	0,52±0,03	0,42±0,08
АсАТ, мккат/л	0,55±0,03	0,59±0,03	0,68±0,03*	0,59±0,03
ЩФ, Е/л	133,90±8,78	135,10±10,80	134,25±14,52	134,94±11,39
Глюкоза, ммоль/л	8,29±0,72	7,30±0,63	7,00±0,46	7,97±0,53
Мочевина, ммоль/л	3,82±0,20	3,58±0,15	3,93±0,21	4,09±0,22

Показатели	0,5 мл/кг	2,5 мл/кг	5,0 мл/кг	Контроль
Креатинин, мкмоль/л	124,46±3,87	131,76±3,88	118,76±3,66	126,04±2,82
Белок, г/л	81,88±4,51	77,24±4,45	77,56±1,96	80,30±3,13
Холестерин, ммоль/л	1,19±0,17	1,35±0,11	1,13±0,09	1,39±0,21
Билирубин, мкмоль/л	3,54±0,30	4,10±0,82	3,62±0,38	3,73±0,45
Триглицериды, ммоль/л	1,92±0,08	1,41±0,24	1,45±0,29	1,69±0,32
* – достоверность различий по сравнению с контролем при $p < 0,05$.				

По данным биохимических исследований показатели сыворотки крови кроликов через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы в дозах 0,25 мл/кг и 1,25 мл/кг не отличались от контрольных значений (таблицы 18, 19).

Таблица 18 – Биохимические показатели крови кроликов-самцов через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,25 мл/кг	1,25 мл/кг	Контроль
АлАТ, мккат/л	0,20±0,02	0,24±0,02	0,19±0,01
АсАТ, мккат/л	0,09±0,02	0,17±0,03	0,13±0,02
ЩФ, Е/л	105,76±7,89	99,96±11,54	134,15±26,77
Глюкоза, ммоль/л	6,51±0,44	6,67±0,45	7,83±0,78
Мочевина, ммоль/л	5,67±0,33	4,94±0,49	5,07±1,29
Креатинин, мкмоль/л	130,98±7,13	143,03±8,77	142,80±5,12
Белок, г/л	75,97±1,20	72,95±1,16	79,43±4,65
Холестерин, ммоль/л	0,72±0,07	0,81±0,18	0,72±0,05
Билирубин, мкмоль/л	2,48±0,22	1,96±0,31	2,73±0,63
Триглицериды, ммоль/л	0,37±0,07	0,64±0,10	1,07±0,45

Введение ЛС на основе гексафторида серы не вызывало изменение показателей функционального состояния почек, не оказывало влияния на показатели ориентировочно-исследовательского поведения у крыс в тестах

«открытое поле» и «эмоциональная реакция», не оказывало токсического воздействия на электрическую активность сердца.

Таблица 19 – Биохимические показатели крови кроликов-самок через 60 дней внутривенного введения лекарственного средства на основе гексафторида серы, $\bar{X} \pm m$

Показатели	0,25 мл/кг	1,25 мл/кг	Контроль
АлАТ, мккат/л	0,17±0,02	0,20±0,02	0,21±0,03
АсАТ, мккат/л	0,14±0,02	0,13±0,01	0,12±0,01
ЩФ, Е/л	76,21±6,05	108,96±25,44	83,26±4,57
Глюкоза, ммоль/л	8,05±0,65	7,53±0,63	7,00±0,91
Мочевина, ммоль/л	7,32±0,95	8,24±0,36	6,38±0,58
Креатинин, мкмоль/л	140,78±12,31	145,58±6,61	143,10±1,32
Белок, г/л	77,84±4,12	75,52±3,68	78,98±3,52
Холестерин, ммоль/л	0,95±0,16	1,12±0,09	1,10±0,20
Билирубин, мкмоль/л	2,19±0,07	2,14±0,27	3,59±1,06
Триглицериды, ммоль/л	0,33±0,04	0,41±0,04	0,43±0,03

Макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов не выявило каких-либо патологических изменений по сравнению с контролем. Брюшина у крыс и стенка вен у кроликов были без признаков воспаления. Это позволяет заключить, что при внутрижелудочном введении препарат не обладает местно-раздражающим действием.

Таким образом, проведенное изучение хронической токсичности ЛС на основе гексафторида серы свидетельствует, что тестируемый препарат при внутрибрюшинном введении крысам и внутривенном введении кроликам в течение 60 дней не оказывает какого-либо токсического действия на функциональное состояние органов и систем экспериментальных животных.

Резюмируя результаты исследования острой и хронической токсичности экспериментального образца эхоконтрастного препарата на основе гексафторида серы, можем сделать вывод, что он не имеет токсического влияния на функциональное состояние органов и систем подопытных животных.

Глава 4 Обсуждение результатов исследования

Современная лучевая диагностика неразрывно связана с использованием контрастных препаратов – йодсодержащих в рутинной рентгенодиагностике и компьютерной томографии и препаратов, изменяющих магнитные свойства тканей, – парамагнетиков – в магнитно-резонансной томографии.

Проникая адекватно кровотоку в исследуемые органы и ткани, эти препараты улучшают визуализацию, что достигается путем повышения плотности тканей при использовании рентгеноконтрастных веществ или усилением сигнала тканей при использовании парамагнетиков.

Использование эхоконтрастных препаратов в мировой клинической практике стало обязательным условием исследования больных широкого клинического профиля. Эхоконтрастные препараты повышают диагностическую точность УЗИ в выявлении патологических (изоэхогенных) образований до 96% (по сравнению с 77–80% при нативном УЗИ) [112, 113, 116, 131, 132].

Впервые искусственное контрастирование было применено при исследовании камер сердца в 1973 г. Pravin V. Shan и R. Gramiag.

Принцип повышения качества изображения при использовании ЭКП состоит во введении в кровь пациента суспензии, содержащей микропузырьки газа или твердых частиц, которые усиливают отражение ультразвуковых волн и повышают чувствительность метода в регистрации магистрального и органного кровотока.

Чрезвычайно важное преимущество контрастных средств заключается в отсутствии выведения их почками, что исключает влияние эхоконтрастных препаратов на функцию почек и делает их безопасными для пациентов с почечной недостаточностью. Кроме того, УЗИ с ЭКП превосходят КТ и МРТ в установлении гиперваскуляризации образования в артериальную фазу благодаря получению данной фазы в реальном масштабе времени [131, 132].

Показаниями для использования эхоконтрастных препаратов являются подтверждение/исключение впервые обнаруженных образований при нативном УЗИ, дифференциальная диагностика природы образований (доброкачественная или злокачественная), мониторинг пациентов онкологического профиля в процессе или после лечения в качестве метода, альтернативного КТ или МРТ, необходимость исследования с КУ при наличии противопоказаний для КУ при КТ или МРТ, низкие показатели специфичности и чувствительности нативного УЗИ в определении образований при жировом гепатозе печени и при глубоко расположенных образованиях, неопределенные данные визуальной картины КТ или МРТ, а также неопределенные результаты цитологии / гистологии [43, 131, 133].

Первой областью использования ЭКП была сердечно-сосудистая система: регистрация псевдо- и истинных окклюзирующих поражений сосудов, контрастирование камер сердца при подозрении на септальные дефекты, исследование перфузии миокарда [92].

На современном уровне развития ультразвуковой диагностики ЭКП применяются для выявления очаговых образований печени различной этиологии (на основании различия в васкуляризации образований на микро- и макроциркуляторном уровне) [30, 91], для обнаружения опухолей желчевыводящих путей [121], для определения местоположения дренажного катетера в процессе лечения обструкции желчных протоков, для дифференциальной диагностики кистозных образований поджелудочной железы [70, 79], для диагностики онкологических (метастазы, гипозоногенные после КУ), гематологических, инфекционных, метаболических заболеваний селезенки [59, 129, 135].

В урологии ЭКП используются для дифференциальной диагностики очаговых образований почек, выявления участков ишемии, травматических повреждений, стеноза почечной артерии, тромбоза сосудов почки [29, 38, 53, 55, 86].

Кроме того, при исследовании органов малого таза у женщин и мужчин ЭКП используются для оценки результатов высокоинтенсивной фокусированной ультразвуковой абляции миом матки, диагностики новообразований предстательной железы и органов мошонки [63, 85]. В артрологии КУ позволяет оценить васкуляризацию и пролиферативные изменения синовия [40, 105].

Наиболее распространенным ЭКП по показаниям к диагностике патологических состояний является препарат на основе гексафторида серы (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария)), зарегистрированный разработчиком в 2001 г. и лицензированный в Европе, Китае, Индии, Корее, России.

Использование данного эхоконтрастного препарата повышает чувствительность и специфичность метода как в выявлении патологического субстрата, так и в уточнении его природы. Возможность изображения кровотока в органе в артериальную, портальную и отсроченную фазы делает ультразвуковое исследование с контрастным усилением сопоставимым с КТ- и МРТ-ангиографией, а в случае противопоказаний к использованию контрастирования при томографических методах ультразвуковое исследование с эхоконтрастным препаратом стало их альтернативой.

Несмотря на очевидную эффективность ЭКП, в отечественной ультразвуковой диагностике КУ длительное время не использовалось, контрастный препарат на основе гексафторида серы (SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария)) зарегистрирован только в 2014 году, после чего началось внедрение этого препарата в клиническую практику и стали выполняться первые исследования по оценке информативности метода в ультразвуковой диагностике.

В связи с этим первый – клинический – этап нашего исследования заключался в оценке информативности КУ при визуализации метастазов печени у пациентов онкологического профиля путем сравнения результатов

нативного и постконтрастного ультразвукового исследования с применением эхоконтрастного препарата на основе гексафторида серы.

С этой целью было исследовано 35 пациентов (13 мужчин и 22 женщины) с установленным диагнозом онкологического заболевания (раком молочной железы, колоректальным раком и раком других локализаций), T3-4N0-1M0-1. Средний возраст пациентов $66,1 \pm 12,3$ года.

Всем пациентам было проведено нативное УЗИ и УЗИ с введением контрастного препарата на основе гексафторида серы. Исследование выполнялось на аппаратах фирмы Toshiba Aplio 300 и Toshiba Aplio 400 конвексным датчиком частотой 3,5–8 МГц в В-режиме и при использовании опции Contrast Harmonic Imaging (CHI). Регистрацию контрастного усиления осуществляли в артериальную (10–35 с), портальную (35–120 с) и позднюю (> 120 с) фазы исследования.

В ходе нативного ультразвукового исследования диффузные изменения паренхимы печени в виде неоднородности структуры, а также неровность контуров отмечались практически у всех пациентов.

Очаговые образования в виде гипер-, изо- и гипоехогенных структур были выявлены у 21 пациента (60%). Размеры выявленных образований составляли от 5 до 100 мм. Все очаговые образования изначально были расценены нами как метастатические. Эхогенность очаговых образований зависит от гистологической структуры ткани, а именно от количества стромального компонента, от длительности существования, от воздействия агрессивных факторов (гормоно-, химио- и лучевая терапия), от наличия системных заболеваний [9, 15, 24].

При оценке в В-режиме таких показателей, как гепатомегалия, диффузные изменения печени, размеры и количество образований, патология желчевыводящей системы, нами было выявлено большее количество пациентов с диффузными изменениями печени, с изоэхогенными образованиями более 30 мм в небольшом количестве (менее трех).

При сопоставлении результатов нативного УЗИ с МРТ с контрастным веществом было получено 16 ИП, 5 ЛП, 10 ИО и 4 ЛО результата, а чувствительность, специфичность, диагностическая точность, прогностическая ценность положительного и прогностическая ценность отрицательного результата составили 80, 66, 73, 76 и 71% соответственно.

При этом полученные нами показатели чувствительности мы объясняем преобладанием в нашем исследовании изоэхогенных образований, сложность визуализации которых повышается за счет диффузно неоднородной ткани печени. Низкие показатели специфичности были обусловлены гипердиагностикой метастазов в результате сложности дифференциальной диагностики метастазов и таких доброкачественных образований, как гемангиома, аденома и фибронодулярная гиперплазия у больных онкологического профиля.

Результаты исследования печени на фоне КУ оценивались в реальном времени после парентерального введения (2 мл) ЭКП на основе гексафторида серы. Эффект контрастирования был зафиксирован с 5–8-й с достижением максимума к 30-й с. Общее время контрастного усиления составило 6–8 мин.

Артериальная фаза фиксировалась с 10–35-й с, ткань печени визуализировалась как высококонтрастная структура, портальная фаза длилась с 35-й по 120-ю с, при этом сохранялась высокая контрастность печени. Поздняя фаза регистрировалась после 120-й с, высокая контрастность ткани печени после 250–300-й с начинала постепенно снижаться. Общее время контрастирования составило от 360 до 480 с.

На фоне КУ ультразвуковая картина печени характеризовалась неоднородностью эхоструктуры органа за счет наличия очаговых образований, отчетливо визуализируемых на фоне возросшей контрастности печени. Контуры образований становились более четкими. Структура большинства образований принимала умеренно неоднородный характер.

В результате КУ из 35 больных онкологического профиля ультразвуковая картина изменилась у 13 человек. Эти изменения

заклучались в увеличении количества вновь выявленных очаговых образований малых размеров – 2–5 мм у 5 человек, выявлении доброкачественных образований у 5 человек и обнаружении метастазов, не видимых при нативном ультразвуковом исследовании у 3 человек.

Таким образом, после введения ЭКП и анализа УЗ-картины в артериальную, портальную и позднюю фазы выявлено значимое преобладание больных с множественными ($p=0,041$) образованиями до 30 мм ($p=0,053$).

Однако основной особенностью УЗ-картины печени после КУ было повышение контрастности печени и изменение характеристики очаговых образований, эхогенность которых определяется фазой исследования и состоянием сосудистой архитектоники печени и патологических образований, поскольку органом-мишенью данного препарата являются сосуды циркуляторного русла различного порядка [30, 68, 133].

Метастазы характеризуются хаотичностью сосудистого строения и незавершенностью формирования слоев сосудистой стенки, наличием множества анастомозов, артериовенозных шунтов. Вторичные очаговые образования подразделяются на гиперваскулярные и гиповаскулярные. Гиперваскулярные метастазы имеют богатую сеть незрелых сосудов, что приводит к быстрому поступлению контрастного препарата и быстрому его вымыванию относительно неизменной ткани печени. Гиповаскулярные метастазы имеют обедненный кровоток, контраст в них поступает хуже, чем в окружающую паренхиму [47, 68, 75, 91].

Как известно, возможности КТ и МРТ с использованием йодсодержащих и гадолиниевых препаратов позволяют дифференцировать гипер- и гиповаскулярные метастазы [43, 50, 56].

В нашем исследовании использование КУ обеспечило получение аналогичных данных.

У 2 из 35 больных с гиперваскулярными образованиями в артериальную фазу (10–35 с) регистрировали высокую контрастность

образований на фоне поступления контраста в окружающую ткань печени. В портальную фазу (35–120 с) контрастность очагов снижалась на фоне высокой контрастности окружающей ткани печени – эффект раннего вымывания. В позднюю фазу (более 120 с) контрастное усиление в очаговых образованиях отсутствовало в сочетании со снижением контрастности печени.

В противоположность подобной закономерности контрастирования при гиповаскулярных образованиях у 17 больных в артериальную фазу (10–35 с) наблюдалась слабая визуализация очаговых образований на фоне быстро возникающего контрастирования паренхимы печени. В портальную фазу (35–120 с) нарастало контрастное усиление в печени и визуализация очагов в виде гипоехогенных образований на этом фоне улучшалась. В течение 120–360 с (поздняя фаза) имела место отчетливая визуализация очагов в виде гипоехогенных образований на фоне медленного снижения контрастирования печени.

Полученные нами данные о возможности применения ультразвукового контрастного усиления для установления характера васкуляризации вторичных очаговых образований печени полностью согласуются с достаточно большим количеством зарубежных публикаций [28, 47, 68, 75, 112, 133].

Анализ характера васкуляризации метастатических образований показал значительное преобладание гиповаскулярных метастазов ($p=0,005$) в исследуемой группе больных. О подобных же закономерностях сообщается и в публикациях [28, 47, 68, 75, 112, 133].

В литературе большое значение придается возможностям ультразвукового исследования с контрастным усилением в выявлении очаговых образований печени малых размеров [47, 50, 133].

Полученные нами данные не противоречат приведенным в публикациях по исследуемой теме, о чем свидетельствует визуализация у 5 больных внутripеченочных очагов маленьких размеров – до 5 мм.

Чрезвычайно важным представляется факт, что методика КУ в ультразвуковой диагностике превосходит КТ и МРТ в получении изображения в артериальную фазу в силу определенных технических проблем [43, 50, 56, 133].

Мы столкнулись с проблемой одновременной визуализации всех очаговых образований в артериальную фазу при множественности поражения печени в связи с короткой продолжительностью этой фазы и невозможностью осмотра одномоментно всех сегментов печени.

В то же время результаты КУ в ультразвуковой диагностике аналогичны по информативности КТ и МРТ в визуализации и дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных новообразований печени, в чем мы убедились на примере визуализации гемангиом (n=2), кист (n=2) и фибронодулярной гиперплазии (n=1).

В результате сопоставления УЗ-картины печени, полученной с применением КУ у больных онкологического профиля, с данными МРТ с контрастным веществом (как референтного метода) было установлено 19 ИП, 1 ЛП, 14 ИО, 1 ЛО результата. Чувствительность, специфичность, диагностическая точность, прогностическая ценность положительного и прогностическая ценность отрицательного результата составили соответственно 95, 93, 94, 95 и 93%. Повышение показателей диагностической эффективности КУ было обусловлено возможностью оценки характера васкуляризации доброкачественных и злокачественных образований, что привело к уменьшению ЛП результатов.

Данные нашего исследования убедительно показали повышение диагностической эффективности УЗИ метастатических образований печени после выполнения контрастного усиления. Так, использование ЭКП повысило чувствительность на 15%, специфичность на 27%, диагностическую точность на 21%, прогностическую ценность положительного результата на 19% и прогностическую ценность отрицательного результата на 22%, что согласуется с основными

литературными данными последних лет [28, 47, 68, 75, 112, 133]. Диагностическая точность УЗИ с ЭКП на основе гексафторида серы доброкачественных и злокачественных образований печени составила 94%. Shu-Guang Zheng, Hui-Xiong Xu, Lin-Na Liu [111] и Tae Kyoung Kim, Hyun-Jung Jang [49] в результате проведенных исследований получили чувствительность и специфичность 88%, 89% и 96%, 98% соответственно в диагностике доброкачественных и злокачественных новообразований. По данным Zeno Spârchez, Pompilia Radu [121], диапазон диагностической точности обнаружения опухолей ЖВС составил от 89% до 94%.

Таким образом, наши данные подтверждают опубликованные материалы о повышении диагностической эффективности УЗИ при КУ, что должно привести к широкой востребованности данного метода в клинической практике, доступности контрастных агентов и созданию отечественных ЭКП.

Поэтому вторым этапом исследования было изучение диагностических возможностей отечественного ЭКП на основе гексафторида серы.

Экспериментальная часть состояла из исследований отечественного ЭКП *in vitro* в стационарной системе и *in vivo* на животных. Отечественный ЭКП представлял собой гетерогенную систему «газ – жидкость», состоящую из неполимерных микрочастиц, содержащих слаборастворимый газ гексафторид серы (SF_6), и гибкой, мобильной мембраны из фосфолипидов и полиэтиленгликоля, стабилизирующих микрочастицы. В качестве стерильной среды использовали физиологический раствор. Отечественный ЭКП защищен патентом РФ № 2485976 «Контрастное средство для ультразвуковой диагностики», приоритет от 17 мая 2011 г. Решение о выдаче патента от 14.01.2013.

Экспериментальное исследование *in vitro* осуществлялось путем УЗИ отечественного ЭКП, помещенного в пластиковый контейнер. Исследуемый препарат представлял собой гомогенную суспензию мелкодисперсной структуры с высокой эхогенностью, медиана показателя интенсивности

эхогенности составила 90%. Факт контрастного усиления сохранялся на протяжении 3–4 мин с последующим снижением. Средой для сравнения являлась вода с добавлением воздуха.

Экспериментальная часть работы с животными была проведена на белых беспородных крысах – самцах, кроликах – самцах и самках, и свиньях – самцах, согласно схеме. Моделировалось очаговое поражение печени с целью оценки информативности отечественного ЭКП для выполнения контрастного усиления при УЗИ. Отечественный ЭКП вводили крысам в хвостовую вену, свиньям и кроликам в ушную вену.

В качестве способа оперативного формирования абсцесса печени за основу была взята известная модель (патент SU 1518827 / М.С. Арикьянц, А.Г. Тышко, А.Ф. Макеев, Л.Н. Волюнец). Рана в печени не ушивалась. Передняя брюшная стенка ушивалась послойно наглухо. В качестве инородного тела у крыс использовали деревянную щепку, загрязненную *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл. Кроликам внедряли ватный шарик, пропитанный *B. fragilis* в дозе $0,5 \times 10^9$ микробных тел в 1 мл и *E. coli* в дозе $0,5 \times 10^8$ микробных тел в 1 мл. Свиньям моделировали два очаговых поражения – силиконовый шарик, заполненный физиологическим раствором, и травмированный участок печени, контаминированный микробной взвесью (*B. Fragilis*). УЗИ зоны оперативных вмешательств выполняли через 7–14 суток.

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости животных 1-й и 4-й групп без моделирования очагового поражения печени (с использованием В-режима и режима Contrast Harmonic Imaging) наблюдалось усиление эхогенности печени с нарастанием медианы интенсивности эхогенности от 69 до 89% в сочетании с повышением детализации трабекулярных структур печени (за счет визуализации сосудов печени мелкого калибра) до 3–4-го порядка по сравнению с трабекулярным рисунком до 2-го порядка на нативных сонограммах.

При использовании опции Contrast Harmonic Imaging на эхограммах с 4-й с отмечалось проявление сосудистого рисунка по мере поступления контрастного вещества с постепенным повышением эхогенности паренхимы и достижением максимального эффекта к 20-й с. Общее время контрастирования отечественного ЭКП при однократном введении составило в среднем 3 мин 30 с. В ходе исследования визуализировались все три фазы (артериальная, портальная, поздняя).

Исследование экспериментальных животных с моделью очагового поражения печени показало нарастание эхогенности печени с медианой от 63 до 102%, четко определялись границы задействованных в процесс воспаления тканей и обеспечивалась визуализация изоэхогенных (по данным В-режима) очаговых образований.

Гистологическая картина смоделированных очаговых поражений печени у всех животных верифицировала зоны некроза и воспалительную инфильтрацию прилежащих тканей.

Было получено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение интенсивности эхогенности от 24 до 37% у 3 групп животных (крысы, свиньи). Момент контрастирования фиксировался с 4-й с и достигал максимального эффекта к 20-й с. Общее время контрастирования при однократном введении составило 3–4 мин.

Выполнено исследование острой и хронической токсичности с оценкой местно-раздражающего действия лекарственного средства на основе гексафторида серы при внутрибрюшинном и внутривенном введении самцам и самкам мышей CD 1, аутбредных крыс и внутривенном введении кроликам в течение 60 дней. Исследование показало, что тестируемое лекарственное средство при внутрибрюшинном введении крысам и внутривенном введении кроликам в течение 60 дней не оказывает какого-либо токсического действия на функциональное состояние органов и систем экспериментальных животных. Полученные данные соответствуют результатам доклинических

исследований зарегистрированного ранее препарата гексафторида серы SonoVue (Bracco Swiss SA, Швейцария) [119].

В результате проведенной работы показана высокая эффективность и безопасность отечественного ЭКП, использование которого повышает диагностическую информативность ультразвукового исследования.

Выводы

1. Эхоконтрастное ультразвуковое исследование повышает диагностическую эффективность ультразвуковой диагностики очаговых образований печени у больных онкологического профиля с возрастанием чувствительности с 80 до 95% и специфичности с 66 до 93% при нативном и постконтрастном исследовании соответственно.

2. Постконтрастное ультразвуковое исследование повышает эффективность выявления у пациентов очаговых образований печени средних размеров – до 30 мм ($p=0,053$), в количестве больше 3 ($p=0,041$).

3. Характер распределения эхоконтрастного препарата в зависимости от фазы контрастирования свидетельствует о достоверном преобладании гиповаскулярных метастазов ($p=0,005$) в общей группе пациентов по сравнению с гиперваскулярными образованиями.

4. Особенностью ультразвуковой картины печени при контрастном усилении в артериальную фазу (10–35 с) является сложность объективной оценки количества метастатических (очаговых) образований в реальном масштабе времени в силу малой длительности артериальной фазы.

5. Сформированный в экспериментальной модели абсцесс печени, изоэхогенный при нативном исследовании, отчетливо визуализируется за счет повышения эхогенности печени после введения эхоконтрастного препарата.

6. Исследование общей токсичности и фармакокинетики отечественного эхоконтрастного препарата показало, что изученное лекарственное средство быстро выводится из организма без эффекта кумуляции и не оказывает токсического действия на функциональное состояние органов и систем экспериментальных животных.

Практические рекомендации

1. Для повышения информативности ультразвукового исследования в выявлении очаговых образований печени необходимо использовать контрастное усиление. Введение эхоконтрастного препарата позволяет получить контрастное усиление печени в артериальную (10-35 с), портальную (35-120 с) и позднюю (> 120 с) фазы исследования. Оценка контрастного усиления в артериальную, портальную и позднюю фазы исследования позволит провести дифференциальную диагностику злокачественных и доброкачественных образований.

2. Очаговые образования печени низкой эхогенности в артериальную, портальную и позднюю фазы следует расценивать как гиповаскулярные метастазы. Очаговые образования печени высокой эхогенности в артериальную фазу и низкой эхогенности в портальную, позднюю фазы исследования следует расценивать как гиперваскулярные метастазы.

3. Определение васкуляризации и точного количества метастазов при множественном метастатическом поражении печени требует болюсного введения препарата при сканировании каждой доли печени по заранее определенной схеме с выделением приоритетных зон.

Список сокращений

ГПЦК	– гепатоцеллюлярная карцинома
ГС	– гексафторид серы
КРР	– колоректальный рак
КТ	– компьютерная томография
КУ	– контрастное усиление
ЛС	– лекарственное средство
МРТ	– магнитно-резонансная томография
СОЭ	– скорость оседания эритроцитов
СРБ	– С-реактивный белок
УЗИ	– ультразвуковое исследование
ЦДК	– цветное доплеровское картирование
ЭДК	– энергетическое доплеровское картирование
ЭКП	– эхоконтрастный препарат
ИП	– истинноположительный результат
ИО	– истинноотрицательный результат
ЛП	– ложноположительный результат
ЛО	– ложноотрицательный результат

Список литературы

1. Ангиография / В.В. Борисенко, Е.И. Кремнева, М.И. Киселева [и др.]. – М. : Видар-М, 2008. – 646 с.
2. Альперович Б.И. Доброкачественные опухоли печени: диагностика, лечение / Б.И. Альперович, В.А. Вишневский, А.В. Шабунин. – Томск : Красное знамя, 1998. – 289 с.
3. Борисов А.Е. Руководство по хирургии печени и желчевыводящих путей / А.Е. Борисов. – СПб. : Скифия, 2003. – 293 с.
4. Бляхма Ф.А. Пат. 2444296 Российская Федерация. Способ использования суспензии наночастиц оксидов металлов в качестве контрастных веществ для ультразвуковой визуализации сердца и сосудов / Бляхма Ф.А. [и др.]. – 2010.
5. Вопилов Ю.Е., Никитин Л.Н. [и др.] // Высокомолекулярные соединения. Сер. А. – 2012. – № 6. – С. 842–850.
6. Возможность применения ветеринарного препарата в экспериментальной фармакологии / И.А. Савенко, Ю.В. Усманский, М.Н. Ивашев [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 422–425.
7. Каплун А.П. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ / А.П. Каплун, Ш. Ле Банг, Ю.М. Краснопольский // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45(1). – С. 3–12.
8. Комплексная лучевая диагностика очаговых поражений печени : метод. рекомендации № 98/198 / Л.А. Тютин, П.Г. Таразов, С.М. Березин [и др.]. – СПб., 1998. – С. 23.
9. Контрастная сонография / Hans-Peter Weskott. – 1-е издание – Бремен: UNI-MED, 2014. – С. 284.
10. Кузин Н.М. Чрескожные вмешательства под контролем УЗИ при кистах и абсцессах печени. Современные проблемы хирургической

гепатологии / Н.М. Кузин, А.Н. Лотов, В.Н. Авакян [и др.] // Материалы четвертой конф. хирургов-гепатологов. – М., 1996. – С. 232–233.

11. Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария [и др.]. – Киев : Вища шк., 1983. – 383 с.

12. Операции на печени. Руководство для хирургов / В.А. Вишневский, В.А. Кубышкин, А.В. Чжао [и др.]. – М. : Миклош, 2003. – 378 с.

13. Ультразвуковая диагностика сосудистых заболеваний : учеб.-метод. пособие / В.П. Куликов, Л.Э. Шульгина, М.Л. Дическул [и др.]. – М. : Стром, 2011. – 512 с.

14. Лелюк В.Г. Ультразвуковая ангиология : учеб.-метод. пособие / В.Г. Лелюк, С.Э. Лелюк. – М. : Реальное время, 1999. – 288 с.

15. Митьков В.В. Практическое руководство по ультразвуковой диагностике. Общая ультразвуковая диагностика : учеб. для вузов / В.В. Митьков. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Видар, 2011. – 720 с.

16. Новиков Н.Е. Контрастно-усиленные ультразвуковые исследования. История развития и современные возможности / Н.Е. Новиков // Russian Electronic Journal. – 2012. – Т. 2, № 5. – С. 20–28.

17. Северцев А.Н. Диагностика и хирургическое лечение очаговых поражений печени : автореф. дис. д-ра мед. наук / А.Н. Северцев. – М., 2001. – 27 с.

18. Сергеев П.В. Контрастные средства / П.В. Сергеев, Н.К. Свиридов, Н.Л. Шимановский. – М. : Медицина, 1993. – 256 с.

19. Тютин Л.А. Магнитная резонансная томография с использованием контрастного препарата «Магневист» / Л.А. Тютин, А.Ф. Панфиленко, Н.В. Чернов // Изучение противоопухолевой активности в химиотерапии / А.В. Чернов. – М. : Медицина, 1971. – 382 с.

20. Чернышева Ю.Н. Контрастные вещества в ультразвуковой диагностике (обзор литературы) / Ю.Н. Чернышова, В.В. Митьков // Ультразвуковая диагностика. – 1999. – № 2. – С. 6–13.
21. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Н.Д. Бунятян [и др.] ; под общей ред. А.Н. Миронова. – М. : Гриф и К., 2012. – Ч. 1. – С. 944.
22. Хоффер М. Компьютерная томография. Базовое руководство / М. Хоффер. – М. : Мед. лит., 2006. – 208 с.
23. Цвибель В.Дж. Ультразвуковое исследование сосудов / В.Дж. Цвибель, Д.С. Пеплерито ; под ред. В.В. Митькова, Ю.Н. Никитина, Л.В. Осипова ; пер. с англ. В.В. Ультразвуковое исследование сосудов, 2008.
24. Щеголев А.И. Онкоморфология печени / А.И. Щеголев, О.Д. Мишнев, И.И. Тинькова. – М. : Изд-во РГМУ, 2006. – 252 с.
25. Acoustic behaviour of current ultrasound contrast agents / V. Uhlenndorf, F.-D. Scholle, M. Reinhardt // Ultrasonics. – 2000. – Vol. 38. – № 1. – P. 81–86.
26. Assessment of arterial hypervascularity of hepatocellular carcinoma: comparison of contrast-enhanced US and gadoxetate disodium-enhanced MR imaging / K. Sugimoto, F. Moriyasu, J. Shiraishi [et al.] // European Radiology. – 2012. – N. 22. – P. 1205–1213.
27. Assessment of hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced ultrasound with perfluorobutane microbubbles: comparison with dynamic CT / M. Mandai, M. Koda, T. Matono [et al.] // The British Journal of Radiology. – 2011. – N. 84. – P. 499–507.
28. A Milestone: Approval of CEUS for Diagnostic Liver Imaging in Adults and Children in the USA / K. Seitz, D. Strobel // Ultraschall Med. – 2016. – N.37(3). – P.229-232.
29. Bertolotto M. Value of contrast – enhanced ultrasonography for detecting renal infarcts proven by contrast enhanced CT. A feasibility study / M. Bertolotto // European Radiology. – 2008. – Vol. 18. – P. 376–383.

30. Blood flow patterns in focal liver lesions at microbubble-enhanced US / M. Brannigan, P.N. Burns, S.R. Wilson // Radiographics. – 2004. – N. 24. – P. 921–935.

31. Blunt abdominal trauma: diagnostic performance of contrast-enhanced US in children – initial experience / M. Valentino, C. Serra, P. Pavlica [et al.] // Radiology. – 2008. – N. 246. – P. 903–909.

32. Can contrast-enhanced ultrasonography characterize focal liver lesions and differentiate between benign and malignant, thus providing a one-stop imaging service for patients? / D.D. Cokkinos, M.J. Blomley, C.J. Harvey [et al.] // Journal of Ultrasound. – 2007. – N. 10. – P. 186–193.

33. Characterization of focal liver lesions with contrast-specific US modes and a sulfur hexafluoride-filled microbubble contrast agent: diagnostic performance and confidence / E. Quaia, F. Calliada, M. Bertolotto [et al.] // Radiology. – 2004. – N. 232. – P. 420–430.

34. Characterization of focal liver lesions using contrast enhancedultrasound as a first line method: a large monocentric experience / I. Sporea, A. Martie, S. Sirli [et al.] // Gastrointestin Liver Dis. – 2014. – N. 23(1). – P. 57–63.

35. Characterization of small focal liver lesions using real-time contrast-enhanced sonography: diagnostic performance analysis in 200 patients / H.X. Xu, G.J. Liu, M.D. Lu [et al.] // J Ultrasound Med. – 2006. – N. 25. – P. 349–361.

36. Characterization of focal liver lesions with contrast-enhanced low MI real time ultrasound and SonoVue [in German] / J. Hohmann, J. Skok, R. Puls, [et al.] // Rofo. – 2003. – Vol. 175. – P. 835–843.

37. Characterization of hepatic tumors: value of contrast-enhanced coded phase-inversion harmonic angio / Y.L. Wen, M. Kudo, R.Q. Zheng [et al.] // AJR Am J Roentgenol. – 2004. – P. 182.

38. Characterization of renal tumours with pulse inversion harmonic imaging by intermittent high mechanical index technique: initial results / E. Quaia,

S. Siracusano, M. Bertolotto // *European Radiology*. – 2003. – Vol. 13, N. 6. – P. 1402–1412.

39. Clinical translation in the treatment of hepatocellular carcinoma following the introduction of contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid / A. Hiraoka¹, M. Ichiryu¹, N. Tazuya // *Oncology letters*. – 2010. – P. 57–61.

40. Comparison of contrast-enhanced lomechanical index sonography and unenhanced B-mode sonography for the differentiation between synovitis and joint effusion in patients with rheumatoid arthritis / T. Kleffel // *Fortschr. Roentgenstrahlen*. – 2005. – N. 177. – P. 835–841.

41. Comparison of contrast-enhanced sonography with unenhanced sonography and contrast-enhanced CT in the diagnosis of malignancy in complex cystic renal masses / E. Quaia, M. Bertolotto, V. Cioffi [et al.] // *American Journal of Roentgenology*. – 2008. – Vol. 191, N. 4. – P. 1239–1249.

42. Comparison of transient arterial occlusion and muscle exercise provocation for assessment of perfusion reserve in skeletal muscle with real-time contrast-enhanced ultra-sound / M. Krix [et al.] // *European Radiology*. – 2009.

43. Comparison of Contrast-Enhanced Ultrasound and Gadolinium-Ethoxybenzyl-Diethylenetriamine Pentaacetic Acid-Enhanced MRI for the Diagnosis of Macroscopic Type of Hepatocellular Carcinoma / H. Takada, K. Tsuchiya, Y. Yasui [et al.] // *Cancer Med*. – 2016. – N.5(11). – P.3111-3120.

44. Contrast-Enhanced Sonographic Characteristics of Hepatic Inflammatory Pseudotumors / X. Zhang, S. Tang, L. Huang [et al.] // *Ultrasound Med*. – 2016. – N.35(9). – P.2039-2047.

45. Contrast-enhanced sonography shows superior microvascular renal allograft perfusion in patients switched from cyclosporine A to everolimus / L.P. Kihm, U.P. Hinkel, K. Michael [et al.] // *Transplantation*. – 2009. – N. 88. – P. 261–265.

46. Contrast enhanced ultrasound features of hepatic cystadenoma and hepatic cystadenocarcinoma / Y. Dong, W.P. Wang, F. Mao [et al.] // *Gastroenterol*. – 2017. – N.52(3). – P.365-372.

47. Contrast-enhanced ultrasound features of histologically proven small (≤ 20 mm) liver metastases / Y. Dong, XL. Zhang, F. Mao [et al.] // *Gastroenterol.* – 2017. – N.52(1). – P.23-28.
48. Contrast-enhanced ultrasound in abdominal trauma / A. Afaq, C. Harvey, Z. Aldin [et al.] // *European Journal of Emergency Medicine.* – 2011. – Vol. 19, N. 3. – P. 140–145.
49. Contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of nodules in liver cirrhosis / T.K. Kim, H.-J. Jang // *World J Gastroenterol.* – 2014. – N. 20(13). – P. 3590–3596.
50. Contrast-enhanced ultrasonography in the evaluation of incidental focal liver lesions: A cost-effectiveness analysis / M. Smajerova, H. Petrasova, J. Little [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2016. – N.22(38). – P.8605-8614.
51. Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging of Infected Focal Liver Lesions / G.J. Liu, M.D. Lu [et al.] // *J Ultrasound Med.* – 2008. – N. 27. – P. 657–666.
52. Contrast-Enhanced Ultrasonography in Evaluation of the Therapeutic Effect of Chemotherapy for Patients with Liver Metastases / N. Ueda, H. Nagira, N. Sannomiya [et al.] // *Yonago Acta Med.* – 2016. – N.26. – P.255-261.
53. Contrast Enhanced Ultrasound of the Kidneys: What Is It Capable of? / D.C. Demosthenes, G.A. Eleni, M. Skilakaki [et al.] // *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.* – 2013. – P. 13.
54. Contrast-enhanced ultrasound: The evolving applications / H.X. Xu // *World J Radiol.* – 2009. – N. 1 (1). – P. 15–24.
55. Contrast-Enhanced Ultrasonography: renal applications / J.M. Correias // *Radiol.* – 2003. – N. 84. – P. 2041–2054.
56. Contrast-enhanced ultrasound in the Characterization of Hepatocellular Carcinomas Treated by Ablation: Comparison with Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging / P. Qu, X. Yu, P. Liang [et al.] // *Ultrasound Med Biol.* – 2013. – N. 3. – P. 39–45.
57. Contrast-enhanced ultrasound in the differentiation between phlegmon and abscess in Crohn's disease and other abdominal conditions / T. Ripollés,

M.J. Martínez-Pérez, J.M. Paredes [et al.] // European Radiology Radiol. – 2013. – N. 7. – P. 525-31.

58. Contrast enhanced ultrasound performed under urgent conditions. Indications, review of the technique, clinical examples and limitations / D.D. Cokkinos, E. Antypa, I. Kalogeropoulos [et al.] // Insights Into Imaging. – 2013. – Vol. 4, N. 2. – P. 185–198.

59. Contrast-enhanced ultrasonography with SonoVue: differentiation between benign and malignant lesions of the spleen / A. Herbay, A.P. Barreiros, A. Ignee [et al.] // J Ultrasound Med. – 2009. – N. 28. – P. 421–434.

60. Contrast-enhanced ultrasound for imaging blunt abdominal trauma – indications, description of the technique and imaging review / D. Cokkinos, E. Antypa, K. Stefanidis [et al.] // Ultraschall in der Medizin. – 2012. – Vol. 33, N. 1. – P. 60–67.

61. Contrast harmonic imaging ultrasound and perfusion imaging for surveillance after endovascular abdominal aneurysm repair regarding detection and characterization of suspected endoleaks / K. Pfister, J. Rennert, W. Uller [et al.] // Clin Hemorheol Microcirc. – 2009. – N. 43. – P. 119–128.

62. Contrast-Enhanced Ultrasound for Characterisation of Hepatic Lesions Appearing Non-hypervascular on CT in Chronic Liver Diseases / H. Maruyama, M. Takahashi, H. Ishibashi [et al.] // Br J Radiol. – 2012. – N. 85. – P. 351–357.

63. Contrast-Enhanced Ultrasonography for Real-time Monitoring of Interstitial Laser Thermal Therapy in the Focal Treatment of Prostate Cancer / M. Atri, M.R. Gertner, M.A. Haider [et al.] // CUAJ. – 2009. – Vol. 3 – P. 38–44.

64. Contrast-enhanced ultrasonography parameters in neural network diagnosis of liver tumors / C.T. Streba, M. Ionescu, D.I. Gheonea [et al.] // World J Gastroenterol. – 2012. – N. 18(32). – 4427–4434.

65. Contrast-enhanced ultrasound for characterization of hepatic lesions appearing non-hypervascular on CT in chronic liver diseases / H. Maruyama, M. Takahashi, H. Ishibashi [et al.] // Br J Radiol. – 2012. – N. 85. – P. 351–357.

66. Contrast carotid ultrasound for the detection of unstable plaques with neoangiogenesis: a pilot study / M.F. Giannoni, E. Vicenzini, M. Citone [et al.] // Eur J Vasc Endovasc. – 2009. – N. 37. – P. 722-7.

67. Contrast-enhanced ultrasonography of skeletal muscles for type 2 diabetes mellitus patients with microvascular complications / S. Ye, L.Yuan, W. Pei-Jun [et al.] // Int J Clin Exp Med. – 2014. – N. 7(3). – P. 573–579.

68. Contrast-enhanced ultrasound using SonoVue® (sulphur hexafluoride microbubbles) compared with contrast-enhanced computed tomography and contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the characterisation of focal liver lesions and detection of liver metastases: a systematic review and cost-effectiveness analysis / M. Westwood, M. Joore, J. Grutters [et al.] // Health Technol Assess. – 2013. – N. 17(16). – P. 1–243.

69. Contrast enhanced ultrasonography (CEUS) in the characterization of tumor microcirculation. Validation of the procedure in the animal experimental model / A.F. Badea, A. Tamas-Szora, S. Clichici // Med Ultrason. – 2013. – N. 15(2). – P. 85–94.

70. Contrast enhanced ultrasound in the pathology of the pancreas - a monocentric experience / M. Ardelean, R. Şirli, I. Sporea [et al.] // Med Ultrason. – 2014. – N. 16(4). – P. 325-31.

71. Contrast ultrasound imaging in liver disease / F. Tranquart, A. Bleuzen, J.M. Correas [et al.] // J Radiol. – 2003. – N. 84. – P. 2025–2040.

72. Crohn disease: correlation of findings at contrastenhanced US with severity at endoscopy / T. Ripollés, M.J. Martínez, J.M. Paredes [et al.] // Radiology. – 2009. – Vol. 253. – P. 241–248.

73. Current role of ultrasound for the management of hepatocellular carcinoma / H. Maruyama, M. Yoshikawa, O. Yokosuka // World J Gastroenterol. – 2008. – N. 14. – P. 1710–1719.

74. Detection of carotid adventitial vasa vasorum and plaque vascularization with ultrasound cadence contrast pulse sequencing technique and

echo-contrast agent / E. Vicenzini, M.F. Giannoni, F. Puccinelli [et al.] // *Stroke*. – 2007. – N. 38. – P. 2841-3.

75. Detection of liver metastases in cancer patients with geographic fatty infiltration of the liver: the added value of contrast-enhanced sonography / TV. Bartolotta, A. Taibbi, D. Picone [et al.] // *Ultrasonography*. – 2016. – N. 16. doi: 10.14366/usg.16041.

76. Diagnosis of Focal Liver Masses on Ultrasonography Comparison of Unenhanced and Contrast-Enhanced Scans Stephanie / R. Wilson, H.J. Jang [et al.] // *J Ultrasound Med*. – 2007. – N. 26. – P. 775–787.

77. Differentiation between benign and malignant hepatic lesions: utility of color stimulated acoustic emission with the microbubble contrast agent Levovist / A. Herbay, C. Vogt, D. Häussinger // *J Ultrasound Med*. – 2004. – N. 23. – P. 207–215.

78. Discrimination between neoplastic and non-neoplastic lesions in cirrhotic liver using contrast-enhanced ultrasound / H.X. Xu, M.D. Lu, L.N. Liu [et al.] // *Br J Radiol*. – 2012. – N. 85. – P. 1376–1384.

79. Differentiation of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms from serous cystadenomas of the pancreas using contrast-enhanced sonography / F. Chen, J.Y. Liang, Q.Y. Zhao [et al.] // *J Ultrasound Med*. – 2014. – N. 33(3). – P. 449-55.

80. Efficacy of Perflubutane Microbubble-enhanced ultrasound in the characterization and detection of focal liver lesions: phase 3 multicenter clinical trial / F. Moriyasu, K. Itoh // *Am J. Roentgenol*. – 2009. – N. 193. – P. 86–95.

81. Efficacy and safety of the novel ultrasound contrast agent perflutren (definity) in patients with suboptimal baseline left ventricular echocardiographic images / D.W. Kitzman, M.E. Goldman, L.D. Gillam [et al.] // *The American Journal of Cardiology*. – 2000. – Vol. 86, N. 6. – P. 669–674.

82. Efficacy of sonazoid (perflubutane) for contrast-enhanced ultrasound in the differentiation of focal breast lesions: phase 3 multicenter clinical trial /

Y. Miyamoto, T. Ito, E. Takada [et al.] // AJR Am J Roentgenol. – 2014. – N. 202(4). – P. 400–407.

83. Endocavitary contrast enhanced ultrasound (CEUS) – work in progress / A. Heinzmann, T. Müller, J. Leitlein [et al.] // Ultraschall Med. – 2012. – N. 33(1). – P. 76–84.

84. Efficacy of perflubutane microbubble-enhanced ultrasound in the characterization and detection of focal liver lesions: phase 3 multicenter clinical trial / F. Moriyasu, K. Itoh // Am J Roentgenol. – 2009. – N. 193. – P. 86–95.

85. Enhancement characteristics of benign and malignant focal peripheral nodules in the peripheral zone of the prostate gland studied using contrast-enhanced transrectal ultrasound / J. Tang, J.C. Yang, Y. Luo [et al.] // Clin Radiol. – 2008. – N. 63. – P. 1086–1091.

86. Evaluation of indeterminate renal masses with contrast-enhanced US: a diagnostic performance study / R.G. Barr, C. Peterson, A. Hindi // Radiology. – 2014. – N. 271(1). – P. 133–42.

87. Evaluation of local recurrence after treatment for hepatocellular carcinoma by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid: comparison with dynamic computed tomography / K. Shiozawa, M. Watanabe, R. Takayama // J. Clin. Ultrasound. – 2010. – N. 38. – P. 182–189.

88. Evaluation of cystic renal masses: comparison of CT and MR imaging by using the Bosniak classification system / G.M. Israel, N. Hindman, M.A. Bosniak // Radiology. – 2004. – Vol. 231, N. 2. – P. 365–371.

89. Evaluation of primary malignancies of the liver using contrast-enhanced sonography: correlation with pathology / Z.H. Fan, M.H. Chen, Y. Dai [et al.] // AJR Am J Roentgenol. – 2006. – Vol. 186. – P. 1512–1519.

90. Greis C. Contrast-Enhanced Ultrasound in General Imaging / C. Greis. – Italia, Springer-Verlag, 2005. – P. 326.

91. Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) in the liver – update 2012: A WFUMB-EFSUMB initiative in cooperation with representatives of AFSUMB, AIUM, ASUM,

FLAUS and ICUS / M. Claudon, C.F. Dietrich, B.I. Choi [et al.] // World Federation for Ultrasound in Medicine; European Federation of Societies for Ultrasound // *Ultrasound Med Biol.* – 2013. – N. 39(2). – P. 187–210.

92. Harmonic imaging with Levovist for transthoracic echocardiographic reconstruction of left ventricle in patients with post-ischemic left ventricular dysfunction and suboptimal acoustic windows / S. De Castro, L. Agati, D.J. Cartoni // *Am. Soc. Echocardiogr.* – 2000. – Vol. 13, N. 2. – P. 139–145.

93. Häussinger D. Late-phase pulseinversion sonography using the contrast agent Levovist: differentiation between benign and malignant focal lesions of the liver / D. Häussinger, A. Herbay, C. Vogt // *AJR Am J Roentgenol.* – 2002. – N. 179. – P. 1273–1279.

94. Hepatocellular carcinoma after ablation: the imaging follow-up scheme / L.N. Liu, H.X. Xu, Y.F. Zhang [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2013. – N. 19. – P. 797–801.

95. Heterogeneity in patient diagnostic pathways: an example from contrast-enhanced ultrasound diagnostic scans for focal liver lesions Adam B Smith / F. Alexandra, C. Louise // *BMC Research Notes.* – 2014. – N. 7. – P. 199.

96. Hui-Xiong Xu. Contrast-enhanced ultrasound: The evolving applications / Xu. Hui-Xiong // *J. World. Radiology.* – 2009. – P. 15–24.

97. Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging / D.R. Morel, I. Schwieger, L. Hohn [et al.] // *Invest Radiol.* – 2000. – N. 35. – P. 80–85.

98. Imaging of hepatocellular carcinoma: qualitative and quantitative analysis of postvascular phase contrast-enhanced ultrasonography with sonazoid. Comparison with superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images / T. Inoue, M. Kudo, K. Hatanaka [et al.] // *Oncology.* – 2008. – Vol. 75, N. 1. – P. 48–54.

99. Impact of Contrast-Enhanced Ultrasonography in a Tertiary Clinical Practice / B. Lanka, H.J. Jang, T.K. Kim [et al.] // J Ultrasound Med. – 2007. – N. 26. – P. 1703–1714.

100. Improved detection of hepatic metastases with contrast-enhanced low mechanical-index pulse inversion ultrasonography during the liver-specific phase of sonazoid: observer performance study with JAFROC analysis / K. Sugimoto, J. Shiraishi, F. Moriyasu [et al.] // Acad Radiol. – 2009. – N. 16. – P. 798–809.

101. Intravenous application of second-generation ultrasound contrast agents in children: a review of the literature / M. Piskunowicz, W. Kosiak // Ultraschall Med. – 2012. – N. 33(2). – P. 135-40.

102. Intrasurgical dignity assessment of hepatic tumors using semi-quantitative strain elastography and contrast-enhanced ultrasound for optimization of liver tumor surgery / Batista da Silva N. Platz, M. Schauer, M. Hornung [et al.] // Clin Hemorheol Microcirc. – 2016. – N.64(4). – P.735-745.

103. Isolated tuberculous liver abscesses with multiple hyperechoic masses on ultrasound: a case report and review of the literature / H.C. Chen, Y.C. Chao, R.Y. Shyu [et al.] // Liver Int. – 2003. – N. 23. – P. 346–350.

104. Johannsen E.C. Pyogenic liver abscesses / E.C. Johannsen, C.S. Sifri, C.M. Lawrence // Infect Dis Clin North Am. – 2000. – N. 14. – P. 47–56.

105. Kleffel T. Comparison of Contrast-enhanced LoMechanical Index Sonography and Unenhanced B-Mode Sonography for the Differentiation between Synovitis and joint Effusion in Patients with Rheumatoid Arthritis / T. Kleffel // Fortschr. Roentgenstrahlen. – 2005. – N. 177. – P. 835–841.

106. Krix M. Comparison of transient arterial occlusion and muscle exercise provocation for assessment of perfusion reserve in skeletal muscle with real-time contrast-enhanced ultrasound / M. Krix [et al.] // Eur J Radiol. – 2009. – Doi:10.1016, j.ejrad.2009.11.014.

107. Lencioni R. Enhancing the Role of Ultrasound with Contrast Agents / R. Lencioni. – Italia, Springer-Verlag, 2009. – P. 378.

108. Lin M.-L. Diagnostic performance of contrast – enhanced ultrasound for complex cystic focal liver lesions: blinded reader study / M.-L. Lin // Eur. Radiol. – 2009. – Vol. 19. – P. 358–369.

109. Liver Contrast-Enhanced Ultrasound Improves Detection of Liver Metastasis in Patients with Pancreatic or Periapillary Cancer / V.L. Jongerius, C.J. Pek, N.C. Krak // Ultrasound Med Biol. – 2015. – N. 41(12). – P. 3063-9.

110. Low mechanical index contrast-enhanced sonographic findings of pyogenic hepatic abscesses / O. Catalano, F. Sandomenico, M.M. Raso [et al.] // AJR Am J Roentgenol. – 2004. – N. 182. – P. 447–450.

111. Management of hepatocellular carcinoma: The role of contrast-enhanced ultrasound / S.G. Zheng, H.X. Xu, L.N. Liu // World J Radiol. – 2014. – N. 28. – P. 7–14.

112. Microbubbleultrasound contrast agents: an update / E. Quasia // Eur. Radiol. – 2007. – Vol. 17, N. 8. – P. 1995–2008.

113. Micro-Bubble Contrast Agents (Marketed as Definity (Perflutren Lipid Microsphere) Injectable Suspension and Optison (Perflutren Protein-Type sMicrospheres for Injection) [Electronic Resource] // US Food and Drug Administration, USA. – 2008. – URL: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm092270.htm>.

114. Moschouris H. Contrast-Enhanced Ultrasonography of Hepatocellular Carcinoma After Chemoembolisation Using Drug-Eluting Beads: A Pilot Study Focused on Sustained Tumor Necrosis / H. Moschouris. – Italia, Springer-Verlag, 2010. – P. 356.

115. Multislice computed tomography versus contrast-enhanced ultrasound in evaluation of complex cystic renal masses using the Bosniak classification system / D.-A. Clevert, N. Minaifar, S. Weckbach [et al.] // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2008. – Vol. 39, N. 1–4. – P. 171–178.

116. New contrast enhanced ultrasonography agent: Impact of Sonazoid on radiofrequency ablationjgh_6678 616..621 / A. Hiraoka, H. Yoichi, O. Morikazu

[et al.] // Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2011. – N. 26. – P. 613–618.

117. Piscaglia F. The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations / F. Piscaglia // Ultrasound Med Biol. – 2006. – N. 32. – P. 1369–1375.

118. Physical and biochemical stability of Optison, an injectable ultrasound contrast agent / S1. Podell, C. Burrascano, M. Gaal [et al.] // Biotechnol Appl Biochem. – 1999. – N. 30. – P. 213–223.

119. Relationship between Enhanced Intensity of Contrast Enhanced Ultrasound and Microvessel Density of Aortic Atherosclerotic Plaque in Rabbit Model / Y. Xiangdong, H. Pintong, Z. Chao [et al.] // Shuyuan Chen PLoS One. – 2014. – N. 9(4). – P. 924–945.

120. Role of contrast-enhanced ultrasound in follow-up assessment after ablation for hepatocellular carcinoma / S.G. Zheng, H.X. Xu, M.D. Lu [et al.] // World J Gastroenterol. – 2013. – N. 19. – P. 855–865.

121. Role of contrast enhanced ultrasound in the assessment of biliary duct disease / Z. Spârchez, P. Radu // Med Ultrason. – 2014. – Vol. 16, N. 1. – P. 41–47.

122. Surveillance of a coiled renal artery aneurysm by contrast-enhanced ultrasound with Definity / G. Low, S.D. Winters, R.J. Owen // Definity J Vasc Surg. – 2011. – N. 54(6). – P. 1801–1804.

123. The gross classification of hepatocellular carcinoma: usefulness of contrast-enhanced US / J. Clin, K. Hatanaka, Y. Minami [et al.] // Ultrasound. – 2014. – N. 42(1). – P. 1–8.

124. The impact of vascular and nonvascular findings on the noninvasive diagnosis of small hepatocellular carcinoma based on the EASL and AASLD criteria / S. Leoni, F. Piscaglia, R. Golfieri [et al.] // Am J Gastroenterol. – 2010. – N. 105. – P. 599–609.

125. The kidney: imaging with microbubble contrast agents / J.-M. Correas, M. Claudon, F. Tranquart [et al.] // *Ultrasound Quarterly*. – 2006. – Vol. 22. – N. 1. – P. 53–66.

126. Therapeutic response assessment of high intensity focused ultrasound therapy for uterine fibroid: utility of contrast-enhanced ultrasonography / X.D. Zhou, X.L. Ren, J. Zhang [et al.] // *Eur J Radiol*. – 2007. – N. 62. – P. 289–294.

127. The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations / F. Piscaglia, L. Bolondi // *Ultrasound Med Biol*. – 2006. – N. 32. – P. 1369–1375.

128. This module reflects the initial scientific discussion for the approval of Sonovue and has been updated until 1 October 2004. For information on changes after this date please refer to module 8B [Electronic Resource] // European Medicines Agency. – 2004. – URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000303/WC500055376.pdf.

129. The ultrasound contrast agent Levovist helps with the differentiation between accessory spleen and lymph nodes in the splenic hilum: a pilot study [in German] / A. Herbay, C. Vogt, D. Häussinger // *Z Gastroenterol*. – 2004. – N. 42. – P. 1109–1115.

130. The usefulness of contrast-enhanced ultrasound with Sonazoid for evaluating liver abscess in comparison with conventional B-mode ultrasound / M1. Kishina, M. Koda, S. Tokunaga [et al.] // *Hepato Res*. – 2014. – P. 28–34.

131. Ultrasound contrast agents: properties, principles of action, tolerance, and artifacts / J.M. Correas, L. Bridal, A. Lesavre [et al.] // *Eur Radiol*. – 2001. – N. 11. – P. 1316–1328.

132. Ultrasound contrast agents: balancing safety versus efficacy / M.L. Main, J.H. Goldman, P.A. Grayburn // *Expert Opin Drug Saf* 8. – 2009. – P. 49–56.

133. Ultrasound contrast agents and ultrasound molecular imaging / Q. Wen, S. Wan, Z. Liu [et al.] // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2014. – N. 14(1). – P. 190–209.
134. Ultrasonographic detection of focal liver lesions: increased sensitivity and specificity with microbubble contrast agents / J. Hohmann, T. Albrecht, C.W. Hof [et al.] // *Eur J Radiol.* – 2003. – N. 46. – P. 147–159.
135. Zdren M. Ultrasonography of the spleen. Pictorial essay / M. Zdrenghea, R. Badea // *Med Ultrason.* – 2014. – N. 16(1). – P. 48–59.
136. Updated safety information on definity (perflutren injectable suspension) [Electronic Resource] // Health Canada. – 2008. – URL: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/medeff/advisories-avis/prof>.
137. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images / K. Korenaga, M. Korenaga, M. Furukawa [et al.] // *J Gastroenterol.* – 2009. – N. 44. – P. 733–742.
138. Utility of contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma / R. Masuzaki, S. Shiina, R. Tateishi // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2011. – N. 26. – P. 759–64.
139. Value of contrast-enhanced ultrasonography for detecting renal infarcts proven by contrast enhanced CT. A feasibility study / M. Bertolotto, A. Martegani, L. Aiani [et al.] // *European Radiology.* – 2008. – Vol. 18, N. 2. – P. 376–383.