

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

### ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА Mn-ТРАНС-1,2-ДИАМИНОЦИКЛОГЕКСАН-N,N,N',N'- ТЕТРААЦЕТАТА (ЦИКЛОМАНГА) В КАЧЕСТВЕ ПАРАМАГНИТНОГО КОНТРАСТНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ

В. Ю. Усов<sup>1</sup>, М. Л. Белянин<sup>2</sup>, А. И. Безлепкин<sup>1</sup>, А. А. Чуринов<sup>3</sup>, Т. Ю. Дубская<sup>3</sup>,  
Т. Л. Ветошкина<sup>3</sup>, В. Д. Филимонов<sup>2</sup>

Проведено доклиническое исследование 0,5 М раствора комплекса Mn(II)-транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (Mn-ДЦТА, цикломанг) в качестве возможного аналога парамагнитных контрастных препаратов, лишённого риска высвобождения гадолиния. Токсикологические исследования Mn-ДЦТА проводили на мышах и крысах. Жидкостные фантомы были использованы для определения релаксивности Mn-ДЦТА, в сравнении с Gd-ДТПА и Mn-ДТПА. Визуализационные свойства Mn-ДЦТА изучали при МРТ у собак с церебральными менингиомами ( $n = 10$ ). LD<sub>50</sub> при однократном введении у крыс была более 17 мл/кг массы тела, незначительно превышая таковую для Gd-ДТПА и Mn-ДТПА. Релаксивность R1 для Mn-ДЦТА составляла R1 = 3,68 1/(мМ · с) и не отличалась достоверно от релаксивности Gd-ДТПА. Mn-ДЦТА обеспечивал высокоинтенсивное контрастирование опухолей мозга у собак. Mn-ДЦТА может быть использован в качестве контраста-парамагнетика.

**Ключевые слова:** Mn(II)-транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетраацетат; Mn-ДЦТА; МРТ; парамагнитное контрастирование; доклиническое исследование

## ВВЕДЕНИЕ

Высокая диагностическая эффективность парамагнитного контрастирования при магнитно-резонансной томографии (МРТ) в клинике [1] и одновременно научная информативность МРТ-исследований с контрастированием в эксперименте [13] сегодня несомненны. Наряду с используемыми уже много лет парамагнетиками на основе комплексов гадолиния [9], разрабатываются новые парамагнитные соединения на основе других лантанидов [22], металл-несодержащих высокомолекулярных парамагнитных соединений [4, 6], комплексов фтора [15]. Одним из рациональных направлений развития выглядит создание клинических парамагнитных диагностических препаратов на основе комплексов марганца (II) — природного микроэлемента и в то же время — мощного парамагнетика, незначительно отличающегося от гадолиния по физическим магнитным параметрам. В особенности такой подход важен для перспективного создания средств парамагнитного контрастирования специфических па-

тологических процессов, из молекулы которых высвобождение парамагнетика в организме пусть невелико, но заметно, что можно допустить для марганца, но неприемлемо для гадолиния.

В последнее время озабоченность возможными токсическими последствиями применения комплексов Gd [17, 18] стимулировала исследования комплексов Mn с линейными комплексоном ДТПА и ЭДТА [10], и циклическим — ДЦТА [11]. Предварительный квантово-химический анализ механизмов релаксации в водных биологических средах в условиях магнитных полей, обеспечиваемых МР-томографами с напряженностями 0,2 – 3Т позволил нам предполагать, что комплекс марганца с полиацетатным хелатом, включающим в свой состав циклическую структуру, например циклогексан [11], мог бы обладать высокой, возможно превосходящей линейные полиацетаты, релаксивностью. В качестве такого комплексообразователя мы остановились на транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоте (ДЦТА), кроме того широко применяемой в биологических исследованиях и в ЯМР-спектроскопии в качестве хелата лантанидов [12]. Внимание к существующему риску редких токсических последствий применения парамагнитных комплексов Gd [17, 18] стимулировало детальные физико-химические исследования комплексов Mn с такими производными и аналогами ДТПА, как ЭДТА, ЦДТА, ТМДТА,

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН, 634012, Томск 12, ул. Киевская, 111А.

<sup>2</sup> Кафедра органической химии и органического синтеза Национального исследовательского Томского политехнического университета, 634050, Томск, ул. Ленина, 43/1.

<sup>3</sup> ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, Томск, ул. Ленина, 7.

БИМП, ЭГТА и ААЗТА [19]. При этом в последнее время в детальном физико-химическом исследовании F. Kalman and G. Tirco [19] было показано, что по физико-химическим показателям комплексы Mn-ЦЦТА и Mn-ААЗТА обладают наилучшими показателями стабильности в физиологическом спектре значений pH и не высвобождают токсически значимое количество Mn при длительной экспозиции в физиологических средах.

Использование Mn(II)-ДЦТА в практике МРТ было бы оправдано уже сегодня в том случае, если бы удалось доказать наряду с физико-химическими свойствами практическую применимость Mn-ДЦТА *in vivo*, т.е. низкую токсичность препарата не только в физико-химическом эксперименте, но и в соответствии с токсикологическими требованиями и правилами [8].

Мы осуществили синтез комплекса Mn(II) с транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислотой (названного нами цикломангом) и оценили его токсикологические характеристики при однократном введении экспериментальным животным и существенные для МРТ визуализирующие свойства.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Синтез и очистка.** 0,5 М раствор комплекса  $Mn^{2+}$ -транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, Mn-ДЦТА, был получен на кафедре органической химии химико-технологического факультета Национального исследовательского Томского политехнического университета, в один этап из оксида марганца (II) и  $NaH_2DЦТА$ , с выходом в итоге 0,5 М раствора Mn-ДЦТА при отсутствии определяемых концентраций свободного марганца, без токсических примесей и при небольшом избыточном количестве свободного ДЦТА (до 0,55 %), при pH готового раствора фармацевтической формы в пределах 6,7 – 7,4. Растворы Mn-ДЦТА автоклавировались при  $t = 140\text{ }^\circ\text{C}$  и фильтровали через мембранные микрофильтры Millipore (США) (размер пор менее 0,22 мкм), с получением стерильного раствора для внутривенного введения. Препарат помещали в стандартные флаконы по 10 и 20 мл под резиновой пробкой с закатыванием и повторным автоклавированием в течение часа, и использовали как для физико-химических исследований, так и для экспериментов на лабораторных животных. Лекарственная форма Mn-ДЦТА представляет собой прозрачную, с трудноуловимым слабо-желторозовым оттенком жидкость без осадка, pH 6,4 – 7,4, при незначительном избытке хелатора в пределах 0,25 – 0,6 % во всех сериях изготовленного препарата.

**Оценка химической чистоты и физико-химических параметров.** С помощью общепринятых лабораторных методов исследования [2] оценивали плотность, вязкость и осмолярность Mn-ДЦТА. Для сравнения те же параметры одновременно определяли для инъекционных форм гадопентетата (0,5 М раствор

Gd-ДТПА) и манганпентетата (0,5 М раствор Mn-ДТПА). Химическую чистоту препарата оценивали по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, в пробах препарата непосредственно после его получения и спустя 3 мес, 6 мес и 1 год. Показатели константы термодинамической стабильности и протонирования комплекса Mn рассчитывали для формирования комплекса [Mn-ДЦТА]

$$K_{Mn-ДЦТА} = \frac{[Mn-ДЦТА]}{[Mn] \cdot [H_2ДЦТА]}$$

pH-потенциометрическое титрование выполняли с помощью титровальной рабочей станции Methrohm 888 Titrand с помощью комбинированного электрода Metrohm-6.0233.100. При титровании все растворы (в объеме 10,0 мл) термостатировали при 25 °С. Образцы перемешивали и постоянно держали в атмосфере  $N_2$ , как инертного газа, с целью избежать возможных эффектов  $CO_2$ . Для калибровки pH были использованы буферы КН-фталевой кислоты (pH 4,005) и боракса (pH 9,177).

**Фантомные исследования.** Для оценки возможности использования Mn-ДЦТА в качестве контрастного препарата были проведены исследования МРТ в T1-взвешенном режиме на фантомах, заполненных физраствором с содержанием в нем растворенного Mn-ДЦТА от 0,25 мМ до 64 мМ, т.е. в пределах, достигаемых в тканях при введении обычных доз контрастного средства — 0,2 мл/кг массы тела (0,1 мМ/кг). Фантомные исследования проводились при времени повторения T1-взвешенного исследования  $TR = 200\text{ мс} - 1500\text{ мс}$ . Рассчитывали по классической методике [23] показатели релаксивности при напряженности магнитного поля 0,2 Т (МР-томографа Магнетом Опен, Сименс Медикал).

**Исследование токсичности препарата у лабораторных животных.** Оценка острой токсичности в соответствии с государственными нормативами России по изучению новых фармакологических веществ [5] была проведена на половозрелых белых неинбредных мышцах (поровну по 20 самцов и самок, исходная масса тела 20 – 30 г) и крысах (также по 20 самцов и самок, исходная масса тела 130 – 250 г), разводки лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. Содержание животных осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), с соблюдением всех необходимых требований содержания и кормления [3]. Контролем служили животные (по 5 самцов и самок), получившие в эквивалентном объеме физиологический раствор. Mn-ДЦТА вводили мышам и крысам однократно внутривенно, внутрижелудочно и подкожно. Длительность наблюдения за животными составляла до 14 дней. В ходе эксперимента следили за поведением, внешним видом, двигательной активностью, реакцией животных на

внешние раздражители, массой тела. Измеряли температуру тела, исследовали показатели форменных элементов периферической крови, костного мозга, функцию печени, ЦНС и ЭКГ, а также морфологию основных внутренних органов. Температуру тела измеряли ректально с помощью медицинского электротермометра ТПЭМ-1. Состояние костномозгового кровотока у крыс оценивали путем подсчета общего количества миелокарицитов (ОКК) на бедренную кость ( $10^6$ /бедро) и миелограмм на мазках, приготовленных из гомогената фрагмента миелоидной ткани, взятой из сегмента грудины, и аутологичной сыворотки (1:1), комбинированно окрашенных фиксатором-красителем Май-Грюнвальда и азур II-эозином по Нохту. Процентное содержание отдельных клеточных форм при подсчете миелограмм переводили в абсолютные цифры —  $\cdot 10^6$  клеток на бедро.

Для изучения патоморфологии острой токсичности Мп-ДЦТА вводили крысам массой 150 – 220 г внутривенно однократно в дозе 5,0 мл/кг. Контрольные животные получали внутривенно инъекцию физиологического раствора в дозе 5,0 мл/кг. В каждой группе было по 10 крыс (по 5 самок и 5 самцов). Макро- и микроскопическое исследование проводили через 10 сут после введения. После забоя животных путем декапитации и взятия крови, проводили вскрытие крыс, макроскопическое исследование внутренних органов и определение их массы. Для микроскопического исследования были взяты следующие органы: головной мозг, сердце, легкое, печень, почка, мочевой пузырь, желудок, тонкая и толстая кишка, поджелудочная и щитовидная железы, селезенка, тимус, надпочечник, яичник или семенник. Кусочки органов фиксировали в формалине и заливали в парафин. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

**Оценка кинетики в организме и контрастированные МРТ-исследования у животных.** Оценку возможности использования Мп-ДЦТА для визуализации патологических процессов проводили в ходе ветеринарно-клинического обследования 10 собак (вес тела 10 – 45 кг) с опухолевыми поражениями (менингеомами) головного мозга, заподозренными и выявленными у амбулаторных пациентов ветеринарной клиники. Диагноз данного опухолевого поражения устанавливали на основании гистологического исследования удаленных препаратов. Исследование проводили с использованием радиочастотной катушки для исследований головы. Перед проведением исследования животные получали наркоз, путем внутривенной капельной инфузии раствора рекофола, до 5 мл/ч. Раствор Мп-ДЦТА вводили внутривенно в дозе 2 мл/10 кг массы тела, эквивалентной рекомендованной производителями для препаратов омнискан (“Никомед”), магневист (“Байер”) и оптимарк (“Маллинкродт”). Использовали  $T_1$ -взвешенный спин-эхо режим (TR = 400 мс; TE = 15,0/1 мс, толщина среза —

SL = 5,0, в матрицу  $256 \times 256$ ), до и спустя 10 – 15 мин после введения парамагнетика. Оценку контрастирующего эффекта Мп-ДЦТА осуществляли по величине индексов усиления изображения, которые рассчитывали как отношение:  $IY = (\text{Интенсивность } T_{1\text{-взв. МРТ}} \text{ после Мп-ДЦТА}) / (\text{Интенсивность } T_{1\text{-взв. МРТ}} \text{ Исходная})$ . При обработке результатов исследований с помощью средств выделения зон интереса на изображениях  $T_1$ -взвешенных МРТ, при TR = 400 – 420 мс, выделяли области подкожной клетчатки, мышц, корковых и мозговых отделов почек, печеночной паренхимы, головного мозга. Для каждой области рассчитывался представленный индекс усиления. Динамические исследования кинетики накопления Мп-ДЦТА в опухоли в связи с их большей продолжительностью и проблемой длительной анестезии у ветеринарных собак в данном исследовании не проводили. До исследования и в ходе контрастированной МРТ (т.е. на 0, 20, 45 и 120 мин) у собак брали пробы венозной крови для оценки уровня свободного Мп в плазме. Содержание марганца в цельной крови определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ELAN DRC II, производства PerkinElmer Sciex Corp.). Статистический анализ результатов выполняли с расчетом критерия Стьюдента для парных и непарных выборок с помощью пакета статистических и графических программ Origin 6.11 (OriginLab Inc, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Химическую устойчивость* Мп-ДЦТА в 0,5М растворе при pH 6,4 – 7,5 характеризовали константой термодинамической стабильности, которая составила 19,6. Эта величина несколько выше, но близка к константе стабильности для гадопентетата (составляющей 17,9 – 18,1) и означает практическое отсутствие диссоциации Мп-ДЦТА в плазме и других жидкостях и средах организма человека. Величина кинетической константы стабильности была незначительно выше — в пределах 19,8 – 21,3. По показателям вязкости и осмоляльности Мп-ДЦТА также достоверно не отличался от гадопентетата (табл. 1).

*Токсичность.* Токсичность Мп-ДЦТА оценивали по величинам  $LD_{50}$  (табл. 2). Так, при первоначальном введении Мп-ДЦТА внутривенно однократно в дозе 10 мл/кг крысам (предельный объем для введения этим лабораторным животным), не наблюдали гибели животных и каких-либо патологических изменений общего состояния, динамики общей массы, функциональной активности и морфологии изученных внутренних органов и систем. Последующее введение этим животным внутривенно больших количеств препарата выявило, что для 0,5 М раствора Мп-ДЦТА показатель  $LD_{50}$  достоверно превышает 17,5 мл/кг массы. Изменений содержания марганца в плазме крови крыс при введении им Мп-ДЦТА, не происходило. Введение препарата животным внутривенно в дозах, превышающих 19 мл/кг массы, не проводили. Величи-

ны LD<sub>50</sub> позволяют отнести препарат в соответствии с ГОСТ 121007-76 к группе 4 (малоопасные вещества).

Микроскопическое исследование внутренних органов всех экспериментальных крыс при однократном внутривенном введении Mn-ДЦТА в дозе 10,0 мл/кг

массы тела, что препарат не оказывает токсического влияния на морфологию внутренних органов животных. В показателях периферической крови крыс на 14 сутки после однократного внутривенного введения Mn-ДЦТА в дозе 10 мл/кг не было выявлено статисти-

Таблица 1. Биофизические характеристики комплекса Mn-ДЦТА ( $M \pm m$ )

Контраст — парамагнетик	Mn-ДЦТА (цикломанг)	Mn-ДТПА	Gd-ДТПА (гадопентетат)
Релаксивность R1, при $B_0 = 0,2T$ , $mmol^{-1} \cdot c^{-1}$	3,68 ± 0,08	3,25 ± 0,06	3,75 ± 0,09
Вязкость, мПа · с, при 37 °С	2,97 ± 0,07	2,77 ± 0,07	2,90 ± 0,05
Осмоляльность, мОсмоль/(кг H <sub>2</sub> O), при 37 °С	1754 ± 21	1947 ± 34	1955 ± 15
lgK <sub>Mn-ДЦТА</sub> (константа термодинамической стабильности, при pH 7,4)	19,6	15,6	18,1

Таблица 2. LD<sub>50</sub> при однократном внутривенном введении крысам 0,5 М раствора комплекса Mn-ДЦТА, Gd-ДТПА и Mn-ДТПА ( $M \pm m$ )

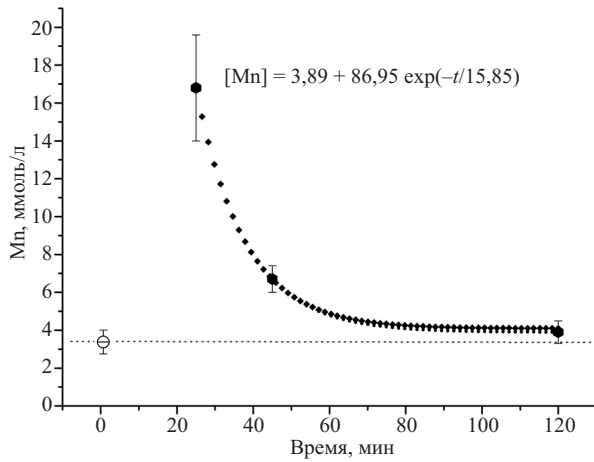
Контраст — парамагнетик	Mn-ДЦТА (цикломанг)	Mn-ДТПА	Gd-ДТПА (гадопентетат)
LD <sub>50</sub> , при однократном введении в вену, мл/кг	17,1 ± 1,2	14,1 ± 0,8	16,9 ± 1,1

Таблица 3. Показатели периферической крови крыс на 14-е сутки после однократного введения Mn-ДЦТА в максимально допустимой дозе 10 мл/кг ( $M \pm m$ )

Показатель	Самцы		Самки	
	Mn-ДЦТА	Контроль	Mn-ДЦТА	Контроль
Гемоглобин, г/л	134,6 ± 4,2	136,5 ± 6,2	132,9 ± 8,3	135,7 ± 7,1
Эритроциты, тыс/л	7,92 ± 0,29	8,15 ± 0,34	7,84 ± 0,72	7,92 ± 0,63
Ретикулоциты, %	43,7 ± 2,9	47,2 ± 3,5	48,4 ± 3,4	53,5 ± 6,1
Гематокрит, %	38,9 ± 1,4	40,1 ± 2,1	36,2 ± 3,1	38,7 ± 2,9
Тромбоциты, г/л	791 ± 73	852 ± 51	804 ± 181	833 ± 107
СОЭ, мм/ч	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,4	2,4 ± 0,4	4,1 ± 1,1
Общее число лейкоцитов, г/л	14,3 ± 1,5	15,4 ± 2,3	12,5 ± 4,4	13,5 ± 2,2
Базофилы, г/л	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Эозинофилы, г/л	0,18 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,11	0,25 ± 0,12
Незрелые нейтрофилы, г/л	0,21 ± 0,10	0,21 ± 0,09	0,09 ± 0,05	0,14 ± 0,07
Зрелые нейтрофилы, г/л	1,35 ± 0,19	1,34 ± 0,30	1,32 ± 0,08	1,43 ± 0,33
Моноциты, г/л	1,28 ± 0,09	1,43 ± 0,42	0,83 ± 0,25	1,21 ± 0,34
Лимфоциты, г/л	10,32 ± 1,29	9,95 ± 1,26	9,37 ± 3,95	8,53 ± 1,94

Таблица 4. Биохимические показатели крови у крыс на 14-е сутки после однократного введения Mn-ДЦТА в дозе 10,0 мл/кг ( $M \pm m$ )

Показатель	Самцы		Самки	
	Mn-ДЦТА	Контроль	Mn-ДЦТА	Контроль
АлАТ, мккат/л	0,56 ± 0,05	0,54 ± 0,03	0,42 ± 0,05	0,39 ± 0,02
АсАТ, мккат/л	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,49 ± 0,01
ЩФ, Е/л	814,8 ± 42,7	827,7 ± 53,4	454,0 ± 83,9	375,7 ± 76,0
Глюкоза, ммоль/л	6,59 ± 0,53	6,83 ± 0,69	9,07 ± 0,89	8,25 ± 0,51
Мочевина, ммоль/л	6,75 ± 1,19	6,12 ± 0,71	6,43 ± 1,06	6,94 ± 0,57
Креатинин, мкмоль/л	52,47 ± 1,55	48,59 ± 1,87	80,87 ± 4,31	76,36 ± 10,92
Белок, г/л	51,95 ± 1,25	50,81 ± 1,76	59,50 ± 1,32	62,53 ± 2,76
Холестерин, ммоль/л	2,27 ± 0,27	2,27 ± 0,11	2,41 ± 0,21	2,03 ± 0,86
Общий билирубин, мкмоль/л	9,43 ± 0,89	9,45 ± 2,03	5,17 ± 0,86	7,30 ± 0,70

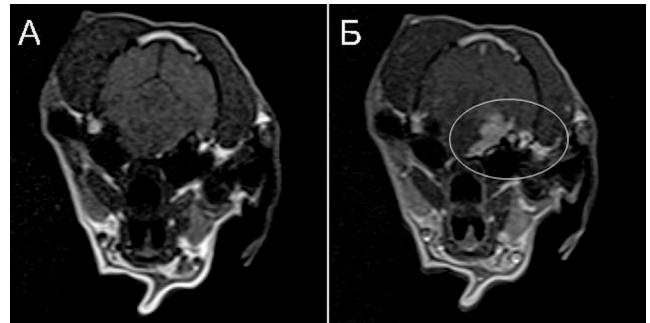


**Рис. 1.** Динамика концентрации марганца в крови собак при инъекции Mn-ДЦТА ( $n = 9$ ). Исходный уровень Mn представлен пунктирной линией от исходного значения. Аппроксимация послеинъекционных значений в моменты (20 мин, 45 мин, 120 мин) представлена моноэкспоненциальной зависимостью вида  $y = y_0 + A_{\text{exp}}(-t/t_0)$ .

чески значимых отличий от таковых у животных соответствующей контрольной группы (табл. 3, 4). Микроскопическое исследование костного мозга не выявило достоверной разницы в показателях содержания костномозговых клеточных форм. Признаков миелотоксичности Mn-ДЦТА не выявлено. Введение Mn-ДЦТА не приводило к изменению показателей функционального состояния почек.

*Релаксивность Mn-ДЦТА* представлена, в сравнении с препаратами сравнения — мангапентетатом и гадопентетатом — в табл. 1. Показатель спин-решетчатой релаксивности R1 Mn-ДЦТА заметно превосходил величину для мангапентетата и был близок к релаксивности гадопентетата. Максимум усиления изображения фантомов наблюдали в интервале концентраций в среде 1,0–4,0 мМ. При этом усиление интенсивности  $T_{1\text{-взв}}$  спин-эхо изображений оказывается более высоким для более коротких времен повторения TR — в интервале 300–700 мс. Это позволяет предполагать применимость препарата не только для контрастирования объемных патологических процессов, сопровождающихся повреждением гистогематических барьеров, но и для МР-ангиографических исследований, для оценки экскреторной функции почек, исследований уродинамики, а также кинетики проникновения препарата через гистогематические барьеры.

*Кинетика уровня Mn в крови после введения Mn-ДЦТА.* При проспективной оценке уровня марганца в крови у собак после инъекции Mn-ДЦТА отмечали временную динамику, представленную на рис. 1. Можно видеть, что первоначально на 20–26 мин отмечали выраженное увеличение уровня Mn в крови животных, которое практически нивелировалось к 120 мин. Временная динамика уровня Mn в плазме примерно укладывается в экспоненциальную кривую, с показателем  $t_{1/2} = 10,7$  мин, что типично для клирен-



**Рис. 2.** Апробация контрастирующих свойств Mn-ДЦТА *in vivo* у собаки (пудель, 12 кг) с повторными судорожными приступами, нарушениями походки и глухотой на левое ухо. МРТ в T1-взв. режиме при TR = 480 мс, TE = 15 мс. Слева (А) исходный фронтальный срез на уровне мостомозжечковых углов. Справа (Б) срез на том же уровне спустя 15 мин после введения 2,5 мл 0,5 М раствора Mn-ДЦТА. Ясно визуализируется опухолевое накопление парамагнетика в области менингеомы мостомозжечкового угла (область выделена). Прирост индекса отношения интенсивностей (опухоль/здоровая ткань) при контрастировании с исходной от 0,96 до 2,21.

са полидентатных комплексов металлов, распределяющихся в плазме крови и выводимых почками. При этом уровень горизонтальной асимптоты, к которой стремится зависимость уровня марганца крови от времени составляла 3,89 мкМ. Учитывая, что исходная величина содержания марганца составляла в крови 3,4 мкМ, разница составляла 0,59 мкМ. Очевидно, что несмотря на значительный статистический разброс, эта величина характеризует высвобождение марганца из комплекса в крови за счет трансметаллирования. Хотя очевидно, что к 120 мин исследования вымывание собственно Mn-ДЦТА из крови было еще далеко не полным, если все же относить указанную величину прироста целиком на счет марганца, высвободившегося из состава комплекса при трансметаллировании, то, с учетом введения препарата в дозе 1 мМ/10 кг массы тела, т.е. примерно 1,33 мМ в циркулирующей крови [3], это дает оценочную величину реальной доли высвобождения металла из комплекса в крови собак —  $4,5 \cdot 10^{-4}$  от общей введенной дозы.

*Визуализационные свойства in vivo у собак с опухолями ЦНС.* Сочетание нетоксичности и высокой релаксивности Mn-ДЦТА позволило предполагать, что это соединение окажется высокоэффективным в качестве контраста-парамагнетика *in vivo*. При введении Mn-ДЦТА собакам с менингеомами головного мозга достоверное накопление парамагнетика происходило в области жизнеспособной ткани опухоли, где сочеталось наличие опухолевого кровотока с поврежденным гистогематическим барьером (рис. 2). При этом степень усиления изображения достоверно отличалась от 1 только в зонах опухолевой ткани (ИУ =  $1,55 \pm 0,12$ ) и в области гипофиза (ИУ =  $1,46 \pm 0,10$ ), в котором накопление парамагнетиков отмечается и в норме. Накопления препарата в неповрежденной ткани мозга не

происходило. Внутренние органы, за исключением почек, — а именно печень, скелетные мышцы, легкие, миокард не изменяли интенсивности  $T_{1-взв.}$  изображения при введении Mn-ДЦТА в дозировке 0,1 мМ/кг массы. Интенсивность изображения почек усиливалась значительно ( $IУ = 1,68 \pm 0,12$ ). Таким образом, в эксперименте *in vivo* при введении Mn-ДЦТА МРТ в  $T_{1-взв.}$  режиме визуализировала проникновение его в область опухолевого нарушения гематоэнцефалического барьера.

Необходимость создания общедоступных контрастных препаратов для МРТ сегодня не вызывает сомнения, поскольку их применение резко повышает эффективность диагностических процедур и последующего лечения [1, 9]. Пока создание новых препаратов для клинической МРТ основывается на синтезе комплексов гадолиния, как наиболее сильного парамагнетика [20]. Внедрение в практику магневиста, а затем и омнискана, оптимарка, вьюгама [7, 14] составило эпоху в современном развитии лучевой диагностики.

Однако то, что гадолиний является в свободном виде токсичным ксенобиотиком, вызвало доказанные опасения, что незначительное, но достоверное высвобождение его в плазме из комплексов под конкурентным воздействием цинка, кальция, других двухвалентных ионов, приводит к тяжелым осложнениям в виде интерстициального фиброза почек у пациентов с хронической почечной недостаточностью [21]. В то же время для Mn, в пределах его физиологической концентрации в плазме, некоторое высвобождение из комплекса может быть приемлемо. Таким образом, возникла необходимость поиска и практической апробации контрастов-парамагнетиков для МР-томографической диагностики и на основе отличных от гадолиниевых соединений.

Ранее как *in vitro*, так и *in vivo* был исследован комплекс Mn-ДТПА [10]. Это соединение оказалось не уступающим по визуализирующим свойствам существующим комплексам гадолиния в эксперименте [10]. Однако теоретические представления о том, что комплекс Mn-ДТПА уступает в стабильности комплексам гадолиния [16], вызвал обоснованные предположения о его недостаточной безопасности и возможности диссоциации комплекса с высвобождением  $Mn^{2+}$  [8]. Необходимость получения комплекса Mn, обладающего более высокой, чем Mn-ДТПА, релаксивностью, и одновременно более устойчивого, очевидна. По результатам вычислительного квантовохимического моделирования структуры расположения молекул воды в окружении комплекса комплексон-парамагнетик и процессов релаксации при  $T_{1-взв.}$  последовательностях МР-томографии (при временах повторения 300 – 900 мс и временах эхо 15 – 50 мс) в качестве такого препарата был предложен комплекс Mn(II) с полиацетатным производным циклогексана — транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетраакусусной кислотой — Mn-ДЦТА.

В 2012 г. F. Kalman с сотрудниками опубликовали детальные результаты оценки устойчивости комплексов Mn в водных средах, и кинетики их трансметаллирования при избытках меди и кобальта [19], в которых достоверно показали, что даже в средах при нефизиологически высоких концентрациях ионов-конкурентов марганца, устойчивость комплексов Mn-ААЗТА и в особенности Mn-ДЦТА достаточна для того, чтобы оставаться нетоксичными. Данные кинетики уровня Mn в крови после однократного введения диагностической дозы показывают, что высвобождение составляет около  $4,5 \cdot 10^{-4}$  от введенной дозы, а изменение концентрации Mn в крови остается в пределах статистической ошибки.

Релаксивность Mn-ДЦТА (в концентрации 0,5 М — цикломанг) в нашем исследовании оказалась достоверно и значительно больше, чем у мангапентетата, и не уступала релаксивности гадопентетата. Постоянная устойчивость комплекса в водном растворе достоверно более 18, что меньше, чем в работе F. Kalman [19], и это исключает возможность практически значимой диссоциации комплекса Mn-ДЦТА в физиологических средах.

Пренебрежимая диссоциация Mn-ДЦТА, высокая релаксивность, невысокая осмоляльность и плотность объясняют низкую токсичность Mn-ДЦТА.  $LD_{50}$  для Mn-ДЦТА больше 17,0 мл/кг массы, тогда как диагностическая доза составляет обычно 0,2 мл/кг массы. Соотношение этих величин дает диагностический диапазон до 85. Это в клинических условиях позволит практически безопасно обеспечить любые необходимые режимы и протоколы однократного или повторного контрастирования.

Накопление препарата *in vivo* соответствовало типичной кинетике гидрофильных контрастов — маркеров проницаемости гистогематических барьеров. В частности, паренхиматозные органы с интактным гистогематическим барьером не демонстрировали никакого накопления препарата. Почки, активно фильтрующие Mn-ДЦТА в норме, за счет этого выражено констатировались при введении обычных диагностических доз препарата.

При опухоли головного мозга у собак препарат с высокой интенсивностью за счет фильтрации и экстравазации накапливается в зонах расположения жизнеспособной перфузируемой опухолевой ткани. Величина спин-решеточной релаксивности  $R1 = 3,68 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  в водных средах позволит осуществлять на МР-томографах полноценные МР-аниографические исследования с высокой скоростью нарастания градиентов. Однако для заключений о диагностических возможностях Mn-ДЦТА очевидно будет необходимым исследование его в клинических и близких к клиническим экспериментальных *in vivo* условиях на высокопольных и сверхвысокопольных томографах.

## ВЫВОД

Mn-ДЦТА превосходит по показателям химической устойчивости, безопасности и релаксивности другие комплексы Mn(II), обладает высокими визуализационными диагностическими свойствами и является перспективным в качестве парамагнитного контрастирующего агента.

Авторы благодарят Проф. Ференца Кальмана и Д-ра Дьюлу Тирсо (Университет Дебрецена, Венгрия) за неоценимую помощь — предоставленные материалы и методики оценки констант стабильности комплексных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Кармазановский, Н. Л. Шимановский, *Мед. визуализация*, № 4, 126 – 132 (2007).
2. А. Г. Касаткин, *Основные процессы и аппараты химической технологии*, Химия, Москва (1998).
3. *Лабораторные животные*, Руководство Н. Н. Каркищенко (ред). “ВПК”, Москва (2003).
4. В. И. Овчаренко, Е. Ю. Фурсова, К. Н. Сорокина и др., *Докл. АН*, **403**(2), 171 – 175 (2005).
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Р. У. Хабриев (ред), Медицина, Москва (2005).
6. К. Н. Сорокина, *Дис. канд. мед. наук*, Томск (2006).
7. Н. Л. Шимановский, *Диагностическая и интервенционная радиология*, **3**(1), 5 – 15 (2010).
8. Н. Л. Шимановский, *Экспер. и клин. фармакол.*, **71**(4), 47 – 48 (2008).
9. Л. А. Тютин, Н. Л. Шимановский, Т. Н. Трофимова, *Мед. визуализация*, № 3, 125 – 131, (2004).
10. В. Ю. Усов, М. Л. Белянин, О. Ю. Бородин и др., *Мед. визуализация*, № 4, 134 – 142 (2008).
11. В. Ю. Усов, М. Л. Белянин, О. Ю. Бородин и др., *Химия и медицина*, ОрХиМед-2009, Уфа (2009), сс. 74 – 75.
12. M. B. Bass, H. J. Fromm, *Anal. Biochem.*, **145**(2), 292 – 301 (1985).
13. V. C. te Boekhorst, M. J. Cramer, G. Pasterkamp, et al., *Int. J. Cardiovasc. Imaging*, **26**(4), 447 – 457 (2010).
14. D. H. Carr, J. Brown, G. M. Bydder, et al., *Gadolinium-DTPA as a contrast agent in MPI: Initial clinical experience in 20 patients*, *Am. J. Radiol.*, **143**(2), 215 – 224 (1984).
15. J. Chen, G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Wiley Interdiscip. Re. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2**(4), 431 – 440 (2010).
16. B. Gallez, C. Baudelet, J. Adline, et al., *Chem Res Toxicol.*, **10**(4), 360 – 363 (1997).
17. J. M. Idee, M. Port, I. Raynal, et al., *Fund. Clin. Pharmacol.*, **20**, 563 – 576 (2006).
18. J. M. Idée, M. Port, C. Robic, et al., *J. Magn. Reson. Imaging.*, **30**(6), 1249 – 1258 (2009).
19. F. K. Kalman, G. Tircsó, *Inorg. Chem.*, **51**(19), 10065 – 10067 (2012), DOI: 10.1021 / ic300832e.
20. D. McRobbie, E. A. Moore, M. J. Graves, M. Prince, *MRI from picture to proton*, Cambridge University Press, Cambridge (2004).
21. M. A. Perazella, *Curr. Drug. Saf.*, **3**(1), 67 – 75 (2008).
22. G. A. Pereira, J. A. Peters, F. A. Paz, et al., *Inorg. Chem.*, **49**(6), 2969 – 2974 (2010).
23. H. Petersson, R. M. Slone, S. Spanier, et al., *Radiology*, **167**(4), 783 – 785 (1988).

Поступила 26.12.12

## EVALUATION OF MANGANESE –TRANS-1,2-DIAMINOCYCLOHEXANE-N,N,N',N'-TETRAACETATE COMPLEX (CYCLOMANG) AS PARAMAGNETIC CONTRAST AGENT FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING

V. Yu. Usov<sup>1</sup>, M. L. Belyanin<sup>2</sup>, A. I. Bezlepkin<sup>1</sup>, A. A. Churin<sup>3</sup>, T. Yu. Dubskaya<sup>3</sup>, T. L. Vetoshkina<sup>3</sup>, and V. D. Filimonov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cardiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences, Kievskaya ul. 111a, Tomsk, 634012, Russia

<sup>2</sup> Department of Organic Chemistry and Organic Synthesis, Tomsk State Polytechnic University, ul. Lenina 43/1, Tomsk, 634050, Russia;

<sup>3</sup> Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Lenina 7, Tomsk, 634028, Russia

Preclinical evaluation of a 0.5 M solution of the manganese(II) – *trans*-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complex (Mn-DCTA, Cyclomang) has been carried out with a view to substitution of potentially toxic gadolinium-containing paramagnetic contrast agents for clinical MRI routines. The toxicological tests of Mn(II)-DCTA were performed on mice and rats. Liquid phantoms were used for evaluating the relaxivity of Mn(II)-DCTA in comparison to that of Gd(III)-DTPA and Mn-DTPA. The diagnostic imaging properties of Mn(II)-DCTA were quantitatively assessed on dogs with cerebral meningiomas ( $n = 10$ ). The LD<sub>50</sub> upon single administration in rats was above 17 ml/kg, thus slightly exceeding the corresponding values for of Gd(III)-DTPA and Mn-DTPA. The relaxivity of Mn(II)-DCTA amounted to  $R1 = 3.68 \text{ (mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$  and did not differ significantly from the values known for Gd-DTPA and Mn-DTPA. Mn(II)-DCTA ensured high-intensity contrast of tumor areas in brain of dogs. It is concluded that Mn(II)-DCTA can be employed as a paramagnetic contrast agent in routine MRI studies and is worth further clinical evaluation.

**Key words:** manganese(II) – *trans*-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate (Mn-DCTA); MRI; paramagnetic enhancement; preclinical evaluation