

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА “НАНОКОЛЛОИД, $^{99m}\text{Tc-AL}_2\text{O}_3$ ” ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

Н. В. Варламова¹, В. С. Скуридин¹, Е. А. Нестеров¹,
В. И. Чернов^{1, 2}, А. А. Тицкая^{1, 2}

Проведено исследование острой токсичности нанокolloидного препарата на основе гамма-оксида алюминия, меченного технецием. Исследование острой токсичности радиофармпрепарата проведено на 80 крысах (40 самцов и 40 самок) и 80 мышах (40 самцов и 40 самок) при внутрибрюшинном и подкожном введении. Исследование острой токсичности препаратов предполагает однократное введение фармакологического вещества и дальнейшее наблюдение за выжившими животными в течение 14 сут. На основании установленных границ токсичности и с учетом классификации токсичности по Березовской И. В. изученный препарат можно условно отнести к классу умеренно токсичных веществ. Действительные значения ЛД₅₀ находятся в диапазоне больших доз. Коэффициент безопасности для изученного препарата многократно превышает минимальное значение коэффициента безопасности — 100.

Ключевые слова: радиофармпрепарат (РФП); гамма-оксид алюминия; нанокolloид; лимфатический узел; острая токсичность; крысы; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

Сторожевые лимфатические узлы (СЛУ) представляют собой первые лимфатические узлы на пути оттока лимфы от злокачественной опухоли. Полагают, что если СЛУ не поражены метастатическим процессом, все остальные регионарные лимфоузлы остаются интактными [9, 11]. Повсеместное внедрение технологий выявления СЛУ позволило бы улучшить качество жизни 100 – 120 тыс. россиян, которым ежегодно не по показаниям выполняют оперативные вмешательства по поводу онкологической патологии [4, 8, 9, 12]. В мировой практике накоплен значительный опыт в отношении радионуклидной визуализации СЛУ при меланоме и раке молочной железы. При опухолях других локализаций эффективность данной методики изучается [2, 8, 9, 10, 11].

Оптимальным методом выявления СЛУ считается использование меченных технецием-99м коллоидных наноматериалов для сцинтиграфического или радиометрического определения локализации узла [10]. При этом определяющим фактором в выборе индикатора является размер радиоактивных частиц. Так, согласно данным [12], коллоид с размером частиц менее 50 нм может накапливаться не только в СЛУ, но и других узлах. Частицы более 100 нм медленно мигрируют с

места инъекции. Оптимальным для выявления СЛУ был признан коллоид с размером частиц от 50 до 80 нм.

Устойчивые коллоидные соединения были получены путем адсорбции восстановленного ^{99m}Tc на гамма-оксиде алюминия [6, 7]. При этом величина адсорбции радионуклида на поверхности оксида превышает 80 %. Основными предпосылками для использования наноразмерных порошков гамма-оксида Al_2O_3 в качестве “носителя» метки ^{99m}Tc является его низкая токсичность в сочетании с хорошими адсорбционными свойствами, доступностью и низкой стоимостью. Следует отметить, что короткоживущий технеций-99м является наиболее востребованным радионуклидом для проведения диагностических исследований практически во всех областях медицины. Радиофармпрепараты (РФП) на его основе используются более чем в 87 % всех радионуклидных исследований, проводимых с целью выявления различных заболеваний и оценки состояния живых систем. Это, в первую очередь, обусловлено его ядерно-физическими характеристиками: относительно коротким $T_{1/2}$ (6,02 ч) и энергией γ -излучения 0,1405 МэВ, обеспечивающих малую экспозиционную дозу и, вместе с тем, достаточную проникающую способность для проведения радиометрических измерений.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реагент для получения радиофармацевтического препарата “Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc-AL}_2\text{O}_3$ ” разработан в

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Российская Федерация, 634050, Томск, пр. Ленина, 30.

² Томский НИИ онкологии, 634050, Томск, пер. Кооперативный, 5.

лаборатории производства радиофармацевтических препаратов ТПУ, представлен в виде лиофилизата и имеет следующий состав:

Гамма-оксида алюминия нанопорошок	0,10 – 0,14 мг
Олова дихлорид дигидрат	не более 0,07 мг
Аскорбиновая кислота	0,8 – 1,0 мг
Желатин	8,0 – 10,0 мг

Для приготовления РФП в асептических условиях во флакон с реагентом с помощью шприца вводят 4 мл элюата из генератора технеция-99м общей активностью 1120 – 2000 МБк. Содержимое флакона перемешивают встряхиванием до полного растворения лиофилизата и инкубируют при температуре 70 – 80 °С в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры препарат готов к применению. РХЧ препарата > 95 %.

При выбранных условиях синтеза образуется нанокolloид, меченный технецием-99м, с требуемым размером частиц от 50 до 100 нм. Размеры наночастиц определяли при помощи установки Nanofox (Sympatec GmbH). Кроме того, для экспресс-определения количественного соотношения в препарате частиц с различными размерами использовали мембранные фильтры с диаметром пор от 25 до 220 нм.

Исследование безопасности применения изученного фармацевтического вещества в остром эксперименте проводили по условиям стандартных рекомендаций “Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [5].

Эксперименты по исследованию острой токсичности поставлены на 80 белых аутбредных крысах (40 самцов и 40 самок, вес самцов 220 – 260 г, масса самок 180 – 240 г, возраст 10 недель), и 80 белых аутбредных мышах (40 самцов и 40 самок, масса самцов 37 – 40 г, масса самок 27 – 29 г, возраст 10 недель) из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга.

В ходе эксперимента следили за поведением, внешним видом, общей массой, двигательной активностью, реакцией животных на внешние раздражители.

Дизайн исследования острой токсичности препаратов предполагал однократное введение фармакологического вещества и дальнейшее наблюдение за выжившими животными в течение 14 дней. Целью исследования явилось определение переносимых, токсических и летальных доз препарата с использованием метода Литчфилда и Уилкоксона [3], установление причин наступления гибели животных в течение 14 дней наблюдения, изучение влияния РФП на общее состояние, некоторые функциональные и морфологические показатели.

Использовался подкожный путь введения препарата, который предлагается для клинического применения [5], а также дополнительный путь введения — внутрибрюшинный — для получения данных о токсичности препарата при попадании вещества в орга-

низм экспериментальных животных иным путем, чем подкожное введение. Исследование острой токсичности было проведено при введении 3 доз препарата. Основываясь на объеме максимальной введенной дозы, последующие были введены со снижением объема исследуемого препарата вдвое. Максимально введенные объемы препарата регламентированы стандартными рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств [5], в которых оговаривается максимально допустимое количество жидкости для мышей и крыс при внутрибрюшинном и подкожном способах введения. Учитывая, что испытуемая форма препарата представляет собой бесцветную, прозрачную жидкость, ее дозирование опытным животным, равно как растворитель — контрольным животным, производили в мл/кг. Растворитель — раствор натрия хлорида 0,9 % в ампулах по 5 мл, производство ЗАО “Производственная фармацевтическая компания Обновление”, Новосибирск.

Препарат был введен крысам внутрибрюшинно и подкожно в дозах: 5, 10 мл/кг и в максимально возможном для данного пути введения количестве: при внутрибрюшинном способе введения — 5 мл/200 г массы тела животного и подкожно — 10 мл/200 г массы тела животного, что составило, соответственно, 25 и 50 мл/кг [5].

Мышам препарат был введен внутрибрюшинно и подкожно в дозах: 5, 10 мл/кг и в максимально возможном для внутрибрюшинного и подкожного пути введения — около 50 мл/кг (1 мл/20 г массы тела животного). Растворитель (физиологический раствор) вводили в максимально возможном для данного пути введения объеме.

В случае гибели экспериментальных животных планировалось проведение вскрытия, макро- и микроскопическое исследование внутренних органов.

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в организации-производителе исследований, которые соответствуют правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg (1986)). Эвтаназия животного проводится ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, путем ингаляции CO_2 .

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики с использованием программы статистического анализа StatPlus (AnalystSoftInc, версия 2009). Вычисляли среднее арифметическое (\bar{X}), ошибку среднего арифметического (m), значение вероятности (p). Различие 2 сравниваемых величин считали достоверным в том

случае, если вероятность их тождества была меньше 5 % ($p < 0,05$). Используя выборочные коэффициенты асимметрии и эксцесса, оценивали степень приближения закона распределения исследуемого признака к нормальному. Так как были выявлены отклонения распределений признака от нормального вида для независимых выборок, использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдение за животными всех групп в течение 14 дней не выявило никаких изменений внешнего вида, поведения и двигательной активности. Осмотр животных после введения препарата проводился в первые сутки после введения непрерывно в течение 8 ч, затем ежедневно. Оценивалось влияние препарата на поведение, потребление корма и воды, внешний вид, двигательную активность, реакцию животных на внешние раздражители. Ни по одному из регистрируемых параметров отклонений не было выявлено. При взвешивании крыс и мышей в конце эксперимента (через 2 недели) отмечено увеличение массы тела животных. Токсического влияния изучаемого препарата ни в одной из экспериментальных групп не выявлено.

Патологоанатомическое исследование проводили после окончания 14-дневного периода наблюдения за животными. В течение всего периода наблюдения гибели животных не было, исследованию подвергали крыс и мышей, получивших препарат в максимальной дозе, а также животных контрольных групп, получивших носитель.

При наружном осмотре и исследовании трупов крыс и мышей не установлены различия между состоянием животных опытных и контрольных групп: шерстный покров был гладкий, блестящий, кожа эластичная, подвижная, подкожная клетчатка умеренно выражена, видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений, патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. При патологоанатомическом вскрытии также не было установлено различий между животными подопытных и контрольных групп. Органы грудной и брюшной полостей имели анатомически правильное расположение и нормальную макроструктуру, каких-либо макроскопических патологических изменений не обнаружено.

В связи с отсутствием гибели животных параметр ЛД₅₀ РФП рассчитан условно, с учетом максимально введенного его объёма, что допустимо согласно методическим указаниям “Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств”. При расчете ЛД₅₀ методом графического представления данных на оси абсцисс откладывают логарифмы доз изучаемого препарата, а на оси ординат — процентное выражение гибели подопытных особей, трансформированное в условные вероятностные величины, называемые пробит (от английского

probability unit — вероятностная единица). В этом случае результаты исследования можно представить лишь в виде луча, совпадающего с осью абсцисс. В случае исследования веществ, обладающих токсическими свойствами, результаты представляются в форме S-образной кривой. В общей форме пробит-анализ, по мнению Беленького М. Л. [3], предназначен для определения линейной зависимости между дозами и эффектами, выраженными в пробитах:

$$y = a + bx,$$

где a — свободный член уравнения, определяющий расстояние до точки пересечения прямой с осью абсцисс; b — коэффициент, численно равный тангенсу угла наклона, образованного прямой и осью абсцисс. В случае отсутствия гибели животных в экспериментальном исследовании и, как следствие, отсутствия угла наклона у прямой “доза — эффект”, такие широко используемые способы вычисления пробит-анализа, как метод Литчфилда – Вилкоксона в данном случае не применимы из-за отсутствия основного параметра для проведения вычисления — гибели животных (летального исхода).

Согласно результатам проведенных экспериментов максимальный объем препарата составил при внутрибрюшинном введении у мышей (самок и самцов) — 50 мл/кг (объемная активность составила 12500 МБк/кг), у крыс (самок и самцов) — 25 мл/кг (объемная активность составила 6250 – МБк/кг). При подкожном пути введения у мышей (самок и самцов) — 50 мл/кг (объемная активность составила 12500 МБк/кг), у крыс (самок и самцов) — 50 мл/кг (объемная активность составила 12500 МБк/кг). Таким образом, с учетом того, что в 1 мл испытуемого раствора содержится 1 мг ^{99m}Tc-нанокolloида и параметр его ЛД₅₀ составил у мышей при внутрибрюшинном и подкожном введении — более 50 мг/кг (12500 МБк/кг); у крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении — более 25 мг/кг (6250 МБк/кг) и 50 мг/кг (12500 МБк/кг), соответственно.

На основании установленных границ токсичности и с учетом классификации токсичности по Березовской И. В. [1] изученный препарат можно условно отнести к классу умеренно токсичных веществ. Действительные значения ЛД₅₀ РФП находятся в диапазоне больших доз, но точное вычисление уровня летальных доз невозможно из-за ограничений, накладываемых лекарственной формой препарата, и его низкой токсичности. При этом введенный объем препарата превышает 2 г/мг, и составил у мышей 50 и 20 мл/кг. Коэффициент безопасности для изученного препарата многократно превышает минимальное значение коэффициента безопасности — 100.

ВЫВОД

“Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ ” при введении крысам и мышам внутрибрюшинно и подкожно в максимально возможном для данного пути введения объеме не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении за ними в течение 14 сут.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Автандилов, *Медицинская морфометрия*, Медицина, Москва (1990).
2. С. Г. Афанасьев, А. В. Августинович, В. И. Чернов, И. Г. Синилкин, *Сиб. онкол. журн.*, **34**(4), 27 – 32 (2009).
3. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963).
4. С. В. Канаев, С. Н. Новиков, Л. А. Жукова и др., *Вопросы онкологии*, **57**(5), 616 – 621 (2011).
5. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Москва (2005).
6. В. С. Скуридин, Е. С. Стасюк, Н. В. Варламова, *Известия вузов, Физика*, **54**(11/2), 332 – 339 (2011).
7. В. С. Скуридин, Е. С. Стасюк, В. Н. Варламова и др., *Известия ТПУ. Химия*, **323**(3), 33 – 37 (2013).
8. В. И. Чернов, С. Г. Афанасьев, А. А. Синилкин, *Сиб. онкол. журн.*, **28**(4), 5 – 10 (2008).
9. В. И. Чернов, И. Г. Синилкин, С. В. Ширяев, *Национальное руководство по радионуклидной диагностике*, STT, Томск (2010).
10. S. Maza, *QJ Nucl. Med.*, **30**, 651 – 688 (2003).
11. P. Paredes, S. Vidal-Sicart, G. Zanón, et al., *E. J. Nucl. Med.*, **32**(11), 1283 – 1287 (2005).
12. A. J. Schauer, *The Sentinel Lymph Node Concept*, Springer, Berlin, New York (2005).

Поступила 25.03.15

STUDYING ACUTE TOXICITY OF NEW RADIOPHARMACEUTICAL $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ NANOCOLLOIDS FOR ONCOLOGICAL DIAGNOSTICS

N. V. Varlamova¹, V. S. Skuridin¹, E. A. Nesterov¹, V. I. Chernov^{1,2}, and A. A. Titskaya^{1,2}

¹ Tomsk Polytechnic University, prosp. Lenina 30, Tomsk, 634050 Russia

² Tomsk Cancer Research Institute, per. Kooperativnyi 5, Tomsk, 634050 Russia

The acute toxicity of a new drug based on nanocolloidal gamma alumina labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) has been studied on 80 rats (40 females and 40 males) and 80 mice (40 females and 40 males) with intraperitoneal and subcutaneous drug administration. A single administration of the pharmacological agent was followed by observation of the survival of animals for 14 days with determining tolerable, toxic, and lethal doses for intraperitoneal and subcutaneous administration according to the Litchfield – Wilcoxon method, establishing the causes of animal death within 14 days of observation, and studying the drug influence on the general condition and some functional and morphological indices. Based on the established boundaries of toxicity and the classification of toxicity, the $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ nanocolloids can be classified into conditionally moderately toxic substances. The actual values of LD_{50} of the radiopharmaceutical fall in the range of large doses. The safety factor for the drug studied significantly exceeds the minimum permissible value of 100.

Keywords: radiopharmaceutical; gamma-alumina; nanocolloid; lymph node; acute toxicity; rats; mice.