

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТА “1-ТИО-D-ГЛЮКОЗА, ^{99m}Tc ” ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ В ОНКОЛОГИИ

В.И. Чернов¹, Р.В. Зельчан¹, А.А. Медведева¹, И.Г. Синилкин¹, О.Д. Брагина¹,
В.С. Скуридин², Е.С. Стасюк², Е.А. Ильина², Н.В. Варламова²

¹ НИИ онкологии Томского Национального медицинского исследовательского
центра, Томск

² Томский политехнический университет, Томск

Меченные радионуклидами производные глюкозы широко используются во всем мире для проведения высокоинформативных диагностических исследований в онкологии, что связано с повышенным уровнем метаболизма глюкозы в раковых клетках. В работе рассматривается возможность получения и использования в медицине меченой технецием-99м (^{99m}Tc) производной 1-тио-D-глюкозы вместо дорогостоящих радиофармпрепаратов на основе позитронно-излучающих радионуклидов ^{18}F , ^{11}C и др. Приводятся экспериментальные данные по разработке состава стандартного лиофилизированного набора для получения РФП “1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc ” и результаты его медико-биологических испытаний.

Ключевые слова: технеций-99м, 1-тио-D-глюкоза, гамма-камера, лиофилизат

Введение

Методы ядерной медицины достаточно широко используются в развитых странах для визуализации злокачественных опухолей различной локализаций [1–3]. В то же время развитие ядерных медицинских технологий в России существенно отстает от мирового уровня [4–6]. По экспертным оценкам, потребность населения России в радиофармацевтических лекарственных препаратах (РФП) удовлетворяется не более чем на 1–3 %. Как известно, наибольшее распространение в онкологии получили РФП на основе производных глюкозы. Существуют различные производные глюкозы, меченные радионуклидами ^{18}F , ^{11}C и другими. В настоящее время в России для диагностики

опухолей, выявления метастазов и оценки эффективности противоопухолевой терапии методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) используется, главным образом, РФП “2-фтор, ^{18}F -2-дезоксид-D-глюкоза” (^{18}F -ФДГ), содержащий позитронно-излучающий радионуклид фтор-18 [7]. Несмотря на высокую диагностическую информативность этого метода, его широкое применение ограничено из-за высокой стоимости препаратов, а также малого количества ПЭТ-центров в стране. В то же время, на территории России имеется много действующих лабораторий онкологического профиля (более 200), оснащенных гамма-камерами для проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ-центров). Здесь наиболее часто используются РФП на ос-

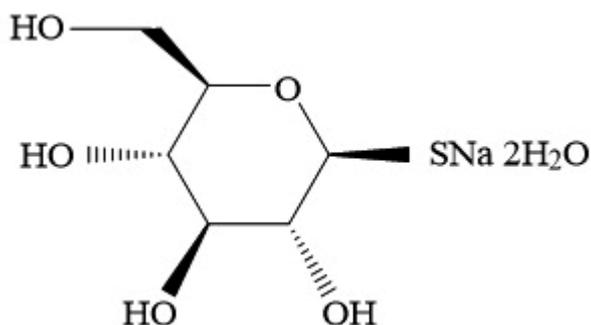


Рис. 1. Натрия 1-тио-β-D-глюкоза дигидрат

нове короткоживущего радионуклида ^{99m}Tc , получаемого непосредственно в клиниках из генераторов технеция-99m. Поэтому представляется актуальной разработка инновационных радиофармацевтических препаратов для молекулярной визуализации на основе меченных технецием-99m производных глюкозы [8, 9]. Такая возможность была рассмотрена, например, в работах [10–15].

Главным достоинством меченных ^{99m}Tc РФП является то, что визуализация опухоли с их использованием может быть произведена с помощью гамма-камеры, а не ПЭТ-сканера, что позволит значительно снизить стоимость диагностической процедуры.

Целью настоящего исследования явилась разработка и изучение возможности применения для визуализации опухолевой ткани туморотропного РФП на основе меченной технецием-99m производной глюкозы 1-тио-D-глюкоза. Ее структурная формула представлена на рис. 1.

Материал и методы

Программа экспериментальных исследований по проведению синтеза препарата “1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc ” включала следующие основные разделы:

- ✓ Исследование растворимости исходной субстанции в различных средах, обеспечивающих возможность внутривенного введения препарата;
- ✓ Выбор восстанавливающего агента и условий восстановления $^{99m}\text{Tc(VII)}$ с целью его последующего введения в структуру производной;

- ✓ Выяснение оптимальных концентраций основной субстанции и восстановителя в составе лекарственной формы;
- ✓ Изучение влияния кислотности (величины pH) раствора препарата на его радиохимическую чистоту;
- ✓ Разработка методики изготовления наборов реагентов для получения меченной ^{99m}Tc производной глюкозы в виде лиофилизата.

По результатам проведенных исследований был сделан вывод, что субстанция 1-тио-D-глюкоза хорошо растворима в солянокислых и щелочных растворах. Полное растворение субстанции без образования коллоида наблюдается также в физиологическом растворе и воде, что облегчает задачу разработки и создания на ее основе меченного ^{99m}Tc РФП для внутривенного введения.

Как правило, 7-валентный ^{99m}Tc , выделяемый из генераторов в виде раствора натрия пертехнетата ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), напрямую не используется для приготовления РФП, поскольку не обладает комплексообразующими свойствами. В качестве восстанавливающего агента для перевода $^{99m}\text{Tc(VII)}$ в $^{99m}\text{Tc(IV)}$ в работе был выбран дихлорид олова дигидрат (далее по тексту Sn(II)), с которым были проведены все последующие исследования. Было установлено, что содержание невосстановленного $^{99m}\text{Tc(VII)}$ в препарате снижается по мере увеличения в смеси концентрации Sn(II). При этом допустимое содержание радиохимической примеси $^{99m}\text{Tc(VII)}$ в РФП ~5 % достигается в том случае, если количества Sn(II) в препарате находится на уровне 0,0175–0,035 мг/мл. Как показали эксперименты, в результате взаимодействия Sn(II) с $^{99m}\text{Tc(VII)}$ возможно образование гидролизованного оксида $^{99m}\text{TcO}_2$, а также дополнительное образование комплекса восстановленного ^{99m}Tc с оловом или же хемосорбция радионуклида на поверхности коллоида олова, что, в конечном итоге, приводит к снижению радиохимического выхода (РХВ) целевого меченого продукта. Для устранения эффекта образования радиоактивного коллоида и повышения РХВ в реакционную смесь была добавлена аскорбиновая кислота.

В результате проведенных исследований по установлению оптимальных количеств реагентов в исходных смесях с целью последующего изготовления стандартных наборов реагентов (лиофилизатов) для приготовления

Таблица 1

Состав лиофилизата во флаконе

Реагент	Количество
1-тио-D-глюкоза натриевая соль гидрат	Не более 0,625 мг
Олово хлорид дигидрат	0,044–0,052 мг
Аскорбиновая кислота	Не более 0,125 мг

РФП “1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc ” была разработана следующая методика.

В стерильный стакан вместимостью 100 мл помещали 50 мл раствора 1-тио-D-глюкозы с концентрацией субстанции $C=2,5$ мг/мл, затем туда последовательно добавляли 2,5 мл аскорбиновой кислоты (10 мг/мл) и от 1,25 до 1,5 мл раствора Sn(II) (7 мг/мл). После тщательного перемешивания, полученную смесь реагентов пропускали через стерилизующий фильтр 200 нм и расфасовывали в стерильные флаконы по 1 мл смеси. Затем флаконы помещали в лиофилизатор FreeZone в холодильную камеру сушки и проводили заморозку реагента в течение 60 мин при температуре -50°C и далее проводили процесс автоматическом режиме в течение 24 ч. Состав готового лиофилизата представлен в табл. 1.

Получаемый из него препарат “1-Тео-D-глюкоза, ^{99m}Tc ” готовится путем введения во флакон элюата из генератора технеций-99m в объеме 4 мл с общей активностью 0,8–3,0 ГБк. Содержимое флакона перемешивают встряхиванием до полного растворения лиофилизата и инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин.

Изучение функциональной пригодности препарата “1-Тео-D-глюкоза, ^{99m}Tc ” проводилось в два этапа. На первом этапе изучалась возможность применения указанного препарата для визуализации опухолевых клеток *in vitro*. Для этого использовались культуры нормальных клеток (СНО – клетки яичников китайских хомячков) и опухолевых клеток (MCF 7 – аденокарцинома молочной железы человека). Обе клеточные линии в количестве 35 тыс. клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в течение ночи, затем после удаления среды клетки промывали буфером PBS в смеси с 1 % бычьим сывороточным альбумином (БСА). Далее каждую

Таблица 2

Уровень радиоактивности в нормальных и опухолевых клетках после инкубации препаратом “1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc ”

Культуры клеток	Радиоактивность, МБк
Нормальные клетки (СНО)	$0,30 \pm 0,15$
Опухолевые клетки (MCF 7)	$1,07 \pm 0,60$

клеточную культуру объемом по 1 мл (3 млн. клеток/мл) распределяли по 5 пробиркам и разводили в буфере PBS с 1 % БСА. Исследование особенностей накопления препарата в культурах нормальных и опухолевых клеток выполняли следующим образом: в 5 пробирок с 1 мл каждой культуры, добавляли по 200 мкл препарата с активностью 25 МБк. После пробирки с клетками инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, подвергая периодическому встряхиванию, чтобы не допустить слипания клеток. По завершению инкубации пробирки с клетками помещали в центрифугу и обрабатывали 5 мин при 300 оборотах в минуту. После выпадения осадка, аккуратно отбирали надосадочную жидкость и производили раздельное измерение радиоактивности осадка и жидкости. Затем выполняли трехкратную отмывку клеток путем последовательного добавления в каждую пробирку с клетками по 1 мл буфера и центрифугирования пробирок. При этом на каждом этапе отмывки производили измерение радиоактивности осадка и надосадочной жидкости. После последней отмывки рассчитывали эффективность мечения клеток – процент аккумуляции РФП в клетках нормальных и злокачественных тканей и выполняли сцинтиграфическое исследование планшета с пробирками в планарном режиме. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Из представленной таблицы следует, что накопление радиофармпрепарата в опухолевых клетках (MCF 7) в 3,5 раза выше, чем в нормальных (СНО) клетках.

Аналогичный вывод можно сделать из результатов сканирования планшета с пробирками на гамма-камере. Здесь визуально также четко прослеживается более интенсивное накопление препарата в опухолевых клетках (рис. 2).

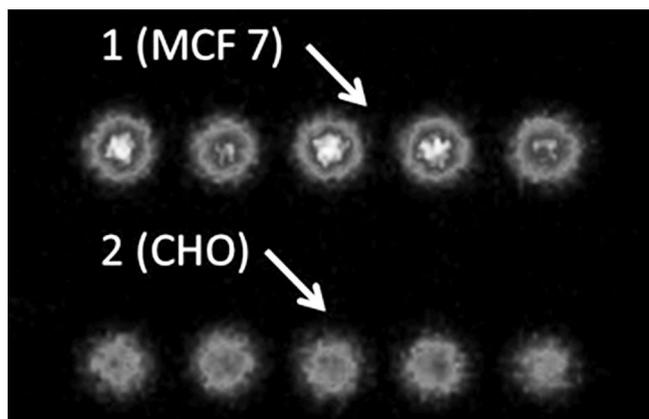


Рис. 2. Сцинтиграфическое изображение пробирок с опухолевыми (1) и нормальными клетками (2) после инкубации с РФП и трехкратной отмывки

На втором этапе исследований проводилось изучение функциональной пригодности исследуемого РФП с использованием модели перевиваемой опухоли – карциномы легких Льюиса (Банк клеточных линий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва), выращенной *in vivo* на мышах линий С57В1/6j методом внутримышечной трансплантации. На момент исследования объем опухолевого узла в бедре животных составлял $2 \pm 0,2 \text{ см}^3$. Содержание животных и уход за ними производились согласно нормам Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986).

Для изучения особенностей накопления исследуемого РФП в организме животных препарат с диагностической активностью 25 МБк вводился им внутривенно после предварительной наркотизации. Через 10–15 мин после введения выполнялась гамма-сцинтиграфия всего тела на двухдетекторной гамма-камере Siemens E.Cam 180. Затем проводили расчет радиоактивности в выделенных зонах интереса, соответствующих различным органам животных, а также в опухолевом узле по отношению к общей введенной активности препарата. Обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ E.soft Software Version 5.5 (Siemens).

Результаты и обсуждение

На полученных сцинтиграммах опухоль проявлялась в виде участка гиперфиксации препарата с достаточно четкими контурами. Накопление препарата в проекции опухоли чаще было неоднородным, различной интенсивности (рис. 3).

Отмечается гиперинтенсивное накопление препарата в проекции опухоли бедра (1). Визуализируется также гиперфиксация препарата в проекции сердца и легких (2), обусловленное циркуляцией РФП в кровяном русле, а также в проекции места введения (3) – инфра-орбитальный синус.

При постпроцессинговой обработке полученных изображений среднее значение интенсивности накопления препарата в опухоли составило 2665 ± 431 импульсов. При этом в симметричном участке (мягкие ткани противоположного бедра) интенсивность включения РФП не превышала в среднем 878 ± 134 импульсов (табл. 3).

Из приведенной таблицы следует вывод, что уровень накопления препарата в опухоли превышает уровень его накопления в симметричном участке в 3 раза. Кроме того, расчет доли накопления изучаемого радиофармпрепарата в опухоли, произведенный при обработке

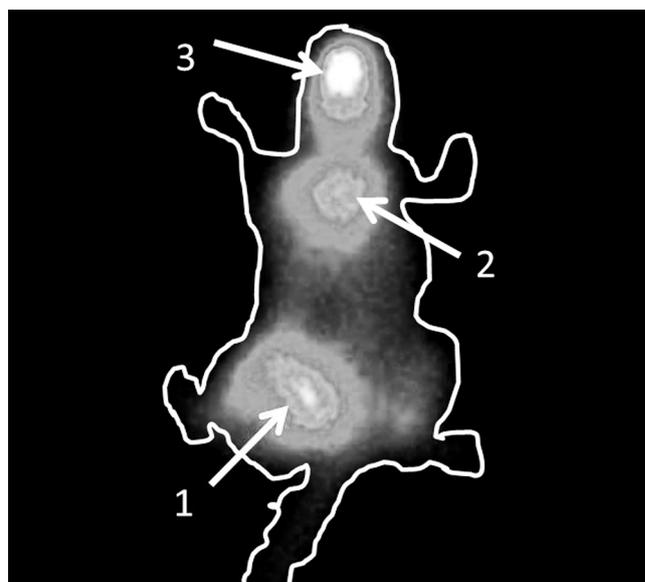


Рис. 3. Сцинтиграмма животного с опухолью левого бедра через 15 мин после внутривенного введения радиофармпрепарата ^{99m}Tc 1-тио-D-глюкоза

Таблица 3
Уровни накопления препарата
“1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc” в опухоли
и симметричном участке
у лабораторных животных

Область измерения	Накопления РФП, импульсы
Опухоль бедра	2665±43
Мягкие ткани противоположного бедра	878±134

полученных данных, показал, что через 10–15 мин после внутривенного введения в опухолевом узле накапливается в среднем около 8,14 % от общего количества введенного препарата.

Таким образом, использование РФП на основе меченой технецием-99m производной 1-тио-D-глюкозы для визуализации опухолевой ткани методом однофотонной эмиссионной скintiграфии позволяет получать качественные скintiграммы и визуализировать опухолевый узел с высоким уровнем накопления в нем диагностического препарата.

Заключение

Обобщая полученные данные, можно уверенно говорить о функциональной пригодности радиофармпрепарата “1-тио-D-глюкоза, ^{99m}Tc” для визуализации опухолевой ткани и необходимости проведения дальнейших доклинических исследований с целью изучения его фармакокинетических характеристик и безопасности применения.

Список литературы

- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г. и соавт. Радионуклидная тераностика злокачественных образований // Вестник рентгенологии и радиологии, 2016. Т. 97. № 5. С. 306–313.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г. и соавт. Радиоиммунотерапия: современное состояние проблемы // Вопросы онкологии, 2016. Т. 62. № 1. С. 24–30.
- Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г. и соавт. Радиоиммунотерапия в лечении злокачественных образований // Сибирский онкол. журнал, 2016. Т. 15. № 2. С. 101–106.
- Чернов В.И., Медведева А.А., Синилкин И.Г. и соавт. Опыт разработки инновационных радиофармпрепаратов в Томском НИИ онкологии // Сибирский онкол. журнал, 2015. № S2. С. 45–47.
- Зельчан Р.В., Медведева А.А., Синилкин И.Г. и соавт. Диагностические радиофармацевтические препараты на основе производных глюкозы в современной онкологической практике // Сибирский онкологический журнал, 2018. Т. 17. № 2. С. 71–81.
- Chernov V., Sinilkin I., Choyzonov E. et al. Comparative evaluation of ^{99m}Tc-Al₂O₃ and ^{99m}Tc-fitat nanocolloids for sentinel lymph nodes visualization in patients with cancer of larynx and hypopharynx // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2015. Vol. 42. № S1. P. 704–708.
- Чернов В.И., Дудникова Е.А., Гольдберг В.Е. и соавт. Позитронная эмиссионная томография в диагностике и мониторинге лимфолипролиферативных заболеваний // Мед. радиол. и радиац. безопасность, 2018. Т. 63. № 6. С. 41–50.
- Zeltchan R., Medvedeva A., Sinilkin I. et al. Experimental study of radiopharmaceuticals based on technetium-99m labeled derivative of glucose for tumor diagnosis // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. “VIII International Scientific Conference “Issues of Physics and Technology in Science, Industry and Medicine””. 2016. P. 012054.
- Зельчан Р.В., Медведева А.А., Синилкин И.Г. и соавт. Изучение функциональной пригодности туморотропного радиофармпрепарата ^{99m}Tc-1-тио-D-глюкоза в эксперименте // Молекулярная медицина, 2018. Т. 16. № 3. С. 54–57.
- Chen Y., Huang Z.W., He L. et al. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate-deoxyglucose complex ^{99m}Tc-DTPA-DG as a potential imaging modality for tumors // Appl. Radiat. and Isot. 2006. Vol. 64. № 3. P. 342–347.
- Chen X., Li L., Liu F., Liu B. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m-labeled deoxyglucose derivatives as imaging agents for tumor // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. Vol. 16. № 21. P. 5503–5506.
- Скуридин В.С., Садкин В.Л., Стасюк Е. С. и соавт. Разработка метода получения нового

- радиофармпрепарата на основе моносахарида, меченого технецием-99м // I Международная научно-практическая конференция “Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов” РАДИОФАРМА-2015, Сборник тезисов. 2015. С. 50.
- 13 Зельчан Р.В., Медведева А.А., Брагина О.Д. и соавт. Изучение общей острой токсичности нового радиофармпрепарата ^{99m}Tc -1-тио-D-глюкоза в эксперименте // Молекулярная медицина, 2019. Т. 19. № 1. С. 58–66.
- 14 Zhang X., Ruan Q., Duan X. et al. Novel ^{99m}Tc -Labeled Glucose Derivative for Single Photon Emission Computed Tomography: A Promising Tumor Imaging Agent // *Mol. Pharm.* 2018. Vol. 15. № 8. P. 3417–3424. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00415. Epub 2018 Jul 19.
- 15 Qutbi M., Shafiei B., Khoshbakht S. et. al. An Unexpected and Less Recognized Altered Distribution on Bone Scintigraphy; Possibility of ^{99m}Tc -Dextrose Complex as a Cause // *Clin. Nucl. Med.* 2017. Vol. 42. № 12. P. 952–957. DOI: 10.1097/RLU.0000000000001857.

**DEVELOPMENT AND ASSESSMENT OF FUNCTIONAL FITNESS RADIOPHARMACEUTICAL
“1-THIO-D-GLUCOSE, ^{99m}Tc ” IN THE DIAGNOSIS FOR ONCOLOGY**

V.I. Chernov¹, R.V. Zelchan¹, A.A. Medvedeva¹, I.G. Sinilkina¹, O.D. Bragina¹,
V.S. Skuridin², E.S. Stasyuk², E.A. Ilyina², N.V. Varlamova²

¹ Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

² Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

Glucose derivatives labeled with radionuclides are widely used throughout the world for highly informative diagnostic studies in oncology, which is associated with an increased level of glucose metabolism in cancer cells. The paper considers the possibility of obtaining and using in medicine labeled technetium-99m derivative of 1-thio-d-glucose instead of expensive radiopharmaceuticals based on positron-emitting radionuclides ^{18}F , ^{11}C , etc. Experimental data on the development of the composition of the standard lyophilized set for the production of RFP “1-thio-d-glucose, ^{99m}Tc ” and the results of its biomedical tests are presented.

Key words: *technetium-99m, 1-thio-d-glucose, lyophilisate, scintigraphy*

E-mail: zelchan@yandex.ru