

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТА «НАНОКОЛЛОИД,^{99m}Tc Al₂O₃» ДЛЯ СЦИНТИГРАФИЧЕСКОГО И ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ «СТОРОЖЕВЫХ» ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

В.С. Скуридин – д.т.н., профессор¹
В.И. Чернов – д.м.н., профессор^{1,2}
***Н.В. Варламова** – к.б.н.¹
Е.А. Нестеров – к.т.н.¹
И.Г. Синилкин – к.м.н.^{1,2}
Р.В. Зельчан – к.м.н.^{1,2}

¹ *Национальный исследовательский Томский политехнический университет, лаборатория производства радиофармацевтических препаратов 634050 Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30*

² *Томский НИИ онкологии, отделение радионуклидной диагностики 634050 Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

- радиофармпрепарат (РФП)
- нанокolloид
- сторожевой лимфатический узел (СЛУ)
- сцинтиграфия

РЕЗЮМЕ:

Цель: на экспериментальных животных оценить функциональную пригодность нанокolloидного препарата меченного технецием-99m для сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов.

Материалы и методы: исследование было выполнено в 6 сериях экспериментов, включивших по 5 белых крыс-самцов линии «Вистар» массой 300–350 г. Инъекцию РФП в дозе 18–20 МБк выполняли между первым и вторым пальцами передней лапы крысы.

Результаты: при сцинтиграфическом исследовании сторожевых лимфатических узлов (СЛУ) отмечено, что РФП «Нанокolloид,^{99m}Tc-Al₂O₃» достигает плато аккумуляции в узле (10,2%) на 2 часу исследования и его процентное содержание сохраняется на этом уровне до 24 часов. При интраоперационном исследовании во всех случаях удавалось визуализировать СЛУ.

Выводы: полученные результаты свидетельствуют о функциональной пригодности РФП «Нанокolloид,^{99m}Tc-Al₂O₃» для сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфоузлов.

STUDY OF FUNCTIONAL FITNESS RADIOPHARMACEUTICALS «NANOCOLLOIDS,^{99m}Tc-Al₂O₃» FOR SCINTIGRAPHIC AND INTRAOPERATIVE IDENTIFICATION OF «SENTINEL» LYMPH NODES

Skuridin V.S. – PhD, professor¹
Chernov V.I. – MD, PhD, professor^{1,2}
***Varlamova N.V.** – PhD¹
Nesterov E.A. – PhD¹
Sinilkin I.G. – MD, PhD^{1,2}
Zelchan R.V. – MD, PhD^{1,2}

¹ *National Research Tomsk Polytechnic University 30, Lenina str., Tomsk, Russian Federation, 634050*

² *Tomsk Cancer Research Institute 5, Kooperativniy sq., Tomsk, Russian Federation, 634050*

KEY-WORDS:

- radiopharmaceutical (RPh)
- nanocolloids
- «sentinel» lymph node (SLN)
- scintigraphy

ABSTRACT:

Aim: was to estimate the functionality of the nanocolloid drug labeled with technetium-99m for scintigraphy and intraoperative detection of «sentinel» lymph nodes (SLN) in experimental animals.

Materials and methods: the study was performed in 6 series of experiments, including 5 white male rats line «Wistar» weighing 300–350 g. Injection of radiopharmaceuticals (RPh) at a dose of 18–20 MBq were performed between the first and second fingers of the front paws of rats.

Results: in scintigraphic studies STL noted that RPh «Nanocolloid, ^{99m}Tc-Al₂O₃» accumulation reaches a plateau at the node (10.2%) for 2 hour study and its percentage content is stored at this level until 24 h. Intraoperative study, in all cases it was possible to visualize the STL.

Conclusions: results shows functional fitness RPh «Nanocolloids, ^{99m}Tc-Al₂O₃» for scintigraphy and intraoperative detection of «sentinel» lymph nodes.

*Адрес для корреспонденции (Correspondence to): Варламова Наталья Валерьевна (Varlamova Natalya Valer'evna), e-mail: varlamova@tpu.ru

Введение

В настоящее время активно развиваются новые медицинские технологии в лечении онкологических заболеваний [1–3]. Становится очевидным, что при начальных стадиях опухолевого процесса радикальность расширенных операций значительно превосходит необходимую. Проводятся исследования, направленные на оценку эффективности применения и совершенствования технических аспектов новых органосохраняющих и функционально-щадящих подходов к хирургическому лечению злокачественных новообразований (ЗНО) [4–6]. Приоритетным направлением современной онкологии является не только полное излечение от рака с сохранением высокого качества жизни, но и сведение к минимуму возможных осложнений и полной профилактики рецидивов после проведенного лечения [7].

Злокачественные опухоли характеризуются как гематогенным, так и лимфогенным метастазированием. Именно способность опухолей к диссеминации по лимфатическим и кровеносным сосудам является основной проблемой в лечении онкологических заболеваний [8, 9]. В связи с этим, в стандарты хирургического лечения злокачественных опухолей входит обязательное удаление всех лимфатических коллекторов [1, 10, 11]. Вместе с тем, по мере накопления результатов многолетнего изучения биопсии сторожевых лимфатических узлов (СЛУ) (Sentinel lymph nodes) при многих опухолях увеличиваются доказательства нецелесообразности такого «радикального» подхода у всех без исключения больных [1, 3, 12].

Доступные в настоящее время неинвазивные методы исследования (эхография, компьютерная и магнитно-резонансная томографии) не могут дать четкого ответа о наличии или отсутствии метастазов в лимфатических узлах. Объективная диагностика микрометастазов возможна только морфологическими методами [11, 13], в связи с чем концепция биопсии СЛУ приобретает все большее признание и введена для многих локализаций опухолей в стандарты хирургического лечения Европейской организацией по изучению и лечению рака (EORTC). Ее суть состоит в том, что в сомнительных случаях во время оперативного вмешательства проводится интраоперационное экспресс гистологическое исследование (ЭГИ) СЛУ — по результатам которого хирург непосредственно определяет объем оперативного вмешательства.

Оптимальным методом выявления СЛУ считается использование меченных технецием-99м коллоидных наноматериалов для сцинтиграфического или радиометрического определения локализации узла [14].

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение возможности применения нового отечественного РФП на основе меченого технецием-99м гамма-оксида алюминия для визуализации СЛУ. Основными предпосылками для использования

оксида алюминия 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 на сегодняшний день является наиболее востребованным радионуклидом для проведения диагностических исследований, практически, во всех областях медицины. Это, в первую очередь, обусловлено его ядерно-физическими характеристиками: относительно коротким $T_{1/2}$ (6,02 ч) и энергией — излучения 0,1405 МэВ, обеспечивающих малую экспозиционную дозу и, вместе с тем, достаточную проникающую способность для проведения радиометрических измерений [15–17].

Материалы и методы

Реагент для получения РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » был разработан в лаборатории производства радиофармпрепаратов Томского политехнического университета [18]. Меченый технецием-99м нанокolloид получают непосредственно в медицинских радионуклидных лабораториях путем добавления к реагенту 4 мл элюата из генератора технеция общей активностью 1120–2000 МБк. Содержимое флакона перемешивают встряхиванием до полного растворения лиофилизата и инкубируют при температуре 70–80°C в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры препарат отбирают из флакона с помощью шприца со стерилизующим фильтром (0,22 мкм). РХЧ препарата >95%.

Оценка функциональной пригодности нового отечественного РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » для сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов выполнялась по разработанной экспериментальной модели на мелких лабораторных животных.

Все сцинтиграфические исследования проводили на гамма-камере E-CAM-180 (Siemens, США) при настройке дифференциального дискриминатора на фотопик 140 КэВ, при ширине окна 20%, используя параллельный низкоэнергетический высокоразрешающий коллиматор. В момент исследования животных располагали вентральной поверхностью к детектору гамма-камеры так, чтобы в поле зрения оказывалось все тело животного.

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета программ STATISTICA. Результаты представлены как $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение.

Содержание и участие в эксперименте животных, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов

или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Исследование функциональной пригодности нового РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » для скintiграфического выявления СЛУ было выполнено в 3 сериях экспериментов, включивших по 5 белых крыс-самцов линии «Вистар» массой 300–350 г. Инъекцию РФП в дозе 18–20 МБк выполняли между первым и вторым пальцами передней лапы крысы. Перед подкожным введением и в ходе скintiграфического исследования животных наркотизировали с помощью эфира. Начиная с момента введения, кинетика распределения радиофармпрепарата по органам и тканям фиксирова-

лась покадровой записью в течение 15 мин. (1 кадр в 30 секунд), в матрицу 64×64 пикселя. Статическую скintiграфию проводили через 1, 2, 3 и 24 часа в передней и задней проекциях в матрицу 256×256 пикселей с набором 500 импульсов.

По результатам скintiграфических исследований определяли процент аккумуляции РФП в подмышечном лимфатическом узле и месте инъекции.

Исследование функциональной пригодности РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » для интраоперационного выявления СЛУ выполнена в 3 сериях экспериментов, включивших по 5 белых крыс-самцов линии «Вистар» массой 300–350 г. Инъекцию РФП в дозе 18–20 МБк выполняли между первым и вторым пальцами передней лапы крысы. Перед подкожным введением и в ходе интраоперационного исследования животных наркотизировали с помощью эфира.

Интраоперационное выявление «сторожевых» лимфатических узлов выполнялось через 1 час после введения индикатора. В момент операции животных фиксировали на спине с использованием специальных растяжек на операционном столике. После препарирования подмышечной области и выделения лимфатических узлов, детектировались лимфатические узлы с повышенным скintiлляционным счетом с помощью гамма-зонда «GammaFinder» (США). Указанные лимфатические узлы извлекали из операционной раны и скintiлляционный счет в них измерялся повторно. Затем определялся фоновый уровень счета в подмышечной области.

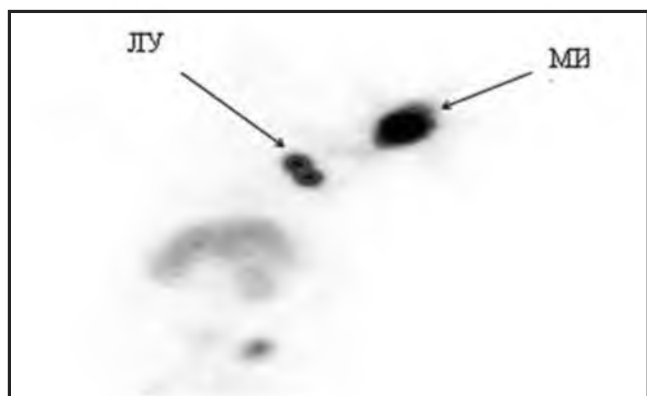


Рис. 1. Скintiграмма крысы, выполненная через 2 ч. после инъекции «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ ». Уровень радиоактивности в точке инъекции (МИ) 65% от общей введенной дозы; в лимфатическом узле I порядка (ЛУ) – 10,2%.

Таблица 1. Динамика уровня аккумуляции РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » в месте инъекции крыс

Время после инъекции	Среднее накопление (%)	Максимальное накопление (%)	Минимальное накопление (%)	Ошибка среднего (%)
5 мин.	74,7	77	73,8	1
15 мин.	73,3	75	72	0,8
1 ч.	67,2	71	64	1,8
2 ч.	61,8	67	55	3,6
3 ч.	57,3	63	51	3,6
24 ч.	49,4	51	47	2,5

Таблица 2. Динамика уровня аккумуляции РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » в подмышечном лимфатическом узле крыс

Время после инъекции	Среднее накопление (%)	Максимальное накопление (%)	Минимальное накопление (%)	Ошибка среднего (%)
5 мин.	0,9	1,3	0,4	0,2
15 мин.	1,2	1,5	0,9	0,2
1 ч.	8,4	9,3	5,7	0,9
2 ч.	10,2	10,8	7,4	0,8
3 ч.	10,9	11,8	9,8	0,6
24 ч.	12,6	14,0	10,9	0,8

Таблица 3.

**Сцинтилляционный счет через 1 час
после инъекции РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ »**

Время после инъекции	Среднее накопление (имп.)	Максимальное накопление (имп.)	Минимальное накопление (имп.)	Ошибка среднего (имп.)
Место инъекции	22 779	23 976	21 894	600
Сторожевой лимфатический узел в операционной ране	438,42	536	273	84
Извлеченный сторожевой лимфатический узел	447,84	584	274	87
Подмышечная область после удаления сторожевого лимфатического узла	65,87	86	49	11

По результатам радиометрических исследований определяли сцинтилляционный счет в месте инъекции и СЛУ (до и после их извлечения из операционной раны), а также в подмышечной области после удаления «сторожевых» лимфатических узлов.

Результаты исследования сцинтиграфической визуализации СЛУ. Результаты динамических сцинтиграфических исследований крыс показали, что радиофармпрепарат поступает в лимфатическую систему из места инъекции, при этом через 2 часа в депо оставалось 61,8% от введенной дозы (**табл. 1**). Через 24 ч. в месте введения сохранялось около 49,4% препарата. Подмышечный лимфатический узел у всех животных четко визуализировался уже к 15 мин. исследования, когда в нем накапливалось до 1,2% от введенной дозы РФП (**табл. 2**). В дальнейшем при оценке накопления препарата в лимфатическом узле отмечено, что РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » достигает плато аккумуляции в узле (10,2%) на 2 часу исследования (**рис. 1**) и его процентное содержание сохраняется на этом уровне (12,6%) до 24 часов (**табл. 2**).

Результаты исследований интраоперационного выявления СЛУ. Интраоперационно визуализировать «сторожевой» лимфатический узел удавалось во всех случаях. Сцинтилляционный счет в месте инъекции через 1 час после введения РФП находился на уровне 22 779 тыс. имп. в секунду. Средний счет в лимфатическом узле до его извлечения из операционной раны

составил 438,42, после – 447,84. Уровень сцинтилляционного счета в подмышечной области после удаления лимфатического узла оставался на фоновом уровне – 65,87 импульсов (**табл. 3**).

Выводы

Таким образом, проведенное исследование показало, что РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » активно поступает из места инъекции в лимфатическую систему и накапливается в подмышечном лимфатическом узле. Аккумуляция РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » в лимфоузле свидетельствует о функциональной пригодности данного РФП для сцинтиграфического выявления «сторожевых» лимфоузлов. Согласно проведенным расчетам регистрацию сцинтиграфического изображения следует проводить через 60–180 минут после подкожного введения РФП, когда аккумуляция препарата в лимфоузле составляет 8,4–12,6% от введенной дозы.

Кроме того, проведенное исследование продемонстрировало функциональную пригодность нового РФП «Нанокolloид, $^{99m}\text{Tc}-\text{Al}_2\text{O}_3$ » для интраоперационного выявления СЛУ. При этом через 1 час после подкожного введения РФП в первый межпальцевый промежуток грудной конечности крысы в дозе 18–20 МБк уровень сцинтилляционного счета в лимфатическом узле составил 447,84 импульсов в минуту. ■

Список литературы/References

1. Семиглазов В.Ф. Новое направление в сберегательном и органосохраняющем хирургическом лечении злокачественных опухолей. *Медицинский вестник*. 2009; 35 (504): 12–24.
Semiglazov V.F. Novee napravlenie v sberagatel'nom i organosohranjajushhem hirurgicheskom lechenii zlokachestvennyh opuholej. [A new trend in savings and organ-surgical treatment of malignant tumors]. *Medicinskij vestnik*. 2009; 35 (504): 12–24 [In Russ].
2. Abu-Rustum N.R., Knoury-Collado F., Gemignani M.L. Tehniques of sentinel lymph node identification for early-stage cervical and uterine cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008; 111(2): 44–50.
3. Altgassen C., Hertel H. et al. Multicenter validation study of the sentinel lymph node concept in cervical cancer: AGO Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2943–2951.
4. Кузнецов В.В., Лебедев А.И., Морхов К.Ю., Грицай А.Н. Хирургия инвазивного рака шейки матки. *Практическая онкология*. 2002; 3(3): 178–182.
Kuznecov V.V., Lebedev A.I., Morhov K.Ju., Gricaj A.N. Hirurgija invazivnogo raka shejki matki [Surgery is invasive cervical cancer]. *Prakticheskaja onkologija*. 2002; 3(3): 178–182 [In Russ].
5. Hauspy J., Beiner M., Harley A. Sentinel Lymph Node in early stage cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008; 108 (1): 256–257.
6. Takeda N., Sakuragi N., Takeda M. et al. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2002; 81: 1144–1151.
7. Seong S.J., Park H., Yang K.M. et al. Detection of sentinel lymph nodes in patients with early stage cervical cancer. *J. Korean Med. Sci.* 2007; 22 (1): 105–109.
8. Баггиш М.С., Каррам М.К. Атлас анатомии таза и гинекологической хирургии. Лондон: Изд-во Elsevier Ltd. 2009; 1172.
Baggish M.S., Karram M.K. Atlas anatomii taza i ginekologicheskoj hirurgii [Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery]. London: Izd-vo Elsevier Ltd. 2009; 1172 [In Russ].
9. Lawrenz B., Jauckus J., Kupka M.S. et al. Fertility preservation in >1,000 patients: patient's characteristics, spectrum, efficacy and risks of applied preservation techniques. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010; 283(3): 651–656.
10. Клиническая онкогинекология: Руководство для врачей. (Под ред. В.П. Козаченко). М.: Медицина, 2005; 431.
Klinicheskaja onkoginekologija: Rukovodstvo dlja vrachej. (Pod red. V.P. Kozachenko) [Clinical cancers: A Guide for Physicians. (Ed. V. Kozachenko)]. M.: Medicina, 2005; 431 [In Russ].
11. Abu-Rustum N.R., Neubauer N., Sonoda Y. et al. Surgical and pathologic outcomes of fertility-sparing radical abdominal trachelectomy for FIGO stage IB1 cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2008; 111(2): 261–264.
12. Чернов В.И., Афанасьев С.Г., Синилкин И.Г. и др. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов. *Сибирский онкологический журнал*. 2008; 4 (28): 5–10.
Chernov V.I., Afanas'ev S.G., Sinilkin I.G. i dr. Radionuklidnye metody issledovanija v vyjavlenii «storozhevyyh» limfaticeskikh uzlov [Radionuclide methods of investigation to identify «sentinel» lymph nodes]. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal*. 2008; 4 (28): 5–10 [In Russ].
13. Yarbrow J.W., Page D.L., Fielding L.P. et al. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer*. 1999; 86 (11): 2436–2446.
14. Maza S. Peritumoural versus subareolar administration of technetium-99m nanocolloid for sentinel lymph node detection in Breast cancer: preliminary results of a prospective intra-individual comparative study. *QJ Nucl Med.* 2003; 12: 651–688.
15. Старков О.В. Производство радионуклидов для медицины и научных исследований. ГНЦ РФ ФЭИ: 50 лет. Обнинск, 1995; 359–363.
Starkov O.V. Proizvodstvo radionuklidov dlja mediciny i nauchnyh issledovanij. GNC RF FJeI: 50 let. Obninsk [Production of radionuclides for medical and scientific research], 1995; 359-363 [In Russ].
16. Zhang Z., Zhao Y., Chai Z. Applications of radio-tracer techniques for the pharmacology and toxicology studies of nanomaterials. *Chinese Science Bulletin*. 2009; 54(2): 173–182.
17. Silvia S. Jurisson, John D. Lydon. Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* 1999; 99: 2205–2218.
18. Чойнзонов Е.Л., Чернов В.И., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Синилкин И.Г., Варламова Н.В., Стасюк Е.С. Способ получения реагента для приготовления меченого технецием-99м нанокolloида на основе гамма-оксида алюминия. Патент RU № 2512595. 2014 Бюл.10.
Chojnzonov E.L., Chernov V.I., Zel'chan R.V., Tickaja A.A., Sinilkin I.G., Varlamova N.V., Stasjuk E.S. Sposob poluchenija reagenta dlja prigotovlenija mechenogo tehneciem-99m nanokolloida na osnove gamma-oksida aljuminija [A method for producing a reagent for preparing technetium-99m labeled nanocolloid based on gamma-alumina]. Patent RU, no. 2512595, 2014.