

УДК 546.79:615.849

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НАНОДИСПЕРСНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ КОМПЛЕКСОНОВ ДТПА

Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Варламова Н.В., Нестеров Е.А.,
Белянин М.Л., Садкин В.Л., Рогов А.С.

ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,
Томск, e-mail: svsl946@rambler.ru

В работе исследована возможность получения меченных технецием-99м коллоидных нанодисперсных систем с регулируемыми свойствами на основе производных комплексона ДТПА с гидрофобными (липофильными) заместителями, обеспечивающими стабильность нанокolloидов в водной среде. В результате экспериментов, проведенных на четырнадцать смесей с различным соотношением компонентов и приготовленных по разным методикам, были определены оптимальные условия получения меченного ДТПА_{мод} путем прямого взаимодействия элюата ^{99m}Tc с раствором смеси [0,107 мг ДТПА_{мод} + 0,14 мг SnCl₂]. В результате проведенных исследований определены условия введения радиоактивной метки ^{99m}Tc в структуру модифицированного ДТПА и подобраны количественные составы реагентов для наработки опытных партий нанокolloидных препаратов. Содержание радиохимической примеси ^{99m}Tc (VII) в полученном нанокolloидном препарате составляет 2,7%.

Ключевые слова: технеций, ДТПА, нанокolloид, хроматограмма

MAKING LABELED WITH TECHNETIUM-99M NANODISPERSED DTPA DERIVATIVES KOMPLEKSONAM

Skuridin V.S., Stasyuk E.S., Varlamova N.V., Nesterov E.A.,
Belyanin M.L., Sadkin V.L., Rogov A.S.

National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, e-mail: svsl946@rambler.ru

We have studied the possibility of technetium-99m-labeled colloidal nano-dispersed systems with controlled properties on the basis of the chelator DTPA derivatives with hydrophobic (lipophilic) substituents nanocolloids ensure stability in aqueous media. As a result of experiments conducted on fourteen mixtures with different ratios of ingredients and prepared by different methods, were the optimal conditions for obtaining labeled DTPA_{mod} by direct interaction ^{99m}Tc elution with a solution of a mixture of [DTPA_{mod} 0,107 mg + 0,14 mg SnCl₂]. The studies identified conditions radiolabeling ^{99m}Tc DTPA modified the structure and quantitative compositions of selected reagents for production of pilot batches nanokolloidnyh drugs. Radiochemical impurity content ^{99m}Tc (VII) obtained in Preparation nanokolloidnom is 2,7%.

Keywords: technetium, DTPA, nanocolloids, chromatogram

Использование в медицине радиоактивных нанокolloидных материалов открывает широкие возможности для проведения высокоинформативных диагностических исследований [2]. Например, нанокolloиды с технецием-99м (^{99m}Tc) нашли применение в кардиологии для мечения аутолейкоцитов с целью диагностики воспалительных процессов [5], а также в онкологии для проведения лимфосцинтиграфии и выявления «сторожевых» лимфатических узлов у онкологических больных [3]. Данный метод обладает достаточно высокой чувствительностью в плане выявления заболеваний в сочетании с высоким разрешением получаемых скинтиграфических изображений и минимальной радиационной нагрузкой на организм [4].

В настоящее время рассматривается два принципиальных подхода к формированию наночастиц на основе неорганической и органической матриц. Первый из них подразумевает получение уже готовых частиц, например, нанопорошков с заданными размерами и последующей их мо-

дификацией. Второй подход заключается в создании коллоидных нанодисперсных систем с регулируемыми свойствами на основе органических хелатирующих агентов. В соответствии с этим подходом, в работе был проведен комплекс исследований по созданию меченных ^{99m}Tc производных комплексона ДТПА, несущих гидрофобные (липофильные) заместители. Данные заместители обеспечивают образование стабильных нанокolloидных систем в водной среде.

Цель исследования – создание меченных ^{99m}Tc производных комплексона ДТПА.

Материалы и методы исследования

Исходная субстанция (ДТПА_{мод}) была синтезирована на Кафедре биотехнологии и органической химии Института физики высоких технологий [1]. Для получения препарата ^{99m}Tc в виде раствора натрия пертехнетата, ^{99m}Tc использовали сорбционный генератор «^{99m}Tc-ГТ-ТОМ» производства Физико-технического института ТПУ.

Введение радиоактивной метки ^{99m}Tc в нанокolloидную субстанцию проводили двумя способами: путем смешивания растворов, содержащих ДТПА-

и восстанавливающий агент SnCl_2 с элюатом технеция-99м из $^{99\text{m}}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -генератора, а также путем растворения сухих остатков, полученных после упаривания растворов ДТПА_{мод} и SnCl_2 в элюате $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

С этой целью предварительно готовили по отдельности раствор активного вещества ДТПА_{мод} и раствор восстановителя $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Для приготовления коллоидного раствора ДТПА_{мод} использовали следующую методику. Навеску модифицированного ДТПА массой 0,027 г количественно перенесли в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворили в 20 мл 5%-го раствора NaHCO_3 при нагревании до 80°C. После довели объем этим же раствором до метки (концентрация 1,1 мг/мл). Затем в полученном растворе провели определение размеров частиц по оптической плотности коллоидной системы в различных участках видимой области спектра ($\lambda = 400\text{--}800$ нм) с использованием спектрофотометра Unicо 2802(S). Было установлено, что средний радиус частиц составляет 93 нм, а их диаметр 187 нм. С целью уменьшения размера частиц суспензию нагрели на водяной бане до 70°C и обработали в ультразвуковой ванне в течение 40 мин, что позволило снизить средний радиус частиц до 60 нм.

Для приготовления исходного раствора восстановителя Sn (II) навеску $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ массой 70 мг растворили в 200 мкл 1 М раствора HCl и довели объем раствора до 10 мл дистиллированной водой (концентрация 7 мг/мл).

В дальнейшем полученные растворы смешивали в разных соотношениях с последующим добавлением к этим смесям элюата $^{99\text{m}}\text{Tc}$ и снимали их радиохроматограммы с целью определения радиохимического выхода продуктов взаимодействия, в том числе и меченного $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – ДТПА_{мод}.

В качестве подвижных фаз для хроматографирования использовали смеси:

а) хлороформ:метанол:вода:уксусная кислота (лед) = 4:4:0,1:0,3 (система № 1), время хроматографирования 20 мин;

б) хлороформ:этанол:аммиак (конц) = 5:5:1 (система № 2), время хроматографирования 60 мин;

в) ацетон, время хроматографирования 10 мин.

Ацетон был выбран в качестве подвижной фазы для определения непрореагировавших пертехнетат-ионов $^{99\text{m}}\text{Tc(VII)}$, распределение которых по хроматограмме проходит достаточно быстро, около 10 мин. Системы № 1 и 2 подбирали с учетом свойств модифицированного ДТПА. Линия старта на хроматограммах – 20 мм от нижнего края.

Параллельно с радиометрическим определением пиков, меченых $^{99\text{m}}\text{Tc}$ продуктов, проводили определение местоположения на полученных хроматограммах пятен немеченых исходных субстанций с помощью УФО-кабинета и камеры, насыщенной парами йода. В качестве эталонного раствора использовали 10%-й раствор гидрокарбоната натрия, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл. Место расположения пятна модифицированного ДТПА находили по его характерному свечению в ультрафиолетовом свете и появлению коричневого пятна в йодной камере. В результате было установлено, что исходной субстанции модифицированного ДТПА соответствует область $R_f = 0,5$.

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение радиохроматограмм, полученных при анализе проб исходного элюата

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ из генератора, показало, что пертехнетат-ионам семивалентного $^{99\text{m}}\text{Tc}$ на ленточках хроматограмм во всех выбранных подвижных фазах (системах) соответствует пик с $R_f = 0,9$. То же самое наблюдается при прямом взаимодействии $^{99\text{m}}\text{Tc}$ с модифицированным ДТПА. Здесь также во всех системах на хроматограммах наблюдается единственный пик в области $R_f = 0,9$, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия ДТПА_{мод} с $^{99\text{m}}\text{Tc(VII)}$.

Напротив, при введении в элюат $^{99\text{m}}\text{Tc}$ восстановителя Sn(II) основной пик смещается, практически, к линии старта в область $R_f = 0,1$, что позволяет предполагать образование малоподвижного гидролизованного оксида $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$. Не исключена также хемосорбция радионуклида на поверхности коллоида олова, образующегося при гидролизе $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Вероятность такого взаимодействия достаточно велика, т.к. количество ядер $^{99\text{m}}\text{Tc}$ несоизмеримо мало по сравнению с количеством атомов олова. Информация в литературе по этому вопросу отсутствует. Тем не менее тот факт, что смещение пика в область $R_f = 0,1$ связано с восстановлением $^{99\text{m}}\text{Tc}$, не вызывает сомнения.

В процессе работы были исследованы смеси следующего состава.

Смесь № 1. Во флакон вместимостью 10 мл ввели 0,1 мл 5%-го раствора гидрокарбоната натрия, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1,1 мг/мл, 0,02 мл раствора хлорида олова с концентрацией $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 мг/мл и 5 мл элюата $^{99\text{m}}\text{Tc}$. После инкубирования смеси в течение 20 мин провели отбор проб объемом 5 мкл для хроматографирования. pH раствора = 7.

Смесь № 2. Во флакон ввели 0,1 мл 10%-го раствора гидрокарбоната натрия, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1,1 мг/мл, 0,01 мл 1 М раствора NaOH, содержащего Sn в количестве 11,9 мг/мл (по металлу) и 5 мл элюата $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Время инкубирования 20 мин. pH раствора = 8.

Смесь № 3. Во флакон ввели 0,1 мл обезвоженного спирта, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл, 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего Sn в количестве 6,3 мг/мл (по металлу) и 5 мл элюата $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Инкубировали в течение 20 мин. pH раствора = 6.

Смесь № 4. Во флакон ввели 1 мл обезвоженного спирта, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл, 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего Sn в количестве 1 мг/мл (по металлу) и 5 мл элюата, $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Инкубировали в течение 20 мин. pH раствора = 6.

Смесь № 5. Во флакон ввели 0,1 мл 10%-го раствора гидрокарбоната натрия, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл и 0,01 мл 1 М раствора NaOH, содержащего

Sn в количестве 11,9 мг/мл (по металлу). Смесь высушили до сухого остатка и ввели 5 мл элюата ^{99m}Tc. Инкубировали в течение 20 мин. pH раствора = 8.

Смесь № 6. Во флакон ввели 0,1 мл обезвоженного спирта, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл, 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего Sn в количестве 6,3 мг/мл (по металлу). Смесь высушили до сухого остатка и ввели 5 мл элюата ^{99m}Tc. Инкубировали в течение 20 мин. pH = 6.

Смесь № 7. Во флакон ввели 0,1 мл обезвоженного спирта, содержащего ДТПА_{мод} в количестве 1 мг/мл. После упаривания до сухого остатка, на другую сторону дна флакона внесли 0,01 мл 1 М HCl, содержащей Sn в количестве 0,63 мг/мл (по металлу) и также упарили. После ввели 5 мл элюата ^{99m}Tc и провели инкубирование в течение 20 мин. pH раствора = 8. Результаты хроматографирования всех смесей представлены в таблице.

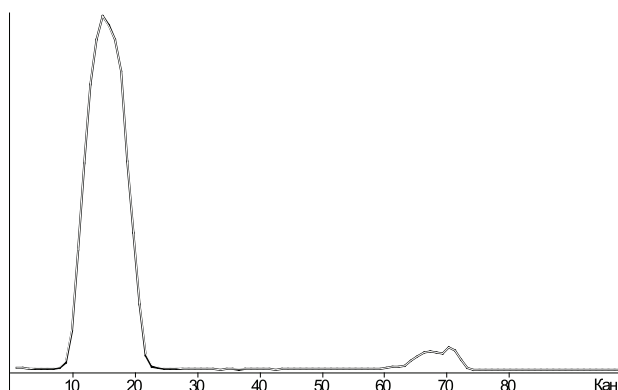
Обобщенные данные по введению метки ^{99m}Tc в структуру ДТПА_{мод}

Номер смеси	Система	Расстояние от линии старта, L, см									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Активность, имп./с									
1	Ацетон	41661	118270	688	570	781	1165	1745	2619	126	–
	Система № 1	76314	93553	1511	4760	2501	148	148	112	–	–
2	Система № 1	163	566	1364	608	6270	246149	132	109	–	–
3	Система № 1	72	66151	109302	4715	3117	4367	3182	77	–	–
4	Система № 2	186	196907	17877	11905	12930	16945	27405	114136	2466	230
5	Система № 1	129	2893	4876	2814	11027	248081	144	104	–	–
6	Система № 1	67	58905	118239	5940	1629	2650	103	67	–	–
7	Система № 2	145	294076	918	468	476	925	2436	14006	5541	165

Из анализа радиохроматограмм, представленных в таблице, можно сделать следующие выводы. Исходя из хроматограммы смеси № 2, где для мечения ДТПА_{мод} использовался раствор SnCl₂ в 1 М NaOH, следует, что олово в щелочной среде не проявляет восстанавливающих свойств. Напротив, в спиртовом растворе (смесь № 3) наблюдается полное восстановление ^{99m}Tc.

Однако в этой среде происходит полное растворение коллоида ДТПА_{мод}.

Наиболее интересный результат получается при прямом взаимодействии раствора элюата ^{99m}Tc с раствором смеси № 1 [0,107 мг ДТПА_{мод} + 0,14 мг SnCl₂], которой соответствует хроматограмма, приведенная на рисунке. Подвижная фаза – ацетон.



Радиохроматограмма элюата ^{99m}Tc с раствором смеси [0,107 мг ДТПА_{мод} + 0,14 мг SnCl₂]

Исходя из хроматограммы можно сделать вывод, что содержание радиохимической примеси (РХП) невосстановленного ^{99m}Tc (VII) в полученном препарате нанокolloида составляет 2,7%. Это достаточно хороший показатель, близко соответствующий нормативным требованиям к подобным препаратам. Окончательный вывод о его

качестве и функциональной пригодности может быть сделан только при проведении медико-биологических испытаний на следующих этапах проведения НИР.

Достаточно низкое содержание радиохимической примеси ^{99m}Tc (VII) наблюдается также при взаимодействии элюата ^{99m}Tc с сухими остатками, полученными из

спиртовых смесей (хроматограмма смеси № 7 в системе № 2). Здесь величина РХП составляет 4,8%.

В заключение следует отметить, что ни на одной из радиохроматограмм, представленных в таблице, нам не удалось зафиксировать немеченую субстанцию в области $R_f = 0,5$. Пятно проявлялось по $R_f = 0,1$. Из этого следует, что субстанция взаимодействует, скорее всего, с оловом, через которое вводится радиоактивная метка с ^{99m}Tc , например, путем присоединения к хелатирующим группам цепочки $-\text{Sn}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{Tc}(\text{OH})\text{O}$ вместо «прямого» присоединения гидратированного иона $\text{Tc}(\text{OH})\text{O}^+$. Во избежание гидролиза олова, приводящего к его окислению и снижению восстанавливающих свойств, в дальнейшем для приготовления нанокolloидного раствора ДТПА_{мод} планируется использовать раствор олова в виде лиофилизата.

Заклучение

В результате проведенных исследований определены условия введения радиоактивной метки ^{99m}Tc в структуру модифицированного ДТПА и подобраны количественные составы реагентов для наработки опытных партий нанокolloидных препаратов с низким содержанием радиохимической примеси $^{99m}\text{Tc}(\text{VII})$ для последующего проведения исследований на экспериментальных животных.

Список литературы

1. Визуализация поглощения миокардом фенолпентадекановой кислоты, меченой $\text{Mn}(\text{II})\text{ДТПА}$, с использованием низкочастотной магнитно-резонансной томографии в эксперименте / М.Л. Белянин, В.Ю. Усов, О.Ю. Бородин, В.Д. Филимонов // Медицинская визуализация – 2007. – № 2. – С. 124–129.
2. Becker W.S., Behr T.M., Cumme F., Rössler W., Wendler J., Kern P.M., Gramatzki M., Kalden J.R., Goldenberg D.M., Wolf F.G. 67Ga citrate versus 99mTc-labeled LL2-Fab' (anti-CD22) fragments in the staging of B-cell non-Hodgkin's lymphoma // Cancer Res. – 1995. – Vol. 1, № 55. – P. 5771s–5773s.

3. Ciambellotti E., Lanza E., Coda C., Cartia G.L. Comparison of 2 microcolloids labeled with ^{99m}Tc Minerva Med, Lymphoscintigraphy. – 1986. – № 10;77. – P. 313–319.

4. Miot-Noirault E. Perin F. Routledge L. Normier G. Le Pape A. Macrophage targeting with technetium-99m labelled J001 acylated poly-galactoside for scintigraphy of inflammation: optimization and assessment of imaging specificity in experimental arthritis // Eur J Nucl Med. – 1996. – № 23(1). – P. 61–69.

5. Yoshida H., Uno K., Minoshima S., Imazeki K., Miyoshi T., Saitou M., Akiba H., Arimizu N. Fundamental study of ^{99m}Tc nanocolloids for inflammation imaging // Radioisotopes. – 1989. – № 38(8). – P. 347.

References

1. Beljanin M.L. Usov V.Ju. Borodin O.Ju. Filimonov V.D. Vizualizacija pogloshhenija miokardom fenilpentadekanovoj kisloty, mechenoj $\text{Mn}(\text{II})\text{DTPA}$, s ispol'zovaniem nizkopol'noj magnitno-rezonansnoj tomografii v jeksperimente // Medicinskaja vizualizacija. 2007. no. 2. pp. 124–129.
2. Becker W.S. Behr T.M. Cumme F. Rössler W. Wendler J. Kern P.M. Gramatzki M. Kalden J.R. Goldenberg D.M. Wolf F.G. 67Ga citrate versus ^{99m}Tc -labeled LL2-Fab' (anti-CD22) fragments in the staging of B-cell non-Hodgkin's lymphoma, Cancer Res., 1995, no.1;55, pp. 5771–5773.
3. Ciambellotti E. Lanza E. Coda C. Cartia G.L. Comparison of 2 microcolloids labeled with ^{99m}Tc Minerva Med, Lymphoscintigraphy., 1986, no. 10;77, pp. 313–319.
4. Miot-Noirault E. Perin F. Routledge L. Normier G. Le Pape A. Macrophage targeting with technetium-99m labelled J001 acylated poly-galactoside for scintigraphy of inflammation: optimization and assessment of imaging specificity in experimental arthritis, Eur J Nucl Med., 1996, no. 23(1), pp. 61–69.
5. Yoshida H. Uno K. Minoshima S. Imazeki K. Miyoshi T. Saitou M. Akiba H. Arimizu N. Fundamental study of ^{99m}Tc nanocolloids for inflammation imaging, Radioisotopes., 1989, no. 38(8), p. 347.

Рецензенты:

Чернов В.И., д.м.н., профессор, руководитель отделения радионуклидной диагностики, ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии СО РАМН», г. Томск;

Лишманов Ю.Б., д.м.н., профессор, заместитель директора по научно-исследовательской работе, ФГБУ «Научно-исследовательский институт кардиологии» СО РАМН, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 24.09.2013.