

УДК 577.3: 615.33
541.182+661.242+661.871.9:615.849.23+616-006

Б.М.МАНУЙЛОВ^{1,*}, А.В.ЕРМАКОВ²

¹ООО «Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Салута-М»», г.Истра, Московская область, 143500

²Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, 125284

e-mail: info@saluta.ru
kamrey@rambler.ru

Получение и свойства нанокolloидного раствора на основе сульфида рения для лимфосцинтиграфических методов исследования микрометастазов

Предложен способ получения нанокolloидного раствора сульфида рения, который включает следующие стадии: взаимодействие перрената аммония и тиосульфата натрия в водном растворе желатина в кислой среде при нагревании до 70—80°; нейтрализация pH до значения 7,0; диализ против физиологического раствора; обессоливание и концентрирование ультрафильтрацией. Полученный коллоидный раствор содержит 85% частиц с оптимальным размером 80—100 нм и может быть использован в качестве диагностического средства для лимфосцинтиграфии «сторожевых» лимфатических узлов при онкологических и других заболеваниях.

Ключевые слова: диагностическое средство, лимфосцинтиграфия, нанокolloидный раствор.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-3-78-83

В последнее время с целью диагностики состояния лимфатической системы применяются лимфосцинтиграфические методы исследования. Лимфосцинтиграфия была внедрена в хирургическую практику как основной метод для исследования особенностей лимфатического дренажа опухолей [1]. Лимфосцинтиграфия позволяет диагностировать метастатические поражения лимфатических узлов, устанавливать причины отеков и оценивать нарушения лимфатического дренажа при различных заболеваниях [2—4].

Обнаружение микрометастазов методами функциональной радионуклидной лимфосцинтиграфии в лимфатических узлах позволяет осуществлять коррекцию хирургического лечения и проводить органосохранные операции [5—7].

Для достижения наиболее эффективного действия диагностическое средство должно представлять собой коллоидную систему с размером частиц от 80 до 100 нм, которые способны при подкожном введении в область новообразования поступать через физиологические капилляры в лимфатические сосуды и лимфатические узлы [8].

В настоящее время в мировой практике для лимфосцинтиграфии используется ряд агентов, содержащих коллоидный раствор сульфида рения, меченного изотопом технеция-99 (⁹⁹Tc). К таким средствам относятся препараты Nanocis (Франция), Nanotop (Германия), Nanocoll (Италия) и Корен 99mTc (Россия). Радиоактивный изотоп технеций имеет очень короткий период полураспада (6 ч) и низкую стоимость, что способствует широкому

Мануйлов Борис Михайлович, Ермаков Анатолий Викторович.

* Автор для переписки.

распространению радиоизотопных исследований с применением этого компонента [9—11].

Однако перечисленные зарубежные лимфотропные препараты труднодоступны для широкого применения, а отечественный препарат Корен 99mTc обладает существенным недостатком: он может быть захвачен клетками ретикулоэндотелиальной системы и выделен в лимфатическое русло только после того, как образует коллоидно-опсониевый комплекс с белками крови.

В связи с этим создание отечественного нанокolloидного диагностического лимфотропного средства, обладающего всеми необходимыми свойствами (в том числе требуемыми размерами наночастиц 80—100 нм), а также доступного для широкого использования и удобного в применении, является весьма актуальной задачей практической медицины.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали отечественные реактивы квалификации «ч.д.а.» и «х.ч.». Эксперименты по обессоливанию препарата проводили на колонке (1,5×30 см) сефадекса G-25sf (Pharmacia, Швеция); применяли УФ-детектор с длиной волны 280 нм (mod.Uvicord S11 Pharmacia LKB, Швеция).

Получение коллоидного раствора в общем виде проводили следующим образом. В стеклянный термостатируемый реактор, оборудованный системой перемешивания, помещали 100 мл 1%-ного раствора желатина в 0,4 н. HCl и 30—40 мг перрената аммония. Полученный раствор при перемешивании нагревали до 40°, добавляли порционно водный раствор 400 мг тиосульфата натрия (100 мг/мл по 0,1 мл), постепенно повышая температуру реакционной массы до 70—80°. При этой температуре смесь интенсивно перемешивали в течение 15—20 мин, а затем продолжали перемешивание при температуре 20° в течение еще 1,5 ч. Реакция начиналась с помутнения прозрачного раствора перрената аммония (за счет образования гептасульфида рения), после чего окраска реакционной массы изменялась от светло-желтой до коричневой. По окончании реакции pH полученной массы нейтрализовали до 7,0, добавляя небольшими порциями сухой гидроксид натрия. Полученный коллоидный раствор гептасульфида рения в желатине диализовали против физиологического раствора и концентрировали в ячейке для ультрафильтрации (Amicon, США), используя мембрану PM-10 (Nuclepore, США). Вязкость полученных коллоидных растворов определяли с помощью стеклянных вискозиметров ВПЖ-2 (Россия) [12].

Исследование размера частиц и дисперсности коллоидных препаратов проводили методом седиментационной неустойчивости с помощью спектрометра динамического рассеяния света (Photocor Complex, Россия). Поскольку исследуемые частицы склонны к агломерации и достаточно быстро оседают, для получения более достоверных результатов суспензию частиц диспергировали с помощью ультразвукового излучения на лазерном анализаторе частиц (MicroSizer 201, Япония). За время эксперимента все частицы исследуемой суспензии многократно проходили через световой пучок, что обеспечивало высокую степень усреднения результатов в виде объемных долей, соответствующих эквивалентным диаметрам частиц при лазерной дифракции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существующие методы получения коллоидных растворов гептасульфида рения основаны на реакции восстановления рениевых солей тиосульфатом натрия в кислой среде в растворах этиленгликоля, альбумина, декстрина или желатина [8, 10, 13—16].

С целью получения стабильного коллоидного раствора гептасульфида рения с размером частиц 80—100 нм нами была применена хорошо изученная реакция взаимодействия перрената аммония с тиосульфатом натрия в кислой среде с использованием водных растворов желатина.

Были изучены следующие факторы, влияющие на получение и свойства коллоидного раствора:

- температура и концентрация соляной кислоты в процессе взаимодействия перрената аммония с тиосульфатом натрия;
- концентрация водного раствора желатина;
- стабильность коллоидного раствора гептасульфида рения в различных буферных системах;
- плотность и вязкость коллоидного раствора гептасульфида рения;
- размер и дисперсность частиц коллоидного раствора гептасульфида рения.

Было показано, что для начала реакции перрената аммония с тиосульфатом натрия **температура реакционной массы** должна быть не менее 40°; с повышением температуры скорость реакции увеличивается и достигает максимума при температуре 70—80°.

Для изучения влияния концентрации водородных ионов на синтез гептасульфида рения реакцию проводили в присутствии 0,5 н., 0,4 н. и 0,2 н. HCl. Было найдено, что для успешного синтеза гептасульфида рения концентрация соляной кис-

Свойства коллоидных растворов гептасульфида рения в различных буферных системах и при разной температуре
Characteristics of rhenium heptasulfide colloidal solutions in various buffer systems and at various temperatures

№	Состав образца Composition of sample	Температура, °C Temperature, °C	Кинематическая вязкость, сСт (среднее значение из 4 измерений) Kinematic viscosity, cSt (mean value of 4 measurements)	Плотность, г/см ³ Density, g/cm ³	Динамическая вязкость, сП Dynamic viscosity, cP	Размер коллоидных частиц* (доля в препарате) Size of colloidal particles (percentage in preparation)
1	0,25 мг/мл Re ₂ S ₇ , 1%-ный раствор желатина в 0,01М аскорбатном буфере, содержащем 0,15M NaCl 0.25 mg/ml Re ₂ S ₇ , 1% solution of gelatin in 0.01 M ascorbate buffer with 0.15 M NaCl	20	2,560	1,011	2,530	22,4 нм (5%) 470 нм (92%)
		30	0,976	1,008	0,968	
2	0,25 мг/мл Re ₂ S ₇ , 1%-ный раствор желатина в 0,01М цитратном буфере, содержащем 0,15M NaCl 0.25 mg/ml Re ₂ S ₇ , 1% solution of gelatin in 0.01 M citrate buffer with 0.15 M NaCl	20	2,54	1,010	2,510	102,6 нм (45%) 469,3 нм (53%)
		30	0,981	1,007	0,974	
3	0,25 мг/мл Re ₂ S ₇ , 1%-ный раствор желатина в физиологическом растворе (0,15M NaCl) 0.25 mg/ml Re ₂ S ₇ , 1% solution of gelatin in saline (0.15 M NaCl)	20	2,554	1,012	2,520	102,6 нм (97%)
		30	0,974	1,008	0,966	

*Исследование размера частиц проведено методом седиментационной неустойчивости.

*Particle size was measured by the method of sedimentation instability.

лоты в реакционной смеси должна быть не менее 0,4 н.; снижение нормальности HCl до значения 0,2 н. приводит к прекращению реакции.

Стабильность полученного коллоидного раствора гептасульфида рения исследовали в разных условиях. С этой целью аликвоты коллоидного раствора диализовали против следующих растворов:

- 0,01 М аскорбатного буфера, содержащего 0,15 М NaCl;
- 0,01М цитратного буфера, содержащего 0,15M NaCl;
- физиологического раствора (0,15 М NaCl).

После диализа раствор обессоливали на сефадексе G-25sf, уравновешенном соответствующим

буфером. В этих опытах использовали УФ-детектор с длиной волны 280 нм.

Было обнаружено, что коллоидный раствор элюируется с колонки сефадекса в свободном объеме одним большим пиком с характерной для белка полосой поглощения в области 280 нм, что свидетельствует о его высокой молекулярной массе. Для дальнейшего исследования обессоленные коллоидные растворы концентрировали на мембране PM-10.

Из приведенных выше результатов следует, что гептасульфид рения образует стабильный комплекс с желатином (таблица).

Исследование плотности и вязкости образцов полученных коллоидных растворов. Коллоидный раствор гептасульфида рения в желатине

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА НАНОКОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА НА ОСНОВЕ СУЛЬФИДА РЕНИЯ

Лазерный анализатор частиц
ВА Инсталт

Micro Sizer 201

Санкт-Петербург
Россия

Оператор:		Комментарий:			
Имя файла:	Re-холоид желатина физ-ра.ems				
Дата:	08.11.2012	Расчет по:	Фраунгоферу	Диапазон:	(0.20-300) нм
Время:	18:25:44	Ультразвук:	Мощность 200 Вт Время 60с.	Кэфф. пропускания:	91.0 %

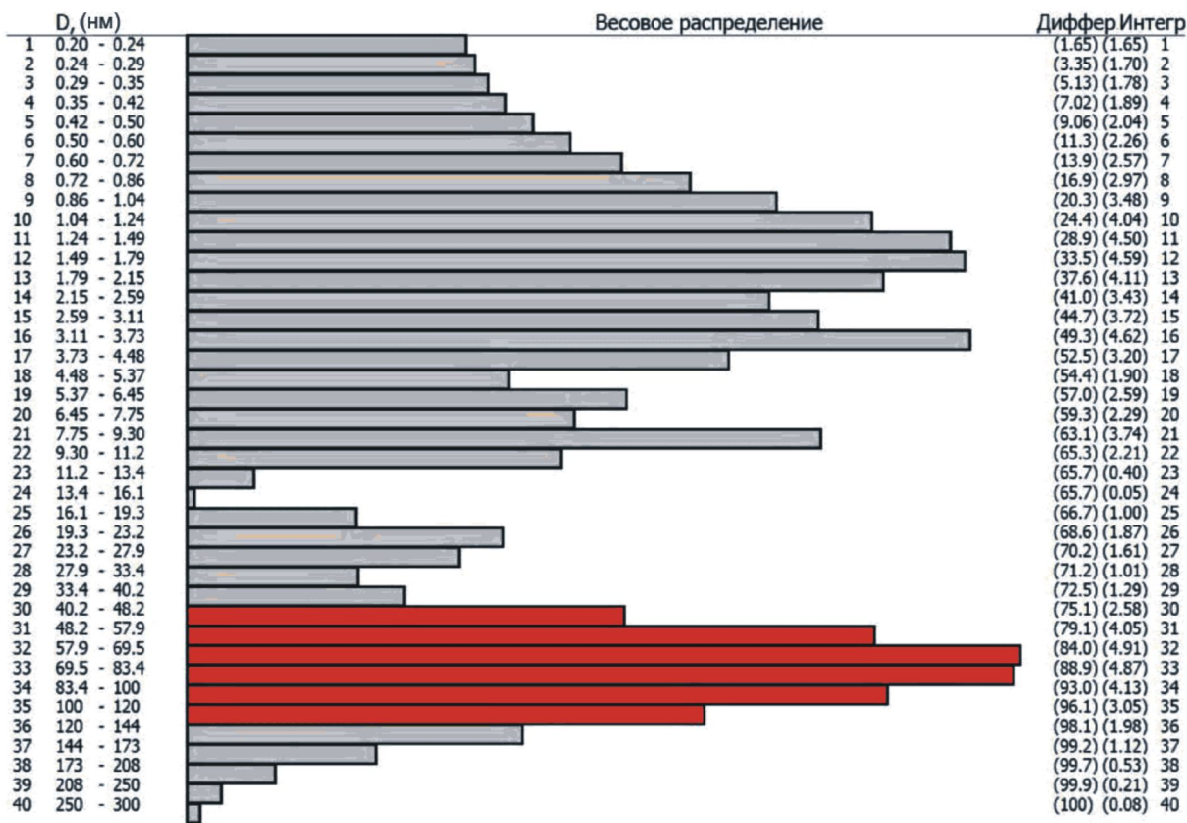


Таблица соответствия размеров частиц (D, нм) заданным значениям весовых долей

D, nm	0.54	1.02	1.57	2.46	3.88	8.03	27.3	60.0	87.8	300
P, %	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	70.0	80.0	90.0	100

Таблица весовых долей частиц (P, %), соответствующих заданным значениям размеров частиц

P, %	36.0	43.9	53.7	64.2	65.6	70.6	75.8	93.0	98.4	100
D, nm	2.00	3.00	5.00	10.0	15.0	30.0	50.0	100	150	300

Размер коллоидных частиц раствора гептасульфида рения в желатине, диализованного против физиологического раствора (по данным лазерного анализа)

Size distribution of particles of colloidal solution of rhenium heptasulfide in gelatin after dialysis against saline (according to laser analysis)

предназначен для лимфосцинтиграфического исследования при подкожном введении; поэтому важно, чтобы, попадая в лимфу, он максимально соответствовал таким ее физиологическим показателям, как плотность и вязкость. Известно, что плотность лимфы из разных областей организма колеблется от

1,017 до 1,026 г/см³, а вязкость может быть сравнима с вязкостью плазмы крови — 1,7 до 2,2 сСт.

Два указанных параметра полученных коллоидных растворов исследовали с использованием стандартных методов и различных буферных система (см. таблицу).

Как следует из данных таблицы, образцы коллоидных растворов гептасульфида рения в различных буферных системах незначительно отличаются друг от друга по плотности и вязкости и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к компонентам для лимфосцинтиграфии (1,012—1,026 сСт при 30°).

Исследование размера частиц и дисперсности полученных препаратов было проведено методом изучения их седиментационной неустойчивости. Результаты этого исследования приведены в таблице (столбец «Размер коллоидных частиц»).

Из представленных результатов следует, что коллоид рения в желатине и аскорбатном буфере состоит в основном из частиц размером 470 нм (92%) с примесью частиц размером 22 нм (5%), что свидетельствует о значительной степени коагуляции коллоидных частиц. Такой же результат получен при исследовании образца № 2, коллоида рения в желатине и цитратном буфере. Использование цитратного буфера приводит при хранении в течение недели к образованию примерно в равных количествах коллоидных частиц размером 100 нм и 500 нм. Коллоид рения в желатине и физиологическом растворе (образец № 3) представляет собой устойчивый комплекс с размером частиц порядка 100 нм (см. таблицу).

Эти результаты были подтверждены при изучении образца № 3 (см. таблицу) с помощью лазерного анализатора (рисунок).

Как следует из полученных данных (см. рисунок), основная часть коллоидного раствора гептасульфида рения в желатине представляет собой частицы, размер которых равен 70—100 нм. Вместе с тем, в образце, исследуемом указанным методом, детектируется до 20% частиц с размером 1—5 нм. По-видимому, эти частицы представляют собой надмолекулярные структуры низкомолекулярных фрагментов желатина, образующих прочные комплексы с гептасульфидом рения.

Таким образом, на основании полученных результатов образец № 3, представляющий собой коллоидный раствор гептасульфида рения в желатине после диализа против физиологического раствора, может быть рекомендован для дальнейших исследований *in vivo* в качестве диагностического средства при лимфосцинтиграфии «сторожевых» лимфатических узлов при онкологических и других заболеваниях.

Выражаем глубокую благодарность д.х.н. Н.С. Мирзабековой и к.х.н. Т.И. Новожиловой за проведение экспериментальных работ.

We are deeply acknowledged to Dr. N.S. Mirzabekova and Cand. Chem. Sci. T.I. Novozhilova for performance of experiments.

Получено 12.05.16

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blakeslee, D.B.* Lymphoscintigraphy of the neck. *Otolaryngol Head and Neck* / D.B. Blakeslee, G.D. Becker, G.T. Simpson // *Surg. Oncol.* — 1985. — V. 93. — P. 361—365.
2. *Krag, D.N.* Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe / D.N. Krag, D.L. Weaver, J.C. Alex, J.T. Fairbank // *Surg. Oncol.* — 1993. — V. 101. — P. 335 — 339.
3. *Alazraki, N.P.* Sentinel node staging of early breast cancer using lymphoscintigraphy and the intraoperative gamma-detecting probe / N.P. Alazraki, T. Styblo, S.F. Grant, C. Cohen, T. Larsen, J.N. Aarsvold // *Semin. Nucl. Med.* — 2000. — V. 30. — P. 56—64.
4. *Ames, F.* Tumor Location and Nodal Drainage Patterns on Lymphoscintigraphy Are Predictors of Axillary Sentinel Lymph Node Status / F. Ames, C. Laronga, M. Ross, J. Alderfer // *J. ASCO.* — 2001. — V. 20. — P. 40—43.
5. *Романов И.С.* «Сторожевые» лимфатические узлы при плоскоклеточном раке головы и шеи / И.С. Романов, А.А. Оджарова, Д.Л. Ротин, М.И. Нечушкин // *Вестник оториноларинголог.* — 2007. — № 6. — С. 14—17.
6. *Romanov, I.S.* Sentinel lymph nodes at squamous cell carcinoma of head and neck / I.S. Romanov, A.A. Odzharova, D.L. Rotin, and M.I. Nechushkin // *J. Otolaryngology.* — 2007. — N 6. — P. 14—17.
7. *Kern, K.A.* Preoperative lymphoscintigraphy during lymphatic mapping for breast cancer: improved sentinel node imaging using subareolar injection of technetium 99m sulfur colloid / K.A. Kern, R.J. Rosenberg // *J. Am. Coll. Surg.* — 2000. — V. 191. — P. 479—489.
8. *Лутцевич Е.В., Решетов Д.Н., Прилепо Ю.В.* Способ диагностики метастазирования при раке молочной железы или меланоме // Патент РФ № 2195871, А61В6/02. 2003.
9. *Lutsevich E.V., Reshetov D.N., and Prilepo Ju.V.* Method for diagnostics of metastasis at mammary cancer or melanoma // Patent of RF 2195871, А61В6/02. 2003.
10. *Tu, W.* Synthesis of small-sized rhenium sulfide colloidal nanoparticles / W. Tu, B. Denizot // *J. Coll. Interface Sci.* — 2007. — V. 310. — P. 167—170. http://www.scirus.com/sisapp/sciruslink?src=mdl&url=http%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fentrez%2Fquery.fcgi%3Fcmd%3DRetrieve%26db%3Dpubmed%26dopt%3DAbstract%26list_uids%3D17321536/
11. *Khalkhali, I.* Scintimammography: the complementary role of Tc-99m Sestamibi prone breast imaging for the diagnosis of breast carcinoma / I. Khalkhali, J.A. Cutrone, I.J. Mena // *Radiology.* — 1995. — V. 196. — P. 421—426.
12. *Tsopelas, Ch.* ^{99m}Tc-Labeled and Unlabeled Antimony Trisulfide and Rhenium Sulfide Colloids Intended for Lymphos-

- cintigraphic Application // J. Nucl. Med. — 2001. — V. 42. — P. 460—466.
11. Weiss, M. Sentinel node mapping in patients with malignant melanoma using melanoma Tc-99m colloidal rhenium sulfide/ M. Weiss, Ch. Kunte, R.A. Schmid, B. Konz // J. Clin. Nucl. Med. — 2003. — V. 28. — P. 379 — 384.
 12. Мануйлов Б.М., Новожилова Т.И., Мирзабекова Н.С., Ермаков А.В. Способ получения коллоидного компонента диагностического средства для непрямой лимфосцинтиграфии // Заявка на патент РФ № 2014140841/20 (066188) от 09.10.2014 г., А61В6/02.
Manuilov, B.M., Novozhilova, T.I., Mirzabekova, N.S., and Ermakov, A.V. Method for obtaining of colloidal component of diagnostic tool for indirect lymphoscintigraphy // Application claim (country RU) 2014140841/20 (066188), 09.10.2014 г., А61В6/02.
 13. Mochiki, E. Sentinel lymph node mapping with technetium-99m colloidal rhenium sulfide in patients with gastric carcinoma / E. Mochiki, H. Kuwano, Y. Kamiyama, R. Aihara, T. Nakabayashi, K. Endo // Amer. J. Surg. — 2006. — V. 191. — P. 465—469.
 14. Nuñez, E.G.F. Influence of colloid particle profile on sentinel lymph node uptake / E.G.F. Nuñez, B.L. Faintuch, R. Teodoro, D.P. Wiecek, J.R. Martinelli, N.G. Da Silva, C.E. Castanheira, R. Pasqualini // J. Nucl. Med. Biol. — 2009. — V. 36. — P. 741 — 747. http://www.scirus.com/srsapp/scirus-link?src=mdl&url=http%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fentrez%2Fquery.fcgi%3Fcmd%3DRetrieve%26db%3Dpubmed%26dopt%3DAbstract%26list_uids%3D19720286/
 15. Jimenez, I.R. Particle sizes of colloids to be used in sentinel lymph node radiolocalization / I.R. Jimenez, M. Roca, E. Vega, M.L. Garcia, A. Benitez, M. Baje'n // J. Nucl. Med. Commun. — 2008. — V. 29. — P.166—172.
 16. Bensimhon, L. Influence of temperature on the radiochemical purity of 99mTc-colloidal rhenium sulfide for use in sentinel node localization / L. Bensimhon, T. Me'taye', J. Guilhot, R. Perdrisot // J. Nucl. Med. Commun. — 2008. — V. 29. — P.1015—1020.

B.M. MANUILOV^{1,*}, and A.V. ERMAKOV²

¹The Pharmaceutical Research Enterprise *Saluta-M*, 143500, Istra, Moskovskaya oblast Russia

² The Herten Moscow Research Institute for Oncology, Branch of National Medical Research Center for Radiology, Ministry of Health of RF, 125284, Moscow Russia

e-mail: info@saluta.ru
kamrey@rambler.ru

Preparation and Properties of Nanocolloidal Solution based on Rhenium Sulfide for Lymphoscintigraphy Methods of Micrometastases Investigation

A method for producing a nanocolloidal solution of rhenium sulfide has been suggested. It includes the following stages: interaction of ammonium perrhenate and sodium thiosulfate in aqueous solution of gelatin in an acidic medium by heating up to 70—80°C; pH neutralization up to 7.0; dialysis against saline; desalination and concentrating by ultrafiltration. The obtained colloidal solution contains 85% particles with the optimal size 80—100 nm and can be used as a diagnostic tool in lymphoscintigraphy of “sentinel” lymph nodes in patients with cancer and other diseases.

Key words: diagnostics, lymphoscintigraphy, nanocolloidal solution.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V 32, N 3, P. 78—83.

* Author for correspondence.