Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»

На правах рукописи

Варламова Наталья Валерьевна

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НАНОКОЛЛОИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СТОРОЖЕВЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ

05.17.02 – Технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов

Диссертация на соискание ученой степени
доктора технических наук

Научный консультант:
д-р техн. наук, профессор
Скуридин В. С.

Томск – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….……..... 5

Глава 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ…… 15

1.1 Характеристика методов, используемых для выявления сторожевых лимфатических узлов…….……..… 15

1.1.1 Контрастный метод выявления сторожевых лимфатических узлов …... 15

1.1.2 Радионуклидная лимфосцинтиграфия …… 16

1.3.3 Выявление сторожевых лимфатических узлов методом двойного контрастирования ……..…… 24

1.2 Радиофармпрепараты для визуализации сторожевых лимфатических узлов……...…….. 24

1.3 Обоснование целесообразности использования оксида алюминия для изготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»…….……... 30

1.4 Выводы по главе …….…. 33

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……. 35

2.1 Характеристика используемых материалов и оборудования…….. 35

2.2 Методики приготовления растворов и реагентов для получения наноколлоидов меченных технецием -99м…….. 39

2.2.1 Приготовление раствора олова дихлорида дигидрата…….…… 39

2.2.2 Приготовление раствора желатина…….…. 39

2.2.3 Приготовление раствора аскорбиновой кислоты…….….. 39

2.2.4 Приготовление суспензии из порошка гамма-оксида Al_2O_3……. 40

2.3 Методики проведения радиометрических измерений……..…… 41

2.3.1 Определение объемной активности технеция-99м……..... 41

2.3.2 Определение степени адсорбции ^{99m}Tc на оксидах алюминия с различной кислотной обработкой…… 42

2.3.3 Методика получения радиохроматограмм……..… 42

2.3.4 Определение размера меченных ^{99m}Tc наноколлоидных частиц методом фильтрации……..… 43
2.3.4 Инструментальный метод определения размеров меченых наноколлоидов…… 44
2.5 Методики проведения микробиологических исследований …… 45
2.5.1 Определение бактериальных эндотоксинов …… 45
2.5.2 Определение стерильности …….. 49
2.6 Определение функциональной пригодности РФП для сцинтиграфического выявления «сторожевых» лимфатических узлов…… 50
2.7 Определение функциональной пригодности РФП для интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов…… 51
2.8 Методы статистической обработки результатов…….. 52
2.9 Выводы по главе ……..… 53
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НАНОРАЗМЕРНЫХ КОЛЛОИДОВ. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ……... 54
3.1 Формирование наноразмерных коллоидных систем на основе диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА)……..…….. 55
3.2 Получение наноколлоидных препаратов на основе Fe@C..... 67
3.3 Получение наноколлоидного радиофармпрепарата на основе наноразмерных порошков Al_2O_3..... 74
3.3.1. Исследование адсорбционных характеристик Al2O3 к пертехнетат-ионам технеция-99м ……. 74
3.3.2. Коэффициент распределения ^{99m}Tc в системе HCl - Al_2O_3 …… 78
3.3.3 Изучение влияния общей активности ^{99m}Tc на величину степени его адсорбции ……..……..… 82
3.3.4 Проведение процесса адсорбции восстановленного технеция-99м на наноразмерном порошке оксида алюминия…… 84

3.4 Разработка методики изготовления лиофилизированного набора реагентов для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»……..... 91
3.5 Выводы по главе …….. 101
Глава 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ И НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ПРОИЗВОДСТВО ПРЕПАРАТА «НАНОКОЛЛОИД, ^{99m}Tc-Al_2O_3»……. 103
4.1. Качественное и количественное определение оксида алюминия……..… 104
4.2. Качественное и количественное определение Sn (II)……..… 109
4.3. Качественное и количественное определение аскорбиновой кислоты…. 117
4.4. Качественное и количественное определение желатина…… 125
4.5 Определение срока годности РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»…… 128
4.6 Определение срока хранения реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» ……..……..……. 132
4.7. Разработка нормативной документации на РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» …… 135
4.8 Выводы по главе ……. 141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..…… 142
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ…… 144
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……..…… 145
ПРИЛОЖЕНИЯ
Приложение 1 Акты внедрения результатов диссертационной работы …….. 175
Приложение 2 Патенты…….. 177
Приложение 3 Проект Фармакопейной статьи предприятия …… 180
Приложение 4 Проект опытно-технологического регламента на производство лиофилизата для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» (ОПР-14402245-02-14)…….…… 195

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время в нашей стране онкологические заболевания находятся на втором месте в структуре причин смертности населения. Каждый год в России от злокачественных новообразований умирает около трехсот тысяч человек, а заболевает ими почти пятьсот тысяч. Результативность оказания медицинской помощи онкологически больным зависит от уровня развития и внедрения в медицинскую практику современных методов ядерной медицины [1 - 3].

В США и Европе ядерная медицина считается самым прогрессивным методом ранней диагностики онкологических, кардиологических, эндокринных и ряда других заболеваний. В Америке больше 80% пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО) полностью вылечиваются уже в первый год и проходят пятилетний рубеж после постановки диагноза. В настоящее время Россия по радионуклидной диагностике заметно отстает от других стран. Уровень производства отечественных радиофармпрепаратов (РФП) не превышает 3 % от их потенциального спроса. В России в практической медицине используются 22 РФП для проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и около 6 препаратов для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) на основе 4-х ультракороткоживущих радионуклидов и порядка 20 импортных наборов для радиоиммуного анализа (РИА-наборы) [1]. В то же время в США применяются около 130 радионуклидных тестов in vivo и около 60 радиодиагностических методов in vitro [4].

Методы ядерной медицины обладают высокой чувствительностью, воспроизводимостью, специфичностью и функциональностью.

Основными задачами радиоизотопной диагностики в клинической онкологии являются:

1) диагностика первичной опухоли;

2) изучение распространенности опухолевого процесса;

3) оценка эффективности лечения онкологического больного;

4) выявление рецидивов заболевания.

В настоящее время в лечении онкологических заболеваний формируются новые медицинские стандарты [5-8]. Приоритетным является не только излечение от ЗНО с сохранением качества жизни, но и сведение к минимуму возможных осложнений. Актуальным является и профилактика рецидивов после проведённого лечения [8, 9].

Современные исследования, направленны на усовершенствование технических аспектов новых органосохраняющих и щадящих подходов к хирургическому лечению ЗНО и оценку эффективности их применения [8, 10-12]. Очевидно, что радикальность расширенных операций при начальных стадиях рака существенно превосходит необходимую [8]. Предоперационные методы диагностики лимфатических узлов (эхография, компьютерная и магнитно-резонансная томографии) используемые в настоящее время являются недостаточно достоверными [13, 14].

Единственным способом выявления метастазов в лимфатических узлах при диссеминации опухоли по лимфосистеме является «профилактическая» лимфаденэктомия с последующим гистологическим исследованием удаленных лимфоузлов [13, 15-21]. Известно, что хирургические вмешательства подобного рода имеют ряд осложнений, приводящих к снижению реабилитационной способности, и нередко становятся причиной стойкой инвалидизации больного [13].

С целью улучшения диагностики раннего метастазирования является актуальным использование концепции так называемого «сторожевого» лимфатического узла, разработанной в 1977 г. Cabanas R.M. Согласно его мнению: «лимфатический дренаж из любого участка тела или органа осуществляется в каком-либо преимущественном направлении и, следовательно, должен существовать некий основной, так называемый «сторожевой», лимфатический узел (СЛУ), через который осуществляется преимущественный пассаж лимфы» [13]. Поэтому актуальность выявления СЛУ у больных раком с

целью ранней диагностики метастатического поражения является чрезвычайно высокой, так как это позволит обоснованно изменить объёмы хирургического вмешательства и спланировать послеоперационное лечение каждого конкретного больного [13].

Для определения сторожевых лимфоузлов в настоящее время достаточно широко применяется метод радионуклидной индикации с радиоизотопом технецием-99м [22-32].

Радионуклид технеций-99м (^{99m}Tc) применяется для диагностики во многих областях медицины. Радиофармпрепараты (РФП) на основе технеция -99м используют более чем в 87 % всех радионуклидных исследований [33-45]. Обусловлено это низкой энергией γ-излучения 0,1405 МэВ, которая обеспечивает малую экспозиционную дозу и хорошую проникающую способность для проведения радиометрических измерений, а так же относительно коротким периодом полураспада $T_{1/2}$ (6,02 ч) [3]. Координационная химия технеция позволяет получать на его основе различные активные комплексные соединения с заданными свойствами [46-55]. К тому же технеций-99м является наиболее доступным радионуклидом для ядерной медицины. Это связано с возможностью его получения непосредственно в медицинских учреждениях из ^{99}Mo/^{99m}Tc-генераторов [3, 56-69].

Для определения лимфоузлов в ядерной медицине существует ряд РФП [70], но ни один из них не зарегистрирован в Российской Федерации. При этом в качестве транспортирующих ^{99m}Tc агентов используют коллоиды фторида олова [71], сульфида сурьмы и рения [72], представляющие собой устойчивые гидрозоли.

Как показала практика, определяющим фактором для проведения диагностических исследований с радиоактивными коллоидами является не столько химическая природа таких частиц, сколько их размеры. Известно, что оптимальный размер частиц для проведения лимфосцинтиграфии составляет 20-100 нм. [73] При этом наночастицы с размерами менее 20 нм легко проникают в

кровь, что препятствует визуализации лимфоузлов [73, 74], а частицы более 100 нм перемещаются по лимфосистеме медленно.

В нашей стране для этих целей нашел применение единственный серийно выпускаемый препарат ^{99m}Tc-Технефит (ООО «Диамед», г. Москва) - коллоидный раствор на основе фитина (солей инозитгексафосфорной кислоты). Указанный РФП зарегистрирован для проведения сцинтиграфии печени и селезенки, но на практике кроме того были выявлены его лимфотропные свойства. Основным недостатком всех известных лимфотропных радиофармпрепаратов является низкий уровень накопления в лимфоузлах (менее 2 % от введенной активности) и проникновение в лимфатические узлы 2 и 3 порядков, что снижает специфичность диагностики [70, 73, 75].

Большую часть из известных коллоидных радиофармпрепаратов получают по достаточно сложным технологиям. Например, технология изготовления коллоида сульфида сурьмы включает до 10 технологических операций. Примерно столько же стадий требуется для изготовления ^{99m}Tc-сульфид рениевого коллоида. Вместе с тем, проведенные нами предшествующие исследования показали, что стабильные наноколлоидные соединения могут быть получены более простым способом – путем проведения адсорбции восстановленного ^{99m}Tc на модифицированных гидрофобными группами молекулах ДТПА, магнитоуправляемых коллоидах Fe@C, а также на наноразмерных порошках гамма-оксида алюминия [3, 76].

Основными предпосылками для использования гамма-оксида Al_2O_3 в качестве транспортирующего агента метки ^{99m}Tc является его низкая токсичность и хорошие адсорбционные свойства, доступность и низкая стоимость. Следует сказать, что все мировое производство генераторов технеция-99м, используемых в медицине основано на этом сорбенте [3]. В результате изучение литературных данных определели, что работы по получению меченного ^{99m}Tc наноколлоида Al_2O_3 в мире не проводились. Это определило цель настоящей работы.

Степень разработанности темы исследования. Исследования, посвященные разработке наноразмерных РФП, и их практическому применению

проводились во многих странах. В России разработкой и синтезом препаратов для ядерной медицины, занимается ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА и ФГАОУ ВО НИ ТПУ.

В ТПУ были получены меченные ^{99m}Tc коллоидные препараты на основе модифицированных производных ДТПА и железо-углеродных частиц [3,76-78]. Здесь же впервые была исследована возможность получения наноразмерного коллоида ^{99m}Tc-Al_2O_3.

Результаты представляемой работы получены при выполнении госбюджетной темы «Исследование физико-химических закономерностей введения метки технеция-99м в соединения на основе органических и неорганических матриц» (№ Госрегистрации НИР 01201251361), а также при проведении исследований в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 годы» по теме «Разработка методов получения меченых технецием-99м наноколлоидов для медицинской диагностики» (№ Госрегистрации НИР 01200960413).

Были проведены исследования по теме «Разработка методов получения лиофилизата наноколлоида к генератору технеция для диагностики в онкологии» (ГК №14.518.11.7036) при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2009 - 2013 годы». Совместно с НИИ кардиологии г. Томска были проведены работы в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 годы» по теме «Разработка методов получения новых наноколлоидных РФП и изучение их влияния на функциональную морфологию жизненно важных органов» (№ Госрегистрации НИР 01201275909). Совместно с Томским НИИ онкологии в рамках федеральной целевой программы ФАРМА - 2020 были проведены работы по теме «Доклинические исследования нового лимфотропного радиофармацевтического препарата на основе меченого технецием-99м гамма-оксида алюминия» (ГК №16.N08.12.1011).

Целью работы является разработка технологии получения меченного технецием-99м радиофармацевтического наноколлоидного препарата и методов контроля его качества, обеспечивающих безопасность и высокую эффективность использования для диагностики сторожевых лимфатических узлов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

1. Установить круг исходных органических и неорганических субстанций, обеспечивающих получение меченных технецием-99м наноколлоидных РФП.

2. Исследовать качественный и количественный состава реагентов и условия проведения синтеза меченных технецием-99м наноколлоидов на основе модифицированных молекул ДТПА, магнитоуправляемых частиц Fe@C, а также гамма-оксида алюминия с высоким радиохимическим выходом и радиохимической чистотой (РХЧ) целевых продуктов.

3. Разработать состав и методику приготовления реагента на основе гамма-оксида Al_2O_3 виде стандартного набора (лиофилизата) к генератору технеция-99м для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3».

4. Разработать методики качественного и количественного анализа нового РФП. На основании полученных результатов подготовить проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП).

5. В экспериментальных исследованиях оценить функциональную пригодность нового РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» для сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов.

Научная новизна работы состоит в том, что в ней впервые:

1. Установлен круг исходных субстанций для получения меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов на основе органических модифицированных молекул ДТПА, магнитоуправляемых частиц Fe@C и наноразмерного порошка гамма-оксида алюминия.

2. Исследован состав реагентов и условия проведения синтеза трех наноколлоидных РФП. Определено минимальное количество (0,0175 мг/мл)

восстанавливающего агента - олова (II) для достижения радиохимической чистоты препаратов более 94 % и установлена экспериментальная зависимость изменения содержания в препаратах примеси ^{99m}Tc(VII) от концентрации восстаговителя.

Впервые в мировой практике доказана возможность получения устойчивых наноколлоидных соединений простым способом – путем проведения адсорбции восстановленного ^{99m}Tc на гамма-оксиде алюминия.

3. Разработаны оптимальный состав реагентов и технология приготовления стандартного набора к генератору технеция-99м в виде лиофилизата для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Установлен срок годности лиофилизированного набора для изготовления РФП, который составляет 1 год.

4. Разработаны методы аналитического контроля качества радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Проведена стандартизация методик качественного и количественного определения основных компонентов в составе лиофилизата.

5. Экспериментально доказано, что РФП может быть использован для визуализации сторожевых лимфотических узлов при среднем его накопления в СЛУ около 8% в течение 1 часа.

Теоретическая и практическая значимость. Созданы проекты Спецификации и Фармакопейной статьи предприятия на новый отечественный радиофармпрепарат. Разработан Технологический регламент получения радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Технология получения препарата «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3», созданная при выполнении диссертации, была апробированная при наработке опытных образцов РФП для проведения его доклинических испытаний в НИИ онкологии Томского НИМЦ, в ходе которых была подтверждена функциональная пригодность препарата для диагностики СЛУ. Результаты работы используются в учебно-педагогическом процессе при чтении курса лекций по теме: «Радиохимия. Применение радионуклидов и радиофармпрепаратов в диагностике и терапии» по направлению 14.04.02

«Ядерная медицина. Применение полученных результатов на практике подтверждается Актами о внедрении (приложение 1).

Методология и методы исследования. В работе использовали следующие методы исследований и методики: спектрофотометрические методы анализа, метод инверсионной вольтамперометрии, метод тонкослойной хроматографии, методика потенциометрического измерения pH, методы определения размеров меченых коллоидов, методики выполнения радиометрических измерений, методы изучения общетоксического действия лекарственных средств, а также статистические методы анализа.

Методологической основой диссертационного исследования послужили существующие наработки по синтезу наноразмерных препаратов для ядерной медицины в мире, а также методов контроля качества и анализа результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспериментальные результаты по проведению синтеза меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов на основе химически модифицированных комплексонов диэтилентриаминпентауксусной кислоты (^{99m}Tc-ДТПА).

2. Результаты экспериментальных исследований по получению меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов на основе железоуглеродных частиц Fe@C, модифицировенных фрагментами бензилдиметилен-аминоуксусной кислоты. И третий – на основе наноразмерного порошка гамма-оксида алюминия.

3. Результаты определения качественного и количественного составов реагентов и условий проведения устойчивой адсорбции технеция-99м на наноразмерных порошках гамма-оксида Al_2O_3.

4. Разработка состава и технологии приготовления лиофилизированного набора реагентов для получения радиофармпрепарата «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» в условиях медицинских радиологических лабораторий.

5. Результаты определения сроков годности лиофилизированного набора и получаемого на его основе РФП.

6. Комплекс аналитических методик определения основных компонентов синтезированного радиофармпрепарата и проведения контроля его качества. Проекты Спецификации и Фармакопейной статьи предприятия на препарат.

7. Технологический регламент получения радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3».

8. Определение функциональной пригодности РФП на экспериментальных животных.

Личный вклад автора состоит в изучении и анализе литературы по теме диссертационной работы, в общей постановке задач, участии в проведении исследований, математической обработке и анализе полученных результатов, написании докладов, статей и внедрении результатов исследований в разработку технологии изготовления нового РФП.

Степень достоверности результатов обеспечивается воспроизводимостью результатов опытов. Работа не противоречит современным научным представлениям о закономерностях физико-химических процессов. Согласуется с с известными литературными данными. Все оценки и исследования проведены с использованием аттестованных методик на сертифицированном оборудовании.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Междунар. Конф. «Ядерная и радиационная физика». – Алматы, 2011; Междунар. конф. «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике». - Санкт-Петербург, 2012; Междунар. науч. конф. «International conference Nanomaterials: Applications and Properties». – Алушта, 2013; I росс. конф. по мед. химии. - Москва, 2013; Междунар. науч. конф. «Изотопы: технологии, материалы и применение: материалы». – Томск, 2014; V Междунар. конф. «От наноструктур, наноматериалов и нанотехнологий к наноиндустрии». - Ижевск, 2015; Междунар. конгр. «Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine». - Barcelona, 2015

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 66 работ, из них 31 - в журналах, входящих в перечень рекомендованных ВАК МОиН РФ, 32 - тезисы докладов в материалах всероссийских и международных научных конференций, 3 патента на изобретение (приложение 2). Имеется два акта о внедрении.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 229 страницах печатного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, объектов и методов исследования, 2 глав собственных экспериментальных исследований, заключения, списка цитируемой литературы и приложений. В работе содержатся 28 таблиц, 33 рисунка. Список цитируемой литературы включает 258 библиографических источников, из которых 169 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

1.1 Характеристика методов, используемых для выявления сторожевых лимфатических узлов

Одним из основных показателей распространения в организме опухолевого процесса является поражение лимфатических узлов, поэтому определение их состояния является одним из критериев, оцениваемых при определении стадии заболевания. Тщательное исследование лимфатических узлов в хирургическом материале имеет огромное значение в определении прогноза заболевания. Концепция развития сторожевых лимфатических узлов связана с учением о лимфогенном метастазировании различных опухолей органов и тканей [79].

«Сторожевой» лимфатический узел (СЛУ) - это первый лимфатический узел, в который попадает оттекающая от первичной опухоли лимфа. Если в ткани этого узла есть опухолевые клетки, то, следовательно, они могут быть и в других лимфатических узлах [80-111, 112]. Для выявления СЛУ в настоящее время используются, главным образом, контрастный метод и метод радионуклидной лимфасцинтиграфии.

1.1.1 Контрастный метод выявления сторожевых лимфатических узлов

В 1990 г. были опубликованы результаты экспериментальных исследований D. Morton с соавторами [113,114] по изучению эффективности различных красителей для определения (визуализации) сторожевых лимфатических узлов [79]. К их числу относится синий изосульфан, представляющий собой моно натриевую соль 2,5-дисульфоната, и запатентованный сине-фиолетовый контраст

- трифенилметан, похожий по структуре на синий изосульфан. Биохимически оба агента похожи друг на друга, при этом различий в способности определять сигнальные лимфоузлы не обнаружено. в Европе используется запатентованный сине-фиолетовый контраст. в США используется Синий изосульфан [8].

В ряде исследований применялись и другие красители, включая метиленовый синий, зелёный индоцианин и индигокармин. Однако при использовании метиленового синего может возникать жировой некроз, поэтому его не рекомендуют применять у пациентов, которым планируется органосохраняющая операция [115].

Используют несколько вариантов введения красителя:

– интратуморальное (в опухоль)

– перитуморальное (рядом с опухолью)

– подкожное (внутрикожное, субареолярное).

Краситель вводят подкожно или перитуморально за 20 мин до операции. После введения красителя окрашивание сторожевых лимфоузлов происходит через 10 - 20 мин. Место разреза для биопсии можно определить при этой методике лишь приблизительно, что иногда может приводить к большой затрате времени и увеличению объема удаляемых тканей.

1.1.2 Радионуклидная лимфосцинтиграфия

В 1993 г. J. Alex и D. Krag [114, 116 -117] предложили способ определения лимфоузлов с применением гамма-сканера и наночастиц, меченных технецием-99м [79].

За несколько часов до операции радиоактивные наночастицы вводили в опухоль по нескольким точкам [79]. Визуализацию сторожевых лимфоузлов осуществляли с использованием гамма-камеры и портативного гамма-сканера [13, 79]. Указанные авторами преимущества метода состоят в следующем: «можно

определять расположение сторожевых лимфатических узлов непосредственно через кожу, в том числе и парастернальных; при разрезе тканей можно в любой момент контролировать локализацию узла и направление разреза; всегда можно удостовериться, что был удален действительно сторожевой лимфатический узел; метод позволяет выявить остаточные лимфатическе узлы, накапливающие радиоактивный коллоид» [13, 79].

Важным преимуществом данного способа является то, что СЛУ может быть удален через маленький разрез, прост, легко и быстро выполним. При использовании методики с красителем необходимо рассечь кожу и ткани, чтобы визуализировать узел [13, 79], а чувствительность данной методики ниже, чем у методики с использованием наночастиц.

При чрезкожном определении СЛУ используют специальные гамма-зонды. Качество этих изделий характеризуют следующие показатели:

- пространственное разрешение;
- параметр счета;

селективность;

уровень радиационной защиты;

энергетическая дискриминация;

размеры зонда.

Пространственное разрешение - это минимальное расстояние до лимфоузла, которое может определить гамма-зонд. Два источника диаметром 3 мм располагают на расстоянии 1 см и проводят измерение. При исследовании СЛУ в подмышечной, подвздошной и паховой областях рекомендовано использовать гамма-зонды с разрешением не более 25 мм. Для нахождения места положения лимфоузлов в надключичной зоне, области головы и шеи используют приборы с параметром не более 15 мм.

Отображение параметров счета воспроизводится на цифровом или аналоговом табло [23]. Даные должны просматриваться на расстоянии не далее 2 м и соотноситься со звуковым сигналом, который издает прибор.

Пространственная селективность показывает поле видения детектора и характеризуется углом наклона. Измеряеют данный показатель на расстоянии 30 см. Гамма-зонд необходимо повернуть, таким образом, чтобы максимальная скорость счета от источника снизилась в 2 раза. Чем больше этот угол, тем меньше соотношение сигнала от лимфоузла к фону. Данный показатель важен в тех случаях, когда место инъекции РФП располагается рядом с лимфоузлом. Используемые в клинической практике гамма-зонды, как правило имеют угол наклона не более 40º.

Уровень радиационной защиты гамма-зонда - это процент скорости счета от излучения источника, которое находится вне поля зрения гамма-зонда, к максимальной скорости счета. Данный критерий имеет определяющее значение в работе радиометра, поскольку при плохой защите детектора бльшая доза радиоактивности от места введения РФП будет мешать определению лимфоузла [23]. Для эффективной работы радиометра защита должена быть более 0,1 %.

Энергетическая дискриминация в приборах используется для профилактики регистрации рассеянных гамма-квантов, которые образуются в результате Комптон-эффекта.

Размеры зонда особенно важны для лапароскопических детекторов. Диаметр гамма-зонда должен быть менее 15 мм. Диаметр лапароскопического детектора должен быть не более 10 мм при длине около 40 см [23]. Возможность Кончика зонда должны сгибаться, что в некоторых случаях позволяет более точно отличить место инъекции РФП от лимфоузла.

В зависимости от вида опухоли, отличаются и условия выявления СЛУ. В настоящее время в мировой практике достаточно широко применяются методики поиска «сторожевых» лимфатических узлов при мелономе, это обусловлено в первую очередь поверхностным расположением опухолей и линейным типом оттока лимфы, практически полным отсутствием коллатералей [23].

При ЗНО молочной железы поиск лимфоузла осложняется тем, что накопление РФП в нем не большое, при близком расположениии СЛУ и опухоли.

Более сложный поиск лимфоузла наблюдается у больных раком простаты [23]. Поскольку приходится выполнять измерения в большом количестве лимфатических бассейнов.

У пациентов со ЗНО головы и шеи при обследовании могут возникать трудности. Это связано с местом инъекции, в котором наблюдается высокий уровень фона, маленьким расстоянием между СЛУ и опухолью, низким уровнем накопления РФП в лимфоузле (0,001–1 %) [23].

После выявления сторожевого лимфатического узла осуществляют его гистологическое изучение. Забор исследуемого материала производят тонкоигольной аспирационной, центральной и вакуумной биопсии [23]. Обычные иммуногистохимические методы выполняются очень долго и не подходят для срочного решения задачи о вовлеченности в патологический процесс лимфоузла. С этой целью разработан протокол «Сверхбыстрого иммуногистохимического окрашивания», который в течении 20 мин позволяет точно диагностировать поражение лимфоузла злокачественными клетками [23, 118].

Выявление сторожевых лимфоузлов при различных локализациях опухолей имеет свою специфику, связанную с расположением опухоли и направленностью лимфооттока от ЗНО. В этой связи рассмотрим ряд примеров, показывающих целесообразность поиска СЛУ для проведения диагностики заболеваний и их лечения.

Рак молочной железы - одно из самых частых ЗНО у женщин в странах Европы, Австралии и Северной Америки. Частота заболевания данным видом ЗНО - каждой восьмая женщины Европы.

Радикальная мастэктомия с удаленим аксилярных лимфатических узлов это стандартная тактика лечения пациенток с данным заболванием. Но у женщин с ранней стадией этого заболевания метастазы в лимфатических узлах обнаруживаются в 0–28% случаев [21, 114 - 120]. При этом удаление лимфатических узлов повышает риск развития осложнений после проведенной операции (отеки, онемение рук). Осложнения встречаются в 28 % случаев после удаления более 10 лимфатических узлов.

Кроме метастазов в аксиллярные лимфатические узлы при раке молочной железы так же встречается распространение злокачественных клеток в другие лимфатические узлы. Частота распостранения в парагляндулярные узлы состаляет 6–8%, парастернальные 20–28%, интрапекторальные около 2%. Примерно 7% опухолей метастазируют одновременно в 2 бассейна [13, 23, 57]. В интрапекторальные, парагляндулярные и аксиллярные узлы лимфа оттекает из боковой, верхней и нижней части молочной железы, в парастеральные – от ее медиальной области. Но существуют различные анатомические варианты. Доказана прямая корреляционная связь между частотой вовлечения в патологический процесс аксиллярных лимфоузлов и размерами опухоли и (табл. 1.1). По этой причине падает клиническая значимость определения сторожевых лимфоузлов у женщин со злокачественными новообразованиями больших размеров (pT2 и pT3) [119 - 121].

Таблица 1.1 - Зависимость частота метастазирования в аксиллярные лимфатические узлы от размера опухоли

Стадия процесса	Диаметр опухоли, см	Частота метастазирования в аксиллярные лимфатические узлы, %
pT1a	<0,5	20,6
pT1b	0,5–0,9	20,6
pT1c	1–1,9	33,2
pT2	2–2,9	44,9
	3–3,9	52,1
	4–4,9	60
pT3	>5	70,1

Результаты диагностки сторожевых лимфоузлов при меланоме кожи отражают состояние лимфатического коллектора с точностью 96,7%, специфичность диагностики составляет 100%, а чувствительность – 71,4% [23, 25, 27, 91, 113,114, 132 - 134]. В случае, когда ЗНО расположено в области головы и шеи, туловища - лимфатичекий отток происходит в несколько бассейнов. При таком варианте оттока, для оценки лимфогенного распространения опухоли

большое значение имеет диагностика СЛУ [23]. Если происходит удаление только первичного очага, то 5-летняя выживаемость составляет 35%. Если опухоль локализована на конечностях, то определение лифоузлов не вызывает проблем [23, 122 - 131].

Последние несколько лет наблюдается устойчивая тенденция к снижению заболеваемости **раком желудка.** Несмотря на это патология продолжает лидировать в структуре заболеваемости и смертности от ЗНО данного типа. В России в структуре заболеваемости рак желудка занимает второе место у мужчин (14,7%) и третье – в структуре заболеваемости женщин (10,8%) [23, 132 - 137]. Основным методом радикального лечения рака желудка остаётся оперативное лечение [23, 138, 139]. В Японии, Южной Корее в связи с участившимися случями заболевания ранним раком желудка вырос интерес к проблеме сторожевых лимфатических узлов. Число таких пациетов в сруктуре заболевания более 50%. Следует отметить, что в странах Юго-Восточной Азии расширенная лимфодиссекция является стандартом лечения.

В связи с наличием длинных лимфатических протоков, определяющих частое появления «прыгающих» метастазов негативная точка зрения по поводу определения лимфоузлов у больных раком желудка, активно пересматривается [23, 29, 30, 140 - 148].

По данным исследователей Токийского противоракового национального центра [23, 149 - 152], метод определения СЛУ характеризуется хорошей чувствительностью и специфичностью при определении лимфогенных метастазов. Поэтому данный метод рекомендуют использовать при дифференцированном подходе к лапароскопической хирургии рака желудка.

Чувствительность данной методики составляет 83,3–84,6%, специфичность - 100% [23, 153]. При таком исследовании препарат вводится при выполнении гастроскопии (за сутки до операции). Инъекцию выполняют субмукозно, по периферии опухоли, в несколько точек.

Рак щитовидной железы – самое распространнное ЗНО эндокринной системы. За последнее десятлетие заболеваемость этой патологией возросла почти в два раза.

В шейных лимфатических узлах метастазы обнаруживаются 17 до 70%. Выделяют 6 уровней лимфатических узлов шеи.

Чаще всего поражаются лимфоузлы 6 уровня (расположенные в пре- и паратрахеальной клетчатке, а также в яремной вырезке) [23, 154]. Обнаружение метастазирования в этих ЛУ составляет от 10,2 до 52,4% [23, 75]. РФП вводится в железу в несколько точек по периферии опухоли.

Рак легкого – самое распространенное злокачественное новообразование у мужчин. Частота поражения регионарных лимфатических узлов метастазами в зависимости от стадии заболевания находится от 23 до 87% [23, 155, 156].

Лимфатические узлы легких классифицруют на: паратрахеальные, трахеобронхиальные, бронхопульмональные, бифуркационные. Лимфосистема легких характеризуется большим количеством коллатералей. Это сопровождается высоким процентом «прыгающих» метастазов (70%). Такая ситуация вызывает сомнения целесообразности определения положения сторожевого лимфоузла при раке легкого. В настоящее время проводятся исследования, посвященные этому вопросу [23, 157 - 161]. При периферическом раке легкого препарат вводится в опухоль, или по переферии. При центральном раке РФП вводят при помощи бронхоскопа субмукозно.

При ЗНО **головы и шеи** самым частым гистотипом являются плоскоклеточные злокачественные опухоли. Такие виды исследования, как УЗИ, КТ, ПЭТ не позволяют достоверно оценивать состояние регионарных лимфатических узлов при данном типе заболевания. Кроме этого, тонкоигольная биопсия лимфоузлов этой локализации нередко оказывается неэффективной. Поскольку в 40–50% случаев опухолей головы и шеи формируется местный рецидив заболевания, то в этих случаях следует выполнять лимфоаденэктомию [23, 162, 163].

Во время обнаружения сторожевых лимфоузлов при ЗНО головы и шеи воникает ряд проблем:

- технические сложностями выявления лимфоузла из-за его близкого расположения к месту инъекции,

- нарушение дренажа лимфы в случаях, поражения сторожевого узла метастазом [23, 164, 165].

Одновременно метод позволяет диагностировать субклинические лимфогенные метастазы.

Выявление сторожевых лимфатичских узлов все чаще используется в онкологической практике. Это обусловлено хорошей прогностической значимостью состояния лимфоузлов. и необходимостью персонализированного подхода к объему хирургического вмешательства.

При раке молочной железы и меланоме значимость радионуклидного выявления сторожевого лимфоуза хорошо изучена и во многих странах метод входит в медицинские стандарты лечения этих ЗНО. При опухолях других локализаций необходимо проведение дополнительных научных исследований [23, 70]. Такие исследования направлены не только на решение технических проблем диагностики СЛУ, но и на изучение особенностей лимфатического оттока новообразований различных локализаций, размеров и типов.

1.1.3 Выявление сторожевых лимфатических узлов методом двойного контрастирования

Двойное контрастирование - это одновременное использование двух контрастных веществ.

С 1993 г. появляются работы по использованию красителя и коллоидного РФП при некоторых видах ЗНО [79].

В данное время в большинстве клиник, обладающих данной методикой, используется двойной метод контрастирования - радиоизотопный + метилен синий. Это позволяет с высокой вероятностью и предоперационно, и интраоперационно идентифицировать локализацию лимфоузла. При использовании этого метода увеличивается вероятность обнаружения СЛУ (91,4 %) [8, 99 -101, 166 - 168].

1.2 Радиофармпрепараты для визуализации сторожевых лимфатических узлов

В настоящее время оптимальными РФП для выявления «сторожевых» лимфатических узлов признаны меченные технецием-99м наноколлоидные препараты различного состава. Интерес ученных к таким препаратам обусловлен тем, что на сегодняшний день вследствие возможности получения технеция - 99м из ^{99}Mo/^{99m}Tc-генераторов непосредственно в медицинских лабораториях, он является самым доступным радионуклидом для медицины [3]. Сам по себе ^{99м}Tc является идеальным радионуклидом для проведения диагностических исследований благодаря своим ядерно-физическим характеристикам и химическим свойствам [3, 33, 37, 39 - 44, 169]. Исходя из применяемого метода разделения, генераторы подразделяются на три основных типа: сорбционные

(хроматографические), сублимационные и экстракционные [60, 62, 170 - 172]. По объёму выпуска и применения в мире главенствующие позиции занимают генераторы сорбционного типа, что обусловлено их компактностью и возможностью безопасной транспортировки на большие расстояния от мест производства, что создаёт условия для широкого использования в практической медицине ^{99m}Tc и различных РФП на его основе [53 - 55, 172].

Радионуклид ^{99m}Tc имеет относительно короткий период полураспада $T_{1/2}$=6,02 ч и энергию γ-излучения 0,1405 МэВ, обеспечивающую малую экспозиционную дозу на критические органы и, одновременно хорошую проникающую способность для проведения радиометрии. К тому же, богатая координационная химия технеция позволяет получать на его основе различные биологически активные комплексные соединения с заданными свойствами [3, 49 - 54, 173 - 182].

На основе технеция-99м изготавливается более 80% всех РФП, используемых в диагностических целях. По данным публикаций [4, 182], только в США ежедневно выполняется около 28 000 исследований с технециевыми РФП из 36 000 диагностических тестов. Такая же ситуация характерна и для других развитых стран.

Обычно для приготовления технециевых РФП используют заранее приготовленные стандартные наборы реагентов (лиофилизаты) к генераторам ^{99m}Tc. В России основным производителем таких наборов для генератора ^{99m}Tc является ООО "Диамед". За рубежом подобную продукцию производят фирмы "Nicomed Amersham" (Великобритания), "Mallincrodt" (Голландия), "CIS" (Франция) и др.

В настоящее время метод радионуклидной индикации с технецием-99м часто используют для обнаружения метастаз в «сторожевых» лимфатических узлах [3, 18, 22, 89, 90, 183-192]. Определяющим фактором при этом являются размеры наночастиц. Коллоид с размером менее 50 нм может накапливаться не только в сторожевых лимфоузлах, но и в узлах второго и последующих уровней, что снижает точность диагностики [3, 193-195]. Частицы, которые имеют размер

более 100 нм, медленно мигрируют с места инъекции. Поэтому, для проведения исследований в онкологии приемлемым размером наноколлоидных частиц является размер в пределах 50-100 нм [3, 13, 23, 70]. Препаратов с такими подходящими характеристиками не так много.

Следует отметить, что на сегодняшний день в России производится один собственный наноколлоидный препарат для медицины – ^{99m}Тс-Технефит (ООО «Диамед», г. Москва), представляющий собой коллоидный раствор на основе фитина (солей инозитгексафосфорной кислоты) [1, 3]. Ранее за рубежом закупался препарат на основе сульфида рения «Наноцис». Однако, из-за слишком малых размеров частиц (10-15 нм) он был не подходящим при поиске сторожевых лимфатических узлов. В ООО «РАФАР», г. Москва разработан «Способ получения наноколлоида для приготовления радиофармпрепаратов на основе сульфида рения» [195].

Ряд исследований по получению меченых технецием-99м наноколлоидных соединений проведен в Томском политехническом университете [3, 70]. Здесь впервые были синтезированы и испытаны на лабораторных животных радиофармпрепараты на основе производных ДТПА (диэтелентриаминпентауксусной кислоты) [78] и наноразмерных железо-углеродных частиц, модернизированных арилдиазоний тозилатами [77, 196]. Технология их получения была разработана в Институте физики металлов УрО РАН.

В таблице 1.2 представлены данные о наноколлоидных технециевых препаратах, производимых в Европе [1, 3, 96, 197, 198].

Таблица 1. 2 – Радиофармпрепараты зарубежного производства

Радиофармпрепарат	Размеры частиц	Производитель
Nanocoll	<80 нм	GE Amersham
^{99m}Tc-nanocolloid	<80 нм	GE,Uppsala,Swede
Nanocis	3-15 нм	CIS bio International
Microlite	Около 10 нм	Du Pont
Sulfur colloid	40-10000 нм	CIS bio International

В России эти препараты не зарегистрированы и их закупка не осуществляется. Ниже приведены методики приготовления некоторых из известных препаратов.

Наноцис (Nanocis) –набор для приготовления коллоидной инъекции [^{99m}Tc]-рения сульфид [3]. Реагенты содержится в двух флаконах (1 и 2).

Состав флакона 1 (на 1 мл раствора):

– рения сульфид (Re_2S_7) – 0,48 мг;

– желатин – 9,6 мг;

– аскорбиновая кислота – 7 мг;

– вода для инъекций – 1 мл;

– соляная кислота концентрированная – 37,4 мкл

Состав флакона 2 (на 1 мл раствора):

– пирофосфат натрия десятиводный – 3 мг;

– хлорид олова дигидрат – 0,5 мг

Правила приготовления раствора.

Во флакон 2 иглой вливают 2 мл воды для инъекций. Содержимое флакона инкубируют до полного растворения вещества. От полученной смеси отбирают 0,5 мл, переносят во флакон 1 и встряхивают. Флакон 1 помещают в контейнер из свинца и добавляют во флакон 1-2 мл элюата ^{99m}Tc с активностью 350-5700 МБк.

Флакон ставят в кипящую водяную баню на 15-30 минут. В последующем проводят его охлаждение.

Полученный наноколлоид [^{99m}Tc]-рения сульфид используется для гастро-эзофагальная сцинтиграфия и лимфосцинтиграфии.

Обязательной процедурой является контроль радиохимической чистоты полученного препарата.

Гепатоцис (Hepatocis) – стандартный набор для приготовления коллоидной инъекций [^{99m}Tc]-рения сульфид (средний диаметр частиц 500 нм) [3]. В состав Набора включает в себя однин флакон и два заполненных шприца, содержащих реагенты. Получают инъекцию технеций[99mTc]-рений сульфид путем добавления инъекционного раствора пертехнетата натрия [99mTc] во флакон с желатином, затем добавляют содержимое шприца с 4,6 N соляной кислотой, затем – 0,65 М раствора цитратного буфера.

Состав реагента во флаконе (объем реагента 6 мл):

– желатин – 166,0 мг;

– тиосульфат натрия пятиводный – 10,0 мг;

– калия перренат – 4,17 мг;

– вода для инъекций – 6 мл

Шприц № 1 содержит 2 мл стерильного апирогенного 0,65 М цитратного буфера.

Шприц № 2 содержит 1 мл стерильного апирогенного раствора 4,6 М HCl имеющего состав:

– гидроокиси натрия – 113 мг;

– трехнатриевой соли лимонной кислоты дигидрат – 386 мг;

– воды для инъекций – 2 мл

Правила приготовления раствора.

Флакон помешают в контейнер из свинца. Вводят во флакон раствор элюата (10-100 мКи). Затем добавляют содержимое из шприца № 2, перемешивают и кипятят 5 мин. Содержимое флакон остужают в кристаллизаторе с ледяной водой,

вносят содержимое шприца № 1. Тщательно перемешивают. Объем готового раствора доводят стерильным 0,9% раствором хлорида натрия до 5 мл.

Полученный раствор используется для диагностики селезенки и костного мозга, сцинтиграфии печени, состояния пищеварения.

Препараты на основе сульфида рения имеют ряд достоинств -стабильность выхода и высокая радиохимическая чистота.

^{99m}Тс-коллоид фторида олова (Австралия) [3, 71] **–** набор из двух частей для приготовления коллоидной инъекции. Часть комплекса – фторид олова находится в замороженном состоянии в азоте, поскольку фторид олова является основным компонентом, необходимым для приготовления радиоколлоида.

Приготовление данного коллоида включает смешивание водного раствора фторида натрия и фторида олова. Затем содержимое фильтруют (диаметром пор 0,2 мкм). Одну часть фильтрата приливают к элюту технеция - 99м. Полученную смесь отбирают в шприц. После производится смешивание растворов в шприце в течении 1 ч, в результате начальная добавленная радиоактивность полностью поглощается количеством производимого продукта (коллоидом 99mТс- фторид олова), что установлено с помощью тонкослойной хроматографии.

Радиоактивный продукт - бесцветный гидрофильньный коллоид, невидимый в водной дисперсии.

В этом заключается первый этап подготовки препарата. Следующим шагом производится инкубация РФП с образцом крови пациента, для мечения лейкоцитов. После взбалтывания содержимого в течение 1 ч, образец центрифугируется на соответствующей скорости для отделения клеток от плазмы. Обычно меньше чем 5 % начальной радиоактивности – присутствует над осадком. Распределение меченой человеческой цельной крови изучали методом авторадиографии, по результатам которого стало ясно, что количество меченых эритроцитов составило 75 % по сравнению с белыми клетками и лейкоцитами.

Радиохимическая чистота коллоида ^{99m}Тс-фторид олова - выше 98 %, и больше чем 96 % всех ^{99m}Тс-частиц – имеют диаметр 1-3 мкм,

Коллоид ^{99m}Тс–фторида олова –используется при диагностике инфекции и воспалений для маркировки лейкоцитов.

^{99m}Тс - наноколлоид сульфида сурьмы [3, 199].

Правила приготовления.

Сероводород барботируют через охлажденной до 0 °С дистиллированную воду (объем 100 мл). В полученный раствор вводят 5 мл 3,5 % раствора поливинилпирролидона и перемешивают в течение 5 мин. Добавляют 1 % - ного раствора антимонил-тартрата калия (10 мл) и вновь перемешивают в течении 10 мин. Через синтезированный гидрозоль пропускают азот. Полученный коллоид сульфида сурьмы (10 мл) смешивают с предварительно подготовленной смесью, состоящей из 10 мл 1 %-ного раствора антимонил-тартрата калия с 60 мл 0,1 М раствора тиоацетомида. Далее раствором 0,1 М НС1смесь нейтрализуют до pH 5-6, нагревают в течение 6 ч на водяной бане и охлаждают до комнатной температуры [3].

Мечение полученного коллоида технецием-99м проводят по следующей методики. Во флакон с наноколлоида сурьмы (1,5 мл) вводят раствора натрия пертехнетата (0,5) мл и добавляют 0,1 М раствора НС1 (0,1 мл). Кипятят на водяной бане 30 мин. В охлажденную смесь добаляют ацетатного буфера до нейтральной реакции.

1.3 Обоснование целесообразности использования оксида алюминия для изготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Из анализа представленных литературных данных следует, что испульзуемые в ядерной медицинеой радиоактивные нанокоразмерные препараты изготавливаются на основе соединений, образующих устойчивые гидрозоли [3, 13, 23, 70, 73, 79]. Для их изготовления чаще всего применяют готовые частицы с заданными (определенными) размерами и с последующей их модификацией

радионуклидами [3]. Большинство препаратов, используемых в практической медицине, представляет собой простые неорганические комплексы ^{99m}Tc с сульфидами рения и сурьмы. Вместе с тем, их синтез осуществляется по достаточно сложным технологиям [3].

В связи с чем в диссертации исследуется возможность получения стабильного наноразмерного коллоидного соединения более простым способом - введением радиоактивной метки ^{99m}Tc в модифицированные гидрофобными группами молекулы ДТПА и на магнитоуправляемые коллоиды Fe@C. В качестве наиболее оптимального варианта исследуется возможность одностадийного проведения адсорбции восстановленного ^{99m}Tc на активированной поверхности наноразмерных частиц гамма-оксида алюминия.

На сегодняшний день много работ посвящено изучению свойств оксида алюминия, поскольку он широко применяется в ядерной медицине в качестве адсорбента для производства различных генераторных систем: ^{99}Mo/^{99m}Tc; ^{188}W/^{188}Re; ^{68}Ge/^{68}Ga [199, 200]. Предназначенный для производства катализаторов и адсорбентов оксид, обычно называют «активной окисью алюминия».

Одно из ведущих мест среди наиболее важных промышленных неорганических веществ принадлежит оксиду Al_2O_3. Он находит широкое применение в различных областях науки и техники благодаря уникальным свойствам. На основе оксида алюминия изготавливают керамические и вяжущие материалы, сорбенты и катализаторы. Разнообразие функциональных возможностей оксида алюминия определяется его полиморфизмом и широким спектром поверхностных свойств.

В медицине широко используются также фосфат алюминия, гидроокись алюминия и каолин, больше известный как белая глина (силикат алюминия) [201]. В дерматологической практике применяются преимущественно жженые и алюмокалиевые квасцы. Алюминиевые квасцы обладают вяжущим, антибактериальным и ранозаживляющим свойствами [201]. При этом они оказывают на кожу мягкое воздействие, снимают болевой симптом, зуд и жжение.

На основе алюминия существуют лекарственные препараты для приема внутрь. Наиболее популярные «алюминиевые» лекарства - это препараты от изжоги, гастритов и язвы желудка: «Алюмаг», «Антацид», «Альмагель», «Альмагель-а», «Гастралюгель», «Гастал» «Алюгастрин» и другие [201]. С каждым годом совершенствуются технологии изготовления этих препаратов. Благодаря новым технологиям и разработкам снижается их побочное действие и усиливается эффективность [201]. Реальной замены таким алюминиевым соединениям пока не найдено.

Основными предпосылками для использования оксида Al_2O_3 в качестве наноразмерной субстанции для метки ^{99m}Tc является его более низкая токсичность, чем у сульфидов и фторидов рения, в сочетании с его доступностью и низкой стоимостью, поскольку технология получения нанопорошков гамма-оксида алюминия с помощью электрического взрыва алюминиевого проводника известна достаточно давно [3, 70, 200, 202]. Не смотря на эти положительные моменты, работы по получению меченного ^{99m}Tc наноколлоида гамма-оксида алюминия в мире не проводились.

Возможной причиной этого является общеизвестный факт, что в $^{99}Mo/^{99m}Tc$-генераторах, где в качестве сорбента применяется оксид алюминия, технеций-99м практически не удерживается и легко смывается с его поверхности физиологическим 0,9 % раствором натрия хлорида в виде 7-валентных ионов натрия пертехнетата,^{99m}Tc. Вместе с тем, проведенные нами предварительные исследования [3, 76], показали, что устойчивые соединения ^{99m}Tc-Al_2O_3 могут образовываться при взаимодействии с оксидом алюминия восстановленного технеция-99м, присутствующего в реакционной смеси в 4 или 5-валентном состоянии. Возможность образования такой устойчивой связи отмечалась и в ранних работах [202, 203], посвященных вопросам выделения технеция-99м из генераторов, где наблюдалось резкое снижение элюационного выхода радионуклида за счет его восстановления.

Для разработки простой и эффективной технологии изготовления готового радиофармпрепарата ^{99m}Tc-Al_2O_3 необходимо было определить условия

проведения устойчивой адсорбции ^{99m}Tc на наноразмерном гамма-оксиде Al_2O_3. Подобрать качественный и количественный состав реагентов, требуемых для получения меченого коллоида с размерами частиц в пределах 50-100 нм. Оценить основные свойства и радиохимическую чистоту синтезированного препарата. Провести его испытания на экспериментальных животных. Все сказанное и определило цели и задачи настоящей работы.

1.6 Выводы по главе

1. В современной онкологической практике большой интерес представляет выявление сторожевых лимфатических узлов – первых узлов, стоящих на пути метастазирования злокачественных новообразований. Предполагается, что если СЛУ не содержат раковых клеток, то все остальные, следующие за ним регионарные лимфоузлы также не поражены метастатическим процессом. Поэтому результаты биопсии сторожевых лимфоузлов оказываются объективным диагностическим критерием распространения злокачественного процесса, и концепция биопсии СЛУ приобретает все большее признание.

2. Для выявления СЛУ в настоящее время используются, главным образом, контрастный метод и метод радионуклидной лимфасцинтиграфии. Контрастный метод основан на использовании для визуализации сторожевых лимфатических узлов различных красителей с целью их окрашивания. Для реализации метода радионуклидной лимфасцинтиграфии применяют меченные радионуклидами наноразмерные коллоиды, распределение которых в лимфасистеме регистрируется с использованием портативного гамма-сканера.

3. Из анализа литературных данных следует, что меченные радионуклидами наноколлоидные препараты, применяемые для медицинской диагностики, изготавливаются на основе соединений, образующих устойчивые гидрозоли. Для их изготовления как правило используют уже готовые частицы с определенными

размерами с последующей их модификацией радионуклидами.

4. Большинство наноколлоидных препаратов меченых технецием - 99м, используемых в практической медицине, представляют собой простые неорганические комплексы ^{99m}Tc с сульфидами рения и сурьмы. Вместе с тем, их синтез осуществляется по достаточно сложным технологиям. Использование короткоживущего технеция-99м для проведения их мечения вызвано его достаточной проникающей способностью при малом значении экспозиционной дозы, а также его химическими свойствами, которые обеспечивают возможность получать различные биоактивные комплексные соединения.

5. Исходя из представленного анализа, общим недостатком всех известных лимфотропных РФП является невысокий уровень их аккумуляции в СЛУ (менее 2% от введенной активности) и перераспределение в лимфатические узлы 2 и 3 порядков, что снижает специфичность исследования. Кроме того, большую часть из известных коллоидных радиофармпрепаратов производят по достаточно сложным технологиям. В этой связи, актуальной задачей является поиск более специфичных РФП для молекулярной визуализации СЛУ, а также разработка более простых способов их получения.

6. Для разработки более простой технологии изготовления наноколлоидгного радиофармпрепарата ^{99m}Tc-Al_2O_3 необходимо проведение экспериментальных исслований по определению условия проведений устойчивой адсорбции ^{99m}Tc на гамма-оксиде Al_2O_3, выбору качественного и количественного состава реагентов для получения меченого наноколлоида с размерами частиц в пределах 50-100 нм. Необходимо также сделать оценку основных свойств полученного препарата и радиохимической чистоты. Исследовать полученный препарат на экспериментальных животных.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика используемых материалов и оборудования

При проведении исследований были использованы материалы, вещества и оборудование, представленные в таблицах 2.1. и 2.2.

Таблица 2.1 - Перечень используемых веществ и реактивов

№ п/п	Наименование	Квалификация или сортность	ГОСТ, ТУ, страна, фирма
1	2	4	3
1	Порошок гидроксида алюминия	Размер частиц 50-80 нм	ТУ 2164-003-03069303-2014 ШБЕП ТПУ, Россия
2	Алюминия оксид для колоночной хроматографии 0,063-0,200 мм	Ч	«Merck», Германия
3	Модифицированная молекула диэтилентриаминопентауксусной кислоты ($ДТПА_{мод}$)	Размер частиц 50-100 нм	ИФВТ ТПУ, Россия
4	Наночастицы Fe@C, модифицированные арилдиазоний тозилатами Fe@C(АДТ)	Размер частиц 5-17 нм	ИФВТ ТПУ, Россия
5	Натрия пертехнетат, ^{99m}Tc для внутривенного введения	РХЧ > 99%;	ФГАОУ ВО НИ ТПУ, ТУ 9452-001-02070200
6	Раствор натрия хлорида 0,9 % для инъекций	Фарм.	ФС 42-2572-95
7	Олово(II) хлорид дигидрат	ХЧ	«Merck», Германия
8	Аскорбиновая кислота		ГОСТ 4815-76

Продолжение Таблицы 2.1

1	2	3	4
9	Вода для инъекций		ФС 42-2620-97
10	Желатин	пищевой	ГОСТ 11293-89
11	Кислота соляная	ХЧ	ГОСТ 3118-77
12	Натрий фосфорнокислый пиро 10-водный	ХЧ	ГОСТ 342-77
13	Ацетон	ОСЧ	ТУ 2633-039-44493179-00
14	Спирт этиловый	«Экстра», 96 %	ГОСТ Р-51-652-2000
15	Калий рениевокислый (перренат)	Ч	ТУ 6-09-04-79-74
16	Квасцы железоаммонийные	ЧДА	ГОСТ 4205-77
17	Металлический алюминий	марка А99	ГОСТ 11069-74
18	Хлорид кобальта		ТУ 6-09-2338-77
19	Пробки резиновые медицинские	Тип 1-1	ТУ 9398-001-31316292-2007
20	Алюминиевые колпачки для укупорки лекарственных средств	Тип К2-20	ГОСТ 51314-99
21	Флаконы стеклянные	ФО-10-НС-1А	ТУ 9461-025-80007803-2007

Таблица 2.2 — Перечень радиометрического и аналитического оборудования

№ п/п	Наименование	ГОСТ, ТУ, страна, фирма	Примечание
1	2	3	4
1	Гамма-камера E-CAM-180	«Siemens», США	
2	Гамма-зонд «GammaFinder»	США	
3	Радиометр активности радионуклидов для ТСХ «ГаммаСкан-01А»	ООО «НТЦ Амплитуда», Россия	Регистрируемая активность 10 кБк ÷ 1 МБк
4	Специализированная радиометрическая установка УРС-06/07	«Канберра», США	

Продолжение Таблицы 2.2

1	2	3	4
5	Радиометр жидкостный гамма РЖГ-07-ц	Россия	
	Радиометр «Дозкалибратор» РИС-А1	ООО «НТЦ Амплитуда», Россия	Диапазоны 1 кБк ÷ 40 ГБк
6	Стерилизатор ГК-10	«Hirayama», Япония	
7	pH-метр/иономер S220 SevenCompact	«Mettler-Toledo», Швейцария	Относительная погрешность pH ± 0,002.
8	Лиофильная сушка FreeZone 2.5L	«Labconco», США	Объем 2,5 л
9	Фотонный кросскорреляционный спектрометр Nanophox	Германия	
10	Ультразвуковой диспергатор	Россия	мощность 800 Вт
11	Комплекс аналитический вольтамперометрический СТА в комплекте с IBM-совместимым компьютером	Россия	
12	Индикаторный электрод стеклоуглеродный	«ЮМХ», Россия	рабочая поверхность 25 - 30 мм^2
13	Электрод сравнения насыщенный хлоридсеребряный (нас.х.с.) в насыщенном растворе хлорида калия	«ЮМХ», Россия	сопротивление не более 3,0 кОм
14	Вспомогательный электрод насыщенный хлоридсеребряный (нас.х.с.) в насыщенном растворе хлорида калия	«ЮМХ», Россия	сопротивление не более 3,0 кОм
15	Мембранные фильтры «МФАС-Б-2»	ТУ 6-55-221-879-88	Диаметр пор 220; 100 и 50 нм
16	Шприцевые насадки для мембранной фильтрации Minisart	«Sartorius», Германия	

Продолжение Таблицы 2.2

1	2	3	4
17	Дуговой генератор ДГ-2 со штативом для крепления электродов	Россия	
18	Угольные электроды марки В-3	(ТУ-48-0123-71)	диаметр 6 мм, длиной 50 мм
19	Анализатор многоканальный атомно-эмиссионных спектров «МАЭС»	Россия, ПО «АТОМ»	
20	Камера хроматографическая (стекло)	Россия	19х24,6х11 см
21	Термостолик для ТСХ с подогревом	«Lenchrom», Россия	Максимальная температура 80ºС
22	Полуавтомат для закатки алюминиевых колпачков на флаконах ПЗФ Изотерм	«Изотерм», Россия	Производительность 1000 – 1200 шт./час;
23	Ультразвуковая ванна «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4	«Unitra», Польша	Ультразвуковая частота 50 Гц
24	Спектрофотометр 2802 S UV/VIS UNICO	«Unico», США	Диапазон спектра 190 – 1100 нм
25	Электронные аналитические весы RADWAG WAS 220/c/2	«Radwag», Польша	До 200 г
26	Шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80	Россия	
27	Одноканальный амплитудный анализатор Strahlungsmessgerat 20 046	Германия	

2.2 Методики приготовления растворов и реагентов для получения меченных технецием -99м наноколлоидов

2.2.1 Приготовление раствора олова дихлорида дигидрата

Навеску $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ массой 0,7 г растворяют в 2 мл 1М HCl. Объем раствора доводят кипяченой дистиллированной водой до 100 мл. Концентрация олова составляет 7 мг/мл. Растворение проводят в атмосфере аргона.

2.2.2 Приготовление раствора желатина

Растворяют 10 г желатина медицинского в кипяченой дистиллированной воде. Растворение проводят на водяной бане при температуре 70°С. Время растворения 10 мин. Объем раствора доводят кипяченой дистиллированной водой до 100 мл. Концентрация желатина составляет 10%.

2.2.3 Приготовление раствора аскорбиновой кислоты

Точную навеску аскорбиновой кислоты (масса 1 г) растворяют в 100мл кипяченой дистиллированной воды. Концентрация аскорбиновой кислоты 10 мг/мл.

2.2.4 Приготовление суспензии из порошка гамма-оксида Al_2O_3

В качестве объекта исследования использовался порошок гамма-оксида Al_2O_3, полученный из порошка гидроксида алюминия $Al(OH)_3$ путем прокаливания его в течение 2 ч. при температуре 400°*C* в муфельной печи. Наработку партий исходного гидроксида алюминия проводили в Отделении естественных наук ШБИП Томского политехнического университета. Изображения порошков гидроксида алюминия и полученного гамма-оксида алюминия приведено на рисунке 2.1. В каждом случае средний размер частиц составляет 50-80 нм.

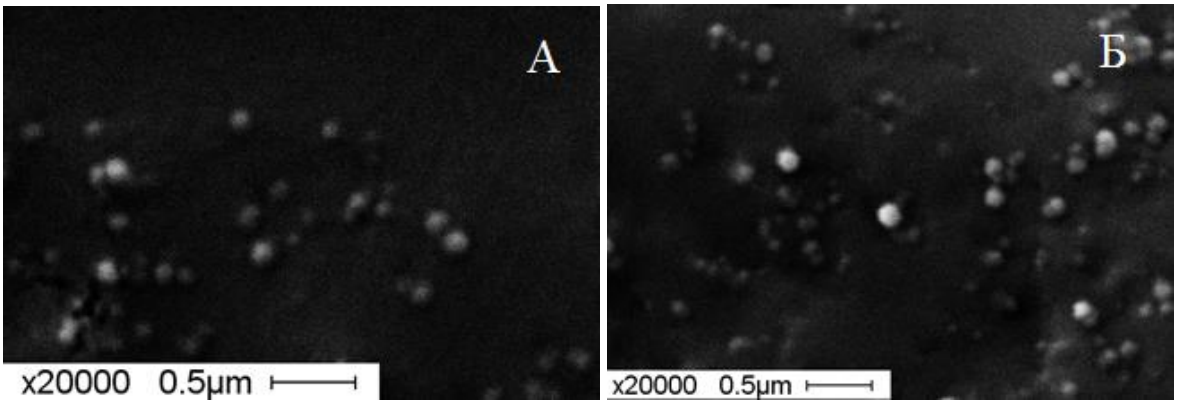


Рисунок 2.1 – Фотография частиц оксида алюминия, выполненная при помощи электронного микроскопа Philips SEM 515: А – исходный порошок гидроксида алюминия, Б - гамма-оксид алюминия

Суспензию из порошка гамма-оксида алюминия готовили путем обработки навески (~ 0,05 г) полученного гамма-оксида и 10 мл дистиллированной воды. Суспензию обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 60 минут. Затем в стакан с суспензией добавляли 0,05 М раствор соляной кислоты (порциями по 10 мкл) с интервалом в 30 с. При этом проводили измерение pH среды. Кислотную обработку осуществляли до значения pH=4-5. После этого суспензию вновь

помещали в ультразвуковую ванну на 15 мин. Готовую суспензию хранили в темном месте в закрытом флаконе.

2.3 Методики проведения радиометрических измерений

2.3.1 Определение объемной активности технеция-99м

Для измерения объемной активности ^{99m}Tc в элюате из генератора технеция «^{99m}Tc-ГТ-ТОМ», проводили отбор проб объемом 5 мкл (не менее 5 шт.). Пробы наносили на фильтровальную бумагу (диаметр 15 мм), упаковывали в липкую полиэтиленовую пленку. Измерение полученных проб осуществляли на гамма-спектрометре с Ge(Li) детектором [202, 203]. Чтобы снизить загрузку детектора от интенсивного излучения ^{99m}Tc во время измерения использовали фильтр из оргстекла (толщина 2 - 5 мм). Таким же образом осуществляли замеры образцового источника ^{152}Eu из стандартного набора ОСГИ. Объемную активность ^{99m}Tc (A_{Tc}) расчитывали по формуле:

$$A_{Tc} = A_O \cdot \frac{l_O P_O}{lP} \cdot \frac{S}{S_O} \cdot \frac{1}{V} \qquad (2.1)$$

где, A_O – активность образцового источника, Бк;

S и S_O – площади измеряемых пиков в спектрах препарата и образцового источника с энергиями E=0,140 МэВ и E_O=0,122 МэВ;

l_0=3,2·10^{-2} и l=3,4·10^{-2} эффективности регистрации гамма-квантов с энергиями E и E_O, соответственно;

P=88,8 % и P_O=28,3 % – выходы гамма-квантов ^{99m}Tc и ^{152}Eu;

V – объем пробы препарата, взятой для измерения, мл.

По результатам, полученным после измерения 5 проб провели расчет среднего значения активности ^{99m}Tc в растворе, Бк/мл при доверительной вероятности 0,95 и доверительном интервале ± 1.

2.3.2. Определение степени адсорбции ^{99m}Tc на оксидах алюминия с различной кислотной обработкой

Использовали оксид алюминия для колоночной хроматографии (0,063-0,200 мм). Исследования проводили по следующей методике. К навеске оксида алюминия (масса ~ 1 г) добавляли 3 мл раствора технеция - 99м. Смесь перемешивали. Оксид осаждали методом центрифугирования. Для проведения измерений из верхнего слоя водной фазы отбирали 3 пробы объемом 5 мкл. В качестве эталона использовали пробы исходного раствора технеция - 99м (3 пробы объемом 5 мкл). Для определения количества (*W*, %) ^{99m}Tc который адсорбировался оксидами использованием формулу:

$$W = \frac{A_{исх} - A_i}{A_{исх}} \cdot 100 \qquad (2.2)$$

где A_i – средняя активность пробы образца в 5 мкл, $A_э$ – средняя активность эталона в 5 мкл. После проведенных расчетов строили зависимость изменения величины адсорбции ^{99m}Tc от массы поглощенной оксидом кислоты. Для этого полученные показатели измеренных активностей приводили к одному времени.

2.3.3 Методика получения радиохроматограмм

Распределение технеция - 99м по хроматографической пластине осуществляли с использованием установки «ГаммаСкан-01А».

Готовили пластины с тонким слоем силикагеля (тип «Sorbfil») размером 20×150 мм. Отступив от одного края пластины на 15 мм (линия старта) наносили пробу испытуемого образца, содержащего ^{99m}Tc (объем 5 мкл). После высушивания пятна, пластину помещали в подготовленную камеру.

Хроматографическую камеру предварительно наполняли ацетоном (подвижная фаза) с высотой слоя на дне камеры 1 см.

Для распределения подвижных пертехнетат-ионов ^{99m}Tc(VII) по хроматографической пластине достаточно 10 мин хроматографирования. Полученную хроматограмму высушивали при комнатной температуре. После обклеивали «липкой» лентой с двух сторон, и осуществляли ее изучение по всей длине на установке «Гамма-Скан-01А». На экран компьютера выдаются данные о соотношении площади пика активности к общей активности хроматограммы (%) и на каком расстоянии от края пластины находится максимум гамма-излучения ^{99m}Tc. Калибровку прибора проводили непосредственно перед осуществлением измерений.

2.3.4 Определение размера меченных ^{99m}Tc наноколлоидных частиц методом фильтрации

Размер меченных технецием-99м коллоидных частиц устанавливали измерением активности растворов до и после их фильтрации. Фильтрацию проводили последовательно через фильтрационные насадки с определенными размерами пор: 220, 100 и 50 нм. Из исходных растворов и каждого фильтрата отбирали по 3 пробы (объем 5 мкл) и проводили измерения их активности. Расчеты выхода продуктов с различными размерами частиц определяли по приведенным ниже формулам:

$$C_{220} = \frac{A_{ис} - A_1}{A_{ис}}; \quad C_{100} = \frac{A_1 - A_2}{A_1}; \quad C_{50} = \frac{A_2 - A_3}{A_2} \qquad (2.3)$$

где $A_{ис}$ – активность исходного раствора до фильтрации;

A_1 – активность, измеренная после фильтрации через фильтр 220 нм;

A_2 – активность после фильтрации через 100 нм;

A_3 – активность, измеренная после фильтрации через 50 нм.

2.4 Инструментальный метод определения размеров меченых наноколлоидов

Размер меченных технецием-99м коллоидных частиц устанавливали методом спектроскопии кросс-корреляции фотонов (PCCS). Преимуществом данного метода является то, что определение размеров частиц можно проводить даже в непрозрачных эмульсиях (суспензиях) в диапазоне от 1 нм до нескольких микрон [204]. Концентрация испытуемого образца не оказывает влияния на результаты проведенных измерений. Измерения проводят на анализаторе размеров частиц Nanophox (рисунок 2.2.).

Рисунок 2.2 – Анализатор Nanophox фирмы Sympatec GmbH:
1- измерительная зона, 2 - радиатор, 3 - LED-индикатор,
4 - LED-индикатор, 5 - LED-индикатор

Для измерения размера частиц пробу препарата объемом 3 мл отбирают в пластиковую кювету 10×10 мм и помещают в зону измерения анализатора. В программе прибора задают координаты пересечения лучей и время выдержки (экспозиции). Происходит измерение интенсивности рассеянного света. Программа обрабатывает полученных результаты и выдает информацию о среднем размере частиц и график распределения частиц по размерам.

2.5. Методики проведения микробиологических исследований

2.5.1. Определение бактериальных эндотоксинов

Определение концентрации бактериальных эндотоксинов в РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» проводили с помощью лизата амебоцитов мечехвоста «Limulus polyphemus» (ЛАЛ-реактива), согласно ОФС 1.2.4.0006.15 [205, 206].

Расчёт предельного содержания бактериальных эндотоксинов (ПСБЭ) проводили по формуле:

$$\text{ПСБЭ} = \frac{175 * ЕЭ}{V} \text{ ЕЭ/мл}, \qquad (2.4)$$

где V– максимально рекомендуемая доза в мл.

Процедура анализа.

В круглодонные пробирки вносили равные объёмы исследуемого РФП и ЛАЛ-реактива (по 0,1 мл). Перемешивали и одновременно инкубировали 60 мин на водяной бане при температуре 37°С [206].

По истечении указанного срока регистрировали, как положительные (+), так и отрицательные (–) результаты. При положительном результате наблюдается образование плотного геля, который при аккуратном переворачивании пробирки не разрушается. При отрицательном результате образование геля не наблюдается [206].

Для обеспечения достоверности результатов определения бактериальных эндотоксинов проводили анализ «Подтверждение заявленной чувствительности ЛАЛ-реактива». Кроме того, для испытуемых РФП определяли степень максимально допустимого разведения (МДР), которое рассчитывали по формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{ПСБЭ}}{\lambda}, \qquad (2.5)$$

где λ = 0,03 ЕЭ/мл – чувствительность ЛАЛ-реактива.

Для РФП приготовленных из реагентов (лиофилизатов) и растворов (элюатов), проводят расчёт предельного содержания (ПС) бактериальных

эндотоксинов каждого из компонентов (лиофилизатов или растворов). При этом учитывают величину ПС бактериальных эндотоксинов в готовом преапарате. Для РФП предельное содержание бактериальных эндотоксинов определяют по формуле 175 ЕЭ/V, где V - максимальная доза препарата в мл в конце срока годности (наибольшая по объему доза препарата с наименьшей объёмной активностью) [205, 206]. Согласно существующим требованиям, для РФП на основе ^{99m}Tc, приготовляемых из реагентов, ПСБЭ не должно превышать 8,75 ЕЭ/мл. С учётом этого, МДР = 292.

Проведение анализа «Мешающие факторы»

Для проведения анализа готовили растворы A, B, C и D по схеме, приведённой в таблице 2.3. Испытанию подвергали РФП в разведении, не превышающем значения МДР.

Таблица 2.3 - Схема анализа «Мешающие факторы» [204]

Раствор	Коли-чество повторно стей	Исходный раствор	Растворитель	Конечная концентрация эндотоксина в испытуемом растворе	Фактор разведения
A	4	Испытуемый РФП	–	–	–
B	4 4 4 4	Испытуемый РФП, содержащий КСЭ, в концентрации 2 λ	Испытуемый РФП	2 λ 1 λ 0,5 λ 0,25 λ	1 2 4 8
C	4 4 4 4	Раствор КСЭ в ЛАЛ-воде, с концентрацией КСЭ 2 λ	ЛАЛ-вода	2 λ 1 λ 0,5 λ 0,25 λ	1 2 4 8
D	2	ЛАЛ - вода	–	–	–

Серия растворов A – испытуемый РФП в выбранном разведении (контроль испытуемого РФП).

Раствор B – разведение контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ) в растворе испытуемого РФП (тест, выявляющий возможность ингибирования или усиления реакции).

Серия растворов С – разведение КСЭ ЛАЛ-водой (контроль чувствительности ЛАЛ-реактива).

Раствор D – ЛАЛ-вода (отрицательный контроль).

Тест проводили, как описано в разделе «Процедура анализа».

Качественный анализ

Для проведения анализа готовили растворы A, B, C и D по схеме, приведённой в таблице 2.4.

Таблица 2.4 - Схема проведения качественного анализа [204]

Раствор	Количество повторностей	Исходный раствор	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе
A	2	Испытуемый РФП	–
B	2	Испытуемый РФП, содержащий КСЭ, в концентрации 2 λ	2 λ
C	2	Раствор КСЭ в ЛАЛ-воде, с концентрацией 2 λ	2 λ
D	2	ЛАЛ-тВода	–

Раствор А – испытуемый РФП в разведении, для которого был проведён тест "Мешающие факторы".

Раствор В – испытуемый РФП, к которому добавлен КСЭ (положительный контроль испытуемого РФП). Конечная концентрация эндотоксина должна составлять 2 λ

Раствор С – раствор КСЭ в ЛАЛ-воде (положительный контроль), конечная концентрация 2 λ.

Раствор D – ЛАЛ-вода (отрицательный контроль).

Анализ проводили, как описано в разделе «Процедура анализа».

Количественный анализ

Для проведения анализа готовили растворы A, B, C и D (таблица 2.5). В тесте использовали разведения, для которых был проведён анализ "Мешающие факторы" и большие, но не превышающие МДР для ЛАЛ-реактива с данной чувствительностью.

Раствор A – разведения испытуемого РФП, начиная с разведения, в котором был проведён анализ "Мешающие факторы".

Раствор B – испытуемый РФП в наименьшем из разведений, к которому добавлен КСЭ в концентрации 2 λ (положительный контроль испытуемого РФП).

Таблица 2.5 - Схема проведения количественного анализа [206]

Раствор	Коли-чество повторностей	Исходный раствор	Растворитель	Фактор разведения	Конечная концентрация КСЭ в испытуемом растворе
A	2 2 2 2	Испытуемый РФП	ЛАЛ-вода	1 2 4 8 и т.д. до МДР	– – – –
B	2	Испытуемый РФП, содержащий КСЭ, в концентрации 2 λ	Испытуемый РФП	1	2 λ
C	2 2 2 2	Раствор КСЭ в ЛАЛ-воде, с концентрацией 2 λ	ЛАЛ-вода	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0,5 λ 0.25 λ
D	2	ЛАЛ - вода	–	–	–

Раствор C – серия разведений КСЭ в ЛАЛ-воде (контроль чувствительности ЛАЛ-реактива).

Раствор D – ЛАЛ-вода (отрицательный контроль).

Среднее геометрическое значение концентрации эндотоксина рассчитывали по формуле:

$$antilog*(\Sigma e/f), \text{ где} \qquad (2.6)$$

e – логарифм значения концентрации КСЭ в каждой повторности,

Σe – сумма логарифмов концентрации эндотоксина,

F – количество повторностей.

2.5.2 Определение стерильности

Испытания на стерильность РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc - Al_2O_3» проводили по ОФС 1.2.4.0003.15 [205].

Контроль стерильности проводили методом прямого посева на питательные среды. Использовали тиогликолевую среду (*среда №1*) и жидкую среду Сабуро (*среда №2*). В соответствии с методикой, РФП отбирали стерильной пипеткой и вносили 2 мл в пробирки с питательной средой №1, затем в пробирки с питательной средой №2. Посевы в тиогликолевой среде инкубировали при температуре 32,5 ± 2,5°С, а в среде Сабуро – 22,5 ± 2,5°С. Продолжительность инкубации посевов в обеих средах составляет 14 суток [205, 207]. Посевы просматривали в рассеянном свете ежедневно и по окончании периода инкубации. Наличие роста микроорганизмов определяли визуально.

2.6 Определение функциональной пригодности РФП для сцинтиграфического выявления «сторожевых» лимфатических узлов

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) [208, 209].

Исследование по оценке функциональной пригодности нового РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» для сцинтиграфического определения СЛУ выполняли в 3 сериях экспериментов. В каждой серии использовали по 5 белых крыс-самцов линии Вистар массой 300-350 г.

Между первым и вторым пальцами задней лапы крысы выполняли инъекцию РФП (доза 18-20 Мбк). Перед подкожным введением и в ходе сцинтиграфического исследования животных наркотизировали с помощью эфира.

В течение 15 мин после введения РФП, фиксировали кинетику распределения препарата по органам и тканям. Покадровая запись - 1 кадр 30 секунд, матрица 64х64 пиксела [73]. Статическую сцинтиграфию осуществляли через 1, 2, 3 и 24 часа в передней и задней проекциях в матрицу 256х256 с набором 500 импульсов.

После проведенных исследований определяли процент накопления РФП в подмышечном лимфатическом узле и месте инъекции.

Одновременно проводилось сравнительное изучение возможности визуализации сторожевых лимфатических узлов с использованием РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» и РФП «^{99m}Tc-Nanocis» (CIS Bio International, Франция). Приготовление РФП «Nanocis» осуществлялось согласно инструкции, предложенной фирмой производителем.

2.7 Определение функциональной пригодности РФП для интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов

Исследование по оценке функциональной пригодности нового РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» для интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов выполняли в 3 сериях экспериментов. В каждой серии использовали по 5 белых крыс-самцов линии Вистар массой 300-350 г. [209].

Между первым и вторым пальцами задней лапы крысы выполняли инъекцию РФП (доза 18-20 Мбк). Перед подкожным введением и в ходе интраоперационного исследования животных наркотизировали с помощью эфира.

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

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

2.9 Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку экспериментальных результатов радиометрических измерений активностей ^{99m}Tc проводили с использованием критерия Стьюдента, при доверительной вероятности 0,95 и доверительном интервале ± 1% от среднего значения. Измерения проводили не менее 5 раз с последующим внесением поправки на время распада радионуклида [210, 211].

Обработку экспериментальных данных, полученных при проведении исследований, осуществляли с помощью пакета программ Microsoft office Excel, а также методом наименьших квадратов. зависимость функции $y = f(x, a_0, a_1, ..., a_k)$ строили таким образом, чтобы сумма квадратов отклонений измеренных значений y_i от расчетных $f(x_i, a_0, a_1, ..., a_k)$ была наименьшей (рисунок 2.3) [3, 212, 213].

2.9 Выводы по главе

1. Сформирован перечень используемых веществ, реактивов, материалов и основного радиометрического и аналитического оборудования. Дана их характеристика.

2. Рассмотрены методики по подготовке исходных компонентов и растворов для синтеза разрабатываемых радиофармацевтических препаратов.

3. Описаны методики проведения радиометрических измерений активности ^{99m}Tc в пробах из исследуемых радиофармпрепаратов и получения радиохроматограмм.

4. Рассмотрены способы определения размеров меченных наноколлоидных частиц методом мембрабной фильтрации и методом спектроскопии кросс-корреляции фотонов (PCCS) на анализаторе размеров частиц Nanophox.

5. Приведены методики оценки эффективности и безопасности новых РФП.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ И РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НАНОРАЗМЕРНЫХ КОЛЛОИДОВ. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении исследований по разработке методов получения наноколлоидных РФП было рассмотрено два принципиальных подхода к формированию меченых технецием-99м частиц на основе неорганических структур и органических соединений.

Метод формирования наночастиц с использованием неорганических структур подразумевает получение готовых наноразмерных частиц металлов с заданными размерами и структуры их модификацию с переводом в коллоидную систему.

Второй способ получения наноразмерных соединений заключается в органическом синтезе коллоидных наноразмерных дисперсных систем с присоединением хелаторов для связи с изотопом технеция-99м [169].

На основе вышеприведенных подходов нами были разработаны оригинальные методы получения трех наноколлоидных препаратов.

Первый тип наноколлоидов был создан на основе металлохелатов с химически модифицированными комплексонами диэтилентриамин-пентауксусной кислоты (ДТПА). Модификация достигается путем введения в молекулы комплексонов длинноцепочечных алифатических фрагментов. Указанные фрагменты, являясь липофильными (гидрофобными), обеспечивают не только повышенное сродство препаратов к определенным органам, но также приводят к формированию стабильных в водной среде коллоидных систем с определенными размерами частиц.

Второй тип коллоидов представляет собой частицы металлов, покрытых углеродной оболочкой, которая химически модифицирована различными функциональными группами, в том числе, способными давать металлохелаты.

Для получения коллоидов использовали наночастицы железа, покрытые углеродной оболочкой Fe@C, к которой через ковалентные связи были присоединены фрагменты бензилдиметилен-аминоуксусной кислоты.

При получении третьего типа наноколлоидов радионуклид технеций-99м был адсорбирован на порошке оксида алюминия. При разработке методики получения этого коллоида была исследована возможность использования в качестве носителя радиоактивной метки ^{99m}Tc порошков низкотемпературной (кубической) модификации гамма-оксида алюминия.

3.1 Формирование наноразмерных коллоидных систем на основе диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА)

Для реализации первого подхода была исследована возможность получения наноразмерных коллоидов на основе химически модифицированной молекулы ДТПА, имеющей определенные сходства с молекулой белка – наличие амидной (пептидной) связи и существование в цвиттер-ионной форме. Исходная субстанция модифицированной ДТПА (далее – ДТПА$_{мод}$) была синтезирована в Институте физики высоких технологий Томского политехнического университетиа на кафедре биотехнологии и органической химии [215, 216].

Главным фактором, повлиявшим на выбор ДТПА в качестве хелатора радиоактивной метки, является способность молекулы ДТПА, а так же и ее производных, образовывать достаточно стабильные комплексы с различными металлами и, в том числе, с радиоактивным ^{99m}Tc. Простые химические трансформации позволили получить ряд производных ДТПА, модифицированных гидрофобными группами.

Следует отметить, что сама по себе молекула ДТПА, как и ее комплексы с металлами, гидрофильна и не склонна к образованию коллоидных частиц. Введение в ее структуру гидрофобных фрагментов позволило получить

водонерастворимые модифицированные комплексы ДТПА [170, 216, 217]. По своей сути это амфифильные соединения, существующие в виде цвиттер-ионов и являющиеся одновременно аналогами сразу катион- и анион-поверхностноактивных веществ (ПАВ).

На растворимость молекулы и ее способность образовывать коллоидные частицы определенного размера в первую очередь влияют особенности ее геометрии. При этом на стабильность коллоидной системы влияет соотношение между количеством гидрофильных и гидрофобных групп (гидрофильно-липофильный баланс - ГЛБ). Как было установлено, модифицированные комплексы ДТПА при соответствующих условиях могут существовать в виде наноколлоидных частиц [215]. В результате проведенных в этой работе исследований было определено, что присоединение к молекуле ДТПА двух длинных (С21 – С22) алифатических неразветвленных цепей с ароматической группой, выполняющей роль «мостика» между молекулой ДТПА и алифатическими цепями, обеспечивает возможность растворения модифицированной ДТПА в липидах, а также повышает возможность получения коллоидных растворов $ДТПА_{мод}$ при физиологических значениях pH. Соединения с более короткими алифатическими цепями (С7 – С10) показали себя значительно хуже. Общая структурная формула синтезированного $ДТПА_{мод}$ и получаемого из него меченного ^{99m}Tc комплекса представлены на рисунке 3.1.

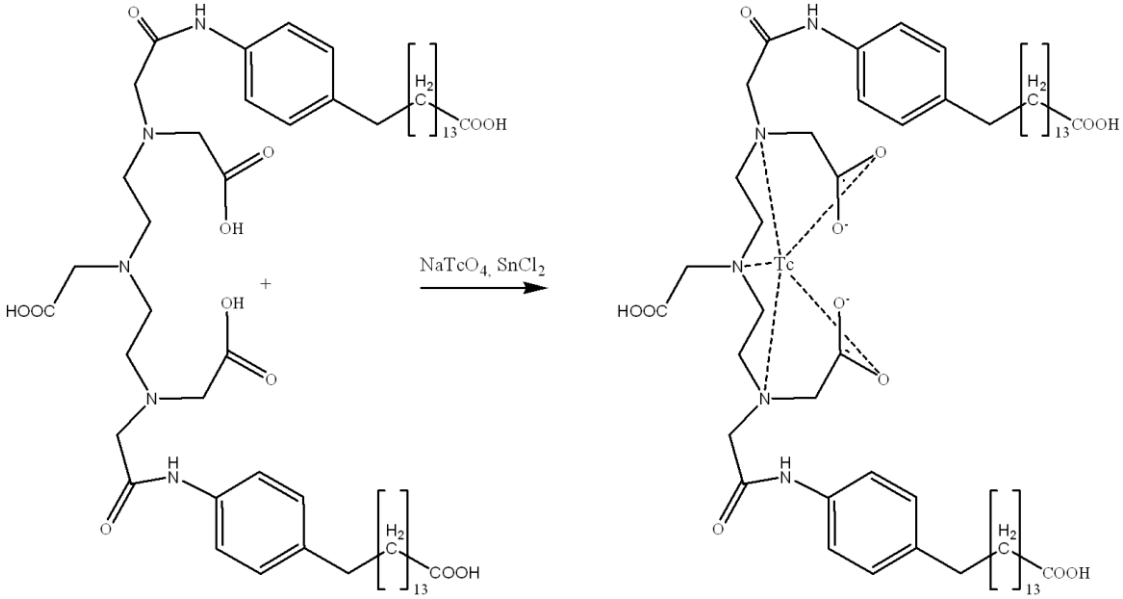


Рисунок 3.1 – Схема синтеза ДТПА$_{мод}$ меченного технецием – 99м

Для получения из синтезированного ДТПА$_{мод}$ наноколлоида с требуемым размером частиц (до 100 нм) необходимо было проверить растворимость выбранной модифицированной субстанции. В качестве растворителей были испытаны следующие растворы: физиологический раствор - 0,9 % раствор NaCl; растворы соляной кислоты с различной концентрацией; обезвоженный этиловый спирт, а также 5-10 % растворы $NaHCO_3$.

При проведении этих экспериментов во флаконы вместимостью 20 мл вносили навески по 5 мг ДТПА$_{мод}$, а затем в каждый из них вводили приготовленные растворители. Растворимость вещества определяли визуально с использованием специализированной установки, представляющей собой световой стенд с оптическим устройством.

В результате выполнения исследований было определено, что в физиологическом растворе субстанция ДТПА$_{мод}$ не растворяется даже при нагревании до 80 ^{0}С. То же самое наблюдалось и в кислых средах вплоть до предельных концентраций HCl. Напротив, в обезвоженном спирте ДТПА$_{мод}$ растворяется полностью без образования коллоида. В отличие от рассмотренных сред, в растворах бикарбоната натрия ДТПА$_{мод}$ образует мутноватый, опалесцирующий раствор коллоидного типа. На этом основании в качестве растворителя для приготовления меченной ^{99m}Тс наноколлоидной суспензии ДТПА$_{мод}$ нами был выбран 5 % раствор $NaHCO_3$.

Для получения раствора натрия пертехнетата, содержащего радиоизотоп ^{99m}Тс, использовали коммерческий генератор технеция «^{99m}Тс-ГТ-ТОМ» производства Томского политехнического университета.

Как известно [218, 219], 7-валентный ^{99m}Тс, выделяемый из генератора в виде раствора натрия пертехнетата,^{99m}Тс, не проявляет комплексообразующих свойств и используется для получения меченых им соединений только в восстановленной форме и чаще всего в 4-валентном состоянии. При этом в качестве восстанавливающего агента при приготовлении радиофармпрепаратов на основе ^{99m}Тс в мировой практике, наиболее часто применяют хлорид

двухвалентного олова [220 - 222]. Основная сложность использования этого реагента для приготовления меченого наноколлоида ДТПА$_{мод}$ состоит в том, что его избыточное количество в составе реакционной смеси приводит гидролизу олова до четырехвалентного и образованию крупного коллоида вида:

$$(—O—TcO—O—SnCl_2—O—TcO—)_n,$$

где n = 2, 3, … – зависит от кислотности раствора [221]. За счет гидролиза избытка $SnCl_2$ или же дополнительного образования комплекса восстановленного ^{99m}Tc с оловом возможно также появление нецелевого коллоида. Все это потребовало проведения предварительных экспериментальных исследований по установлению необходимого и достаточного количества $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ в реакционной смеси [78, 169, 218, 219]. В ходе этих экспериментов было установлено, что оптимальная концентрация Sn(II) в составе реакционной смеси при его взаимодействии с ^{99m}Tc должна находиться в пределах 0,0175-0,035мг/мл.

Приготовление раствора олова(II) дихлорида выполняли по методике, представленной в разделе 2 п.2.2.1. Последующее введение метки ^{99m}Tc в коллоидную субстанцию ДТПА$_{мод}$ осуществляли двумя способами: путем введения во флакон с субстанцией ДТПА$_{мод}$ восстанавливающего агента олова (II) в виде раствора $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ с последующим добавлением к смеси элюата технеция-99м, а также путем введения элюата ^{99m}Tc в предварительно упаренную смесь ДТПА$_{мод}$ с раствором $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. Смеси готовились с разным соотношением концентраций компонентов. После проводили анализ состава получаемых продуктов методом тонкослойной хроматографии (методика п. 2.3.3) с целью определения радиохимического выхода меченного ^{99m}Tc-ДТПА$_{мод}$ и других продуктов взаимодействия. Кроме того, исследовали взаимодействие отдельных компонентов реакционных смесей с раствором натрия пертехнетата,^{99m}Tc.

В качестве подвижных фаз для проведения тонкослойной радиохроматографии использовали смеси:

а) ацетон (время хроматографирования 10 мин);

б) хлороформ—метанол—вода—уксусная кислота (ледяная) в соотношении 4:4:0,1:0,3 (время хроматографирования 20 мин) (система №1);

в) хлороформ—этанол—аммиак (концентрированный) в соотношении 5:5:1 (время хроматографирования 60 минут) (система №2).

В качестве подвижной фазы для определения содержания в смеси пертехнетат-ионов семивалентного ^{99m}Tc был выбран ацетон. Системы №1 и №2 подбирали с учетом растворимости в этих средах модифицированного ДТПА и примеси гидролизованного оксида $^{99m}TcO_2$ восстановленного ^{99m}Tc(IV). Для проведения хроматографирования из всех исследуемых смесей отбирали пробы объемом 5 мкл.

Одновременно с определением местоположения на полученных радиохроматограммах пиков, меченых ^{99m}Tc комплексов, проводили хроматографирование немеченой исходной субстанции. Картину ее распределения по хроматограмме устанавливали с помощью УФО-камеры, насыщенной парами йода, по характерному свечению, а также по появлению коричневых пятен. В качестве образцового раствора использовали 5%-ый раствор натрия гидрокарбоната, содержащего соединение ДТПА$_{мод}$ концентрацией 1мг/мл. В результате исследований было установлено, что исходной субстанции ДТПА$_{мод}$ на хроматограмме соответствует область, находящаяся на R_f =0,5.

Были изучены смеси состава:

Смесь № 1. Для определения места расположения на хроматограммах пика невосстановленного ^{99m}Tc(VII) снимали радиохроматограммы исходного раствора натрия пертехнетата, ^{99m}Tc, выделенного из генератора (элюата).

Смесь №2. Для определения содержания восстановленного технеция-99м во флакон вместимостью 10мл было введено 5мл элюата, содержащего ^{99m}Tc, и 0,02мл раствора хлорида олова $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ с концентрацией 7 мг/мл. Отбор проб производили после инкубирования смеси в течение 20 мин.

Смесь № 3. Для проверки комплексообразующей способности невосстановленного ^{99m}Tc(VII) была приготовлена смесь, включающая 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc, и 0,1 мл 5%-го раствора натрия гидрокарбоната с

концентрацией ДТПА$_{мод}$ 1,0 мг/мл, не содержащая хлорида олова $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. Смесь была проинкубирована в течение 20 мин. pH раствора = 7.

Далее для проверки влияния на эффективность мечения субстанции ДТПА$_{мод}$ качественного и количественного состава реакционных смесей были приготовлены и исследованы следующие смеси:

Смесь № 4. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали 0,1 мл 5%-го раствора натрия гидрокарбоната, содержащего ДТПА$_{мод}$ с концентрацией 1,1 мг/мл, 0,02 мл раствора $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ с концентрацией 7 мг/мл и 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 7.

Смесь № 5. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали 0,1 мл 10%-го раствора натрия гидрокарбоната, содержащего ДТПА$_{мод}$ с концентрацией 1 мг/мл, 0,01 мл раствора NaOH концентрацией 1 моль/л, содержащего двухвалентное олово концентрацией 11,9 мг/мл (по металлическому олову) и 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 8.

Смесь № 6. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали обезвоженный спирт (0,1 мл), содержащий ДТПА$_{мод}$ с концентрацией 1 мг/мл, 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего двухвалентное олово концентрацией 6,3 мг/мл (по металлическому олову) и 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 6.

Смесь № 7. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали обезвоженный спирт (0,1 мл), содержащий ДТПА$_{мод}$ с концентрацией 1 мг/мл, и упаривали досуха. Затем осторожно на другую сторону дна флакона вносили 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего двухвалентное олово концентрацией 10мг/мл (по $SnCl_2$) и также упаривали. После этого вводили 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 6.

Смесь № 8. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали 0,1 мл 10%-го раствора натрия гидрокарбоната, содержащего ДТПА$_{мод}$ с концентрацией

1 мг/мл и высушивали досуха. Затем осторожно на другую сторону дна флакона вносили 0,01 мл раствора NaOH концентрацией 1 моль/л, содержащего двухвалентное олово концентрацией 11,9 мг/мл (по металлическому олову) и также высушивали досухали. После этого вводили 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 8.

Смесь № 9. Во флакон объемом 10мл последовательно приливали обезвоженный спирт (0,1 мл), содержащий ДТПА$_{мод}$ с концентрацией 1 мг/мл, 0,01 мл обезвоженного спирта, содержащего двухвалентное олово концентрацией 6,3 мг/мл (по металлическому олову). Смесь высушили досуха. После этого вводили 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc. Время инкубирования составило 20 мин. Кислотность раствора pH 6.

Обобщенные данные по результатам хроматографирования приготовленных смесей в разных подвижных фазах и распределению активности ^{99m}Tc по длине (*L*) радиохроматограмм представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. – Обобщенные данные по хроматографированию смесей

Образец	Система	Расстояние от линии старта, L, см									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Активность, имп/с									
Смесь № 1	Ацетон	567	1322	315	471	332	736	**1955**	**142565**	85	-
	№1	178	238	456	**70908**	**80086**	117	82	-	-	
	№2	190	965	360	271	325	545	**211344**	**239177**	525	485
Смесь № 2	Ацетон	**64380**	**98160**	161	186	232	451	793	528	133	
	№ 1	**75309**	**90270**	1046	453	182	104	94	-	-	
Смесь № 3	Ацетон	327	352	282	274	359	539	4028	**27717**	**73419**	135
	№ 1	353	616	290	**11589**	**141467**	106	102	-	-	
Смесь №	Ацетон	**41661**	**118270**	688	570	781	1165	**1745**	**2619**	126	

	№ 1	**76314**	**93553**	1511	**4760**	2501	148	148	112	-	-
Смесь № 5	№ 1	163	566	**1364**	608	**6270**	**246149**	132	109	-	-
Смесь № 6	№ 1	72	**66151**	**109302**	4715	3117	4367	3182	77	-	-
Смесь № 7	№ 2	167	**445966**	564	580	475	1005	2517	**17986**	175	170
Смесь № 8	№ 1	129	**2893**	**4876**	2814	11027	**248081**	144	104	-	-
Смесь № 9	№ 1	67	**58905**	**118239**	5940	1629	**2650**	103	67	-	-

Из анализа радиохроматограмм, представленных в таблице 3.1, были сделаны следующие выводы.

Изучение радиохроматограмм, полученных на пробах исходного элюата ^{99m}Tc из генератора (Раствор №1), показало, что пертехнетат-ионам семивалентного (невосстановленного) ^{99m}Tc во всех системах соответствует пик со значением R_f равном 0,9. Такой же пик с R_f = 0,9 наблюдается и для смеси №3, полученной при смешивании ДТПА$_{мод}$ с невосстановленным элюатом ^{99m}Tc, что свидетельствует об отсутствии прямого взаимодействия субстанции с ^{99m}Tc(VII).

В случае введения в препарат ^{99m}Tc олова хлорида дигидрата $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (Смесь № 2), основной пик на хроматограммах, как в ацетоне, так и в системе №1, смещается в область R_f=0,1, что говорит о восстановлении ^{99m}Tc и его переходе, предположительно, в ^{99m}Tc(IV). Точно также, полное восстановление ^{99m}Tc наблюдается и в спиртовом растворе (Смесь № 6), содержащем Sn в количестве

6,3 мг/мл (по металлу). Однако в этой среде, как было уже отмечено, происходит полное растворение коллоида ДТПА$_{мод}$, что препятствует синтезу целевого продукта. Не подходит для проведения мечения ДТПА$_{мод}$ также и щелочной раствор $SnCl_2$, используемый для приготовления Смеси № 5. Исходя из полученной хроматограммы можно сделать заключение, что олово в этой среде не проявляет восстанавливающих свойств и присутствующий в растворе ^{99m}Tc в основном остается в исходном 7-валентном состоянии. Аналогичный результат был получен и для Смеси №8 с сухими исходными щелочными компонентами.

В отличие от рассмотренных смесей, достаточно низкое содержания радиохимической примеси (РХП) невосстановленного ^{99m}Tc(VII) наблюдается при взаимодействии элюата, содержащего ^{99m}Tc, с высушеными остатками из спиртовых смесей ДТПА$_{мод}$ и Sn(II) (Смесь №9). Здесь величина РХП составляет 4,8 %. Близкое значение (5,1 %) наблюдается и для Смеси №7, приготовленной из спиртовых растворов.

Наиболее значимый результат получается при прямом взаимодействии раствора элюата ^{99m}Tc с раствором Смеси №4 состава, содержащего 0,11мг ДТПА$_{мод}$ и 0,14мг $SnCl_2$, которой соответствует хроматограмма, представленная на рисунке 3.2, где подвижной фазой является ацетон.

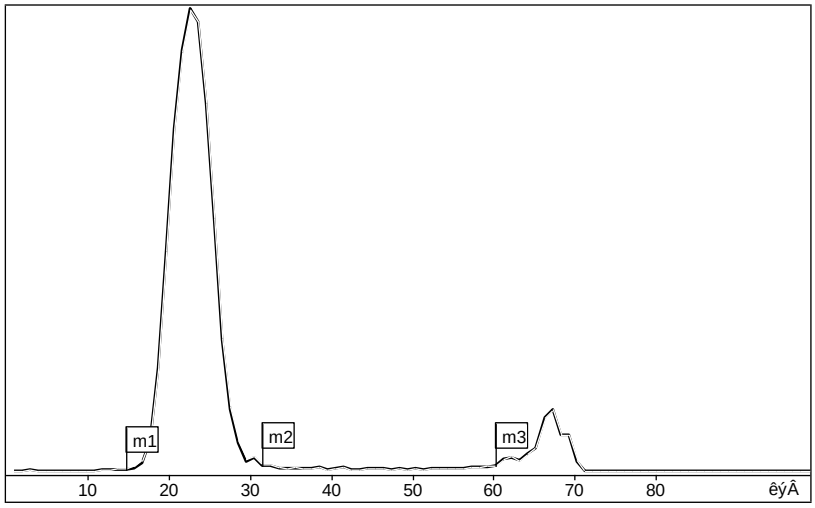


Рисунок 3.2 – Радиохроматограмма смеси [0,11 мг ДТПА$_{мод}$ + 0,14 мг $SnCl_2$ + ^{99m}Tc]

Исходя из представленной хроматограммы, следует, что содержание радиохимической примеси невосстановленного ^{99m}Tc(VII) в смеси составляет 2,75%, что является достаточным для эффективности наноколлоидного препарата, используемого в диагностических целях при радиоизотопных исследованиях. Однако предварительные испытания такой смеси на экспериментальных животных показали, что накопление препарата в лимфатических узлах практически не наблюдается, хотя коллоид имеет размеры частиц в требуемом диапазоне от 50 до 100 нм. Исходя из этого, было высказано предположение, что препарат перемещается по лимфатической системе с недостаточной скоростью. В этой связи была исследована возможность его «транспортирования» путем введения желатина (Ж) в состав радиофармпрепарата.

Желатин является полидисперсной смесью низкомолекулярных пептидов со следующими характеристиками:

- длина молекулы желатина – около 2750 Å;
- диаметр молекулы желатина – 15 Å;
- средний размер межмолекулярных пустот – 80-90 Å.

Данные характеристики позволяют сказать о том, что матричные системы на основе желатина характеризуются структурной организацией, обеспечивающей однородное распределение иммобилизированного вещества, а также хорошую стерическую доступность молекул. В нашем случае это препятствует образованию крупного коллоида олова с восстановленным ^{99m}Tc [220, 222]. Это, в свою очередь, обеспечивает хорошую стерическую доступностью молекул для осуществления различных химических процессов, а также их упорядочивания, препятствующего коагуляции в процессе «транспортирования» коллоида по лимфосистеме. Содержание желатина в концентрации 2,5-4 мг/мл достаточно для снижения количества крупного коллоида олова с ^{99m}Tc до приемлемого значения 20 %, как подтвердили и наши исследования.

Для проведения эксперимента к суспензии, содержащей 1 мг ДТПА$_{мод}$ в 2-ух мл 5%-го раствора натрия гидрокарбоната, 20 мкл раствора Sn (II)Cl_2

(концентрация 7 мг/мл по $SnCl_2 \cdot 2H_2O$) и 100 мкл водного раствора желатина с концентрацией 10 мг/мл, добавляли 2 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc.

После перемешивания смесь кипятили в течение 30 минут и охлаждали в ультразвуковой ванне до температуры 20-25^{0}С. Затем смесь последовательно фильтровали через фильтры с диаметрами пор 220, 100, 50 нм. Готовый препарат проверяли на содержание радиохимических примесей. Активность препарата измеряли до нагревания, после нагревания и после фильтрации.

Из полученных данных был сделан вывод, что введение в состав реакционной смеси желатина обеспечивает повышение выхода целевого наноколлоида ^{99m}Tc-ДТПА$_{мод}$ с размерами частиц 50 – 100 нм до 87-89 % при радиохимической чистоте продукта 92-95 %.

В результате проведенных экспериментов были определены условия формирования наноколлоидных форм, определен количественный состав реагентов для наработки опытных партий наноколлоидного препарата на основе ДТПА$_{мод}$, меченого технецием-99м.

В результате исследований был сформирован состав готового радиофармпрепарата (из расчета на 1 мл):

Активные вещества:

Технеций-99м	750-1000 МБк

Вспомогательные вещества:

Диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА $_{мод}$)	1,0 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,035 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	2,5 – 4,0 мг
Хлорид натрия (ФС 42-2572-95)	9,0 мг
Вода инъекционная (ФС 42-2620-97)	до 1 мл

Как показали радиометрические измерения, средний радиохимический выход наноколлоида с размером частиц ≤100 нм в готовом РФП после фильтрации составляет порядка 80%, что соответствует показателям зарубежных

аналогов. При этом содержание в нем радиохимической примеси невосстановленного ^{99m}Tc(VII) не превышает 2,8 %.

На рисунке 3.3 представлена лимфосцинтиграмма радиофармпрепарата, полученная после его подкожного введения экспериментальному животному (крысе линии Вистар).

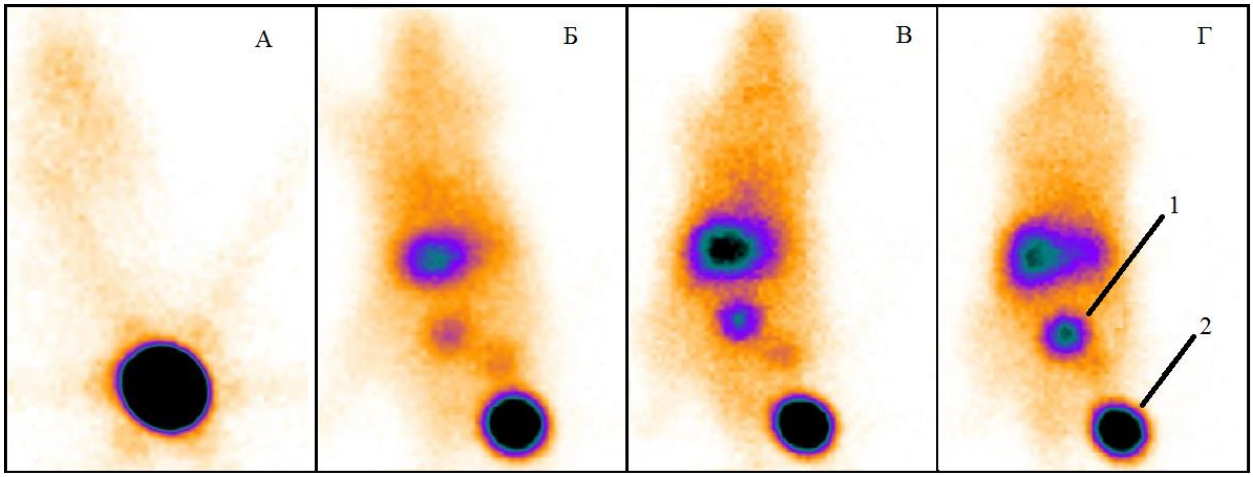


Рисунок 3.3 – Распределение препарата в организме крысы при введении смеси [ДТПА$_{мод}$+^{99m}Tc+Sn (II) + Ж]: А) в первый момент времени после введения; Б) через 30 минут после введения; В) через 60 минут после введения; Г) через 120 минут после введения.

1 – лимфатический узел; 2 –место введения препарата.

В соответствии с этими данными, накопление препарата в лимфоузле находится на уровне 1,5 %. В целом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что предлагаемый способ позволяет получать меченный технецием-99м наноколлоидный препарат на основе модифицированного ДТПА, пригодный для проведения гамма-сцинтиграфических исследований.

3.2 Получение наноколлоидных препаратов на основе Fe@C

По данным ПЭМ (просвечивающей электронной микроскопии) порошки магнитоуправляемых коллоидов, такие как Ni@C, Co@C, Fe@C и др., представляют собой частицы сферической или близкой к сферической формы с металлическим ядром и нанесенным на него углеродным слоем толщиной 1-2 нм. Поверхностные углеродные структуры имеют достаточно сложную конструкцию из чередующихся слоев карбидов металлов sp^3- и sp^2 гибридизованного углерода. При этом поверхностный слой представляет собой упорядоченные структуры sp^2 гибридизованного углерода графенового типа. Подобное строение наночастиц повышает их биологическую инертность. По предварительным оценкам, данные наночастицы можно отнести к малотоксичным веществам 4-го класса опасности, что существенно расширяет возможности для медицинского применения меченых коллоидов на их основе.

Нами были проведены исследования по получению меченых технецием-99м железо-углеродных частиц Fe@C, синтезированных в Институте физики металлов УрО РАН. Общий вид частицы приведен на фотографии (рисунок 3.4.)

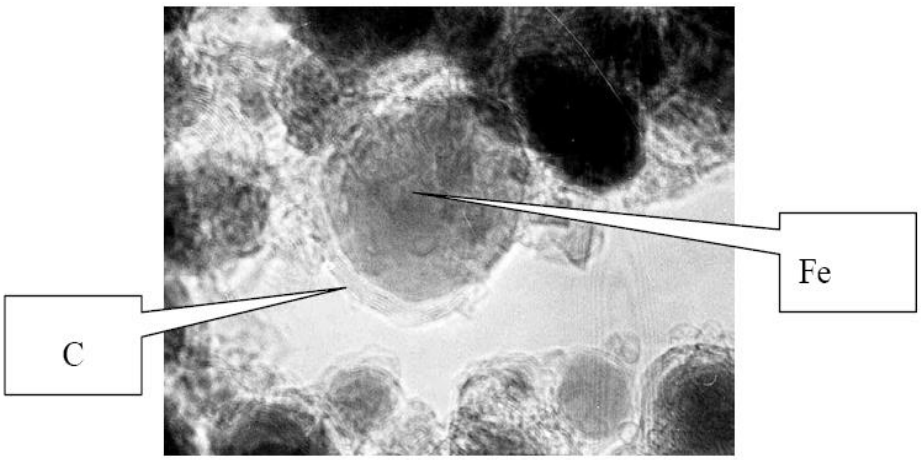


Рисунок 3.4 – Капсулированная в углерод наночастица железа

Для придания железо-углеродным частицам липофильных свойств и повышения их устойчивости в растворе в виде коллоида была разработана методика предварительного нанесения на поверхность этих частиц органических радикалов - арилдиазоний тозилатов АДТ [216], которые способны спонтанно реагировать с углеродсодержащими поверхностями с выделением азота и ковалентной пришивкой органического остатка (фрагментов бензилдиметиленаминоуксусной кислоты - IDA) к углеродной оболочке. Предполагалось, что последующее присоединение ^{99m}Tc к таким модифицированным частицам будет происходить не путем физической адсорбции радионуклида к углеродной поверхности, а путем образования его комплексов с пришитыми радикалами.

Эффективный метод синтеза АДТ с последующим их нанесением на углеродную поверхность частиц был разработан в Томском политехническом университете [79, 222-226]. Получаемые при этом продукты представляют собой бесцветные или слабо окрашенные кристаллические соединения с уникально высокой для диазониевых солей стабильностью. Они могут храниться в темноте при комнатной температуре на воздухе в течение, по крайней мере, нескольких месяцев без изменений.

Общая схема синтеза коллоида на основе наночастиц Fe@C, модифицированных арилдиазоний тозилатами с хелатсодержащей группой приведена на рисунке 3.5.

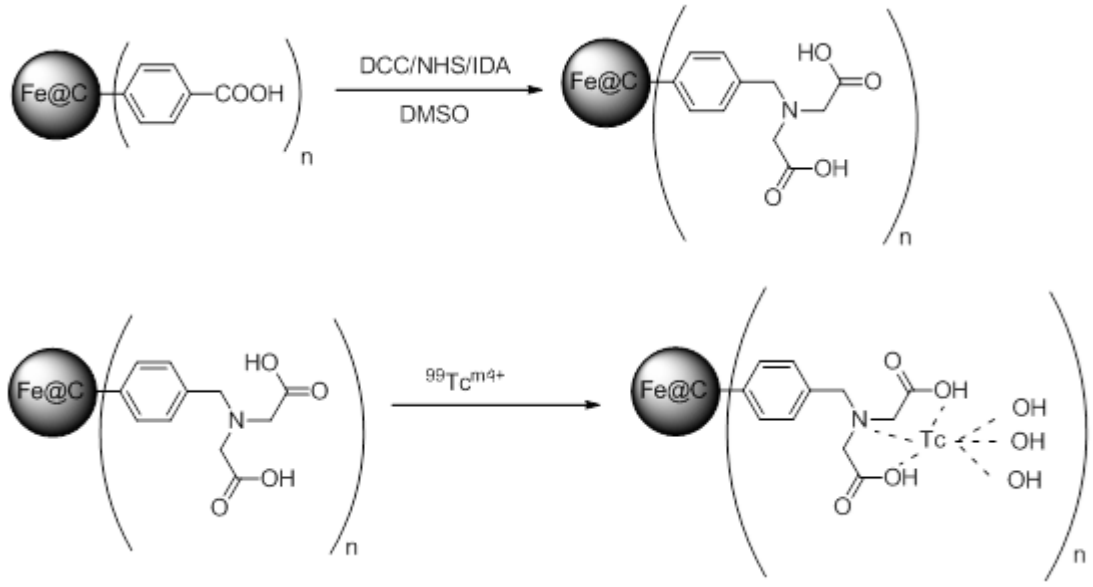


Рисунок 3.5 – Схема синтеза коллоида на основе наночастицы Fe@C, модифицированного арилдиазоний тозилатами с хелатсодержащей группой

Следует отметить, что разработанная методика синтеза носит общий характер для модификации поверхности частиц, покрытых углеродом, независимо от их металлического ядра (Ni, Co, Fe). Реакция протекает одинаково эффективно для всего ряда АДТ. При этом не обнаруживается влияния на ход процесса заместителей (-NO_2; -COOH; -NH_2). За счет этого метод позволяет прививать на поверхность частиц наиболее реакционноспособные амино- и карбокси группы, облегчающие проведение иммобилизации различных метящих агентов и, в том числе, восстановленных ионов $^{99m}Tc^{4+}$ или $^{99m}Tc^{5+}$.

Образующиеся в результате комплексы ^{99m}Tc с лигандами отличаются высокой устойчивостью, что позволяет их использовать в диагностике для целевой доставки радионуклида к определенным органам.

Как уже было отмечено выше, ^{99m}Tc, присутствующий в элюате из генератора имеет высшею степень окисления +7 и не проявляет комплексообразующих свойств. Поэтому для «связывания» ^{99m}Tc с органическими радикалами АДТ были предварительно испытаны такие восстанавливающие агенты, как формалин, муравьиная кислота и олово (II) в виде

дихлорида дигидрата ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$). Проверку восстанавливающих способностей формалина и муравьиной кислоты проводили путем их прямого введения в количестве по 10 мкл во флаконы, содержащие по 1 мл исходного элюата ^{99m}Tc. После перемешивания смесей и их инкубации в течение 5 мин из полученных растворов отбирали пробы для снятия радиохроматограмм. Одновременно в качестве образца сравнения отбирали пробу из исходного элюата. В качестве подвижных фаз использовались составы а), б) и в), приведенные в предыдущем разделе.

На основании проведенных исследований был сделан вывод, что восстановление ^{99m}Tc в этих средах происходит недостаточно эффективно. Поэтому в качестве восстановителя в дальнейшем, так же, как и в экспериментах с $ДТПА_{мод}$, использовали $SnCl_2 \cdot 2H_2O$. Экспериментально было установлено, что в заданном объеме РФП для полного восстановления ^{99m}Tc, концентрация Sn (II) должна быть около 0,0175 мг/мл [216, 217, 220].

Последующее нанесение метки ^{99m}Tc на поверхность модифицированных частиц Fe@C(АДТ) в присутствии олова (II) проводили по следующей методике. Во флаконе смешивали 2 мл водной суспензии Fe@C(АДТ) с 2 мл элюата. Затем вводили раствор Sn (II) из расчета 0,02 мг на 1 мл смеси. Кроме того, в качестве добавок с целью повышения радиохимической чистоты препарата использовали аскорбиновую кислоту (АК) - 0,25 мг/мл и пирофосфат натрия (ПФ) - 4,4 мг/мл. Затем полученные продукты отфильтровывали через фильтры с различным диаметром пор для определения радиохимического выхода меченных ^{99m}Tc фракций с размерами частиц 50, 100 и 220 нм. Величину выхода определяли путем сравнения активности полученных фильтратов с активностью исходной смеси. Параллельно проводили определение радиохимической чистоты препаратов путем снятия радиохроматограмм проб, отобранных из фильтратов. Результаты исследований для фракций с размерами 100 нм представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Изменение величины адсорбции ^{99m}Tc на модифицированном Fe@C(АДТ) в зависимости от состава реакционных смесей (фракция 100 нм)

п/п	Образец	РХЧ, %	Выход, %
1	Fe@C+^{99m}Tc+Sn(II)	55	25
2	Fe@C+^{99m}Tc+ПФ+АК+Sn(II)	91,7	31,1
3	Fe@C+^{99m}Tc+АК+Sn(II)	96,3	42,2

Из таблицы 3.2 следует, что наибольший радиохимический выход 42 % меченного технецием-99м коллоида Fe@C (АДТ) с размером частиц менее 100 нм наблюдается для смеси №3, содержащей аскорбиновую кислоту без пирофосфата. При этом РХЧ продукта составляет 96 %. Худшие показатели имеет смесь, не содержащая добавок аскорбиновой кислоты, препятствующей окислению Sn (II).

Для повышения радиохимического выхода, меченного технецием-99м продукта смесь № 3 в укупоренном флаконе нагревали на водяной бане при температуре 75ºС в течение 30 минут, затем ее охлаждали до комнатной температуры в ультразвуковой ванне. В результате, выход меченного ^{99m}Tc наноколлоида Fe@C (IDA) с размером частиц менее 100 нм был повышен до 94%. Хроматограмма полученного РФП представлена на рисунке 3.6 (в качестве подвижной фазы использовали ацетон), на котором видно, что радиохимическая чистота препарата достигает значения 95 %.

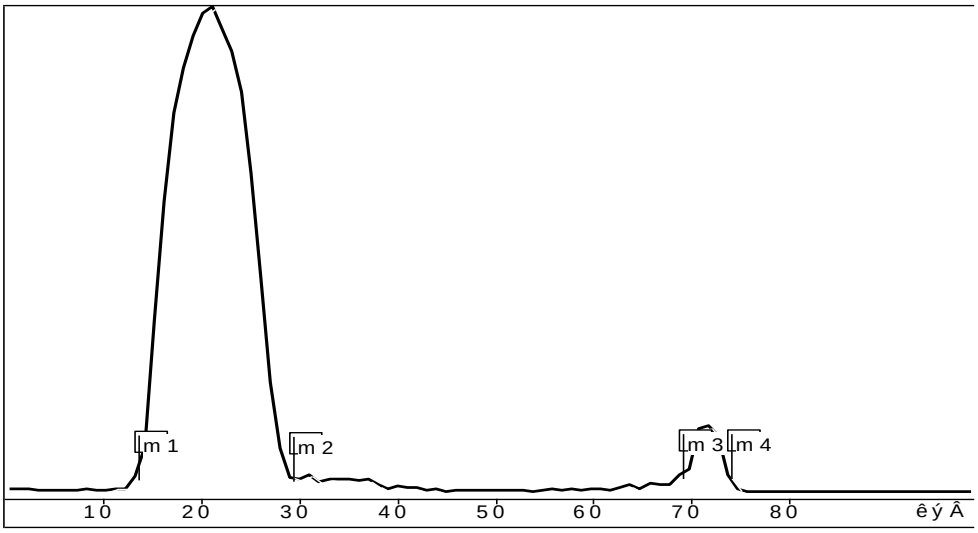


Рисунок 3.6 – Хроматограмма смеси [Fe@C+^{99m}Tc+АК+Sn(II)] после нагревания и фильтрации (фильтр 100нм)

Однако его предварительные испытания на экспериментальных животных показали, что накопление препарата в лимфатических узлах не наблюдается, хотя образующийся коллоид и имеет размеры частиц в требуемом диапазоне от 50 до 100 нм. В этой связи, в состав исходной смеси, также как и в случае с ДТПА$_{мод}$, был введен желатин (2,5 мг/мл). При последующих исследованиях такого препарата с измененным составом было установлено, что в нем выход меченного технецием-99м коллоида Fe@C (АДТ) с размером частиц менее 100 нм составляет 97 %, а РХЧ продукта находится на уровне 94 % в течение 4-6 часов.

Готовый препарат имеет следующий состав (из расчета на 1 мл):

Активные вещества:

Технеций-99м	750 – 1000 МБк

Вспомогательные вещества:

Модифицированные частицы Fe@C (АДТ)	1,0 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,03 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	2,5 – 4,0 мг
Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95)	0,20 – 0,25 мг
Хлорид натрия (ФС 42-2572-95)	9,0 мг
Вода инъекционная (ФС 42-2620-97)	до 1 мл

В целом предлагаемый состав и методика приготовления РФП позволяет получать меченный технецием-99м коллоидный препарат на основе частиц Fe@C(АДТ), пригодный для проведения гамма-сцинтиграфических исследований, о чем свидетельствует лимфосцинтиграмма (рисунок 3.7), полученная после введения радиофармпрепарата экспериментальному животному (крысе линии Вестар). На сцинтиграммах, полученных через 60 и 120 минут после инъекции, отчетливо видно сторожевой лимфоузел, а накопление препарата составило 1,72% от общей введенной активности, что является приемлемым для диагностики сторожевых лимфоузлов.

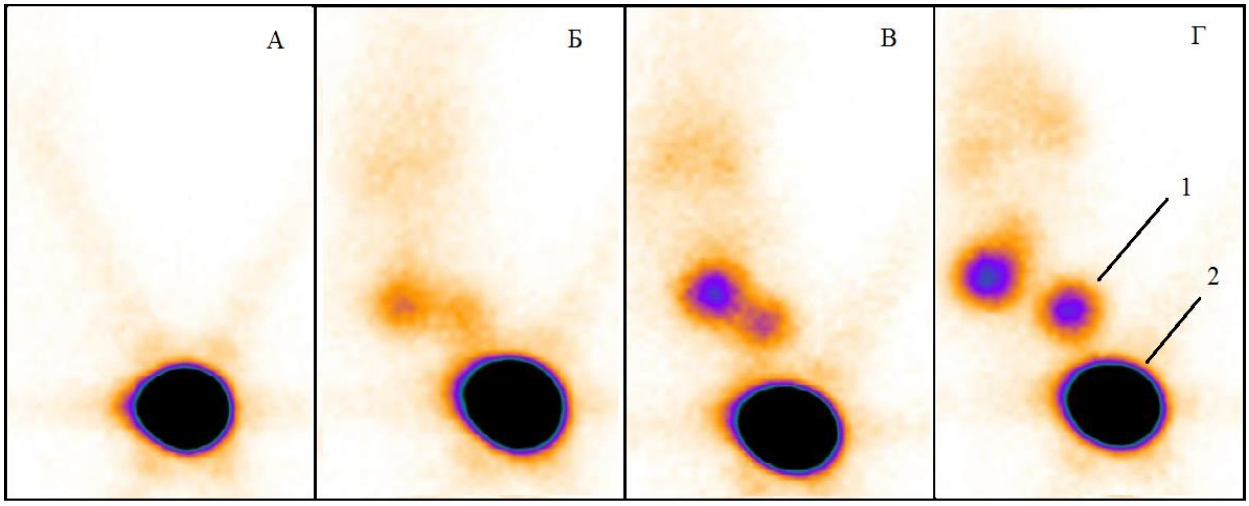


Рисунок 3.7 – Сцинтиграммы препарата в организме экспериментального животного (крысы) при введении смеси [Fe@C+^{99m}Tc+АК+Sn (II)+ Ж]: А) в первый момент времени после введения; Б) через 30 минут после введения; В) через 60 минут после введения; Г) через 120 минут после введения.
1 – лимфатический узел; 2 –место введения препарата.

3.3 Получение наноколлоидного радиофармпрепарата на основе наноразмерных порошков Al_2O_3

Исследования, проведенные на модифицированной субстанции $ДТПА_{мод}$ и частицах Fe@C(АДТ) показали, что уровень накопления синтезированных на их основе препаратов в СЛУ соответствует стандартным требованиям и находится в пределах 2 %. С целью повышения этого показания была предпринята попытка получения наноколлоидного препарата на основе оксида Al_2O_3, обладающего высокими адсорбционными характеристиками. В качестве объекта исследования нами использовался порошок низкотемпературной (кубической) модификации гамма-оксида алюминия, приготовленный из порошка гидроокиси алюминия $Al(OH)_3$ после прокаливания (см. раздел 2 п.2.2.4).

В существующих генераторных технологиях перед проведением адсорбции молибдена или других металлов на поверхности оксидов Al_2O_3 проводят их активацию путем кислотной обработки. Предполагается, что в результате этого на поверхности оксида образуются некоторые активные центры адсорбции. Поэтому, с целью достижения устойчивой связи ^{99m}Tc- Al_2O_3, нами предварительно было проведено детальное изучение влияния кислотной обработки на процесс адсорбции радионуклида [227-232].

3.3.1. Исследование адсорбционных характеристик Al_2O_3 к пертехнетат-ионам технеция-99м

При получении ^{99m}Tc из $^{99}Mo/^{99m}Tc$-генератора более 99% его атомов присутствует в 0,9%-ом растворе NaCl в виде пертехнетат-ионов $^{99m}TcO_4^-$ и имеют наивысшую степень окисления +7 [232, 233]. В этой связи на начальном этапе

изучали адсорбционные свойства оксида алюминия по отношению к технецию-99м.

Поскольку γ-оксид алюминия может частично содержать гидроксильные ионы и иметь неоднородную структуру, вплоть до образования ими заполненных монослоев, в его структуре содержатся также молекулы гидроокиси алюминия $Al(OH)_3$ и бёмита AlO(OH). Для гидроокиси, процесс ее взаимодействия с соляной кислотой имеет следующую последовательность реакций:

$$Al(OH)_3 + H^+ \leftrightarrow Al(OH)_2^+ + H_2O$$

$$Al(OH)_2^+ + H^+ \leftrightarrow Al(OH)^{2+} + H_2O$$

$$Al(OH)^{2+} + H^+ \leftrightarrow Al^{3+} + H_2O\,.$$

Итогом такого взаимодействия является образование активных ионов алюминия с зарядом +3. И напротив, в результате реакции бёмита с HCl возможно, кроме того, образование ионов AlO^+ с зарядом +1.

Так, в работе [233, 234] при изучении адсорбционных свойств молибдена на оксидах алюминия показано, что его максимальная сорбционная емкость достигается в области, когда практически полностью прекращается взаимодействие оксидов алюминия с кислотой при их кислотной обработке. При этом сорбционная емкость дочернего технеция-99м в этих условиях практически не наблюдается, и он легко десорбируется изотоническим раствором натрия хлорида. В связи с этим, нашей задачей было определить оптимальные условия кислотно-щелочной обработки оксидов алюминия (процесс закисления), которые бы обеспечивали прочную адсорбцию радионуклида технеция-99м.

Были проведены экспериментальные исследования на оксиде алюминия в нейтральной форме для колоночной хроматографии фирмы Merck с размерными характеристиками 0,063-0,200 мм. Для изучения влияния кислотной обработки оксида алюминия на его адсорбционные характеристики по ^{99m}Tc были испытаны оксиды алюминия, обработанные соляной кислотой следующими концентрациями: 0,1; 0,2 и $0{,}3\cdot10^{-4}$ ммоль/г, а также оксиды алюминия,

прошедшие обработку в области их предельного закисления: 0,4; 0,46 и $0{,}49 \cdot 10^{-4}$ ммоль/г [234-236].

Сорбционную емкость оксидов алюминия с различной кислотной обработкой проводили по методике, представленной в разделе 2.3.2 второй главы диссертации. Расчеты активности адсорбированного оксидами ^{99m}Tc - W (%) проводили с использованием уравнения:

$$W = \frac{A_{исх} - A_i}{A_{исх}} \cdot 100, \qquad (3.1)$$

где $A_э$ – активность исходного раствора ^{99m}Tc (эталона),

A_i – средняя активность водной фазы над оксидом после проведения адсорбции ^{99m}Tc.

Результаты измерений представлены в таблице 3.3. Полученная по этим данным зависимость изменения степени адсорбции ^{99m}Tc на оксиде алюминия от количества прореагировавшей с оксидом алюминия кислоты показана на рисунке 3.8.

Таблица 3.3 – Значения сорбционной емкости оксида алюминия по радиоизотопу ^{99m}Tc, при его обработке соляной кислотой.

Образец	Объемная активность ^{99m}Tc, МБк/мл	Степень адсорбции ^{99m}Tc на Al_2O_3 (W), %	Содержание поглощенной кислоты m_{HCL}, ммоль/г
Эталон	0,602	------	------
1	0,557	7,48	0
2	0,492	18,27	0,1
3	0,419	30,40	0,2
4	0,435	27,74	0,3
Эталон	0,656	------	------
4	0,545	16,92	0,4
5	0,591	9,91	0,46
6	0,614	6,40	0,49

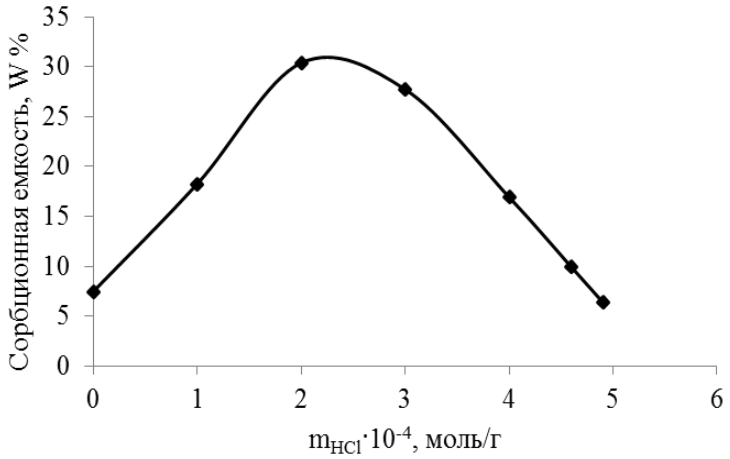


Рисунок 3.8 – Зависимость изменения степени адсорбции ^{99m}Tc на оксиде алюминия от массы поглощенной оксидом кислоты

Из представленных данных в таблице 3.3 и на рисунке 3.8 следует, что максимальная степень адсорбции ^{99m}Tc 30,4%, наблюдается при поглощении оксидом алюминия кислоты в количестве 0,2 ммоль/г (pH 2).

3.3.2. Коэффициент распределения ^{99m}Tc в системе HCl-Al_2O_3

Представленные в предыдущем подразделе экспериментальные данные по изучению степени адсорбции ^{99m}Tc на оксиде алюминия являются базовыми для последующей адсорбции радиоактивного изотопа ^{99m}Tc на оксид алюминия наноразмерной структуры с целью последующего приготовления наноколлоидного препарата.

Для избежания неблагоприятных последствий для пациентов при введении готового нанопрепарата внутривенно или подкожно необходимо, чтобы концентрация ионов алюминия в препарате была минимальной. Для этого необходимо было определить коэффициент распределения ^{99m}Tc в водной фазе и оксиде алюминия с целью определения оптимального соотношения концентрации ионов алюминия, а равно и массы оксида алюминия к объему элюата ^{99m}Tc при проведении адсорбции. Необходимо было также изучить влияние адсорбированной активности ^{99m}Tc на степень его поглощения оксидом алюминия.

Так же, как и в предыдущем подразделе, для проведения исследований использовался коммерческий оксид алюминия для колоночной хроматографии с размерами 63-200 мкм, обработанный соляной кислотой из расчета 0,2 ммоль/г, при котором наблюдается максимальная степень адсорбции ^{99m}Tc [239 - 241].

Для определения оптимального соотношения между массой Al_2O_3 и объемом элюата ^{99m}Tc использовали следующую методику. В подготовленные химические

стаканы вместимостью 50 мл были внесены навески наноразмерного Al_2O_3 с массами m_{ox} от 1 до 5 г, а затем к ним добавляли элюат ^{99m}Tc по 5 мл (V) с известной активностью технеция-99м ($A_{исх}$). После интенсивного перемешивания и отстаивания смесей из раствора над оксидом алюминия отбирали пробы элюата и измеряли их активности (A_i) по технецию-99м.

Данные об активностях проб и соответственно рассчитанная по уравнению: W= $(A_{исх}-A_i)/A_{исх}$ с учетом поправки на время распада ^{99m}Tc, степень адсорбции технеция-99м представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Таблица данных по экспериментальному определению степени адсорбции ^{99m}Tc и коэффициента распределения K_p.

№ п/п	m_{ox}, г	A_i, МБк/мл	$(A_{исх}-A_i)/A_{исх}$	V/m_{ox}, мл/г	K_p
1	1,01	1,60	0,091	4,94	0,494
2	2,03	1,55	0,119	2,47	0,335
3	3,01	1,50	0,148	1,66	0,288
4	4,01	1,42	0,193	1,25	0,299
5	5,02	1,33	0,244	1,00	0,323
Исх	-	1,77			

Исходя из данных, представленных в таблице 3.4, были определены зависимости изменения степени поглощения ^{99m}Tc оксидом алюминия W от массы Al_2O_3 (m_{ox}) (рисунок 3.9) и величины отношения V/m_{ox} (рисунок 3.10), а также зависимость изменения поглощенной оксидом алюминия активности ^{99m}Tc от массы оксида (рисунок 3.11). Для расчета величины коэффициента K_p, который характеризует распределение радионуклида в твердой и жидкой фазах, использовали соотношение [230]:

$$K_P = \frac{A_{ис} - A_i}{A_i} \cdot \frac{V}{m_{OX}} \qquad (3.2)$$

Из данных таблицы 3.4 можно сделать вывод, что величина степени адсорбции ^{99m}Tc в рассмотренных условиях не превышает 25% даже при соотношении V/m_{ox} =1. При этом коэффициент распределения находится в пределах 0,3–0,5, что недостаточно для приготовления РФП ввиду недостаточно прочного связывания изотопа и сорбента.

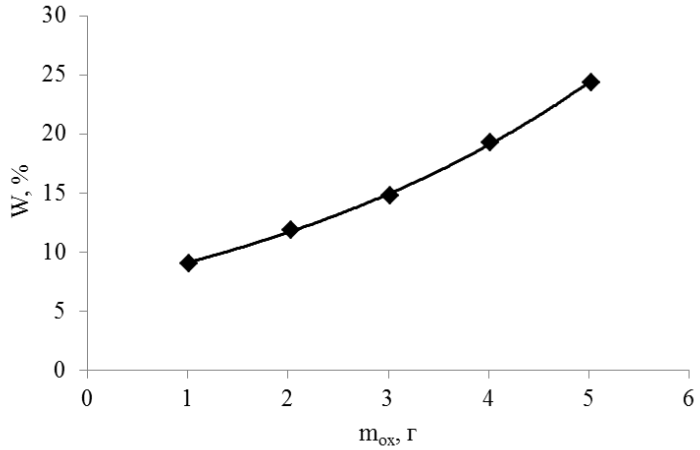


Рисунок 3.9 – Изменение степени адсорбции оксида алюминия по ^{99m}Tc в зависимости от массы Al_2O_3

Из зависимости, представленной на рисунке 3.9 следует, что степень адсорбции ^{99m}Tc из одного и того же объема раствора возрастает непропорционально увеличению массы Al_2O_3 и описывается уравнением:

$$W = 0,0713 \cdot e^{0,247 \cdot m_{Ox}} \quad (3.3)$$

Проведенные по этому уравнению расчеты показывают, что максимальная степень адморбции 100% будет достигаться при массе оксида 10,69 г, т.е. при соотношении V/m_{ox} = 0,47. Или другими словами, в том случае, если масса Al_2O_3 будет превышать объем препарата ^{99m}Tc в 2,13 раза, что при разработке экспрессных методов получения радиофармпрепарата в условиях радиоизотопной лаборатории медицинского учреждения трудно реализовать (рисунок 3.10).

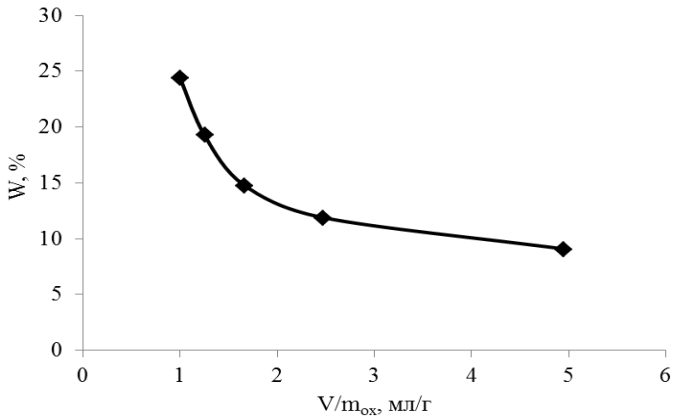


Рисунок 3.10 – Изменение степени адсорбции ^{99m}Tc на оксиде алюминия в зависимости от соотношения V/m_{ox}

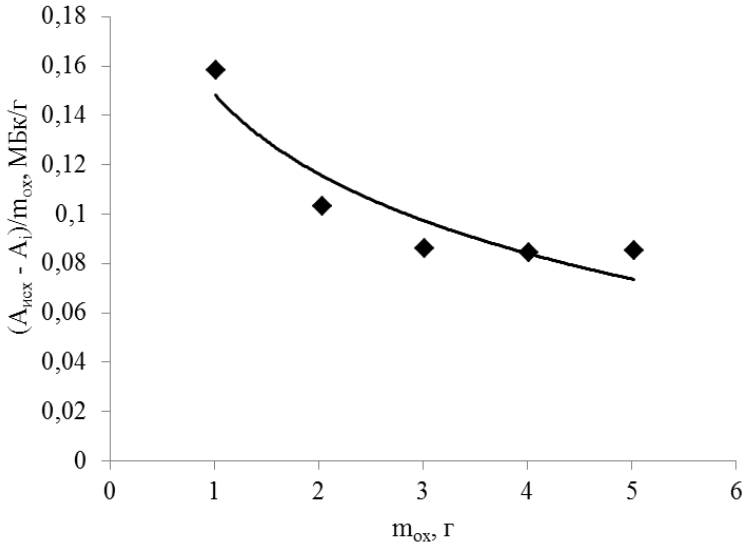


Рисунок 3.11 – Изменение соотношения активности ^{99m}Tc на массу сорбента в зависимости от массы Al_2O_3

Было отмечено, что удельная активность адсорбата, содержащего ^{99m}Tc, с увеличением массы Al_2O_3 уменьшается и, наоборот, возрастает в случае снижения массы. Данная тенденция следует из зависимости, представленной на рисунке 3.11. Этот вывод представляет практический интерес, так как общая концентрация коллоидной формы в готовом радиофармпрепарате должна быть по возможности минимальной. В связи с этим необходимо провести исследования по определнию зависимости степени адсорбции ^{99m}Tc от его активности.

3.3.3 Изучение влияния активности ^{99m}Tc на величину степени его адсорбции

Для формирования радиофармпрепарата, содержащего некоторую активность радиоизотопа, необходимо руководствоваться тем, что активность в РФП должна быть минимально необходима для эффективной визуализации конкретного органа, но в то же время она должна быть оптимальной для качественной связки всех компонентов в РФП. В нашем случае она должна быть оптимальной для устойчивой адсорбции технеция-99м на оксиде алюминия.

С целью изучения влияния активности ^{99m}Tc на величину степени его адсорбции в 5 подготовленных химических стаканов вместимостью 50 мл вносили навески по 1 г Al_2O_3, а затем приливали по 5 мл элюата, содержащего ^{99m}Tc, но с разной объемной активностью ($A_{исх}$). Адсорбцию проводили путем интенсивного перемешивания элюата и порошка оксида алюминия. По окончании адсорбции смесь отстаивют и отбирают пробы элюата над оксидом алюминия (A_i). Результаты измерений активности технеция-99м до и после адсорбции, приведенные к одному времени, представлены в таблице 3.5. На основании полученных данных были проведены расчеты степени адсорбции ^{99m}Tc на оксиде алюминия $(A_{исх}-A_i)/A_{исх}m_{ox}$ и его удельной адсорбции $(A_{исх}-A_i)/m_{ox}$ и получены кривые зависимостей этих параметров от начальной активности технеция-99м $A_{исх}$. Полученные данные в виде кривых представлены на рисунках 3.12 и 3.13, из которых видно, что величина удельной адсорбции технеция-99м $(A_{исх}-A_i)/m_{ox}$ возрастает (рисунок 3.12) пропорционально увеличению его активности в растворе без насыщения в пределах изменения объемной активности технеция-99м от 40 до 112 кБк/мл. При этом степень поглощения ^{99m}Tc оксидом $(A_{исх}-A_i)/A_{исх}m_{ox}$ не зависит от его исходной активности (рисунок 3.13) и составляет в среднем 8,6% для соотношения V/m_{ox}=5 при среднем значении коэффициента распределения K_p =0,471.

Таблица 3.5 - Степень адсорбции ^{99m}Тс на оксиде алюминия

№п/п	m_{ox}, г	$A_{исх}$, МБк/мл	A_i, МБк/мл	$(A_{исх}-A_i)/m_{ox}$, МБк/г	$(A_{исх}-A_i)/A_{исх}m_{ox}$, г$^{-1}$	K_p
1	1,0189	0,387	0,354	0,033	0,0852	0,466
2	1,0025	0,581	0,530	0,050	0,0866	0,474
3	1,0088	0,774	0,707	0,067	0,0860	0,471
4	1,0021	0,968	0,883	0,085	0,0880	0,483
5	1,0009	1,162	1,061	0,101	0,0867	0,475

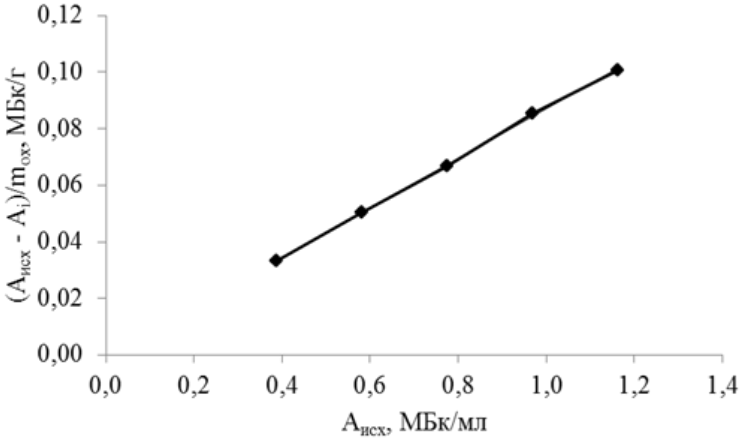


Рисунок 3.12 – Изменение адсорбционной емкости оксида алюминия по ^{99m}Тс в зависимости от активности РФП

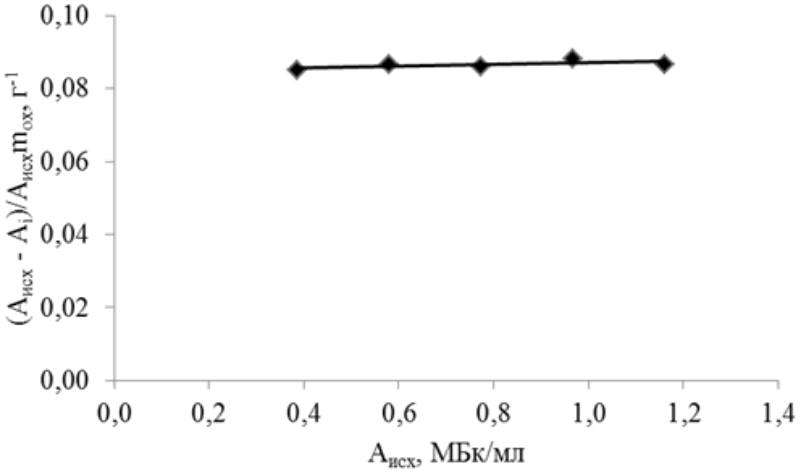


Рисунок 3.13 – Изменение степени адсорбции ^{99m}Тс на оксиде алюминия в зависимости от его общей активности

Как показали исследования общая активность технеция-99м практически не оказывает влияния на величину адсорбции технеция-99м на оксиде алюминия, а значит может быть получен РФП с любой максимально необходиой активностью. Полученные результаты должны обеспечить возможность получения высокоактивного наноразмерного коллоида, а также целевого радиофармпрепарата с заданной активностью.

Также полученные результаты показали, что ^{99m}Tc, содержащийся в элюате в высшей степени окисления +7, обладает низкой сорбционной способностью. Это повлечет за собой получение некачественного РФП, в котором будет присутствовать до 70% «несвязанного» радионуклида в виде свободных пертехнетат ионов TcO_4^-, который будет оказывать дополнительную радиационную нагрузку на организм и ухудшать эффективность сцинтиграфических исследований. В связи с этим поставлена задача проведения исследований по изучению адсорбционных характеристик восстановленного ^{99m}Tc в степени окисления +4, который является хорошим комплексообразователем. Дополнительным аргументом для исследования адсорбции восстановленной формы являются практические наблюдения, сделанные в работе [241], которые свидетельствуют, что при хроматографической очистке ^{99m}Tc от следовых количеств ^{99}Mo на колонке с оксидом алюминия иногда наблюдается его практически полное (более 95 %) поглощение оксидом.

3.3.4 Проведение процесса адсорбции восстановленного технеция-99м на наноразмерном порошке оксида алюминия

В проведенных ранее экспериментах было установлено, что для восстановления ^{99m}Tc с целью достижения его максимальной адсорбции, требуемое содержание олова (II) в реакционной смеси должно находиться в пределах от 0,0175 до 0,020 мг/мл [72,196,221,223, 242].

Как показала практика, в рассматриваемом случае, также, как и при синтезе приведенных выше коллоидов, очередность введения реагентов оказывает большое влияние на процедуру мечения. При проведении экспериментов было выявлено, что при добавлении к суспензии оксида алюминия элюата с предварительно восстановленным ^{99m}Tc(VII) (введенная в РФП концентрация олова (II) составляла C_{Sn}=0,02 мг/мл) практически весь ^{99m}Tc успевает прореагировать с оловом и войти в соединение крупноразмерного комплекса еще до смешивания с оксидом алюминия.

Изменили схему мечения следующим образом. Во флакон с 2 мл водной суспензии алюминия (pH=4,2) вводили 2 мл элюата ^{99m}Tc. После интенсивного перемешивания к смеси добавляли $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ из расчета 0,02 мг/мл. За тем укупоренный флакон нагревали на водяной бане (70-80 ºС) в течение 30 мин. После охлаждения в ультразвуковой ванне до комнатной температуры, смесь отфильтровали последовательно на фильтрах 220, 100 и 50 нм. Из фильтратов и исходной смеси производили отбор проб для проведения радиометрических измерений и хроматографирования. Результаты измерений, приведенные к одному времени, представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 - Результаты определения РХЧ и величин выхода фракций коллоидов с различными размерами

Образец	Активность проб, имп	Активность ^{99m}Tc(VII), имп	РХЧ, %	Выход, %
Al_2O_3+^{99m}Tc+Sn(II) [2мл +2мл+15мкл] до фильтрации	549 963	54996	90,0	-
Фильтрат 220	484 907	72736	85,0	82,1
Фильтрат 100	355 591	28447	92,0	62,1
Фильтрат 50	62 917	33975	54,0	5,9

Из результатов таблицы 3.6 следует, что при восстановлении ^{99m}Tc

оловом (II) в присутствии оксида Al_2O_3 наблюдается «конкурентное» перераспределение радионуклида между оксидом и комплексом олова, что, в конечном итоге, приводит к повышению выхода целевого коллоида ^{99m}Tc -Al_2O_3.

В целом, радиохимическая чистота исходной смеси после проведения синтеза составляет 90 %. В продукте, полученном после фильтрации через фильтр 220 нм, РХЧ уменьшается до 85 %. В фильтрате 100 нм РХЧ увеличивается до 92 %. При этом радиохимический выход суспензии, прошедшей через фильтры 220 нм и 100 нм составляет 82 % и 62 % соответственно. Следует обратить особое внимание на то, что количество меченого коллоида в фильтрате прошедшего через фильтр 50 нм составляет всего 5,9 %. Этот факт говорит о том, что при выбранной схеме синтеза в достаточном количестве образуется целевой коллоид ^{99m}Tc-Al_2O_3 с размером частиц в пределах от 50 до 100 нм.

С целью повышения выхода целевого коллоида была предпринята попытка увеличения температуры инкубации реагента с 70 - 80 ºС до 100 ºС. Проведенные эксперименты показали, что при увеличении температуры инкубации происходит существенное укрупнение коллоида. Так в фильтратах 220 и 100 нм содержание наноколлоида $^{99m}Tc(IV)$-Al_2O_3 соответственно составляло 6 и 3 %, что на порядок ниже результатов, представленных в таблице 3.6.

Стабильность синтезируемого препарата характеризуется устойчивой связью радиоактивной метки ^{99m}Tc с поверхностью гамма-оксида Al_2O_3 и является важным показателем качества. Такая устойчивая хемосорбция достигается, главным образом, за счет присутствия в реакционной смеси ионов $^{99m}Tc(IV)$, обладающих комплексообразующими свойствами. Для их стабилизации на 1 мл реакционной смесь дополнительно вводили 0,25 мг аскорбиновой кислоты (100 мкл раствора с концентрацией 10 мг/мл). Укупоренные флаконы выдерживали на водяной бане при 70-80 ºС в течении 30 мин.

В результате этих экспериментальных исследований было установлено, что в присутствии аскорбиновой кислоты (АК) радиохимическая чистота фракции 100 нм повышается до 96 %, (рисунок 3.14).

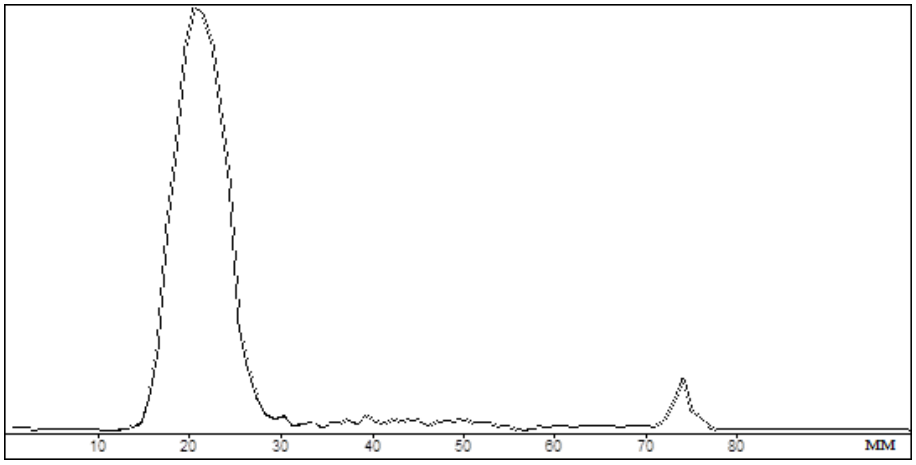


Рисунок 3.14 – Хроматограмма фильтрата (100 нм):
[суспензия Al_2O_3+ РФП + АК + Sn (II)]

Для примера, РХЧ аналогичных зарубежных коммерческих препаратов ^{99m}Tc, изготавливаемых на основе лиофилизатов обычно находится в пределах от 88,2 % (Пентатех, ^{99m}Tc) до 95 % (Технефит, ^{99m}Tc).

Предварительные медико-биологические испытания стабильности и функциональной пригодности препарата, содержащего аскорбиновую кислоту, были проведены на экспериментальных животных (крысах линии Вистар). Лимфосцинтиграммы представлены на рисунке 3.15.

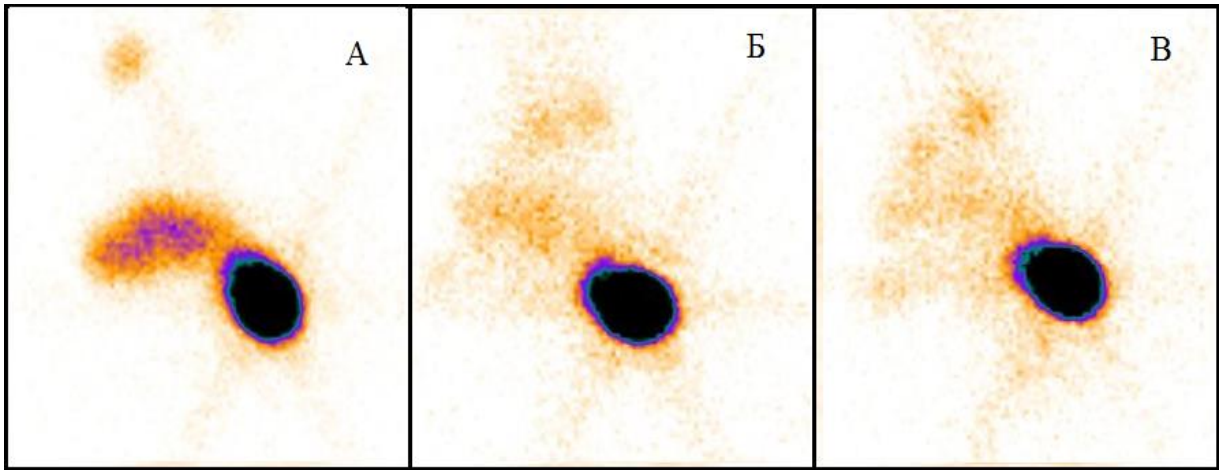


Рисунок 3.15 – Распределение препарата в организме крысы при введении суспензии: [Al_2O_3+^{99m}Tc +АК +0,02 мг/мл Sn (II)]: А) Сразу после введения препарата; Б) Через 30 минут после введения; В) Через 60 минут после введения

Из представленных сцинтиграмм следует, что РФП находится в месте введения в течение 60 мин. При этом накопления ^{99m}Tc в крови животных не наблюдается. Это доказывает хорошую фиксацию ^{99m}Tc на поверхности коллоида. Однако, так же не наблюдается миграции препарата по лимфатической системе. В этой связи, так же как и в экспериментах с коллоидами на основе ДТПА$_{мод}$ и частиц Fe@C(АДТ), для увеличения «подвижности» меченых частиц оксида Al_2O_3 и повышения скорость их перемещения по лимфасистеме в состав реакционной смеси был введен желатин.

Для приготовления препарата использовалась следующая методика. Во флакон с 2 мл суспензии оксида алюминия прилили 2 мл элюата ^{99m}Tc, добавили 0,25 мг аскорбиновой кислоты (из расчета на 1 мл смеси) и 0,0175 мг Sn(II). Перемешали и ввели 100 мкл желатина (методика приготовления раствора желатина в разделе 2.2.2).

Полученную смесь нагревали на водяной бане (70-80°C) 30 мин. Охлаждали в ультразвуковой ванне и проводили ее фильтрацию через фильтры с диаметром пор 220, 100 и 50 нм с последующим отбором проб для хроматографических исследований и радиометрических измерений. Результаты данного синтеза представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 - Выход фракций наноколлоида и их РХЧ в присутствии желатина

Состав смеси	Активность, МБк/мл	Содерж. ^{99m}Tc(VII), %	РХЧ %	Выход %
Al_2O_3+^{99m}Tc+АК+Sn(II)+ Желатин (исходный)	76,71	22	78	
После нагревания	76,71	7	93	
Фильтрат 220 нм	61,95	9	95	77
Фильтрат 100 нм	57,61	7		76

Из результатов, представленных в таблице 3.7, видно, что количество частиц с размером ≤100 нм увеличивается 76 % с присутствием в реакционной смеси желатина, по сравнению с другими условиями приготовления препарата.

Размеры частиц этой реакционной смеси было изучены на анализаторе частиц Nanophox. Провели трехкратное измерение препарата, по результатам которого была построена зависимость изменения плотности распределения частиц от их размера (рисунок 3.16.)

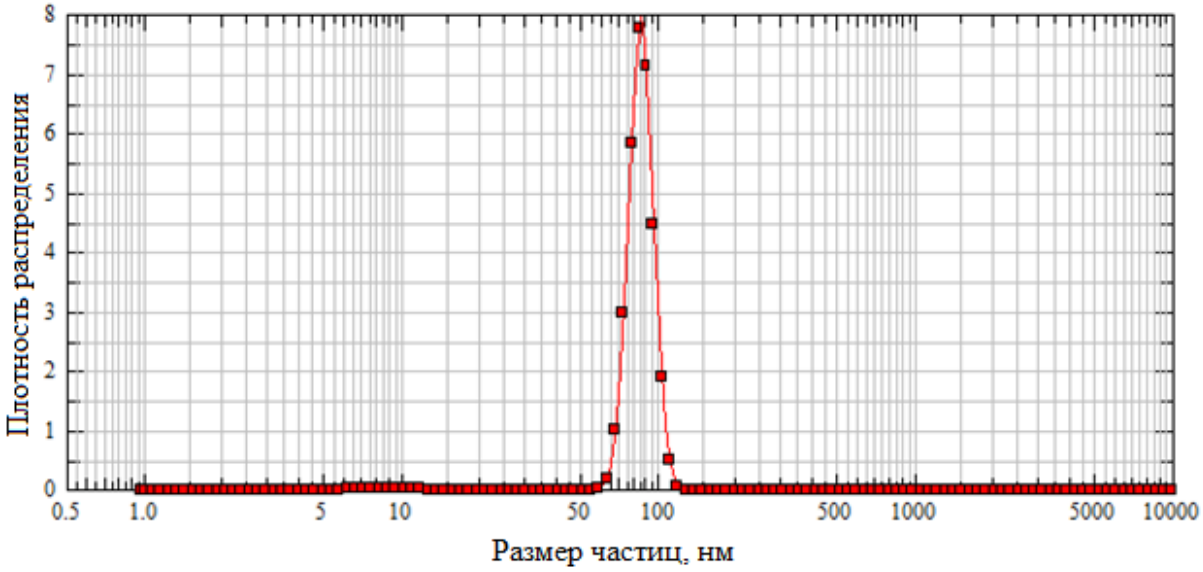


Рисунок 3.16 – График мзменения плотности распределения частиц от их размера

В результате этих измерений был подтвержден средний размер (диаметр) частиц, который составляет 84 нм.

Полученные результаты определения радиохимического выхода меченого коллоида с нужными размерами и радиохимической чистотой в присутствии желатина создают реальные перспективы для получения положительного результата в эксперименте на животных. Испытания на крысах были проведены описанным выше методом (рисунок 3.17.)

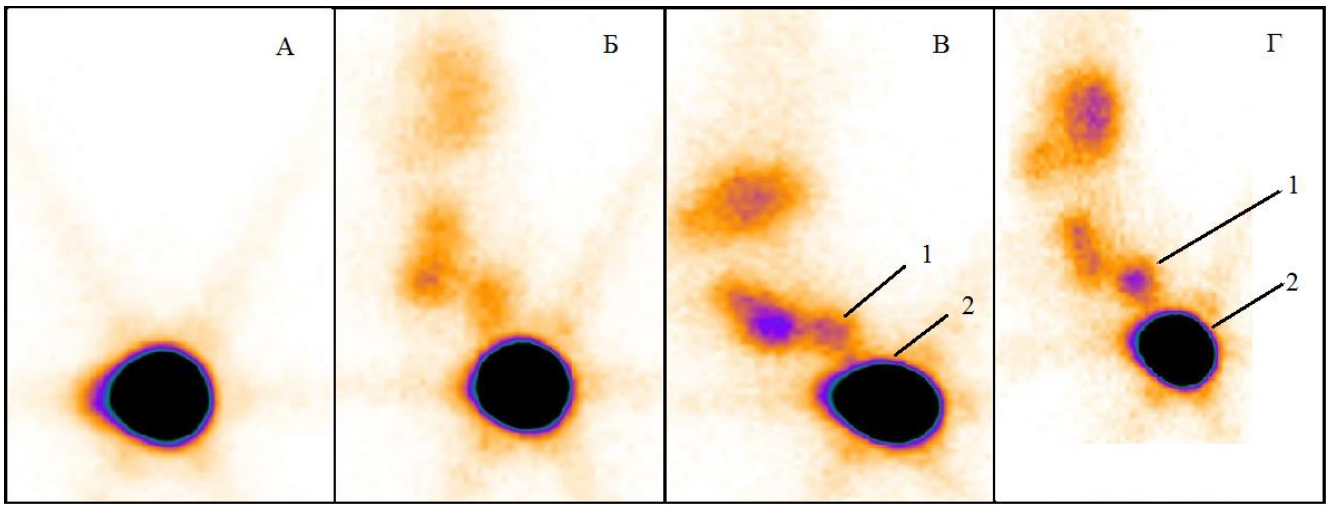


Рисунок 3.17 - Лимфосцинтиграмма экспериментального животного (крысы) при введении суспензии [Al_2O_3+^{99m}Tc +АК+ Ж +0,0175 мг/мл Sn (II)]: А) Сразу после введения препарата; Б) Через 30 минут после введения; В) Через 60 минут после введения; Г) Через 120 минут. Цифрами обозначено:

1 – Лимфатический узел; 2 – Место введения препарата

На сцинтиграммах, соответствующих временным интервалам с момента введения РФП 60 и 120 мин, хорошо видно сторожевой лимфатический узел 1. Аккумуляция РФП в лимфоузле составляет 8,6 % от введенной активности. Полученный результат существенно превосходит стандартные требования к подобным препаратам (0,5 - 1,7 %) и доказывает эффективность использования данного РФП.

Все синтезированные выше наноколлоидные препараты обеспечивают хороший уровень накопления в сторожевых лимфатических узлах. Вместе с тем, производство коллоидных суспензий на основе органических матриц ДТПА$_{мод}$ и модифицированных жклезо-углеродных частиц Fe@C(АДТ) представляет собой достаточно сложный технологический процесс. Достаточно сложной является и технология приготовления на их основе стандартных наборов в виде лиофилизатов к генератору технеция-99м. В этом смысле, более простым и удобным является наноколлоидный препарат, получаемый в результате одностадийного процесса адсорбции восстановленного ^{99m}Tc на порошках гамма-оксида алюминия. Исходя из этого, далее в диссертационной работе приводятся результаты исследований по созданию стандартного набора реагентов в виде

лиофилизата для получения РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» непосредственно в медицинских лабораториях, а также по стандартизации методик изготовления и проведения контроля качества этого лимфотропного радиофармпрепарата с последующим изучением его поведения в организме экспериментальных животных.

3.4 Разработка методики изготовления лиофилизированного набора реагентов для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Как известно, большинство диагностических препаратов на основе ^{99m}Tc получают непосредственно в клинических условиях путем смешивания раствора пертехнетата натрия,^{99m}Tc из генератора с лиофилизированными реагентами [243-252]. Лиофилизаты содержат в своем составе восстановитель – олово (II) хлорид дигидрат, который быстро теряет свои свойства в обычных условиях. При сублимационной сушке восстановитель сохраняет свои свойства на протяжении года (регламентированный срок годности лиофилизатов).

Сублимационная сушка представляет собой удаление влаги из замороженного материала путем возгонки (сублимации) льда, который превращается в пар, минуя жидкую фазу. Огромным преимуществом этого способа сушки является то, что влага удаляется при низких температурах и, следовательно, сушка протекает в мягких для исходного материала условиях.

Процесс лиофилизации разделяется на три основные фазы:

– замораживание,

– сублимация льда (основная сушка),

– удаление связанной влаги при температуре выше 0 °С (досушивание).

На первой стадии получения лиофилизатов исследуемого коллоида Al_2O_3 необходимо было убедиться, что в суспензиях, приготовленных на основе таких

лиофилизатов, присутствует наноколлоид с требуемым размером частиц. Также требовалось оценить влияние условий проведения сублимационной сушки на выход коллоидных частиц с заданными размерами.

Экспериментальные исследования проводились по следующей программе. В три флакона (№№ 1, 2 и 3) были введены по 1 мл суспензии, приготовленной по п. 2.2.6, 100 мкл раствора аскорбиновой кислоты и 100 мкл 10 % раствора желатина. После перемешивания во флакон добавили 10 мкл раствора Sn (II).

Эксперимент 1:

Флакон №1 поместили предварительно в морозильную камеру и выдержали при Т= - 20 ºС в течение 2 суток. Затем перевели в холодильную камеру лиофилизатора, выведенную на рабочий режим - 50 ºС. Параметры лиофилизации: Т = - 50 ºС, вакуум - 0,0015 Торр. Продолжительность лиофилизации - 20,5 ч. После флакон переместили в верхнюю лиофильную камеру. Провели досушивание в течение 5,5 ч.

Эксперимент 2:

Флакон № 2 без предварительного замораживания смеси поместили в холодильную камеру лиофилизатора с заданными параметрами: Т = - 50 ºС, вакуум - 0,0015 Торр и провели сушку в течение 20,5 ч. Провели досушивание в верхней лиофильной камере - 5,5 ч.

Эксперимент 3:

Флакон № 3 поместили в стакан с жидким азотом. После замораживания перенесли в холодильную камеру лиофилизатора, выведенную на рабочий режим -50 ºС. Провели лиофилизацию при заданных параметрах: Т = - 50 ºС, вакуум - 0,0015 Торр и провели сушку в течение 20,5 ч. Провели досушивание в верхней лиофильной камере - 5,5 ч..

После в подготовленные флаконы с лиофилизатами ввели по 2 мл элюата ^{99m}Tc с активностью 1,5 ГБк. Полученные смеси после интенсивного перемешивания нагрели на водяной бане (70 - 80 ºС) в течение 30 мин с последующим охлаждением в ультразвуковой ванне до комнатной температуры. Предварительно из исходных смесей до и после их нагревания провели отбор

проб для хроматографирования. Затем полученные препараты последовательно отфильтровали через фильтры 220, 100 нм с измерением активности фильтратов.

Обобщенные результаты экспериментов сведены в таблицу 3.8.

Таблица 3.8 - Результаты исследования лиофилизированных суспензий на основе нанопорошка гамма-оксида Al_2O_3

Образец	Радиохимическая чистота, %	Выход фракций, %
№1	91	-
Фильтрат 220 нм	96	10
Фильтрат 100 нм	99	87
№2	93	-
Фильтрат 220 нм	97	11
Фильтрат 100 нм	99	90
№3	98	-
Фильтрат 220 нм	98	10
Фильтрат 100 нм	98	79

Из представленной таблицы можно сделать общий вывод, что процесс лиофилизации приводит к повышению радиохимической чистоты как исходных смесей, так и фильтратов. Вместе с тем, наблюдается частичное укрупнение частиц за счет возможной их коагуляция при высушивании. Следствием этого является снижение радиохимического выхода меченного технецием-99м наноколлоида с заданным размером в фильтратах 100 нм.

Лучший результат при минимальных временных затратах получается в условиях приготовления образца №2 без предварительного замораживания исходной смеси реагентов.

С учетом проведенных исследований была разработана хорошо воспроизводимая методика приготовления лиофилизированного реагента для получение меченного ^{99m}Tc наноколлоида на основе оксида алюминия в виде стандартного набора к генератору технеция-99м.

Для последующего приготовления на его основе радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» во флакон с лиофилизатом шприцем вводят 4,0 мл

элюата натрия пертехнетата,^{99m}Tc путем прокола иглой резиновой пробки. Содержимое флакона перемешивают встряхиванием и инкубируют 30 минут при температуре 70 - 80ºС. Охлаждают до комнатной температуры. Объем- 4 мл

Готовый препарат имеет следующий состав (из расчета на 1 мл):

Активные вещества:

Технеций-99м, адсорбированный на оксиде алюминия 280 – 500 МБк

Вспомогательные вещества:

Алюминия оксид (ТУ 2164-003-03069303-2014)	0,025 – 0,035 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,0175 мг
Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95)	0,20 – 0,25 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	2,0– 2,5 мг
Натрия хлорид (ФС 42-2572-95)	9,0 мг
Вода для инъекций (ФС 42-2620-97)	до 1 мл

Исследование функциональной пригодности (эффективности) лиофилизированного реагента для получения радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» при оценке сцинтиграфического выявления «сторожевых» лимфатических узлов проводилось в сравнительном изучении с известным импортным аналогом РФП «^{99m}Tc-Nanocis» (Франция).

Инъекцию РФП в дозе 18 – 20 МБк выполняли между первым и вторым пальцами передней лапы крысы (рисунок 3.18). Перед подкожным введением и в ходе интраоперационного исследования животных наркотизировали с помощью эфира.

Рисунок 3.18 - Инъекция РФП « Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» между первым и вторым пальцами передней лапы крысы

Изучение функциональной пригодности РФП для сцинтиграфического выявления СЛУ показало, что оба РФП активно поступают из места инъекции в лимфатическую систему и накапливаются в паховом лимфоузле. Через 1 час после введения среднее накопление РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» в нем составила 8,6%, накопление РФП «^{99m}Tc-Nanocis» оказалось значимо ниже - 1,8%. Ко второму часу исследования среднее накопления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в лимфатическом узле превысило 10 % и через сутки постепенно увеличилось до 12,8 %. Накопление РФП «^{99m}Tc-Nanocis» через 2 часа достигло 3,6% и незначительно колебалось на этом уровне до 24 часов наблюдения. Следует отметить, что на всех сроках средняя аккумуляция ^{99m}Tc - Al_2O_3 в лимфатическом узле было статистически значимо выше накопления «^{99m}Tc-Nanocis» (рисунок 3.19) [252].

Согласно данным, полученным на экспериментальных животных начинать регистрацию сцинтиграфического изображения надо через 1–3 часа после подкожного введения РФП, когда аккумуляция препарата в лимфоузле составляет

8,4 – 12,6 % от введенной дозы. Результаты измерений представлены на рисунке 3.19 и в таблице 3.9.

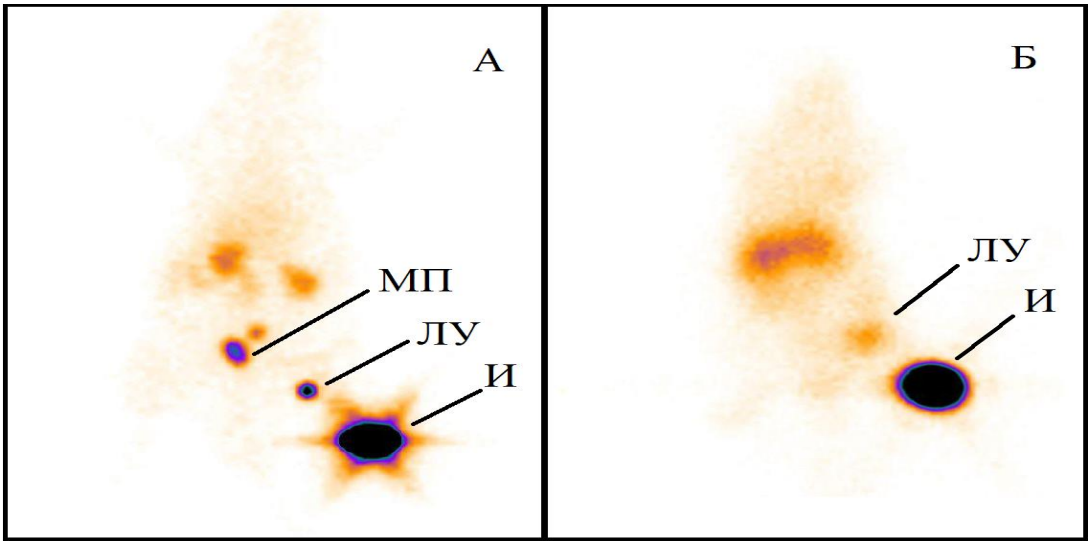


Рисунок 3.19 - Сцинтиграммы крыс, выполненные через 2 ч после инъекции РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» (А) и РФП «^{99m}Tc-Nanocis» (Б). А - Уровень радиоактивности в точке инъекции (И) 56,3 % от введенной дозы, в паховом лимфатическом узле (ЛУ) – 11,2 %. МП – мочевой пузырь. Б - Уровень радиоактивности в точке инъекции (И) 61,3 % от введенной дозы, в паховом лимфатическом узле (ЛУ) – 3,5%.

Таблица 3.9 - Содержание ^{99m}Tc в месте инъекции и паховом лимфатическом узле после подкожного введения РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» и РФП «^{99m}Tc-Nanocis» по данным сцинтиграфии

Локализация измерения	Время после введения	Аккумуляция ^{99m}Tc-Al_2O_3	Аккумуляция ^{99m}Tc-Nanocis (%)
Место инъекции	5 мин	76,8±3,7	82,7±5,0
	15 мин	71,3±4,2	67,7±3,0
	1 ч	68,2±5,3	55, 7±4,8
	2 ч	57,0±8,6	50,5±5,1
	3 ч	53,5±4,9	47,7±4,6
	24 ч	46,7±6,8	35,33±3,3
Паховый лимфатический узел	5 мин	0,9±0,2	0,98±0,22
	15 мин	1,19±0,13	1,03±0,22
	1 ч	8,6±1,1	1,4±0,86
	2 ч	10,5±1,6	2,05±1,67
	3 ч	11,1±1,2	2,18±1,57
	24 ч	12,0±1,4	2,31±1,45

Таким образом, проведенное исследование показало, что радиофармпрепарат «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» активно поступает из места инъекции в лимфатическую систему и накапливается в лимфатическом узле.

Высокая аккумуляция РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» в лимфоузле свидетельствует о функциональной пригодности данного РФП для сцинтиграфического выявления «сторожевых» лимфоузлов.

Интраоперационное выявление «сторожевых» лимфатических узлов выполнялось через 1 час после введения индикатора. После препарирования подмышечной области и выделения лимфатических узлов, детектировались лимфатические узлы с повышенным сцинтилляционным счетом с помощью гамма-зонда «GammaFinder» (США) (рисунок 3.20). С этой целью лимфатические узлы извлекали из операционной раны и сцинтилляционный счет в них измерялся повторно (рисунок 3.21). Затем определялся фоновый уровень счета в подмышечной области (рисунок 3.22).

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

Рисунок 3.20 - Интраоперационное выявление «сторожевого» лимфатического узла с помощью гамма-зонда «GammaFinder» (США).

Рисунок 3.21 - Определение уровня сцинтилляционного счета в «сторожевом» лимфатическом узле, извлеченном из операционной раны.

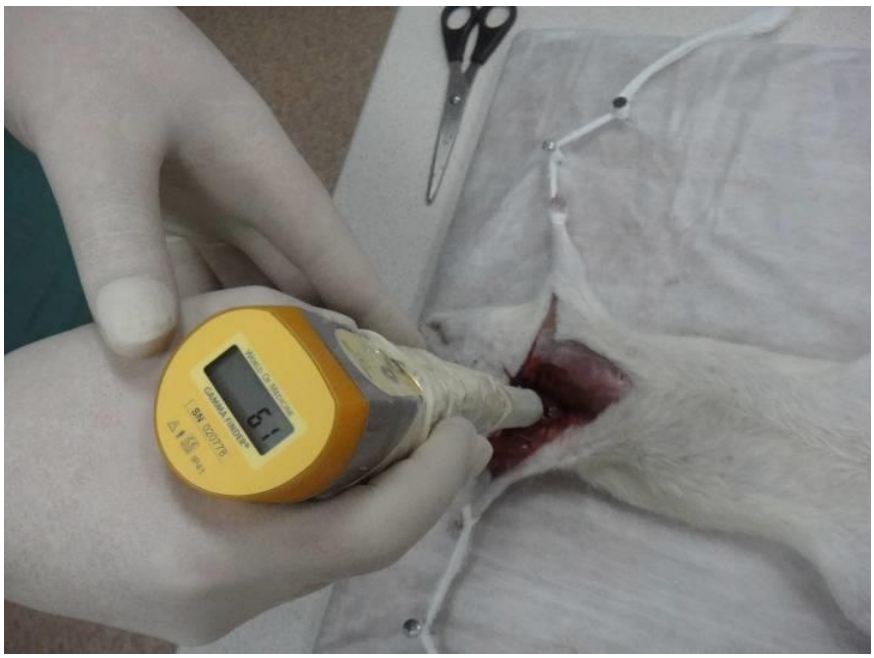


Рисунок 3.22 - Определение уровня сцинтилляционного счета в операционной ране после извлечения «сторожевого» лимфатического узла.

Результаты исследований крыс показали, что во всех случаях удавалось интраоперационно визуализировать «сторожевой» лимфатический узел. Сцинтилляционный счет в месте введения РФП через 1 час был на уровне 22779 тыс. имп. в секунду. Средний счет в лимфатическом узле до его извлечения из операционной раны составил 438,42, а после – 447,84.

Уровень сцинтилляционного счета в подмышечной области после удаления лимфатического узла оставался на фоновом уровне – 65,87 имп. (таблица 3.10).

Таблица 3.10 - Сцинтилляционный счет через 1 час после инъекции РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Локализация измерения	Минимальное накопление (имп.)	Максимальное накопление (имп.)	Среднее накопление (имп.)	Ошибка среднего (имп.)
Место инъекции	21894	23976	22779	600
Сторожевой лимфатический узел в операционной ране	273	536	438,42	84
Извлеченный сторожевой лимфатический узел	274	584	447,84	87
Подмышечная область после удаления сторожевого лимфатического узла	49	86	65,87	11

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало эффективность нового радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» для интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов. 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. Следует отметить, что тенденции перераспределения в лимфатические узлы 2 и 3 порядков не наблюдалось.

Довольно часто место инъекции радиофармпрепаратов находится очень близко от сторожевого лимфатического узла и это осложняет его поиск [73, 75, 96]. В данной работе было доказано более высокое накопление РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в лимфатическом узле по сравнению с зарубежным аналогом. Этот факт позволит упростить интраоперационный поиск СЛУ при использование нового отечественного РФП.

Результаты аналитического контроля качества препарата представлены в следующем разделе диссертации.

3.5 Выводы по главе

1. В результате проведенных исследований разработаны методы получения трех наноколлоидных препаратов.

Первый тип создан на основе металлохелатов с химически модифицированными комплексонами диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА). Второй – на основе наночастицы железа, покрытых углеродной оболочкой Fe@C, с присоединенной к ней через ковалентные связи фрагментами бензилдиметилен-аминоуксусной кислоты. И третий – на основе нанопорошка гамма-оксида алюминия.

2. Для получения первого типа меченных технецием наноколлоидов к суспензии, содержащей 1 мг $ДТПА_{мод}$ в 2 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия, 20 мкл раствора Sn (II) (концентрация 7 мг/мл по $SnCl_2 \cdot 2H_2O$) и 100 мкл водного раствора желатина с концентрацией 10 мг/мл было добавлено 2 мл элюата ^{99m}Tc. После интенсивного перемешивания смесь кипятили в течение 30 мин. и охлаждали в ультразвуковой ванне до комнатной температуры. Средний радиохимический выход наноколлоида с размером частиц 50 – 100 нм в готовом РФП составляет порядка 80%, при радиохимической чистоте продукта 92-95 %. Накопление препарата в лимфоузле находится на уровне 1,5 %, что позволяет использовать препарат для проведения гамма-сцинтиграфических исследований.

3. Нанесение метки ^{99m}Tc на поверхность модифицированных частиц Fe@C(АДТ) в присутствии олова (II) проводили по следующей методике. Во флаконе смешивали 2 мл водной суспензии Fe@C(АДТ) с 2 мл элюата. За тем вводили раствор Sn (II) из расчета 0,02 мг на 1 мл смеси, аскорбиновую кислоту 0,25 мг/мл и водный раствор желатина с концентрацией 10 мг/мл. После интенсивного перемешивания смесь кипятили в течение 30 мин. и охлаждали в ультразвуковой ванне до комнатной температуры. Выход меченного технецием-99м коллоида Fe@C (АДТ) с размером частиц менее 100 нм составляет 97 %, а РХЧ продукта находится на уровне 94 % в течение 4-6 часов. При этом

аккумуляция РФП в лимфоузле находится на уровне 1,71 % от введенной дозы. Это соответствует стандартным требованиям.

4. Для приготовления РФП на основе наноразмерного оксида алюминия использовалась следующая методика. Во флакон с 2 мл коллоида оксида алюминия вводили 2 мл элюата ^{99m}Tc, а затем из расчета на 1 мл смеси 0,25 мг аскорбиновой кислоты, 0,0175 мг Sn(II) и после перемешивания - 100 мкл желатина. Смесь нагревали на водяной бане (70-80°С) в течение 30 мин и после охлаждали в ультразвуковой ванне до комнатной температуры. Уровень аккумуляции РФП в лимфоузле находится на уровне 8,6 % от общей введенной дозы, что гарантирует его надежную визуализацию. Полученный результат превосходит стандартные требования к подобным препаратам (0,5 - 1,7 %), что определило его выбор для проведения дальнейших исследований.

5. С учетом проведенных исследований была разработана хорошо воспроизводимая методика приготовления лиофилизированного реагента для получение меченного ^{99m}Tc наноколлоида на основе оксида алюминия в виде стандартного набора к генератору технеция-99м.

6. Изучение функциональной пригодности нового РФП для сцинтиграфического и интраоперационного выявления СЛУ показало, что препарат активно поступает из места инъекции в лимфатическую систему и накапливается в паховом лимфоузле. Через 60 минут после введения накопление РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в нем составила 8,6%. Результаты исследований крыс показали, что во всех случаях удавалось интраоперационно визуализировать «сторожевой» лимфатический узел.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СТАНДАРТИЗАЦИИ И НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ НА ПРОИЗВОДСТВО ПРЕПАРАТА «НАНОКОЛЛОИД, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Готовый радиофармпрепарат «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3», применяется для подкожнго, паратуморального и внутривенного введения. Для препаратов такого назначения должен выполняться аналитический контроль качества, который включает проведение анализа лекарственного средства по многим показателям.

Для идентификации компонентов в смесях применяют наиболее специфические и чувствительные реакции. Но, сопутствующие компоненты смеси могут или создавать неблагоприятные условия для протекания реакции, или сами вступать во взаимодействие. Анализ лекарственной формы, состоящей из нескольких ингредиентов, создает определенные трудности при их идентификации. Сложность анализа лекарственных смесей связана с тем, что один ингредиент часто мешает открытию другого по разным причинам. Так, два или несколько ингредиентов могут реагировать с одним и тем же реактивом. Иногда препарат не удается обнаружить принятой для него реакцией в связи с тем, что выделяющееся в результате реакции вещество вступает во взаимодействие с другим компонентом лекарственной смеси. Метод разделения лекарственной смеси трудоемок и длителен, в связи с этим, важно пользоваться реакциями, позволяющими провести идентификацию одного компонента в присутствии другого, а в некоторых случаях использовать возможность определения подлинности двух и более ингредиентов одним реактивом или одной реакцией. Возможно использование различных видов хроматографии для разделения и идентификации компонентов лекарственной формы.

В соответствии с ОФС.1.11.0001.15 «Радиофармацевтические лекарственные препараты» анализ по установлению подлинности и количественного определения веществ, входящих в состав РФП, можно

выполнять любыми подходящими физико-химическими методами [203]. Однако:«Принимая во внимание, требования радиационной безопасности, а также небольшое количество фасовок РФП в серии, следует учитывать необходимость минимизации проб испытуемого препарата, как по объёму, так и по массе. Кроме того, предпочтительно должны быть выбраны методы экспресс-анализа с использованием дистанционно управляемого оборудования. В исключительных случаях из-за невозможности количественного определения какого-либо компонента современными методами в составе РФП с учетом выше изложенных требований определение не проводят» [205].

Для качественного и количественного определения оксида алюминия, олова, и аскорбиновой кислоты использованы известные методики, в которые внесены изменения с учетом концентраций данных компонентов в составе препарата и возможного взаимного влияния этих компонентов в процессе их определения. Для стандартизации состава нового РФП была разработана методика количественного определения желатина.

4.1 Качественное и количественное определение оксида алюминия

Качественное и количественное определение оксида алюминия в составе лиофилизированного реагента проводили методом эмиссионного спектрального анализа с применением спектрографа «ИСП-30» и многоканального анализатора атомно-эмиссионных спектров «МАЭС» [3]. Обработку спектров и вычисление концентраций анализируемых элементов осуществляли с использовние программного пакета «Атом».

При проведении анализа сжигают пробы анализируемого вещества в электрической высоковольтной искре или газовом пламени. При этом осуществляется диссоциация вещества на атомы и ионы, которые испускают

кванты света определенной длины волны. Эти волны регистрируются при помощи спектральных приборов.

Качественный анализ проводят по наиболее чувствительным линиям определяемых элементов. При выполнении анализа даного препарата должны обнаруживаться характерные линии с длинами волн 308,22 нм и 309,27нм.

Количественное определение основано на взаимовязи между концентрацией и интенсивностью (J) спектральной линии определяемого элемента. Поэтому количественный анализ осуществляют используя спектры эталонных образцов. В эталонных образцах содержатся различные, но точно известные концентрации элементов подлежащих определению.

При проведении анализов РФП, которые представляют собой растворы радионуклидов, применяют метод анализа сухого остатка. Сухой остаток образуется на поверхности угольных электродах во время выпаривания раствора.

Для проведения данного анализа использовался анализатор МАЭС, который установили на выходе спектрографа ИСП-30 вместо фотопластинок. Обработка данных и вычисление концентраций веществ осуществляется с помощью программного пакета АТОМ.

Приготовление эталонных растворов и градуировочного графика

1. Приготовления основного раствора алюминия [3].

Для приготовления основного раствора алюминия растворяют при нагревают навеску металла 1,00 г (ГОСТ 11069-74, марка А99) в 10-15 мл разбавленной (1:1) HCl. Остаток упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 20-40 мл 1% раствора Hcl. В последующем его переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем до метки этим же раствором соляной кислоты. Содержание алюминия в растворе составляет 1,0 мг/мл.

2. Приготовления основного раствора натрия хлорида.

16,0000 г фармакопейного натрия хлорида растворяют в 250 мл воды. Содержание NaCl в полученном растворе 64 мг/мл.

3. Приготовления основного раствора кобальта.

В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют навеску хлорида кобальта (ТУ 6-09-2338-77) порядка 90 мг в 1% растворе HCl. Доводят объем до 100 мл тем же раствором кислоты. Содержание кобальта в растворе 0,4 мг/мл.

4. Приготовление эталонных растворов алюминия [3].

В мерные колбы вносят по 14,0 мл раствора натрия хлорида и основные растворы алюминия и кобальта в следующих объемах:

№ эталона	Концентрация Al в растворе, мг/мл	Объем основного раствора Al, мл	Объем основного раствора кобальта, мл
1	0,030	3,0	1,0
2	0,025	2,5	1,0
3	0,020	2,0	1,0
4	0,015	1,5	1,0
5	0,010	1,0	1,0

5. Построение градуировочного графика.

Эталонные растворы (объемом 0,05 мл) наносят на угольные электроды. Электроды просушивают и закрепляют в штативе. Над ними закрепляют конические электроды. Задают критерии работы спектрографа: диафрагма 5мм, ширина входящей щели 15 мкм, ток переменный 8,5 А, диафрагма Гартмана 4 мм. Спектрографируют. По полученным спектрам строят градуировочный график. В дальнейшем его используют при проведении количественного анализа.

<u>Проведение анализа препарата</u>

К исследованию представлен реагент для приготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» серий № 11140915, 12170915, 13210915, 14240915, 15280915, 16011015, 17051015, 18081015, 19121015, 20151015.

Для проведения анализа раствор лиофилизата готовили добавлением во флакон 4 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций. На подготовленные электроды (5-6 шт.) наносят 0,05 мл раствора РФП и 0,05 мл

раствора кобальта [3]. Электроды просушивают, спектрографируют и проводят определение содержания алюминия в пробах. В последующим вычисляют концентрации (рисунок 4.1, таблица 4.1).

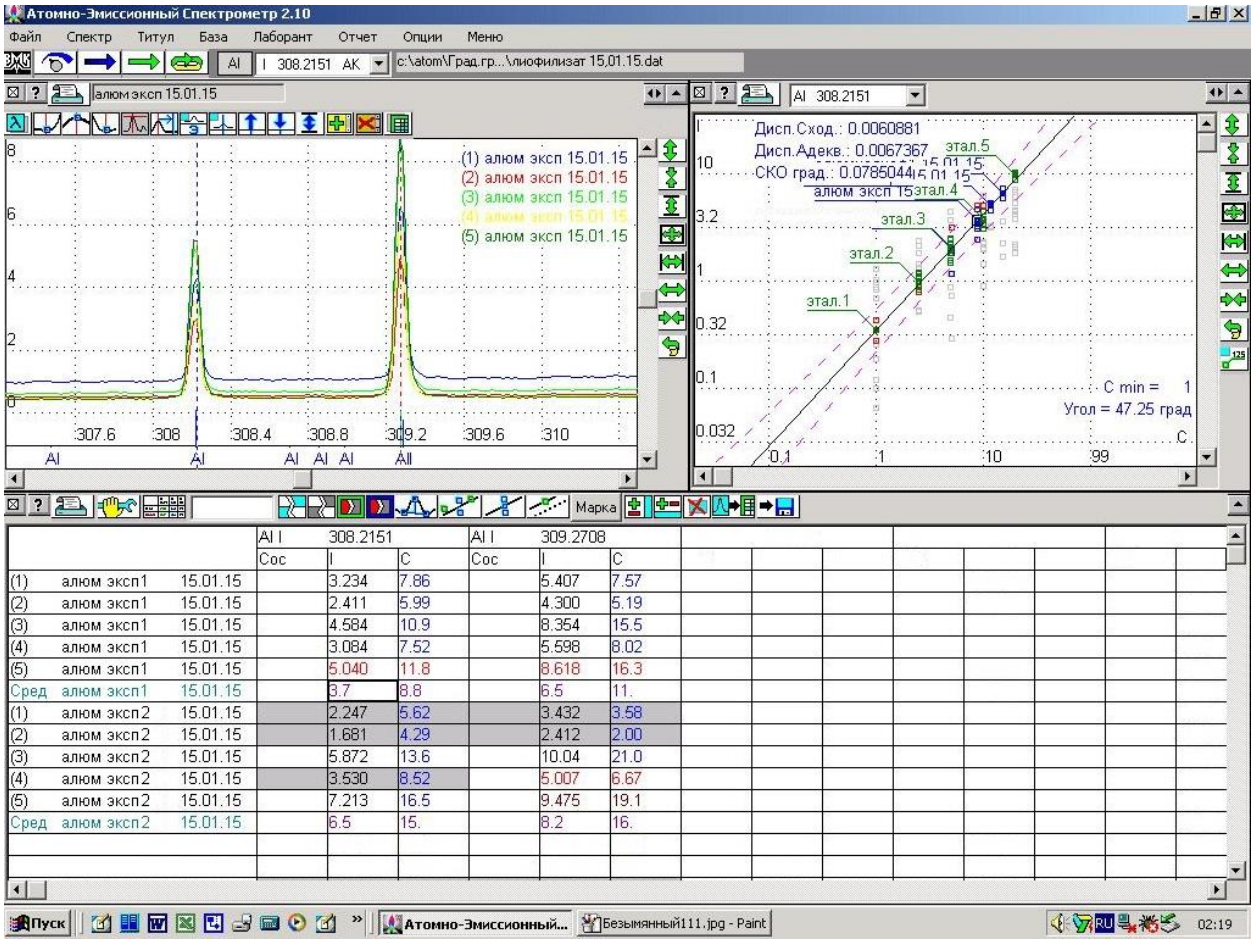


Рисунок 4.1 - Определение алюминия в составе лиофилизированного реагента методом эмиссионного спектрального анализа.

Содержание алюминия оксида во флаконе (C) в миллиграммах вычисляют по формуле:

$$C = C_{Al} \cdot 4 \cdot 3{,}78 \text{, где} \qquad (4.1)$$

C_{Al} – концентрация Al в исследуемом растворе, установленная с помощью калибровочного графика, мг/мл;

4,0– объём раствора реагента во флаконе в миллилитрах;

3,78 – коэффициент пересчёта Al в алюминия оксид.

Содержание алюминия оксида во флаконе должно быть от 0,1 до 0,25 мг.

Таблица 4.1 - Результаты экспериментального определения концентрации оксида алюминия в реагенте для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Серия	C(Al), мкг/мл	Среднее C(Al), мкг/мл	Среднее C(Al), мг/мл	C(Al_2O_3), мг на флакон
11140915	8,67 9,27 9,10	9,013	0,009013	0,136
12170915	8,24 8,58 8,74	8,52	0,00852	0,129
13210915	13,6 9,00 16,5	13,0	0,0130	0,197
14240915	7,86 7,52 10,9	8,76	0,0086	0,130
15280915	8,81 9,2 8,75	8,92	0,00892	0,134
16011015	9,40 9,1 8,98	9,16	0,00916	0,138
17051015	8,09 8,91 8,28	8,42	0,00742	0,127
18081015	9,45 9,93 9,97	9,78	0,00978	0,147
19121015	9,01 8,98 9,18	9,05	0,00905	0,136
20151015	9,51 9,48 9,50	9,49	0,00949	0,143

Исследования представленных серий реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» показали, что содержание алюминия оксида во флаконе находится в пределах от 0,127 до 0,197 мг на флакон, что соответствует требованиям нормативной документации.

4.2 Качественное и количественное определение Sn (II)

Для определения олова в растворах реагентов применяют потенциометрический [252], вольтамперометрический [252] и спектрофотометрический методы [253].

При проведении качественного содежания ионов олова в составе реагента для приготовления РФП использовали методику, основанную на реакции взаимодействия олова с перренатом калия в присутствии роданида калия. Для приготовления раствора 4,1 мл 2 М кислоты хлористоводородной помещают в пробирку вместимостью 5 мл с притертой пробкой, прибавляют по 0,3 мл 0,006 М раствора калия рениевокислого (ALDRICH кат. № 243590), 0,1 мл 2 М раствора калия роданистого (MERCK кат. № A349425), 0,5 мл раствора лиофилизата и перемешивают. Измеряют оптическую плотность полученного раствора не позже чем черз 10 мин после его приготовления. Определение олова проводили спектрофотометрическим методом (максимальное поглощение при длине волны 353 ± 2 нм, диапазон от 340 до 370 нм). Измерения осуществляли на спектрофотометре «UNICO». Измерения проводят в режиме «Мультиволновой» (область 340 - 370 нм). Измеряемый параметр – оптическая плотность D.

D_{max} должно наблюдаться при длине волны 353 ± 2 нм.

Количественное определение Sn (II) проводили методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА).

Сущность методики выполнения измерений основана на проведении процесса предварительной подготовки проб лиофилизата и дальнейшем инверсионно-вольтамперометрическом измерении аналитических сигналов элементов в растворе подготовленной пробы [252]. Химические помехи, влияющие на результаты определения элементов, устраняются в процессе пробоподготовки. Допускается разбавление подготовленной к измерению пробы.

Принцип метода инверсионной вольтамперометрии состоит в концентрировании определяемых элементов на электроде в растворе

подготовленной пробы и последующем электрорастворении концентрата при определенном режиме изменения потенциала. Определение массовых концентраций олова проводят путем электролиза их ионов на ртутно-пленочном электроде (РПЭ) при заданном отрицательном потенциале, равном минус 1,30 В при заданном времени.

Процесс электрорастворения элементов с поверхности электрода и регистрацию аналитических сигналов (анодных пиков олова проводят при линейно меняющемся потенциале от минус 0,80 В до минус 0,05 В относительно хлорсеребряного электрода при заданной чувствительности прибора. Максимальный анодный ток регистрируется при потенциале, характерном для каждого элемента и линейно зависит от концентрации. Потенциал максимума суммарного анодного пика олова на фоне соляной кислоты равен минус (0,4 ± 0,1) В.

Массовые концентрации элементов в пробе определяют по методу добавок аттестованных смесей (АС) элементов.

Алгоритм определения олова в реагенте приведен на рисунке 4.2. [252]

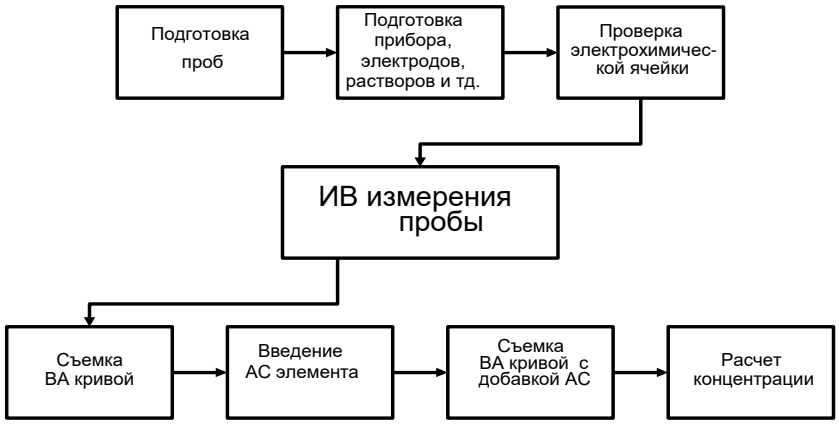


Рисунок 4.2. - Основные этапы анализа проб при определении олова методом ИВА

В таблице 4.2. приведены значения погрешностей, возникающих в результате измерений массовых концентраций олова в реагенте для получения РФП методом ИВА [252]

Таблица 4.2 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики при доверительной вероятности Р=0,95

Наименование определяемого элемента	Диапазон определяемых концентраций, мг/л или мг/кг	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность методики), δ, %	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r\left(\overset{0}{\delta}\right)$, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R\left(\overset{0}{\delta}\right)$, %
Олово	От 0,2 до 500 включ.	25	7	12

При выполнении измерений применяют комплекс аналитический вольтамперометрический СТА в комплекте с IBM-совместимым компьютером, индикаторный электрод - ртутно-пленочный на серебряной подложке с толщиной пленки ртути 10 - 20 мкм и рабочей поверхностью 0,03 - 0,2 см^2, сопротивлением не более 0,5 кОм и электрод сравнения - хлорсеребряный с сопротивлением не более 3,0 кОм [254].

Приготовление растворов

Основные аттестованные растворы (ОР), содержащие 100,0 мг/л элементов [254]

а) Приготовление состава растворов с аттестованными концентрациями элементов 1,0 мг/мл из государственных стандартных образцов:

В мерную колбу вводят 5,0 мл стандартного образца состава олова и доводят объем довместимостью 50,0 мл раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л;

б) Приготовление состава растворов с аттестованными концентрациями металлов 10,0 мг/ мл из государственных стандартных образцов :

В мерную колбу вводят 1,0 мл стандартного образца состава олова и доводят объем до 100,0 мл раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л;

в) Приготовление из солей элементов:

Навеску (0,100 ± 0,001) г металлического олова растворяют в стаканчике при слабом нагревании в 10,0 мл концентрированной соляной кислоты с добавлением 2,0 мл перекиси водорода; раствор количественно переносят в мерную колбу; добавляют еще 10,0 мл концентрированной HCl и доводят объем раствора до 1000,0 мл дистиллированной водой.

Готовят аттестованную смесь серии АС-1, содержащую 10,0 мг/л олова. Для этого в колбу на 50,0 вносят мл 5,0 мл ОР олова концентрации 100 мг/л и доводят до метки раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л (таблица 4.3).

Таблица 4.3 - Приготовление аттестованных смесей

Исходный раствор для приготовления АС, мг/л	Код раствора	Концентрация приготовленного раствора АС, мг/л	Отбираемый объем, мл	Объем мерной посуды, мл
100,0	АС-1	10,0	5,0	50,0
100,0	АС-2	5,0	2,5	50,0
10,0	АС-3	1,0	5,0	50,0

АС-1, АС-2 устойчивы в течение 30 дней. АС-3 устойчив в течении 15 дней.

Подготовка анализируемых проб

В кварцевый стаканчик мерной пипеткой вносят 2,0 мл лиофилизата, добавляют 6 – 8 мл соляной кислоты концентрации 5 – 8 моль/л. Нагревают несколько минут на плитке при температуре не более 80^0С, выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. Отделяют осадок матрицы анализируемой пробы при помощи центрифуги или фильтруют через бумажный фильтр, предварительно промытый раствором разбавленной соляной кислоты (1:10), в мерную пробирку вместимостью 15 мл. Объем центрифугата (фильтрата) доводят дистиллированной водой до объема 10,0 – 15,0 мл. Полученный раствор используют для определения олова.

Подготовку холостых проб проводят при контроле качества реактивов, добавляя их в тех же количествах и последовательности, но без анализируемой пробы. Рекомендуемые добавки АС олова и чувствительности прибора при снятии вольтамперограмм приведены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 - Рекомендуемые добавки аттестованных смесей (АС) олова и чувствительности прибора при регистрации вольтамперограмм

Диапазон определяемых концентраций элемента, мг/л или мг/кг	Время электро-лиза, с	Концентрация аттестованной смеси, используемой для добавок, мг/л	Рекомендуемый объем добавок, мл	Чувствительность прибора, А/мм
От 0,2 до 10	30 – 60	10	0,01 - 0,04	8.10^{-9} - 2.10^{-8}
От 50 до 100	20 – 40	100	0,02 - 0,08	$2.10^{-}8$ - 8.10^{-8}
От 100 до 500	10 – 20	100	0,04 - 0,08	8.10^{-8}

Вольтамперометрический анализатор используют в комплекте с компьютером. Регистрацию, обработку результатов измерений аналитических сигналов и расчет массовых концентраций олова в анализируемой пробе (мг/л или мг/кг) выполняет система сбора и обработки данных анализатора [254].

<u>Проведение анализа препарата</u>

К исследованию представлен реагент для приготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» серий № 11140915, 12170915, 13210915, 14240915, 15280915, 16011015, 17051015, 18081015, 19121015, 20151015.

Для проведения анализа раствор лиофилизата готовили описанным выше способом. Одновременно проводят анализ одной «холостой» пробы и двух параллельных в трех стаканчиках.

В проверенные на чистоту стаканчики с фоновым электролитом вносят мерной пипеткой или дозатором анализируемую пробу.

Запускают команду «ПРОБА». В трассе устанавливают время подготовки раствора 200 с. Запускают команду «ПУСК». При выполнении серии измерений на экране компьютера одновременно должно быть 3 - 5 вольтамперограмм в каждом оконе вывода, которые соответствуют ячейкам 1, 2, 3 [254].

Невоспроизводимые вольтамперограммы исключают, оставшиеся усредняют.

Запускают команду «ДОБАВКА». Заполняют таблицу «КОЛИЧЕСТВО» (рисунок 4.3).

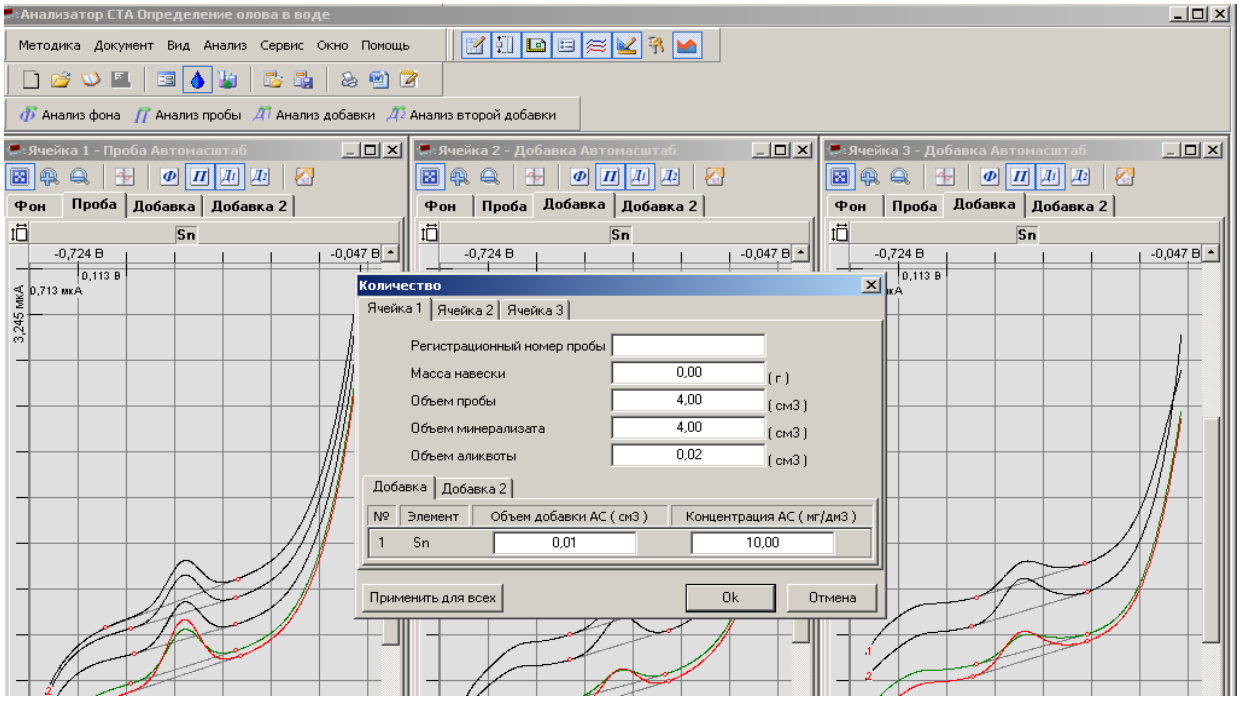


Рисунок 4.3 - Определение олова в составе лиофилизированного реагента методом ИВА.

Вносят добавку АС олова по 0,01 мл концентрации 10,0 мг/л в каждую ячейку. Нажав «ПУСК», запускают измерение по добавке. Получают три значения суммарной массовой концентрации олова (каждое значение для соответствующей параллельной пробы), которые смотрят в таблице «РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА» (рисунок 4.5) и заносят в «АРХИВ».

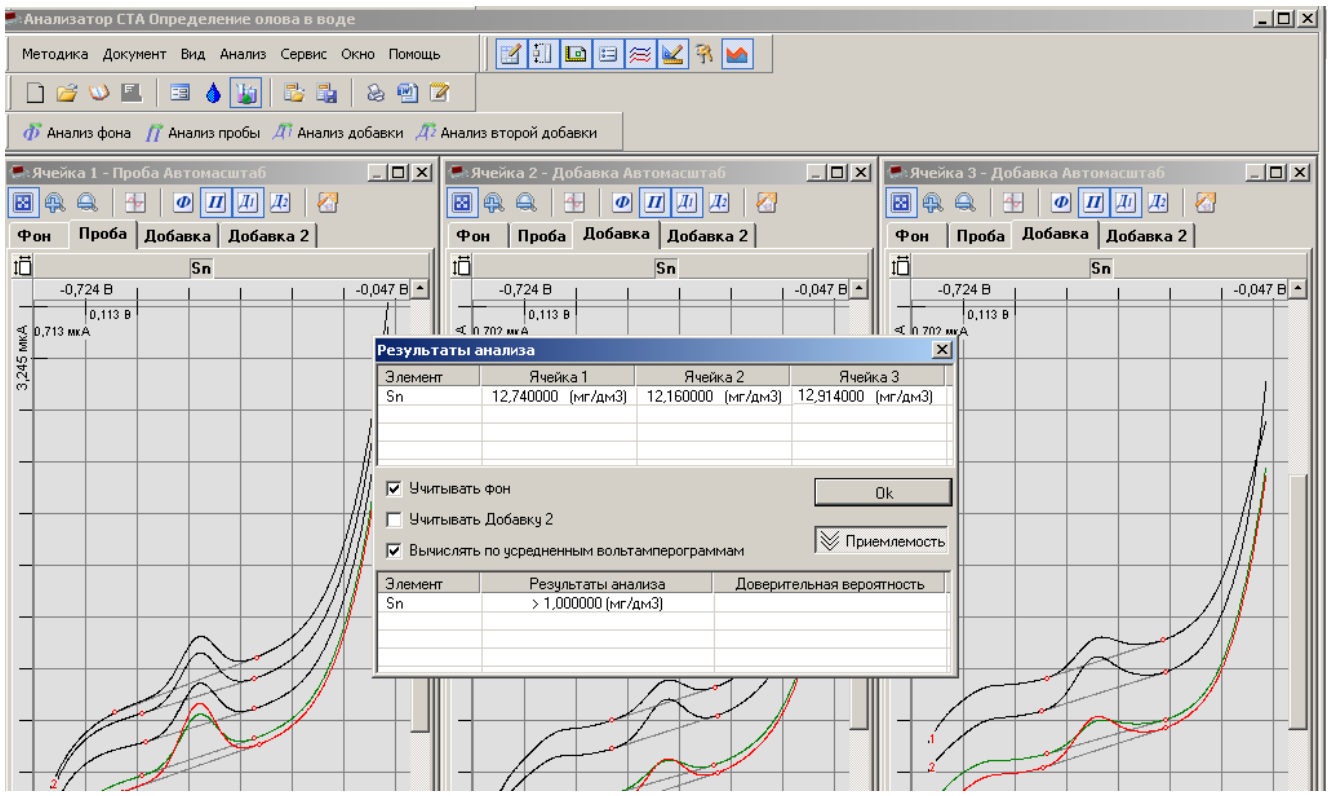


Рисунок 4.5 - Определение олова в составе лиофилизированного реагента методом ИВА.

Содержание олова двухвалентного во флаконе (G) вычисляют по формуле:

$$G = \frac{C}{1000} \cdot 4{,}0 \text{, где} \qquad (4.2)$$

C– концентрация олова (II) в исследуемом растворе, установленная с помощью метода ИВА, миллиграмм/литр;

4,0 – объём раствора лиофилизата в миллилитрах;

Содержание олова во флаконе должно быть не более 0,07 мг (таблица 4.5).

Таблица 4.5 - Результаты экспериментального определения концентрации олова в реагенте для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

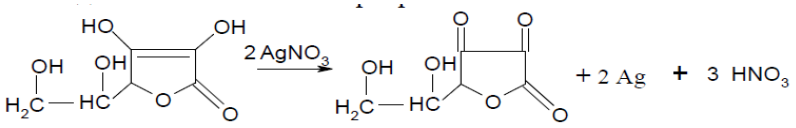
Серия	C(Sn), мкг/дм^3	Среднее C(Sn), мкг/дм^3	Среднее C(Sn), мг/мл	C(Sn), мг на флакон
11140915	12,740 12,264 12,917	12,6	0,0126	0,0504
12170915	12,625 12,900 12,987	12,83	0,0128	0,0510
13210915	13,010 12,900 12,874	12,928	0,0129	0,0510
14240915	13,217 13,001 12,980	13,066	0,0130	0,0520
15280915	12,852 13,014 12,962	12,942	0,0129	0,0517
16011015	12,988 12,901 13,412	13,100	0,0131	0,0524
17051015	12,852 13,021 13,087	12,986	0,0129	0,0519
18081015	13,150 13,206 13,050	13,135	0,0131	0,0525
19121015	13,021 12,998 13,207	13,075	0,0130	0,0523
20151015	12,962 12,841 13,043	12,948	0,0129	0,051

Исследования представленных серий реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» показали, что содержание олова во флаконах не превысило 0,07 мг на флакон, что соответствует требованиям нормативной документации.

4.3 Качественное и количественное определение аскорбиновой кислоты

Для качественного определения аскорбиновой кислоты в реагенте для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» была опробована стандартная методика с использованием раствора серебра нитрата (реакция образования «серебряного зеркала»).

1. Для этого к 0,01 г реагента прибавляют 0,2 мл раствора серебра нитрата. При взаимодействии кислоты аскорбиновой с раствором нитрата серебра его катион восстанавливается до металлического серебра с образованием осадка серого цвета:



В нашем случае при проведении анализа образуется бурое окрашивание. Из чего можно сделать вывод, что прибавляемый реактив реагирует одновременно с двумя ингредиентами.

В Европейской фармакопее [253] приведена методика определения аскорбиновой кислоты, которую использовали для проведения качественного анализа. Согласно методике [253], определение проводят методом спектрофотометрии (область 230 - 280 нм, максимальном поглощении на длине волны 255 ± 2 нм) [211].

С этой целью к 0,4 мл раствора лиофилизата добавляют 9,6 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и переносят в кювету спектрофотометра. Измерения оптической плотности проводят в диапазоне от 230 до 280 нм.

Измерения осуществляли на спектрофотометре «UNICO» (спектральный диапазон 190 -1100 нм). Режим - «Мультиволновой» (диапазон длин волн 450 - 550 нм), измеряемый параметр – оптическая плотность D.

Для количественного определения содержания аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах используют метод титриметрического анализа. При выполнении этого анализа аскорбиновую кислоту титруют раствором йода известной концентрации. Поскольку в составе разработанного лиофилизата имеется олово хлорид, который также реагирует с раствором йода, то для данного препарата такая методика не подходит. Поэтому для количественного определения аскорбиновой кислоты в РФП использовали метод инверсионной вольтамперометрии [254].

Сущность методики состоит в переводе проб лиофилизата в раствор путем растворения в воде или растворе соляной кислоты с последующим вольтамперометрическим определением массовой концентрации аскорбиновой кислоты.

Метод ИВА основан на способности аскорбиновой кислоты при определенном потенциале окисляться на индикаторном стеклоуглеродном электроде.

Регистрация аналитического сигнала на вольтамперограмме проводится при накопительной развертке потенциала с использованием комплекса СТА в дифференциальном режиме записи вольтамперограмм. Массовая концентрация аскорбиновой кислоты в пробе определяется методом добавок аттестованных смесей витамина С.

Общая схема анализа проб методом вольтамперометрии представлена на схеме (рисунок 4.6).

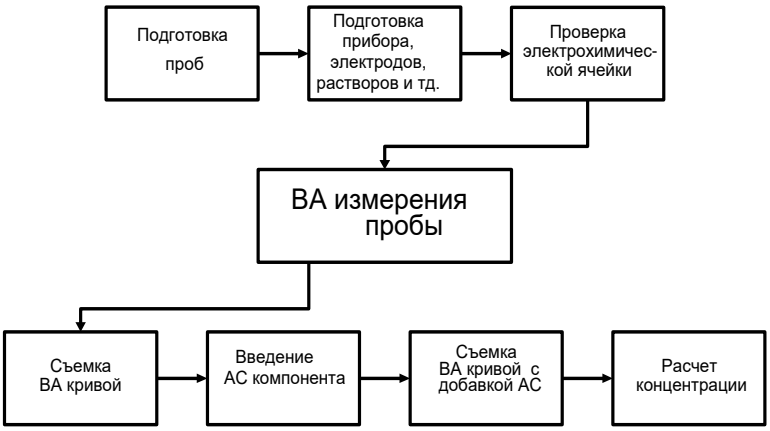


Рисунок 4.6 - Основные этапы анализа проб при определении аскорбиновой кислоты методом ИВА

В таблице 4.6. приведены значения погрешностей, возникающих в результате измерений массовых концентраций олова в реагенте для получения РФП методом ИВА [254].

Таблица 4.6 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости методики при доверительной вероятности Р=0,95

Наименование определяемого элемента	Диапазон определяемых концентраций, мг/л или мг/кг	Показатель точности (границы, в которых находится погрешность методики), δ, %	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r\left(\overset{0}{\delta}\right)$, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R\left(\overset{0}{\delta}\right)$, %
Аскорбиновая кислота	От 2 до 3000 включ.	18	7	9

При выполнении измерений применяют комплекс аналитический вольтамперометрический СТА в комплекте с IBM-совместимым компьютером, индикаторный электрод (стеклоуглеродный с рабочей поверхностью 25 - 30 мм^2), электрод сравнения (насыщенный хлоридсеребряный (нас.х.с.) в насыщенном растворе хлорида калия с сопротивлением не более 3,0 кОм), вспомогательный

электрод (насыщенный хлоридсеребряный (нас.х.с.) в насыщенном растворе хлорида калия с сопротивлением не более 3,0 кОм).

Приготовление растворов

Основной раствор (ОР) аскорбиновой кислоты (содержащий 1000 мг/л)

а) Приготовление из ампул, выпускаемых медицинской промышленностью (5% раствора 1,0 мл)

В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вводят 0,5 мл аскорбиновой кислоты из ампулы и доводят объем до метки дистиллированной водой;

б) Приготовление из сухого порошка аскорбиновой кислоты

Пробу аскорбиновой кислоты(0,025±0,001г) растворят в 25,0 мл бидистиллированной воды.

Приготовленные стандартные растворы идентичны.

Основной раствор готовят не более, чем за 2 час до проведения анализа. Хранить долго не рекомендуется, т.к. аскорбиновая кислота неустойчива и с течением времени разлагается. Поэтому стандартный раствор готовят в малых объемах для работы с ним в течение одних суток.

Аттестованные смеси серий АС-1, АС-2, АС-3 с содержанием по 100,0; 300,0; 500,0 мг/л аскорбиновой кислоты готовят соответствующими разбавлениями растворов дистиллированной водой в мерных цилиндрах вместимостью 10,0 мл согласно таблице 4.7. АС-1, АС-2 и АС-3 [252].

Таблица 4.7 - Приготовление аттестованных смесей аскорбиновой кислоты

Компонент	Концентрация исходного раствора для приготовления АС, мг/л	Отбира-емый объем, мл	Объем мерной посуды, мл	Концентрация приготовленного раствора АС, мг/л	Код полученного раствора (АС)
Аскорбиновая кислота	1000,0 1000,0 1000,0	1,0 3,0 5,0	10,0 10,0 10,0	100,0 300,0 500,00	АС-1 АС-2 АС-3

Фоновый электролит [254] - раствор хлорида калия концентрации 0,1 моль/л, подкисленный раствором соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л до pH 3 – 4.

На аналитических весах взвешивают навеску (7,5 ± 0,01) г хлорида калия, переносят в колбу, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, приливают 20,0 мл соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л и доводят дистиллированной водой до 1,0 л.

Раствор соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л

0,8 мл концентрированной HCl, растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды.

Подготовка анализируемых проб

Во флакон с лиофилизатом (реагентом) добавляют 4 мл дистиллированной воды и переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, смывая со стенок флакона остатки пробы дистиллированной водой [3]. Добавляют 30 мл раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л, доводят объем колбы до метки дистиллированной водой, инкубируют 20 – 30 мин и отфильтровывают через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является пробой для вольтамперометрического измерения.

Проведение анализа препарата

К исследованию представлен реагент для приготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» серий № 11140915, 12170915, 13210915, 14240915, 15280915, 16011015, 17051015, 18081015, 19121015, 20151015.

Для проведения анализа раствор лиофилизата готовили описанным выше способом. Одновременно проводят анализ одной резервной и двух параллельных проб в трех стаканчиках.

Процесс электрохимического окисления аскорбиновой кислоты проводят в растворе хлорида калия концентрации 0,1 моль/л, подкисленном соляной кислотой до pH примерно 3 – 4, на индикаторном стеклоуглеродном электроде при потенциале, равном (0,45-0,60) В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода (нас.х.с.).

В проверенные на чистоту стаканчики с фоновым электролитом вносят мерной пипеткой или дозатором анализируемую пробу.

Запускают команду «ПРОБА». В трассе устанавливают время подготовки раствора 200 с. Запускают команду «ПУСК». При выполнения серии измерений на экране компьютера одновременно должно быть 3 - 5 вольтамперограмм в каждом оконе вывода, которые соответствуют ячейкам 1, 2, 3 [254].

Невоспроизводимые вольтамперограммы исключают, оставшиеся усредняют.

Запускают команду «ДОБАВКА». Пипеткой или дозатором в стаканчики с пробой вносят добавки аттестованных смесей аскорбиновой кислоты. Объемы добавок должны быть такими, что бы высоты пиков на вольтамперограмме увеличились примерно в 2 раза (по 0,01 мл концентрации 500,0 мг/л). Заполняют таблицу «КОЛИЧЕСТВО» (рисунок 4.7) и запускают измерение по добавке, нажав «ПУСК».

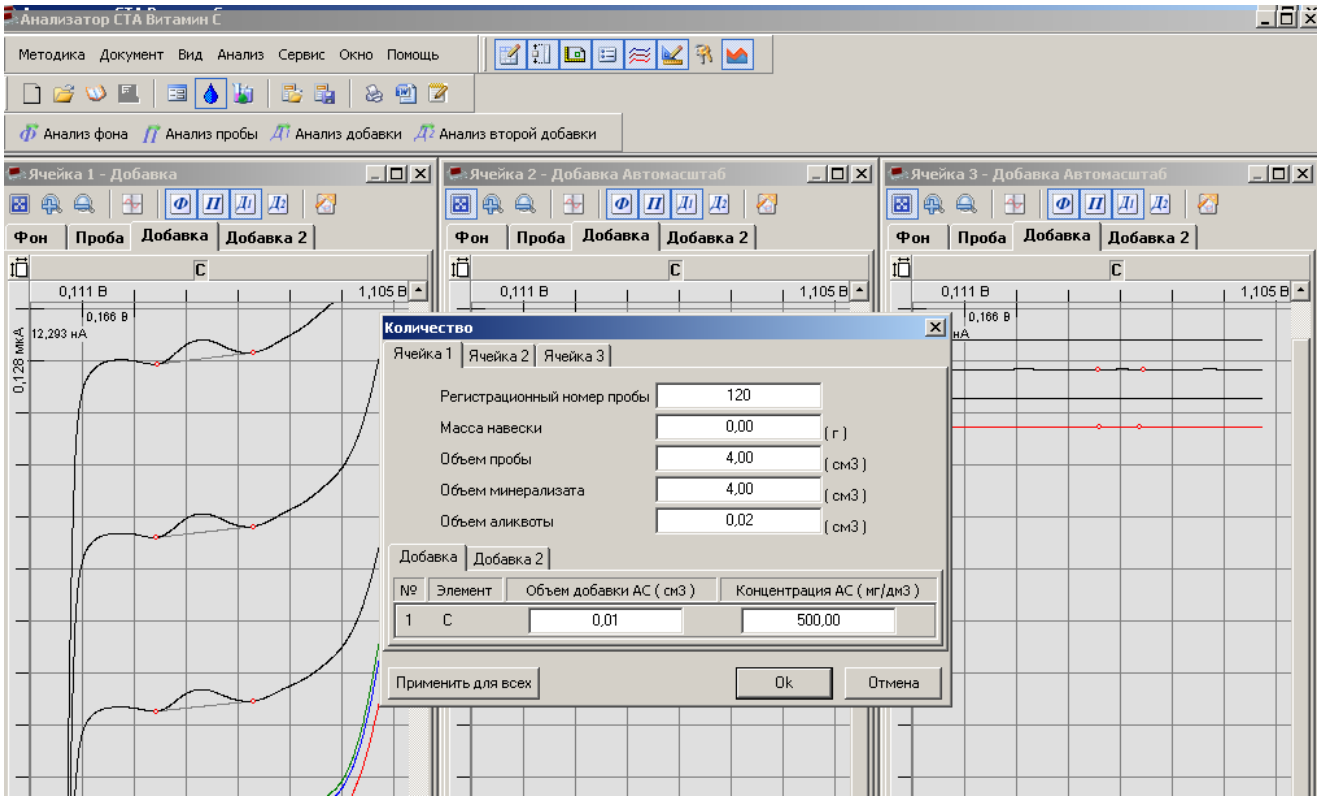


Рисунок 4.7 - Определение аскорбиновой кислоты в составе лиофилизированного реагента методом ИВА.

Получают три значения суммарной массовой концентрации аскорбиновой кислоты (каждое значение для соответствующей параллельной пробы), которые смотрят в таблице «РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА» и заносят в «АРХИВ».

Содержание аскорбиновой кислоты во флаконе (G) вычисляют по формуле:

$$G = \frac{C}{1000} \cdot 4; \text{ где} \qquad (4.3)$$

C– концентрация аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе, установленная с помощью метода ИВА, миллиграмм/литр;

4,0 – объём раствора лиофилизата в миллилитрах;

Содержание аскорбиновой кислоты во флаконе должно быть около 1,0 мг (таблица 4.8).

Таблица 4.8 - Результаты определения концентрации аскорбиновой кислоты (АК) в реагенте для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3».

Серия	С(АК), мкг/дм^3	Среднее С(АК), мкг/дм^3	Среднее С(АК), мг/мл	С(АК), мг на флакон
11140915	203,100 203,231 202,985	203,105	0,2031	0,812
12170915	203,568 203,852 203,740	203,720	0,2037	0,814
13210915	203,953 203,864 203,937	203,918	0,2039	0,815
14240915	203,741 203,958 204,001	203,900	0,2039	0,815
15280915	203,951 204,025 204,098	204,024	0,204	0,816
16011015	204,027 203,962 203,985	203,991	0,2039	0,815
17051015	204,321 204,012 203,957	204,096	0,2040	0,816
18081015	203,845 203,659 203,891	203,798	0,2037	0,815
19121015	203,893 204,231 204,098	204,074	0,2040	0,816
20151015	203,971 203,864 204,002	203,945	0,2039	0,815

Исследования представленных серий реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» показали, что содержание аскорбиновой кислоты во флаконе находится в диапазоне от 0,812 до 0,816 мг, что соответствует требованиям нормативной документации.

4.4 Качественное и количественное определение желатина

За основу методики качественного и количественного определения желатина была выбрана методика с использованием биуретового реактива. При использовании данной методики происходит образование окрашенного комплекса меди с молекулами белка, реакция идет в щелочной среде [3, 205]. Определение можно проводить методом градуировочных прямых и методом добавок. В работе был использован фотометрический метод добавок, поскольку он позволяет снизить мешающее влияние матрицы, по сравнению с методом градуировочных прямых, и свести к минимуму предварительную подготовку образца.

Измерения осуществляли на спектрофотометре «UNICO» (спектральный диапазон 190 - 1100 нм).

Приготовление растворов

Приготовление биуретового реактива [3]: для проведения анализа смешивают 20 мл раствора А и 80 мл раствора Б.

Приготовление раствора А. В колбу вносят 4,3 г сегнетовой соли (KNaC4H4O6) и 40 мл 0,2 М NaOH. Растворяют и прибавляют 1,5 г меди сульфата ($CuSO_45H_2O$) и 0,5 г калия йодистого. Перемешивают и доводят объем до 100 мл 0,2 М раствором NaOH. Срок годности около месяца.

Приготовление раствора Б. 0,5 г калия йодистого растворяют в 100 мл 0,2 М NaOH. Срок годности 14 суток.

Приготовление 0,2 М раствора едкого натра. 0,8 г едкого натра растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 мл. Воду предварительно освобождают от углекислого газа путем кипячения в течение нескольких минут.

Приготовления стандартного образца желатина. В 100 мл теплой дистиллированной воды растворяют 1,0 г желатина. Стандартный раствор содержит 10,0 мг/мл желатина.

Подготовка анализируемых проб

Готовят рабочий раствор реагента. Для этого во флакон с лиофилизатом добавляют 4 мл теплой дистиллированной воды, растворяют. Объем содержимого доводят до 25 мл и перемешивают.

Далее, в пробирку № 1 вносят 1 мл полученной смеси и 4 мл биуретового реактива. Объем доводят до 10 мл дистиллированной водой и перемешивают.

В пробирку № 2 вносят 1 мл исследуемого раствора и 0,04 мл стандартного раствора желатина. Затем в пробирку вносят 4 мл биуретового реактива, доводят общий обьем раствора дистиллированной водой до 10 мл.

Обе пробирки инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Измерение проводят на спектрофотометре при длине волны 540 нм относительно дистиллированной воды.

Проведение анализа препарата

К исследованию представлен реагент для приготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» серий № 11140915, 12170915, 13210915, 14240915, 15280915, 16011015, 17051015, 18081015, 19121015, 20151015.

Для проведения анализа раствор лиофилизата готовили описанным выше способом.

Приготовленные растворы в кювете (толщина слоя 10 мм) помещают в спетрофотометр и проводят измерения оптической плотности (длина волны 540 нм) в режиме «Анализ по множеству длин волн». Установлена длина волны и измеряемый параметр – оптическая плотность D. Измерение оптической плотности проводили относительно дистиллированной воды. По окончании измерений значение D высвечивалось на экране прибора.

Определение концентрации (C_x) желатина в исследуемом растворе и его содержание во флаконе (Q_x) вычисляют по следующим формулам:

$$C_x=C_{эт}*D_x/(D_{x+эт}-D_{x)} \qquad (4.4)$$

$$Q_x=C_x*V_x*V_{общ}/V_{ал} \qquad (4.5)$$

$C_{эт}$ – концентрация желатина в стандартном растворе;

D_x – оптическая плотность пробы;

$D_{х+эт}$ – оптическая плотность пробы с добавкой стандартного раствора желатина;

$V_х$ – объем добавки;

$V_{ал}$ – объем аликвоты;

$V_{общ}$ – объем рабочего раствора реагента

Содержание желатина во флаконе должно быть от 8 до 10 мг (таблица 4.9).

Таблица 4.9 - Результаты экспериментального определения концентрации желатина (Ж) в реагенте для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Серия	$D_х$	$D_{х+эт}$	$C_х$(Ж), мг/мл	$Q_х$ (Ж), мг на флакон
11140915	0,091	0,184	9,78	9,78
12170915	0,091	0,190	10,00	10,00
13210915	0,092	0,186	9,78	9,78
14240915	0,091	0,182	10,00	10,00
15280915	0,09	0,190	9,00	9,00
16011015	0,091	0,188	9,38	9,38
17051015	0,092	0,190	9,38	9,38
18081015	0,091	0,188	9,38	9,38
19121015	0,093	0,186	10,00	10,00
20151015	0,092	0,189	9,48	9,48

Исследования представленных серий реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» показали, что содержание желатина во флаконе находится в диапазоне от 9,38 до 10 мг на флакон, что соответствует требованию нормативной документации.

4.5 Определение срока годности РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Срок годности РФП определяется по совокупности нескольких факторов [205]:

- стабильность состава РФП (химического и радиохимического);
- уменьшением активности радионуклида по закону распада радиоактивности;
- возрастанием содержания радионуклидных примесей.

При определении срока годности РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» исходили из величины объёмной активности технеция - 99м на время приготовления РФП, а также из того, что на конец срока годности общая величина этой активности в объёме, вводимом пациенту, должна обеспечивать достоверный результат сцинтиграфических исследований. Так же при определении срока годности РФП исходили из величины радиохимической примеси (РХП), которая на конец срока годности не должна превышать 5 %.

Обычно для препаратов, изготовленных на основе наборов к генератору технеция-99м, срок годности составляет 3-5 часов. В течение этого времени объемная активность РФП уменьшается почти в 2 раза.

Анализ препарата проводили по всем показателям качества на момент приготовления РФП и по окончании срока годности. По критическим показателям «объемная активность» и «радиохимическая примесь» анализ проводили каждый час после изготовления препарата до момента, пока один из показателей будет несоответствовать предъявляемым требованиям.

Обобщенные результаты определения срока годности 10 серий радиофармпрепарата представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.10 – Результаты анализа препарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в течение срока годности

Номер серии	Дата анализа и время	Описание препарата	Подлинность	pH	Радиохимическая примесь, %	Объемная активность, МБк/мл
По проекту ФСП		Мутновато-опалесцирующ.	^{99m}Tc, Al	4,0-6,0	Не более 5,0	280-500 МБк/мл
11140915	14.09.15 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00} 15^{00} 16^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,5	3,6 3,8 4,0 4,1 4,5 4,9 5,4	850 757 675 600 535 472 405
12170915	17.09.15 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00} 15^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,6	3,1 3,6 3,8 4,0 4,4 4,8 5,5	880 784 700 625 553 492 427
13210915	21.09.15 8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,4	3,0 3,3 3,7 4,0 4,6 4,8 5,4	950 842 753 669 629 535 470
14240915	24.09.15	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,7	3,1 3,4	980 873

	8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00}				3,7 4,0 4,6 4,7 5,6	780 691 620 543 478
15280915	28.09.15 8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,8	3,5 3,7 4,0 4,3 4,7 4,9 5,7	995 880 782 696 630 561 496
16011015	01.10.15 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00} 15^{00} 16^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,4	3,6 3,8 3,9 4,2 4,6 4,8 5,5	850 759 672 600 539 477 413
17051015	05.10.15 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00} 15^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,3	3,9 4,1 4,3 4,6 4,7 4,9 5,8	940 840 742 667 591 530 467

18081015	08.10.15 8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 15^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,4	3,1 3,4 3,8 4,2 4,7 4,9 5,6	745 665 591 525 472 420 357
19121015	12.10.15 8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,5	3,2 3,5 3,8 4,0 4,6 4,8 5,4	987 880 783 698 620 555 493
20151015	15.10.15 8^{00} 9^{00} 10^{00} 11^{00} 12^{00} 13^{00} 14^{00}	Мутновато-опалесцирующ.	Соответствует	5,8	3,0 3,3 3,8 4,1 4,5 4,8 5,7	1020 908 811 723 645 572 509

В результате проведенных исследований был установлен срок годности РФП, который составил 5 ч от момента приготовления. Критическим показателем явилась радиохимическая примесь, содержание которой возрастает при дальнейшей инкубации РФП. Через 6 часов после изготовления величина РХП достигает значений 5,4 - 5,7 %, что не соответствует нормативным требованиям к качеству РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Влияние на количество РХП в готовом препарате может оказывать реагент (срок и условия его хранения), а также радиохимические примеси соединений технеция-99м, не вступившего во взаимодействие с субстанцией.

4.6 Определение срока хранения реагента для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

В основу определения срока хранения реагента положено изучение стабильности лекарственного средства с использованием химических и физико-химических методов анализа, указанных в общих фармакопейных статьях, а также, в случае необходимости, других специальных методов исследований.

Для изучения стабильности реагента были отобраны образцы от 10 серий для долгосрочных и ускоренных испытаний. Образцы отобраны в количестве 10 штук от каждой серии для «ускоренного старения» и по 10 штук от каждой серии для долгосрочного хранения. Перед закладкой на хранение все лекарственные средства подвергают полной проверке по всем показателям в объеме требований действующей нормативно-технической документации. В дальнейшем контролируются только те показатели, которые могут изменяться в процессе хранения. В нашем случае критическим показателем является количество РХП в препарате, содержание которой не должно превышать 5%.

При **ускоренных испытаниях** в течение всего эксперимента строго соблюдался температурноый режим. Для этого использовали термостаты, позволяющие поддерживать температуру на заданном уровне.

Образцы хранились при температуре +40^{0}С в течение 115 дней. Первые испытания образцов проводились через 15 суток, последующие испытания с интервалом 30 дней.

Результаты анализа образцов при ускоренном испытании представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11 - Определение радиохимической примеси в РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» при определении стабильности реагента методом ускоренного хранения.

№ серии	№ пробы	Определение РХП, %			
		на 15 сутки хранения	на 45 сутки хранения	на 75 сутки хранения	на 105 сутки хранения
11140915	1	4,1	4,2	4,4	4,6
	2	4,3	4,4	4,4	4,7
12170915	1	4,4	4,4	4,5	4,7
	2	4,2	4,3	4,6	4,6
13210915	1	3,8	3,9	4,3	4,8
	2	3,7	4,0	4,4	4,7
14240915	1	4,5	4,5	4,5	4,5
	2	4,6	4,7	4,6	4,8
15280915	1	4,1	4,3	4,5	4,7
	2	4,3	4,4	4,5	4,5
16011015	1	4,1	4,4	4,6	4,6
	2	4,4	4,3	4,7	4,9
17051015	1	4,4	4,5	4,6	4,7
	2	4,5	4,5	4,5	4,7
18081015	1	4,5	4,5	4,6	4,8
	2	4,3	4,5	4,5	4,5
19121015	1	4,4	4,4	4,4	4,6
	2	4,3	4,5	4,5	4,8
20151015	1	4,3	4,3	4,6	4,6
	2	4,4	4,5	4,7	4,9

Одновременно проводили «долгосрочные испытания» (испытания в реальном времени) в условиях, максимально приближенных к предполагаемым условиям хранения ЛС в процессе реализации. Образцы хранили при температуре

25±2ºС в складском помещении. Температура в помещении регистрируется с помощью термометра со шкалой от -50^{0}С до +50^{0}С. Контрольно-измерительные приборы установлены в центре помещения на высоте 1,5 м от пола и удалены от отопительных приборов и дверей на 2 м [255].

Испытания образцов при долгосрочных испытаниях проводились с интервалом в 3 месяца. Результаты представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12 - Определение радиохимической примеси в РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» при определении стабильности реагента методом долгосрочных испытаний (испытания в реальном времени).

№ серии	№ пробы	Определение РХП, %			
		Через 3 месяца хранения	Через 6 месяцев хранения	Через 9 месяцев хранения	Через 12 месяцев хранения
11140915	1	4,2	4,4	4,5	4,6
	2	4,3	4,4	4,5	4,6
12170915	1	4,3	4,2	4,5	4,6
	2	4,2	4,5	4,7	4,7
13210915	1	3,9	4,1	4,4	4,6
	2	4,0	4,3	4,5	4,6
14240915	1	4,4	4,4	4,4	4,6
	2	4,4	4,6	4,7	4,8
15280915	1	4,1	4,4	4,6	4,6
	2	4,4	4,5	4,5	4,6
16011015	1	4,1	4,4	4,4	4,5
	2	4,2	4,6	4,7	4,7
17051015	1	4,4	4,5	4,6	4,7
	2	4,2	4,5	4,6	4,8
18081015	1	4,3	4,5	4,7	4,9
	2	4,2	4,5	4,5	4,7
19121015	1	4,4	4,5	4,6	4,8
	2	4,2	4,5	4,6	4,9
20151015	1	4,4	4,5	4,7	4,7
	2	4,4	4,4	4,7	4,8

По результатам полученных данных можно сделать вывод об отсутствии факторов, ведущих к дестабилизации реагента при его хранении в течение 12 месяцев. Соответственно, не выявлено ухудшение качества РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» при приготовлении препарата из реагента с таким сроком хранения. В результате проведенных исследований по изучению стабильности лекарственного средства, определен срок годности реагента, вид упаковки, требуемые условия хранения и транспортирования. Эти данные будут внесены в проект нормативной документации.

4.7 Разработка нормативной документации на РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Согласно требованиям, действующей ОФС 1.11.0001.15 «Радиофармацевтические лекарственные препараты» [205] контроль качества РФП, который приготовленного из реагента (лиофилизата) и препарата, содержащего радионуклид для мечения, путем их смешивания, должен подвергаться различным тестам на подлинность используемых субстанций, входящих в состав реагента. Перечень показателей качества, которым должны соответствовать радиофармацевтические препараты экстемпорального изготовления, включает следующие пункты:

Лиофилизат или реагент:

- состав;
- описание;
- растворимость;
- подлинность;
- прозрачность;
- цветность;
- pH;

- компоненты;
- бактериальные эндотоксины или пирогенность;
- стерильность;
- упаковка;
- маркировка;
- транспортирование;
- хранение;
- срок годности.

Вводимый препарат:

- состав;
- описание;
- pH;
- объёмная активность;
- радиохимическая чистота (радиохимические примеси);
- хранение;
- срок годности;
- меры предосторожности.

Методы, при помощи которых осуществляют контроль качества препарата по перечисленным выше показателям описанны в методической части работы или приведенны в Государственной фармакопее Российской федерации, XIII изд., тома 1, 2 и 3 (ГФ XIII) [205].

Показатели качества реагента и РФП, методы их контроля приводятся в Спецификации, которая является обязательным разделом «Фармакопейной статьи» на производство РФП [255].

Лиофилизат состав:

Активные вещества:

Гамма-оксида алюминия нанопорошок (ТУ 2164-003-03069303-2014)	0,10 – 0,25 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,07 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	8,0 – 10,0 мг

Вспомогательные вещества

Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95) около 1,0 мг

Описание лиофилизата проводили визуальным методом. Лиофилизат должен быть в виде порошка белого цвета или пористой массы.

Время растворения. Содержимое флакона должно растворяться в 4 мл раствора натрия хлорида 0,9 % для инъекций не более 120 сек (2 мин). Время растворения лиофилизата во всех случаях составило от 80 до 100 сек.

Подлинность устанавливали по алюминию, олову дихлориду дигидрату, аскорбиновой кислоте и желатину. Испытание на алюминий проводили используя эмиссионный спектральный анализ по статье «Радиофармацевтические препараты» (ГФ XIII, том 2, с.987). В эмиссионном спектре препарата должны обнаруживаться характерные линии с длинами волн (нм): 308,22 и 309,27. Определение подлинности остальных компанентов проводили методом УФ-спектрофотометрии. По олову дихлориду дигидрату: ультрафиолетовый спектр раствора, приготовленного для определения дихлорида олова, должен иметь максимум поглощения при длине волны 353±2 нм в области длин волн от 340 до 370 нм. Приготовление раствора сравнения описано в разделе «Олова дихлорид дигидрат». По аскорбиновой кислоте: ультрафиолетовый спектр раствора, приготовленного путем добавления к 0,4 мл раствора лиофилизата (приготовление см. в разделе «Время растворения») 9,6 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, в области длин волн от 230 до 280 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 255±2 нм. По желатину: ультрафиолетовый спектр раствора должен иметь максимум поглощения при длине волны 540 нм.

Прозрачность и цветность раствора определяли визуальным методом (ГФ XIII, ч. 1, с. 534, 542). Во всех случаях раствор лиофилизата был опалесцентным и имел белесоватый оттенок.

Для определения pH использовали метод потенциометрии (ГФ XIII, т. 1, с.526). Полученные значения pH находились в пределах от 2,0 до 4,0.

Лиофилизат выдерживает требования ОФС.1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» [203].

Для количественного определения содержания во флаконах с реагентами алюминия, олова дихлорида дигидрата, аскорбиновой кислоты и желатина использовали методики, приведённые в разделах 4.1 - 4.4 данной главы. Результаты, полученные на опытных сериях реагентов, показали, что содержание алюминия и олова в реагентах составляет 0,127-0,129 мг и 0,0504 - 0,0520 мг на флакон соответственно, количество аскорбиновой кислоты находилось в пределах 0,812-0,816 мг на флакон, а желатина в пределах 9,38 - 10мг на флакон.

Определение бактериальных эндотоксинов и стерильности реагентов проводилось по методикам, представленным в разделе 2.5 главы «Материалы и методы». Исходя из полученных данных, растворы реагентов были стерильными, содержание бактериальных эндотоксинов не превышало 52,6 ЕЭ на флакон или не более 26,5 ЕЭ на 1 мл исходного раствора реагента, что соответствует требованиям к качеству лиофилизатов по этим показателям.

В результате изучения стабильности лекарственного средства, определен срок годности реагента, вид упаковки, требуемые условия хранения и транспортирования. Срок годности реагента составляет 12 мес.

После введения во флакон с реагентом раствора натрия пертехнетата, ^{99m}Tc и инкубации при температуре 70 - 80ºС в течение 30 мин. получается РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» имеющий следующий сотав (на 1 мл):

Активные вещества:

Технеций-99м, адсорбированный на оксиде алюминия (ФТИ ТПУ – Россия; НИФХИ им. Л.Я. Карпова - Россия)	280-500 МБк

Вспомогательные вещества:

Алюминия оксид (ТУ 2164-003-03069303-2014)	0,025 – 0,063 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,0175 мг
Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95)	0,20 – 0,25 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	2,0– 2,5 мг

Натрия хлорид (ФС 42-2572-95) 9,0 мг

Вода для инъекций (ФС 42-2620-97) до 1 мл

Описание радиофармпрепарата проводили визуальным методом. Раствор препарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» должен быть слабо опалесцирующим.

Для определения pH использовали метод потенциометрии (ГФ XIII, т. 1, с.526). Полученные значения pH находились в пределах от 2,0 до 4,0.

Объёмная активность ^{99m}Tc в РФП определяется его объёмной активностью в растворе натрия пертехнетата, ^{99m}Tc используемом для приготовления РФП, и находилась в пределах от 280 до 500 МБк/мл на время приготовления.

Для определения радиохимической чистоты готовили пластины размером 20×150 мм тип «Sorbfil». Отступали от края пластины на 15 мм (линия старта) и наносили 5 мкл РФП. После высушивания пятна, пластину помещали в подготовленную камеру. Хроматографическую камеру предварительно наполняли ацетоном (подвижная фаза) с высотой слоя на дне камеры 1 см.

Для распределения подвижных пертехнетат-ионов ^{99m}Tc(VII) по хроматографической пластине достаточно 10 мин хроматографирования. В указанных условиях пертехнетат,^{99m}Tc-ионы продвигаются с фронтом растворителя, а меченный ^{99m}Tc наноколлоид гамма-оксида алюминия остается на линии старта. Полученную хроматограмму высушивали при комнатной температуре. После обклеивали «липкой» лентой с двух сторон. и измеряли скорость счёта от участка, содержащего пертехнетат-ионы, и от всей хроматограммы радиометрическим методом. Радиохимическая чистота препарата должна быть не менее 93,0 %.

Качественный и количественный состав радионуклидных примесей, также как и химических примесей, в Спецификации на РФП «Наноколлоид ^{99m}Tc-Al_2O_3» не приводится, поскольку их содержание определяется составом примесей в используемом для приготовления препарата растворе натрия пертехнетата,^{99m}Tc.

Определен срок годности РФП, который составил 5 ч со времени приготовления.

В результате проведенных исследований, обоснован состав радиофармацевтического препарата для диагностики сторожевых лимфатических узлов и осуществлена его стандартизация. Подготовлен проект фармакопейной статьи предприятия [256] (Приложение 3) и опытно-промышленного регламента (Приложение 4).

Основным технологическим документом является Регламент. Данный документ устанавливает: «технологические методы, технологические средства, нормы и нормативы которые обеспечивают безопасность работ и достижение оптимальных технико-экономических показателей для осуществления процесса производства продукции» [258].

Опытно-промышленный регламент (ОПР): «Технологический документ, которым завершается отработка новой технологии производства лекарственного средства на опытно-промышленной установке. ОПР используется для наработки опытных образцов (партий) новых лекарственных средств в полупроизводственных условиях, отработки качественных показателей нового лекарственного средства, вводимых в нормативную документацию (ФСП, ТУ) и при составлении данных для проектирования промышленного производства новой продукции» [256].

На базе материалов научных исследований и экспериментальных работ был создан лабораторный регламент, который лег в основу ОПР. Главная задача при составлении регламента состояла в разработке оптимального технологического процесса производства продукции, отработке всех технико-экономических сведений, необходимых для проектирования производства продукции на заданную мощность.

«Опытно-промышленный регламент на производство лиофилизата для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3» (ОПР-14402245-02-14)» [256] созданный при выполнении диссертации, был аппробирован при наработке образцов РФП для проведения доклинических испытаний в НИИ онкологии Томского НИМЦ.

4.8 Выводы по главе

1. Приведены методы аналитического контроля качества радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» согласно ОСТ «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. № 91500.05.001-00.

2. С использованием разработанных методов анализа проведена апробация методик качественного и количественного определения основных компонентов реагента: оксида алюминия, дихлорида олова, желатина и кислоты аскорбиновой с учетом их взаимного влияния на результаты анализа.

3. Определен срок годности РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», который составил 5 часов со времени приготовления.

4. Определен срок хранения реагента для приготовления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Проведенные исследования подтверждают сохранение качественного и количественного состава реагента в предложенных условиях «ускоренного старения», соответствующих заявленному сроку хранения в 1 год.

5. Предложен проект Спецификации для наработки опытных партий препарата, как основной раздел для подготовки «Фармакопейной статьи предприятия» на производство радиофармацевтического препарата.

7. Разработан проект ФСП и опытно-промышленного регламента на новый радиофармпрепарат «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследований, проведенным при выполнении диссертационной работы, можно сделать следующие общие выводы:

1. Исследован круг исходных субстанций для получения наноразмерных коллоидов с регулируемыми свойствами на основе органических и неорганических матриц.

2. Разработаны методы получения трех наноколлоидных препаратов. Первый тип создан на основе металлохелатов с химически модифицированными комплексонами диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА). Радиохимический выход наноколлоида с размером частиц 50 – 100 нм в готовом РФП составляет порядка 80% при радиохимической чистоте продукта 92-95 %. Накопление препарата в лимфоузле находится на уровне 1,5 %, что позволяет использовать препарат для проведения гамма-сцинтиграфических исследований. Второй тип разработан на основе наночастиц железа Fe@C, покрытых углеродной оболочкой, с присоединенной к ней через ковалентные связи фрагментами бензилдиметилен-аминоуксусной кислоты. Выход меченного технецием-99м коллоида Fe@C (АДТ) с размером частиц менее 100 нм составляет 97 %, РХЧ продукта составляет 94 %. Уровень накопление препарата в лимфоузле 1,7 %. Третий тип наноколлоида создан впервые в мировой практике. Для его получения используется более простая методика, основанная на проведении адсорбции технеция-99м на порошке гамма-оксида алюминия с размером частиц в пределах 50-100 нм, обеспечивающая радиохимический выход целевого продукта более 90 %.

3. Разработана методика приготовления стандартного набора к генератору технеция-99м в виде лиофилизата для получения РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3». Определен срок годности лиофилизированного реагента, который составил 1 год.

4. Разработаны методики качественного и количественного анализа РФП. Установлены показатели качества, на основе которых составлена спецификация на реагент и радиофармпрепарат. Подготовлен проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП).

5. На экспериментальных животных доказана эффективность РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» для проведения диагностических исследований СЛУ. Показано, что РФП активно поступает из места инъекции в лимфатическую систему и накапливается в первом лимфатическом узле. Аккумуляция препарата в лимфоузле через 1–24 ч после подкожного введения РФП составляет 8,4-12,6% от введенной дозы. Все сказанное создает перспективы использования разработанного наноколлоидного препарата для проведения диагностики лимфатических узлов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в использовании данной технологии с целью создания новых диагностических РФП. Предложенные методологические подходы к разработке методик стандартизации радиофармпрепарата, могут быть реализованы с целью совершенствования методик качественного и количественного определения компонентов других РФП с использованием современных физико-химических и спектральных методов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает свою благодарность сотрудникам лаборатории №31 ИЯТШ Томского политехнического университета, сотрудникам отделения радионуклидной диагностики НИИ онкологии Томского НИМЦ за оказанную поддержку и содействие в организации и проведении представленных в работе исследований.

Автор выражает отдельную благодарность научному консультанту, доктору технических наук Скуридину Виктору Сергеевичу за помощь в выборе направления диссертационной работы и постоянную поддержку в ходе ее выполнения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Sn (II) – олово(II) хлорид дигидрат ($SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$)

Fe@C (АДТ) – модифицированные железо-углеродные частицы

^{99m}Tc – технеций-99м

$T_{1/2}$ – период полураспада

Al_2O_3 – гамма-оксид алюминия

АС – аттестованные смеси

БЭ – бактериальные эндотоксины

ЗНО – злокачественные новообразования

$ДТПА_{мод}$ – модифицированная диэтилентриамин-пентауксусная кислота

ЕЭ – единица эндотоксина

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина

ЛАЛ-реактив – лизат амебоцитов мечехвоста «Limulus polyphemus»

ЛС – лекарственное средство

МБк – мегаБеккерель

МДР – максимально допустимое разведение

ОПР – опытно-промышленный регламент

ПСБЭ – предельное содержание бактериальных эндотоксинов

РФП – радиофармацевтический препарат

РХЧ – радиохимическая чистота

СЛУ – сторожевой лимфатический узел

ФСП - фармакопейная статья предприятия

Список литературы

1. Тульская Т. И. Диагностические радиофармпрепараты / Тульская Т.И. // Медицина целевые проекты. – 2012. – №12. – С. 23 - 25.

2. Скуридин В. С. Инновационные радиофармпрепараты для диагностики в онкологии / Скуридин В. С., Чернов В.И., Лишманов Ю.Б. // Медицина: целевые проекты – 2015. – №21. – С. 30 - 33

3. Садкин В. Л. Получение меченного технецием-99м наноколлоида на основе гамма-оксида алюминия для медицинской диагностики: дис. канд. техн. наук: / Садкин Владимир Леонидович. – Томск, 2014. – 110 с. https://esu.citis.ru/dissertation/0aLD000KApXG15JGvs2cLb00

4. Куренков Н. В. Применение радионуклидов для диагностики и терапии в США / Куренков Н.В. // Атомная техника за рубежом. – 2001. – № 11. – С. 11 - 15.

5. Семиглазов В. Ф. Новое направление в сберегательном и органосохраняющем хирургическом лечении злокачественных опухолей / Семиглазов В. Ф. // Медицинский вестник. – 2009. – № 35 (504). – С.12 - 24.

6. Abu-Rustum N.R. Tehniques of sentinel lymph node identification for early-stage cervical and uterine cancer / Abu-Rustum N.R., Knoury-Collado F., Gemignani M.L. // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 111 (2). – P. 44 - 50.

7. Altgassen C. Multicenter validacion study of the sentinentel lymph node concept in cervical cancer: AGO Study Group / Altgassen C., Hertel H. [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26. – P. 2943 - 2951.

8. Чернышова А.Л. Определение сторожевых лимфатических узлов при хирургическом лечении рака шейки матки, А.Л. Чернышова А.Ю. Ляпунов, Л.А. Коломиец, В.И. Чернов, И.Г. Синилкин / Сибирский онкологический журнал. - 2012. -№ 3 (51). – с. 5-10

9. Seong S.J. Detection of sentinel lymph nodes in patients with early stage cervical cancer / Seong S.J., Park H., Yang K.M. [et al.] // J. Korean Med. Sci. – 2007. – Vol. 22 (1). – P. 105 - 109.

10. Кузнецов В.В. Хирургия инвазивного рака шейки матки / Кузнецов В.В., Лебедев А.И., Морхов К.Ю., Грицай А.Н. // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3. – № 3. – С. 178 - 182.

11. Hauspy J. Sentinel Lymph Node in early stage cervical cancer / Hauspy J., Beiner M., Harley A. // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 108 (1). – P. 256 – 257.

12. Levenback C. Update on sentinel lymph node biopsy in gynecologic cancers / Levenback C. // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 111. (2). – P. 42 - 43.

13. Асиновсков И. Г. Интраоперационная диагностика сторожевых лимфатических узлов у больных раком щитовидной железы в определении тактики хирургического лечения: дис. канд. мед. наук: / Асиновсков Илья Геннадьевич. – Москва, 2012. – 125 с.

14. Cooper D. S. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer / Cooper D.S., Doherty G.M., Haugen B.R., Kloos R.T., Lee S.L., Mandel S.J., Mazzaferri E.L., McIver B., Pacini F., Schlumberger M. [et al.] // Thyroid. – 2009. – Vol. 19 – P. 1167 - 1214. doi:10.1089/thy.2009.0110

15. Важенин А. В. Превентивная лимфаденэктомия в комплексном лечении меланомы кожи туловища и конечностей / ВаженинА.В., Привалов А.В., Яйцев С.В., Ахметов И.Р. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2011. – N 1. – С.11 – 14.

16. Романчишен А.Ф. Профилактическая центральная лимфаденэктомия – безопасный метод выбора операции у больных раком щитовидной железы / Романчишен А.Ф., Романчишен Ф.А., Вабалайте К.В. // Опухоли головы и шеи. – 2013. – №2. – С. 21 – 24.

17. Degiuli M. Gastric cancer: Current status of lymph node dissection / Degiuli M., De Manzoni G., Di Leo A., D'Ugo D. [et al.] // World J Gastroenterol. – 2016. – Vol. 22(10). – P. 2875 - 93.

18. Hubalek M. Axillary Dissection in the Case of Positive Sentinel Lymph Nodes: Results of the Innsbruck Consensus Conference / Hubalek M., Bartsch R., Gnant M., Kapp K. S. [et al.] // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2012. – Vol. 72(4). – P. 293 - 298.

19. Ishimoto T. Laparoscopic lateral lymph node dissection technique and short-term results in our hospital / Ishimoto T., Nakanishi M., Konishi H., Murayama Y., [et al.] // Ryoho. – 2013. – Vol. 40 (12). – P. 1924 - 1926.

20. Minicozzi P. Management of rectal cancers in relation to treatment guidelines: a population-based study comparing Italian and French patients. / Minicozzi P., Bouvier A. M., Faivre J., Sant M. // Dig Liver Dis. – 2014. – Vol. 46 (7). – P. 645 - 51.

21. Wu X, Li B. Hepatectomy Versus Hepatectomy With Lymphadenectomy in Hepatocellular Carcinoma: A Prospective, Randomized Controlled Clinical Trial / Wu X., Li B., Qiu J., Shen J., Zheng Y., Li Q. [et al.] // J Clin Gastroenterol. – 2015. – Vol. 49(6). – P. 520 - 8.

22. Вельшер Л. З. Сторожевые лимфатические узлы при раке молочной железы / Л. З. Вельшер, Д. Н. Решетов, З. Р. Габуния и др. // Опухоли жен. репр. системы. – 2007. – №1. – С. 23 - 25.

23. Чернов В. И. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов / Чернов В. И., Афанасьев С. Г., Синилкин И. Г. [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2008. – № 4 (28). – С. 5 - 10.

24. Eiriksson L. R. Sentinel lymph node mapping in cervical cancer: the future? / Eiriksson L. R., Covens A. // Gynaecological oncology. – 2012. – Vol. 119 (2). – P. 129 – 133.

25. Matheoud R. Minimum acceptable sensitivity of intraoperative gamma probes used for sentinel lymph node detection inmelanoma patients / Matheoud R., Giorgione R., Valzano S., Sacchetti G. [et al.] // Phys Med. – 2014. – Vol. 30(7). – P. 822 - 6.

26. Meves A. Suman Tumor Cell Adhesion As a Risk Factor for Sentinel Lymph Node Metastasis in Primary Cutaneous Melanoma / Meves A., Nikolova E.,

Heim J. B., Squirewell E. J. [et al.] // J Clin Oncol. – 2015. – Vol. 33(23). – P. 2509 - 15.

27. Sarafianou E. Nuclear medicine techniques in Merkel cell carcinoma: A case report and review of the literature / Sarafianou E, Kritikos N, Priftakis D, Stavrinides S, Kleanthous S // Oncol Lett. – 2015. – Vol. 10(3). – P. 1610 - 1616.

28. Vasques P. Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph node biopsy in human breast cancer / Vasques P.H., Alves M.M., Aquino R.G., Torres RV, [et al.] // Acta Cir Bras. – 2015(11). – P. 785 - 90.

29. Yan J. A multicenter study of using carbon nanoparticles to show sentinel lymph nodes in early gastric cancer / Yan J., Zheng X., Liu Z., Yu J. // Surg Endosc. – 2015. – Vol. l 7. – [Epub ahead of print]

30. Yanagita S. The clinical usefulness of the intraoperative detection of sentinel lymph node metastases by a rapid RT-PCR system in patients with gastric cancer / Yanagita S., Uenosono Y., Arigami T., Daisuke M. [et al.] // Cancer. – 2016. – Vol. 122(3). – P. 386 - 92. doi: 10.1002/cncr.29740

31. Zanghì G. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer New indications and our experience / Zanghì G, Rinzirillo NM, Caponnetto AM, [et al.] // Ann Ital Chir. – 2015 (86). – P. 508 - 12.

32. Zarghami N. Detection of Superior Markers for Polymerase Chain Reaction Diagnosis of Breast Cancer Micrometastasis in Sentinel Lymph Nodes / Zarghami N., Alizadeh Shargh S., Movafagh A., [et al.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2016 (17). – P. 179 - 83.

33. Chakravarty R. Preparation of clinical-scale 99Mo/99mTc column generator using neutron activated low specific activity 99Mo and nanocrystalline γ-Al2O3 as column matrix / Chakravarty R., Ram R., Dash A., Pillai M. R. // Nucl Med Biol. – 2012. – Vol. 39(7). – P. 916 - 22.

34. Dapueto R. Technetium glucose complexes as potential cancer imaging agents / Dapueto R., Aguiar R. B., Moreno M., Machado C. M. [et al.] // Bioorg Med Chem Lett. – 2015. – Vol. 25(19). – P. 4254-9.

35. Costa P. H. Scintigraphic imaging with technetium-99M-labelled ceftizoxime is a reliable technique for the diagnosis of deep sternal wound infection in rats / Costa P. H., Diniz S.O., Cardoso V.N., Tarabal B. [et al.] // Acta Cir Bras. – 2015. – Vol. 30(9). – P. 632 - 8.

36. Dudhia J. In Vivo Imaging and Tracking of Technetium-99m Labeled Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Tendinopathy / Dudhia J., Becerra P., Valdés M.A., Neves F.[et al.] // J Vis Exp. – 2015. – Vol. 106.

37. Fernandes R. S. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification / Fernandes R. S., Silva J.de O., Lopes S.C., Chondrogiannis S. [et al.] / Nucl Med Commun. – 2016. – Vol. 37(3). – P. 307 - 12.

38. Grady E. Gastrointestinal Bleeding Scintigraphy in the Early 21st Century / Grady E. // J Nucl Med. – 2016. – Vol. 57(2). – P. 252 - 9.

39. Khan I. Development and bioevaluation of (99m)Tc(CO)3-labeled (1-azido-1-deoxy-β-D-glucopyranoside) complex as a potential tumor-seeking agent / Khan I., Shahid A., Dar U.K., Ahmad F. // Pak J Pharm Sci. – 2016. – Vol. 29 (1). – P. 213 - 9.

40. Kikuchi M. Preoperative Diagnostic Strategy for Parotid Gland Tumors Using Diffusion-Weighted MRI and Technetium-99m Pertechnetate Scintigraphy: A Prospective Study / Kikuchi M., Koyasu S., Shinohara S., Imai Y., Hino M., Naito Y. // PLoS ONE. – 2016. – 11(2).

41. Kim D.W. Tc-99m Glu-Cys-Gly-His-Gly-Lys (ECG-HGK), a novel Tc-99m labeled hexapeptide for molecular tumor imaging / Kim D.W., Kim M. H., Kim C. G. //J Labelled Comp Radiopharm. – 2016. .doi: 10.1002/jlcr.3378.

42. Mackie S.L. Accuracy of musculoskeletal imaging for the diagnosis of polymyalgia rheumatica: systematic review / Mackie S.L., Koduri G., Hill C. L., Wakefield R. J. [et al.] // RMD Open. – 2015. – Voi. 13(1). doi: 10.1136/rmdopen-2015-000100

43. Notopoulos A. The diagnostic performance of (99m)Tc-HMPAO radiolabeled leucocytes scintigraphy in the investigations of infection. A single center

experience / Notopoulos A., Likartsis C., Zaromytidou E., Petrou I. [et al.] // Hell J Nucl Med. – 2015. – Vol. 1. – P. 23 - 8.

44. Papantoniou V. L. Imaging of cardiac amyloidosis by (99m)Tc - PYP scintigraphy / Papantoniou V. L., Valsamaki P., Kastritis S., [et al.] // Hell J Nucl Med. – 2015. – Vol. 1 (42). – P. 50.

45. Xue S. ^{99m}Tc-Labeled Iron Oxide Nanoparticles for Dual-Contrast (T1/T2) Magnetic Resonance and Dual-Modality Imaging of Tumor Angiogenesis / Xue S., Zhang C., Yang Y., Zhang L., Cheng D. [et al.] // J Biomed Nanotechnol. – 2015. – Vol. 11(6). – P. 1027 - 37.

46. Salvarese N. Novel [99mTcIII(PS)2(Ln)] mixed-ligand compounds (PS = phosphino-thiolate; L = dithiocarbamate) useful in design and development of TcIII-based agents: synthesis, in vitro, and ex vivo biodistribution studies / Salvarese N., Morellato N., Rosato A., Meléndez-Alafort L. [et al.] // J Med Chem. – 2014. – Vol. 57(21). – P. 8960 - 70.

47. Blanchard P. E.An unconventional method for measuring the Tc L3-edge of technetium compounds / Blanchard P. E., Reynolds E., Kennedy B. J., Ling C. D. [et al.] // J Synchrotron Radiat. – 2014. – Vol. 21(6). – P. 1275 - 81.

48. Braband H. J. High-valent technetium chemistry - new opportunities for radiopharmaceutical developments / Braband H. J. // Labelled Comp Radiopharm. – 2014. – Vol. 57(4). – P. 270 - 4.

49. Dilworth J. R. Synthesis of sulfonamide conjugates of Cu(II), Ga(III), In(III), Re(V) and Zn(II) complexes: carbonic anhydrase inhibition studies and cellular imaging investigations / Dilworth J. R., Pascu S. I., Waghorn P. A., Vullo D. [et al.] // Dalton Trans. – 2015. – Vol. 44(11). – P. 4859 - 73.

50. Kharissova O.V. Metal complexes containing natural and and artificial radioactive elements and their applications / Kharissova O.V., Méndez-Rojas M. A., Kharisov B. I., Méndez U. O. // Molecules. – 2014. – Vol. 19(8). – P. 10755 - 802.

51. Makris G. Synthesis, characterization, and biological evaluation of new biotinylated (99m)Tc/Re-tricarbonylcomplexes // Makris G., Papagiannopoulou D. J. // Labelled Comp Radiopharm. – 2016. – Vol. 59(3). – P. 95 - 102.

52. North A. J. Toward hypoxia-selective rhenium and technetium tricarbonyl complexes / North A. J., Hayne D. J., Schieber C., Price K. // Inorg Chem. – 2015. – Vol. 54(19). – P. 9594 - 610.

53. Poineau F. Recent advances in technetium halide chemistry / Poineau F., Johnstone E. V., Czerwinski K. R., Sattelberger A. P. //Acc Chem Res. – 2014. – Vol. 47(2). – P. 624 - 32.

54. Rodríguez - Hermida S. A Hexameric Cationic Copper (II) Metallacrown as a Pertechnetate and Perrhenate Scavenger / Rodríguez - Hermida S., Lago A. B., Pino-Cuevas A., Hagenbach A., [et al.] // Chemistry. – 2016. – Vol. 22(5). – P. 1847 - 53.

55. Wang Y. Gas-phase chemistry of technetium carbonyl complexes / Wang Y., Qin Z., Fan F. L., Haba H. [et al.] // Chem Phys. – 2015. – Vol. 17(20). – P. 13228 - 34.

56. Buroni F. E. A sensitive, rapid and inexpensive method to assess aluminium (III) ions in technetium eluates / Buroni F. E., Lodola L., Persico M. G., Aprile C. // Nucl Med Commun. – 2014. – Vol. 35(7). – P. 777 - 80. doi: 10.1097/MNM.0000000000000108

57. Catania S. Mondor’s disease and breast cancer / Catania S., Zurrida S., Veronesi P. [et al.] // Cancer. – 1992. – Vol. 69(9). – P. 2267 - 70.

58. Chakravarty R. An electrochemical procedure to concentrate 99mTc availed from a zirconium [99Mo] molybdate gel generator / Chakravarty R., Sarkar S. K., Venkatesh M., Dash A. // Appl Radiat Isot. – 2012. – Vol. 70(2). – P. 375 - 9. doi: 10.1016/j.apradiso.2011.09.024

59. Chung K. H. Design and performance of an automated radionuclide separator: its application on the determination of ^{99}mTc in groundwater / Chung K. H., Choi S. D., Choi G. S., Kang M. J. // Appl Radiat Isot. – 2013. – Vol. 81. – P. 57 - 61.

60. Dash A. 99Mo/(99m)Tc separation: an assessment of technology options / Dash A., Knapp F. F., Pillai M. R. // Nucl Med Biol. – 2013. – Vol. 40(2). – P. 167 - 76. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.10.005

61. Dash A. Development of a 99Mo/99mTc generator using alumina microspheres for industrial radiotracer applications / Dash A., Chakravarty R., Ram R., Pillai K. T. [et al.] // Appl Radiat Isot. – 2012. – Vol. 70(1). – P. 51 - 8.

62. Galea R. A comparison of rat SPECT images obtained using (99m)Tc derived from 99Mo produced by an electron accelerator with that from a reactor / Galea R. A., Wells R. G., Ross C. K., Lockwood J. [et al.] // Phys Med Biol. – 2013. – Vol. 58(9). – P. 2737 - 50.

63. Métayé T. The presence of sodium nitrate in generator eluate decreases the radiochemical purity of 99mTc-sestamibi / Métayé T., Rosenberg T., Guilhot J., Bouin-Pineau M. H., Perdrisot R. // J Nucl Med Technol. – 2012. – Vol. 40(3). – P. 187 - 93.

64. Monroy-Guzman F. Production optimization of 99Mo/99mTc zirconium molybate gel generators at semi-automatic device: DISIGEG. / Monroy-Guzman F., Rivero Gutiérrez T., López Malpica I. Z., Hernández Cortes S. [et al.] // Appl Radiat Isot. – 2012. – Vol. 70(1). – P. 103 - 11.

65. Pillai M. R. Diversification of 99Mo/99mTc separation: non–fission reactor production of 99Mo as a strategy for enhancing 99mTc availability / Pillai M. R., Dash A., Knapp F. F. // J Nucl Med. – 2015. – Vol. 56(1). – P. 159 - 61.

66. Pillai M. R. Molybdenum-99 production from reactor irradiation of molybdenum targets: a viable strategy for enhanced availability of technetium-99m / Pillai M. R., Knapp F. F. // Jr.Q J Nucl Med Mol Imaging. – 2012. – Vol. 56(4). – P. 385 – 99.

67. Pillai M. R. Sustained availability of 99mTc: possible paths forward // Pillai M. R., Dash A., Knapp F. F. // Jr. J Nucl Med. – 2013. – Vol. 54(2). – P. 313 - 23. doi: 10.2967/jnumed.112.110338

68. Mushtaq A. Future of low specific activity molybdenum-99/technetium-99m generator / Mushtaq A. // Curr Radiopharm. – 2012. – Vol. 5(4). – P. 325 - 8.

69. Osso J. A. Technetium-99m -- new production and processing strategies to provide adequate levels for SPECT imaging / Osso J. A., Catanoso M. F., Barrio G., Brambilla T. P. [et al.] // Curr Radiopharm. – 2012. – Vol. 5(3). – P. 178 - 86.

70. Ляпунов А.В. Радионуклидные методы выявления сторожевых лимфатических узлов при органосохраняющем лечении инвазивного рака шейки матки у больных репродуктивного возраста: дис. канд. мед. наук: / Ляпунов Александр Юрьевич. – Томск, 2017. – 131 http://www.tnimc.ru/upload/dissovet/dissovet-onco/soiskateli/2017-12/lyapunov/diss_tekst.pdf

71. Tsopelas C. The radiopharmaceutical chemistry of 99mTc-tin fluoride colloid-labeled-leukocytes / Tsopelas C. // The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging. – 2005. – Vol. 49. – P. 319 – 324.

72. Sang H. P. Rapid Synthesis and Biological Evaluation of a 99mTc-Labeled Antimony Sulfide Nanocolloid/ Sang H. P., Kyong-Cheol K. //Journal of Radiation Industry. – 2007. – Vol. 1 (2). – P. 87 - 90.

73. Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии: Доклады 11-й межд. научн.конф. Книга 1 – Владимир: 2014. с. – 416

74. Sampson C.B. Textbook of Radiopharmacy Theory and Practice / Sampson C.B. – 2nd ed. London, United Kingdom: Gordon and Breach, 1994. – 196 p.

75. Schauer A. The Sentinel Lymph Node Concept / Schauer A., Becker W., Reiser M., Possinger K., 2005. – P. 565.

76. Садкин В. Л. Синтез наноколлоидов на основе оксида алюминия / В. Л. Садкин, В. С. Скуридин, Е. С. Стасюк, Н. В. Варламова, А. С., Рогов, Е. А. Нестеров, Е. А. Ильина, Л. А. Ларионова // Изотопы: технологии, материалы и применение: материалы Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов. – Томск, 2014. – С. 83.

77. Skuridin V. S. Preparation Technique of Technetium-99m-Labeled Nanoparticles of Fe@C with Modified Surface / Skuridin V. S., Stasyuk E. S., Rogov A. S, Varlamova N. V., Nesterov E. A., Sadkin V. L., Postnikov P. S. // J. Advanced Materials Research. – 2014. – Vol. 1084. – P. 582 – 587.

78. Stasyuk E. Preparation of nanocolloids based on modified DTPA molecule labeled with technetium-99m / Stasyuk E., Skuridin V., Nesterov E., Sadkin V.L. [et al.]

// Book of Abstracts. The seventh Eurasian conference nuclear science and its application. – Baku, Azerbaijan, 2014. – pp. 283 - 284.

79. Онкология: учебник / М. И. Давыдов, Ш. Х. Ганцев. 2010. - 920 с.

80. Diaz-Ruiz M. Diagnostic Accuracy and Impact on Management of Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration to Detect Axillary Metastasis in Breast Cancer Patients: A Prospective Study / Diaz-Ruiz MJ, Arnau A, Montesinos J, Miguel A, [et al.] // Breast Care (Basel). – 2016. – Vol. 11(1). – P. 34 - 9.

81. Fujii T. Prediction of Extracapsular Invasion at Metastatic Sentinel Nodes and Non-sentinel Lymph Nodal Metastases by FDG-PET in Cases with Breast Cancer / Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Kuwano H // Anticancer Res. – 2016 (4). – P. 1785 - 9.

82. Lawrenz B. Fertility preservation in >1,000 patients: patient's characteristics, spectrum, efficacy and risks of applied preservation techniques / Lawrenz B., Jauckus J., Kupka M. S. [et al.] // Arch. Gynecol. Obstet. – 2010. – Vol. 283(3). – P. 651 - 656.

83. Wasif N. Regional recurrence in the era of sentinel lymph node biopsy / Wasif N, Linnaus M. E., Dueck A. C., Kosiorek H. E., [et al.] // Am J Surg. – 2015. – Vol. 210(6). – P. 1155 – 60.

84. Schneider A. Molecular Diagnosis for Nodal Metastasis in Endoscopically Managed Cervical Cancer: The Accuracy of the APTIMA Test to Detect High-risk Human Papillomavirus Messenger RNA in Sentinel Lymph Nodes / Schneider A, Köhler C, Le X, Dogan NU, [et al.] // J Minim Invasive Gynecol. – 2016. – P. S1553-4650.

85. Seki H. A Case of Glycogen-Rich Clear Cell Carcinoma of the Breast with Extensive Intraductal Components and Micrometastases to the Axillary Lymph Node / Seki H, Sasaki K, Morinaga S, Asanuma F, [et al.] // Gan To Kagaku Ryoho. – 2016. – Vol. 43(2). – P. 239 - 41.

86. Напалков Н. П. Общая онкология: Руководство для врачей / Под ред. Н. П. Напалкова. – Ленинград: Медицина, 1989.

87. Баггиш М. С. Атлас анатомии таза и гинекологической хирургии / Баггиш М. С., Каррам М. – Лондон: Изд-во Elsevier Ltd., 2009. – 1172 с.

88. Вельшер Л. З. Сторожевые лимфоузлы: их поиск и значение при раке молочной железы / Вельшер Л. З., Габуния З. Р., Праздников Э. Н. и др. // Современная онкология. – Т. 3. – № 3. – 2001. – С.42 – 45.

89. Акопов А. Л. Интраоперационное определение "сторожевых" лимфатических узлов при раке легкого (обзор) / А. Л. Акопов, Г. В. Папаян, И. В. Чистяков // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2015. – Т. 174. – № 1. – С. 96 - 102.

90. Пак Д. Д. Исследование сторожевых лимфатических узлов у больных с меланомой кожи /Д. Д. Пак, Е. А. Белова, Т. Н. Лазутина // Российский онкологический журнал. – 2008. – № 4. – С.10 - 17.

91. Чернышова А.Л. Выбор объема хирургического лечения у больных раком шейки матки / Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Синилкин И.Г., Чернов В.И., Ляпунов А.Ю. // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 2 (13). – С. 64 - 70.

92. Hauspy J. Sentinel Lymph Node in early stage cervical cancer / Hauspy J., Beiner M., Harley A. // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 108 (1). – P. 256 – 257.

93. Козаченко В. П. Клиническая онкогинекология: Руководство для врачей / Под ред. В.П. Козаченко. – М.: ОАО «Изд-во Медицина», 2005. – 431 с.

94. Чернов В.И., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Синилкин И.Г., [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. –2011. – Т. 56. – № 2. – С. 38 - 43.

95. Чернов В.И. Радионуклидные методы исследования в выявлении «сторожевых» лимфатических узлов / В.И. Чернов, С.Г. Афанасьев, И.Г. Синилкин, А.А. Тицкая, А.В. Августинович // Сиб. Онкол. Жур. – 2008. – №4. – С. 1 - 10.

96. Чернов В. И. Использование онкотропных радиофармпрепаратов для визуализации злокачественных новообразований / Чернов В.И., Медведева А. А., Зельчан Р. В., Синилкин И. Г., Слонимская Е. М.// Сибирский онкологический журнал. – 2015. – № 2. – С. 29 - 30.

97. Новикова Е. Г. Рак шейки матки. Онкология: клинические рекомендации. / Новикова Е. Г., Антипов В. А. Под ред. В. И. Чиссова, С. Л. Дарьяловой. – М.: Гэотар-Медиа, 2009. – С. 642 - 657.

98. Hertel H. Association of Gynecologic Oncologists (AGO): Radical vaginal trachelectomy (RVT) combined with laparoscopic pelvic lymphadenectomy: prospective multicenter study of 100 patients with early cervical cancer / Hertel H., Köhler C., Grund D. [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2006. – Vol. 103 (2). – P. 506 - 511.

99. Meyer J. Sentinel lymph node biopsy: Strategies for pathologic examination of the specimen / Meyer J. // J. Surg. Oncol. – 1998. – Vol. 69. – P. 212 - 218.

100. Takeda N. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy / Takeda N., Sakuragi N., Takeda M. [et al.] // Acta Obstet. Gynecol. Scand. – 2002. – Vol. 81. – P. 1144 - 1151.

101. Humeres A. P. Pre and intraoperative scintigraphic detection of sentinel nodes in breast cancer / Humeres A P, González J, González P, [et al.] // Rev Med Chil. – 2016. – Vol. 144(1). –P. 66 - 73.

102. Levenback C. Update on sentinel lymph node biopsy in gynecologic cancers / Levenback C. // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 111. (2). – P. 42 - 43.

103. Sakurai K. A Case of Pure Type Mucinous Carcinoma Recurrence after Local Control / Sakurai K, Enomoto K, Amano S // Gan To Kagaku Ryoho. – 2015. – Vol. 42(12). – P.1632 - 4.

104. Wan T. Investigation of individualized treatment based on sentinel lymph node biopsy for early-stage vulvar cancer / Wan T, Tu H, Huang H, Gu H, Feng Y, Liu J // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. – 2015. – Vol. 50(8). – P. 596 - 602.

105. Wang X. False-negative Frozen Section of Sentinel Lymph Node Biopsy in a Chinese Population with Breast Cancer / Wang X, Qiao G, Cong Y, Zou H, [et al.] // Anticancer Res. – 2016. – Vol. 36(3). – P. 1331 - 7.

106. Watanabe C. Sentinel Lymph Node Biopsy After Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With an Initial Diagnosis of Cytology-Proven Lymph Node-

Positive Breast Cancer / Watanabe C, Enokido K, Nakamura S, [et al.] // Clin Breast Cancer. – 2016. – P. S1526.

107. Wu D. I. Invasive ductal carcinoma within borderline phyllodes tumor with lymph node metastases: A case report and review of the literature / Wu DI, Zhang H, Guo L, Yan XU, Fan Z // Oncol Lett. – 2016. – Vol. 11(4). – P. 2502 - 2506.

108. Zanchetta M. The Use of CYFRA 21-1 for the Detection of Breast Cancer Axillary Lymph Node Metastases in Needle Washouts of Fine-Needle Aspiration Biopsies / Zanchetta M Liscia DS, Detoma P, Anrò P, [et al.] // Appl Immunohistochem Mol Morphol. – 2015. – P. 9.

109. Yarbro J. W. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference / Yarbro J. W., Page D. l., Fielding L. P. [et al.] // Cancer. – 1999. – Vol. 86 (11). – P. 2436 - 2446.

110. Abu-Rustum N. R. Surgical and pathologic outcomes of fertility-sparing radical abdominal trachelectomy for FIGO stage IB1 cervical cancer / Abu-Rustum N. R., Neubauer N., Sonoda Y. [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2008. – Vol. 111 (2). – P. 261 - 264.

111. Morton D. L. Current management of malignant melanoma / Morton D. L. // Ann Surg. – 1990. – Vol. 212. –P. 123 - 124.

112. Чернов В.И. Экспериментальное изучение возможности использования 99мТс-нанотеха для визуализации лимфатических узлов / Чернов В.И., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Тицкая А.А., Кодина Г.Е. и др. // Медицинская радиология и радиационная безопасность 2011Т. – 56. № - 1. - С. 36-42

113. Morton D. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma / Morton D., Wen D., Wong J. [et al.] // Arch Surg. – 1992. – Vol. 127. P. 392 - 399.

114. Krag D. N. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe / Krag D. N., Weaver D. L., Alex J. C. [et al.]. // Surg Oncol. – 1993. – 2(6). – P. 335 – 9.

115. Семиглазов В.Ф Проблемы хирургического лечения рака молочной железы (целесообразность биопсии сигнальных лимфатических узлов. местное

хирургическое лечение при определяемых отдаленных метастазах) / Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Дашян Г.А. // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11. - № 4. – С. 217-220

116. Alex J. C. Gamma-Probe-Guided Lymph Node Localization in Malignant Melanoma / Alex J. C., Weaver D. L., Fairbanks J. T., Rankin B. S., Krag D. N. // Surg Onc. – 1993. – Vol. 2. – P. 303 - 308.

117. Alex J. C. Sentinel Node Radio-Localization in Head and Neck Melanoma / Alex J. C., Krag D. N., Meijer S., Weaver D. L. // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 1998. – Vol. 124. – P. 135 - 140.

118. Richter T. Protocol for ultrarapid immunostaining of frozen sections /, Nährig J., Komminoth P. [et al.] // J Clin Pathol. – 1999. – Vol. 52. –P. 461 - 63.

119. Ramirez P. Long-term outcomes of sentinel node mapping in vulvar cancer: A time to cheer with enthusiasm or pause and question current practice? / Ramirez PT, Levenback C // Gynecol Oncol. – 2016(1). – P. 1 - 2.

120. Rautiainen S. Axillary ultrasound for a breast cancer patient and changing international treatment practices / Rautiainen S, Sutela A, Joukainen S, Auvinen P, [et al.] // Duodecim. – 2015. –Vol. 131(19). – P. 1803 - 10.

121. Sun J. Decline in Frozen Section Diagnosis for Axillary Sentinel Lymph Nodes as a Result of the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 Trial / Sun J, Bishop JA, Ajkay N, Sanders MA // Arch Pathol Lab Med. – 2015. – P. 30.

122. Suzuki S. Study of the Identification Rate of Sentinel Lymph Node Biopsy after Partial Breast Resection / Suzuki S, Sakurai K, Adachi K, [et al.] // Gan To Kagaku Ryoho. – 2015. – Vol. 42(12). – P.1791 - 3.

123. Witt A. Preoperative core needle biopsy as an independent risk factor for wound infection after breast surgery / Witt A., Yavuz D., Walchetseder C. [et al.] // Obstet Gynecol. – 2003. – Vol. 101(4). – P. 745 - 50.

124. Egnatios G. L. Clinical Follow-up of Atypical Spitzoid Tumors Analyzed by Fluorescence In Situ Hybridization / Egnatios GL, Ferringer TC // Am J Dermatopathol. – 2016(4). – P. 289 - 96.

125. Veronesi U. Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series / Veronesi U., Paganelli G., Viale G. [et al.] // J Natl Cancer Inst. – 1999. – Vol. 91. –P. 368 - 373.

126. Winchester D. J. A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes / Winchester D. J., Chang H. R., Graves T. A. [et al.] // J Am Coll Surg. – 1998. – Vol. 186. –P. 416 - 422.

127. Cox C. E. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer / Cox C. E., Pendas S., Cox J. M. [et al.] // Ann Surg. – 1998. – Vol. 227. – P. 645 – 653.

128. Alex J. Gamma-probe guided localization of lymph nodes / Alex J., Krag D. // Surg Oncol. – 1993. – Vol. 2(3). – P. 137 - 143.

129. Maza S. Peritumoral versus subareolar administration of technetium-99m nanocolloid for sentinel lymph node detection in breast cancer: preliminary results of a prospective intra-individual comparative study / Maza S., Valencia R., Geworski L. [et al.] // Eur J Nucl Med Mol Imaging. – 2003. – Vol. 30. – P. 651 - 656.

130. Moro K. A Case of Minimally Invasive Apocrine Carcinoma Derived from Ductal Adenoma / Moro K, Koyama Y, Nagahashi M, [et al.] // Gan To Kagaku Ryoho. – 2016. – Vol. 43(2). – P. 235 - 7.

131. Murawski M. Significance of Matrix Metalloproteinase 9 Expression as Supporting Marker to Cytokeratin 19 mRNA in Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients // Murawski M, Woźniak M., Duś-Szachniewicz K., Kołodziej P. // Int J Mol Sci. – 2016. – Vol. 17(4). – P. E571.

132. Ma M. W. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymphnode / Ma M. W., Medicherla R. C., Qian M., Vega-Saenz de Miera E. [et al.] //. Mod Pathol. – 2012. – Vol. 25(7). – P. 1000 - 10.

133. Han D. Clinical utilities and biological characteristics of melanoma sentinel lymph nodes / Han D, Thomas DC, Zager JS,[et al.] // World J Clin Oncol. – 2016. – Vol. 7(2). – P. 174 - 88.

134. Balch C. M. Sondak Age as a predictor of sentinel node metastasis among patients with localized melanoma: an inverse correlation ofmelanoma mortality and incidence of sentinel node metastasis among young and old patients / Balch C. M., Thompson J. F., Gershenwald J. E., Soong S. J. [et al.] // Ann Surg Oncol. – 2014. – Vol. 21(4). – P. 1075 - 81.

135. Чернов В. И. Возможности определения сторожевых лимфатических узлов у больных раком желудка / Чернов В. И., Афанасьев С. Г., Синилкин И. Г. Августинович А. В. // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – № 4 (28). – С. 27 - 31.

136. Чиссов В. И. Расширенные лимфаденэктомии при раке желудка Чиссов В. И., Вашакмадзе Л. А., Бутенко А. В. // 5 Всероссийский съезд онкологов. Казань, 2000. – с. 164.

137. Higgins R. M. Outcomes and Use of Laparoscopic Versus Open Gastric Resection / Higgins R. M., Kubasiak J. C., Jacobson R. A., Janssen I. [et al.] // JSLS. – 2015. – Vol. 19(4). – pii: e2015.00095. doi: 10.4293/JSLS.2015.00095

138. Wang W. Impact of Abdominal Shape on Short-Term Surgical Outcome of Laparoscopy-Assisted Distal Gastrectomy forGastric Cancer / Wang W., Ai K. X., Tao F., Jin K. T. [et al.] // J Gastrointest Surg. – 2016. – Mar 7. [Epub ahead of print].

139. Kamiya S. Auxiliary diagnosis of lymph node metastasis in early gastric cancer using quantitative evaluation of sentinelnode radioactivity / Kamiya S., Takeuchi H., Nakahara T., Niihara M. [et al.] // Gastric Cancer. – 2015. – Vol. 41. – P. 124 -26.

140. Li Z. L. Secondary sentinel lymph node tracing technique: a new method for tracing lymph nodes in radical gastrectomy for advanced gastric cancer / Li Z. L., Jiang H. W., Song M., Xu L. //J Zhejiang Univ Sci B. – 2015. – Vol. 16(11). – P. 897 - 903.

141. Maruyama K. Can sentinel node biopsy indicate rational extent of lymphadenectomy in gastric cancer surgery? Fundamental and new information on lymph-node dissection / Maruyama K., Sasako M., Kinoshita T. [et al.] // Arch Surg. – 1999. – Vol. 384. – P. 149 - 157.

142. Min-Chan Kim Lymphatic Mapping and Sentinel Node Biopsy Using 99mTc tin Colloid in Gastric Cancer / Min-Chan Kim, Hyung-Ho Kim, Ghap-Joong Jung, Jong-Hun Lee, [et al.] // Ann Surg. – 200. – Vol. – 239(3). – P. 383 - 387.

143. Shimada A. Clinical significance of the anterosuperior lymph nodes along the common hepatic artery identified by sentinelnode mapping in patients with gastric cancer / Shimada A., Takeuchi H., Kamiya S., Fukuda K. [et al.] // Gastric Cancer. – 2015. – Vol. 42. – P. 275 -79.

144. Somashekhar S. Intraoperative Frozen Section Evaluation of Sentinel Lymph Nodes in Breast Carcinoma: Single-Institution Indian Experience / Somashekhar SP, Naikoo ZA, Zaveri SS, Holla S, [et al.] // Indian J Surg. – 2015 (2). – P. 335 -40.

145. Tsuburaya A. Solitary lymph node metastasis of gastric cancer as a basis for sentinel lymph node biopsy / Tsuburaya A., Noguchi Y., Yoshikawa T., Kobayashi O., Sairenji M., Motohashi H. // Hepatogastroenterol. – 2002. – Vol. 49(47). – P. 1449 – 52.

146. Yaguchi Y. Preferentially examined sentinel nodes for sentinel node navigation surgery in gastric cancer / Yaguchi Y., Tsujimoto H., Hiraki S., Ichikura T. [et al.] // Mol Clin Oncol. – 2015. – Vol. 3(4). –P. 944 - 948.

147. Takeuchi H. Clinical Significance of Sentinel Node Positivity in Patients with Superficial Esophageal Cancer / Takeuchi H., Kawakubo H., Nakamura R., Fukuda K., Takahashi T. // World J Surg. – 2015. – Vol. 39(12). – P. 2941 - 7.

148. Yoshida M. Indocyanine green injection for detecting sentinel nodes using color fluorescence camera in the laparoscopy-assisted gastrectomy / Yoshida M., Kubota K., Kuroda J., Ohta K., Nakamura T.J. [et al.] // Gastroenterol Hepatol. – 2012. – Vol.3. – P. 29 - 33.

149. Matsumoto A. Technical feasibility of sentinel lymph node biopsy in patients with ipsilateral breast tumor recurrence and previous axillary surgery / Matsumoto A., Jinno H., Nakamura T., Saito J. // Int J Surg. – 2015. – Vol. 22. – P. 28 - 31.

150. Kitawaga Y. Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer / Kitawaga Y., Fujii H., Mukai M., Kubota T. // Br J Surg. – 2002. – Vol. 89(5). – P. 604 - 8.

151. Kitawaga Y. The role of sentinel lymph node in gastrointestinal cancer / Kitawaga Y. [et al.] // Surg Clin North Amer. – 2000. – Vol. 80(6). – P. 1799 - 809.

152. Kim M. C. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy using 99mTc tin colloid in gastric cancer / Kim M.C., Kim H.H., Jung G.J., Lee J.H. [et al.] // Ann Surg. – 2004. – Vol. 239(3). – P. 383 - 7.

153. Kim M.C. Sentinel lymph node biopsy with 99mTc tin-colloid in patients with gastric carcinoma / Kim M.C., Jung G.J., Lee J.H., Choi S.R. [et al.] // Hepatogastroenterology. – 2003. – Vol. 50(2) – P. ccxiv - ccxv.

154. Haigh P. I. Sentinel lymph node dissection for thyroid malignancy / Haigh P. I., Giuliano A. E. // Recent Results Cancer Res. – 2000. – Vol. 157. – P. 201 - 5.

155. Zhu Z. H. Predictive value of detection of sentinel lymph nodes on lymphatic metastasis of non-small cell lung cancer / Zhu Z. H., Li B. J. , Zhang S. Y., Rong T. H. [et al.] // Ai Zheng. – 2005. – Vol. 24(3). – P. 341 - 4.

156. Liptay M. J. Intraoperative radioisotope sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer / Liptay M. J., Masters G. A., Winchester D. J., Edelman B. L. [et al.] // Ann Thorac Surg. – 2000. – Vol. 70(2). – P. 384 - 9.

157. Liptay M. J. Intraoperative sentinel lymph node mapping in non-small-cell lung cancer improves detection of micrometastases / Liptay M. J., Grondin S. C., Fry W. A., Pozdol C. [et al.] // J Clin Oncol. – 2002. – Vol. 20(8). –P. 1984 - 8.

158. Liptay M. J. Intraoperative sentinel node mapping with technitium-99m in lung cancer: results of CALGB 140203 multicenter phase II trial. Thoracic Surgery Subcommittee of the Cancer and Leukemia Group B. / Liptay M. J., D'amico T. A., Nwogu C., Demmy T. L., Wang X. F. [et al.] // J Thorac Oncol. – 2009. – Vol. 4(2). – P. 198 - 202. doi: 10.1097/JTO.0b013e318194a2c3

159. Liptay M. J. Sentinel node mapping in lung cancer: introduction / Liptay M. J. // Semin Thorac Cardiovasc Surg. – 2009. – Vol. 21(4). – P. 297. doi: 10.1053/j.semtcvs.2009.12.001

160. Liptay M. J. Sentinel node mapping in lung cancer: the Holy Grail? / Liptay M. J. // Ann Thorac Surg. – 2008. – Vol. 85(2). – P. S778 - 9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2007.10.103

161. Ambrosch P. Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion / Ambrosch P., Kron M., Fischer G., Brinck U. / Head Neck. – 1995. – Vol. 17. – P. 473 - 479.

162. Ambrosch P. Selective neck dissection in the management of squamous cell carcinoma of the upper digestive tract / Ambrosch P., Freudenbert L., Kron M., [et al.] // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 1996. – Vol. 253(6). – P. 329 – 335.

163. Valdés Olmos R. A. Contribution of nuclear medicine to lymphatic mapping and sentinel node identification in oncology / Valdés Olmos R. A., Jansen L., Muller S. H., Hoefnagel C. A., Nieweg O. // Rev Esp Med Nucl. – 1999. – Vol. 18. – P. 111 – 121.

164. Van der Vorst J. R. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients / Van der Vorst J. R., Schaafsma B. E., Verbeek F. P., Keereweer S. [et al.] // Oral Oncol. – 2013. – Vol. 49(1). – P. 15 - 9.

165. Jansen L. / Jansen L., Koops H. S., Nieweg O. E., Doting M. H. [et al.] // Sentinel node biopsy for melanoma in the head and neck region // Head Neck. – 2000. – Vol. 22(1). – P. 27 - 33.

166. Kara P. P. Sentinel lymph node detection in early stage cervical cancer: a prospective study comparing preoperative lymphoscintigraphy, intraoperative gamma probe, and blue dye / Kara P. P., Ayhan A., Caner B., Gültekin M. [et al.] // Ann. Nucl. Med. – 2008. – Vol. 22 (6). – P. 487 - 494.

167. Niikura H. Sentinel lymph node detection in early cervical cancer with combination 99mTc phytate and patent blue / Niikura H., Okamura C., Akahira J., Takano T. [et al.] // Gynecol. Oncol. – 2004. – Vol. 94. – P. 528 - 532.

168. Xue S. 99mTc-Labeled Iron Oxide Nanoparticles for Dual-Contrast (T1/T2) Magnetic Resonance and Dual-Modality Imaging of Tumor Angiogenesis /

Xue S., Zhang C., Yang Y., Zhang L., Cheng D. [et al.] // J Biomed Nanotechnol. – 2015. – Vol. 11(6). – P. 1027 - 37.

169. Скуридин В. С. Получение меченных технецием-99м нанодисперсных производных комплексонов ДТПА / Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Варламова Н. В., Нестеров Е. А. и др. // Фундаментальные исследования. – 2013 г. – №10 (7). – С. 1427 - 1430.

170. Vucina J. Technetium-99m production for use in nuclear medicine / Vucina J. // Med Pregl. – 2000. – Vol. 53(11-12). – P. 631 - 4.

171. Wojdowska W. Studies on the separation of 99mTc from large excess of molybdenum / Wojdowska W., Pawlak D., Parus J. L., Mikołajczak R. // Nucl Med Rev Cent East Eur. – 2015. – Vol. 18(2). – P. 65 - 9.

172. Salvarese N. Novel [99mTcIII(PS)2(Ln)] mixed-ligand compounds (PS = phosphino-thiolate; L = dithiocarbamate) useful in design and development of TcIII-based agents: synthesis, in vitro, and ex vivo biodistribution studies / Salvarese N., Morellato N., Rosato A., Meléndez-Alafort L. [et al.] // J Med Chem. – 2014. – Vol. 57(21). – P. 8960 - 70.

173. Bordoloi J. K. Technetium-99m and rhenium-188 complexes with one and two pendant bisphosphonate groups for imaging arterial calcification / Bordoloi J. K., Berry D., Khan I. U., Sunassee K. [et al.] // Dalton Trans. – 2015. – Vol. 44(11). – P. 4963 - 75.

174. Hayes T. R. Influence of functionalized pyridine ligands on the radio/chemical behavior of [M(I)(CO)3](+) (M = Re and (99m)Tc) 2 + 1 complexes / Hayes T. R., Lyon P. A., Barnes C. L., Trabue S., Benny P. D. // Inorg Chem. – 2015. – Vol. 54(4). – P. 1528 - 34.

175. Jia J. 2-Phenylbenzothiazole conjugated with cyclopentadienyl tricarbonyl [CpM(CO)3] (M = Re, (99m)Tc)complexes as potential imaging probes for β-amyloid plaques / Jia J., Cui M., Dai J., Liu B. // Dalton Trans. – 2015. – Vol. 44(14). – P. 6406 - 5.

176. Kim D. W. Synthesis and evaluation of Tc-99m DTPA-glutathione as a non-invasive tumor imaging agent in a mouse colon cancer model / Kim D. W., Kim W. H., Kim M. H., Kim C. G. [et al.] // Ann Nucl Med. – 2014. – Vol. 28(5). – P. 447 - 54.

177. Kydonaki T. E. Synthesis, characterization and biological evaluation of ^{99m}Tc/Re-tricarbonyl quinolonecomplexes / Kydonaki T. E., Tsoukas E., Mendes F., Hatzidimitriou A. G. [et al.] // J Inorg Biochem. – 2015. – Vol. 21. – pii: S0162-0134(15)30140-9. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.12.010

178. Oliveira B. L. Re(I) and Tc(I) complexes for targeting nitric oxide synthase: influence of the chelator in the affinity for the enzyme / Oliveira B. L., Morais M., Mendes F., Moreira I. S., Cordeiro C. [et al.] // Chem Biol Drug Des. – 2015. – Vol. 86(5). – P. 1072 - 86.

179. Salvarese N. Reactivity of the [M(PS)2](+) building block (M = Re(III) and (99m)Tc(III); PS = phosphinothiolate) toward isopropylxanthate and pyridine-2-thiolate / Salvarese N., Dolmella A., Refosco F., Bolzati C. // Inorg Chem. – 2015. – 54(4). – P. 1634 - 44.

180. Yazdani A. Imidazole-based [2 + 1] Re(I)/99mTc(I) complexes as isostructural nuclear and optical probes / Yazdani A., Janzen N., Banevicius L., Czorny S., Valliant J. // Inorg Chem. – 2015. – Vol. 54(4). – P. 1728 - 36.

181. Zhang Q. In vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled propylene amine oxime complexescontaining nitroimidazole and nitrotriazole groups as hypoxia markers / Zhang Q., Huang H., Chu T. // J Labelled Comp Radiopharm. – 2016. – Vol. 59(1). – P. 14 - 23.

182. Кодина Г. Е. Статус и прогресс использования радиофармпрепаратов технеция-99м в России / Кодина Г. Е., Корсунский В. Н. // Радиохимия. – 1997. – Т. 38. – № 5. – С. 385 - 388.

183. Arpana M. The Risk of Axillary Relapse After Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer Is Comparable With That of Axillary Lymph Node Dissection / Arpana M., Jane F., Gemignani M., Heerdt A. [et al.] // Ann Surg. – 2004. – Vol. 240(3). – P. 462 - 471.

184. Huemer G. M. Oncoplastic techniques allow breast-conserving treatment in centrally located breast cancers / Huemer G. M., Schrenk P., Moser F., Wagner E., Wayand W. // Plast Reconstr Surg. – 2007. – Vol. 120(2). – P. 390 - 8.

185. Konstantiniuk P. A nonrandomized follow-up comparison between standard axillary node dissection and sentinelnode biopsy in breast cancer / Konstantiniuk P., Schrenk P., Reitsamer R., Koeberle-Wuehrer R. [et al.] // Breast. – 2007. – Vol. 16(5). – 520 - 6.

186. Kuehn T. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study / Kuehn T., Bauerfeind I., Fehm T., Fleige B. [et al.] // Lancet Oncol. – 2013. – Vol. 14(7). – P. 609 - 18.

187. Main B. G. The metastatic potential of head and neck cutaneous malignant melanoma: is sentinel nodebiopsy useful? / Main B. G., Coyle M. J., Godden A., Godden D. R. // Br J Oral Maxillofac Surg. – 2014. – Vol. 52(4). – P. 340 - 3.

188. Piñero-Madrona A. Tumoral load quantification of positive sentinel lymph nodes in breast cancer to predict more than two involved nodes / Piñero-Madrona A., Ruiz-Merino G., Bernet L., Miguel-Martínez B. // Breast. – 2014. – Vol. 23(6). – P. 859 - 64.

189. Rosenow T. Sentinel Lymph Node Biopsy in Patients with Breast Cancer: Comparison of Peritumoral and Periareolar Injection / Rosenow T., Biedendieck C., Fricke H., Brinkmann M. [et al.] // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2012. – Vol. 72(11). – P. 1024 – 1028

190. Schrenk P. Lymphatic mapping in patients with primary or recurrent breast cancer following previous axillary surgery / Schrenk P., Tausch C., Wayand W. // Eur J Surg Oncol. – 2008. – Vol. 34(8). – P. 851-6.

191. Schrenk P. Prediction of non-sentinel lymph node status in breast cancer with a micrometastatic sentinel node / Schrenk P., Konstantiniuk P., Wölfl S., Bogner S. [et al.] // Br J Surg. – 2005. – Vol. 92(6). – P. 707 - 13.

192. Schrenk P. Sentinel node mapping performed before preoperative chemotherapy may avoid axillary dissection in breast cancer patients with negative or

micrometastatic sentinel nodes / Schrenk P., Tausch C., Wölfl S., Bogner S., Fridrik M., Wayand W. // Am J Surg. – 2008. – Vol. 196(2). – P. 176 - 83. doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.08.068

193. Paganelli G. Optimized sentinel node scintigraphy in breast cancer / Paganelli G., De Cicco C., Cremonesi M., Prisco G. [et al.] // Q J Nucl Med. – 1998. – Vol. 42(1). – P. 49 - 53.

194. De Cicco C. Lymphoscintigraphy and radioguided biopsy of the sentinel axillary node in breast cancer / De Cicco C., Cremonesi M., Luini A., Bartolomei M. [et al.] // J Nucl Med. – 1998. – Vol. 39(12). – P. 2080 - 4.

195. Кодина Г.Е., Богородская М.А., Малышева А.О., Севостьянова А.С.. Способ получения наноколлоида для приготовления радиофармпрепаратов // Патент RU № 231562427, 2008.

196. Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Варламова Н. В., Садкин В. Л., Нестеров Е. А., Рогов А. С. Способ получения меченного технецием-99м наноколлоида / Патент RU № 2463075, 2012.

197. Линденбратен Л. Д. Медицинская радиология (Основы лучевой диагностики и терапии) / Линденбратен Л. Д., Королюк И. П. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.

198. Lin Y. Preparation and radiolabeling of antimony sulfide nanocolloids with two different particle sizes / Lin Y., Zhang X., Li J. [et al.] // Appl. Radiat. Isot. – 2003. – Vol. 58 (3). – P. 347 - 352.

199. Скуридин В.С. Методы и технологии получения радиофармпрепаратов / Скуридин В.С. – Томск: Изд. ТПУ, 2013. – 139 с.

200. Ильин А.П. Двухстадийное горение ультрадисперсного порошка алюминия на воздухе / Ильин А.П., Проскуровская Л.Т. // Физика горения и взрыва. – 1990. – №2. – С. 71 – 72.

201. Применение алюминия в медицине. Современное медицинское оборудование http://zakazy.net/primenenie-aljuminija-v-medicine/

202. Abrashkin S. ^{99m}Tc Generators: the Influence of the Radiation Dose on the Elution Yield / Abrashkin S., Heller-Grossman L., Schafferman A., Davis M.A. // Int. J. Appl. Radiat. Isot. – 1978. – Vol. 29. – P. 395.

203. Cifka J. Some factors influencing the elution of technetium –99m Generators / Cifka J., Vesely P. // Radiochim. Acta. – 1971. – Vol.16. – P. 30

204. Nanophox инструкция по эксплуатации и обслуживанию. Sympatec GmbH. -2013. – 65 с.

205. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издание, Т. 1,2,3. – М.:2015. [Электронный ресурс] URL: http://femb.ru/feml (Дата обращения 01.02.2015г.).

206. Бактериальные эндотоксины. ОФС 1.2.4.0006.15. [Электронный ресурс] URL: https://studfiles.net/preview/3216894/

207. Доклинические исследования радиофармацевтического препарата на основе таллия-199 для диагностики нарушения мозгового кровообращения. Сведения о результатах научно-исследовательской работы с отчётом №АААА-Б17-217112810006-9. – 2015 [Электронный ресурс] URL:https://esu.citis.ru/nioktr/3mAXG00KOhuM15JG_o2cLb00

208. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Комиссия по биоэтике. Нормативные документы: Европейская конвенция по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) [Электронный ресурс] URL: http://www.msu.ru/bioetika/doc/konv.doc

209. Сазонова С.И. Гамма-сцинтиграфическая визуализация воспалительных поражений сердца: методология и проблемы топической диагностики: дис. док-р мед. наук: / Сазонова Светлана Ивановна. – Томск, 2015 – 260 с.

210. .Румшиский Л. З. Математическая обработка результатов эксперимента / Румшиский Л. З. – М.: Наука, 1971. – 192 с.

211. Чарыков А. К. Математическая обработка результатов химического анализа: Учеб. Пособие для вузов / Чарыков А. К. – Л.: Химия, 1984. – 168 с.

212. Рогов А.С. Разработка технологии изготовления сорбционного генератора технеция-99м на основе активационного 99Mo: Рогов Александр Сергеевич. – Томск, 2017 - 157 [Электронный ресурс] URL: https://esu.citis.ru/dissertation/H6A1V2DTVYUDQNTKESWRT5RH

213. Ильина Е.А. Разработка радиофармпрепарата на основе меченной технецием-99м 5-тио-d-глюкозы для медицинской диагностики: дис. канд. техн. наук: / Ильина Екатерина Алексеевна. - Томск 2016. - 123 с. [Электронный ресурс] URL:

214. Белянин М. Л. Визуализация поглощения миокардом фенилпентадекановой кислоты, меченой Mn(II) ДТПА, с использованием низкопольной магнитно-резонансной томографии в эксперименте / Белянин М. Л., Усов В. Ю., Бородин О. Ю., Филимонов В. Д. // Медицинская визуализация. – 2007. – №2 – С. 124 – 129.

215. Белянин М.Л. Твердофазное нанодисперсное получение и оценка свойств комплекса марганца с диэтилентриаминпентауксусной кислотой как контрастного препарата для магнитно-резонансной томографии / Белянин М.Л., Федущак Т.А., Филимонов В.Д., Бородин О.Ю., Чурин А.А., Усов В.Ю. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – №2 – С. 33 – 36.

216. Скуридин В. С. Изучение процесса взаимодействия технеция-99м с нанодисперсными производными комплексонов ДТПА / Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Варламова Н. В., Нестеров Е. А. и др. // Известия ВУЗов, ж. Физика. – 2013. – Т. 56. – № 11/3 – С. 217 - 221

217. Skuridin V. Modified DTPA molecule-based nanocolloid radiopharmaceuticals / Skuridin V., Stasyuk E., Varlamova N., Nesterov E. [et al.] // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2015. – Vol. 303(3). – P. 582-587.

218. Зайцева Л. Л. Соединения технеция и области их применения // Итоги науки и техники / Зайцева Л. Л., Величко А. В., Виноградов И. В. – М.: ВИНИТИ, 1984. – Т. 9. – 180 с.

219. Кодина Г. Е. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для медицины. Изотопы: свойства, получение,

применение / под ред. В.Ю. Баранова: в 2 томах. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2005. – Т. 2. – С. 311 - 483.

220. Скуридин В. С. Получение наноколлоидов меченных технецием-99м для лимфосцинтиграфии / Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Садкин В. Л., Рогов А. С., Нестеров Е. А., Варламова Н. В. // 9-я международная конференция «Ядерная и радиационная физика». – Алматы, 2013. – 24-27 сентября. – С. 273.

221. Скуридин В. С., Стасюк Е. С., Варламова Н. В., Нестеров Е. А., Рогов А. С., Садкин В. Л, Постников П. С. Способ получения меченного технецием - 99м наноколлоида / Патент RU 2543654, 2015.

222. Скуридин В. С. Получение и экспериментальные испытания меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов на основе гамма-оксида алюминия и магнитоуправляемых частиц Fe@C(IDA) / Скуридин В. С. Стасюк Е. С., Варламова Н. В., Постников П. С., Нестеров Е. А., Садкин В. Л. // Известия ВУЗов, ж. Физика. –2011. – Т. 54. – № 11/2. – С. 332 - 339.

223. Филимонов В. Д., Федущак Т. А., Постников П. С, Ермаков А. Е., Уймин М. А., Итин В. И., Кувшинов А. В., Восмериков А. В. Способ функционализации наноразмерных порошков / Патент RU № 2405655, 2010.

224. Filimonov V. D. Unusually Stable, Versatile, and Pure Arenediazonium Tosylates: their Preparation, Structures, and Synthetic Applicability / Filimonov V. D., Trusova M. S., Postnikov P. S., Krasnokutskaya E. A., Lee Y. M., Hwang H. Y., Kim H. and Ki-Whan Chi. // Org. Lett. – 2008. – Vol. 10 (18). – P. 3961 - 3964.

225. Postnikov P. S. Aryldiazonium Tosylates as New Efficient Agents for Covalent Grafting of Aromatic Groups on Carbon Coatings of Metal Nanoparticles / P. S. Postnikov, M. E. Trusova, T. A. Fedushchak, M. A. Uimin, A. E. Ermakov, V. D. Filimonov // Nanotechnologies in Russia. – 2010. – Vol. 5 (8). – P. 446 - 449.

226. Scuridin V. S. Development methods labeled technetium-99m magnetically nanocolloids for medical diagnosis / Scuridin V. S., Varlamova N. V., Nesterov E. A., Rogov A. S., Sadkin V. L., Stasyuk E. S., Postnikov P. S.// 1-st international conference «Nanomaterials: applications and properties», – Alushta, Crimea, Ukraine. – Sept. 27-30, 2011. – Vol. 2. – Part 1. – P.164 – 170.

227. Стасюк Е. С. Исследование факторов, влияющих на элюационные характеристики хроматографического 99Mo/99mTc генератора на основе обогащенного молибдена-98: дис. канд. техн. наук: 05.17.02 / Стасюк Елена Сергеевна. – Томск, 2010. – с.

228. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Садкин В.Л., Рогов А.С., Нестеров Е.А., Варламова Н.В. Исследования адсорбции технеция-99м на γ-оксидах алюминия с различной кислотной активацией. // 9-я международная конференция «Ядерная и радиационная физика»: конференция. – Алматы, 24-27 сентября 2013. – с. 266.

229. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Варламова Н.В., Нестеров Е.А., Рогов А.С., Садкин В.Л. Разработка методов получения нового коллоидного радиофармпрепарата на основе оксида алюминия меченого технецием-99м. // Первая Российская конференция по медицинской химии: конференция. – Москва, 8-12 сентября 2013. – с. 140.

230. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Варламова Н.В., Садкин В.Л., Рогов А.С. Исследование процесса адсорбции ^{99m}Tc (VII) на активированном оксиде алюминия // Российская научно-техническая конференция с международным участием «Актуальные проблемы радиохимии и радиоэкологии»: конференция. – г. Екатеринбург, ноябрь 9-11, 2011 – С. 131-136.

231. Skuridin V.S., Sadkin V.L., Stasyuk E.S., Nesterov E.A., Rogov A.S. A procedure for Sorbent Pretreatment for the Production of High-Activity ^{99}Mo/^{99m}Tc Generators Based on Enriched ^{98}Mo // Radiochemistry, - 2012. - Vol. 54. - № 4. - P. 391 - 394.

232. Стасюк Е.С., Скуридин В.С. Способ изготовления хроматографического генератора технеция-99m из облученного нейтронами молибдена-98 // Патент RU № 2403640, 2010.

233. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Садкин В.Л., Нестеров Е.А., Чибисов Е.В., Рогов А.С., Ларионова Л.А., Нестерова Ю.В., Варламова Н.В. Исследования процесса адсорбции технеция-99м на оксидах алюминия // Мат. V межд. научно-практич. конф. «Физико-технические проблемы атомной энергетики и промышленности»: конференция. – Томск, 2010. – с.115.

234. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Садкин В.Л., Чибисов Е.В., Рогов А.С., Чикова И.В. Изучение статической и динамической адсорбции технеция-99м на оксиде алюминия// Известия ВУЗов, ж. Физика, –2010. – т. 53. – № 10/2 – с. 294–300.

235. Skuridin V.S., Sadkin V.L., Stasyuk E.S., Varlamova N.V., Rogov A.S., Nesterov E.A. Obtaining technetium-99m labeled nanocolloids based on aluminum oxide for medical diagnostics //7th International Symposium on Technetium and Rhenium – Science and Utilization: symposium – Moscow, 2011. - p. 135.

236. Скуридин В.С., Изучение закономерностей адсорбции ^{99m}Tc(VII) на активированном оксиде алюминия / Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Рогов А.С., Варламова Н.В., Нестеров Е.А., Садкин В.Л. // Известия ВУЗов, ж. Физика, –2012. – т. 55. – № 11/2. – С. 287-292.

237. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Нестеров Е.А., Садкин В.Л., Рогов А.С. Изучение процесса сорбции технеция-99м на оксидах алюминия//Материалы III Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии»: конференция. – Краснодар, 2011. – С. 203.

238. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Варламова Н.В., Нестеров Е.А., Рогов А.С., Садкин В.Л. Разработка методов получения нового коллоидного радиофармпрепарата на основе оксида алюминия меченого технецием-99м. // Первая Российская конференция по медицинской химии: конференция. – Москва, 8-12 сентября 2013. – С. 140.

239. Скуридин В.С., Стасюк Е.С., Варламова В.Н., Рогов А.С., Садкин В.Л., Нестеров Е.А. Получение нового наноколлодного радиофармпрепарата на основе оксида алюминия // Известия ТПУ. Химия. - 2013 - Т. 323 - №. 3. - с. 33-37.

240. Несмеянова Н., Руководство к практическим занятиям по радиохимии. М.: Химия, - 1968. - С. 136-143.

241. Скуридин В.С., Чибисов Е.В., Меркулов В.Г., Нестеров Е.В. Экстракционно-хроматографическое получение высокочистого технеция-99м // Российская научно-техническая конференция с международным участием

«Актуальные проблемы радиохимии и радиоэкологии»: конференция. – г. Екатеринбург, ноябрь 9-11, 2011 – с. 147-151.

242. 27. Skuridin V.S. Radiopharmaceutical drug based on aluminum oxide / Skuridin V.S., Sadkin V.L., Stasyuk E.S., Varlamova N.V., Rogov A.S., Nesterov E.A., Ilina E.A., Larionova L.A. / Indian Journal of Science and Technology. - 2016. - V. 8. - № 36. – 90580.

243. Ahlgren S. Kit formulation for 99mTc-labeling of recombinant anti-HER2 Affibody molecules with a C-terminally engineered cysteine / Ahlgren S., Andersson K., Tolmachev V. // Nucl Med Biol. – 2010. – Vol. 37(5). – P. 539 - 46.

244. Almeida É. V. Selective polarographic determination of stannous ion in technetium radiopharmaceutical cold kits / Almeida É. V., D., Silva J. L., Fukumori N. T., Matsuda M. M. // J Nucl Med Technol. – 2011. – Vol. 39(4). – P. 307 - 11.

245. Al-Saeedi F. J. Choline treatment affects the liver reticuloendothelial system and plasma fatty acid composition in diabetic rats / Al-Saeedi F. J., Cheng B. // Clin Physiol Funct Imaging. – 2013. – Vol. 33(4). – P. 293 - 301.

246. Kim D. W. Synthesis and evaluation of novel 99mTc labeled NGR-containing hexapeptides as tumor imaging agents / Kim D. W., Kim W. H., Kim M. H., Kim C. G. // J Labelled Comp Radiopharm. – 2015. – Vol. 58(2). – P. 30 - 5.

247. Kowalsky R. J. Technical problems associated with the production of technetium Tc 99m tin(II) pyrophosphate kits / Kowalsky R. J., Dalton D. R. // Am J Hosp Pharm. – 1981. – Vol. 38(11). – P. 1722 - 6.

248. McClelland C. M. 99mTc-SnF2 colloid "LLK": particle size, morphology and leucocyte labelling behaviour / McClelland C. M., Onuegbulem E., Carter N. J., Leahy M. [et al.] // Nucl Med Commun. – 2003. – Vol. 24(2). – P. 191 – 202.

249. Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits. – Vienna: International Atomic Energy Agency, 2008. – P. 466.

250. Спиваковский В.Б. Аналитическая химия олова. М.: Наука. – 1975. – с. 58-74.

251. Lejeune R., Thunus J., Thunus L. Polarografic determination of (Sn(II) in samples containing Sn (IV) such as in technetium-99m radiopharmaceutical kits. // Analytical Chemistry Acta. – 1996. – V.332. – p. 67-71.

252. Чернов В.И. Экспериментальное изучение возможности применения нового отечественного радиофармпрепарата 99мТс-гамма-оксид алюминия для визуализации сторожевых лимфатических узлов / Чернов В.И., Синилкин И.Г., Зельчан Р.В., Медведева А.А., Ляпунов А.Ю., Варламова Н.В. и др. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. - 2016. – Т. 61. - № 6. – С. 68-71

253. Руководство по стандартизации лекарственных средств. Руководство по стандартизации лекарственных средств: учеб. пособие для слушателей системы последипломного образования. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Науч. центр экспертизы средств мед. применения: [Багирова В. Л. и др.]; под ред. Р. У. Хабриева, В. Л. Багировой, В. Б. Герасимова

254. Доронченкова Т.Н., Харламов В.Т. Стандартизация разбавленных растворов двухвалентного олова для его спектрофотометрического определения. // Химико-фармацевтический Журнал. – 1986. – № 1. – С. 112-116.

255. Европейская фармакопея 7.0, том 1. – Совет Европы. – Страсбург. – 2011/2012. – с. 1812.

256. МУ 08-47/189: Вода природная, питьевая, технологически чистая, очищенная сточная. Вольтамперометрический метод измерения массовых концентраций фенола

257. "Государственный реестр лекарственных средств. Том II. Часть 1. Типовые клинико-фармакологические статьи (А-М)" М., Издательство "Медицина", 2006

258. ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения».

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

TOMSK POLYTECHNIC UNIVERSITY
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ministry of Education and Science of the Russian Federation
Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"National Research Tomsk Polytechnic University" (TPU)
30, Lenin ave., Tomsk, 634050, Russia
Tel. +7-3822-606333, +7-3822-701779,
Fax +7-3822-563865, e-mail: tpu@tpu.ru, tpu.ru
OKPO (National Classification of Enterprises and Organizations): 02069303,
Company Number: 1027000890168,
VAT / KPP (Code of Reason for Registration) 7018007264/701701001, BIC 046902001

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)
Ленина, пр., д. 30, г. Томск, 634050, Россия
тел.: +7-3822-606333, +7-3822-701779,
факс +7-3822-563865, e-mail: tpu@tpu.ru, tpu.ru
ОКПО 02069303, ОГРН 1027000890168,
ИНН/КПП 7018007264/701701001, БИК 046902001

АКТ

внедрения результатов диссертационной работы Варламовой Н.В. на тему:

«Разработка методов получения меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов для диагностики сторожевых лимфатических узлов», представленной на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности: 05.17.02 – Технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов

Настоящий акт составлен об использовании в учебном процессе результатов и методик экспериментального получения меченных технецием-99м наноколлоидных соединений для медицинской диагностики. Полученные Варламовой Н.В. новые данные о процессе восстановления ^{99m}Tc в присутствии Sn (II) и адсорбции восстановленного радионуклида на наноразмерном порошке оксида Al_2O_3 характеризуют общий методологический подход для получения биоактивных соединений с радиоактивной меткой технеция-99м.

Результаты исследований используются при чтении курса лекций по теме: «Радиохимия. Применение радионуклидов и радиофармпрепаратов в диагностике и терапии» по направлению 14.04.02 «Ядерная медицина», а также при выполнении практических и лабораторных занятий, включая выполнение курсовых работ.

Начало использования объекта внедрения с 2015 г.

Акт составлен 04 февраля 2019 года.

Директор ИЯШТ О.Ю. Долматов

Руководитель Отделения
ядерно-топливного цикла ИЯТШ А.Г. Горюнов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ
(НИИ онкологии)
Кооперативный пер., д. 5, Томск, 634009, тел./факс (3822) 51 10 39 / 51 33 06, e-mail: onco@tnimc.ru
ОКПО 01895186, ОГРН 1027000861568, ИНН / КПП 7019011979 / 701745014

АКТ

внедрения в производство результатов диссертационной работы Варламовой Н.В. на тему: «Разработка методов получения меченных технецием-99м наноколлоидных препаратов для диагностики сторожевых лимфатических узлов», представленной на соискание ученой степени доктора технических наук по специальности: 05.17.02 – Технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов

Методика получения и состав меченного технецием-99м наноколлоидного препарата на основе гамма-оксида алюминия, разработанные в процессе выполнения диссертационных исследований, используются для приготовления лиофилизатов того же состава при синтезе нового отечественного радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc». Доклинические испытания препарата проводились в НИИ Онкологии в рамках выпонения ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования нового лимфотропного радиофармацевтического препарата на основе меченного технецием - 99м гамма-оксида алюминия». Одним из важнейших результатов внедрения считаем создание стабильного наноколлоидного радиофармацевтического препарата с требуемым размером частиц в пределах от 50 до 100 нм в сочетании с его высоким радиохимическим выходом и чистотой. Все это делает препарат конкурентоспособным по сравнению с известными зарубежными аналогами. В России подобные препараты отсутствуют.

Начало использования объекта внедрения с 2014 г.

Директор НИИ онкологии Томского НИМЦ
академик РАН — Е.Л. Чойнзонов

Заведующий отделением
радионуклидной диагностики
НИИ онкологии Томского НИМЦ,
д-р мед. наук, профессор — В.И. Чернов

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2463075

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННОГО ТЕХНЕЦИЕМ-99m НАНОКОЛЛОИДА

Патентообладатель(ли): ***Российская Федерация, от имени которой выступает Министерство образования и науки Российской Федерации (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (ГОУ ВПО НИ ТПУ) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2011127269**

Приоритет изобретения **01 июля 2011 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***10 октября 2012 г.***

Срок действия патента истекает **01 июля 2031 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2512595

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕАГЕНТА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МЕЧЕННОГО ТЕХНЕЦИЕМ 99-m НАНОКОЛЛОИДА НА ОСНОВЕ ГАММА-ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

Патентообладатель(ли): ***Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт онкологии" Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (ФГБУ "НИИ онкологии" СО РАМН) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2013100458**

Приоритет изобретения **09 января 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***11 февраля 2014 г.***

Срок действия патента истекает **09 января 2033 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2543654

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННОГО ТЕХНЕЦИЕМ-99m НАНОКОЛЛОИДА

Патентообладатель(ли): ***Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2013152911**

Приоритет изобретения **29 ноября 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***02 февраля 2015 г.***

Срок действия патента истекает **29 ноября 2033 г.**

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ПРОЕКТ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение №_____

Дата регистрации «____»_____ 20___г.

ФГАОУ ВО НИ ТПУ, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ

_____(номер)

Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3

(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3

(международное непатентованное или химическое наименование)

Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения

(лекарственная форма, дозировка)

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ – ФГАОУ ВО НИ ТПУ, Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА) – ФГАОУ ВО НИ ТПУ, Россия

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА)– ФГАОУ ВО НИ ТПУ, Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ФГАОУ ВО НИ ТПУ, Россия

ПРОЕКТ

СПЕЦИФИКАЦИЯ

«Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения.

ФГАОУ ВО НИ ТПУ

Параметры	Методы	Нормы
Лиофилизат		
Описание	Визуальный	Лиофилизат белого цвета в виде порошка или пористой массы.
Время растворения	Визуальный	Содержимое флакона должно растворяться в 4 мл раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % для инъекций. Время растворения не более 2 мин.
Подлинность	А. Эмиссионный спектральный анализ Б. УФ-спектрофотометрия В. УФ-спектрофотометрия	Линии эмиссионного спектра (нм): 308,22 и 309,27 – алюминий. УФ-спектр раствора, приготовленного для количественного определения олова дихлорида дигидрата, в области длин волн от 340 до 370 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 353±2 нм. УФ-спектр раствора, приготовленного для определения аскорбиновой кислоты, в области длин волн от 230 до 280 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 255±2 нм. УФ-спектр раствора, приготовленного

	Г. УФ-спектрофотометрия	для количественного определения желатина, должен иметь максимум поглощения при длине волны 540 нм.
Прозрачность раствора	ГФ XIII	Раствор должен быть опалесцентным
Цветность раствора	ГФ XIII	Раствор должен иметь белесоватый оттенок
pH	Потенциометрия	От 4,0 до 6,0
Механические включения	ГФ XIII	Соответствуют требованиям
Алюминия оксид	Эмиссионный спектральный анализ	От 0,10 до 0,25 мг/фл
Олова дихлорид дигидрат	Вольтамперометрия	Не более 0,07 мг/фл
Аскорбиновая кислота	Вольтамперометрия	Около 1мг/фл
Желатин	Спектрофотометрия	От 8,0 до 10,0 мг/фл
Бактериальные эндотоксины	ГФ XIII	Предельное содержание не более 26,5 ЕЭ/мл
Стерильность	ГФ XIII, метод прямого посева	Должен быть стерильным

Упаковка		Во флаконы для лекарственных средств вместимостью 10 мл (ТУ 9461-010-00480514-99. Флаконы герметично укупоривают пробками резиновыми (ТУ 38.106618-95 Тип I-I или УЛ-1А) и обжимают колпачками алюминиевыми или алюминиево-пластиковыми (ГОСТ Р51314-99). На флаконы наклеивают этикетки из бумаги писчей (ГОСТ 18510-87) или этикеточной (ГОСТ 7625-86) или самоклеящиеся этикетки. В контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной по ГОСТ 25250-88, помещают 5 флаконов с лиофилизатом. Одну контурную ячейковую упаковку вместе с инструкцией по применению препарата «Наноколлоид ^{99m}Tc-Al_2O_3» помещают в коробку картонную по ОСТ 64-071 или в коробку из картона марки хром-эрзац по ГОСТ 7933-89. На коробку наклеивают этикетку из бумаги писчей (ГОСТ 18510-87) или этикеточной (ГОСТ 7625-86) или наносят маркировку типографским способом.
Маркировка		Соответствует ФСП
Транспортирование		Должно соответствовать ГОСТ 17768-90. Допускается отклонение от

		температурного режима (10-25 ^{0}C) при транспортировании в течение 1 мес.
Хранение		При температуре от 2 ^{0}C до 10^{0}C.
Срок годности		1 год с даты изготовления
Препарат «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»		
Описание	Визуальный	Жидкость мутновато опалесцирующая
pH	Потенциометрия	От 4,0 до 6,0
Объемная активность	Радиометрия	280-500 МБк/мл на время приготовления
Радиохимическая чистота	Хроматография и радиометрия	Не менее 95,0 %
Хранение	-	Должно соответствовать «Основным санитарным правилам обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ-99/2010)
Срок годности	-	5 ч со времени приготовления
Меры предосторожности	-	Должно соответствовать «Основным санитарным правилам обеспечения радиационной безопасности» (ОСПОРБ-99/2010)

<u>Лиофилизат состав:</u>

<u>Активные вещества:</u>

Гамма-оксида алюминия нанопорошок

(ТУ 2164-003-03069303-2014) 0,10 – 0,25 мг

Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда) не более 0,07 мг

Желатин (ГОСТ 23058-89) 8,0 – 10,0 мг

Вспомогательные вещества

Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95) около 1,0 мг

Описание. Лиофилизат в виде порошка белого цвета или пористой массы.

Время растворения. Содержимое флакона должно растворяться в 4 мл раствора натрия хлорида 0,9 % для инъекций не более 120 сек (2 мин).

Подлинность. А. По алюминию: испытание проводят используя эмиссионный спектральный анализ по статье «Радиофармацевтические препараты» (ГФ XIII, том 2, с.987). В эмиссионном спектре препарата должны обнаруживаться характерные линии с длинами волн (нм): 308,22 и 309,27.

Б. По олову дихлориду дигидрату: льтрафиолетовый спектр раствора, приготовленного для определения дихлорида олова, должен иметь максимум поглощения при длине волны 353±2 нм в области длин волн от 340 до 370 нм. Приготовление раствора сравнения описано в разделе «Олова дихлорид дигидрат».

В. По аскорбиновой кислоте: ультрафиолетовый спектр раствора, приготовленного путем добавления к 0,4 мл раствора лиофилизата (приготовление см. в разделе «Время растворения») 9,6 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, в области длин волн от 230 до 280 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны 255±2 нм.

Г. По желатину: ультрафиолетовый спектр раствора должен иметь максимум поглощения при длине волны 540 нм.

Прозрачность раствора. Раствор лиофилизата (приготовление см. в разделе «Время растворения») должен быть опалесцентным (ГФ XIII, т. 1, с. 542).

Цветность раствора. Раствор лиофилизата (приготовление см. в разделе «Время растворения») должен иметь белесоватый оттенок (ГФ XIII, т. 1, с. 534).

pH. От 2,0 до 4,0 (потенциометрически; ГФ XIII, т. 1, с.526).

Механические включения. Лиофилизат должен выдерживать требования ОФС.1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах» (ГФ XIII, т. 2, с. 182).

Алюминия оксид. Определяют методом эмиссионного спектрального анализа по статье «Радиофармацевтические лекарственные препараты» (ГФ XIII, том 2, с. 987). На подготовленные электроды (5-6 шт.) наносят 0,05 мл раствора РФП и 0,05 мл раствора кобальта (ТУ 6-09-2338-77). Электроды просушивают, спектрографируют и проводят определение содержания алюминия в пробах. В последующим вычисляют концентрации.

Содержание алюминия оксида во флаконе (C) в миллиграммах вычисляют по формуле:

$$C = C_{Al} \cdot 4 * 3{,}78$$ где

C_{Al}– концентрация Al в испытуемом растворе, установленная с помощью калибровочного графика, миллиграмм/миллилитр;

4,0– объём раствора реагента во флаконе в миллилитрах;

3,78 – коэффициент пересчёта Al в алюминия оксид.

Содержание алюминия оксида во флаконе должно быть от 0,1 до 0,25 мг.

Примечание. Приготовления основного раствора кобальта.
В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют навеску хлорида кобальта (ТУ 6-09-2338-77) порядка 90 мг в 1% растворе HCl. Доводят объем до 100 мл тем же раствором кислоты. Содержание кобальта в растворе 0,4 мг/мл. Срок годности раствора 6 месяцев.

Построение калибровочного графика. Около 1,0 г (точная навеска) металлического алюминия (ГОСТ 11069-74, марка А99) помещают в стакан вместимостью 100 мл и растворяют при нагревании в 10-15 мл разбавленной (1:1)

кислоты хлористоводородной с последующим упариванием досуха. Сухой остаток растворяют в 20-40 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят объем до метки. Стандартный раствор содержит 1,0 мг/мл алюминия.

В пять мерных колб вместимостью 100 мл каждая вносят 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5; 0,25 мл стандартного раствора алюминия, а после по 14,0 мл основного раствора натрия хлорида и по 1 мл основного раствора кобальта хлорида. Затем объемы растворов в колбах доводят до метки 1% раствором кислоты хлористоводородной. На подготовленные электроды наносят по 0,05 мл каждого эталонного раствора и проводят спектрографирование. Калибровочный график строят в координатах: интенсивность спектральных линий - содержания алюминия в пробах, миллиграмм/миллилитр.

Примечание. Приготовление основного раствора натрия хлорида. 16,0 г фармакопейного натрия хлорида растворяют в 250 мл воды. Срок хранения 3 месяца.

Олово дихлорид дигидрат. В кварцевый стаканчик мерной пипеткой вносят 2,0 мл лиофилизата (приготовление см. в разделе «Время растворения»), добавляют 6 – 8 мл соляной кислоты концентрации 5 – 8 моль/мл. Нагревают несколько минут на плитке при температуре не более 80 ^{0}С, выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре. Отделяют осадок матрицы анализируемой пробы при помощи центрифуги или фильтруют через бумажный фильтр, предварительно промытый раствором разбавленной соляной кислоты (1:10), в мерную пробирку вместимостью 15 мл. Объем центрифугата (фильтрата) доводят до объема 10,0 – 15,0 мл дистиллированной водой.

Подготовку холостых проб проводят, добавляя те же реактивы, в тех же количествах и последовательности, но без анализируемой пробы. Одновременно проводят анализ двух параллельных и одной резервной («холостой») пробы.

Определение массовых концентраций олова проводят путем электролиза их ионов на ртутно-пленочном электроде при заданном отрицательном потенциале, равном минус 1,30 В в течение 200 секунд. Процесс электрорастворения

элементов с поверхности электрода и регистрацию анодных пиков олова проводят при линейно меняющемся потенциале от минус 0,80 В до минус 0,05 В относительно хлорсеребряного электрода. Потенциал максимума анодного пика олова на фоне соляной кислоты равен минус (0,4 ± 0,1) В.

Массовую концентрацию олова в пробе определяют по методу добавок аттестованных смесей олова. Для этого в каждую ячейку вносят по 0,01 мл аттестованной смеси олова концентрации 10,0 мг/л и проводят измерение по добавке.

Содержание олова во флаконе (G) вычисляют по формуле:

$$G = \frac{C}{1000} \cdot 4$$; где

C– концентрация олова (II) в испытуемом растворе, установленная с помощью метода ИВА, миллиграмм/литр;

4,0 – объём раствора лиофилизата в миллилитрах.

Содержание олова дихлорида дигидрата во флаконе должно быть не более 0,07 мг.

Примечание. 1. Приготовление основных аттестованных растворов из государственных стандартных образцов состава растворов с аттестованными концентрациями элементов 1,0 мг/мл

В мерную колбу вместимостью 50,0 мл вводят 5,0 мл стандартного образца состава олова и доводят объем до метки раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л;

2. Приготовление основных аттестованных растворов из государственных стандартных образцов состава растворов с аттестованными концентрациями металлов 10,0 мг/мл

В мерную колбу вместимостью 100,0 мл вводят 1,0 мл стандартного образца состава олова и доводят объем до метки раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л;

3. Приготовление основных аттестованных растворов из солей элементов

Навеску (0,100 ± 0,001) г металлического олова растворяют в стаканчике при слабом нагревании в 10,0 мл концентрированной соляной кислоты с добавлением 2,0 мл перекиси водорода; раствор количественно переносят в мерную колбу; добавляют еще 10,0 мл концентрированной HCl и доводят объем раствора до 1000,0 мл

дистиллированной водой.

4. Приготовление аттестованной смеси серии АС-1 с содержанием олова 10,0 мг/мл.
в колбу на 50,0 вносят мл 5,0 мл ОР олова концентрации 100 мг/л и доводят до метки раствором соляной кислоты концентрации 3,0 моль/л

Аскорбиновая кислота. Раствор реагента (приготовление см. в разделе «Время растворения») переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, смывая со стенок флакона остатки пробы дистиллированной водой. Добавляют 30 мл раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л, доводят объем колбы до метки дистиллированной водой, инкубируют 20 – 30 мин и отфильтровывают через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является пробой для вольтамперометрического измерения.

Подготовку холостых проб проводят, добавляя те же реактивы, в тех же количествах и последовательности, но без анализируемой пробы. Одновременно проводят анализ двух параллельных и одной резервной («холостой») пробы.

Процесс электрохимического окисления аскорбиновой кислоты проводят в растворе хлорида калия концентрации 0,1 моль/л, подкисленном соляной кислотой до pH примерно 3 – 4, на индикаторном стеклоуглеродном электроде при потенциале, равном (0,45-0,60) В относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода (нас.х.с.).

Массовую концентрацию аскорбиновой кислоты в пробе определяют по методу добавок аттестованных смесей. Для этого в каждую ячейку вносят по 0,01 мл аттестованной смеси аскорбиновой кислоты концентрации 500,0 мг/л и проводят измерение по добавке.

Содержание аскорбиновой кислоты во флаконе (G) вычисляют по формуле:

$$G = \frac{C}{1000} \cdot 4$$; где

C– концентрация аскорбиновой кислоты в испытуемом растворе, установленная с помощью метода ИВА, миллиграмм/литр;

4,0 – объём раствора лиофилизата в миллилитрах.

Содержание аскорбиновой кислоты во флаконе должно быть около 1,0 мг.

Примечание. 1. Приготовление основного раствора аскорбиновой кислоты (1000 мг/л):

а) Приготовление из ампул (5% раствор), выпускаемых медицинской промышленностью. В мерную колбу вместимостью 25,0 мл вводят 0,5 мл аскорбиновой кислоты из ампулы и доводят объем до метки дистиллированной водой;

б) Приготовление из сухого порошка аскорбиновой кислоты. Пробу аскорбиновой кислоты (0,025±0,001г) растворят в 25,0 мл бидистиллированной воды.

2. Приготовление раствора хлорида калия (0,1 моль/л). 7,5 ± 0,01 г хлорида калия, переносят в мерную колбу вместимостью 1,0 л, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, приливают 20,0 мл соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л и доводят дистиллированной водой до метки.

3. Приготовление раствора соляной кислоты (0,1 моль/л).

0,8 мл концентрированной HCl, растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды.

Желатин. Раствор реагента (приготовление см. в разделе «Время растворения») переносят в колбу и доводят объем дистиллированой водой до 25 мл.

Далее, в пробирку № 1 вносят 1 мл полученной смеси и 4 мл биуретового реактива. Объем доводят до 10 мл дистиллированной водой и перемешивают.

В пробирку № 2 вносят 1 мл исследуемого раствора и 0,04 мл стандартного раствора желатина. Затем в пробирку вносят 4 мл биуретового реактива, доводят общий обьем раствора дистиллированной водой до 10 мл.

Обе пробирки инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Измерение проводят на спектрофотометре при длине волны 540 нм относительно дистиллированной воды.

Определение концентрации (C_x) желатина в исследуемом растворе и его содержание во флаконе (Q_x) вычисляют по следующим формулам:

$$C_x=C_{эт}*D_x/(D_{x+эт}-D_x)$$

$$Q_x=C_x*V_x*V_{общ}/V_{ал}$$

$C_{эт}$ – концентрация желатина в стандартном растворе;

D_x – оптическая плотность пробы;

$D_{x+эт}$ – оптическая плотность пробы с добавкой стандартного раствора желатина;

V_x – объем добавки;

$V_{ал}$ – объем аликвоты;

$V_{общ}$ – объем рабочего раствора реагента

Содержание желатина во флаконе должно быть от 8 до 10 мг.

Примечание. 1. Приготовление биуретового реактива: перед анализом смешивают 20 мл раствора А и 80 мл раствора Б.
2. Приготовление раствора А. В колбу вносят 4,3 г сегнетовой соли (KNaC4H4O6) и 40 мл 0,2 М NaOH. Растворяют и прибавляют 1,5 г меди сульфата (CuSO45H2O) и 0,5 г калия йодистого. Перемешивают и доводят объем до 100 мл 0,2 М раствором NaOH. Срок годности около месяца.
3. Приготовление раствора Б. 0,5 г калия йодистого растворяют в 100 мл 0,2 М NaOH. Срок годности 14 суток..
4. Приготовление 0,2 М раствора едкого натра. 0,8 г едкого натра растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 мл. Воду предварительно освобождают от углекислого газа путем кипячения в течение нескольких минут.
5. Приготовление стандартного раствора желатина. В 100 мл теплой дистиллированной воды растворяют 1,0 г желатина. Стандартный раствор содержит 10,0 мг/мл желатина.

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных токсинов не более 52,6 ЕЭ на флакон или не более 26,5 ЕЭ на 1 мл исходного раствора реагента. Содержимого флакона растворяют воды в 4 мл ЛАЛ-воды (исходный раствор) и проводят разбавление в 200 раз (ГФ XIII, т. 1, с. 956).

Стерильность. Содержимого флакона растворяют воды в 4 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 %. Раствор должен быть стерильным (ГФ XIII, т. 1, с. 924, метод прямого посева).

Упаковка. Во флаконы для лекарственных средств вместимостью 10 мл (ТУ 9461-010-00480514-99). Флаконы герметично укупоривают пробками резиновыми (ТУ 38.106618-95 Тип I-I или УЛ-1А) и обжимают колпачками алюминиевыми или алюминиево-пластиковыми (ГОСТ Р51314-99).

Маркировка. На этикетке флакона указывают: предприятие-изготовитель и его товарный знак, название препарата, лекарственную форму (лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения), «стерильно», номер серии, срок годности.

На коробке указывают: предприятие-изготовитель и его товарный знак, адрес, название препарата, лекарственную форму, состав реагента, количество флаконов, «стерильно», номер серии, срок годности, условия хранения, отклонения от температурного режима хранения при транспортировании.

Транспортирование. В соответствии с ГОСТ 17768-90. Допускается отклонение от температурного режима хранения (10 – 25 ºС) при транспортировании в течение 1 мес.

Хранение. При температуре от 2 ºС до 10 ºС.

Срок годности. 1 год с даты изготовления.

Препарат «Наноколлоид ^{99m}Tc-Al_2O_3»

Для приготовления препарата во флакон с лиофилизатом вводят 4,0 мл натрия пертехнетата,^{99m}Tc шприцем путем прокола иглой резиновой пробки. Содержимое флакона перемешивают встряхиванием и инкубируют при температуре 70-80ºС в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры.

Состав на 1 мл.

Активные вещества:

Технеций-99м, адсорбированный на оксиде алюминия 280-500 МБк

(ФТИ ТПУ – Россия; НИФХИ им. Л.Я. Карпова - Россия)

Вспомогательные вещества:

Алюминия оксид (ТУ 2164-003-03069303-2014)	0,025 – 0,063 мг
Олова дихлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда)	не более 0,0175 мг
Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95)	0,20 – 0,25 мг
Желатин (ГОСТ 23058-89)	2,0– 2,5 мг
Натрия хлорид (ФС 42-2572-95)	9,0 мг
Вода для инъекций (ФС 42-2620-97)	до 1 мл

Описание. Жидкость мутновато опалесцирующая

pH. От 4,0 до 6,0 (потенциометрически; (ГФ XIII, т. 1, с.526).

Объемная активность. Объемная активность технеция-99м в препарате равна объемной активности технеция-99м в растворе натрия пертехнетата,^{99m}Tc, используемого для приготовления препарата, и должна быть в пределах от 280 до 500 МБк/мл на время приготовления.

Радиохимическая чистота. На полоску хроматографической пластины с тонким слоем силикагеля № 5554 фирмы Мерк, размером 20×100 мм, наносят препарат в таком количестве (5 мкл), чтобы можно было статистически достоверно зарегистрировать на установке, минимум 0,5 % от нанесенной активности. После высушивания пятна, пластину помещали в подготовленную камеру. Хроматографическую камеру предварительно наполняли ацетоном (подвижная фаза) с высотой слоя на дне камеры 1 см. Хроматографирование проводят в ацетоне в течение 10 мин. В указанных условиях пертехнетат,^{99m}Tc-ионы продвигаются с фронтом растворителя, а меченный ^{99m}Tc наноколлоид гамма-оксида алюминия остается на линии старта. Полученную хроматограмму высушивают при комнатной температуре и обклеивают с обеих сторон лентой полиэтиленовой с липким слоем (ГОСТ 20477-86) и измеряют скорость счета от

участка, содержащего пертехнетат, ^{99m}Тс-ионы, и от всей хроматограммы радиометрическим методом.

Радиохимическая чистота препарата должна быть не менее 95,0 %.

Хранение. В соответствии с действующими основными санитарными правилами обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010).

Срок годности. 5 ч со времени приготовления.

Меры предосторожности. Работа с препаратом должна проводиться в соответствии с действующими основными санитарными правилами обеспечения радиационной безопасности ОСПОРБ-99/2010.

Примечание. Реактивы и титрованные растворы, приведенные в настоящей фармакопейной статье, описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи XIII издания, ч.1

Проректор по научной работе и инновациям
ФГАОУ ВО «НИ ТПУ»
к.т.н.
_____ С.А. Байдали

«____»_____2017 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Экз. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФТИ ТПУ

_____ О.Ю. Долматов

«_____» _____ 2014 г.

ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство лиофилизата для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения.

«Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

ОПР-14402245-02-14

Срок действия регламента до «01» _____09_____2024 г.

СОГЛАСОВАНО

Директор Томского НИИ Онкологии

_____ Е.Л. Чойнзонов

«_____» _____ 2014 г.

Томск-2014

Содержание

страница

1 Характеристика готового продукта

2 Химическая схема производства

3 Технологическая схема производства

4 Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования

5 Характеристика сырья, вспомогательных материалов, полупродуктов

6 Изложение технологического процесса

7 Материальный баланс

8 Переработка и обезвреживание отходов производства

9 Контроль производства

10 Безопасная эксплуатация производства

11 Охрана окружающей среды

12 Перечень производственных инструкций

13 Технико-экономические нормативы

14 Информационные материалы

Лист регистрации изменений

1 Характеристика готового продукта

1.1. Наименование продукции

«Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения (далее – Лиофилизат).

1.2. Категория и номер действующего нормативного документа.

Проект ФСП на лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3»

1.3. Основное назначение продукции

Лиофилизат для приготовления раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения является полупродуктом, предназначенным для получения готовой лекарственной формы – радиофармпрепарата «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» (далее – РФП «Наноколлоид,^{99m}Tc-Al_2O_3»), который в свою очередь предназначен для диагностики процессов развития злокачественных новообразований на ранних стадиях патологии методом визуализации сторожевых лимфатических узлов и лимфатической системы в целом по средствам γ-сцинтиграфии.

Фармакокинетика.

После проведения подкожной инъекции РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» активно покидает место введения - через 1 час в месте инъекции остается около 2/3 от введенной активности. РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» накапливается в лимфатическом узле через 20 минут после введения, аккумуляция РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в лимфатическом узле составила 1,2% от введённой активности. К первому часу исследования среднее накопления РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» в лимфатическом узле достигает 9% от введённой активности и постепенно, в течение 24 часов, нарастает до 12% от введённой активности. Поступивший в кровь через грудной лимфатический проток РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» весьма активно накапливается в почках, с последующим вымыванием РФП из ренальной паренхимы. Уровень накопления индикатора в почках, через 10 минут после инъекции составляет 2% от введённой

активности, к 30 минуте исследования возрастает до 4% и практически не изменяется в течение 24 часов. В печени и селезенке величина аккумуляции РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» возрастает постепенно и через 24 часа после инъекции достигает 2,2% от введённой активности. Следует отметить незначительное содержание РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» органах средостения и крови (менее 1% от введенной активности).

Показания к применению.

Препарат применяют в качестве диагностического средства для:

- сцинтиграфического и интраоперационного выявления «сторожевых» лимфатических узлов в онкологии;

- лимфосцинтиграфии (играет важную роль в диагностике состояния лимфатической системы у больных с отеками нижних конечностей).

Метод позволяет оценить функцию лимфатических капилляров, транспорт изотопа по коллекторам и накопление его в региональных лимфатических узлах.

«Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», на основе оксида алюминия готовят в медицинском учреждении непосредственно перед употреблением. Готовый препарат представляет собой коллоидный раствор технеция-99м на основе оксида алюминия.

Состав лиофилизата (на 1 флакон)

Гамма-оксида алюминия нанопорошок (ТУ 2164-003-02069303-2014) 0,10 – 0,14 мг

Олово (II) хлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда) не более

Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95) 0,07 мг

Желатин (ГОСТ 23058-89) 0,8 – 1,0 мг

8,0 – 10,0 мг

<u>Состав РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» (на 1 мл).</u>

Активные вещества:

Технеций-99м в растворе натрия пертехнетата, ^{99m}Tc 280-500 МБк

Вспомогательные вещества:

Гамма-оксид алюминия нанопорошок (ТУ 2164-003-02069303-2014) 0,025 – 0,035 мг

Олова (II) хлорид дигидрат (ТУ 6-09-5393-88, чда) не более 0,0175 мг

Аскорбиновая кислота (ФС 42-2668-95) 0,20 – 0,25 мг

Желатин (ГОСТ 23058-89) 2,0– 2,5 мг

Натрия хлорид (ФС 42-2572-95) 9,0 мг

Вода для инъекций (ФС 42-2620-97) до 1 мл

Лекарственная форма: Лиофилизат для приготовления радиофармацевтического раствора для подкожного, паратуморального и интратуморального введения.

1.4 Краткое описание внешнего вида и потребительские свойства.

Лиофилизат белесоватого цвета в виде пористой массы (порошка) во флаконах вместимостью 10 мл. Готовый РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», жидкость мутновато-опалесцирующего цвета, способствует визуализации сторожевых лимфатических узлов.

Готовый РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» представляет собой суспензию на основе гамма-оксида алюминия, меченого технецием-99м.

Механизм действия – при подкожном или интратуморальном/паратуморальном введении поступает в лимфатическую систему и накапливается в сторожевых лимфатических узлах.

РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3» удовлетворяет следующим требованиям:

- механизм действия – радиофармпрепарат при подкожном или интратуморальном/паратуморальном введении поступает в лимфатические сосуды и накапливается в лимфоузлах;

- радиоактивная метка – раствор натрия пертехнетата ($Na^{99m}TcO_4$) из хроматографического генератора, раствор натрия пертехнетата ($Na^{99m}TcO_4$) из экстракционного генератора;

- лекарственное средство должно быть представлено в виде стандартного набора к генератору ^{99m}Tc для прямого получения радиофармпрепарата в условиях медицинских радиологических лабораторий;

- по безопасности – не должен быть токсичнам;

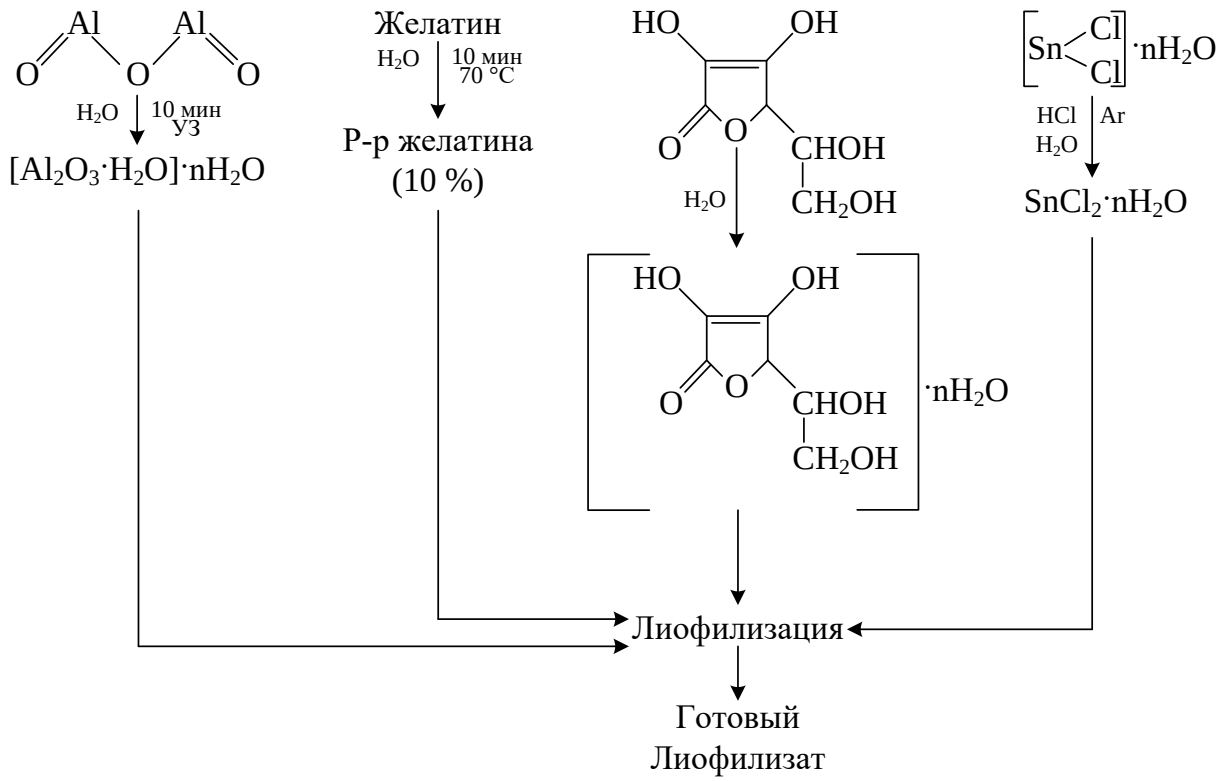
соответствовать требованиям 4 класса опасности «вещества малоопасные» ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества»;

- по времени регистрации – от 20 мин до 20 часов после инъекции;

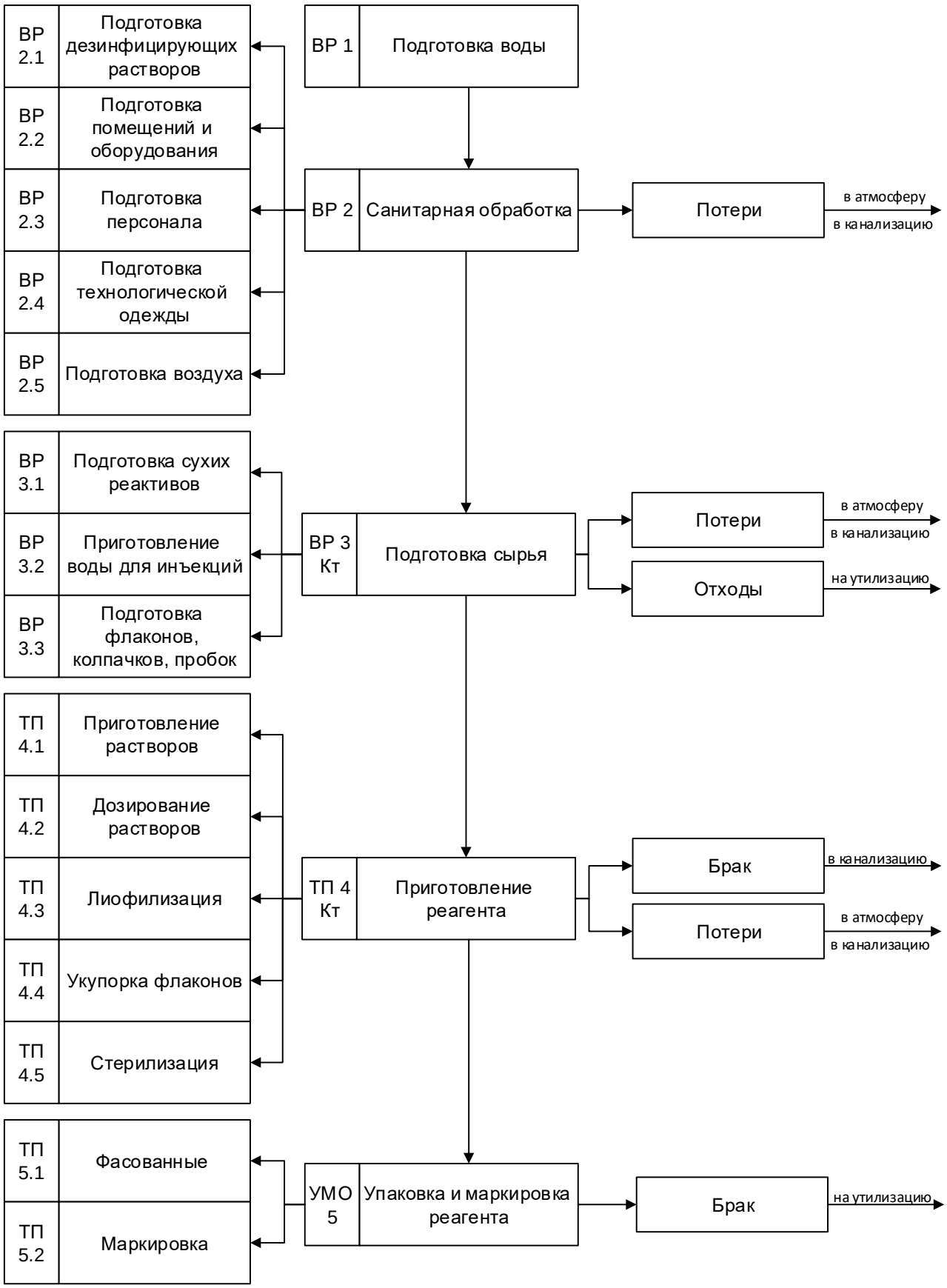
- объемная активность не менее 110 МБк/мл на время приготовления;

- радиохимическая чистота > 95%.

2 Химическая схема производства



3 Технологическая схема производства



4 Аппаратурная схема производства и спецификация оборудования

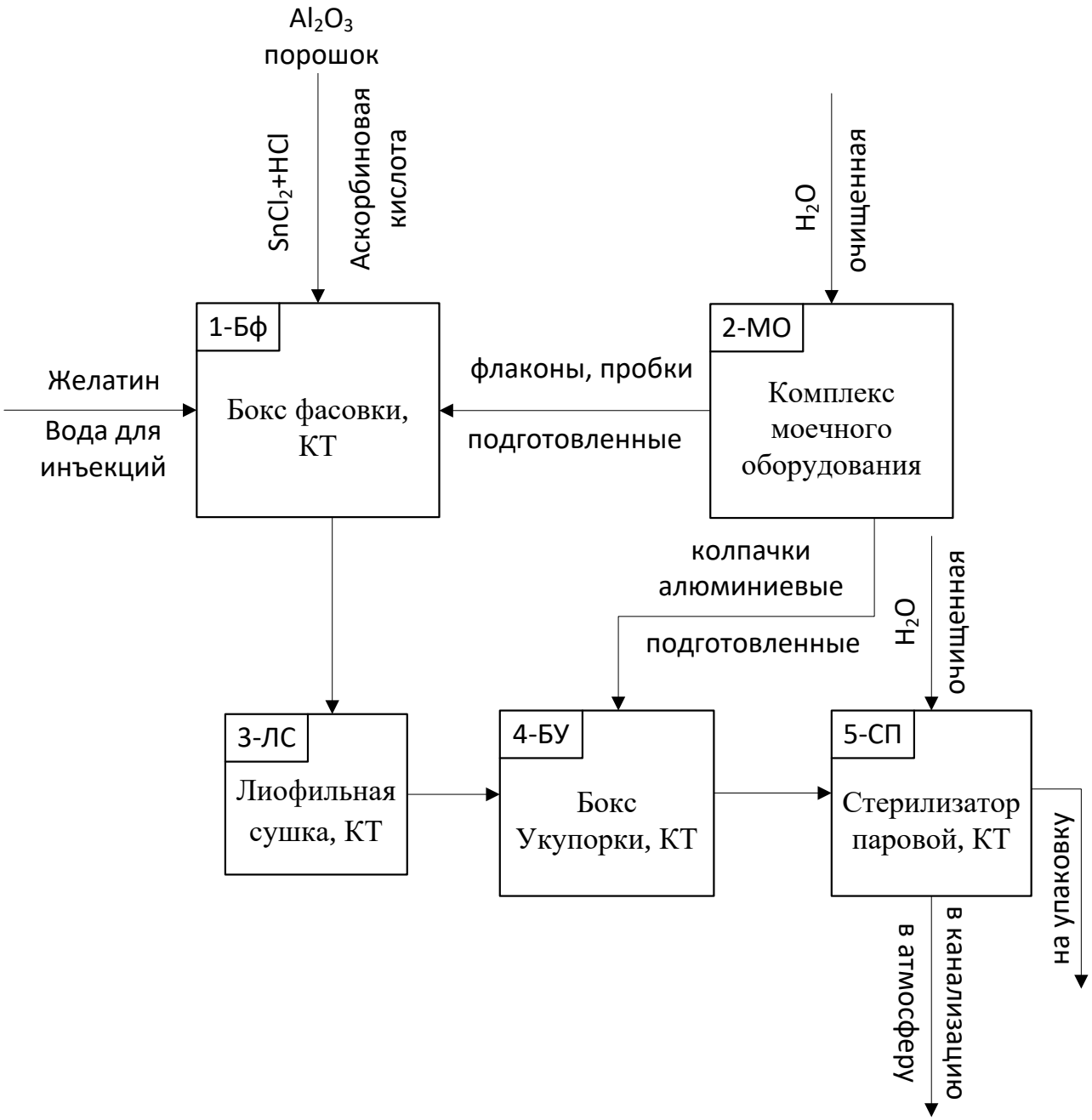


Таблица 4.1 – Спецификация основного оборудования.

код	Наименование	Количество единиц	Материал рабочей зоны	Техническая характеристика	Регистрационный номер
1	2	3	4	5	6
1-БФ	Бокс фасовки	1	Нержавеющая сталь	СЛШ-002-амс	001
2-МО	Комплекс моечного оборудования	1	Нержавеющая сталь	Установка водоподготовки УВОИ-МФ 3 Машина посудомоечная Simens Шкаф ШСС-82 Аппарат для дистилляции GFL 2101	002
3-ЛС	Лиофильная сушка	1	Нержавеющая сталь	FreeZone 2.7	003
4-БУ	Бокс укупорки	1	Нержавеющая сталь	ВЛР-202г-М Полуавтомат закаточный ПЗФ	004
5-СП	Стерилизатор паровой	1	Нержавеющая сталь	ГК-10-1 V = 10 л P = 1.2-1.3 кгс/см^2	005

Вспомогательное оборудование:

1. pH-метр.
2. Весы электронные.
3. Ламинарные системы, включающие ламинарные боксы и боксы для поддержания стерильности.
4. Пинцет анатомический.
5. Стерилизатор паровой.
6. Ультразвуковая ванна.
7. Установка для получения воды для инъекций.
8. Фильтры с диаметром пор 220, 100 и 50 нм.
9. Холодильная установка.
10. Шкаф сушильно-стерилизационный.
11. Электрическая плитка.
12. Химическая посуда (колбы, стаканы, пипетки и т.д.).

5 Характеристика сырья, вспомогательных материалов, полупродуктов

Наименование	Обозначение НТД	Сорт или артикул	Показатели, обязательные для проверки	Примечание
1	2	3	4	5
А – основное сырье				
Аскорбиновая кислота	ФС 42-2668-95			
Вода очищенная	ФС 42-2619-97		В соответствии с ФС	
Вода для инъекций	ФС 42-2620-97		В соответствии с ФС	
Желатин	ГОСТ 23058-89		Отсутствие механических включений	Стадия ТП 4.1
Колпачки алюминиевые и комбинированные для укупорки лекарственных средств.	ГОСТ Р 51314-99		Отсутствие дефектов и механическая целостность	Стадия ТП 4.4
Нанопорошок гамма-оксида Al_2O_3, активированный нейтронами	ТУ 2164-003-02069303-2014)		Отсутствие механических включений	Стадия ТП 4.1
Олово (II) хлорид дигидрат	ТУ 6-09-5393-88	ч.д.а	При входном контроле	Стадия ТП 4.1
Соляная кислота	ГОСТ 3118-77	х.ч.	содержание механических включений	Стадия ТП 4.1
Б – вспомогательное сырье и материалы				

"Амифлайн"	ТУ 9392-048-00479095-2004		цвет, запах	Стадия ВР 2
Водорода перекись. Технические условия	ГОСТ 117-88	ВС ОКП 21 2352 0220	содержание механических включений	Стадия ВР 2
Клиндезин-специаль	ТУ 9392-002-96158941-2007		цвет, запах	Стадия ВР 2
Лизоформин специаль	ТУ 9392-024-00479095-98		цвет, запахс	Стадия ВР 2
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ Р-51-652-2000	96 %	содержание механических включений	Стадия ВР 2

6 Изложение технологического процесса

ВР 1.Подготовка воды

В производстве лиофилизата используется вода очищенная и вода для инъекций по ГФ 13. Растворы для проведения анализов и санитарной обработки готовят на воде очищенной. Суспензию оксида алюминия, олова (II) хлорид дигидрат, аскорбиновая кислота, желатин готовят на воде для инъекций. Качество воды контролируют по всем показателям, соответствующей ФС 42-2620-97.

ВР 2. Санитарная обработка

ВР 2.1. Подготовка дезинфицирующих растворов

В соответствии с программой «Дезинфекция на производстве» ежедневно перед работой проводится влажная уборка и дезинфекция помещения и оборудования.

ВР 2.2. Подготовка помещений и оборудования

Работы проводят в соответствии с программой «Дезинфекция на производстве».

ВР 2.3. Подготовка персонала

Порядок подготовки персонала к работе по выпуску РФП проводится в соответствии с методическими указаниями МУ 64-09-001-2002.

ВР 2.4. Подготовка технологической одежды

Комплект технологической одежды вкючает: комбинезон; шапочка, сшитая из смеси полиэфирных и хлопчатобумажных нитей; обувь.

ВР 2.5. Подготовка воздуха

В Помещениях должна быть эффективная система вентиляции. В помещения подается воздух, соответствующий классу D. Во избежание заброса "грязного" воздуха из смежных помещений предусматривается создание положительного давления с градиентом 5 – 15 Па.

ВР 3. Подготовка сырья

ВР 3.1. Подготовка сухих реактивов

Перед использованием реагенты проверяют на отсутствие механических включений.

ВР 3.2. Приготовление воды для инъекции

Объем получения – 2.5 л/ч. Чистота при получении – 0.5-1,1 мкСм. Содержание солей не более 0.5 мг/л.

Получение воды для инъекций осуществляется на установке серии УВОИ-«М-Ф»-1812. Качество воды контролируется согласно ГФ 13

ВР 3.3. Подготовка резиновых пробок, флаконов, алюминиевых колпачков

Резиновые пробки, флаконы, колпачки алюминиевые готовят в асептических условиях.

Стерилизацию проводить в следующих режимах:

- в паровом стерилизаторе — 120-123 ºС, 20 мин.;

- в воздушном стерилизаторе — 160-180 ºС, 60 мин.

ТП 4. **Приготовление лиофилизата**

Работы по приготовлению проводят в боксе фасования, расположенном в помещении класса чистоты С. Бокс фасования включает в себя ламинарный шкаф, в котором вентилируется инертный газ, и проводятся операции приготовления растворов аскорбиновой кислоты, дихлорида олова, желатина и их фасования.

ТП 4.1 Приготовление растворов

Приготовление суспензии наноколлоида оксида алюминия

Взять навеску оксида алюминия нанопорошка массой 0,025 г, сюда же прилить 50 мл кипяченой дистиллированной воды. Поместить колбу в ультразвуковую ванну на 1-2 часа. Довести pH раствора 0,05 М раствором соляной кислоты до значения, равного 2. За тем объем довести до метки кипяченой дистиллированной водой, тщательно перемешать и оставить на 10 ч при комнатной температуре. Концентрация оксида алюминия в слое жидкости над выпавшим осадком составляет 0, 10-0,25 мг/мл.

Примечание: Приготовление 0,05 М раствора кислоты хлористоводородной. Для приготовления раствора 4,1 мл 2 М кислоты хлористоводородной помещают в пробирку вместимостью 5 мл с притертой пробкой, прибавляют по 0,3 мл 0,006

М раствора калия рениевокислого (ALDRICH кат. № 243590), 0,1 мл 2 М раствора калия роданистого (MERCK кат. № A349425), 0,5 мл раствора лиофилизата и перемешивают.

Приготовление раствора олова (II) хлорида дигидрата

В колбу вместимостью 50 мл с навеской олово (II) хлорид дигидрат ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) массой 0.35 г осторожно прилить 1 мл 1М HCl. По окончании растворении объем довести до метки водой для инъекций. Растворение вести в среде инертного газа (аргона), который барботирует в растворе через стеклянную толстостенную трубку. Полученный раствор имеет концентрацию олова 7 мг/мл. Срок годности 0,5 ч.

Приготовление раствора аскорбиновой кислоты

Взять навеску аскорбиновой кислоты массой 1 г. Объем довести до 100 мл кипяченой дистиллированной водой. Срок годности 3 ч.

Приготовление раствора желатина

Взять навеску желатина медицинского, массой 10 г. Объем довести до 100 мл кипяченой дистиллированной водой. Нагревать на водяной бане при температуре 70ºС в течение 10 мин до полного растворения. Полученный раствор имеет концентрацию желатина 100 мг/мл. Срок годности 3 ч.

ТП 4.2 Дозирование растворов.

В подготовленные флаконы вместимостью 10 мл ввести свежеприготовленные растворы:

- 1 мл суспензии гамма-оксида алюминия;
- 0,01 мл раствора олова (II) хлорида дигидрата;
- 0,1 мл раствора аскорбиновой кислоты;
- 0,1 мл раствора желатина.

Флаконы со смесью реагентов накрыть резиновой пробкой типа УЛ-1 (для лиофилизации) и установить в камеру лиофилизатора.

ТП 4.3. Лиофилизация.

Перед проведением лиофильной сушки внутреннюю поверхность сушильной камеры предварительно обработать дезинфицирующими растворами,

с последующей протиркой поверхности безворсовой салфеткой. Также обработать уплотнители крышки сушильной камеры для удаления пыли и загрязнений, которые могут привести к утечке вакуума. Закрыть все вентили.

Флаконы со смесью реагентов после предварительного замораживания при -50 ºС в течение 2 ч помещают в нижнюю камеру лиофилизатора и выдерживают при -50 ºС и давлении 0,01-0,02 мбар в течение 20 часов. Затем флаконы перемещают в верхнюю камеру лиофилизатора и проводят досушивание в течение 4 ч в режиме 10-15ºС и давлении в камере 0,01-0,02 мбар. КТ.

Контролируемые параметры:

1-Все режимы работы лиофильной сушки реагентов выполняются согласно методике;

2-Визуальный контроль окончания процесса сушки, сухая субстанция, сухие моно хлопья лиофилизата.

ТП 4.4 Укупорка флаконов.

После полного высушивания реагента в лиофильной сушке флаконы укупоривают пробками резиновыми ТУ 38.106618-95 Тип I-I и обжимают колпачками алюминиевыми ГОСТ Р51314-99.

ТП 4.5 Стерилизация.

Стерилизацию содержимого флаконов проводят в паровом стерилизаторе при температуре 120 – 122 °С под давлением 120 кПа в течение 12 минут.

Флаконы с лиофилизатом помещают в паровой автоклав.

В процессе автоклавирования следует регистрировать условия процесса стерилизации (температуру, давление и время). Температуру измеряют с помощью термочувствительных элементов, помещенных в контрольные упаковки, вместе с дополнительными термоэлементами, помещенными в самые низкотемпературные места стерилизационной камеры. Регистрируют условия каждого цикла стерилизации.

Для оценки эффективности каждого цикла стерилизации используют химические (термовременные) индикаторы.

УМО 5. Упаковка и маркировка лиофилизата

УМО 5.1. Упаковка

5 флаконов со стерильным лиофилизатом помещают в ячейковую упаковку из поливинилхлоридной пленки (ГОСТ 25250-88), которую в свою очередь вместе с инструкцией по применению препарата помещают в коробку картонную.

УМО 5.2. Маркировка

Наклеивают этикетки из бумаги писчей или самоклеящиеся этикетки. На этикетке указывают: товарный знак предприятия-изготовителя, названия препарата, лекарственную форму, «стерильно», номер серии, срок годности.

Таблица 6.1 – Израсходовано суммарно на 100 флаконов на стадии.

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание вещества, %	Израсходовано				
		Масса			Объем, мл	Количество, штук
		г	г основного вещества	г/моль		
1	2	3	4	5	6	7
Гамма-оксида алюминия нанопорошок	99,7	0.01-0.025	0.00997-0.0239	-	-	-
Олово (II) хлорид дигидрат	99,0	0.007	0.0069	-	-	-
Аскорбиновая кислота	99,0	0.08-0.1	0.0792-0.099	-	-	-
Желатин	99,0	0.8-1,0	0.792-0.99			
Вода для инъекций	100	-	-	-	250	-
Соляная кислота	18,25	0,009	0,011	-	5	-

Таблица 6.2 – Получено на стадии (суммарно на 100 флаконов).

Наименование полупродуктов и сырья	Содержание основного вещества, %	Получено				
		Масса			Объем, мл	Количество, штук
		г	г основного вещества	г/моль		
1	2	3	4	5	6	7
А) Готовый продукт: «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», лиофилизат для приготовления раствора для подкожного или интратуморального/паратуморального введения	1,72	1,015	0,0175	-	-	100
Б) Отходы: вода в виде пара	100	-	-	-	250	-

Таблица 6.3 – Параметры режима и безопасности технологического процесса.

Наименование стадии, операции	Наименование и расположение аппарата на схеме	Наименование работы (элемента операции)	Параметры технологического процесса					
			название	Значение				
				Технологическая норма		Опасное	Предельно допустимое	Критическое
				мин	макс			
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Приготов-ление растворов	1-БФ	Приготовле-ние раствора олова (II) хлорида дигидрата	Время приготовления, мин	5	7	20	15	19
Приготов-ление растворов	1-БФ	Приготовле-ние суспензии гамма-оксида алюминия	Время приготовления, мин	10	15	30	15	25
Приготов-ление растворов	1-БФ	Приготовле-ние раствора аскорбино-вой кислоты	Время растворения, мин	15	20	40	20	35
Желатин	1-БФ	Приготовле-ние раствора желатина	Время приготовления, мин	10	15	20	15	18
Лиофилиза-ция	3-ЛС	Лиофилиза-ция	Темпера-тура сушки, °С	-45	-50	-42	-40	-35
Лиофилиза-ция	3-ЛС	Лиофилиза-ция	Время сушки, ч	24	30	21	23	22

Таблица 6.4 – Неполадки в работе оборудования и действия персонала при их возникновении.

Неполадки	Причины возникновения неполадок	Способы устранения неполадок (действия персонала)
1	2	3
Не происходит отбор реагента в многоканальный дозатор при дозировании	Неисправен дозатор	Заменить дозатор
Не идет барботаж аргона при растворении	Закончился инертный газ	Замените баллон с газом
Не достигается требуемая температура лиофилизации	Нарушена герметичность камеры Отключен насос	Проверьте плотность прилегания крышки к камере Включите насос
Деформация алюминиевых колпачков при укупорке флаконов	Сбились настройки закаточного устройства	Отрегулируйте закаточное устройство

7 Материальный баланс

Материальный баланс составлен на 1 флакон с РФП «Наноколлоид, ^{99m}Tc-Al_2O_3», объемом 4 мл.

Наименование сырья и полупродуктов	Заданная масса единицы лекарственной формы, мг	Рассчитанный объём серии (количество единиц лекформы, штук)	Рассчитанная масса сырья, мг	Получено	
				кол-во ед. лекформы, штук	масса, мг
1	2	3	4	5	6
А. Сырье: 1 Оксид алюминия 2 Олово (II) хлорид дигидрат 3 Аскорбиновая кислота 4 Желатин 5 Вода для инъекций Б. Полупродукты 1 Флакон пенициллиновый 2 Медицинская пробка 3 Алюминиевый Колпачок	11,22	100 флаконов	1121	100 флаконов	1117
1. Отходы и потери Вода при сушке	1212	100 флаконов	121200	100 флаконов	121200

8 Переработка и обезвреживание отходов производства

Таблица 8.1 – Перечень и характеристика отходов, которые передаются для переработки или обезвреживания в другие подразделения или на другие предприятия

Наименование и место образования отхода	Наименова-ние и номер позиции оборудо-вания, в котором собирается отход	Количество отхода			Класс токсичности отхода	Характеристика отхода				Куда направляется отход
		От одной серии		В пересчете на ед. измерения конечного продукта		Агрегатное состояние; плотность, кг/м^3	Наим-ние ценных веществ, подлежащих переработке	содержание ценных веществ в отходе, % мас		
		кг кг/цикл.	л					до обработки	после обработки	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Вода ВР 2	Емкость	45 кг	-	-	IV	Жидкое, 1000 кг/м^3	-	-	-	Канализация
ВР-3 Некондиционные флаконы	Пластиковый пакет	0.1	-	-	IV	Твердое, 2200 кг/м^3	-	-	-	Полигон ТБО, автомобильным транспортом
ВР-3 Некондиционные пробки	Пластиковый пакет	0.05	-	-	IV	Твердое, 1200 кг/м^3	-	-	-	Полигон ТБО, автомобильным транспортом

ВР-3 Некондиционные колпачки	Пластиковый пакет	0.01	-	-	IV	Твердое, 2800 кг/м^3	-	-	-	Полигон ТБО, автомобильным транспортом

9 Контроль производства

Осуществляется согласно методикам:

- «методика определения химических примесей в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения радиохимической чистоты в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения концентрации ионов водорода (pH) наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения подлинности и объемной активности радионуклидов в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения содержания ионов олова в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения желатина в наноколлоиных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения аскорбиновой кислоты в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения содержания натрия хлорида в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».
- «методика определения ионов алюминия в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия».

Таблица 9.1 – Перечень важнейших контрольных точек производства.

Наименование стадий, места измерения параметров или отбора проб	Наименование объекта контроля	Наименование контролируемого параметра	Регламентированный норматив (значение параметра)	Методы и средства контроля	Режим работы по статистическим методам управления качества продукции	Кто производит контроль и в каком документе регистрируются результаты
Стадия ВР 3.1 Подготовка сухих реактивов	Гамма-оксид алюминия нанопорошок	Масса	0,025 г	Взвешивание, аналитические весы		Химик. Журнал входного контроля
	Олова (II) хлорид дигидрат	Масса	0,35 г	Взвешивание, аналитические весы		Химик. Журнал входного контроля
	Аскорбиновая кислота	Масса	1 г	Взвешивание, аналитические весы		Химик. Журнал входного контроля
	Желатин	Масса	10 г	Взвешивание, аналитические весы		Химик. Журнал входного контроля
Стадия ВР 3.2 Приготовление	Вода для инъекций	ФС 42-2620-97	ФС 42-2620-97	По ФС 42-2620-97		Химик. Журнал приготовления

воды для инъекций						растворов
Стадия ТП 4.1 Приготовление растворов	Суспензия гамма-оксида алюминия нанопорошок	Концентрация	0.10 – 0.14 мг/мл	Химический анализ пробы	При комнатной температуре	Химик. Журнал приготовления растворов
Стадия ТП 4.1 Приготовление растворов	Олова (II) хлорид дигидрат	Концентрация	не более 7 мг/мл	Химический анализ пробы	pH 2-3	Химик. Журнал приготовления растворов
Стадия ТП 4.1 Приготовление растворов	Аскорбиновая кислота	Концентрация	10 мг/мл	Химический анализ пробы		Химик. Журнал приготовления растворов
Стадия ТП 4.1 Приготовление растворов	Желатин	Концентрация	100 мг/мл	Химический анализ пробы		Химик. Журнал приготовления растворов
Стадия ТП 4.2 Дозирование растворов	Жидкий реагент во флаконе	Концентрация гамма-оксид алюминия, олово, аскорбиновая	0,10-0,25 мг не более 0,07 мг	Химический анализ пробы		Химик. Журнал приготовления растворов

		кислота, желатин	около 1 мг 8,0-10,0 мг			
Стадия ТП 4.3 Лиофилизация	Лиофилизат	Внешний вид	Лиофилизат белесоватого цвета в виде порошка или пористой массы	Визуальный		Химик. Паспорт качества

10 Безопасная эксплуатация производства

10.1. Общие положения.

10.1.1. Гамма-оксид алюминия нанопорошок обладает низкой токсичностью, однако его пыль может вызвать раздражение слизистых и верхних дыхательных путей. Не допускается попадание препарата в рабочую зону, поэтому все работы с ним проводятся в вытяжном шкафу при включенной вентиляции. Все работы с гамма-оксидом алюминия нанопорошком проводятся в спецодежде, с применением средств индивидуальной защиты. Гамма-оксид алюминия нанопорошок пожаро- и взрывобезопасен.

10.1.2. Особой токсичностью олово (II) хлорид дигидрат не обладает, однако его пыль может вызвать раздражение кожи, слизистых и верхних дыхательных путей. Не допускается попадание препарата в рабочую зону, поэтому все работы с ним проводятся в вытяжном шкафу при включенной вентиляции. Все работы с оловом (II) хлоридом дигидратом проводятся в спецодежде, с применением средств индивидуальной защиты. Олово (II) хлорид дигидрат пожаро- и взрывобезопасен.

10.1.3. Аскорбиновая кислота витаминное средство, оказывает метаболическое действие, в организме человека не образуется, а поступает только с пищей.

10.1.4. Желатин является съедобным белком, поэтому может считаться пищевым продуктом, токсичностью не обладает.

Таблица 10.1 - Пожаровзрывоопасные свойства сырья, полупродуктов, готового продукта и отходов производства.

Газы и жидкости

N п/п	Наимено-вание вещества, содержа-ние основного вещества, % масс.	Агрегатное состояние при нор-мальных условиях.	Плотность паров (газов) при нор-мальных условия, кг/куб. м	Раство-римость в воде, % масс.	Возможно ли воспла-менение или взрыв вещества при воздействии на него		Удельная теплота сгорания, кДж/кг		Температура, град. С					Минимая энерги зажиган мДж
					воды (да, нет)	кислорода воздуха (да, нет)	жидкой фазы	парога-зовой фазы	кипе-ния	самово с-пламен е-ния	вос-плам е-нени я	вспы шки	начала экзотер-мическо го разложе-ния <*>	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

1	Спирт этиловый ректифицированный	Жидкость	2,043 кг/м^3	100	нет	нет	$25\cdot10^6$	$25\cdot10^6$	78.4	363	18	13	-	0.246

Сведения о взрывопожарной и пожарной опасности производственных зданий, помещений.

Таблица 10.2 - Взрывопожарная и пожарная опасность зданий и помещений

Наименование производственных зданий, помещений	Категория взрывопожарной и пожарной опасности помещений и зданий (НПБ 105-95)	Классификация взрывоопасных зон внутри и вне помещений для выбора и установки электрооборудования по ПУЭ			Средства пожаротушения
		класс взрыво-опасной зоны	Категория и группа взрыво-опасных смесей	наименование веществ, определяющих категорию и группу взрывоопасных смесей	
1	2	3	4	5	6
Аналитическая комната	В4	П-I	-, Т1	Спирт этиловый	Огнетушители типа ОП-8, ПК
Помещение автоклавирования	В4	-	-		Огнетушители типа ОП-8

11 Охрана окружающей среды

11.1. В процессе производства лиофилизата не образуется выбросов в окружающую среду. Вентиляционная система, обеспечивающая рециркуляцию воздуха, снабжена газопылеулавливающей установкой (ГПУУ).

11.2. В случае аварийной ситуации, возникшей на производстве, все реагенты, имеющие на данный момент жидкое агрегатное состояние, сливаются в резервный бак для жидких отходов. Переработка стоков резервного бака не предусмотрена по причине отсутствия острых токсических свойств у исходного сырья и полупродуктов.

12 Технико-экономические нормативы.

Таблица 12.1 – Коэффициенты полезного использования сырья и материалов на 1 партию лиофилизата (100 флаконов)

Стадия	Наименование сырья, материалов	Наименование получаемого продукта	Загружено	Получено	Кт	Кр	Кисп.
1	2	3	4	5	6	7	8
ВР 1	Вода для инъекций	Вода для инъекций	100 мл	100 мл	1	1	100
ВР 3	Гамма-оксида алюминия нанопорошок	Гамма-оксид алюминия нанопорошок	0,014 г	0,01 г	-	0.72	-
ВР 3	Порошок олово (II) хлорид дигидрат	Порошок олово (II) хлорид дигидрат	0.007 г	0.007 г	-	1	-
ВР 3	Аскорбиновая кислота	Аскорбиновая кислота	0.01 г	0.008 г	-	0.8	-
ВР 3	Желатин	Желатин	1 г	0.8 г.	1	1	100
ВР 3	Флаконы	Флаконы	100 шт	100 шт	-	-	-
ВР 3	Пробки	Пробки	100 шт	100 шт	-	-	-
ВР 3	Колпачки	Колпачки	100 шт	100 шт	-	-	-

Таблица 12.2 – Норма расхода сырья и материалов на конечный продукт на 1 партию лиофилизата (100 флаконов).

Наименование сырья и материалов, обозначение НД	Нормы расхода	
	теоретические	практические
1	2	3
Вода очищенная	50 л	50 л
Гамма-оксида алюминия нанопорошок	0.014 г	0.01 г
Порошок олово (II) хлорид дигидрат	0,007 г	0,007 г
Аскорбиновая кислота	0.01 г	0.008 г
Желатин	1 г	0.8 г
Флаконы	100	100
Пробки	100	100
Колпачки	100	100

Таблица 12.3 – Нормы расхода пара, воды, сжатого воздуха, инертного газа, электроэнергии и других видов энергетических затрат на 1 партию лиофилизата (100 флаконов)

Наименование энергозатрат	Краткая характеристика	Регламентные (проектные) нормы расхода
1	2	3
Вода	Очищенная (с температурой 18 – 21 °С)	53
Вода	Для инъекций (с температурой 18 – 20 ºС)	10 л

Электроэнергия	220 В	500 кВт

Показатели трудовых затрат в человеко-часах на 1 партию лиофилизата (100 флаконов)

$T = \frac{P \cdot t}{П}$ чел.ч./кг

где t - 8 чел.-ч.;

П - выработка продукции за смену, 0.000981 кг;

Р - количество основных рабочих, 2 человека.

Трудозатраты на производство 1 кг готовой продукции составляют Т = 18272 чел.ч./кг.

14 Информационные материалы.

1. Общие технические условия
2. Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2010
3. Методика определения химичеких примесей в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
4. Методика определения радиохимической чистоты в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
5. Методика определения концентрации ионов водорода (pH) наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
6. Методика определения подлинности и объемной активности радионуклидов в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
7. Методика определения содержания ионов олова в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
8. Методика определения желатина в наноколлоидных радиофаррепаратах на основе оксида алюминия
9. Методика определения аскорбинки кислоты в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
10. Методика определения содержания натрия хлорида в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия
11. Методика определения ионов алюминия в наноколлоидных радиофармпрепаратах на основе оксида алюминия