

О.Е. Клементьева³, О.П. Власова¹, Д.В. Степченков⁴, К.А. Лунёва³, К.Э. Терновская³,
В.М. Петриев^{1,2}, Е.Д. Степченкова¹, А.А. Кузнецов⁴, С.А. Артамонов, К.А. Мурашин⁴, П.В. Шегай¹,
С.А. Иванов¹, А.Д. Каприн¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ РАДИОФАРМПРЕПАРАТА С ⁹⁰У ДЛЯ ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНОЙ РАДИОЭМБОЛИЗАЦИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПЕЧЕНИ

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава РФ, Обнинск

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

³ Федеральное государственное научное учреждение «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России», Москва

⁴ АО ГНЦ РФ — Физико-энергетический институт, Обнинск

Контактное лицо: Власова Оксана Петровна, somina@inbox.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Проведение исследования безопасности радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) с иттрием-90 для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов при первичном и метастатическом раке печени.

Материал и методы: Разработанный в МРНЦ им. А.Ф. Цыба совместно с ФЭИ радиофармпрепарат представляет собой микросферы альбумина крови человека диаметром 25–40 мкм, модифицированные диэтиленetriаминопентауксусной кислотой и меченные радионуклидом ⁹⁰У. Безопасность РФЛП изучалась в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России по следующим показателям: острая токсичность лиофилизированных реагентов, субхроническая токсичность РФЛП на двух видах животных, местно-раздражающее действие РФЛП терапевтической активности в эквивалентном пересчете на лабораторных животных, специфическая токсичность (аллергизирующее действие) лиофилизированных реагентов для приготовления РФЛП. В качестве экспериментальных животных были взяты самки и самцы мышей линий BALB/c, крыс Wistar, кроликов породы шиншилла и морских свинок-альбиносов. Все животные были получены из сертифицированных питомников лабораторных животных.

Результаты: В ходе исследований острой токсичности определена максимальная безопасная доза неактивного препарата. В пересчете на человека она превышает предполагаемую для клинического применения дозу почти в 20 раз. Исследование субхронической токсичности РФЛП не выявило каких-либо симптомов интоксикации. Выживаемость животных на протяжении всего периода наблюдения была абсолютной. У животных отмечали стандартные поведение и внешний вид. Динамика массы тела была положительной, значения температуры тела крыс и кроликов не выходили за пределы допустимых. Образцы готовой лекарственной формы РФЛП, представленные на доклинические исследования, не обладали местно-раздражающим действием. Раствор неактивных компонентов лиофилизированных реагентов для приготовления РФЛП не обладал аллергизирующим действием в дозах ЭД и ЭД10.

Заключение: По результатам доклинических исследований РФЛП следует считать безопасным для применения. Результаты доклинических исследований позволяют рекомендовать препарат для проведения клинических исследований.

Ключевые слова: радиофармпрепарат, микросферы альбумина, ⁹⁰У, рак печени, радионуклидная эмболизация, доклинические испытания, токсичность, безопасность

Для цитирования: Клементьева О.Е., Власова О.П., Степченков Д.В., Лунёва К.А., Терновская К.Э., Петриев В.М., Степченкова Е.Д., Кузнецов А.А., Артамонов С.А., Мурашин К.А., Шегай П.В., Иванов С.А., Каприн А.Д. Результаты доклинических исследований безопасности радиофармпрепарата с ⁹⁰У для внутриартериальной радиоэмболизации злокачественных новообразований печени. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(5):51-9.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-51-59

Введение

По данным [1], в 2016 г. в России и странах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) было зарегистрировано 741 369 человек с диагнозом «злокачественные новообразования» (ЗНО), из них с диагнозом первичного рака печени 11 732 человека. За десятилетний период количество впервые зарегистрированных с таким диагнозом пациентов увеличилось более чем на 30%. Кроме того, по статистике примерно у 20% всех впервые заболевших ЗНО обнаруживаются метастазы в печени, поскольку печень является одним из самых часто поражаемых метастазами органом, что связано с ее функцией в организме и соответствующим характером кровоснабжения [2, 3].

Метастатический рак печени — быстро прогрессирующее заболевание, характеризуемое, как правило, отсутствием специфических признаков и плохим прогнозом по выживаемости [3, 4].

Оптимальным способом лечения рака печени является ее трансплантация или резекция опухолевых очагов. К сожалению, в России и странах ЕАЭС на момент обнаружения опухоль можно радикально удалить не более чем у 15% пациентов. Кроме того, более чем у 60% прооперированных пациентов наблюдается рецидив в течение 3–5 лет после резекции [4, 5]. Из вышесказанного следует вывод, что терапия нерезектабельного рака печени нужна порядка 80% больным. В качестве методов лечения рака печени в России применяют в основном системную химиотерапию или химиоэмболизацию печеночной артерии [3].

Одним из альтернативных способов локального лучевого воздействия на опухоль является трансартериальная радиоэмболизация (ТАРЭ). Этот метод, основанный на совмещении эмболизации (закупорки сосудов) с прицельной радионуклидной терапией, применяется в мире с 2002 г. Процедура вы-

полняется путем введения в печеночную артерию микроразмерных частиц (микросфер), меченных различными радионуклидами: ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{188}Re и др. Для радиоэмболизации разрешены к клиническому применению стеклянные и/или полимерные микросферы (Theraspheres, MDS Nordion, Канада и SIR-spheres, Sirtex Medical, Австралия) с радионуклидом ^{90}Y . В 2010 г. радиоэмболизацию стали выполнять с использованием радиофармпрепарата ^{131}I -липидола (LipioCis) [6, 7].

Терапевтический эффект при проведении данной процедуры создается вследствие повреждения опухолевых клеток ионизирующим излучением радиоактивных микросфер. Радиоактивные микросферы проникают по капиллярам в опухоль на несколько миллиметров. Из-за высокой объемной скорости кровотока в опухоли (в 3–7 раз) по сравнению с окружающими тканями, создается направленная доставка микросфер в опухоль и формируется высокая доза облучения в опухоли при щадящем облучении тканей, окружающей опухоль [7, 8]. В отсутствие противопоказаний к процедуре выбирают поглощенную в опухоли печени дозу облучения порядка 120–150 Гр, тогда как доза на всю печень не должна превышать 60 Гр [8–10]. Метод ТАРЭ разрешен в качестве лечения ЗНО печени различного генеза во многих странах мира, в том числе России [10, 11]. Более детальная информация о методе ТАРЭ приведена в обзоре [12].

Радионуклид иттрий-90 (^{90}Y) более 30 лет используют в качестве метки в радионуклидной терапии из-за его подходящих физико-химических характеристик, поскольку он является только бета-излучателем и не имеет гамма-составляющей. Небольшой период полураспада ^{90}Y (64 ч) позволяет минимизировать лучевые повреждения в критических органах пациента. Поскольку средняя энергия бета-частиц ^{90}Y равна 0,9 МэВ, а максимальная энергия — 2,28 МэВ, излучение радионуклида способно проникать на глубину до 13 мм (в среднем 4 мм) в мягкой биологической ткани [13].

В мировой клинической практике на основе микросфер с радионуклидом ^{90}Y сформированы лечебные протоколы по ТАРЭ гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) печени, системы индивидуального дозиметрического планирования, а также успешно пролечено более 30 тыс. пациентов в странах Европы и США [10, 11]. В 2017 г. было издано руководство по радиоэмболизации, основанное на анализе различных мировых клинических практик в США и Европе с 1996 по 2017 гг. Из руководства следует, что ТАРЭ с микросферами, меченными ^{90}Y , клинически доказана и является необходимой, с медицинской точки зрения, для следующих ЗНО печени:

- метастатические и радиочувствительные ЗНО печени первичного колоректального рака,
- метастатические и радиочувствительные ЗНО печени нейроэндокринных опухолей;
- неоперабельная первичная ГИЦ [10].

В России на сегодняшний день было проведено лишь 8 операций по ТАРЭ печени: 4 операции с зарубежными стеклянными микросферами с ^{90}Y были проведены в 2009 г. в РНЦРХТ (Санкт Петербург),

1 операция зарубежными микросферами проведена в 2011 г. в ГКБ № 55 (Москва), 2 операции выполнены зарубежными стеклянными микросферами в 2012 г. в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва) и еще одна процедура ТАРЭ с отечественными стеклянными микросферами с ^{90}Y , производства ООО «Бебиг» была проведена в мае 2019 г. в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск) [4, 5].

Целью настоящего исследования являлось изучение безопасности разработанного радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП) на основе модифицированных микросфер альбумина крови человека диаметром 25–40 мкм, меченных радионуклидом ^{90}Y , на экспериментальных животных.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать специфическую токсичность (аллергизирующее действие) раствора неактивных лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата.
2. Исследовать местно-раздражающее действия готовой лекарственной формы радиофармпрепарата.
3. Исследовать острую токсичность раствора неактивных лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата.
4. Исследовать субхроническую токсичность готовой лекарственной формы радиофармпрепарата.

Материал и методы

Для проведения исследований безопасности РФЛП в ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России были поставлены следующие препараты:

— опытные серии микросфер альбумина, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой («МСА-ДТПА, лиофилизат»), диаметром 25–40 мкм, которые были произведены в МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиале НМИЦ радиологии Минздрава России;

— опытные серии радиофармпрепарата «ДТПА-МСА, ^{90}Y », на основе лиофилизата МСА-ДТПА, меченного ^{90}Y , которые готовили в ФЭИ по совместно разработанной с МРНЦ им. А.Ф. Цыба опытно-промышленной технологии.

Основные характеристики РФЛП «МСА-ДТПА, ^{90}Y » представлены в табл. 1 и 2.

Изучение безопасности РФЛП проводилось с применением методик, описанных в Руководствах по проведению доклинических исследований [14, 15].

Для исследований безопасности РФЛП «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм, ^{90}Y » использованы:

- мыши линии BALB/c самки и самцы, средняя масса тела 18–20 г;
- крысы линии Wistar самки и самцы, средняя масса тела 150–190 г;
- кролики породы шиншилла самки и самцы, средняя масса тела 1700–2100 г;
- морские свинки альбиносы самки и самцы, средняя масса тела 220–260 г.

Животные были получены из сертифицированных питомников лабораторных животных и содержались в стандартных условиях. Все манипуляции с использованными лабораторными животными

Таблица 1

Физико-химические характеристики «МСА-ДТПА, лиофилизат»
Physical and chemical characteristics of «MSA-DTPA, lyophilisate»

Показатель	Норма
Название ЛП	Микросферы альбумина крови человека, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой, 25–40 мкм, лиофилизат
Сокращенное название ЛП	МСА-ДТПА, лиофилизат
Внешний вид	Ллиофилизат желтоватого цвета
Размер частиц	25–40 мкм
Стерильность	Стерильны
Пирогенность	Апирогенны
Срок годности	6 мес от даты производства
Хранение	Хранят в холодильнике в хорошо закупоренных флаконах при температуре +2 °С до +8 °С
Комплектность	Один флакон содержит 20 мг субстанции «ДТПА-Микросферы альбумина, 25–40 мкм» и 1 мг Твина-80; рассчитан на получение одного флакона готовой лекарственной формы (ГЛФ) РФЛП « ⁹⁰ Y-ДТПА-МСА, 25–40 мкм»

Таблица 2

Физико-химические характеристики «МСА-ДТПА-⁹⁰Y»
Physical and chemical characteristics of «MSA-DTPA-⁹⁰Y»

Показатель	Норма
Название РФЛП	Микросферы альбумина крови человека, модифицированные диэтилентриаминпентауксусной кислотой, 25–40 мкм, меченные ⁹⁰ Y
Сокращенное название РФЛП	ДТПА-МСА, ⁹⁰ Y
Внешний вид	Суспензия желтоватого цвета
Размер частиц	25–40 мкм
Стерильность	Стерильны
Радиохимические примеси	Менее 5%
Объемная активность	До 5,55 ГБк/мл (150 мКи/мл) на дату и время изготовления
Пирогенность	Апирогенны
Упаковка	Первичная упаковка: Порциями до 5,55 ГБк (до 150 мКи) на установленное время и дату поставки во флаконы из дроба для лекарственных средств вместимостью 10 мл, герметично закупоренные пробками резиновыми медицинскими и обжатые колпачками алюминиевыми. Вторичная упаковка: Флакон в защитном контейнере, паспорт и инструкцию по применению помещают в комплект упаковочный транспортный для радиоактивных веществ
Срок годности	72 ч с даты производства
Хранение	В соответствии с ОСПОРБ 99/2010 при температуре окружающей среды от + 5 °С до + 25 °С и относительной влажности воздуха 65%
Назначение	РФЛП «ДТПА-МСА, ⁹⁰ Y» предназначен для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов с первичными и метастатическими опухолями печени

проведены в соответствии с «Руководством по лабораторным животным» [16], Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей [17] и «Правилами лабораторной практики» [18]. Процедуры, связанные с умерщвлением животных, выполняли согласно соответствующим методическим указаниям и Европейской конвенцией по их защите, изложенной в европейском руководстве по эвтаназии млекопитающих лабораторных животных и директиве Европейского сообщества (2010/63/EU) [19, 20].

Расчет вводимых доз¹ был проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное в соответствии с Руководством [14] по формуле 1:

$$ЭД = \frac{D \times 39}{K}, \quad (1)$$

где D — рекомендованная монодоза для человека; 39 — коэффициент пересчета доз для среднего человека (массой тела 70 кг); K — коэффициент пересчета доз для лабораторного животного определенной массы тела в соответствии с Руководством [14].

¹ Здесь и далее термин «доза» используется в фармакологическом, а не в радиологическом смысле.

Обоснование выбранного пути введения

Для клинического применения РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » определен единственно возможным путем введения, а именно — непосредственно в артерию печени. При проведении доклинических исследований, с целью исключения ложных результатов, вызванных возможной смертностью животных вследствие высокой травматичности процедуры внутриартериального введения, в исследованиях острой и субхронической токсичности был определен максимально приближенный к несистемному внутриартериальному введению способ — введение препарата непосредственно в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки. Выбранный путь введения для доклинических исследований полностью соответствует рекомендациям, данным в разделе 6.3 Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [14].

Исследование острой токсичности на неактивном препарате

Изучение острой токсичности лиофилизированных реагентов «МСА-ДТПА, лиофилизат» для приготовления РФЛП было проведено на двух видах животных: белые мыши линии BALB/c самки и самцы с массой тела 19–19,5 г и белые крысы линии Wistar самки и самцы с массой тела 160–169 г.

Острая токсичность неактивного препарата «МСА-ДТПА, лиофилизат» была оценена с использованием пяти последовательно увеличивающимися концентрациями неактивных компонентов лиофилизата: эквивалентной средней дозе для человека (ЭД), превышающей ЭД в пять, десять, двадцать и пятьдесят раз (ЭД5, ЭД10, ЭД20, ЭД50).

Расчет вводимых доз был проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное по формуле (1), и для мышей ЭД составила 3,64 мг/кг, а для крыс — 1,68 мг/кг. С учетом массы мышей, вводимые количества неактивного препарата для каждой мыши составили: ЭД = 0,07 мг, ЭД5 = 0,36 мг, ЭД10 = 0,73 мг, ЭД20 = 1,45 мг, ЭД50 = 3,64 мг; для каждой крысы вводимые количества препарата составили: ЭД = 0,34 мг, ЭД5 = 1,7 мг, ЭД10 = 3,4 мг, ЭД20 = 6,8 мг, ЭД50 = 17 мг.

Лабораторным животным раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» был введен однократно в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки, в количестве 0,05 мл на одну мышшь и 0,1 мл на одну крысу. Мышам и крысам контрольных групп вводили физиологический апиригенный раствор натрия хлорид 0,9% в тех же объемах.

Наблюдение за животными осуществлялось на протяжении 14 календарных дней. Критериями оценки острой токсичности являлись: выживаемость; интегральные показатели: внешний вид, реакция на внешние раздражители, болевая реакция, потребление корма и воды, количество и консистенция фекальных масс; масса тела; макроскопическая и морфометрическая оценка внутренних органов после аутопсии.

Исследование субхронической токсичности РФЛП

Для исследования отсроченного проявления нежелательного действия РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y », а также для выявления наиболее чувствительных органов и систем организма, была изучена субхроническая токсичность готовой лекарственной формы препарата терапевтической активности. Исследование было проведено на двух видах животных — крысах (линия Wistar, самки и самцы, средняя масса тела 180–200 г) и кроликах (порода Шиншилла, самки и самцы, средняя масса тела 1850–1950 г).

Методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя были сформированы 4 группы по 5 крыс в каждой и 4 группы по 3 кролика в каждой: группа № 1а — контроль/самки, группа № 1в — контроль/самцы, группа № 2а — РФЛП (ЭД)/самки, группа № 2в — РФЛП (ЭД)/самцы.

Расчет активностей вводимого РФЛП проведен с учетом коэффициентов пересчета человек/экспериментальное животное по формуле (1) [14]. Предполагаемая вводимая терапевтическая активность вводимого РФЛП для клинического применения при пересчете на крысу массой 190 г составила 48,9 МБк, на кролика массой 1900 г — 248,3 МБк.

Группам контрольных животных вводили апиригенный физиологический раствор NaCl 0,9%, в объеме 0,05 мл на крысу и 0,1 мл на кролика.

Критериями оценки субхронической токсичности являлись: выживаемость; реакция на введение препарата в паренхиму печени; интегральные показатели (внешний вид и поведение); масса и температура тела; морфологический состав крови (концентрация эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов, концентрация гемоглобина, значение гематокрита, лейкограмма); биохимические показатели крови (общий и прямой билирубин, АЛТ, АСТ); макроскопическая и морфометрическая оценка внутренних органов.

Выявление смертности, клинический осмотр и контрольные взвешивания проводили до введения РФЛП, на 5, 10, 20 и 30 сут после введения РФЛП. Гематологические исследования проведены на ветеринарном гематологическом анализаторе Exigo 17, производства Boule Medical A.B. (Швеция) с использованием унифицированных методик. Биохимические анализы проводили с использованием унифицированных методов на полуавтоматическом биохимическом анализаторе StatFax 4500 Plus, производства Awagene Technology (США) с использованием стандартных наборов реагентов UTS.

Продолжительность исследования субхронической токсичности РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » составила 30 сут. После окончания эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии. Вскрытие произведено сразу после гибели животных по полной патологоанатомической схеме с ведением протокола вскрытия.

Исследование местно-раздражающего действия РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y »

Исследование местно-раздражающего действия методом повторных накожных аппликаций «ДТПА-МСА, ^{90}Y » было проведено с использованием средней

предполагаемой терапевтической активности РФЛП. Поскольку предполагаемая средняя активность одной дозы вводимого пациентам РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » составляет 3000 МБк, что соответствует 42,86 МБк/кг массы пациента, пересчитанная вводимая активность на одну морскую свинку массой 150 г в ЭД составила 62,68 МБк. Пересчет активностей проводился в соответствии с Руководствами по доклиническим исследованиям [14, 15].

Методом случайной выборки с учетом массы тела животных в качестве определяющего показателя были сформированы 2 группы по 5 морских свинок: группа № 1 — самки морских свинок, группа № 2 — самцы морских свинок.

Объем наносимого препарата составлял 0,2 мл на животное. На боковую поверхность выстриженного участка кожи всех животных (2×2 см) один раз в день в течение 2 нед по 5 раз в нед наносили дозированно пипеткой по 0,2 мл РФЛП. Во избежание взаимного груминга, животных размещали в индивидуальные клетки до момента впитывания исследуемого раствора.

Реакцию на коже оценивали ежедневно по шкале оценки кожных проб [14]. Критерием проявления местнораздражающего действия считали развитие признаков неаллергического контактного дерматита.

Определение специфической токсичности

Для определения специфической токсичности исследованы алергизирующие свойства лиофилизированных реагентов (МСА-ДТПА, лиофилизат) для приготовления РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y » по стандартным методикам изучения активной кожной анафилаксии и реакции общей анафилаксии на овальбумин [14] на самках и самцах морских свинок альбиносов со средней массой тела 240 ± 20 г.

Алергизирующие свойства раствора «МСА-ДТПА, лиофилизат» были оценены с использованием двух различных дозировок: в эквивалентной средней дозе для человека (ЭД) и в дозе, превышающей ЭД в десять раз (ЭД10), рассчитанных на вещество, обладающее наибольшим алергизирующим потенциалом — микросферы альбумина 25–40 мкм. С учетом того, что в монодозе РФЛП «ДТПА-МСА, ^{90}Y », предназначенного для клинического применения, содержится 20 мг модифицированных микросфер альбумина, что соответствует 0,28 мг/кг массы пациента, а масса морской свинки составляет 250 г, значение доз для каждого лабораторного животного составило: ЭД = 0,5 мг, ЭД10 = 5 мг.

Для исследования активной кожной анафилаксии (1 этап) методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, были сформированы 3 группы по 10 морских свинок в каждой (5 самок и 5 самцов): группе № 1 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД; группе № 2 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД10; группа № 3 являлась контрольной группой, которой вводили физиологический раствор.

Животных 1 этапа групп № 1 и 2 сенсибилизировали по следующей схеме: первая инъекция раствора «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10 была

произведена внутривенно, две последующие — внутримышечно через день в тех же дозах. Контрольным животным группы № 3 вводили физиологический раствор в том же объеме и по той же схеме. На 17 сут (разрешающая инъекция) на выстриженных участках спины морским свинкам внутривенно вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в указанных дозах. Для контроля реактивности на другом выстриженном участке кожи группам № 1 и 2 вводили по 0,05 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Контрольной группе № 3 также была произведена разрешающая инъекция (ЭД). Через 20 мин всем группам животных эндокардиально вводили по 0,5 мл 1% раствора синьки Эванса. Через 30 мин животных подвергали эвтаназии и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в местах введения исследуемых растворов.

Для исследования реакции общей анафилаксии на овальбумин (2 этап) методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя также были сформированы 3 группы по 10 морских свинок в каждой (5 самок и 5 самцов): группе № 1 (положительный контроль) вводили белок куриного яйца (БКЯ); группе № 2 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД; группе № 3 вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в ЭД10.

Для получения реакции общей анафилаксии всех животных 2 этапа иммунизировали в течение трех дней путем перорального введения 1% раствора БКЯ в дозе 1 мл на 250 г массы тела. Через 12 сут после начала иммунизации БКЯ, животным групп № 2 и 3 внутривенно вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10, животным группы № 1 — физиологический раствор соответствующего объема. На следующие сутки процедуру повторяли. Через час животным всех групп внутрисердечно вводили 1% раствор БКЯ в дозе 1 мг на 250 г массы тела, после чего регистрировали развитие анафилактической реакции и вычисляли анафилактический индекс по Weigle [14].

Результаты и обсуждение

По результатам изучения острой токсичности у мышей и у крыс на протяжении первых 8 ч после введения исследуемых растворов, летальность отсутствовала во всех группах, кроме групп мышей и крыс с введением раствора неактивных компонентов лиофилизированных реагентов в дозе ЭД50, где среди самок и самцов зарегистрировано по одному летальному исходу в каждой подгруппе.

В течение эксперимента не была достигнута полумлетальная доза (ЛД50) как для мышей, так и для крыс, однако, согласно Руководству [13], была определена максимальная безопасная доза (МБД), при введении которой в группах животных полностью отсутствовала летальность. МБД по концентрации микросфер альбумина 25–40 мкм при введении в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки для мышей была равна 72,8 мг/кг, для крыс — 33,6 мг/кг, что в пересчете на человека превышает предполагаемую для клинического применения дозу почти в 20 раз.

Исследование клинических признаков нарушения здоровья подопытных животных не выявило гендерно детерминированных различий в чувствительности мышей и крыс к исследуемому препарату. Существенных отклонений по внешнему виду не наблюдалось ни в одной из групп животных. Также не наблюдалось существенных отклонений в потреблении воды и корма. Статистически достоверной разницы между массами внутренних органов животных контрольной и экспериментальной групп, измеренными на момент окончания эксперимента, выявлено не было.

Таким образом, изложенные выше сведения позволяют заключить, что при однократном введении растворов испытанных лиофилизированных реагентов в паренхиму печени путем прокола брюшной стенки в дозах, меньших МБД, установлена хорошая переносимость препарата, отсутствие выраженных симптомов интоксикации и гибели животных.

По результатам изучения субхронической токсичности, реакция на введение исследуемого РФЛП у всех особей крыс и кроликов была нормальной. На протяжении всего исследования летальность отсутствовала во всех группах крыс и кроликов. Не было зафиксировано тяжелого состояния и признаков интоксикации. Внешний вид животных сохранился без изменений. Каких-либо существенных отклонений в поведении (повышенной или пониженной активности) и в состоянии подопытных животных по сравнению с контрольными группами отмечено не было.

При анализе данных, характеризующих морфологический состав цельной крови, не было выявлено статистически значимых различий между контрольными и опытными группами. Известно, что основным показателем нежелательной реакции организма на воздействие инкорпорированных радионуклидов является изменение количества лейкоцитов в периферической крови. Интрапаренхимальное введение исследуемого РФЛП в эквивалентной терапевтической дозе не привело к достоверному изменению показателей числа лейкоцитов в течение всего эксперимента и на момент окончания исследования, что наглядно показано на рис. 1.

Полученные результаты биохимических показателей плазмы крови крыс и кроликов до и после

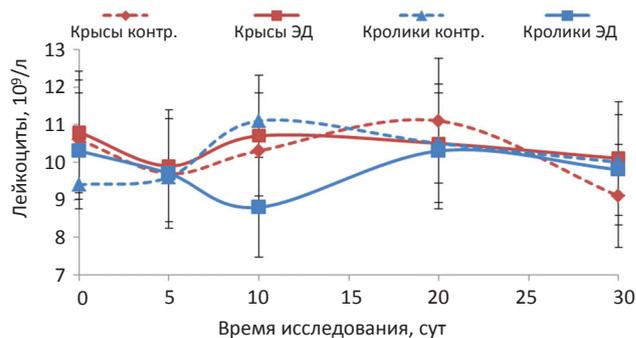


Рис. 1. Динамика изменения количества лейкоцитов
Fig. 1. Trends in the number of leukocytes

введения РФЛП «ДТПА-МСА, ⁹⁰Y» в дозе ЭД не показали нарушений функций печени, почек и других систем органов животных, что явилось следствием отсутствия статистически достоверной разницы в изучении биохимических показателей плазмы крови между контрольными и опытными группами животных. В активности ферментов, характеризующих состояние печени — аланин- и аспартат-аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) — не было выявлено статистически достоверных отличий. Уровень активности данных ферментов на протяжении всего эксперимента колебался в пределах нижней и верхней границ нормальных видовых значений (рис. 2, 3).

Содержание общего и прямого билирубина в крови за время исследования не изменялось во всех группах животных, что также свидетельствует о нормальной функции печени (рис. 4, 5).

Статистически значимых различий по температуре тела между животными контрольных и опытных групп не наблюдали.

У всех крыс и кроликов динамика массы тела была положительной на протяжении всего наблюдения.

Проведенный морфометрический анализ не обнаружил статистически достоверных отличий по абсолютной массе наиболее реактивных внутренних органов крыс и кроликов от аналогичных показателей у животных контрольных групп.

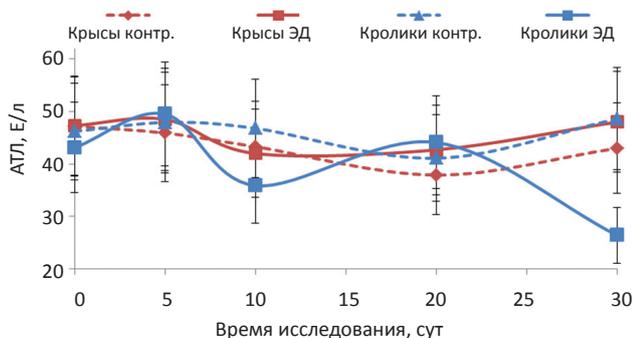


Рис. 2. Динамика изменения активности АЛТ в плазме крови
Fig. 2. Trends in ALT plasma activity

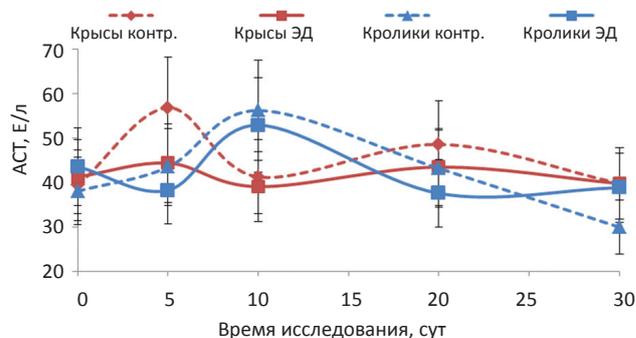


Рис. 3. Динамика изменения активности АСТ в плазме крови
Fig. 3. Trends in AST plasma activity

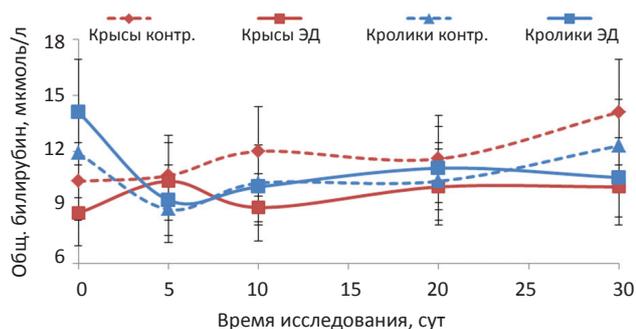


Рис. 4. Динамика изменения концентрации общего билирубина в плазме крови

Fig. 4. Trends in the concentration of total bilirubin in blood plasma

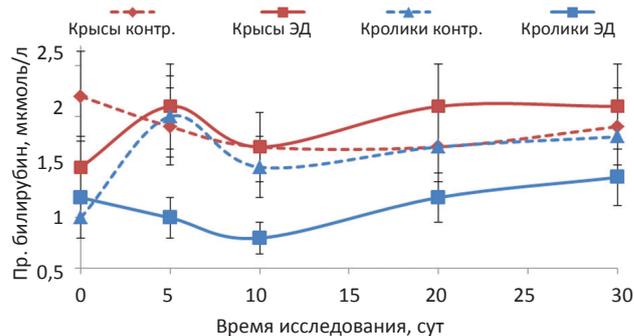


Рис. 5. Динамика изменения концентрации прямого билирубина в плазме крови

Fig. 5. Trends in the concentration of direct bilirubin in blood plasma

Таблица 3

Результаты исследования активной кожной анафилаксии контрольных и опытных групп по диаметру окрашенного пятна

Results of active dermal anaphylaxis studies in control and trial groups of dyed spots diameter

Критерий	Группа № 3 (контрольная)		Группа № 1 (ЭД)		Группа № 2 (ЭД10)	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Средние значения диаметра синего пятна, мм	1,5±0,7	1,7±0,6	1,8±0,8	1,8±0,4	4,8±2,4	5,6±2,7

Анализируя данные, полученные при проведенных исследованиях субхронической токсичности РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰У», можно сделать вывод о безопасности его применения.

При оценке результатов нанесения аппликационных кожных проб для определения местно-раздражающего действия РФЛП, визуальная оценка результатов многократной аппликации РФЛП показала отсутствие воспаления, эритемы и отека кожных покровов в области нанесения исследуемого препарата. Не было выявлено случаев повреждения и нарушения целостности кожных покровов на месте нанесения. Проведенное исследование показало, что образцы РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰У», представленные на доклинические исследования, не обладают местно-раздражающим действием.

Средние данные результатов проведенного эксперимента по исследованию активной кожной анафилаксии по группам животных представлены в табл. 3.

В контрольной группе №3 и в группе №1 у животных размер пятен не превышал предел допустимых значений (при положительной реакции диаметр пятна не менее 6 мм). В группе №2 выявлено слабое аллергизирующее действие у некоторых животных, что можно отнести к индивидуальной непереносимости препарата, поскольку среднее значение по группе не превысило допустимых значений. Из вышесказанного следует, что исследуемая неактивная форма РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰У» не обладает аллергизирующими свойствами в дозе ЭД.

Исследование реакции общей анафилаксии на овальбумин показало, что значение индекса Weigle

в группе №1 (положительный контроль) составило 3,3, что можно отнести к тяжёлому шоку, поскольку группу положительного контроля на протяжении всего исследования иммунизировали 1% раствором БКЯ, обладающим аллергизирующими свойствами, что привело к системной анафилактической аллергической реакции. Значение индекса Weigle в группе №2 (ЭД) составило 1,8, в группе №3 (ЭД10) составило 2,4, что близко умеренному шоку. Исследование реакции общей анафилаксии на овальбумин не привело к летальному исходу в группах животных, которым вводили раствор «МСА-ДТПА, лиофилизат» в дозах ЭД и ЭД10 (группы №2 и 3). Также в группах №2 и 3 меньше половины животных получили тяжёлый аллергический шок. Из результатов исследования следует, что явно выраженной аллергической реакции на введение растворов неактивных компонентов лиофилизированных реагентов для приготовления радиофармпрепарата «ДТПА-МСА,⁹⁰У» в дозах ЭД и ЭД10 не выявлено.

Выводы

1. По результатам доклинических исследований радиофармацевтический лекарственный препарат «ДТПА-МСА,⁹⁰У» следует считать безопасным для применения.

2. Проведенные доклинические исследования безопасности радиофармацевтического лекарственного препарата позволяют рекомендовать РФЛП «ДТПА-МСА,⁹⁰У» для проведения клинических исследований.

Results of Preclinical Safety Tests of Radiopharmaceutical with ^{90}Y for Intra-Arterial Radioembolization of Liver Cancer

O.E. Klementyeva³, O.P. Vlasova¹, D.V. Stepchenkov⁴, K.A. Lunyova³, K.E. Ternovskaya³, V.M. Petriev^{1,2}, E.D. Stepchenkova¹, A.A. Kuznetsov⁴, S.A. Artamonov⁴, K.A. Murashin⁴, P.V. Shegai¹, S.A. Ivanov¹, A.D. Kaprin¹

¹ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

² National Research Nuclear University MEPHI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia

³ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

⁴ A.I. Leypunsky Institute for Physics and Power Engineering, Obninsk, Russia

E-mail: somina@inbox.ru

ABSTRACT

Purpose: Performing a safety study of a radiopharmaceutical drug with yttrium-90 for intra-arterial radioembolization of inoperable patients with primary and metastatic liver cancer.

Material and methods: The developed radiopharmaceutical is a microspheres of human blood albumin with a diameter of 25–40 microns, modified with diethylenetriaminopentaacetic acid and labeled with ^{90}Y radionuclide. The safety of the radiopharmaceutical was studied by the following indicators: acute toxicity of lyophilized reagents, subchronic toxicity of the radiopharmaceutical on two types of animals, local irritant effect of the radiopharmaceutical therapeutic activity in equivalent terms on laboratory animals, specific toxicity (allergizing effect) of lyophilized reagents for the preparation of a radiopharmaceutical drug. Female and male BALB/C mice, Wistar rats, chinchilla rabbits, and albino Guinea pigs were taken as experimental animals. All animals were obtained from certified laboratory animal nurseries.

Results: During acute toxicity studies, the maximum safe dose of an inactive drug was determined. In terms of per person, it exceeds the intended dose for clinical use by almost 20 times. The study of the subchronic toxicity of the radiopharmaceutical did not reveal any symptoms of intoxication. The survival rate of the animals during the entire observation period was absolute. Standard behavior and appearance were observed in animals. The dynamics of body weight was positive, and the body temperature of rats and rabbits did not exceed the limits allowed. Samples of the finished dosage form of the drug did not have a local irritant effect. The solution of inactive components of lyophilized reagents for the preparation of a radiopharmaceutical drug did not have an allergenic effect in quantities ten times higher than the doses administered to a person.

Conclusion: According to the results of preclinical studies, the radiopharmaceutical should be considered safe for use. The results of preclinical studies allow us to recommend the drug for clinical research.

Key words: radiopharmaceutical, albumin microspheres, ^{90}Y , liver cancer, radionuclide embolization, preclinical testing, toxicity, safety

For citation: Klementyeva OE, Vlasova OP, Stepchenkov DV, Lunyova KA, Ternovskaya KE, Petriev VM, Stepchenkova ED, Kuznetsov AA, Artamonov SA, Murashin KA, Shegai PV, Ivanov SA, Kaprin AD. Results of Preclinical Safety Tests of Radiopharmaceutical with Y for Intra-Arterial Radioembolization of Liver Cancer. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(5):51-9 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-5-51-59

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Standardized indices of oncoepidemiological situation in 2016. Eurasian Oncology Journal. 2018;6(2):80.
- Мерабишвили ВМ, Мерабишвили ЭН, Чепик ОФ. Эпидемиология рака печени, Российский онкологический журнал. 2014(4):34-5. [Merabishvili VM, Merabishvili EN, Chepik OF. Epidemiology of liver cancer, Russian Journal of Oncology. 2014(4):34-5. (In Russ.).]
- Подымова СД. Болезни печени: Руководство. 4-е изд, перераб. и доп. М.: «Медицина», 2005. [Podymova SD. Liver Diseases: a Guide. 4th ed. Moscow. 2005. (In Russ.).]
- Cornelis FH, Solomon SB. Treatment of Primary Liver Tumors and Liver Metastases, Part 2: Non-Nuclear Medicine Techniques. J Nucl Med. 2018;59:1801-08, DOI: 10.2967/jnumed.116.186379.
- Kaprin AD, Mardinskiy YS, Smirnov VP, Ivanov SA, Kostin AA, Polikhov SA, et al. The history of radiation therapy (part I). Biomedical Photonics. 2019;8(1):52-62.
- Chai-Hong YEONG, Mu-hua CHENG, Kwan-Hoong NG. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol), 2014;15(10):845-63
- Reinders MTM, Smits MLJ, van Roekel C, Braat AJAT. Holmium-166 Microsphere Radioembolization of Hepatic Malignancies. Seminars in Nuclear Medicine. 2019;9:237-243.
- Kafrouni M, Allimant C, Fourcade M, Vauclin S, Guieu B, Mariano-Goulart D, Bouallègue FB. Analysis of differences between $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA SPECT- and ^{90}Y -microsphere PET-based dosimetry for hepatocellular carcinoma selective internal radiation therapy. EJNMMI Research, 2019;62:1-9.
- Braat AJAT, Kappadath SC, Ahmadzadehfar H, Stothers CL. Radioembolization with ^{90}Y Resin Microspheres of Neuroendocrine Liver Metastases: International Multicenter Study on Efficacy and Toxicity. Cardiovasc Intervent Radiol. 2019(42):413-25. DOI: 10.1007/s00270-018-2148-0
- Implantable Beta-Emitting Microspheres for Treatment of Malignant Tumors// United Healthcare® Oxford, Clinical Policy, Policy Number: CANCER 036.9, 2017, T2, January 1.
- Кодина ГЕ, Красикова РН. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. М. МЭИ. 2014, 282 с. [Kodina GE, Krasikova RN. Methods for producing radiopharmaceuticals and radionuclide generators for nuclear medicine. Moscow. 2014, 282 p. (In Russ.).]
- Бушманов АЮ, Клементьева ОЕ, Лабушкина АА, Тултаев АВ, Корсунский ВН, Кузнецова ОВ. Актуальные проблемы и перспективы применения методов ядерной медицины в диагностике и лечении гепатоцеллюлярной карциномы: аналитический обзор. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019;64(5):58-68. [Bushmanov AYU, Klementyeva OE, Labushkina AA, Tultaev AV, Korsunsky VN, Kuznetsova OV. Actual problems and prospects of using nuclear medicine methods in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: an analytical review. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(5):58-8. (In Russ.).]
- Yang Y, Si T. Yttrium-90 transarterial radioembolization versus conventional transarterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. Cancer Biol Med. 2018;15:299-310. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0177.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012, 244 с. [Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Ed. A.N. Mironova. Moscow. 2012. 244 p. (In Russ.).]

15. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-изд, перераб. и доп. М.: Медицина. 2005. [Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Under the general editorship of the corresponding member of RAMS. Ed by RU Khabriev. Moscow. 2005. (In Russ.)].
16. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. Москва. 2010. 344 с. [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Ed by NN Karkishchenko, SV Grachev. Moscow 2010, 344 p. (In Russ.)].
17. Извлечение из "Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" — ЕЭС, Страсбург. Ланималогия. 1993(1):29. [Extract from the «European Convention for the protection of vertebrates used for experimental and other scientific purposes» — EEC, Strasbourg-Lanimalogia. 1993(1):29 (In Russ.)].
18. Приказ от 01 апреля 2016 г. № 199н Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации «Об утверждении правил лабораторной практики». [Order of April 01, 2016 No. 199n of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation «On Approval of Rules of Laboratory Practice». (In Russ.)].
19. The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition ISBN 978-1-882691-21-0. Version 2013.0.1.
20. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 20.10.2010.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работы проведены в рамках Государственного контракта № 14.N08.12.0167 от 07.09.2017 «Доклинические исследования радиофармацевтического препарата с ⁹⁰Y для внутриартериальной радиоэмболизации неоперабельных пациентов с первичными и метастатическими опухолями печени» между АО «ГНЦ РФ-ФЭИ» и Министерством образования и науки Российской Федерации с привлечением внебюджетных средств АО «ГНЦ РФ-ФЭИ».

Financing. The work was carried out under the State contract No. 14. N08. 12. 0167 dated 07.09.2017 «Preclinical research of a radiopharmaceutical drug with ⁹⁰Y for intra-arterial radioembolization of inoperable patients with primary and metastatic liver tumors» between JSC «SSC RF-FEI» and the

Ministry of education and science of the Russian Federation with the involvement of extra-budgetary funds of JSC «SSC RF-FEI».

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 17.08.2020. **Принята к публикации:** 11.11.2020.

Article received: 17.08.2020. **Accepted for publication:** 11.11.2020.

Information about the authors:

Klementyeva O.E. <https://orcid.org/0000-0002-6604-0860>.

Lunyova K.A. <https://orcid.org/0000-0002-1256-9873>.

Ternovskaya K.E. <https://orcid.org/0000-0001-9527-0596>.