

УДК 616.428-089:616-073.75

А.А. Панкратов<sup>1</sup>, Т.Н. Андреева<sup>1</sup>, Р.И. Якубовская<sup>1</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>, А.А. Конарев<sup>2</sup>, Т.В. Якунина<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>2</sup>**ПРЕПАРАТ ДЛЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ  
«СТОРОЖЕВЫХ» ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ**<sup>1</sup>«Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» – филиал ФГБУ «НМИРЦ» МЗ РФ, Москва<sup>2</sup>ФГУП Государственный научный центр «НИОПИК», Москва**Контактная информация**

Панкратов Андрей Александрович, старший научный сотрудник отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии

адрес: 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, дом 3; тел.: +7(495)945-87-16

e-mail: [andreimnoi@yandex.ru](mailto:andreimnoi@yandex.ru)

Статья поступила 02.11.2015, принята к печати 27.11.2015.

**Резюме**

Нами разработан оригинальный препарат Лимфотест на основе соединения из группы дисульфопроизводных диаминотрифенилметановых красителей, отличающийся (от Лимфозурина) положением сульфогрупп в бензольном кольце – N-[4-(4-диэтиламинофенил)(2,4-дисульфофенилметил)-2,5-циклогексадиенилиден-1]-N-этилэтанаминий гидроксид внутренняя соль, натриевая соль. Предлагаемое соединение спектрально практически не отличается от Лимфазурина, однако гораздо более доступно и обладает высокой лимфотропностью.

Препарат Лимфотест в виде 1 %-ного водного раствора характеризуется высокой диагностической эффективностью при использовании метода прямой цветной лимфографии, низкой токсичностью (введенные дозы превышали предполагаемую максимальную дозу для человека в 50-1000 раз) и не оказывает местно-раздражающего действия при подкожном применении.

**Ключевые слова:** «сторожевые» лимфоузлы, интраоперационная визуализация.A.A. Pankratov<sup>1</sup>, T.N. Andreeva<sup>1</sup>, R.I. Yakubovskaya<sup>1</sup>, A.D. Kaprin<sup>1</sup>, A.A. Konarev<sup>2</sup>, T.V. Yakunina<sup>2</sup>, E.A. Lukyanets<sup>2</sup>**THE PREPARATION FOR INTRAOPERATIVE VISUALIZATION  
OF «SENTINEL» LYMPH NODES**<sup>1</sup>Hertsen Moscow Research Institute of Oncology, Moscow<sup>2</sup>State Research Center «NIOPIK», Moscow**Abstract**

We developed the original preparation Lymphotest on the basis of disulphoderivative of diaminotriphenylmethane dye, differing from Lymphazurin by positions of sulphogroups in benzene ring - N-[4-[[4-(diethylamino)phenyl](2,5-disulphophenyl)methylene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene]-N-ethylethanaminium hydroxide, inner salt, sodium salt. The proposed compound practically does not differ by spectrum from Lymphazurin, but is much more accessible and highly lymphotropic. Lymphotest in the form of 1% aqueous solution is characterized by a high diagnostic efficiency when using direct color lymphography, low toxicity (imposed dose exceeded the anticipated maximum dose for a human in 50-1000 times) and has no locally-irritating effect when using subcutaneously.

**Key words:** «sentinel» lymph nodes, intraoperative visualization.**Введение**

Проблема выявления регионарного лимфогенного метастазирования злокачественных новообразований является крайне актуальной при опухолях различной локализации, особенно при раке молочной железы, желудка, толстой кишки, матки, щитовидной и предстательной желез, меланоме. Это связано с высокой частотой регионарного метастазирования (до 85 % при раке желудка, 90 % при меланоме, 26 % при раке предстательной железы и т.д.). Наличие метастазов в регионарных лимфатических

узлах у больных злокачественными новообразованиями ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, так как при этом значительно повышается риск дальнейшей генерализации опухолевого процесса и снижается безрецидивная выживаемость больных. Современные методы исследования (эхография, компьютерная и магнитно-резонансная томографии, радионуклидная диагностика и др.) не могут дать точного ответа о наличии или отсутствии метастазов в лимфатических узлах. Единственным достоверным методом определения микрометастазов в лимфатических узлах является морфологическое исследова-

ние удаленного препарата. Однако расширенные лимфадэктомии нередко приводят к развитию различных осложнений, среди которых наиболее часто встречаются деформация, потеря чувствительности, отеки в области операции. Могут развиваться также флебиты и инфекционные осложнения. В этой связи является актуальным разработка методов, обеспечивающих визуализацию лимфатических путей и регионарных лимфатических сосудов во время операции как элемента прецизионной и в то же время адекватной лимфодиссекции.

В 1977 г. R.M. Cabanas [3] впервые выдвинул концепцию сторожевых лимфатических узлов. Согласно этой концепции существует так называемый «сторожевой» лимфатический узел, в который в первую очередь осуществляется отток лимфы из определенных участков ткани и который является первым барьером, задерживающим метастатические клетки опухоли. Согласно данной концепции, именно в этом узле реализуются первые метастазы опухоли.

**Целью исследования** являлась разработка препарата, позволяющего осуществить визуализацию путей лимфооттока от первичного опухолевого очага и «сторожевых» лимфоузлов.

После интраоперационного введения в зону опухоли такой препарат эффективнее всего связывается с альбумином плазмы крови и лимфы и с током лимфы поступает, прежде всего, в сторожевые узлы, окрашивая их в синий цвет, легко различимый глазом (без применения специальных устройств) на фоне тканей организма. Визуализированные сторожевые лимфатические узлы удаляют и срочно (интраоперационно) анализируют морфологическими методами. Выявление микрометастазов в сторожевых лимфоузлах является показанием к проведению расширенной лимфадэктомии, что значительно повышает эффективность хирургического противоопухолевого лечения. Контрастный метод имеет преимущество по простоте использования и безопасности. В качестве красителей в нем используют *Isosulfan blue dye*, индигокармин, метиленовый синий и другие [2; 4; 5].

Основные требования, предъявляемые к этим препаратам – хорошая лимфотропность и безопасность применения. В последние годы в мире успешно развивается метод контрастирования «сторожевых» лимфоузлов, однако пока зарегистрирован только один препарат – Лимфазурин, «Isosulfan blue injection 1%» («Lymphazurin injection 1%») на основе дисульфопроизводного диаминотрифенилметанового красителя – N-[4-(4-диэтиламинофенил)(2,5-дисульфопенилметил)-2,5-циклогексанилиден-1]-N-этилэтаминий гидроксид внутренней соль, натриевая соль (N-[4-[[4-(diethylamino)phenyl](2,5-disulphophenyl)methylene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene]-N-ethylethanaminium hydroxide, inner salt, sodium salt).

В России в настоящее время отсутствуют официальные препараты, аналогичные вышеприведенному по механизму действия.

Нами разработан оригинальный препарат

Лимфотест на основе соединения также из группы дисульфопроизводных диаминотрифенилметановых красителей, однако изомерный Лимфазурину – отличающийся положением сульфогрупп в бензольном кольце –

N-[4-(4-диэтиламинофенил)

(2,4-дисульфопенилметил)-

2,5-циклогексанилиден-1]-

N-этилэтаминий гидроксид внутренней соль, натриевая соль. Предлагаемое соединение спектрально практически не отличается от Лимфазурина, однако гораздо более доступно и обладает высокой лимфотропностью (рис. 1).

### Материалы и методы

Исследования проводили на неинбредных крысах, самках, и мышах-гибридах F1, самках, с саркомой S-37, которая метастазирует по лимфогенному пути.

Мыши и неинбредные крысы были получены из Научного центра биомедицинских технологий РАМН (филиал НЦБТ «Андреевка»).

Для контрастирования лимфатических сосудов и лимфатических узлов препарат Лимфотест в виде 1%-ного р-ра в количестве 0,2 мл вводили под кожу внутренней поверхности правого бедра (крысам), а также под кожу по периметру роста первичного опухолевого узла и в ложе опухоли (мышам с саркомой S-37).

Исследование лимфатических сосудов и лимфатических узлов осуществляли через 5; 15 и 30 мин после введения препарата Лимфотест.

По истечении указанных выше сроков животных подвергали эвтаназии путем передозировки эфира для наркоза и проводили аутопсию, исследуя область расположения паховых лимфатических сосудов и узлов справа.

При изучении элементов «острой» токсичности препарат Лимфотест вводили мышам однократно подкожно в дозах от 25 до 500 мг/кг. Оценивали клиническую картину интоксикации и гибель животных от токсичности.

При изучении местно-раздражающего действия препарата Лимфотест, его вводили крысам подкожно в готовой лекарственной форме (1%-ный р-р на фосфатном буфере) в объеме 1 мл.

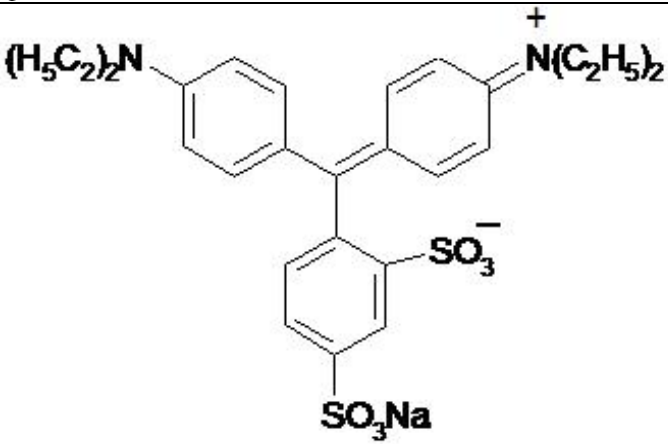
Оценку местно-раздражающего действия проводили макроскопически и с использованием гистологических методов исследования.

### Результаты и обсуждения

Исходным веществом для получения Лимфотеста является распространенный краситель Кислотный ярко-голубой 3; кислотный синий 1; Acid Blue 1, Sulphan Blue, Patent Blue VF (CAS 129-17-9), широко применяющийся в текстильной и полиграфической промышленности, а также как пищевой краситель [1]. Он получается конденсацией бензальдегид-2,4-дисульфокислоты с N,N-диэтиланилино.

Таблица

Физико-химические характеристики препарата Лимфотест

Структурная формула	
Эмпирическая формула	$C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$
Относительная молекулярная масса	$M = 566,66$
Внешний вид	Порошок от темно-синего до фиолетового цвета
Растворимость	Легко растворим в воде, растворим в этаноле
Максимум поглощения, $\lambda_{\text{макс}}$ в воде	$(640 \pm 2)$ нм
Молярный показатель поглощения на длине волны ( $\lambda_{\text{макс}}$ ) в воде ( $\epsilon_{\text{макс}}$ ), л/(моль·см)	97 000
Потеря в массе при высушивании, %	2,0
Содержание сульфатной золы, %	14,53
Содержание хлора, %	0,3
Содержание основного вещества	~ 95 %

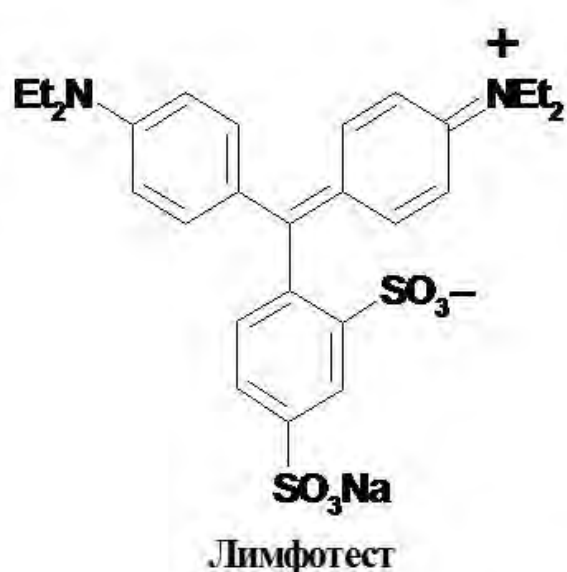
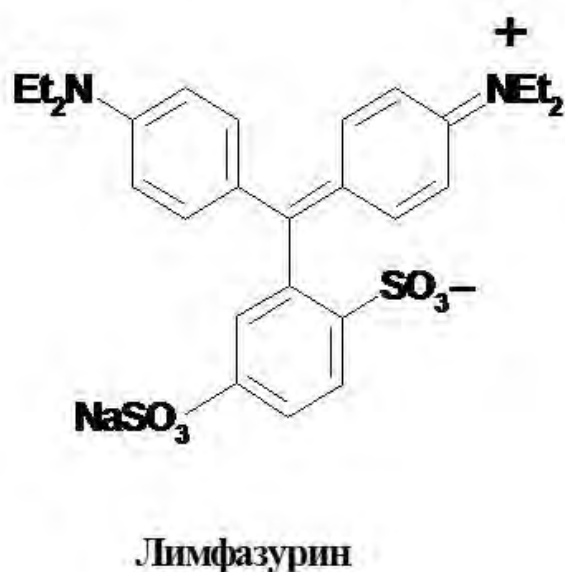


Рис. 1. Структурные формулы лимфазурина и лимфотеста.

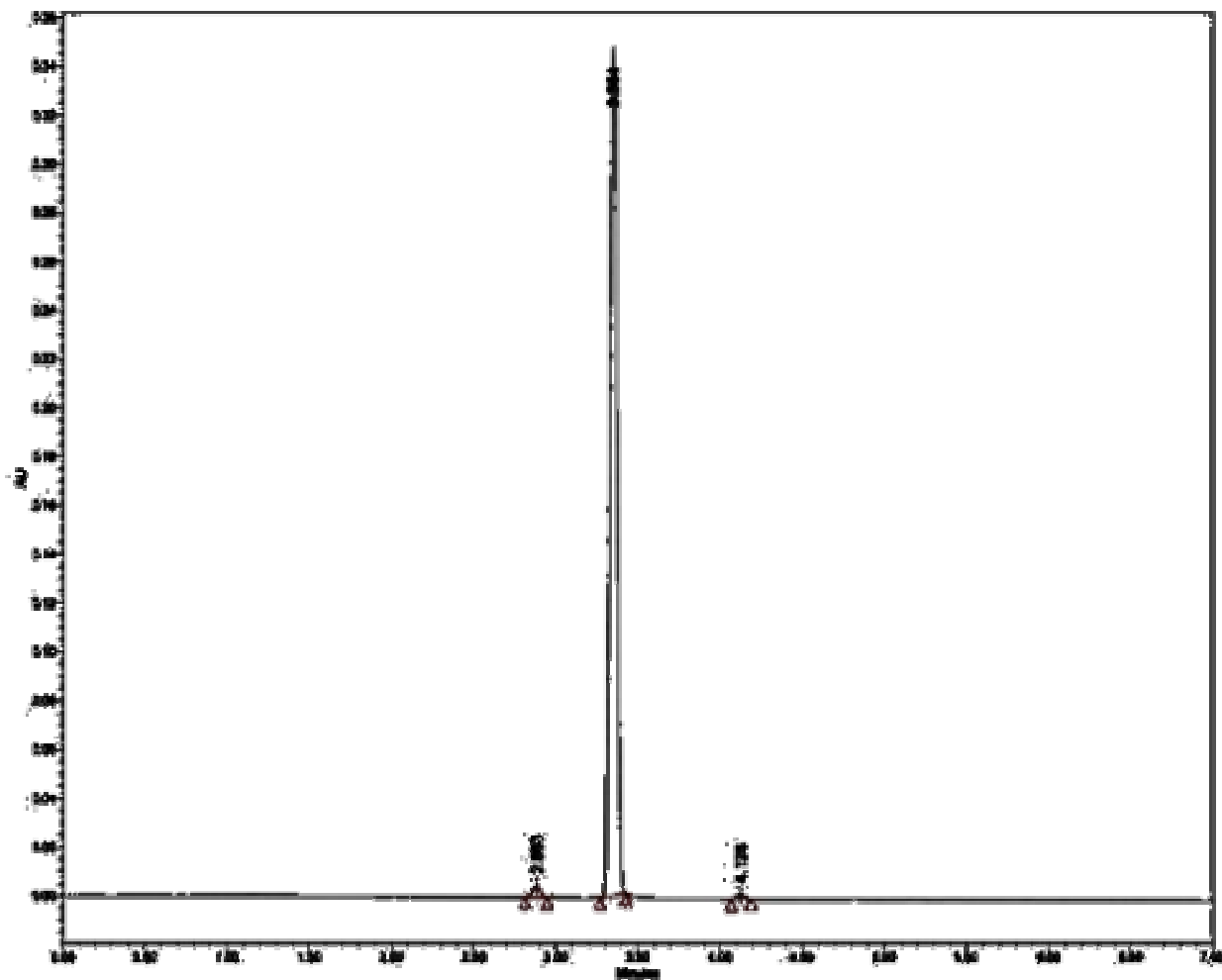


Рис. 2. Хроматограмма высокого разрешения препарата Лимфотест.



Рис. 3. Препарат Лимфотест.

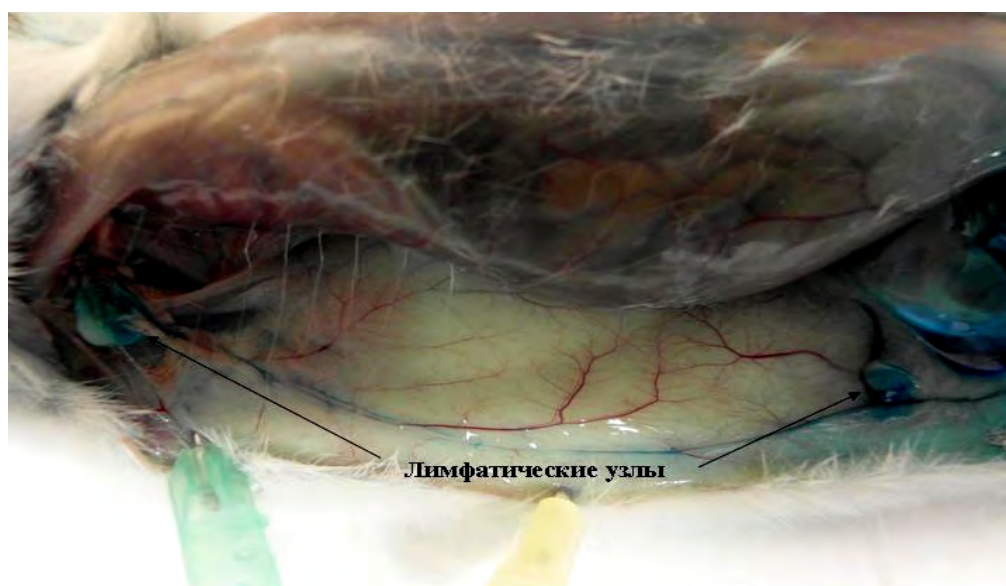
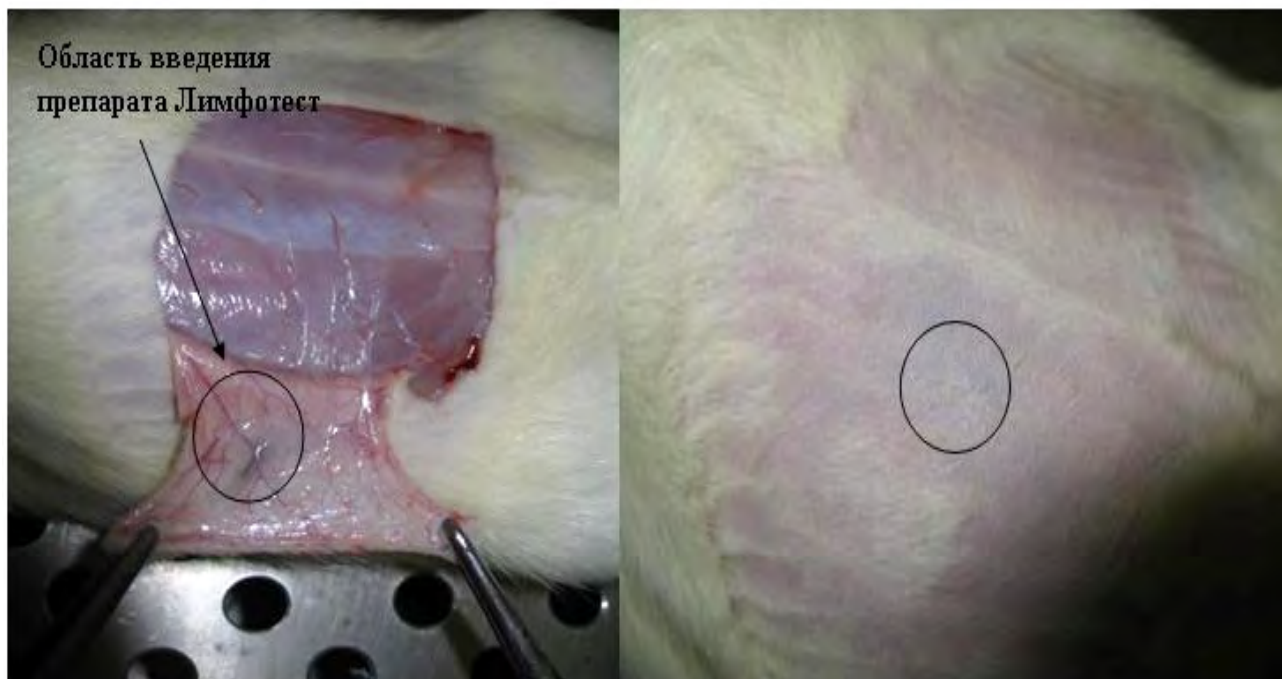


Рис. 4. Интраоперационная цветная лимфография подмышечного и пахового лимфатических узлов, пораженных метастазами, у мышей с саркомой S-37 с использованием препарата Лимфотест.



**Рис. 5.** Местно-тканевые реакции после однократного подкожного введения препарата Лимфотест в виде 1 %-ного раствора. Срок наблюдения – 3 сутки.

Однако содержание основного вещества в техническом красителе (даже в красителе марки “Indicator grade” фирмы Aldrich) составляет лишь около 50 %.

Для получения активной субстанции, в ФГУП «ГНЦ “НИОПИК”» разработана оригинальная патентоспособная технология очистки технического продукта, позволяющая получать очищенное вещество с содержанием основного вещества свыше 95 %.

На рис. 2 приведена хроматограмма высоко-го разрешения Лимфотеста.

Совместно в ФГУП «НИОПИК» и МНИОИ им.П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России разработана лекарственная форма препарата Лимфотест – 1 %-ный р-р в фосфатном буфере для подкожного и внутриопухолевого применения; флакон 50 мг в 5 мл (рис. 3).

На предприятии-изготовителе ФГУП «ГНЦ “НИОПИК”» была выпущена готовая лекарственная форма препарата «Лимфотест» (брутто-формула  $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$ , мол. вес 566.66). Физико-химические характеристики препарата представлены в табл..

В исследованиях *in vitro* показано, что препарата Лимфотест, связывается, главным образом, с альбумином человека и не образует комплексов с липопротеидами низкой плотности, что способствует эффективному накоплению красителя в «сторожевом» лимфоузле.

В сравнительных исследованиях на животных-опухоленосителях с метастатическим поражением лимфоузлов показано, что препарат накапли-

вается в сторожевых лимфоузлах гораздо эффективнее, чем метиленовый синий и индигокармин, и дает сходные результаты в сравнении с препаратом Лимфазурин.

Предлагаемый препарат способен проникать в лимфатические сосуды и лимфатические узлы, окрашивая последние в интенсивно синий цвет, определяемый во время хирургического вмешательства.

Это дает возможность хирургу удалить 1–3 лимфатических узла, определяемых в зоне, наиболее близкой к опухоли, провести их морфологическое исследование, по результатам которого выбрать оптимальный объем оперативного вмешательства.

В МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России – проведены пилотные доклинические исследования на крысах без опухолей (интактные лимфатические узлы, подкожное введение препарата) и мышцах с перевиваемой саркомой S-37 (введение в опухоль и под кожу по периметру опухоли).

Были использованы крысы без опухолей, которым препарат вводили под кожу, а затем оценивали регионарные по отношению к месту введения препарата лимфоузлы. Лимфоузлы регионарной зоны окрашивались лимфотропным красителем и легко визуализировались.

Были использованы также мыши с перевиваемой саркомой S-37, которым препарат вводили в объеме 0,2 мл в виде 1 %-ного р-ра в зону опухоли: в ткань опухоли и под кожу по периферии роста опухоли (обкалывание опухолевого очага).

Визуализировались лимфоузлы в зоне, регионарной по отношению к локализации первичного опухолевого очага (рис. 4).

В пилотных токсикологических исследованиях была оценена переносимость животными разрабатываемого препарата при однократном подкожном введении в дозах от 25 до 500 мг/кг.

Гибель животных от токсичности отсутствовала. Введенные дозы превышали предполагаемую максимальную дозу для человека, равную 0,5 мг/кг, в 50–1000 раз.

Изучение местно-раздражающего действия разрабатываемого препарата при его однократном подкожном введении в объеме 1 мл крысам в концентрации 1,0 %, предполагаемой для применения

у человека (исходя из имеющихся данных по аналогичному препарату), показало отсутствие местно-раздражающего действия при наблюдении за животными в течение 14 дней (рис. 5).

### Выводы

Разработан оригинальный препарат «лимфотест» на основе соединения из группы дисульфопроизводных диаминотрифенилметановых красителей, предназначенный для визуализации «сторожевых» лимфоузлов, в пилотных исследованиях в системе *in vivo* показана его диагностическая пригодность и безопасность.

### Литература

1. Степанов Б.И. Введение в химию и технологию органических красителей. М: Химия, 1984. – 592 с.
2. Blessing W.D., Stoller A.J., Teng S.C. et al. A comparison of methylene blue and lymphazurin in breast cancer sentinel node mapping // Am. J Surg. – 2002. – 184(4). – P. 341–5.
3. Cabanas R.M. An approach for the treatment of penile carcinoma // Cancer. – 1977. – 39. – P. 456–66.
4. Scherck K., Studer W., Figueiredo-j.V., Birchcr A.J. Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2006. – 96. – P. 497–500.
5. Scherck K., Birchcr A. J., Figueiredo-j.V. Blue dyes in medicine – a confusing terminology // Contact Dermatitis. – 2006. – 54. – P. 231–2.