

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОКТРЕОТИДА, МЕЧЕННОГО ИЗОТОПОМ ИНДИЯ-111, ДЛЯ РАДИОНУКЛИДНОЙ ДИАГНОСТИКИ НОВООБРАЗОВАНИЙ С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ СОМАТОСТАТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

М. Г. Гринин, Н. Л. Шимановский¹

Исследована возможность использования октреотида, меченного изотопом индия-111, для радионуклидной диагностики новообразований с высокой экспрессией соматостатиновых рецепторов. Показано, что с помощью культур клеток можно прогнозировать функциональную пригодность октреотида-¹¹¹In в определенные интервалы, в которые будет наблюдаться наилучшая визуализация новообразований. Накопление октреотида-¹¹¹In в перевиваемой опухоли В₁₆ (пигментированная меланома) у животных свидетельствует о возможности использования данного соединения в качестве радиофармацевтического средства для диагностики новообразований.

Ключевые слова: октреотид-¹¹¹In, радионуклидная диагностика, соматостатиновые рецепторы

ВВЕДЕНИЕ

Ранняя диагностика злокачественных новообразований остается одной из важнейших задач современной ядерной медицины. Использование в качестве трэйсеров (радиоизотопов, специфично идентифицирующих рецепторные биомолекулы) веществ белковой природы (гормоны, их аналоги, антитела) значительно повышает специфичность метода, что особенно важно для диагностики нейроэндокринных новообразований и их метастазов [7, 12, 17].

За рубежом существует несколько препаратов, позволяющих использовать метод молекулярной визуализации в медицинской практике для радионуклидной диагностики — “OctreoScan” (Malinkrodt) и “NeoSpect” (CIS bio international) и радионуклидной терапии — “Зевалин” (BayerSchering Pharma). Однако в России из перечисленных препаратов зарегистрирован только “NeoSpect”, предназначенный для диагностики мелкоклеточного рака легкого.

Цель настоящего исследования заключается в экспериментальном исследовании нового отечественного радиофармацевтического препарата, представляющего меченный индием-111 октапептид (октреотид), являющийся синтетическим аналогом соматостатина, предназначенного для рецепторной сцинтиграфии новообразований с высокой экспрессией соматостатиновых рецепторов.

Рилизинг-ингибирующий фактор — соматостатин, как олигопептидный гормон, оказывает биологическое влияние через взаимодействие с рецепторами, расположенными на мембранах клеток, что впервые было показано в 1978 г. [13]. Последующие исследования позволили выявить несколько подтипов рецепторов с различным сродством к соматостатину. Исходя из структуры и фармакологических свойств, рецепторы к соматостатину разделяют на две группы (два семейства). К первой группе относят рецепторы 2, 3 и 5-го типа, которые раньше по фармакологическим характеристикам относили к соматостатиновым рецепторам первого типа. Ко второй группе относятся рецепторы 1-го и 4-го типа, ранее называемые соматостатиновыми рецепторами второго типа [4, 5, 9, 11]. Соматостатиновые рецепторы относятся к группе с семью трансмембранными фрагментами и кодируются генами, расположенными на различных хромосомах [16]. Рецепторы 1–4-го типов практически эквивалентно комплексируются с соматостатином-14 и 28, тогда как рецепторы 5-го типа почти селективно комплексируются с соматостатином, имеющим структуру, включающую 28 аминокислот.

Некоторые опухоли экспрессируют большое количество рецепторов соматостатина [3], табл. 1. Одной из таких опухолей является меланома. В работах [1, 2, 8] показана идентичность по происхождению клеток нервной системы и клеток-прародителей меланомы. Основываясь на данном факте исследователи [8] попытались выявить, а также оценить распределение подтипов соматостатиновых рецепторов на клетках меланомы, уточнив при этом их функциональное назначение. Для этого были использованы следующие

¹ Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению “Научный центр контроля качества” 101000, Москва, ул. Мясницкая, 7, стр. 11, E-mail: nuclmed@hotmail.com

² Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии РГМУ, Москва.

методы: сцинтиграфия с ^{111}In -пентетреотидом и обратная транскриптаз-полимеразная цепная реакция. В результате проведенного исследования установлено, что соматостатиновые рецепторы действительно экспрессируются на клетках меланомы, где частота встречаемости их подтипов с первого по пятый уменьшается с 96 до 9 % [8].

В качестве аналога соматостатина наибольшее распространение в медицинской практике получил синтетический октреотид, период полураспада которого составляет 90 мин, что в 30 раз больше, чем у соматостатина [15].

После открытия пяти подтипов соматостатиновых рецепторов, которые гетерогенно экспрессированы в различных опухолях, было установлено, что эффективность октреотида в определенной степени связана с экспрессией соматостатиновых рецепторов подтипа 2 [6].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследованиях использовали октреотид, произведенный фармацевтической компанией ЗАО “Фарм-Синтез” в соответствии со стандартом качества — ФСП 42-0447-3450-02. Для приготовления препарата Октреотид- ^{111}In октреотид модифицировали диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПА). Готовый к использованию препарат содержал октреотид-ДТПА 0,01 мг, кислоты гентизиновой 1 мг, натрия хлорида 6 мг, натрия цитрата безводного 4 мг. Радионуклид ^{111}In получен в виде препарата “Индия-111 хлорид, без носителя”, выпускаемого ФГУП “Завод медрadioпрепарат” ФМБА России (ФС 42-2066-96). Изотоп индий-111 имеет период полураспада 67,37 ч. При радиоактивном распаде индий-111 испускает гамма-кванты с энергией 0,173 МэВ (89 %) и 0,247 МэВ (94 %). В 1 мл готового препарата содержалось 111 или 222 МБк.

Экспериментальное изучение функциональной пригодности, а также фармакокинетические параметры соединения Октреотид- ^{111}In проводили на белых беспородных крысах, мышцах-самках F1 (СВА · В1) массой 20 – 24 г, а также на культурах клеток опухолей человека. Расчет фармакокинетических параметров проводился с использованием модельно-независимого метода (программа “Comstat”). Препарат вводили в хвостовую вену в объеме 0,1 мл мышам и 0,2 мл крысам.

Для определения функциональной пригодности в условиях *in vivo* в качестве модели была использована перевивная опухоль V_{16} (пигментированная меланома), полученная в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН (Москва). Выбор данной модели был обусловлен наличием у этой опухоли соматостатиновых рецепторов, а также ее доступностью.

Содержание Октреотида- ^{111}In в тканях и органах экспериментальных животных определяли методом

прямой радиометрии цельных органов или навесок тканей (костная, мышечная, кровь) на автоматическом спектрометре НК-350 (Венгрия).

Исследования цитотоксичности и аффинности исследуемого препарата в условиях *in vitro* проводили на клеточных линиях опухолей человека: аденокарциномы шейки матки (HeLa), аденокарциномы молочной железы (MCF-7), феохромоцитомы (PC-12) и мелко-клеточного рака легкого (H-69), полученных в Медико-генетическом центре РАМН (Москва). В качестве “нормальной” ткани использовали лимфоциты периферической крови человека, полученные в Московском научно-исследовательском институте медицинской экологии (Москва). Выбор клеточных линий был обусловлен объединением этих опухолей в группу нейроэндокринных, а также наличием у выбранных линий соматостатиновых рецепторов.

В экспериментах по определению цитотоксичности использовали клетки HeLa и MCF-7.

В 96-луночный планшет в каждую лунку помещали 100 мкл клеточной суспензии, содержащей 5000 клеток HeLa или 10000 клеток MCF-7. Планшет, содержащий клетки, помещали на сутки в CO_2 -инкубатор для формирования монослоя.

Октреотид (200 мкг/мл) растворяли в изотоническом растворе хлорида натрия. Полученный раствор вносили в лунки, содержащие монослой, и раститровывали с уменьшением концентрации в 2 раза. Таким образом, в растворе, омывающем клетки, концентрация составляла: 100, 50, 25, 12, 6, 3, 2, 1, 0,5, 0,25 мкг октреотида на лунку. 16 лунок были использованы в качестве контроля.

После внесения препарата клетки инкубировали в течение 72 ч.

После инкубирования среда, содержащая препарат, была удалена, клетки промыты 3 – 4 раза средой с последующим ее удалением. Затем в лунки был внесен 10 % раствор формалина, и планшет помещен в холодильник на 30 мин.

После инкубирования клеток с формалином планшет осторожно промывали проточной водой и высушивали при комнатной температуре.

Клетки окрашивали 0,1 % раствором кристаллического фиолетового в течение 15 мин при температуре 37 °С. Далее клетки промывали водопроводной водой и высушивали на воздухе. После чего в каждую лунку вносили по 100 мкл этанола и выдерживали в течение 15 мин. Затем планшет помещали в спектрофотометр марки “Эфос” и фотометрировали полученный спиртовой раствор красителя при длине волны 594 нм.

Процент выживших клеток определяли как отношение концентрации красителя в экспериментальных лунках к контрольным лункам.

Для определения аффинности исследуемого препарата в условиях *in vitro* клетки новообразований выращивали в культуральных флаконах с площадью поверхности 25 см² с использованием культуральной

среды следующего состава: для MCF-7 — среда RPMI-1640 и среда Eagle в соотношении 3:1 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки — 5 %, L-глутамин — 200 мМ и гентамицин 10 Ед/мл; для H-69 — среда DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин и антибиотиков; для PC-12 — среда DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки — 5 %, L-глутамин — 200 мМ и гентамицин 10 Ед/мл. Клетки инкубировали в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа, при температуре 37 °С до получения монослоя с плотностью $3 \cdot 10^6$ кл/флакон. При работе с культурой мелкоклеточного рака легкого, являющейся полусуспензионной, использовали клеточную суспензию, которую расфасовывали в пробирки типа “Эпандорф” из расчета $2 \cdot 10^6$ кл/мл.

Перед экспериментом культуральную среду сливали, заменяя ее соответствующей средой, не содержащей добавок. После внесения меченого соединения пробирки или флаконы помещали в инкубатор и выдерживали до окончания срока инкубации. Затем среду, содержащую радиоактивное вещество, сливали, а клетки трижды промывали раствором Хенкса. Клетки MCF-7 и PC-12 снимали с подложки раствором трипсина и версена (1:1) и переносили в пробирки типа “Эпандорф”.

Аккумулированную клетками радиоактивность нормировали из расчета 1 кБк на 10^6 клеток (кБк/млн.кл.).

Математическую обработку результатов исследования вели с использованием программ Microsoft Excel и MathCad.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения вопроса о возможности использования какого-либо соединения в качестве носителя для будущего радиофармацевтического препарата должна быть установлена концентрация, при которой носитель не будет проявлять фармакодинамических свойств, что особенно актуально при использовании октреотида, обладающего широким спектром фармакологических свойств.

Исследования на культурах клеток позволили определить концентрацию октреотида, при которой не проявляются его фармакодинамические свойства, в данном случае влияние на пролиферацию.

В экспериментах на культурах клеток HeLa и MCF-7 установлено, что октреотид в концентрациях ниже 12 мкг/мл не влияет на пролиферативную активность клеток опухолей. Отмечено, что препарат оказывает более сильное влияние на пролиферацию клеток MCF-7, что, вероятно, связано с высокой экспрессией соматостатиновых рецепторов на мембранах опухолевых клеток данного вида. Показано, что лишь в концентрации свыше 25 мкг/мл октреотид начинает про-

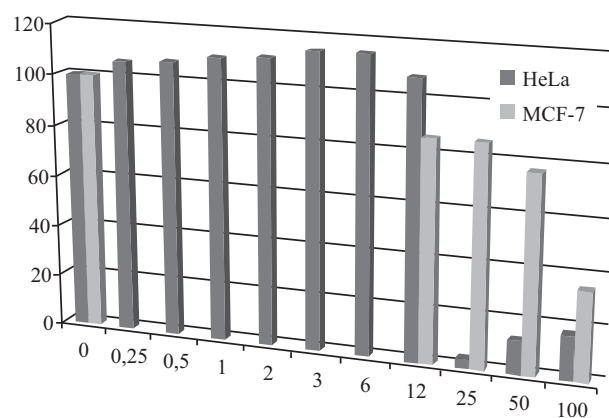


Рис. 1. Жизнеспособность культур клеток HeLa и MCF-7 в присутствии Октреотида-¹¹¹In.

По оси абсцисс — концентрация Октреотида-¹¹¹In, мкг/мл; по оси ординат — процент выживших клеток новообразования.

являть антипролиферативное действие на клетки опухолей (рис. 1).

Таким образом, октреотид в концентрации 10 мкг/мл не проявляет фармакодинамических свойств и может быть использован в данной концентрации для приготовления радиофармацевтического диагностического средства.

Следующим этапом в оценке возможности использования октреотида для диагностики опухолей, экспрессирующих соматостатиновые рецепторы, были исследования, определяющие возможность дифференциального захвата исследуемого соединения клетками опухолей. Подобного рода исследования являются стандартными в мировой практике и позволяют прогнозировать функциональную пригодность исследуемого соединения в дальнейших исследованиях в условиях *in vivo*.

В первой серии экспериментов изучали специфическое связывание Октреотида-¹¹¹In клетками аденокарциномы молочной железы. В качестве препарата сравнения был выбран комплекс ¹¹¹In-ДТПА.

Таблица 1. Частота выявления рецепторов соматостатина на клетках опухолей [3]

Опухоль	Частота выявления рецепторов соматостатина, %
Гастронома	100
Карциноид	96
Глюкагонома	100
Инсулинома	61
Мелкоклеточный рак легкого	100
Параганглиома	100
Нейробластома	89
Феохромоцитом	86
Опухоли гипофиза	75
Медулярная карцинома щитовидной железы	71

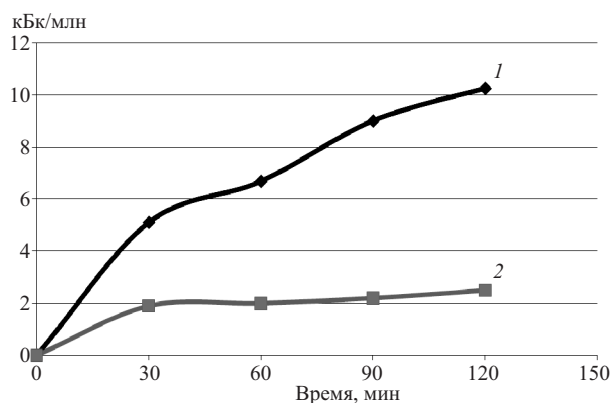


Рис. 2. Динамика накопления меченого октреотида (1) и комплекса ^{111}In -ДТПА (2) клетками аденокарциномы молочной железы мышей самок (для всех значений, $p \leq 0,05$).

По оси абсцисс — время после внутривенного введения Октреотида- ^{111}In или ^{111}In -ДТПА в дозе 0,1 мл, 111 МБк; по оси ординат — накопленная радиоактивность в пересчете на 1 млн клеток.

Кинетика аккумуляции препарата Октреотида- ^{111}In клетками существенно отличается от кинетики комплекса индия-111 с ДТПА (рис. 2). Коэффициент избирательного накопления, как соотношение накопления препарата к накоплению комплекса ^{111}In -ДТПА, через 120 мин после внесения исследуемых соединений в культуральную среду составлял 4.1. Полученные данные свидетельствуют о специфичности взаимодействия меченого индием-111 октреотида с клетками аденокарциномы молочной железы, основанном на комплементарном взаимодействии октреотида с соматостатиновыми рецепторами, имеющимися на мембранах опухолевых клеток.

Во второй серии экспериментов изучали кинетику накопления препарата клетками нескольких видов опухолей человека (мелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома молочной железы, феохромоцитома). В

Таблица 2. Фармакокинетические параметры Октреотида- ^{111}In (0,2 мл, 222 МБк) в крови и органах белых беспородных крыс самок после внутривенного введения

Биоматериал	C_{max} , % от дозы	MRT , ч	$AUC_{0 \rightarrow t}$, ч · % на мл или г ткани	F_t , $AUC_{\text{органы}}/AUC_{\text{кровь}}$
Кровь	7,32	15,09	24,54	—
Сердце	0,27	2,04	0,26	0,01
Легкие	1,15	18,87	5,08	0,21
Печень	2,99	21,37	61,72	2,52
Почки	3,48	21,12	58,79	2,40
Желудок	0,82	20,02	8,62	0,35
Кишечник	8,68	21,54	175,13	7,14
Мышечная ткань	18,90	1,71	10,74	0,44

Примечание. Здесь и в табл. 3 C_{max} — максимальная концентрация; MRT — среднее время удержания лекарственного вещества в организме; $AUC_{0 \rightarrow t}$ — площадь под фармакокинетической кривой в пределах длительности наблюдения (рассчитывалась методом трапеций).

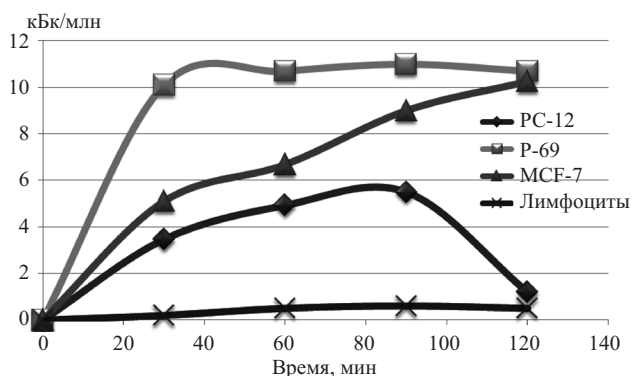


Рис. 3. Динамика накопления Октреотида- ^{111}In клетками опухолей человека.

качестве “нормальной” ткани были использованы лимфоциты периферической крови человека.

Накопление препарата опухолевыми клетками, в проведенных экспериментах достоверно выше уровня накопления препарата лимфоцитами, о чем свидетельствуют значения коэффициентов дифференциального накопления: мелкоклеточный рак легкого — 23, аденокарцинома молочной железы — 18, феохромоцитома — 10 (рис. 3).

Полученные данные о степени накопления препарата различными клетками свидетельствуют о том, что клетки мелкоклеточного рака легкого имеют максимальное количество соматостатиновых рецепторов подтипов 2, 3 и 5 из использованных в эксперименте клеточных линий. Разница между значениями накопленной активности клетками рака легкого и молочной железы, вероятно, обусловлена более быстрым, но менее устойчивым взаимодействием между препаратом и соматостатиновыми рецепторами.

In vitro эксперименты свидетельствуют о специфичном накоплении препарата клетками опухолей, имеющими на своих мембранах рецепторы к соматостатину.

Таким образом, можно говорить о возможности использования *in vitro* теста определения функциональ-

Таблица 3. Фармакокинетические параметры Октреотида- ^{111}In (0,1 мл, 111 МБк) в крови и органах мышей-самок с опухолью V_{16} после внутривенного введения

Биоматериал	C_{max} , % от дозы	MRT , ч	$AUC_{0 \rightarrow t}$, ч · % на мл или г ткани	F_t , $AUC_{\text{органы}}/AUC_{\text{кровь}}$
Кровь	7,32	15,09	24,54	—
Сердце	0,27	2,04	0,26	0,01
Легкие	1,15	18,87	5,08	0,21
Печень	2,99	21,37	61,72	2,52
Почки	3,48	21,12	58,79	2,40
Желудок	0,82	20,02	8,62	0,35
Кишечник	8,68	21,54	175,13	7,14
Мышечная ткань	18,90	1,71	10,74	0,44
Опухолевая ткань	5,16	19,73	31,19	2,77

ной пригодности для прогнозирования возможности использования соединения в диагностических целях в качестве первого этапа скринингового отбора.

Для проверки возможности использования Октреотида-¹¹¹In для визуализации опухолей были проведены исследования на интактных животных и животных-опухоленосителях. Наибольшая аккумуляция Октреотида-¹¹¹In у интактных животных наблюдалась в кишечнике, печени и почках, что объясняется достаточно высокой экспрессией соматостатиновых рецепторов в этих органах (табл. 2).

При введении препарата мышам-самкам с перевивной опухолью его накопление опухолевой тканью было достаточным для ее визуализации (табл. 3). Параметр тканевой доступности для опухолевой ткани в 2,77 раза превышал данный показатель для крови и мышечной ткани, что в свою очередь свидетельствует о наличии соматостатиновых рецепторов в этой опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Использование *in vitro* методики на культурах клеток позволило установить концентрацию Октреотида-¹¹¹In, в которой он не проявляет фармакодинамических свойств.

2. Исследования *in vitro* позволили прогнозировать функциональную пригодность Октреотида-¹¹¹In для визуализации опухолей с соматостатиновыми рецепторами *in vivo*, а также спрогнозировать временные интервалы, в которые будет наблюдаться наилучшая визуализация новообразований.

3. Исследование Октреотида-¹¹¹In в условиях *in vivo* показало возможность его использования в качестве

радиофармацевтического диагностического средства для выявления новообразований с экспрессией соматостатиновых рецепторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юрина, *Гистология, цитология и эмбриология*, Издание пятое, Медицина, Москва (2001).
2. Б. Карлсон, *Основы эмбриологии по Пэттену*, 1, Мир, Москва (1983).
3. А. В. Янкин, *Практическая онкология*, 5(2), 145 – 153 (2004).
4. R. Arnold, B. Simon, M. Wied, *Digestion.*, 62, Suppl. 1, 84 – 91 (2000).
5. H. C. Fehmann, U. Wulbrand, R. Arnold, *Cancer Res.*, 153, 15 – 22 (2000).
6. A. Kubota, Y. Yamada, S. Kagimoto, et al., *J. Clin. Invest.*, 93(3), 1321 – 1325 (1994).
7. S. W. J. Lamberts, J. C. Reubi, E. P. Krenning, *Acta Oncologica*, 32, Suppl. 2, 167 – 170 (1993).
8. S. S. Lum, W. S. Fletcher, M. S. O'Dorisio, et al., *World J. Surg.*, 25, 407 – 412 (2001).
9. D. Nouel, G. Gaudriault, M. Houle, et al., *Endocrinology*, 138, 296 – 306 (1997).
10. Y. C. Patel, *Front Neuroendocrinology*, 20, 157 – 198 (1999).
11. Y. C. Patel, *J. Endocrine Invest.*, 20, 348 – 367 (1997).
12. J. C. Reubi, E. Krenning, S. W. J. Lamberts, et al., *Digestion.*, 54, 76 – 83 (1993).
13. A. Schonbrun, A. H. Tashjian, *J. Biol. Chem.*, 253, 6473 – 6483 (1978).
14. A. Shulkes, *Aust. № Z J Surg.*, 60, 575 – 58 (1990).
15. A. Spanu, O. Schillaci, P. Marongiu, et al., *J. Nucl. Med.*, 43, 299 (2002).
16. V. Tran, G. Uhl, J. Martin, *Science*, 228, 492 – 495 (1985).
17. R. Wiessleder, U. Mahmood, *Radiology*, 219, 316 – 333 (2001).

Поступила 22.04.11

EXPERIMENTAL STUDY OF INDIUM-111 LABELED OCTREOTIDE APPLICATION FOR RADIONUCLIDE DIAGNOSTICS OF TUMORS WITH HIGH EXPRESSION OF SOMATOSTATIN RECEPTORS

M. G. Grinin¹ and N. L. Shimanovskii^{1,2}

¹ Scientific Center for Quality Control, ul. Myasnitskaya 7/11, Moscow, 101000, Russia

² Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117869, Russia

We have studied the possibility of using octreotid labeled by indium-111 for radionuclide diagnostics of neoplasms with high expression of somatostatin receptors. It has been established that, using experiments with cell cultures, it is possible to predict the application of ¹¹¹In-labeled octreotid and determine time intervals for the best visualization of tumors. Indium-111-labeled octreotid accumulation in animals with transferred B₁₆ tumor (pigment melanoma) shows evidence for the opportunity of using this substance as radiopharmaceutical medium for tumor diagnostics.

Key words: ¹¹¹In-labeled octreotid, radionuclide diagnostics, somatostatin receptors