

УДК 615.076.9

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ИНДИЙ-111-МЕЧЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

К.А. Лунёва^{1,2},
К.Э. Терновская¹,
О.Е. Клементьева¹,
А.С. Лунёв¹

¹ФГБУ ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123098, г. Москва, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, 109472, г. Москва, Российская Федерация

Радиофармацевтический предшественник «Оксинд, ¹¹¹In» является комплексным соединением для мечения аутологичных лейкоцитов крови человека и их последующего введения для неспецифической визуализации и локализации очагов воспаления различной природы методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). Исследовано цитотоксическое действие лиофилизата для приготовления радиофармацевтического препарата (РФП) «Оксинд, ¹¹¹In» и его радиофармацевтического предшественника на лейкоцитах крови кролика. В ходе исследований цитотоксичности лиофилизата для приготовления радиофармацевтического предшественника с последовательно возрастающими концентрациями основного вещества – 8-гидроксихинолина – были определены допустимые концентрации и достигнута абсолютно цитотоксичная концентрация. При исследовании цитотоксического действия предшественника РФП на двух дозировках, различающихся в 10 раз объемными активностями (МБк/мл), было подтверждено отсутствие цитотоксических эффектов.

Ключевые слова: 8-гидроксихинолин, индий-111, ¹¹¹In-оксин, оксинд, цитотоксичность, безопасность применения, лейкоциты, радиофармапрепарат, лиофилизат, ОФЭКТ, доклинические исследования.

Введение. История радионуклидной диагностики воспаления начинается с момента использования в 1971 году ⁶⁷Ga-цитрата [1]. Использование ⁶⁷Ga-цитрата для визуализации очагов воспаления ограничивают неблагоприятные для получения изображений ядерно-физические характеристики РФП: диапазон энергии излучения - 93-880 кэВ (не оптимальный для выполнения сцинтиграфии или ОФЭКТ), продолжительный период полураспада – 78 ч, а также особенности его фармакокинетики (оптимальное время проведения исследования от 24 до 72 ч после инъекции). Более приемлемым методом оказалась сцинтиграфия с использованием аутологичных лейкоцитов, меченных липофильными комплексами радионуклидов технецием-99m или индием-111 [2].

Приготовление таких РФП протекает в две важные стадии: мероприятия, связанные с забором крови у пациента и последующим получением аутологичных лейкоцитов, и собственно мечение лейкоцитов In-111 или Tc-99m через посредника – липофильного хелатора [3]. Сразу после внутривенного введения меченых лейкоцитов происходит их физиологическое накопление в печени и селезенке. Затем в течение суток меченые лейкоциты активно мигрируют в воспаленную ткань, где происходит их связывание с сосудистым эндотелием, в связи с локально повышенной экспрессией адгезивных молекул [4]. Мечение аутологичных лейкоцитов индием-111 проводят с применением оксина, как хелатора передачи радиометки внутрь клетки, тогда как для мечения технецием-99m используют НМРАО [5, 6].

Лунёва Кристина Андреевна (Lunyova Kristina Andreevna), инженер отдела радиационных технологий в медицине ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, аспирант кафедры химии ФГБОУ ВО МГАВМиБ –МВА, christfmbc@gmail.com

Терновская Кристина Эдуардовна (Ternovskaya Kristina Eduardovna), инженер отдела радиационных технологий в медицине ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, violet_mak@mail.ru

Клементьева Ольга Евгеньевна (Klementyeva Olga Evgenyevna), кандидат биологических наук, заведующая лабораторией доклинических и клинических исследований радиофармацевтических препаратов отдела радиационных технологий в медицине ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, klementyeva.olga@gmail.com

Лунёв Александр Сергеевич (Lunev Alexander Sergeevich), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела радиационных технологий в медицине ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, mr.alekslunev@gmail.com

Радиофармацевтический предшественник «Оксинд, ^{111}In » представляет собой комплексное соединение 8-гидроксихинолина (оксина) с радионуклидом индий-111 для мечения аутологичных лейкоцитов крови человека и их последующего введения для неспецифической визуализации и локализации очагов воспаления различной природы методом ОФЭКТ. Для наблюдения за динамикой развития патологического процесса и оценки терапевтического ответа требуется выполнение повторных ОФЭКТ исследований, что требует наличия РФП на основе гамма-излучающего радионуклида, подходящего по своим ядерно-физическим характеристикам для выполнения ОФЭКТ и достаточным периодом полураспада. Всем этим требованиям наилучшим образом отвечает индий-111 (тип распада – электронный захват, энергия распада 171,28 кэВ (90,7%) и 245,35 кэВ (9,1%), период полураспада 2,8047 суток).

Поскольку готовым лекарственным средством являются аутологичные лейкоциты пациента, меченные радионуклидом индий-111, основным критерием безопасности является отсутствие цитотоксичности выбранной для клинического применения дозировке 8-гидроксихинолина и активности радионуклида In-111 . Соблюдение этих условий является гарантией не только безопасности, но и функциональной пригодности препарата для выполнения диагностической процедуры.

Целью данного исследования безопасности применения РФП «Оксинд, ^{111}In » является выявление и оценка выраженности цитотоксического эффекта, возникающего при взаимодействии лиофилизата для приготовления РФП и его радиоактивного предшественника с лейкоцитами крови кролика.

Материалы и методы исследования. В качестве материала исследования (*in vitro* тест-системы) была использована лейкоцитарная масса, выделенная из периферической (венозной) крови кроликов. Животные были получены из сертифицированного питомника лабораторных животных «КролИнфо». Экспериментальные животные содержались в требуемых условиях при естественном световом режиме, на стандартной диете, свободном доступе к воде и пище. Животные были включены в эксперименты после 14-дневного карантина. Все манипуляции с животными, связанные с проведением экспериментальных работ и выводом из эксперимента, проводились в соответствии с правилами проведения работ, методическими рекомендациями и правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [7, 8, 9].

Методика выделения лейкоцитов

Для выделения лейкоцитов был использован метод, основанный на различной скорости осаждения форменных элементов крови [10]. Все манипуляции по приготовлению растворов, отбору и разделению цельной крови на фракции, а также мечению лейкоцитарной массы выполнялись с соблюдением условий асептики.

В предварительно подготовленные пробирки с антикоагулянтом (АК) отбирали кровь у кроликов в соотношении 3:17. Осторожно смешивали кровь и АК, путем аккуратного переворачивания пробирки несколько раз. Аккуратно вливали полученную смесь в пробирки с осаждающим раствором (ОР) в соотношении 1:1, аккуратно перемешивали, избегая вспенивания, и оставляли при комнатной температуре на 45-60 минут до полного осаждения эритроцитов.

После осаждения эритроцитарной массы надосадочную жидкость переносили в пластиковые центрифужные пробирки (Corning®, США) и центрифугировали при 150g в течение 5-10 минут (центрифуга CM-6M, Elmi, Латвия). Супернатант, представляющий собой плазму, обогащенную тромбоцитами осторожно удаляли. Лейкоцитарный осадок осторожно ресуспендировали в необходимом объеме физиологического раствора (0,9%-ный раствор натрия хлорида).

Цитотоксичность лиофилизата для приготовления РФП

Объектами исследования являлись растворы лиофилизата для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In ». Согласно рекомендациям Европейской ассоциации ядерной медицины (EANM, European Association of Nuclear Medicine), регламентирующей процедуру мечения аутологичных лейкоцитов человека [4], максимальный объем раствора, в котором происходит мечение, не должен превышать 2 мл. В настоящем исследовании изучено влияние 8-гидроксихинолина в составе лиофилизата для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In » на лейкоциты в концентрациях, превышающих рекомендованную в 2, 5, 10 и 20 раз. В экспериментах использованы растворы со следующими концентрациями 8-гидроксихинолина в растворе для инкубирования: 100 мкг/мл, 250 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл. Лиофилизат для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In » был разбавлен стерильным раствором 0,05 М HCl (далее растворитель) до требуемых концентраций 8-гидроксихинолина. Контрольным раствором для оценки базовой выживаемости лейкоцитов служила аутологичная плазма крови кролика без клеточных элементов.

Каждую порцию лейкоцитов ($\sim 2 \cdot 10^6$ лейкоцитов) ресуспендировали в 1 мл раствора лиофилизата для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In » с заданной концентрацией 8-гидрокси-

нолина и инкубировали при комнатной температуре в течение 10, 30 и 60 минут. По окончании инкубирования, клетки осаждали путем центрифугирования, отмывали от раствора лиофилизата стерильным физиологическим раствором, вновь ресуспендировали в физиологическом растворе. Из каждой пробы отбирали по 3 аликвоты, которые окрашивали раствором трипанового синего, позволяющим оценить сохранность жизнеспособности по результатам качественной и количественной оценки. Отсутствие или степень проявления цитотоксических эффектов оценивали по результатам микроскопирования (микроскоп бинокулярный Микмед, ЛОМО, Россия) окрашенной лейкоцитарной массы, помещенной в камеру Горяева (Мини-Мед, Россия).

Цитотоксичность радиоактивного предшественника РФП

Цитотоксичность радиофармацевтического предшественника оценена при проведении процедуры меченая аутологичных лейкоцитов с использованием двух дозировок. Объемная активность РФП в растворе для инкубирования лейкоцитов составляла 4,0 МБк на $2 \cdot 10^6$ лейкоцитов и 40,0 МБк на $2 \cdot 10^6$ лейкоцитов. Контрольным раствором для оценки базовой выживаемости лейкоцитов служила аутологичная плазма крови кролика без клеточных элементов.

Каждую порцию лейкоцитов ($\sim 2 \cdot 10^6$ лейкоцитов) ресуспендировали в 1 мл раствора РФП «Оксинд, ^{111}In » с заданной объемной активностью и инкубировали при комнатной температуре в течение 10, 30 и 60 минут. По окончании инкубирования, клетки осаждали путем центрифугирования, отмывали от несвязанного раствора РФП стерильным физиологическим раствором, вновь ресуспендировали в физиологическом растворе. Из каждой пробы отбирали по 3 аликвоты, которые окрашивали раствором трипанового синего, позволяющего оценить сохранность жизнеспособности по результатам качественной и количественной оценки. Отсутствие или степень проявления цитотоксических эффектов оценивали по результатам микроскопирования окрашенной лейкоцитарной массы, помещенной в камеру Горяева.

Статистическая обработка результатов

Все полученные данные обработаны методами математической статистики с применением пакета Microsoft Excel. При статистической обработке результатов исследования определяли показатели средних арифметических значений (M), стандартных ошибок с учетом отклонения значений выборки от средних арифметических ($\pm m$). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Цитотоксичность лиофилизата для приготовления РФП

Полученные в исследованиях качественной оценки цитотоксического действия лиофилизатов для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In » результаты показали, что двукратное превышение концентрации 8-гидроксихинолина в инкубационной среде не оказывает негативного влияния на морфологию лейкоцитов в течение 60 минут их контакта со средой инкубирования. При инкубировании лейкоцитов в среде, содержащей пятикратную концентрацию исследуемого вещества, через 10 минут отмечается набухание мембран у более чем 10% клеток, находящихся в поле зрения. С течением времени негативное воздействие на клетки усиливается и к часу контакта лейкоцитов со средой инкубирования наблюдается лизис и плазмолиз клеток. Начиная с 10-кратной концентрации, нарушения в морфологии клеток становятся фатальными. Таким образом, в случае необходимости, концентрацию 8-оксихинолина в среде для меченая лейкоцитов допустимо увеличить в два раза, при этом максимально сократить срок контакта клеток со средой.

Количественная оценка цитотоксического действия раствора лиофилизата для приготовления исследуемого РФП с последовательно возрастающими концентрациями показала, что предельной концентрацией 8-гидроксихинолина, при которой сохраняется приемлемое для последующего введения пациенту количество жизнеспособных лейкоцитов, является 10 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации 8-гидроксихинолина в инкубационной среде приводит к прогрессирующей гибели клеток. Снижение уровня жизнеспособности происходит как с увеличением концентрации 8-гидроксихинолина, так и продолжительности контакта лейкоцитов со средой инкубирования. Причем при концентрации 100 мкг/мл фатальные изменения происходят практически мгновенно. График зависимости жизнеспособности клеток от повышения концентрации 8-гидроксихинолина представлен рисунком 1.

Цитотоксичность радиоактивного предшественника РФП

Полученные результаты качественной оценки цитотоксичности радиоактивного предшественника РФП « ^{111}In , Оксинд» показали, что инкубирование лейкоцитов в среде, содержащей образцы с активностями 4,0 и 40,0 МБк, не оказывает негативного влияния на морфологию лейкоцитов в течение 60 минут их контакта со средой инкубирования.

Количественная оценка цитотоксического действия РФП «Оксинд, ^{111}In » с объемными активностями, различающимися в 10 раз, также показала полное отсутствие цитотоксических эффектов.

Учитывая тот факт, что индий-111 является эмиттером электронов, являющихся физиче-

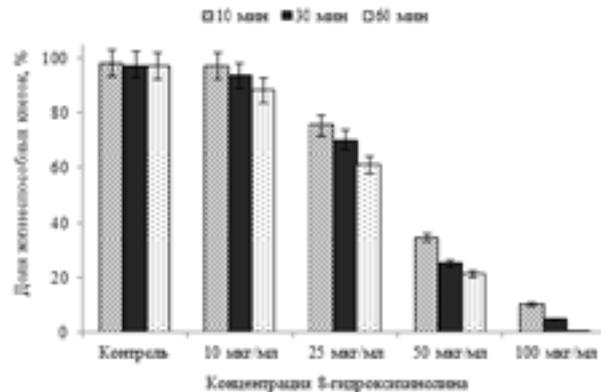


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности лейкоцитов кролика от концентрации 8-гидроксиоксинолина при различном времени инкубирования

ским цитотоксическим фактором, желательно максимально возможно увеличить объем инкубационной среды. Эта мера предосторожности также позволит избежать образования клеточных конгломератов в случае необходимости выделения и мечения клеток из крови пациента со значительным лейкоцитозом.

Заключение. В ходе исследования цитотоксичности растворов лиофилизата для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In » с последовательно возрастающими концентрациями 8-оксихинолина в диапазоне концентраций 10-100 мкг/мл получены следующие результаты:

Превышение рекомендованной концентрации 8-оксихинолина в инкубационной среде в 2 раза не приводит к существенному снижению жизнеспособности лейкоцитов крови кролика на протяжении 1 часа их контакта со средой;

Дальнейшее повышение концентрации вы-

зывает прогрессирующее во времени снижение жизнеспособности клеток и значительные изменения в их морфологии;

Концентрация 8-оксихинолина, равная 100 мкг/мл является абсолютно цитотоксичной для лейкоцитов.

Таким образом, изложенные выше сведения позволяют заключить, что двукратное повышение концентрации 8-оксихинолина, как основного потенциально токсического компонента лиофилизата для приготовления РФП «Оксинд, ^{111}In », является нежелательным, но допустимым, поскольку не вызывает существенного ухудшения качества лейкоцитарной массы.

В ходе исследования цитотоксичности радиоактивного предшественника РФП «Оксинд, ^{111}In » с активностями 4,0 и 40,0 МБк в среде для инкубирования лейкоцитов подтверждено полное отсутствие цитотоксических эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наркевич Б.Я., Костылев В.А. Физические основы ядерной медицины. Учебное пособие. М.: АМФ-Пресс, 20
2. Davina K. Hughes Nuclear Medicine and Infection Detection: The Relative Effectiveness of Imaging with ^{111}In -Oxine-, $^{99\text{mTc}}$ -HMPAO-, and $^{99\text{mTc}}$ -Stannous Fluoride Colloid-Labeled Leukocytes and with $^{67\text{Ga}}$ -Citrate. J. Nucl. Med. Technol. Vol. 31, 20
3. Datz F.L., Thorne D.A. Effect of chronicity of infection on the sensitivity of the ^{111}In -labeled leukocyte scan. Am. J. Roentgenol. Vol. 147, 1986.
4. Datz, F.L. Indium-111-labeled leukocytes for the detection of infection: current status. Semin. Nucl. Med. Vol. 24, 1994.
5. Mc Afee J.G., Thakur M.L. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I Soluble agents. II Particles. J. Nucl. Med. Vol. 17 (6), 1976.
6. Peters A.M., Osman S., Henderson B.L. et al. Clinical experience with $^{99\text{mTc}}$ -hexamethylpropylene-amineoxime for labeling leucocytes and imaging inflammation. Lancet. Vol. 198, 19
7. ГОСТ 33044-2014 от 01.08.20 Принципы надлежащей лабораторной практики. Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. Москва, 2015.
8. Эвтаназия экспериментальных животных. Методические рекомендации. Москва, 1985.
9. European Convention for the Protection Vertebrate Animals Use for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series No. 1 March 18 19 Strasbourg, 1986.
10. M. Roca, E. F. J. de Vries, F. Jamar, O. Israel, A. Signore. Guidelines for the labelling of leucocytes with ^{111}In -oxine. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010; 37:835-8DOI 10.1007/s00259-010-1393-5.

REFERENCES:

1. Narkevich B.Ya., Kostylev V.A. Physical basis of nuclear medicine. Textbook. Moscow, AMF-Press, 2001 (in Russian).
2. Davina K. Hughes Nuclear Medicine and Infection Detection: The Relative Effectiveness of Imaging with ^{111}In -Oxine-, $^{99\text{mTc}}$ -HMPAO-, and $^{99\text{mTc}}$ -Stannous Fluoride Colloid-Labeled Leukocytes and with $^{67\text{Ga}}$ -Citrate. J. Nucl. Med. Technol. Vol. 31, 20
3. Datz F.L., Thorne D.A. Effect of chronicity of infection on the sensitivity of the ^{111}In -labeled leukocyte scan. Am. J. Roentgenol. Vol. 147, 1986.
4. Datz, F.L. Indium-111-labeled leukocytes for the detection of infection: current status. Semin. Nucl. Med. Vol. 24, 1994.
5. Mc Afee J.G., Thakur M.L. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I Soluble agents. II Particles. J. Nucl. Med. Vol. 17 (6), 1976.
6. Peters A.M., Osman S., Henderson B.L. et al. Clinical experience with $^{99\text{mTc}}$ -hexamethylpropylene-amineoxime for labeling leucocytes and imaging inflammation. Lancet. Vol. 198, 19
7. State Standard 33044-2014 by 01.08.20 Good Laboratory Practice. Interstate Council of standardization, metrology and certification. Moscow, 2015 (in Russian).
8. Euthanasia of experimental animals. Guidelines. Moscow; 1985 (in Russian).
9. European Convention for the Protection Vertebrate Animals Use for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series No. 1 March 18 19 Strasbourg, 1986.
10. M. Roca, E. F. J. de Vries, F. Jamar, O. Israel, A. Signore. Guidelines for the labelling of leucocytes with ^{111}In -oxine. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010; 37:835-8DOI 10.1007/s00259-010-1393-5.

K.A. Luneva^{1,2}, K.E. Ternovskaya¹, O.E. Klement'eva¹, A.S. Lunev¹

CITOTOXICITY OF INDIUM-111-LABELED AUTOLOGOUS WBC

¹A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, 123098, Moscow, Russian Federation

²K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 109472, Moscow, Russian Federation

The radiopharmaceutical precursor «Oxind, ¹¹¹In» is a complex compound for labeling autologous leukocytes of human blood and their subsequent introduction for non-specific visualization and localization of inflammation foci of different nature by single-photon emission computed tomography (SPECT). The cytotoxic effect of lyophilisate for preparation of radiopharmaceutical preparation «Oxind, ¹¹¹In» and its radiopharmaceutical precursor on rabbit blood leukocytes has been investigated. In the course of studies of the cytotoxicity of the lyophilisate for the preparation of a radiopharmaceutical precursor with successively increasing concentrations of the main substance, 8-hydroxyquinoline, the permissible concentrations have been determined and the absolutely cytotoxic concentration was achieved.

In the study of the cytotoxic effect of the precursor of radiopharmaceutical on two dosages that differ by 10 times in volume activities (MBq / ml), the absence of cytotoxic effects has been confirmed.

Keywords: *8-hydroxyquinoline, Indium-111, ¹¹¹In-oxin, oxind, cytotoxicity, safety use, leukocytes, radiopharmaceutical, lyophilisate, SPECT, preclinical studies.*

Переработанный материал поступил в редакцию 11.01.2019 г.

