

УДК 616-073.916:615.849.2.012

**ПОВЕДЕНИЕ ГАЛЛИЯ-68 В СОСТАВЕ
NODA-АМИНОГЛЮКОЗЫ В ОРГАНИЗМЕ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ**

В. К. Тищенко^{1,2}, В. М. Петриев^{1,2}, А. В. Федорова¹, Т. Ю. Екатова¹,
И. Н. Завестовская^{2,3}

В работе представлены сравнительные результаты исследования биологического распределения ^{68}Ga в составе NODA-аминоглюкозы в органах и тканях мышей с экспериментальной моделью злокачественной опухоли и асептического воспаления. Было выявлено, что патологические состояния организма мышей не оказывают существенного влияния на поведение ^{68}Ga -NODA-аминоглюкозы после внутривенного введения. Динамика накопления и выведения активности в большинстве органов и тканей не имела значительных различий. Уровень накопления активности в опухоли и мышечной ткани с воспалением через 1 ч после инъекции препарата превышал аналогичные величины в остальных органах и тканях, за исключением почек. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования ^{68}Ga -NODA-аминоглюкозы для визуализации патологических очагов методом позитрон-эмиссионной томографии.

Ключевые слова: галлий-68, производные глюкозы, аминоглюкоза, позитронная эмиссионная томография, аденокарцинома толстого кишечника.

¹ МРНЦ им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ “НМИЦ радиологии” Минздрава России, 249036 Россия, Калужская область, Обнинск, ул. Королёва, 4; e-mail: petriev@mrrc.obninsk.ru.

² НИЯУ “МИФИ”, 115409 Россия, Москва, Каширское шоссе, 31.

³ ФИАН, 119991 Россия, Москва, Ленинский пр-т, 53.

Введение. Методы ядерной медицины используются для диагностики широкого спектра заболеваний. В отличие от анатомо-топографических методов диагностики они основаны на принципе функциональной визуализации, что позволяет использовать их для выявления поражений в ситуациях, когда структурные изменения не определяются или неспецифичны. Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой неинвазивный метод диагностики, превосходящий по чувствительности и разрешающей способности другие методы. Важную роль в широком распространении ПЭТ играют радиофармацевтические лекарственные препараты (РФЛП).

На сегодняшний день наиболее изученным и часто применяемым РФЛП остается [^{18}F]фтор-2-деокси-2-D-глюкоза (^{18}F -ФДГ). Накопление ^{18}F -ФДГ в опухолевых клетках обусловлено двумя причинами. Во-первых, при малигнизации повышается количество белков-транспортеров глюкозы GLUT, доставляющих РФЛП внутрь клеток. Во-вторых, происходит увеличение активности гексокиназы – фермента, катализирующего фосфорилирование ^{18}F -ФДГ в ^{18}F -ФДГ-6-фосфат. ^{18}F -ФДГ-6-фосфат не участвует в дальнейшем метаболизме и накапливается в клетке, становясь своеобразной “метаболической” меткой, позволяющей визуализировать злокачественные новообразования как “горячие” очаги [1].

Повышенная аккумуляция ^{18}F -ФДГ характерна и для воспалительных процессов. Происходит это как вследствие значительного увеличения числа переносчиков глюкозы, так и скопления в области активного воспаления макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, гранулоцитов и других форменных элементов крови, которые являются клетками “накопителями” [2, 3].

Применение ^{18}F -ФДГ ограничено необходимостью использования циклотрона и дорогостоящего оборудования для автоматизированного синтеза, что приводит к высокой стоимости клинической дозы РФЛП [4]. Поэтому рассматривается возможность использования в качестве радиоактивной метки генераторного радионуклида галлия-68 (^{68}Ga), обладающего оптимальными ядерно-физическими свойствами ($T_{1/2} = 68$ мин, $\beta^+ = 89\%$, $E_{\beta_{\text{max}}}^+ = 1.9$ МэВ). В качестве носителя ^{68}Ga предлагается использовать производные глюкозы, имеющие в структуре атом азота или серы и способные образовывать стабильную координационную связь с радиоактивными металлами [4]. В данной работе рассматриваются сравнительные данные биораспределения ^{68}Ga -NODA-аминоглюкозы (^{68}Ga -NODA-АГ) в организме лабораторных животных с опухолевым процессом и асептическим воспалением.

Материалы и методы. Приготовление меченого препарата ($^{68}\text{Ga-NODA-AG}$) проводили путем введения хлорида галлия ($^{68}\text{GaCl}_3$) во флакон с лиофилизатом. Для этого к лиофилизату NODA-AG добавляли 0.5 мл деионизованной воды и перемешивали до полного растворения осадка, добавляли 0.5 мл 0.2 М ацетатного буфера с pH 4.6, перемешивали и добавляли 37 МБк (1.0 мКи) $^{68}\text{GaCl}_3$ в 0.5 мл 0.05 М HCl. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре, доводили до объема 2.0 мл деионизованной водой, фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм.

Для количественного определения ^{68}Ga , связанного с NODA-AG, свободного ^{68}Ga (не связанного с NODA-AG) и гидролизованного ^{68}Ga использовали метод бумажной хроматографии. В качестве неподвижной фазы использовали Ватман-1 производства компании Sigma-Aldrich. В качестве подвижных фаз были выбраны 1.0 М раствор ацетата и 0.05%-ый раствор лимонной кислоты. При элюировании 1.0 М раствором натрия ацетата ^{68}Ga , связанный с NODA-AG, двигался с фронтом элюента ($R_f = 0.85 - 0.95$), свободный ^{68}Ga оставался на старте ($R_f = 0$). При элюировании 0.05%-ым раствором лимонной кислоты гидролизованный ^{68}Ga незначительно сдвигался со старта ($R_f = 0.05 - 0.10$), а свободный ^{68}Ga и связанный с NODA-AG поднимался с фронтом элюента ($R_f = 0.85 - 0.95$).

Количественное определение гидролизованного ^{68}Ga , свободного и связанного с NODA-AG, проводили путем расчета результатов радиометрии полосок хроматографической бумаги. Радиометрию проводили с помощью автоматического гамма-счетчика "Wizard" версии 2480 фирмы PerkinElmer/Wallac (Финляндия).

Полученный РФЛП был предназначен для внутривенных инъекций. Радиохимические примеси в препарате $^{68}\text{Ga-NODA-AG}$ не превышали 5.0%.

Изучение биораспределения экспериментальных образцов нового препарата на основе производной азотсодержащей глюкозы проводили на мышах BALB/c с экспериментальной моделью злокачественной опухоли или воспалительного процесса. Масса тела животных составляла 15–20 г. Всего было использовано 32 животных.

В качестве модели злокачественной опухоли была выбрана аденокарцинома толстого кишечника (АКАТОЛ). Для получения солидного варианта опухоли брали мышью-донора с опухолью, декапитуировали и выделяли опухолевую ткань. Затем опухолевую ткань измельчали, разводили в физиологическом растворе в соотношении 1:10 и имплантировали мышам подкожно по 20 мг взвеси в объеме 0.2 мл. Через 8–10 суток после имплантации опухолевых клеток, когда объем опухоли достигал примерно 0.5 см³,

животным внутривенно (в хвостовую вену) вводили ^{68}Ga -аминоглюкозу. Вводимая активность составляла 0.18-0.37 МБк в объеме 0.1 мл.

Экспериментальная модель воспалительного процесса была представлена асептическим воспалением мышечной ткани бедра. Асептическое воспаление вызывалось внутримышечным введением (в бедренную мышцу) терпентинного масла (скипидара) в объеме 0.05 мл/мышь. В течение последующих 2-х суток происходило развитие асептического воспаления. Его наличие у животных оценивали путем пальпации, а также визуально по поведенческим реакциям и наличию отека и гиперемии в месте введения. Этим животным внутривенно (в хвостовую вену) вводили ^{68}Ga -аминоглюкозу с активностью 0.18-0.37 МБк в объеме 0.1 мл.

Через 5 мин, 1, 2 и 3 ч после внутривенного введения по 4 животных на каждый срок подвергали эвтаназии путем декапитации (под наркозом), выделяли пробы органов и тканей, помещали их в пластиковые пробирки, взвешивали на электронных весах “Sartorius” (Германия) и проводили радиометрию с помощью автоматического гамма-счетчика “Wizard” версии 2480 фирмы PerkinElmer/Wallac (Финляндия). На момент введения в отдельные пробирки отбирали пробы ^{68}Ga -аминоглюкозы в объеме 0.1 мл для использования в качестве стандарта введенной дозы. По данным радиометрии на каждый срок наблюдения рассчитывали количество радиоактивности на 1 г органа или ткани в % от введенной дозы (%/г). Кроме того, были рассчитаны коэффициенты дифференциального накопления (КДН) как частное от деления величин концентрации активности в опухоли или мышечной ткани с воспалением в остальных органах и тканях.

Результаты радиометрии обрабатывали методом оценки с вычислением средней величины и стандартной ошибки средней величины ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение. При проведении исследований было установлено, что при однократном внутривенном введении ^{68}Ga -аминоглюкозы максимальное накопление активности в органах и тканях отмечалось через 5 мин после введения. В последующие сроки содержание препарата значительно снижалось.

Наибольший интерес представляет распределение активности в опухолевой ткани и мышечной ткани с воспалением. Максимальный уровень накопления активности в опухоли составил 4.88 %/г. Через 1 ч эта величина снизилась в 3 раза до 1.57 %/г, а в сроки 2 ч и 3 ч – до 0.54 %/г и 0.52 %/г, соответственно. В мышце бедра с воспалением начальная концентрация активности составила 6.31 %/г, а в последующие сроки – 1.40 %/г, 0.33 %/г и 0.20 %/г через 1 ч, 2 ч и 3 ч, соответственно (рис. 1).

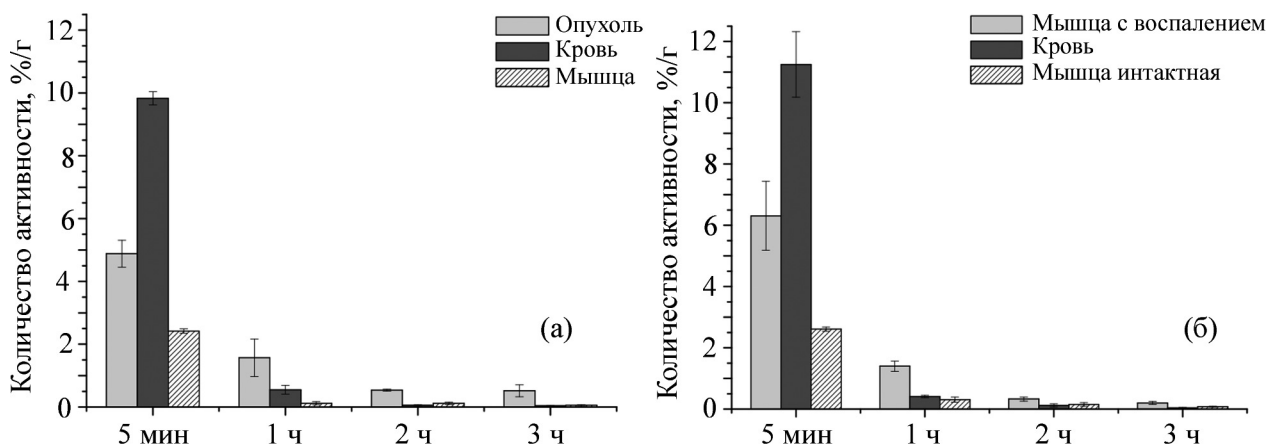


Рис. 1: Динамика изменения удельной активности в некоторых органах и тканях мышей с опухолью (а) и мышцей с воспалением мышечной ткани (б) в различные сроки после внутривенного введения ^{68}Ga -аминоглюкозы.

В крови первоначальное содержание активности у мышей-опухоленосителей составило 9.83 %/г, а у мышей с воспалением – 11.25 %/г, однако уже через 1 ч эти величины снизились в 17–27 раз до 0.55 %/г и 0.41 %/г, соответственно. В поздние сроки уровни активности продолжали снижаться и составили 0.04 %/г через 3 ч в обеих группах животных (рис. 1). Быстрое снижение активности в крови и ее низкая концентрация в поздние сроки свидетельствуют о высокой стабильности препарата. При низкой стабильности $^{68}\text{Ga}^{3+}$ связывается с белками плазмы крови, обеспечивая тем самым повышенный уровень активности в крови в течение всех сроков исследования [5–7].

В мышечной ткани содержание активности невелико. У мышей с опухолью начальная концентрация ^{68}Ga -аминоглюкозы составила 2.42 %/г, снижаясь за 1 ч более чем в 20 раз до 0.12 %/г. В течение следующего часа уровень активности в мышце оставался неизменным – 0.12 %/г, а через 3 ч – снизился до 0.06 %/г. У мышей с воспалением в здоровой мышце бедра накопленная активность не превышала 2.61 %/г в срок 5 мин, быстро выводясь в течение последующих 3 ч до 0.08 %/г (рис. 1).

Для диагностических РФЛП важна не столько величина удельной активности в опухоли или мышечной ткани с воспалением, сколько относительное накопление активности в них по отношению к окружающим здоровым тканям, прежде всего крови и мышечной ткани. Для четкой визуализации достаточно, чтобы эти соотношения составляли 3–4.

При анализе относительного накопления активности в опухоли по отношению к окружающим здоровым тканям было показано, что уже через 1 ч после введения препарата практически для всех органов и тканей КДН превысили численные значения 2 и 3 и сохранялись на этом уровне и в поздние сроки (2 и 3 ч). Соотношения опухоль/кровь увеличивались с 0.50 в срок 5 мин до 3.38, 6.67 и 12.78 в сроки 1, 2 и 3 ч после введения ^{68}Ga -NODA-аминоглюкозы. Соотношения опухоль/мышца также возрастала в течение первого часа с 2.01 до 26.26, однако в последующие сроки эта величина снизилась до 11.88 и 14.34 в сроки 2 ч и 3 ч, соответственно.

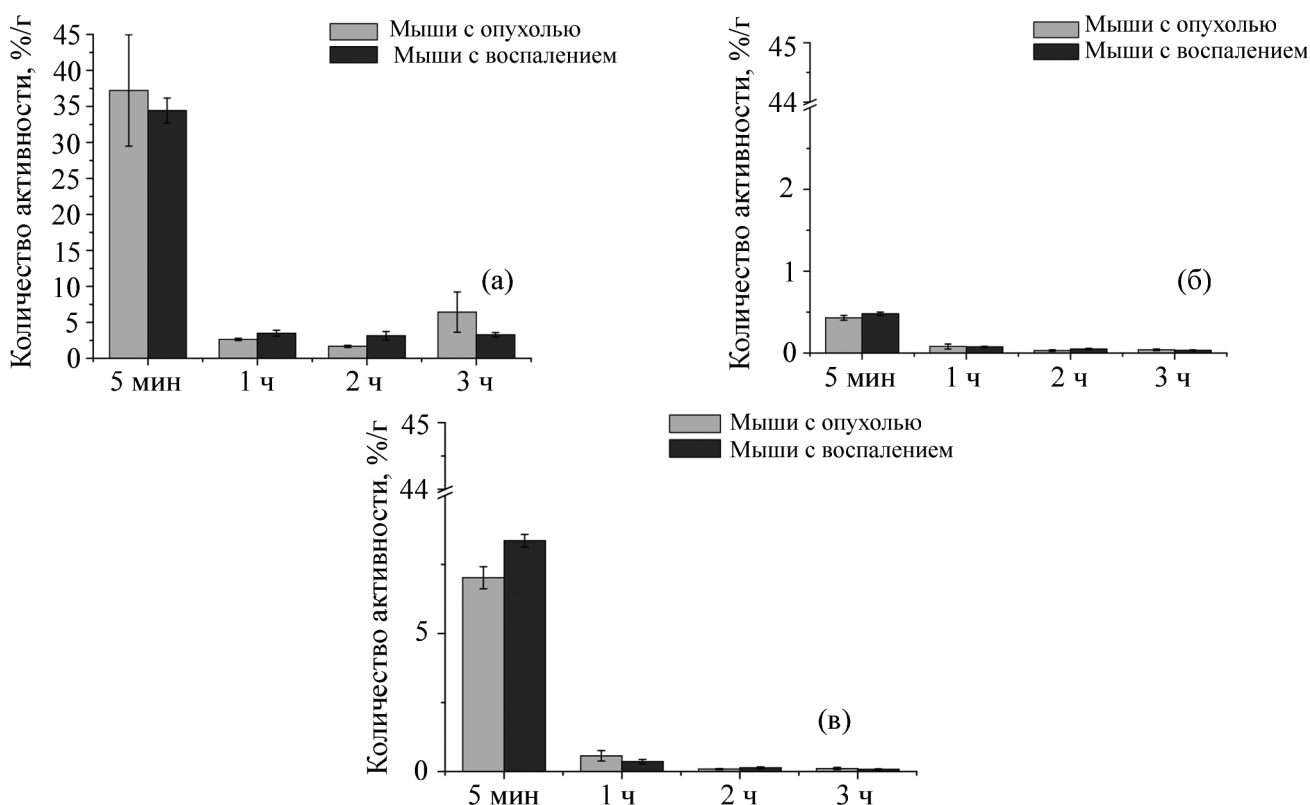


Рис. 2: Величины удельной активности в почках (а), головном мозге (б) и легких (в) в различные сроки после внутривенного введения ^{68}Ga -аминоглюкозы.

Количество активности в мышечной ткани с воспалением также превышало ее содержание в других органах и тканях, кроме почек. Так, первоначальное значение КДН мышца с воспалением/кровь составило 0.59, однако в дальнейшем эти значения возрастали до 3.55, 3.61 и 7.12 в сроки 1 ч, 2 ч и 3 ч, соответственно. Накопление активности в мышечной ткани с воспалением превышало содержание активности в здоровой мышечной ткани на протяжении всего исследования. Начальное значение соотношения

мышца с воспалением/здоровая мышца составило 2.42 в срок 5 мин, возрастая через 1 ч до максимального значения 5.46. В дальнейшем эта величина снижалась до 4.45 и 2.57 в сроки 2 ч и 3 ч, соответственно.

Наиболее высокое накопление активности у животных обеих групп было отмечено в почках, что связано, вероятно, с экскрецией препарата через мочевыделительную систему. Первоначальная концентрация активности в почках у животных с опухолью составила 37.22 %/г, снижаясь в последующие сроки до значений 1.67–6.42 %/г. У животных с воспалением мышечной ткани уже через 5 мин после введения ^{68}Ga -аминоглюкозы удельная активность в почках достигла 34.41 %/г (рис. 2). Тем не менее, за первый час концентрация радиоактивности снизилась почти в 10 раз, а в оставшиеся сроки варьировала в диапазоне от 3.13 %/г до 3.48 %/г.

Следовые количества препарата были зафиксированы в головном мозге (рис. 2). Максимальные концентрации активностей составили 0.43 %/г и 0.48 %/г в срок 5 мин у мышей с опухолевым процессом и асептическим воспалением, соответственно, сни-

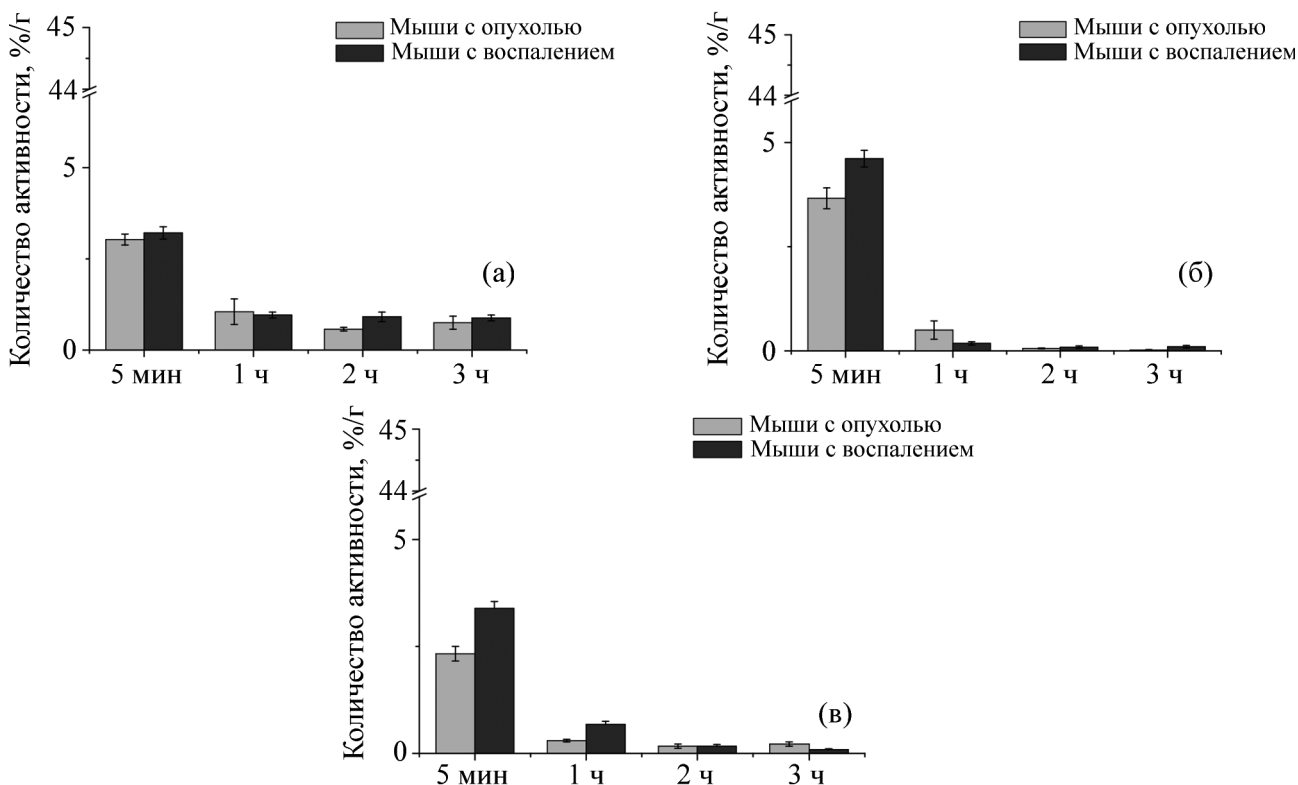


Рис. 3: Величины удельной активности в печени (а), сердце (б) и кости бедра (в) в различные сроки после внутривенного введения ^{68}Ga -аминоглюкозы.

жаясь в процессе исследования до 0.02 %/г. В головном мозге накопление активности не превышало 0.48 %/г в срок 5 мин, а спустя 3 ч в нем регистрировалось не более 0.033 %/г активности. Таким образом, именно в головном мозге было отмечено минимальное содержание активности по сравнению с остальными органами и тканями. Это является преимуществом ^{68}Ga -аминоглюкозы по сравнению с ^{18}F -ФДГ, чей уровень накопления в головном мозге может достигать 2.36–5.81 %/г [8, 9].

Животные с опухолью и с воспалением мышечной ткани практически не имели отличий в распределении активности во внутренних органах и тканях. Наибольшая концентрация ^{68}Ga в составе аминоглюкозы отмечалась в легких: 7.02 %/г и 8.36 %/г для мышей с опухолью и воспалением соответственно (рис. 2). У мышей-опухоленосителей максимальные активности препарата в сердце и печени составили 3.66 %/г и 3.03 %/г, а у мышей с асептическим воспалением – 4.61 %/г и 3.21 %/г, соответственно. В поздние сроки уровни активностей ^{68}Ga -аминоглюкозы в этих органах существенно падали по сравнению с первоначальными значениями (рис. 3).

В кости бедра у мышей с воспалением пиковый уровень активности составил 3.39 %/г в срок 5 мин, снижаясь до 0.68 %/г, 0.17 %/г и 0.09 %/г в сроки 1 ч, 2 ч и 3 ч после введения ^{68}Ga -аминоглюкозы. У мышей с опухолью удельная активность снижалась с 2.33 %/г в срок 5 мин до 0.30 %/г, 0.17 %/г и 0.22 %/г в сроки 1 ч, 2 ч и 3 ч, соответственно (рис. 3).

Заключение. Таким образом, при однократном внутривенном введении ^{68}Ga -аминоглюкозы мышам BALB/c с экспериментальной моделью злокачественной опухоли или асептическим воспалением мышечной ткани наблюдалось схожее распределение радиоактивности. Было выявлено, что удельная активность в опухоли и мышечной ткани с воспалением уже через 1 ч после введения превышала содержание активности в остальных органах и тканях, за исключением почек. При этом численные значения КДН, достаточные для визуализации, отмечены уже через 1 ч после введения препарата. Препарат быстро выводился из крови и других органов и тканей преимущественно через мочевыделительную систему. Минимальное накопление активности отмечено в головном мозге. Следовательно, полученные результаты предполагают возможность применения ^{68}Ga -аминоглюкозы для визуализации патологических процессов.

Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение от 26 ноября 2018 г. № 075-02-2018-097). Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57518X0174.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] W. T. Rahman, D. J. Wale, B. L. Viglianti, et al., *Biomed. Pharmacother.* **117**, 109168 (2019).
- [2] М. С. Тлостанова, *Современные технологии в медицине* **6**(3), 45 (2014).
- [3] S. Vaidyanathan, C. N. Patel, A. F. Scarsbrook, F. U. Chowdhury, *Clin. Radiol.* **70**(7), 787 (2015). DOI: 10.1016/j.crad.2015.03.010.
- [4] В. М. Петриев, В. К. Тищенко, Р. Н. Красикова, *Химико-фармацевтический журнал* **50**(4), 3 (2016). DOI: 10.1007/s11094-016-1425-у.
- [5] В. М. Петриев, В. К. Тищенко, Е. Д. Степченкова и др., *Краткие сообщения по физике ФИАН* **46**(2), 31 (2019). DOI: 10.3103/S1068335619100051.
- [6] В. К. Тищенко, В. М. Петриев, А. А. Михайловская и др., *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* **168**(12), 739 (2019).
- [7] В. М. Петриев, В. К. Тищенко, О. А. Сморызанова и др., *Краткие сообщения по физике ФИАН* **46**(2), 31 (2019). DOI: 10.3103/S1068335619020052.
- [8] Y. H. Zhang, J. Bryant, F. L. Kong, et al., *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, ID 232863 (2012). DOI: 10.1155/2012/232863.
- [9] Z. Yang, C. Xiong, R. Zhang, et al., *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2**(4), 499 (2012).

Поступила в редакцию 15 апреля 2020 г.

После доработки 28 мая 2020 г.

Принята к публикации 29 мая 2020 г.