

С.Е. Северин¹, В.Н. Кулаков², Е.Ю. Москалева¹, Е.С. Северин³, И.И. Слободяник², Т.П. Климова²

¹ ГУЗ Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы

² ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА Российской Федерации

³ Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения

Распределение меченного йодом-125 альфа-фетопротейна в организме животных и его накопление в ткани опухоли

При исследовании распределения меченного йодом-125 альфа-фетопротейна человека после его внутривенного введения мышам максимальное накопление альфа-фетопротейна в разных тканях и органах животных наблюдается, как правило, через 5 ч после введения. Затем этот белок постепенно выводится из организма. В печени, кишечнике и крови интактных животных 125I-альфа-фетопротейн сохраняется в течение по крайней мере 3 сут. Накопление альфа-фетопротейна в различных тканях и органах может обуславливать различные биологические эффекты этого белка. В организме мышей с привитой опухолью лимфолейкоза мыши линии P388 зафиксирован высокий уровень накопления альфа-фетопротейна в ткани опухоли, достигающий 6% от введенного количества на 1 г ткани, что позволяет рассматривать меченный радионуклидами альфа-фетопротейн в качестве перспективного медицинского радионуклидного маркера при создании радиодиагностических препаратов для обнаружения злокачественных новообразований.

Ключевые слова: альфа-фетопротейн, 125I-альфа-фетопротейн, распределение в организме, радионуклидный онкомаркер.

Введение

Альфа-фетопротейн (АФП) — хорошо изученный белок из семейства активно исследуемых в настоящее время онкофетальных маркеров [1]. Это гликопротеин, который состоит из 590 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу порядка 68–74 кДа и относится к семейству альбуминов. В молекуле АФП содержится 3–4,3% углеводов, в состав которых входят глюкоза, галактоза, N-ацетилглюкозамин и сиаловая кислота. Полисахаридные остатки связаны с аспарагином в положении 232. АФП обладает способностью связывать эстрогены, полиненасыщенные жирные кислоты, билирубин, ретиноиды и некоторые лекарственные средства [1, 2]. Способность связывать и транспортировать в клетки некоторых типов полиненасыщенные жирные кислоты

и эстрогены может определять иммунорегуляторную активность АФП и его регулирующее действие на рост определенных клеток, включая противоопухолевую активность [2]. Противоопухолевая активность АФП, а также его эстроген-связывающего фрагмента была обнаружена при выполнении ксенотрансплантации модели эстроген-чувствительных опухолей молочной железы человека иммунодефицитным мышам [3]. Помимо этого установлена способность эстроген-связывающего фрагмента АФП ингибировать рост индуцированных действием N-метил-N-нитрозомочевины опухолей молочной железы у мышей [4]. Противоопухолевая активность АФП выявлена и при использовании модели перевиваемой саркомы Плисса, аденокарциномы Эрлиха и карциномы легких Льюиса [2]. В настоящее время АФП применяют для лечения некоторых, в том числе злокачественных, заболеваний [2].

S.E. Severin¹, V.N. Kulakov³, E.Yu. Moskaeva¹, E.S. Severin², I.I. Slobodyanik³, T.P. Klimova³

¹ State Health Institution the Moscow Research Institute of Medical Ecology

² Russian Research Center of Molecular Diagnostics and Treatment

³ Federal Medical Biophysical A.I. Burnasyan's Centre of Federal Biomedical Agency of the Russian Federation

The distribution of iodine-125 labeled alpha-fetoprotein in the animal organism and its accumulation in the tumor

The distribution of iodine-125 labeled human alpha-fetoprotein in mice was studied after its intravenous injection. The maximal accumulation of alpha-fetoprotein in different tissues and organs of animals was observed mainly 5 hours after injection. Then the protein was gradually eliminated from the body. In the liver, intestine and blood of intact animals 125I-alpha-fetoprotein persists for at least three days. Accumulation of alpha-fetoprotein in various tissues and organs may determine the different biological effects of this protein. In the mice with transplanted lymphatic leukemia cells P388 the high level of alpha-fetoprotein accumulation was detected in the tumor tissue, reaching 6% of the injected amount per 1 g of tissue. This allows considering the radionuclide-labeled alpha-fetoprotein as a promising medical radionuclide marker for the radiological detection of malignant tumors.

Key words: alphafetoprotein, 125I-alpha-fetoprotein, distribution in the organism, radionuclide marker, tumor accumulation.

Распределение АФП в организме в значительной мере может определяться его связыванием с рецепторами этого белка и накоплением в клетках-мишенях в результате рецепторопосредованного эндоцитоза. Однако рецептор АФП (РеАФП), помимо моноцитов/макрофагов [5] и быстро пролиферирующих после стимуляции митогенами лимфоцитов [6], до сих пор обнаружен только в эмбриональных и опухолевых клетках различных типов [1, 7, 8]. Эти данные позволили рассматривать РеАФП как универсальный опухолеспецифический антиген [7, 8].

Система АФП–РеАФП в период эмбрионального развития обеспечивает транспорт пластического материала, в первую очередь, жирных кислот в интенсивно пролиферирующие клетки плода по механизму рецепторопосредованного эндоцитоза. Этот же механизм функционирует в опухолевых клетках различных типов [1]. АФП отличается высокой степенью консервативности и незначительными межвидовыми различиями, что позволяет исследовать некоторые свойства АФП человека на экспериментальных животных [1]. Исследование распределения АФП в организме интактных животных и животных с опухолями необходимо для понимания терапевтического и диагностического потенциала этого белка. Имеющиеся литературные данные, полученные на модели рака молочной железы, свидетельствуют о том, что меченный радионуклидами йода ^{125}I - и ^{131}I -АФП способен накапливаться в опухоли [9], что представляет интерес с точки зрения создания радиофармацевтического средства для ранней диагностики опухолей методом радиосцинтиграфии. Однако J. Uriel et al. [9] сообщили об избирательном накоплении меченного АФП в опухолевой ткани экспериментальных животных только в отдаленные сроки — через 5–7 дней после его внутривенного введения. Вопрос же о возможности выявления опухолевых очагов с помощью меченного радионуклидами АФП в более ранние сроки после его введения остается открытым.

Целью исследования было изучение распределения меченого ^{125}I -АФП человека у интактных животных и опухоленосителей в период от нескольких мин до 72 ч после введения меченого препарата.

Материалы и методы

Получение АФП человека. АФП выделяли из ретроплацентарной сыворотки крови человека и характеризовали по электрофоретической подвижности в ПААГ и иммунохимической активности по Манчини с использованием набора фирмы La Roch [10].

Получение меченого ^{125}I АФП. Приготовление ^{125}I -АФП производили по методу Greenwood в нашей модификации [11]. Ампулу с радиоактивным йодом (^{125}I в щелочном растворе без восстановителей, в химической форме йодид, общая радиоактивность 185 МБк) промывали 0,5 мл фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7,2), последовательно, порциями по 0,2, 0,2 и 0,1 мл. Полученный раствор (содержание йодида — 185 МБк) добавляли во флакон с 1 мг АФП и затем в смесь йодида и АФП добавляли раствор, содержащий 100 мкг хлорамина-Б в 0,1 мл PBS. Через 3 с перемешивания в раствор вносили 40 мкл водного раствора с 400 мкг натрия сульфита для остановки реакции. Через 1 мин перемешивания в реакционную смесь вносили 1 мг сывороточного альбумина человека (HSA) в 0,5 мл PBS. Смесь наносили на колонку PD-10 (Pharmacia) с сефадексом G-25 (средний). Фракции, содержащие радиоактивный

белок, объединяли. Очистку от оставшегося несвязанного с АФП радиоактивного йодида осуществляли методом «ловушек», внося в раствор меченого ^{125}I белка анионообменную смолу MSA-1 в Cl^- -форме. Радиохимическую чистоту ^{125}I -АФП определяли посредством электрофореза на бумаге (350 В, 30 мин, фосфатный буферный раствор, pH 8,0).

Подготовка животных. Исследования проводили на мышах-самках линии DBA2 весом 20 г. Первую группу составляли интактные животные, вторую — мыши с привитой в область спины солидной опухолью лимфолейкоза мыши линии P388, которая развивалась после прививки 1×10^6 опухолевых клеток в 0,1 мл физиологического раствора под кожу. Через 2 нед размер опухоли достигал 1,5 см³. Животных содержали в стандартных клетках и кормили гранулированным кормом *ad libitum*.

Проведение фармакокинетических исследований. ^{125}I -АФП вводили животным в водно-солевом растворе, содержащем сывороточный альбумин человека в качестве стабилизатора. Интактным мышам и мышам с имплантированными опухолями вводили внутривенно 0,1 мл раствора препарата ^{125}I -АФП (9 мкг белка). Распределение ^{125}I -АФП по органам и тканям экспериментальных животных исследовали с помощью прямой радиометрии биологических образцов, выделенных из тушек забитых животных в разные сроки после инъекции маркера с помощью пересчетного устройства фирмы Гамма (Венгрия). Измеряли радиоактивность крови, печени, почек, селезенки, легких, головного мозга, желудка с содержимым, кишечника с содержимым, мышц (навеску), бедренной кости (костный мозг), щитовидной железы, содержимого мочевого пузыря (самки с перевязанным мочеиспускательным каналом, до 5 ч), места внутривенного введения (хвост) и опухоли, по 5 животных на каждый срок исследования. Для определения элиминации маркера из организма животных применяли счет всего тела животного. Во избежание артефактов оценивали период времени, когда степень биодеструкции меченого белка не превышала $15 \pm 6\%$. Для этого применяли электрофорез биологических жидкостей, экстрактов из тканей и крови животных на ацетатцеллюлозной пленке Celagram® производства фирмы Shandon (Англия) [11]. За 5 ч образование радиоактивных низкомолекулярных фрагментов из меченого радиоактивным йодом белка и свободного йода не превышает указанного выше предела, что позволяет не вводить специальные поправки на его катаболизм [11]. Материальный баланс подсчитывали, суммируя радиоактивность органов, тканей, хвоста (место введения) и оставшуюся тушку животного. Во всех случаях материальный баланс составлял $95 \pm 10\%$.

Результаты и обсуждение

Раствор ^{125}I -АФП для введения животным имел следующие характеристики: pH 7,2; общая радиоактивность — 79 МБк; удельная радиоактивность — 7,2 МБк/мл, $5,5 \times 10^{-3}$ МБк/мкмоль; концентрация АФП — 91 мкг/мл; концентрация альбумина — 0,2 мг/мл. Радиохимическая чистота препарата ^{125}I -АФП составила 98,5%.

Скорость элиминации ^{125}I -АФП из периферической крови интактных мышей и мышей с привитой опухолью лимфолейкоза P388 была одинаковой (рис. 1А). В то же время, скорость выведения радионуклида с мочой, которую оценивали по радиоактивности содержимого мочевого пузыря через 5 ч после введения ^{125}I -АФП (самкам перевязывали мочеиспус-

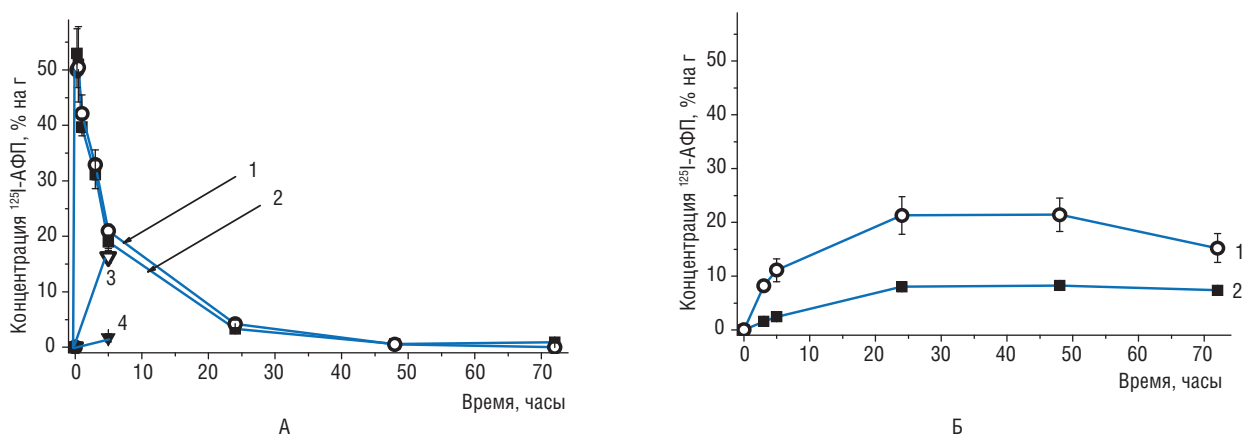


Рис. 1. Кинетика выведения ^{125}I -АФП из периферической крови и его накопление в моче (А, 1, 2 — кровь, 3, 4 — моча) и щитовидной железе (Б) интактных мышей линии *DBA2* (1, 3) и мышей с привитой опухолью лимфолейкоза мыши линии *P388* (2, 4).

тельный канал на 5 ч), у интактных животных оказалась более высокой, чем у мышей с опухолью (см. рис. 1А). Наблюдаемый эффект может свидетельствовать как о более медленном выведении ^{125}I -АФП с мочой, так и о более медленной деградации ^{125}I -АФП у опухоленосителей с последующим высвобождением ^{125}I с мочой. Известно, что свободный йод в организме концентрируется в щитовидной железе. При исследовании накопления ^{125}I в щитовидной железе интактных мышей и мышей с привитой опухолью обнаружено, что максимальное его содержание в обоих случаях достигалось только через 24 ч после введения ^{125}I -АФП (рис. 1Б). Следует подчеркнуть, что такая кинетика накопления ^{125}I в щитовидной железе была отлична от кинетики, наблюдаемой в других органах и тканях (рис. 2А, Б), где максимальное накопление радионуклида регистрировалось уже через 3–5 ч после введения радиоактивно меченного АФП. Полученные результаты позволяют заключить, что у опухоленосителей медленнее происходит и выведение ^{125}I -АФП, о чем свидетельствует более низкое содержание ^{125}I в моче, и деградация ^{125}I -АФП, о чем свидетельствует более медленное накопление ^{125}I в щитовидной железе. Действительно, более низкая концентрация ^{125}I у животных с опухолью наблюдается в этом органе во все сроки исследования, что может определяться накоплением и задержкой ^{125}I -АФП в опухоли.

Характер распределения ^{125}I -АФП в остальных органах интактных мышей и мышей с привитой опухолью был одинаковым и представлен графически только для животных с опухолью (см. рис. 2А, Б). На рис. 2А обобщены данные по содержанию ^{125}I -АФП в костном мозге, селезенке, легких, головном мозге, мышцах и почках, а на рис. 2Б — в желудочно-кишечном тракте и печени в сравнении с его содержанием в опухоли.

Из полученных результатов следует, что накопление ^{125}I -АФП в головном мозге, кровяных (костный мозг) и лимфоидных (селезенка) органах минимально и снижается до нулевых значений уже через 24 ч. В легких зафиксировано высокое накопление ^{125}I -АФП в первые 15 мин, но затем содержание быстро снижается (к 5 ч) и достигает следовых значений уже через 24 ч. В мышцах и почках накопление ^{125}I -АФП происходило постепенно, достигая максимального уровня через 5 ч после введения препарата, и снижалось до нуля к 24 ч.

В печени высокое содержание ^{125}I -АФП обнаруживается уже через 3–15 мин после введения радио-

активного препарата, а затем постепенно снижается и достигает 3–5% от начального через 5 ч, примерно 1% — через 24 ч и сохраняется на уровне 0,6% через 48 и 72 ч. В кишечнике накопление ^{125}I -АФП происходило постепенно, достигая максимального значения только через 3 ч после введения препарата. Затем уровень ^{125}I -АФП в кишечнике незначительно понижался (через 5 ч), далее снижался к 24 ч до 1,4% и сохранялся на уровне 0,5% через 48 и 72 ч. В желудке содержание ^{125}I -АФП достигало максимума (3,2%) через 5 ч после введения препарата, оно понижалось к 24 ч (0,9%) и сохранялось на уровне 0,1% через 48 и 72 ч. Высокое содержание ^{125}I -АФП в этих органах может определяться их интенсивным кровоснабжением при наблюдаемом длительном присутствии введенного АФП в крови, т.к. рецептор АФП в неопухолевых клетках желудка и кишечника при исследовании опухолей этих тканей обнаружен не был [8]. С другой стороны, можно допустить, что часть ^{125}I -АФП выводится с желчью через желудочно-кишечный тракт, что и определяет его длительное присутствие в печени и кишечнике.

В опухоли радиоактивность регистрируют уже через 3 мин после введения ^{125}I -АФП, содержание ^{125}I -АФП достигает максимального значения через 3 ч после введения препарата, а затем незначительно снижается (к 5 ч) и сохраняется на уровне 1,2–0,7% через 24–72 ч, соответственно (см. рис. 2А, Б).

Распределение ^{125}I -АФП в организме животных с привитой опухолью лимфолейкоза мыши линии *P388* характеризуется, таким образом, высоким уровнем накопления АФП в ткани опухоли, достигающем 6% от введенного количества на 1 г ткани, что позволяет говорить о возможности визуализации опухолей методом радиосцинтиграфии при помощи радионуклидных маркеров на основе АФП. Из представленных результатов следует, что через 5 ч после введения ^{125}I -АФП отношение его содержания в опухоли к содержанию в органах для легких, мышц и почек было равно 3, для головного мозга — 5, для селезенки — 13, для желудка — 1,6, и оно еще возрастало до 6–8 через 24–72 ч (рис. 2). В то же время, для кишечника и печени соотношение составляло только 1,0 и 1,5 через 5 ч и 1,0–1,4 через 24–72 ч (соответственно) из-за высокого накопления ^{125}I -АФП в этих органах по сравнению с опухолью (см. рис. 2Б).

Анализ данных отношения радиоактивности пробы опухоли и мышц и пробы опухоли и крови мышей с имплан-

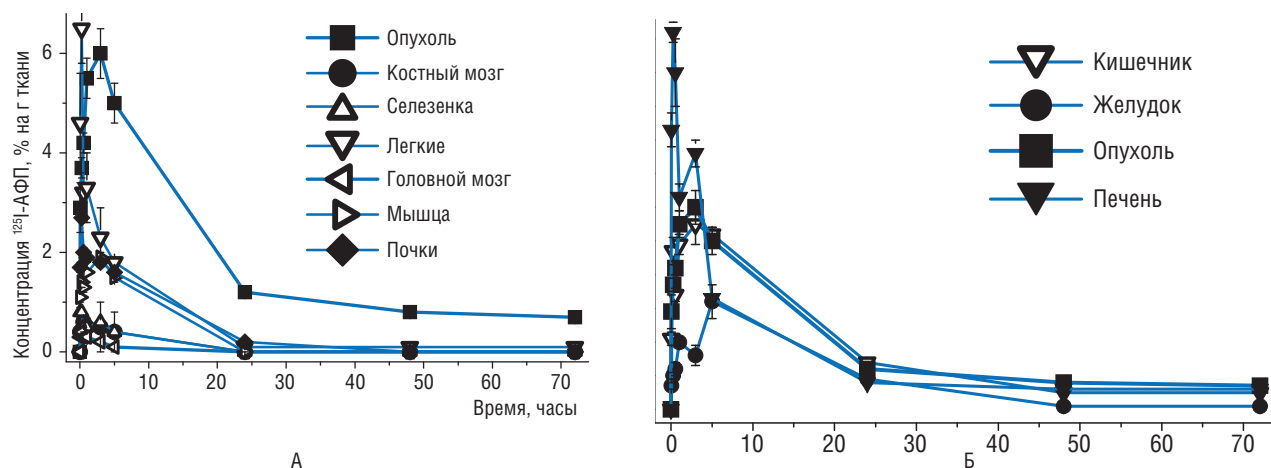


Рис. 2. Фармакокинетика ¹²⁵I-АФП у мышей линии DBA2 с привитой опухолью лимфолейкоза мыши линии P388. Накопление ¹²⁵I-АФП в костном мозге, селезенке, легких, головном мозге, мышцах, почках и опухоли (А) и в кишечнике, желудке, печени и опухоли (Б). Распределение ¹²⁵I-АФП в органах и указанных тканях intactных животных и животных с опухолью в динамике было одинаковым.

14

тированной опухоли в динамике после внутривенного введения ¹²⁵I-АФП также подтверждает накопление радиоактивного маркера в опухоли. Радиоактивность в опухоли уже через 15 мин после введения меченного АФП превышает такую в мышце более чем в 3 раза, что достаточно для хорошей визуализации опухоли. Отношение радиоактивности опухоль/кровь достигает единицы только через 1 сут после введения маркера.

Закономерности накопления радиоактивного АФП в опухоли в поздние сроки (3-и сут) согласуются с литературными данными [9]. В то же время, выявленные особенности фармакокинетики ¹²⁵I-АФП в ранние сроки (до 24 ч после введения ¹²⁵I-АФП) обнаружены впервые и позволяют полагать, что именно период от 5 до 24 ч после введения препарата может оказаться наиболее информативным для визуализации опухолей. Действительно, представленные на рис. 2А данные динамики изменения концентрации ¹²⁵I-АФП в костном мозге, селезенке,

легких, головном мозге, мышцах и почках мышей в сравнении с опухолевой тканью свидетельствуют о высокой избирательности накопления этого препарата в ткани опухоли в период от 3 ч до 3 сут включительно.

Завершая анализ полученных результатов, следует отметить, что максимальное накопление АФП в разных тканях и органах животных наблюдается в основном через 5 ч после введения, а затем этот белок постепенно выводится из организма. При этом обнаружено, что ¹²⁵I-АФП в печени, кишечнике и крови intactных животных сохраняется в организме в течение по крайней мере 3 сут. Установленное накопление АФП в различных тканях и органах через 3–5 ч после введения и его длительное присутствие в организме может определять те биологические эффекты этого белка, которые описаны в литературе [1, 2, 12, 13]. Радиоактивно меченный АФП может быть использован для обнаружения опухолей в период от 5 до 24 и даже до 72 ч после его введения в организм.

REFERENCES

1. Deutsch H.F. Chemistry and biology of alpha-fetoprotein. *Adv. Cancer Res.* 1991; 56: 253–312.
2. Chereshev V.A., Rodionov S.Yu., Cherkasov V.A., Malyutina N.N., Orlov O.A. Al¹²⁵I-fetoprotein. — Ekaterinburg: UrO RAN, 2004. — 376 s.
3. Bennett J.A., Zhu S., Pagano-Mirarchi A., Kellom T.A., Jacobson H.I. Alpha-fetoprotein derived from a human hepatoma prevents growth of estrogen-dependent human breast cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4(11): 2877–2884.
4. Parikh R.R., Gildener-Leapman N., Narendran A. et al. Prevention of N-methyl-N-nitrosourea-induced breast cancer by alpha-fetoprotein (AFP)-derived peptide, a peptide derived from the active site of AFP. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(23): 8512–8520.
5. Suzuki Y., Zeng C.Q., Alpert E. Isolation and partial characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *J. Clin. Invest.* 1992; 90(4): 1530–1536.
6. Torres J.M., Laborda J., Naval J. et al. Expression of alpha-fetoprotein receptors by human T-lymphocytes expressing during blastic transformation. *Molec. Immunol.* 1989; 57(2): 222–228.
7. Moro R., Tamaoki T., Wegmann T.G. et al. Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: The Alpha-Fetoprotein Receptor. *Tumor Biol.* 1993; 14: 116–130.
8. Nitsvetov M.B., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A. i dr. Izuchenie ekspressii retseptora AFP v opukholevykh i normal'nykh tkanyakh cheloveka s pomoshch'yu immunogistokhimicheskogo metoda. *Immunologiya.* 2004; 26(2): 122–125.
9. Uriel J., Villacampa M.J., Moro R. et al. Uptake of radio labeled AFP by mouse mammary carcinomas and its usefulness in tumor scintigraphy. *Cancer Res.* 1984; 44: 5314–5319.
10. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A. et al. In vivo antitumor activity of cytotoxic drugs conjugated with human alpha-fetoprotein. *Tumor Targeting.* 1996; 2: 299–306.
11. Kulakov V.N., v sb. «Organicheskie soedineniya, mechennye radioaktivnymi izotopami». M., TsNIIAtominform, 1982. — Ch. 2. — 75–84 s.
12. Mizejewski G.J., Butterstein G. Survey of functional activities of alpha-fetoprotein derived growth inhibitory peptides: review and prospects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006; 7: 73–100.
13. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. Structural and functional mapping of alpha-fetoprotein. *Biochemistry.* 2006; 71: 120–132.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Северин Сергей Евгеньевич, доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН, генеральный директор ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8 **Тел.:** (499) 613-23-20

E-mail: sergsev@inbox.ru

Москалева Елизавета Юрьевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной биохимии ГУЗ Московский НИИ медицинской экологии Департамента здравоохранения г. Москвы

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8 **Тел.:** 8-916-522-40-54

E-mail: moskalevaey@mail.ru

Северин Евгений Сергеевич, доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН, генеральный директор ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8 **Тел.:** (499) 613-23-51

E-mail: e.severin@mail.ru

Кулаков Виктор Николаевич, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела радиационных технологий Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Адрес: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

Тел.: 8(499) 193-01-86; факс: 8(499) 193-45-73

E-mail: vikov@rambler.ru

Слободяник Илья Игоревич, старший инженер отдела радиационных технологий Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Адрес: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

Тел.: 8(499) 193-01-86; факс: 8(499) 193-45-73

Климова Тамара Петровна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН

Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 28

Тел.: 8(499) 135-92-69

E-mail: tab@ineos.ac.ru