

ZNAČENÍ BUNĚK KOSTNÍ DŘENĚ [¹¹¹IN]INDIUM-TROPOLONÁTEM PRO ÚČELY CELULÁRNÍ TERAPIE U ZVÍŘECÍCH MODELOVÝCH ORGANISMŮ

Jiří Štěpán¹, Josef Skopalík², Martin Pešl³, Peter Scheer⁴, Jiří Prášek¹

¹Klinika nukleární medicíny FN Brno a LF MU

²Interní hematoonkologická klinika FN Brno a LF MU

³I. Interní kardioangiologická klinika FN u sv. Anny v Brně a LF MU

⁴Fyziologický ústav VFU Brno

32. Pracovní dny sekce radiofarmacie, 9. - 11. 6. 2010 - Zlín

Úvod

- Buněčná (celulární) terapie je metoda využívající zavedení nových buněk do poškozené tkáně k léčbě nemoci.
- Jenou z možností je transplantace nediferencovaných kmenových buněk, které mohou diferencovat v jakoukoli tkáň (např. srdeční) a nahradit tak její poškození (např. infarktem myokardu).
- Příkladem často používaných kmenových buněk jsou mezenchymální buňky kostní dřeně (bone marrow mesenchymal cells – BMMCs).
- Přežívání buněk transplantovaných do infarktem poškozeného myokardu je potřeba kvantifikovat.
- Ke sledování viability transplantovaných buněk se využívá jejich radioaktivního nebo neradioaktivního značení.
- K neradioaktivnímu značení pro zobrazení pomocí nukleární magnetické rezonance je možno použít nanočástice superparamagnetického oxidu železa potaženého karboxydextranem.

Úvod

- K radioaktivnímu značení pro zobrazení pomocí gamakamery se využívá lipofilní komplex ^{111}In snadno pronikající buněčnou membránou, např. [^{111}In]indium-tropolonát.
- Experimenty se provádějí na různých zvířecích modelech (psích, prasečích, krysích, králíčích – těm se věnuje naše skupina).

Použité metody

Příprava a kultivace buněk kostní dřeně

VFU

Příprava [^{111}In]indium-tropolonátu

KNM

Radioaktivní značení buněk

KNM

- VFU = Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
- KNM = Klinika nukleární medicíny Fakultní nemocnice Brno a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

Příprava a kultivace buněk kostní dřeně - separace

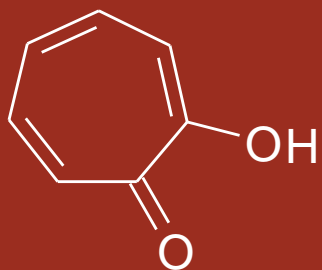
- Odběr buněk pomocí jehly z pánevní kosti pěti králíků (schváleno Etickou komisí VFU Brno)
- Separace mononukleárních buněk z kostní dřeně na hustotním gradientu
 - Zředění kostní dřeně 1 : 1 HBSS (Sigma-Aldrich)
 - Navrstvení směsi do 1 – 2 zkumavek na 5 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich)
 - Centrifugace 20 min při 400 g
 - Odběr prstence mononukleárních buněk, jejich promytí médiem RPMI (Sigma-Aldrich) a následná centrifugace 5 min při 150 g
- HBSS = Hank's Balanced Salt Solution, roztok solí doporučený pro suspendování buněčných kultur
- Histopaque 1077 = roztok polysacharidu (Ficoll 400) a rentgenové kontrastní látky (natrium-amidotrizoát) usnadňující izolaci velkých počtů viabilních lymfocytů
- RPMI = Roswell Park Memorial Institute, růstové médium buněčných kultur

Příprava a kultivace buněk kostní dřeně – prekultivace/kultivace

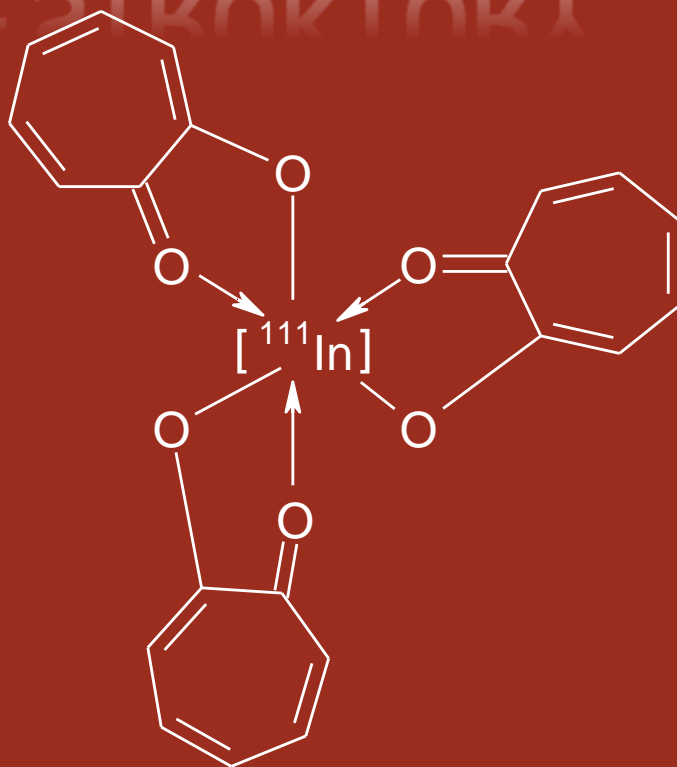
- Paralelní kultivace ve 3 různých kultivačních médiích - IMDM s 10% FSB, IMDM bezsérové, MesenCult (v plastových kultivačních jamkách v inkubačním boxu při 37 °C a 5 % CO₂)
- Po prvních 3 dnech odsátí části neadherovaných buněk a další kultivace jen ke dnu jamky adherovaných mezenchymálních buněk
- Pasážování buněk každý 3 - 5 den po dosažení 60 - 80% konfluence (deadherace, znásobné zředění kultivačním médiem, rozsazení buněk do 3 nových jamek) – 2 způsoby deadherace
 - Prostá resuspendace po dobu 2 min ⇒ buňky **typ1**
 - Trypsinizace (0,25% trypsin, 15 min, 37 °C, promíchat) ⇒ buňky **typ2**
- IMDM = Iscove's Modified Dulbecco's Medium, obohacené syntetické médium vhodné pro rychle proliferující buněčné kultury o vysoké hustotě
- FBS = fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
- MesenCult = ideální médium pro počítání lidských mezenchymálních progenitorových buněk

Příprava [^{111}In]indium-tropolonátu

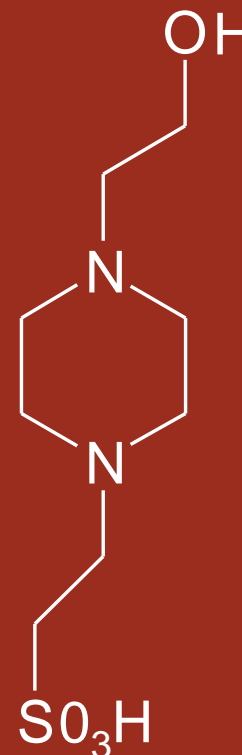
CHEMICKÉ STRUKTURY



tropolon



[^{111}In]indium(III)-tropolonát



HEPES

Příprava [¹¹¹In]indium-tropolonátu

Zásobní roztok tropolonu v solném HEPES pufru

- Tropolon 54 mg (výsledná koncentrace 0,054 % = 4,4 mM)
- Chlorid sodný 804 mg
- HEPES 476 mg
- Voda na injekci do 100 ml
- Upravit pH na 7,6

- Přidání asi 6 MBq [¹¹¹In]Cl₃ v 0,02 – 0,04 M HCl (Covidien, GE Healthcare) o objemu max. 50 µl do 100 µl zásobního roztoku tropolonu, inkubace 5 min při laboratorní teplotě

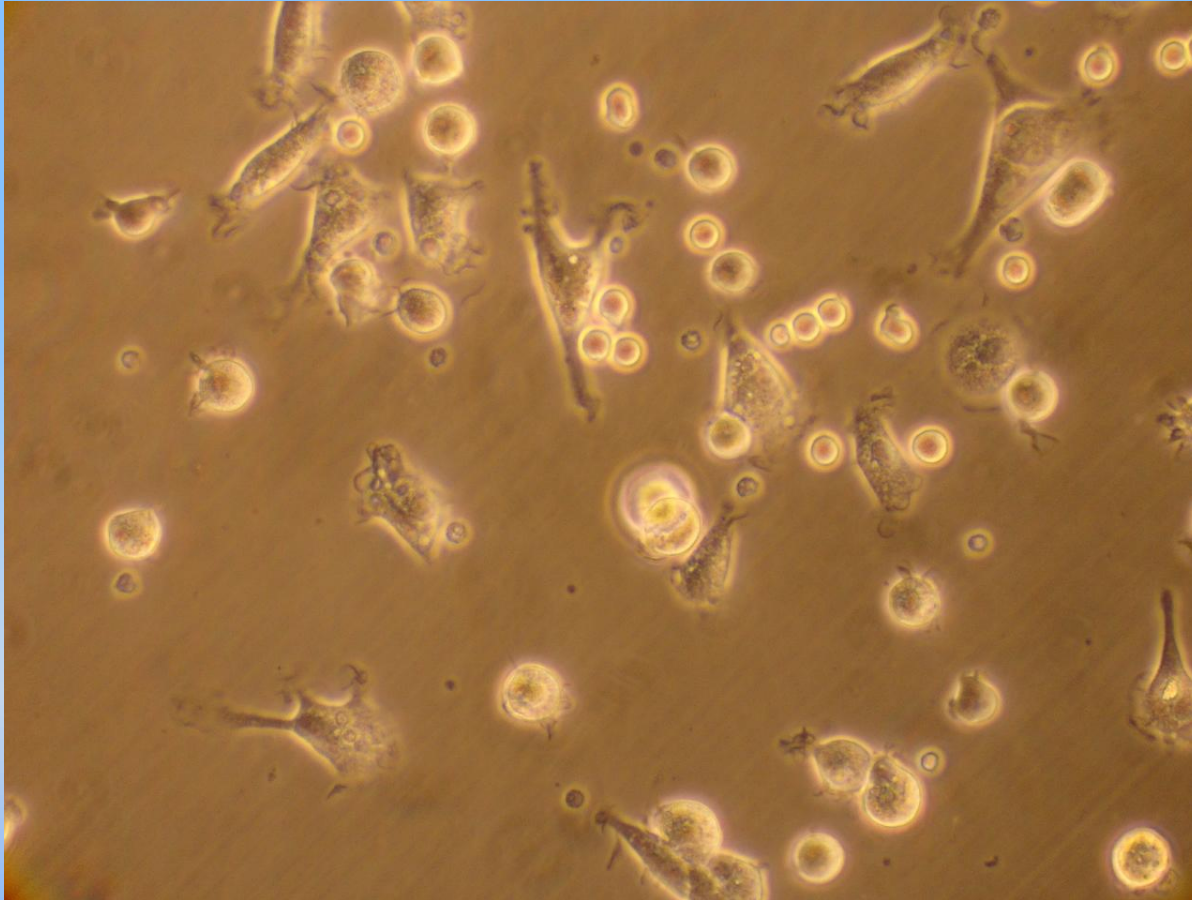
- Ověření radiochemické čistoty vzniklého komplexu [¹¹¹In](trop)₃ chromatografií na ITLC-SG v CH₃OH : CHCl₃ = 1 : 99 (nanáší se 3 - 4 µl vzorku – nechá se 5 min zaschnout, délka dráhy 7 cm, čára stříhu po vyvinutí chromatogramu je 2 cm od startu - toto bylo třeba stanovit, viz výsledky, měření aktivity chromatogramů studnovým scintilačním detektorem NKG 314 (Tesla) připojeným k Laboratorní měřicí soupravě NZO 727-T (Tesla))

Radioaktivní značení buněk a prováděné testy

- Značení mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v 25 μ l média RPMI přidavkem 5 – 10 μ l roztoku [^{111}In](trop) $_3$ s následnou 5 – 15min inkubací – optimální se ukázala 5min inkubace, viz výsledky - dodatková analýza
- Stanovení účinnosti značení buněk centrifugací a následným měřením aktivity buněk a supernatantu, účinnost značení = $A(\text{buňky}) / A(\text{buňky} + \text{supernatant})$
- Výpočet průměrné aktivity v Bq na buňku u zcentrifugovaných označených buněk, počet buněk byl stanoven mikroskopicky pomocí počítačích komůrek, celková aktivita byla stanovena pomocí Bqmetru 4
- Na gamakameře Nucline™ PAC otestováno detekování shluků buněk o aktivitě 25 - 100 kBq umístěných v plastových kapslích ve fantomu králičího hrudníku
- Ve vybraných experimentech sledování viability buněk těsně po označení a po 48 hodinách (část buněk přepipetována do transparentní plastové jamky, buňky 10 min barveny calceinem a následně snímány mikroskopem)
- Dodatková analýza – ověření vlivu doby značení na sledované parametry (účinnost značení, Bq/buňku, viabilita)

Výsledky

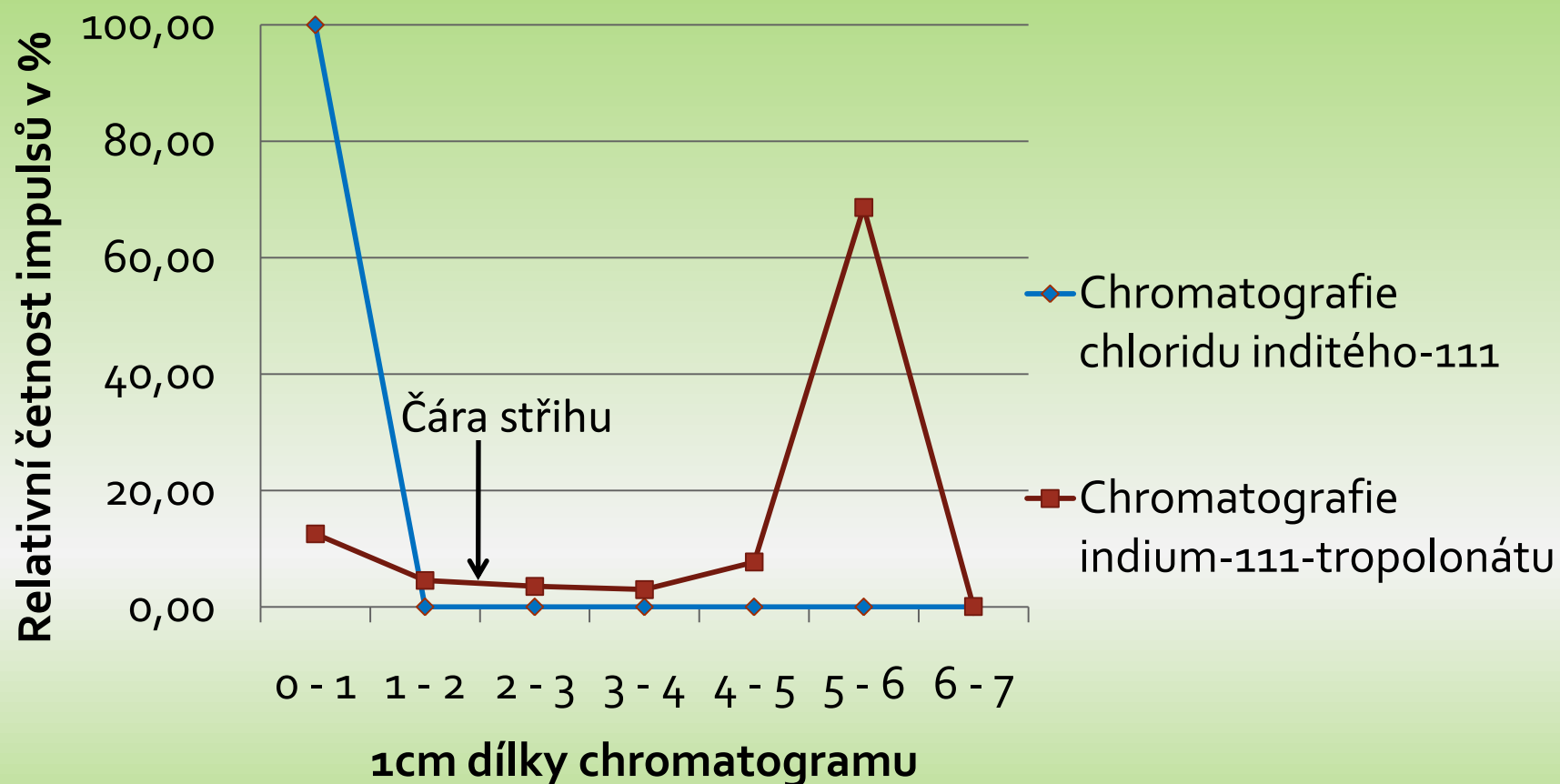
Morfologie buněk MSC přesazených po deadherování do nové jamky



Nejrychlejší růst a nejnižší mortalitu vykazovaly buňky při použití média RPMI s 10% FBS. Pro experimenty bylo dále používáno pouze toto médium.

Výsledky

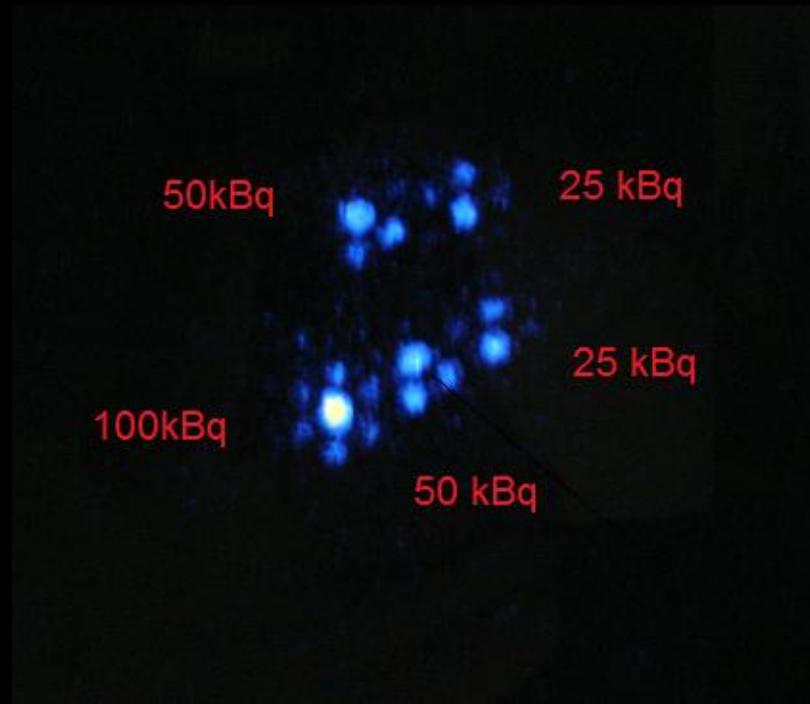
Vývoj chromatografie indium-111-tropolonátu



Stacionární fáze: ITLC-SG, mobilní fáze: $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3 = 1 : 99$ jako u $[\text{}^{68}\text{Ga}](\text{trop})_3$
Nanášení 3 - 4 μl vzorku, 5 min sušit. Požadavek: min. radiochemická čistota 80 %.

Výsledky

Detekovatelnost shluků buněk o aktivitě 25 - 100 kBq umístěných v kapslích o průřezu 5 mm² ve fantomu králičího hrudníku (100 kBq bylo dodatečně přidáno v plastové mikrozkušavce)

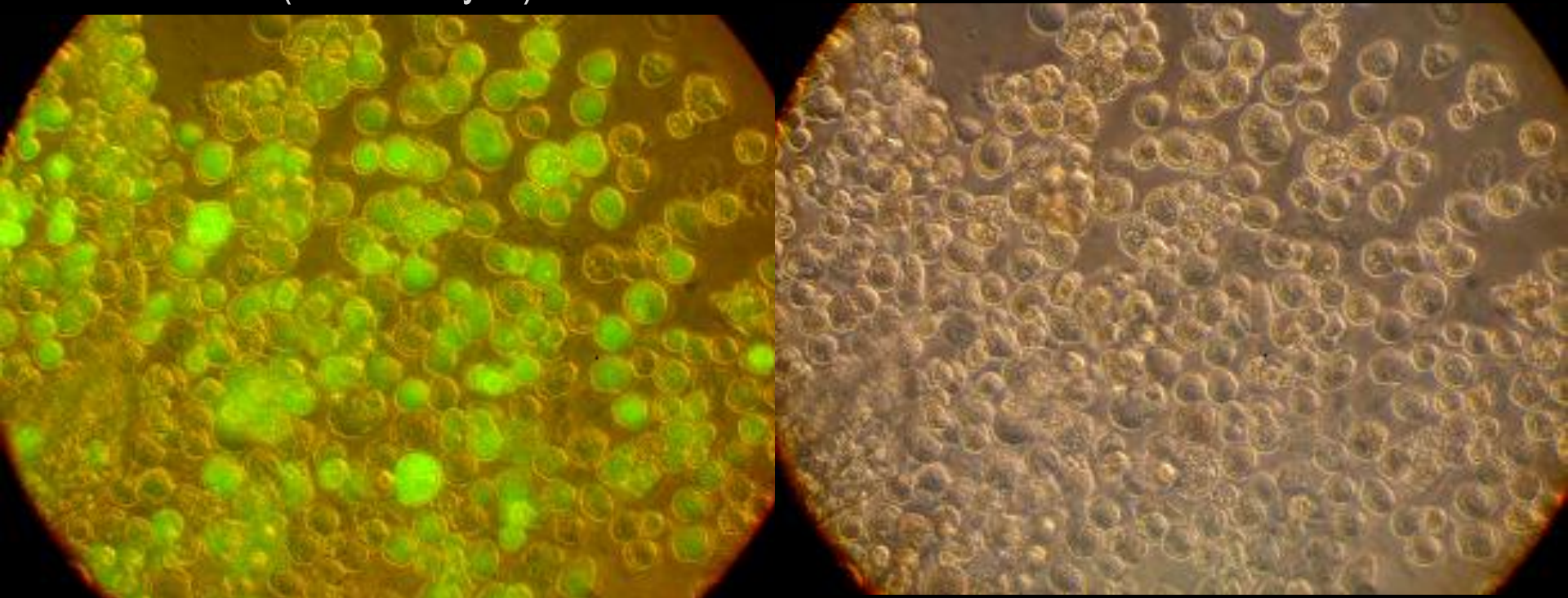


•Snímání gamakamerou Nucline™ PAC: kolimátor ME, matrice 512 × 512, doba snímání 31 min, celkový počet impulzů 41161, velikost pixelu 0,75 × 0,75 mm .

Výsledky

Sledování viability buněk těsně po označení a po 48 hodinách

- viabilita se pohybovala okolo 90 %, což je jen o 2 - 5 % méně než u buněk kontrolních (neznačených)



- Počítání viability buněk krátce po značení $[^{111}\text{In}](\text{trop})_3$ pomoci mikroskopu: vpravo snímek buněk bez zeleného filtru, vlevo s použitím filtru: zeleně obarvené buňky = viabilní.

Výsledky – dodatková analýza

Ověření vlivu doby značení na sledované parametry (účinnost značení, Bq/buňku, viabilita)

Čas inkubace	Objem roztoku $[^{111}\text{In}](\text{trop})_3 = 5 \mu\text{l}$ Naměřená celková aktivita = 265 kBq
5 min	účinnost značení 38 % 1 Bq/buňku viabilita 90 %
15 min	účinnost značení 34% 1 Bq/ buňku viabilita 84 %
30 min	účinnost značení 44% 1 Bq/buňku viabilita 79,2%

Delší čas inkubace: snižuje viabilitu buněk

|| Závěr

Koncentrace buněk

Koncentrace $[^{111}\text{In}](\text{trop})_3$

- její zvýšení vede ke zvýšení účinnosti značení (větší celkový povrch buněk účinněji vychytá $[^{111}\text{In}](\text{trop})_3$ z roztoku)
- její zvýšení prakticky neovlivňuje Bq/buňku (pravděpodobně v důsledku ustavení rovnováhy mezi koncentrací $[^{111}\text{In}](\text{trop})_3$ vně a uvnitř buňky)
- její zvýšení vede ke zvýšení Bq/buňku, ale účinnost značení se prakticky nemění

Diskuse

Obdobné studie využívající [¹¹¹In]indium-tropolonát

	Koncentrace ¹¹¹ In ve značícím roztoku	Doba značení	Účinnost značení	Dosažené Bq/buňku	Viabilita
Bindslev, 2006 (lidské MSC)	15-260 Bq/buňku	10 min	25 %	7,5	čas zdvojení téměř nezměněn (1,3 dne)
Jin, 2005 (psí MSC)				0,14	
Wisenberg, 2009 (psí MSC)				0,9	nezměněna v porovnání s kontrolou
Blackwood, 2009 (psí MSC)		30 min	92 %	0,1	93 % po označení 75 % po 6 dnech

Z tabulky vyplývá, že dosahujeme o něco lepšího označení králičích buněk než obdobné studie využívající jiné zvířecí modely a mírně se lišící metodiky.

Diskuse

- Na použité gamakameře je dobře lokalizovatelných asi 50 kBq soustředěných v oblasti přibližně $0,5 \times 0,5$ cm.
- Při aktivitě buňky kolem 10 Bq by bylo detekovatelných zhruba 5000 buněk koncentrovaných v takto velké oblasti.
- To je zhruba množství, které po injekci mezenchymálních buněk zůstane pevně uchyceno v infarktovém srdci králíka po typickém experimentu s dodáním kmenových buněk.
- Použitá metoda radioaktivního značení MSC se tedy jeví jako nadějná pro lokalizaci a hrubou kvantifikaci buněk, u kterých dojde k zachycení v poškozené tkáni (tzv. homing) myokardu.

Literatura

• BINDSLEV, L., HAACK-SØRENSEN, M., BISGAARD, K., KRAGH, L., MORTENSEN, S., HESSE, B., KJAER, A., and KASTRUP, J. Labelling of human mesenchymal stem cells with indium-111 for SPECT imaging: effect on cell proliferation and differentiation. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, October 2006, vol. 33, no. 10., p. 1171-1177.

• BLACKWOOD, KJ., LEWDEN, B., WELLS, RG., SYKES, J., STODILKA, RZ., WISENBERG, G., and PRATO, FS. In vivo SPECT quantification of transplanted cell survival after engraftment using ¹¹¹In-tropolone in infarcted canine myocardium. *The Journal of Nuclear Medicine*, Jun 2009, vol. 50, no. 6, p. 927-935.

• DANPURE, HJ., OSMAN, S., and BRADY, F. The labelling of blood cells in plasma with ¹¹¹In-tropolonate. *The British Journal of Radiology*, March 1982, vol. 55, no. 651., p. 247-249.

• ELLIS, B. *Radiopharmacy handbook* [online]. 2nd ed. Manchester (GB) : UKRG, 18th April 2002, updated 4 January 2004 [cit. 9. června 2010]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.ukrg.org.uk/rphandbook/radiom.htm>>. ESNB 58691-020402-172725-91.

Literatura

- GHOLAMREZANEZHAD, A., MIRPOUR, S., ARDEKANI, JM., BAGHERI, M., ALIMOGHEDAM, K., YARMAND, S., and MALEKZADEH, R. Cytotoxicity of ^{111}In -oxine on mesenchymal stem cells: a time-dependent adverse effect. *Nuclear Medicine Communications*, March 2009, vol. 30, no. 3, p. 210-216.
- JIN, Y., KONG, H., STODILKA, RZ., WELLS, RG., ZABEL, P., MERRIFIELD, PA., SYKES, J., and PRATO, FS. Determining the minimum number of detectable cardiac-transplanted ^{111}In -tropolone-labelled bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by SPECT. *Physics in Medicine and Biology*, October 2005, vol. 50, no. 19., p. 4445-4455.
- KLABUSAY, M., SKOPALÍK, J. a MELUZÍN, J. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína pro praxi*, 2009, roč. 11, č. 10, s. 452-457.
- SAMPSON, CB. (ed.). *Textbook of radiopharmacy : theory and practice*. 2nd ed. New York : Gordon and Breach Publishers, 1994 (1995 second printing). 360 p. Nuclear medicine - a series of monographs and texts, vol. 3. ISBN 2-88124-973-6.

|| Literatura

• WISENBERG, G., LEKX, K., ZABEL, P., KONG, H., MANN, R., ZEMAN, PR., DATTA, S., CULSHAW, CN., MERRIFIELD, P., BUREAU, Y., WELLS, G., SYKES, J., and PRATO, FS. Cell tracking and therapy evaluation of bone marrow monocytes and stromal cells using SPECT and CMR in a canine model of myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 27 April 2009, vol. 11, article 11.

Dostupné na World Wide Web:

<<http://www.jcmr-online.com/content/11/1/11>>.

• YANO, Y., BUDINGER, TF., EBBE, SN., MATHIS, CA., SINGH, M., BRENNAN, KM., and Moyer BR. Gallium-68 lipophilic complexes for labeling platelets. *The Journal of Nuclear Medicine*, December 1985, vol. 26, no. 12, p. 1429-1437.