

Comparison of *in vitro* and *in vivo* Properties of HYNIC- [β Ala⁷-Tle¹²] Neurotensin (5-13) Labeled with ^{99m}Tc using Two Co-ligand Systems

Iman Emrariani¹,
Nourollah Sadeghzadeh²,
Saeid Abediankenari³,
Seyed Mohammad Abedi⁴

¹ Ph.D. Student in Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Immunogenetics Research Centre, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Radiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 14, 2023; Accepted October 28, 2023)

Abstract

Background and purpose: The selection of co-ligand has a profound effect on the labeling efficiency, biodistribution, and tumor-targeting ability of ^{99m}Tc-labeled HYNIC-conjugated peptides. This study compared the *in-vitro* and *in-vivo* properties from the ^{99m}Tc-labeling of 6-Hydrazinonicotinamide-conjugated neurotensin (HYNIC-[β Ala⁷-Tle¹²] NT (5-13)) by Tricine/EDDA and Tricine as two co-ligand systems.

Materials and methods: After radiolabeling, cellular specific binding, affinity and internalization were evaluated toward the HT-29 cell line, as neurotensin overexpressing cells for both of them. Finally, the biodistribution studies were performed on HT-29 xenografted tumor-bearing nude mice, and the imaging was performed using a gamma camera.

Results: The radiochemical purity of ^{99m}Tc labeled peptide with tricine and tricine/EDDA as co-ligands was found over 95%, and they showed desirable saline and serum stability up to 24 h. The dissociation constant (K_d) value for radiolabeled peptide with tricine and tricine/EDDA toward NT receptors were determined as 50.41 ± 9.76 and 32.66 ± 4.00 , respectively. Internalization of radiolabeled peptide with tricine/EDDA was reported almost 2-fold more than radiolabeled peptide with tricine as co-ligand for HT-29 cell line after 4 h incubation. In biodistribution and imaging, the tumor/muscle activity ratio was 2.30 and 4.20, 1.74 and 2.28 at 2 h post-injection with tricine and tricine/EDDA, respectively.

Conclusion: Despite relatively similar radiochemical properties of both peptide radio-complexes with ^{99m}Tc, the complex labeled with a mixture of tricine/EDDA as co-ligands showed more suitable *in vivo* properties than tricine.

Keywords: HT-29, HYNIC, imaging, neurotensin, ^{99m}Tc, tricine

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 1): 59-76 (Persian).

Corresponding Author: Nourollah Sadeghzadeh- Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: nourollahsadeghzadeh@yahoo.com)

مقایسه خواص برون تنی و درون تنی neurotensin (5-13) $[\beta\text{Ala}^7\text{-Tle}^{12}]$ -HYNIC نشاندار شده با تکنسیوم $^{99\text{m}}$ با استفاده از دو سیستم لیگاند کمکی

ایمان امراریان¹نورالله صادق زاده²سعید عابدیان کناری³سید محمد عابدی⁴

چکیده

سابقه و هدف: انتخاب لیگاند کمکی، تأثیر عمیقی روی کارایی نشان‌دار سازی، توزیع بیولوژیکی و توانایی هدفمند تومور برای پپتیدهای کونزوگه با HYNIC نشان‌دار شده با تکنسیوم $^{99\text{m}}$ دارد. این مطالعه خواص برون تنی و درون تنی neurotensin (5-13) $[\beta\text{Ala}^7\text{-Tle}^{12}]$ -HYNIC نشان‌دار شده با تکنسیوم $^{99\text{m}}$ با استفاده از دو سیستم لیگاند کمکی را مقایسه می‌کند.

مواد و روش‌ها: پس از نشان‌دار سازی، اتصال اختصاصی سلولی، تمایل و ورود سلولی پپتید نشان‌دار شده نسبت به گیرنده‌های نوروتنسنی بر روی رده سلولی HT-29 مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان مطالعات بر روی موش‌های حاوی تومورهای رده سلولی HT-29 انجام شد و تصویربرداری با دوربین گاما از آن‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها: بازده رادیو شیمیایی پپتید نشان‌دار شده با لیگاند کمکی تریسین و EDDA / تریسین بیش از 95 درصد بود و پایداری مطلوبی در محلول و سرم انسانی تا 24 ساعت از خود نشان دادند. ثابت تفکیک پپتید نشان‌دار با تریسین و EDDA / تریسین نسبت به گیرنده‌های نوروتنسنی به ترتیب، $50/41 \pm 9/76$ و $32/66 \pm 4/00$ نانو مولار تعیین شد. تمایل ورود به سلول‌های HT-29 برای پپتید نشان‌دار شده با EDDA / تریسین تقریباً دو برابر با لیگاند کمکی تریسین طی چهار ساعت پس از انکوباسیون گزارش شد. در توزیع زیستی و تصویربرداری نسبت تومور به عضله در دو ساعت پس از تزریق برای پپتید نشان‌دار با تریسین و EDDA / تریسین به ترتیب $2/30$ و $4/20$ ، $1/74$ و $2/28$ ، به دست آمد.

استنتاج: با وجود ویژگی‌های تقریباً مشابه از لحاظ رادیو شیمیایی برای هر دو کمپلکس پپتیدی، پپتیدی نشان‌دار با EDDA / تریسین از لحاظ شرایط درون تنی ویژگی‌های مناسب‌تری نسبت به تریسین نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نوروتنسن، HT-29، تکنسیوم $^{99\text{m}}$ -HYNIC، تریسین، تصویربرداری

مقدمه

رادیو ردیاب‌های جدید جهت کاربرد در بالین باید توانایی هدف‌گیری بالایی را در تومور (نسبت اکتیویته تومور/پس‌زمینه) داشته باشند. توانایی هدف‌گیری بالا در تومور به‌طور مؤثر مزایای زیادی مانند بهبود کیفیت

مؤلف مسئول: نورالله صادق زاده - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیام‌اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: nourollahsadeghzadeh@yahoo.com

1. دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشیار، گروه داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دانشیار، گروه رادیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1402/5/23 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/7/15 تاریخ تصویب: 1402/8/6

تصویبررداری، تعدیل دوز و کاهش هزینه درمان به همراه دارد (1-3). در نتیجه، تلاش‌های زیادی برای افزایش توانایی هدف‌گیری تومور در رادیو رادیاب‌ها انجام شده است (4, 5). از جمله این رادیاب‌ها برای هدف قرار دادن گیرنده‌های سوماتو استاتینی، مشتقات سوماتو استاتین نشان‌دار شده با گالیم-68 و ایندیم-111 برای تصویبررداری پیش از درمان و لوتشم-177 و ایتريوم-90 به‌عنوان رادیو پپتید برای درمان تومورهای نورو اندوکرینی استفاده می‌شوند (1).

برای نشاندارسازی مشتقات نورو تنسین از شلاتورهای مختلفی مثل DTPA، DOTA، MAG₃ و HYNIC هم‌چنین رادیوایزوتوپ‌هایی مثل ¹⁸F، ⁶⁸Ga، ¹¹¹In، ¹²⁵I و ^{99m}Tc استفاده شده است (6-8). در بین این رادیونوکلئیدها، نشان‌دار سازی از طریق تکنسیوم-99m به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب ترجیح داده می‌شود (7, 8). HYNIC (6-هیدرازینونیکوتین آمید) یکی از امیدوارکننده‌ترین عوامل شلات‌کننده برای نشان‌دار سازی با عنصر تکنسیوم می‌باشد (9, 10). از آن‌جایی که HYNIC نمی‌تواند تمام ظرفیت‌های اتم تکنسیوم را کنوردینه کند بنابراین ظرفیت‌های باقیمانده را باید با لیگاندهای کمکی (کولیگاندها) تکمیل کرد. لیگاندهای کمکی که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارت‌اند از: تریس (هیدروکسی متیل) متیل گلاسیسین (تریسین)، اتیلن دی آمین-N، N دی استیک اسید (EDDA). انتخاب لیگاندهای کمکی مختلف یکی از مزایای HYNIC است که امکان تولید پرتوداروهای پایدار با فارماکو کینتیک، توزیع زیستی و در نتیجه توانایی مطلوب هدف‌گیری تومور توسط بیومولکول‌های نشان‌دار با تکنسیوم-99m را فراهم می‌کند. از دیگر مزیت‌های استفاده از HYNIC به‌عنوان شلات‌کننده دو منظوره (BFCA)، روش ساده نشان‌دار کردن، راندمان بالای نشان‌دار سازی با تکنسیوم-99m و پایداری کمپلکس‌های حاصل در داخل بدن است (9, 11-13). برای اتصال HYNIC به بیومولکول‌ها، گروه کربوکسیلیک

اسید مولکول HYNIC را با گروه‌های آمینی موجود در ساختار بیومولکول واکنش می‌دهند. از آن‌جایی که عدد اکسایش تکنسیوم، تعداد لیگاندهای کمکی شرکت‌کننده در کمپلکس، حضور احتمالی لیگاندهای دیگر (لیگاندهای اکسو و هالید) و امکان تشکیل پیوندهای کوئوردینانسی با زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه مشخص نشده است بنابراین ماهیت دقیق کمپلکس‌های HYNIC-^{99m}Tc نامشخص مانده است. با این حال، می‌توان تصور کرد که اتم تکنسیوم از طریق نیتروژن انتهایی گروه هیدرازین به HYNIC متصل می‌شود و سایر جایگاه‌ها توسط یک یا چند کولیگاندها اشغال می‌شوند (14, 15).

بر اساس مطالعات پیشین، انتخاب کولیگاندها تأثیر عمیقی بر کارایی نشان‌دار سازی، توزیع زیستی و هدف‌گیری تومور دارد. هم‌چنین، می‌توان ادعا کرد که هیچ‌یک از لیگاندهای کمکی معمول ایده‌آل نیستند. در میان گزارش‌های متعددی که در مورد بیومولکول‌های کونژوگه با HYNIC نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m منتشر شده است، بیش‌ترین استفاده از لیگاندهای کمکی EDDA/تریسین است (11). مطالعات نشان داده است که ساختار پپتید و شرایط نشان‌دار سازی پپتیدهای کونژوگه با HYNIC نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m توسط تریسین می‌تواند اثر بهتری در کارایی نشان‌دار سازی و هدف‌گیری مطلوب‌تر نسبت به EDDA/تریسین داشته باشد (16-18). عرفانی و همکارانش یک مشتق جدیدی از نورو تنسین را به‌وسیله HYNIC-^{99m}Tc با استفاده از دو سیستم لیگاندهای کمکی تریسین و EDDA/تریسین نشان‌دار سازی کردند. نسبت تومور به عضله برای رادیوپپتید کمپلکس شده با هر دو سیستم لیگاندهای کمکی تقریباً یکسان پس از یک ساعت بود (8, 19). در مطالعات دیگر، مقایسه نتایج جذب توموری و خواص فارماکو کینتیک پپتید کونژوگه با HYNIC نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m توسط تریسین و EDDA/تریسین ضد و نقیض بود (18, 30-28). در این پژوهش یک نورو تنسین کونژوگه شده با HYNIC

جنین گاوی و پنی سیلین/استرپتومايسين از Gibco بود. رده سلولي HT-29 (سرطان کولو رکتال انساني) از بانک سلولي انيستيتو پاستور ايران تهيه شد. سدیم پر تکتنتات از ژنراتور تهيه شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. اکتیویته توسط دوز کالیبراتور مدل Capintec CRC-127R ساخت کشور آمریکا اندازه گیری شد. ارزیابی رادیو شیمیایی با استفاده از TLC توسط دستگاه Lablogic mini-scan TLC scanner ساخت کشور انگلستان و RP-HPLC مدل Knauer ساخت کشور آلمان مجهز به دتکتور Bioscan, INC مدل B-FC-3200 ساخت کشور آمریکا انجام شد. ستون Knauer Earospher 100 250/4.6 5C18 استفاده شد. رادیواکتیویته نمونه‌ها در هر دو آزمایش برون تنی و درون تنی با استفاده از آشکارساز (NaI(Tl) مجهز به سیستم شمارش گاما (دلشید، تهران، ایران) ارزیابی شد. موش‌های برهنه (نود) از مرکز تحقیقاتی پژوهشکده شمال (انیستیتو پاستور آمل) تهيه و در آنجا نگهداری شدند.

جدید (5-13) neurotensin-[βAla⁷-Tle¹²] HYNIC معرفی و با تکنسیوم-99m در حضور لیگاند کمکی EDDA/تریسین برای تصویربرداری از سرطان کولون (HT-29)، بیان‌کننده بالای گیرنده نوروتنسن (نشانداری شد (7)). همانند مشتقات نوروتنسن نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m، رادیو پپتید جدید میل ترکیبی مطلوبی برای گیرنده نوروتنسن و توانایی مناسبی جهت هدف‌گیری تومور از خود نشان داد (7). در این مرحله به منظور بهبود جذب تومور و خواص فارماکوکنتیک، آزمایش‌های برون تنی و درون تنی (5-13) neurotensin-[βAla⁷-Tle¹²] نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m در حضور لیگاند کمکی تریسین (از قبیل نشان‌داری، مطالعه پایداری در سرم انسانی، ارزیابی اتصال اختصاصی نسبت به گیرنده‌های نوروتنسن در محیط کشت سلولی و میزان ورود آن به سلول در نهایت مطالعه توزیع بیولوژیکی در موش توموری) ارائه شد. نتایج با نتایجی که پیش‌تر منتشر شده است (7) مقایسه گردید.

Error! Objects cannot be created from editing field codes.

تصویر شماره 1: ساختار مشتق جدید نوروتنسن کونژوگه با (Ac-Lys (HYNIC)-Pro-βAla-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle- HYNIC leu-COOH)

عملیات نشان‌داری سازی مشتق طراحی شده از نوروتنسن (5-13) با لیگاند کمکی تریسین

در این مطالعه و مطالعه قبلی (7) برای رسیدن به بهترین شرایط نشان‌داری پارامترهایی از قبیل دما، زمان، pH و واکنش، مقدار تریسین و EDDA به‌طور مستقل تغییر یافت. درصد خلوص رادیو شیمیایی و پایداری واکنش‌ها توسط نوارهای سیلیکاژل و دستگاه TLC Scanner به‌طور همسان بررسی شد. از میان واکنش‌ها

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه

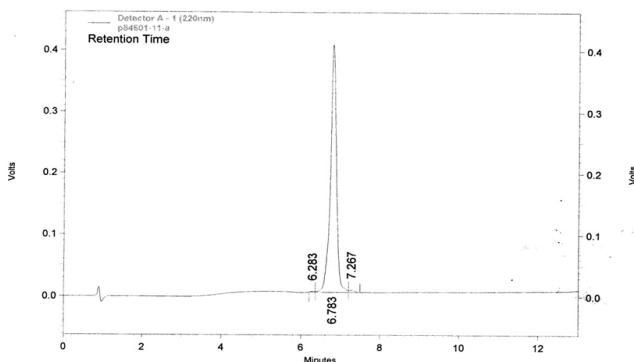
کونژوگه پپتیدی با HYNIC طراحی شده (تصویر شماره 1)، توسط شرکت Peptron در کشور کره سنتز شد و به‌وسیله RP-HPLC و طیف‌سنجی جرمی با خلوص بالای 95 درصد شناسایی و تأیید شد (نمودار شماره 1 و 2).

مواد شیمیایی شامل تریسین، اتیلن دی آمینودی استیک اسید (EDDA)، تری فلونورواستیک اسید از شرکت Fluka و 2-بوتانول، سدیم سیترات، آمونیوم استات، متانول، استونیتریل و کلروقلع از شرکت Merk تهیه شد. محیط کشت سلولی، RPMI1640 با 10 درصد سرم

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP1

Area % Report

Method Name: C:\CLASS-VP\Methods\ss520.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\2014\p84601-11-a
 User: System
 Acquired: 2014-10-31 오전 8:54:54
 Printed: 2014-10-31 오전 9:12:39



PK #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.283	5934	0.138	920	0.226
2	6.783	4254637	99.153	402396	98.868
3	7.267	30392	0.708	3689	0.906
Totals		4290963	100.000	407005	100.000

نمودار شماره 1: آنالیز HPLC مشتق جدید نوروتنسن کونزوگه با HYNIC

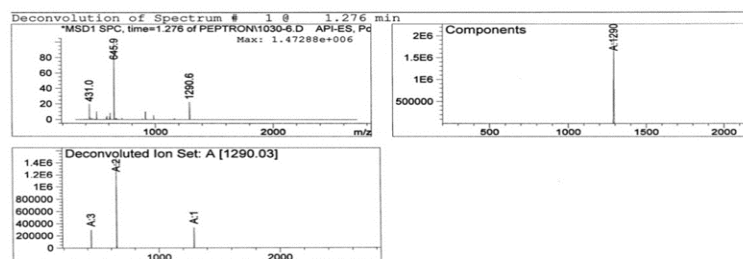
```

-----
Injection Date : 10/30/2014 4:40:12 PM      Location : FIA
Sample Name   :                               Inj Volume : 7 µl
Acq. Operator :                               Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_LC.M  Last changed   : 10/30/2014 4:38:47 PM
                                                    (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_LC.M  Last changed   : 10/30/2014 4:56:25 PM
                                                    (modified after loading)
Flow Injections :
  Inj. InjTime Location FIA Sample Name Fragmentor
      [min]          [V]
-----
1 0.000 Vial 11 P87501-11 120
2 1.105 Vial 12 P84601-11-1 100
3 2.118 Vial 13 P87807-11 120
4 3.134 Vial 14 P91301-11-1 120
5 4.150 Vial 15 P87803-11 120
6 5.163 Vial 16 P87707-11 120
7 6.176 Vial 17 P90003-11 120
8 7.190 Vial 18 P90301 120
9 8.201 Vial 19
  
```

Deconvolution Parameters

```

-----
Adduct Ion(Positive): +H, 1.0079 Da
Adduct Ion(Negative): -H, -1.0079 Da
Low MW: 200
High MW: 2200
Maximum Charge: 50
Minimum Peaks in Set: 3
Retain Residual: No
Ion FWHM: 0.6 Da
MW Agreement: 0.05 %
Noise Cutoff: 1000 counts
Abundance Cutoff: 10 %
MW Assign: Curve fit
MW Assign Cutoff: 40 %
Envelope Cutoff: 50 %
  
```



نمودار شماره 2: طیف MS مشتق جدید نوروتنسن کونزوگه با HYNIC

با شرایط متفاوت نشان‌دارسازی، تنها واکنشی که بالاترین درصد خلوص و پایداری را داشت استفاده گردید که شرایط واکنش به شرح زیر است:

نخست داخل میکرو تیوپ 20 میلی گرم تریسین توزین و نیم میلی لیتر نرمال سالین (که 15 دقیقه به آن گاز ازت دمیده شده بود) اضافه گردید تا حل شود. سپس 25 میکرو گرم پپتید از محلول استوک (یک میلی گرم در یک میلی لیتر در آب دیو نیزه) به ویال حاوی تریسین اضافه شد. سپس 40 میکرو گرم قلع (II) کلرید که در اسید کلریک 0/1 مولار حل شده بود و 10 دقیقه توسط گاز ازت دمیده شده به ویال واکنش اضافه شد. در پایان pH واکنش کنترل بین چهار تا پنج قرار گرفت و بسیار سریع پنج تا 10 میلی کوری سدیم پرتکتات -99m در حجم 100 میکرو لیتر زیر هود و تحت شرایط ایمنی و پشت شیشه سربی به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت 15 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی گراد در حمام خشک قرار گرفت.

عملیات نشان‌دارسازی مشتق طراحی شده از نوروتنسنین (5-13) با لیگاند کمکی EDDA/تریسین (7)

نخست داخل میکرو تیوپ 15 میلی گرم تریسین و پنج میلی گرم EDDA توزین و نیم میلی لیتر نرمال سالین که به مدت 15 دقیقه توسط گاز ازت دمیده شده بود به آن اضافه شد تا حل شود. سپس 25 میکرو گرم پپتید از محلول استوک به ویال حاوی تریسین و EDDA اضافه شد. سپس 40 میکرو گرم قلع (II) کلرید که در اسید کلریک 0/1 مولار حل شد و 10 دقیقه توسط گاز ازت دمیده شده به ویال واکنش اضافه شد. در پایان به سرعت پنج تا 10 میلی کوری سدیم پرتکتات -99m در حجم 50 میکرو لیتر زیر هود و تحت شرایط ایمنی و پشت شیشه سربی به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد در حمام خشک قرار گرفت. قابل ذکر است که pH نهایی مخلوط واکنش کنترل و تقریباً خنثی بود.

کنترل کیفی و بررسی پایداری کمپلکس‌های تهیه شده از مشتق نوروتنسنین با تکنسیوم -99m

برای تعیین بازده واکنش و خلوص رادیو شیمیایی محصول به روش TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) از کاغذ سیلیکاژل به ابعاد 10×1 سانتی متر استفاده شد. هم چنین برای تأیید نتایج به دست آمده، خلوص رادیو پپتید سنتز شده با HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

به مخلوط واکنش پس از پایان واکنش برای انجام آنالیز اجازه داده می شد تا سرد شود. نوارهای سیلیکاژل پیش از لکه گذاری داخل آون خشک می شدند. حجم لکه گذاری دو میکرو لیتر در ابتدای یک سانتی متری نوارهای سیلیکاژل بود. نوارها پس از بالا آمدن حلال نیز خشک می شدند. حجم تزریق توسط سرنگ هاملتون به ستون کروماتوگرافی 10 میکرو لیتر بود. ستون کروماتوگرافی پیش از تزریق توسط متانول شستشو داده می شد.

در روش TLC از حلال متیل اتیل کتون برای تعیین مقدار سدیم پرتکتات آزاد استفاده شد. در هنگام استفاده از این فاز متحرک، پیک مربوط به پپتید نشان‌دار به همراه تکنسیوم هیدرولیز و احیاشده و کمپلکس تکنسیوم -99m همراه لیگاند (های) کمکی (در صورت وجود) در R_f صفر و پیک مربوط به سدیم پرتکتات آزاد در جلوی مسیر حرکت فاز متحرک مشاهده می شود. برای تشخیص میزان تکنسیوم هیدرولیز و احیاشده از مخلوط استونیتریل: آب (1:1) استفاده شد و با استفاده از آن، پیک مربوط به تکنسیوم هیدرولیز شده در مبدأ حرکت و پپتید نشان‌دار به همراه تکنسیوم -99m آزاد و کمپلکس تکنسیوم -99m همراه لیگاند (های) کمکی به سمت جلو حرکت می کنند. مخلوط متانول: آمونیوم استات یک مولار (1:1) نیز در جداسازی مانند مخلوط استونیتریل: آب (1:1) عمل می کند. هم چنین برای تشخیص میزان تکنسیوم -99m همراه لیگاند (های) کمکی از محلول بافر سیترات با pH

سپس محلول رویی از میکروفیلتر 0/22 میکرومتر عبور داده شد و پایداری توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی گردید. برای بررسی اتصال پروتئینی رسوب حاصل از هر نمونه توسط دستگاه گاما کانتر کانت شد. درصد اتصال پپتیدهای نشاندار به پروتئین‌های سرم توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مقدار اکتیویته رسوب} = \text{درصد اتصال} \times 100 \text{ (مجموع اکتیویته رسوب و محلول فوقانی) /}$$

بررسی لیوفیلیسیته یا اندازه‌گیری LogP

در این روش به 1000 میکرولیتر از مخلوط 1:1 از نرمال-اکتانول و آب، 50 میکرولیتر رادیو پپتید تهیه شده (تقریباً پنج میلی کوری) اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه به شدت با شیکر مخلوط شد، سپس پنج دقیقه با سرعت 3000 سانتریفیوژ گردید تا دو فاز به طور کامل از یکدیگر جدا شوند. از هر دو فاز آلی و آبی سه مرتبه، 100 میکرولیتر نمونه برداری شد و اکتیویته هر نمونه توسط دستگاه گاما کانتر خوانده شد. میانگین اکتیویته لایه‌های آبی و آلی برای محاسبه Log P استفاده شد. Log P به صورت زیر محاسبه می‌گردد:

$$\text{نرمال-اکتانول} \text{ Log P} = \text{Log} \text{ (میزان اکتیویته ی لایه ی آبی / میزان اکتیویته لایه ی نرمال-اکتانول)}$$

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پپتید نشاندار برای ورود به سلول

برای انجام آزمایش، سلول‌ها بیان‌کننده بالای رسپتور نوروتنسنین (HT-29) به‌اندازه کافی در محیط کشت RPMI1640 که با 10 درصد سرم جنین گاوی و 1 تا 5 درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین (v/v) کامل شده بودند، تکثیر شدند. سلول‌ها توسط لام نئوبار زیر میکروسکوپ شمارش شدند و در داخل هر چاهک از یک پلیت شش خانه، یک میلیون سلول در چهار میلی‌لیتر محیط کشت کامل کاشته شد. پلیت‌ها به مدت یک شبانه‌روز در انکوباتور 37 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. در روز آزمایش، پلیت‌ها از انکوباتور خارج

برابر پنج استفاده شد و با استفاده از آن، پیک مربوط به تکنسیوم هیدرولیز شده، پپتید نشان‌دار در مبدأ و پیک مربوط به سدیم پرتکتات آزاد و کمپلکس تکنسیوم-99m همراه لیگاند (های) کمکی به سمت جلو حرکت می‌کنند. در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از فازهای متحرک زیر استفاده شد:

الف) محلول 0/1 درصد از اسید تری فلئورو استیک در آب دیونیزه (A)

ب) محلول 0/1 درصد از اسید تری فلئورو استیک در استونیتریل (B)

برنامه شویش به شکل زیر بود: از شروع شویش ستون به مدت 20 دقیقه درصد حلال A از 95 به 30 و درصد حلال B از 5 به 70 رسید و درصد این دو حلال تا 10 دقیقه (پایان 30 دقیقه) ادامه یافت. باید گفت که شویش ستون به صورت گرادینت با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پایداری این پپتید نشان‌دار شده در حلال نرمال سالین و در سرم انسانی مورد بررسی قرار گرفت. پایداری در نرمال سالین، در زمان‌های 1، 4 و 24 ساعت بررسی شد و در هر ساعت نیز سه بار توسط نوارسیلیکاژل مورد بررسی قرار گرفت. این پایداری نیز توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا پس از 24 ساعت بررسی گردید. لازم به ذکر است برای تهیه سرم انسانی پس از خون‌گیری، نمونه خونی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه (1500 g) سانتریفیوژ شد و سپس سرم که به صورت محلول رویی از رسوب جدا شده بود جمع‌آوری گردید. برای پایداری در سرم انسانی، 10 میکرولیتر از نمونه با 90 میکرولیتر از سرم انسانی که از خون تازه گرفته شده تهیه شده بود، مخلوط گردید و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در زمان‌های 1، 4 و 24 ساعت، با 200 میکرولیتر اتانول خالص مخلوط شد و با سرعت 3000 در دمای چهار درجه به مدت هفت دقیقه سانتریفیوژ گردید تا رسوب حاصل شده ته‌نشین شود.

سلول‌های HT-29 به مدت یک شبانه‌روز در بشقابک‌های شش‌خانه (نه بشقابک) تثبیت شدند به صورتی که در هر بشقابک حدود یک میلیون سلول قرار گرفت و هر بشقابک برای یک غلظت اختصاص داده شد. پس از تقریباً 24 ساعت انکوباسیون سلول‌ها، محیط کشت‌های فوقانی در هر بشقابک تخلیه شده و با استفاده از محیط کشت ناقص، دو بار شستشو انجام شد. سپس به هر چاهک یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی 1 درصد سرم جنین گاوی اضافه شد و دوباره داخل انکوباتور قرار گرفت. به مدت یک ساعت مانند قبل در CO₂ انکوباتور و در دمای 37°C انکوبه شدند. برای تعیین اتصال غیراختصاصی، پس از گذشت زمان موردنظر تمامی بشقابک‌ها خارج و به سه چاهک از هر بشقابک 10 میکرومول پپتید سرد اضافه شد. پس از گذشت 30 دقیقه، به هر بشقابک که برای یک غلظت اختصاص داده شده بود مقدار معینی از پپتید نشان‌دار اضافه شد که در حجم نهایی غلظت معلوم به دست آید. (با توجه اینکه حجم نهایی همه چاهک‌ها یکسان بودند). غلظت‌ها 0/2، 0/4، 0/8، 1/6، 5، 10، 50 و 100 نانومولار بودند. پس از افزایش محلول‌ها، بشقابک‌های سلولی به مدت دو ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. با پایان یافتن زمان انکوباسیون، محیط‌های بالایی تمامی بشقابک‌ها تخلیه شده، به‌طور جداگانه در لوله‌های گاما کانتر جمع‌آوری شده و سپس سلول‌ها با استفاده از یک میلی‌لیتر PBS سرد دو بار شستشو داده شدند. در پایان، پس از لیز سلولی با محلول سود یک نرمال، محتویات هر بشقابک به لوله گاما کانتر منتقل شد. میزان اکتیویته آن‌ها توسط دستگاه گاما کانتر شمارش گردید. جهت محاسبه ثابت تفکیک رادیوپپتیدها به HT-29 از نرم‌افزار پریسم استفاده شد.

بررسی توزیع زیستی پپتید نشان‌دار در موش حامل تومور HT-29

موش‌های نود مورد استفاده ماده از نوع CD-1 بوده و در هنگام استفاده وزنی برابر 20-25 گرم داشتند. برای

و محیط کشت رویی آن‌ها تخلیه شد و هر چاهک دو بار با محیط کشت ناقص شستشو داده شد. سه خانه بالای هر پلیت به خانه‌های بلوک اختصاص داده شد و مقدار 25 نانومول از پپتید غیرنشان‌دار در حجم 500 میکرولیتر محیط کشت (غنی شده با یک درصد FBS) به آن‌ها اضافه شد. به سه چاهک باقی‌مانده که مربوط به خانه‌های غیربلوک است 500 میکرولیتر محیط کشت (غنی شده با یک درصد FBS) برای ایجاد شرایط محیطی یکسان اضافه و پلیت‌ها برای نیم ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شدند. پس از نیم ساعت به تمامی شش چاهک 500 میکرولیتر محیط کشت که حاوی 25 پیکومول از پپتید نشان‌دار بود اضافه گردید و پلیت‌ها برای زمان‌های 0/5، 1، 2 و 4 ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباتور خارج و سپس محیط کشت رویی برداشته شد و هر خانه دو بار با بافر فسفات سرد (PBS) شسته شده و در لوله‌های مربوطه، برای تعیین رادیوپپتیدهای متصل نشده جمع‌آوری شد. برای تعیین اتصال اختصاصی رادیوپپتیدها به گیرنده‌های سطح سلول، پلیت‌ها روی ظرف یخ قرار گرفته و سلول‌ها دو بار، هر بار به مدت 10 دقیقه، با بافر گلیسین با pH=2.8 شسته شدند و درون لوله‌های مربوطه جمع‌آوری شدند. در پایان برای تعیین میزان ورود رادیوپپتیدها به درون سلول، از محلول یک مولار NaOH جهت لیز سلول استفاده شد. سلول‌ها با افزایش یک میلی‌لیتر محلول سود یک مولار به هر خانه و 30 دقیقه قرار گرفتن در انکوباتور لیز و به صورت جداگانه داخل لوله‌های مجزا جمع‌آوری شدند. در پایان کار میزان فعالیت پرتویی لوله‌های مربوطه با استفاده از دستگاه شمارش گر گاما اندازه‌گیری شد.

تعیین ثابت تفکیک (K_d) پپتید نشان‌دار

به منظور بررسی قدرت و تمایل اتصال به گیرنده‌های نوروتنسنینی از روش اتصال اشباع (Saturation binding assay) استفاده شد. بدین منظور

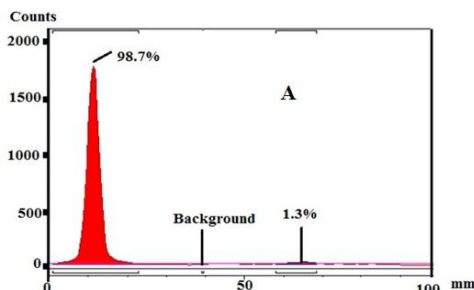
دم به آن‌ها پپتیدهای نشان‌دار تزریق شد. پس از گذشت دو ساعت از تزریق، موش‌ها با کتامین/زایلازین بی‌هوش شدند و تصویربرداری از آن‌ها صورت گرفت.

روش‌های آماری

برای محاسبه تجزیه و تحلیل آماری از آزمون تی دو مستقل استفاده شد. اگر مقادیر $P < 0/05$ ، آزمون‌ها معنی‌دار در نظر گرفته می‌شدند.

یافته‌ها

کنترل کیفی و بررسی پایداری کمپلکس‌های تهیه شده از مشتق نوروتنسن با تکنسیوم 99m نتایج حاصل از رادیو کروماتوگرام‌های روبشگر هسته‌ای TLC مربوط به هر دو روش نشان‌داری، بازده رادیو شیمیایی بالاتر از 95 درصد را نشان دادند. ناخالصی موجود در واکنش مربوط به تکنسیم احیا و هیدرولیز شده (RHT) است که کم‌تر از یک درصد بود (نمودار شماره 3 و 4). خلوص رادیو شیمیایی توسط رادیو کروماتوگرام‌های HPLC نیز تأیید شد (نمودار شماره 5). پایداری در نرمال سالین برای پپتید نشان‌دار با لیگاند کمکی تریسین و EDDA/تریسین توسط نوارهای سیلیکاژل در زمان‌های 1، 4 و 24 ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تریسین به ترتیب بازده نشان‌داری در زمان‌های 1، 4 و 24 ساعت به‌طور تقریبی برابر با 95، 91 و 83 درصد، برای EDDA/تریسین برابر با 99، 97 و 96 درصد نشان داد (نمودار شماره 6).

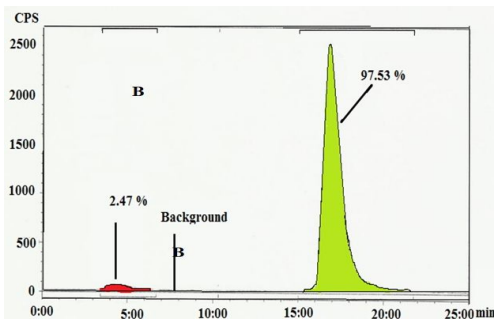
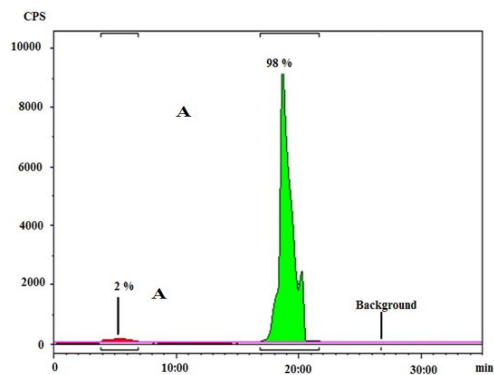


تصویربرداری

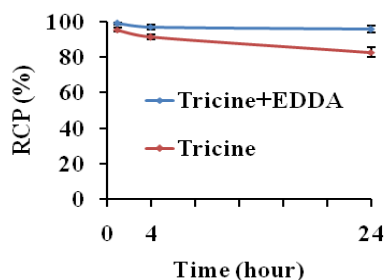
در تصویربرداری توسط دوربین‌های گاما با مشخصات (E-cam, Dual Head, Siemens)، موش‌های نودی که از پیش توسط ده میلیون سلول HT-29 در قسمت پای راستشان توموری شده بودند، از طریق ورید

تلقیح تومور HT-29 در موش، 107 سلول در محیط کشت کامل به‌صورت زیرجلدی و از ناحیه پشت پای راست حیوان تزریق شد. پس از گذشت 10 تا 14 روز اندازه تومورها به حدود 0/7-0/8 سانتی‌متر مکعب رسید، توزیع زیستی ترکیب‌های نشان‌دار در موش‌های توموری مورد بررسی قرار گرفت. نخست با استفاده از سرنگ‌های انسولین 100 میکرولیتر (دو نانومول، یک میلی کوری) محصول واکنش نشان‌داری از طریق ورید دم به موش تزریق شد. نیم ساعت پیش از تزریق پپتیدهای نشان‌داری شده به منظور انجام آزمایش بلاکینگ در شرایط درون تنی، به میزان 200 برابر از پپتید سرد از طریق دم به موش‌های در نظر گرفته شده برای این آزمون (سه موش برای هر ساعت)، تزریق شد. با گذشت دو و چهار ساعت (بلاک و غیر بلاک)، دوز کشنده‌ای از محلول کتامین/زایلازین و از طریق داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. کشتن موش‌ها پس از بی‌هوشی کامل و با کشیدن مستقیم خون از قلب انجام گرفت. کشیدن خون با استفاده از سرنگ‌هایی که قبلاً هپارینه شده بودند انجام پذیرفت و سپس اعضا و جوارحی همچون خون، ریه، غدد بزاقی، طحال، معده، روده، ماهیچه، استخوان، کلیه، کبد و تومور از اجساد موش‌ها جمع‌آوری و پس از انتقال به تیوب‌های گاما کانتینر وزن و اکتیویته آن‌ها شمارش گردید. میزان دریافت اکتیویته در هر ارگان به‌صورت درصد دوز تزریقی بر وزن هر ارگان محاسبه شد. نتایج گزارش شده توزیع بیولوژیکی در هر ارگان، میانگینی از مقادیر مشاهده شده مربوط به سه موش بود که به همراه انحراف استاندارد محاسبه گردید.

EDDA/تریسین در حلال (A): متیل اتیل کتون، B: بافر سیترات، C: آمونیوم استات: متانل)

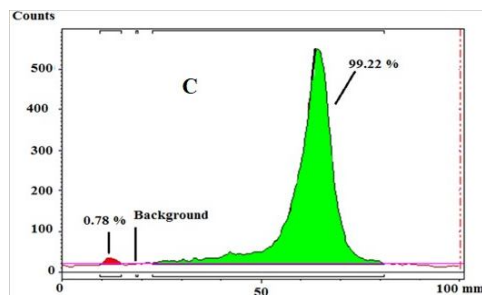
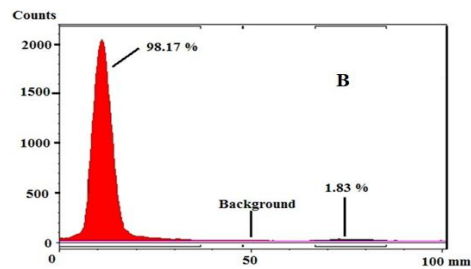


نمودار شماره 5: کروماتوگرام مایع با عملکرد بالا (HPLC) رادیوپپتید با A: تریسین، B: EDDA/تریسین

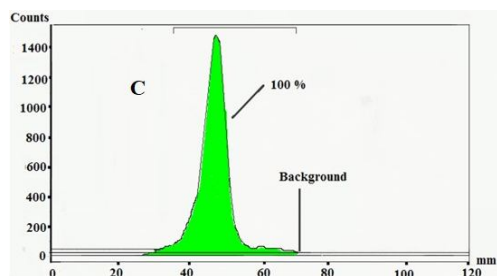
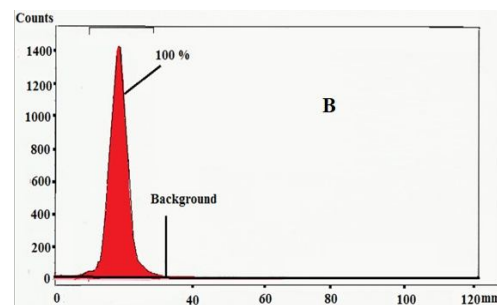
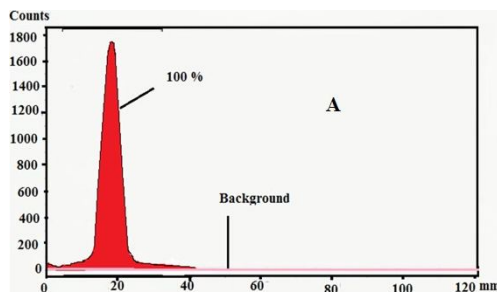


نمودار شماره 6: پایداری پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/تریسین در محلول و دمای اتاق

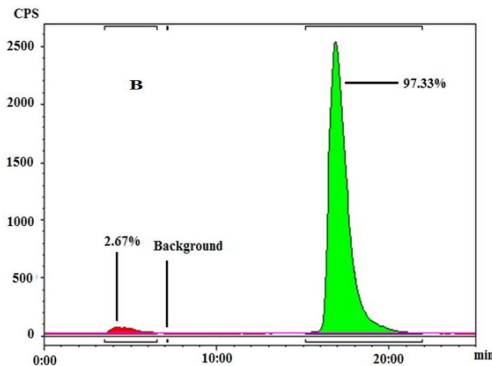
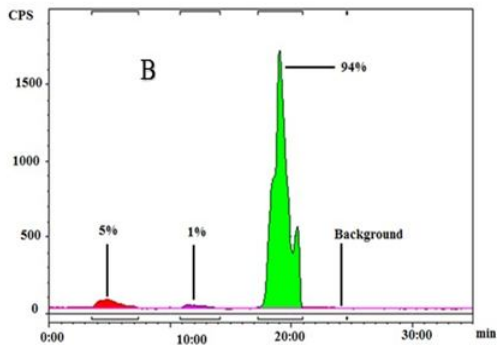
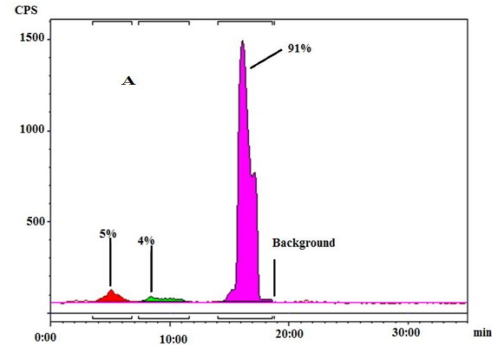
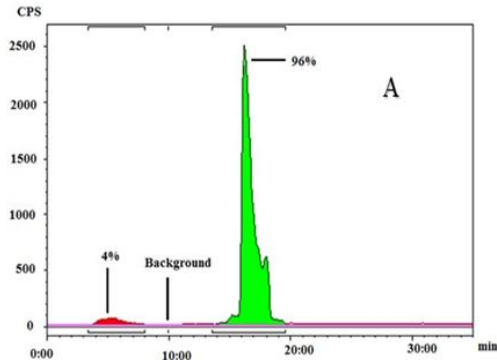
به منظور اثبات بیش تر پایداری در زمان 24 ساعت، آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نیز انجام شد که در نمودار شماره 7 نشان داده شد.



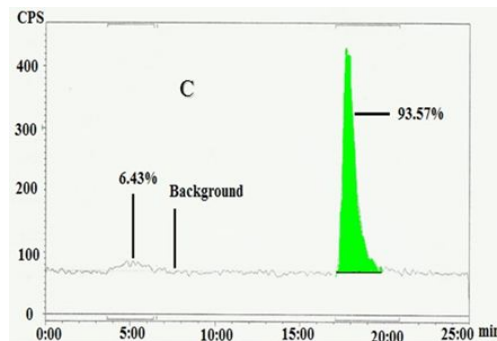
نمودار شماره 3: کروماتوگرام لایه نازک (TLC) رادیوپپتید با تریسین در حلال (A): متیل اتیل کتون، B: بافر سیترات، C: استونیتریل: آب)



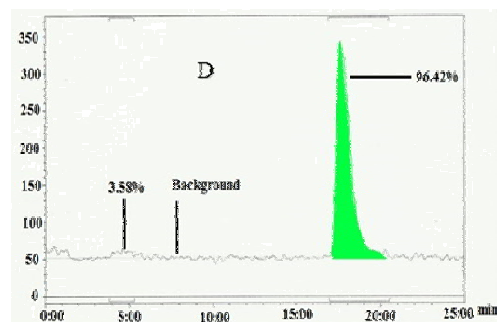
نمودار شماره 4: کروماتوگرام لایه نازک (TLC) رادیوپپتید با



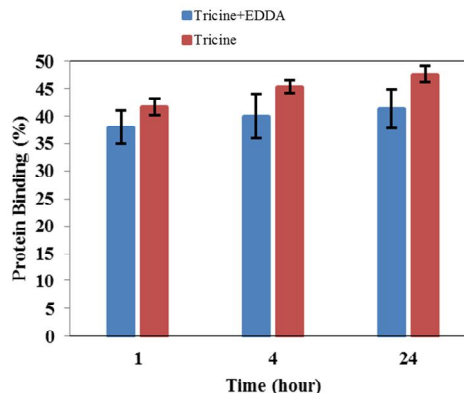
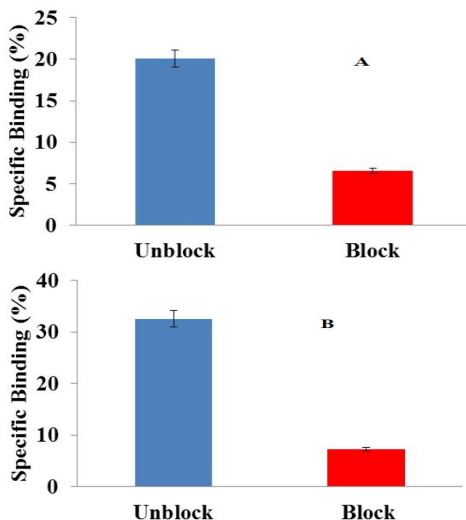
نمودار شماره 7: آنالیز HPLC در سالیان پس از 24 ساعت مربوط به پایداری پپتید نشاندار با A: تریسین، EDDA:B / تریسین



نتایج پایداری پپتید نشاندار در سرم انسانی (رسوب دادن) میزان اکتیویته متصل شده به پروتئین‌های پلاسما و اکتیویته متصل مانده به پپتید در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد. پایداری در سرم انسانی از نظر تجزیه توسط آنزیم یا تغییر احتمالی این پپتید در زمان‌های یک و چهار ساعت توسط آنالیز HPLC نیز مورد بررسی قرار گرفت که برای تریسین به ترتیب درصد بازده رادیو شیمیایی 96 و 94 درصد و برای EDDA / تریسین 93 و 96 درصد به دست آمد. تنها یک صد برای تریسین ناخالصی مربوط به تغییر در پپتید مشاهده شد (نمودار شماره 8). کانت رسوب حاصل پس از افزودن اتانول به مخلوط پپتید نشان‌دار و سرم انسانی به عنوان مقدار داروی متصل به پروتئین در نظر گرفته شد. درصد داروی آزاد برای پپتید نشان‌دار با تریسین و EDDA / تریسین در نمودار شماره 9 نشان داده شد.

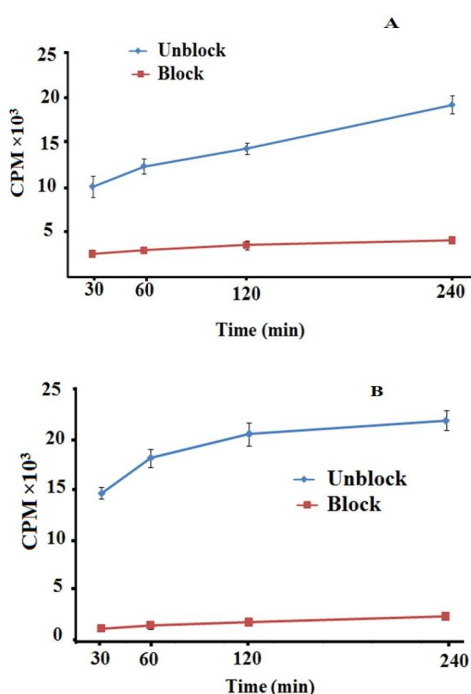


نمودار شماره 8: آنالیز HPLC مربوط به پایداری پپتید نشاندار با تریسین در سرم انسانی پس از یک ساعت (A) و چهار ساعت (B)، با EDDA / تریسین پس از یک ساعت (C) و چهار ساعت (D)



نمودار شماره 9: درصد اتصال پروتئینی پپتید نشاندار با تریسین و EDDA / تریسین

نمودار شماره 10: اتصال اختصاصی پپتید نشاندار به گیرنده های نوروتنسینی در سطح سلول هاپس از یک ساعت با A: تریسین، B: EDDA / تریسین



نمودار شماره 11: تمایل پپتید نشاندار برای ورود به درون سلول های HT-29 با A: تریسین، B: EDDA / تریسین. مقادیر بصورت میانگین ± احراف استاندارد نمایش داده شده است و تعداد بشقابک سلولی در هر بخش سه عدد بوده است.

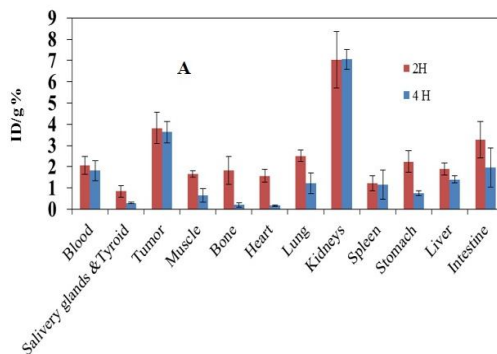
بررسی لیوفیلیسیته یا اندازه گیری $\log p$

نتایج نشان داد که ضریب تقسیم پپتید نشاندار با تریسین و EDDA / تریسین به ترتیب $3/78 \pm 0/18$ و $3/61 \pm 0/16$ است؛ که نشان از هیدروفیلیسیته بالای آنها است.

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پپتید نشاندار برای ورود به سلول

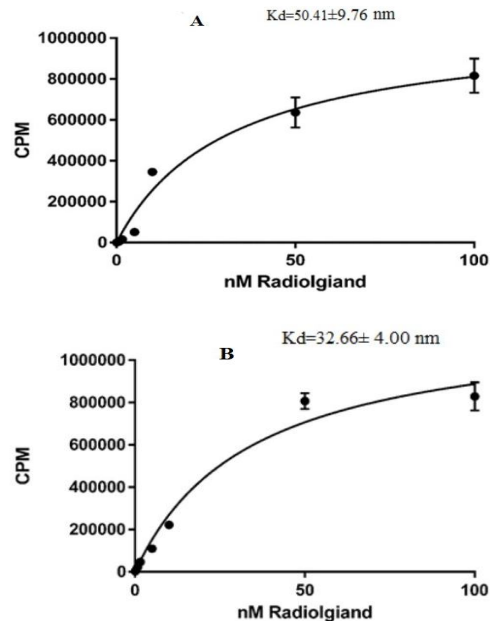
در نتیجه مطالعه بلاک کردن گیرنده ها، اتصال پپتید نشاندار شده با لیگاند کمکی تریسین و EDDA / تریسین در سلول های بلوک نشده به سلول های بلوک شده تفاوتی معنی دار بود ($p < 0/05$) که نشان دهنده اتصال اختصاصی است (نمودار شماره 10). نتایج نشان داد که ورود پپتید نشاندار با EDDA / تریسین نسبت به تریسین بیش از 1/5 برابر است. با بررسی کلی نتایج می توان گفت که پپتید نشاندار با EDDA / تریسین پس از طی زمان چهار ساعت به مقدار تقریبی حدود 18 درصد وارد سلول های HT-29 می شود، در صورتی که این مقدار برای پپتید نشاندار با تریسین به تنهایی نه درصد است (نمودار شماره 11).

پیدا کرد به طوری که نسبت میزان جذب توموری غیر بلاک به بلاک $3/44$ به دست آمد ($U/B=3/44$). سرعت کاهش رادیواکتیویته در خون مانند خود تومور کم بود. از این رو نسبت جذب تومور به خون از دو به چهار ساعت تغییر محسوسی نداشت؛ اما این نسبت در ارگان‌های دفعی (تومور به کلیه و تومور به کبد) فاحش و قابل ملاحظه بود (نمودار شماره 13 و جدول شماره 1) در پیتید نشان‌دار با EDDA/تریسین نسبت تومور به ماهیچه در زمان‌های دو و چهار ساعت به ترتیب برابر $4/2$ و $3/48$ است و با گذشت زمان تا چهار ساعت تغییر نمی‌کند که تقریباً پایداری این نسبت را در گذشت زمان نشان می‌دهد. در مورد پیتید نشان‌دار با تریسین این نسبت از $2/3$ به $5/58$ می‌رسد (جدول شماره 2). کاهش جذب برخلاف پیتید نشان‌دار با تریسین در EDDA/تریسین مشاهده می‌شود که به طور تقریبی نصف می‌شود و نسبت دفع کلیوی پیتید به دفع کبدی برخلاف وقتی که فقط با تریسین نشان‌دار می‌شود کاهش می‌یابد. با بلاک گیرنده‌ها با تزریق پیتید سرد پیش از تزریق پیتید نشان‌دار نسبت غیر بلاک به بلاک بیش تر و برابر $7/55$ است (نمودار شماره 13 و جدول شماره 2). نتایج به دست آمده برای هر ارگان یا بافت به جز روده که تنها شامل درصد دوز تزریقی است، به صورت درصد دوز تزریقی در هر گرم است و به صورت انحراف استاندارد \pm میانگین نمایش داده شده است. تعداد موش بررسی شده در هر زمان سه عدد بوده است.



تعیین ثابت تفکیک (K_d) پیتید نشان‌دار

در نتیجه آزمون اشباع‌شدگی و با استفاده از آنالیز رگرسیون غیرخطی، ثابت تفکیک پیتید نشان‌دار با تریسین و EDDA/تریسین نسبت به گیرنده‌های نوروتنسینی به ترتیب، $50/41 \pm 9/76$ و $32/66 \pm 4/00$ نانو مولار تعیین شد (نمودار شماره 12).

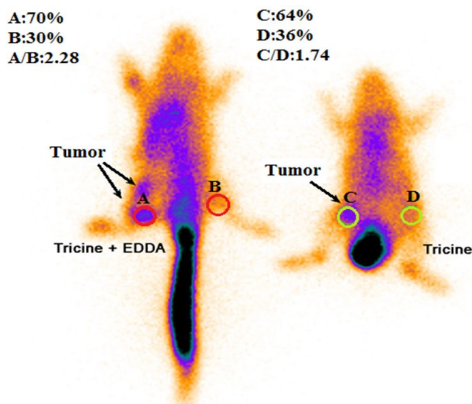


نمودار شماره 12: ثابت تفکیک پیتید نشان‌دار به گیرنده‌های نوروتنسین در سطح سلول‌های HT-29 با A: تریسین، B: EDDA/تریسین

بررسی توزیع زیستی پیتید نشان‌دار در موش حامل تومور HT-29

نتایج حاصل از تزریق پیتید نشان‌دار تریسین در دو و چهار ساعت نشان داد که بالاترین جذب رادیواکتیو مربوط به ارگان کلیه است. میزان جذب در ارگان‌هایی از قبیل قلب، ریه و غده تیروئید و معده جذب ناچیزی از رادیو پیتید را به همراه داشتند. جذب تومور از دو و چهار ساعت کاهش بسیار جزئی داشته و تقریباً تغییر چندانی نمی‌کند ($3/82$ در 2 ساعت به $2/63$ در 4 ساعت). با عمل بلاک کردن یعنی تزریق پیتید سرد پیش از تزریق پیتید نشان‌دار شده نسبت جذب توموری کاهش

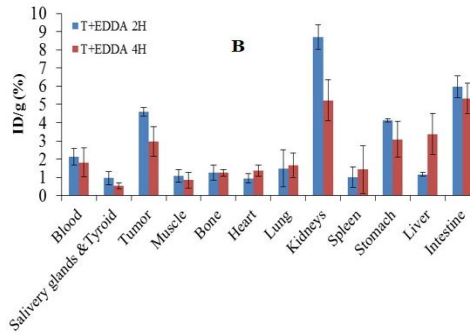
تریسین به بیش تر است. با استفاده از روش ROI(Region of interest) نسبت تومور به عضله برای موش با پتید نشان‌دار با EDDA/ تریسین 2/28 و موش با تریسین 1/74 به دست آمد.



تصویر شماره 2: تصویربرداری با دوربین گاما از موش‌های نود دارای تومورهای حاوی سلول HT-29 دو ساعت پس از تزریق پتید نشان‌دار با تریسین (سمت راست) و EDDA/ تریسین (سمت چپ)

بحث

قبلاً تکنسیوم-99m برای نشان‌سازی نوروتنسین کونژوگه شده با HYNIC [HYNIC-[βAla⁷-Tle¹²] neurotensin (5-13)] در حضور EDDA/ تریسین به منظور شناسایی از سرطان کولون (HT-29) و مقایسه با مشتقات نوروتنسین نشان‌دار شده با تکنسیوم-99m استفاده شده بود (7). خواص فیزیکی و هسته‌ای مناسب تکنسیوم-99m و همچنین دسترسی و مقرون به صرفه بودن آن، منجر به انتخاب آن برای نشان‌سازی این پتیدی شد (21,20). در این مطالعه، توانایی هدف‌گیری تومور این پتید کونژوگه HYNIC با استفاده از روش نشان‌دار تکنسیوم-99m در حضور تریسین نشان داده شد. همچنین توانایی هدف‌گیری تومور پتید نشان‌دار شده با تریسین و EDDA/ تریسین باهم مقایسه گردید. نتایج نشان داد که این پتید کونژوگه HYNIC در حضور هر دو سیستم هم‌لیگاند با بازده رادیوشیمیایی بالا به‌طور مؤثر با تکنسیوم-99m



نمودار شماره 13: توزیع بیولوژیکی پتید نشان‌دار در موش‌های ماده نود دارای تومورهای حاوی سلول HT-29 دو و چهار ساعت پس از تزریق با A: تریسین، B: EDDA/ تریسین. تعداد موش بررسی شده در هر زمان سه عدد بوده است.

جدول شماره 1: توزیع بیولوژیکی پتید نشان‌دار با تریسین و EDDA/ تریسین در موش‌های ماده نود دارای تومورهای حاوی سلول HT-29 دو ساعت پس از تزریق. تعداد موش بررسی شده در هر زمان سه عدد بوده است.

ارگان	EDDA/تریسین (%ID/g)	بلاک (%ID/g)	تریسین (%ID/g)	بلاک (%ID/g)
خون	046±213	064±174	041±206	003±160
تیروئید و غدد بزاقی	035±095	027±067	026±084	026±307
تومور	023±458	* 032±061	074±382	* 005±171
عضله	034±108	04±089	014±165	019±144
استخوان	041±126	051±108	065±184	014±145
قلب	024±094	052±099	029±156	013±112
ریه	1±149	082±129	026±250	009±208
کلیه‌ها	067±870	084±578	133±703	013±1043
طحال	056±101	048±073	036±122	07±115
معدة	008±412	04±144	049±224	174±363
کبد	071±116	048±101	028±190	012±202
روده‌ها	06±598	123±277	085±327	168±496

* تفاوت بین بلاک و بلاک نشده معنا دار است (P<0/05)، روده به صورت درصد دوز تزریقی (%ID) بیان شده است.

جدول شماره 2: نسبت جذب تومور به ارگان‌ها در توزیع بیولوژیکی پتید نشان‌دار با تریسین و EDDA/ تریسین در موش‌های ماده نود دارای تومورهای حاوی سلول HT-29 دو و چهار ساعت پس از تزریق

تومور به ارگان	دو ساعت		چهار ساعت	
	تریسین	EDDA/ تریسین	تریسین	EDDA/ تریسین
ماهیچه	4/20	2/30	3/48	5/58
خون	1/88	1/84	1/63	2
کبد	3/94	0/54	0/77	2/57
کلیه	0/52	2/01	0/56	0/51

تصویربرداری

همان‌طور که از تصویر شماره 2 مشخص است، نسبت جذب تومور به عضله در دو ساعت برای پتید نشان‌دار با EDDA/ تریسین نسبت به پتید نشان‌دار با

DOTA با ثابت تفکیک 14 ± 2 نانومولار؛ اما ثابت تفکیک گزارش شده با همان فارماکوفور با DOTA و ایتریوم-90 با ثابت تفکیک $5/6 \pm 0/7$ نانومولار این فرضیه را به چالش می کشد (6). میزان ورود پپتید نشاندار با EDDA/تریسین در مقایسه با پپتید نشاندار با تریسین بیش از $1/5$ برابر بیش تر پس از گذشت چهار ساعت مجاورت با سلول های HT-29 بود. این نتایج در مقایسه با مطالعات قبلی تأیید می کند که پپتیدها در مقایسه با قطعات آنتی بادی و مولکول های افی بادی، به نسبت بیش تر وارد سلول می شوند. البته باید توجه داشت که تغییرات کمی روی پپتیدهای کوچک می تواند سرعت ورود آنها به سلول را تغییر دهد (22).

بررسی توزیع بیولوژیک پپتید نشاندار با تریسین نشان داد که بیش ترین میزان از تجمع پپتید نشاندار در کلیه ها بوده است که نشان دهنده مسیر دفعی این رادیوپپتید است. تجمع کم اکتیویته در معده و تیروئید حیوان می توان گفت که پپتید نشاندار در شرایط درون تنی پایدار است و آزادسازی پرتکتتات سدیم در بدن موش ناچیز است. تجمع در تومور دو و چهار ساعت پس از تزریق پپتید به ترتیب برابر با $3/82$ و $3/63$ ($\%ID/g$) بوده است. اگرچه در توزیع زیستی پروتئین های نشاندار شده کوچک (کم تر 60 کیلوالتون) تجمع در کلیه ها یک الگوی متداول است (23). اما به نظر می رسد که پپتیدها با حضور اسیدهای آمینه با بار مثبت در توالی تجمع بالایی در کبد می توانند داشته باشند (24). باید توجه داشت که استفاده از شلاتورها و لیگاندهای کمکی متفاوت، می تواند روی الگوی توزیع زیستی رادیو داروها مؤثر باشد. برای مثال مشتقات HYNIC می توانند ترکیباتی با قدرت هیدروفیلی بیش تر تولید کرده، در پایان تجمع در کلیه در این مشتقات نسبت به ترکیباتی که از شلاتورهای دیگر استفاده می کنند بیش تر خواهد بود (25, 26). در مطالعه بلاک کردن در موش توموری نتایج نشان داد که تجمع در تومور به صورت مشهودی دو ساعت پس از تزریق کاهش یافته و

نشاندار شد (نمودار شماره 5-3) (7). نتایج پایداری ترکیبات نشاندار شده در محلول سالین نشان داد که پایداری پپتید نشاندار با تریسین کم تر از EDDA/تریسین پس از 24 ساعت (نمودار شماره 6) است.

این پایداری کم تر با تریسین می تواند به علت داشتن فرم های ایزومری است که معمولاً کمپلکس های با پایداری کم تری با تکنسیوم-99m تشکیل می دهد (16). پایداری پپتیدهای نشاندار شده در سرم انسانی یکی از عواملی است که پایداری درون تنی رادیو داروهای پپتیدی را تعیین می کند. در این مطالعه، پایداری پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/تریسین در سرم انسانی بالاتر از 90 درصد تا چهار ساعت را نشان داد.

در مطالعه بلاک کردن روی سلول های HT-29، تفاوت اتصال به سلول بلاک نشده و سلول بلاک شده با پپتید غیر نشاندار، با تریسین و EDDA/تریسین به ترتیب در حدود سه و $4/5$ برابر بیش تر بود (نمودار شماره 10) و اتصال اختصاصی با تریسین $13/5$ درصد در مقابل با $25/3$ درصد با EDDA/تریسین بود. این نشان می دهد که پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/تریسین نسبت به گیرنده های نوروتنسینی اتصال اختصاصی دارند. ثابت تفکیک پپتید نشاندار با تریسین بیش تر از EDDA/تریسین است که این نشان دهنده میل ترکیبی بالاتر پپتید نشاندار با EDDA/تریسین به گیرنده های نوروتنسینی است. با این وجود این افینیتی نسبت به مقادیری که توسط الشکر و همکارانش برای این فارماکوفور گزارش شد اختلاف فاحش دارد. این نقص احتمالاً ناشی از وارد کردن بتا آلانین در ساختار پپتید است و به تغییرات انجام شده در رادیونوکلئید، شلات کننده دومانظوره یا لیگاند کمکی مربوط نمی شود. الشکر و همکاران میل ترکیبی مشابهی را برای این فارماکوفور از طریق نشاندار کردن توسط رادیو ایزوتوپ های مختلف و شلات کننده دومانظوره گزارش کرده اند (DTPA و ایندیوم-111 با ثابت تفکیک 16 ± 2 نانومولار، DOTA و ایندیوم-111 با ثابت تفکیک 15 ± 1 نانومولار،

فشار داخل سلول‌های توموری، خروج از مویرگ‌ها و جاری شدن خون به سمت رستورهای مورد هدف نقش مهمی در این امر ایفا می‌کند (27). در یک مطالعه یک مشتق جدید از نوروتنسن با دو سیستم کولیگانندی تریسین و EDDA/ تریسین نشان‌دارسازی شد (8). نسبت تومور به ارگان‌های غیر هدف برای رادیوپیتید با تریسین کم‌تر از رادیوپیتید نشان‌دار شده با تریسین برای پیتید مورد مطالعه حاضر بود ولی برای رادیوپیتید با EDDA/ تریسین این نسبت‌ها به جز تومور به عضله (4/24) در مقایسه با 6/5 (در دو ساعت) این نسبت‌ها بیش‌تر بودند. مطالعات متعددی وجود دارد که ویژگی‌های درون تنی و برون تنی لیکاندهای کمکی EDDA/تریسین و تریسین را مقایسه می‌کند. در برخی مطالعات نشان داده شد که پیتید کونژوگه با HYNIC نشان‌دار شده با EDDA/ تریسین جذب توموری بالاتر و خواص فارماکوکنتیک بهتر نسبت به تریسین داشته که در پایان کیفیت تصویربرداری بهتر بوده است (28). در صورتی که در مطالعات دیگر نتیجه برعکس بود (18، 29، 30). این می‌تواند به دلیل تفاوت در توزیع اکتیویته رادیوپیتیدها در پس‌زمینه باشد. در این مطالعه با وجود ویژگی‌های تقریباً مشابه از لحاظ رادیوشیمیایی برای هر دو کمپلکس پیتیدی، کمپلکس پیتیدی نشان‌دار با لیگاند کمکی EDDA/ تریسین از لحاظ شرایط درون تنی ویژگی‌های مناسب‌تری نسبت به کمپلکس پیتیدی نشان‌دار با لیگاند کمکی تریسین نشان داد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه ایمان امراریان دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته‌ای دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح 1104 بود.

References

1. Poletto G, Cecchin D, Bartoletti P, Venturini F, Realdon N, Evangelista L. Radionuclide

نسبت تومور در حالت غیر بلاک به بلاک 3/44 رسیده است. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که اتصال پیتید نشان‌دار به گیرنده‌های نوروتنسنی به صورت اختصاصی انجام می‌شود. بررسی توزیع بیولوژیک پیتید نشان‌دار با EDDA/ تریسین نشان داد (7) که این رادیوپیتید بیش‌ترین میزان از تجمع در کلیه‌ها بوده است که نشان‌دهنده مسیر دفعی این رادیوپیتید است و در مقایسه با پیتید نشان‌دار با تریسین کلیانس کلیدی سریع‌تر بود. الگو تجمع اکتیویته در معده و تیروئید پیتید نشان‌دار با تریسین و EDDA/ تریسین شبیه به هم نشان داد. تجمع در تومور با گذشت دو ساعت کاهش می‌یابد به طوری که میزان تجمع در تومور دو و چهار ساعت پس از تزریق رادیو دارو به ترتیب برابر با 4/58 و 2/96 (ID/g%) بوده است. الگو تجمع اکتیویته در کلیه و کبد پیتید نشان‌دار با تریسین و EDDA/ تریسین شبیه به هم نشان داد. نتایج مطالعه بلاک کردن در موش توموری نشان داد که تجمع در تومور به صورت مشهودی دو ساعت پس از تزریق کاهش یافته و مقدار جذب غیر بلاک به بلاک 7/55 است که در مقایسه با پیتید نشان‌دار با تریسین بیش‌تر است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از توزیع زیستی، تصویربرداری دو ساعت پس از تزریق به موش‌های نود صورت گرفت و نتایج به‌دست آمده به وضوح تومور تشکیل شده در بالای ران پای سمت راست موش را نشان داد. برای قیاس نسبت تومور به عضله برای هر دو تصویر در نظر گرفته شد که برای پیتید نشان‌دار با EDDA/ تریسین اندکی بیش‌تر از پیتید نشان‌دار با تریسین بود و تصاویر حاصله مؤید آن بود. جذب توموری بیوملکول‌ها یک پدیده پیچیده است که البته تابع خواص آن است. علاوه بر خواص بیوملکول‌ها (شامل افینیتی، ورود به سلول و متابولیسم) ویژگی‌های تومور مانند

Delivery Strategies in Tumor Treatment: A Systematic Review. Current Issues in

- Molecular Biology 2022; 44(8): 3267-3282.
2. Xia Y, Rao L, Yao H, Wang Z, Ning P, Chen X. Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery. *Advanced Materials* 2020; 32(40): 2002054.
 3. Leibel SA, Fuks Z, Zelefsky MJ, Wolden SL, Rosenzweig KE, Alektiar KM, Hunt MA, Yorke ED, Hong LX, Amols HI, Burman CM. Intensity-modulated radiotherapy. *The Cancer Journal* 2002; 8(2): 164-176.
 4. Li T, Thorndyke B, Schreibmann E, Yang Y, Xing L. Model-based image reconstruction for four-dimensional PET. *Medical physics* 2006; 33(5): 1288-1298.
 5. Ogawa K, Saji H. Advances in drug design of radiometal-based imaging agents for bone disorders. *Int J Mol Imaging* 2011; 2011: 537687.
 6. Alshoukr F, Prignon A, Brans L, Jallane A, Mendes S, Talbot J-N, et al. Novel DOTA-neurotensin analogues for ¹¹¹In scintigraphy and ⁶⁸Ga PET imaging of neurotensin receptor-positive tumors. *Bioconjugate chemistry* 2011; 22(7): 1374-1385.
 7. Emrarian I, Sadeghzadeh N, Abedi SM, Abediankenari S. New neurotensin analogue radiolabeled by ^{99m}Tc as a potential agent for tumor identification. *Chemical Biology & Drug Design* 2018; 91(1): 304-313.
 8. Ahrabi NZ, Erfani M, Parivar K, Beiki D, Jalilian AR. Preparation and evaluation of a new neurotensin analog labeled with ^{99m}Tc for targeted imaging of neurotensin receptor positive tumors. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2014; 299: 461-469.
 9. Bolzati C, Refosco F, Marchiani A, Ruzza P. (^{99m}Tc)-radiolabelled peptides for tumour imaging: present and future. *Curr Med Chem* 2010; 17(24): 2656-2683.
 10. Carroll V, Demoin DW, Hoffman TJ, Jurisson SS. Inorganic chemistry in nuclear imaging and radiotherapy: current and future directions. *Radiochim Acta* 2012; 100(8-9): 653-667.
 11. Kaihani S, Sadeghzadeh N. Study of the ^{99m}Tc-labeling conditions of 6-hydrazinonicotinamide-conjugated peptides from a new perspective: Introduction to the term radio-stoichiometry. *J Labelled Comp Radiopharm* 2020; 63(14): 582-596.
 12. Sarko D, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Bifunctional chelators in the design and application of radiopharmaceuticals for oncological diseases. *Curr Med Chem* 2012; 19(17): 2667-2688.
 13. Decristoforo C, Mather SJ. The influence of chelator on the pharmacokinetics of ^{99m}Tc-labelled peptides. *Q J Nucl Med* 2002; 46(3): 195-205.
 14. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(12): 1347-1370.
 15. Correia JD, Paulo A, Raposinho PD, Santos I. Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy. *Dalton Transactions* 2011; 40(23): 6144-6167.
 16. King R, Surfraz MB, Finucane C, Biagini SC, Blower PJ, Mather SJ. ^{99m}Tc-HYNIC-Gastrin Peptides: Assisted Coordination of ^{99m}Tc by Amino Acid Side Chains Results in Improved Performance Both In Vitro and In Vivo. *J Nucl Med* 2009; 50(4): 591-598.
 17. Khodadust F, Ahmadpour S, Aligholikhamesh N, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Corrigendum to "An improved ^{99m}Tc-HYNIC-(Ser)3-LTVSPWY peptide with EDDA/tricine as co-ligands for targeting and imaging of HER2 overexpression

- tumor" [EJMECH 144, (2018) 767-773]. Eur J Med Chem 2018; 157: 782.
18. Shaghghi Z, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Tricine co-ligand improved the efficacy of ^{99m}Tc-HYNIC-(Ser) 3-J18 peptide for targeting and imaging of non-small-cell lung cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018; 104: 325-331.
 19. Erfani M, Zarrabi Ahrabi N, Shafiei M, Shirmardi SP. A (99m) Tc-tricine-HYNIC-labeled peptide targeting the neurotensin receptor for single-photon imaging in malignant tumors. J Labelled Comp Radiopharm 2014; 57(3): 125-131.
 20. Haufe SE, Riedmüller K, Haberkorn U. Nuclear medicine procedures for the diagnosis of acute and chronic renal failure. Nephron Clin Pract 2006; 103(2): c77-84.
 21. Hippel Fv. A comprehensive approach to elimination of highly-enriched-uranium from all nuclear-reactor fuel cycles. Science and global Security 2004; 12(3): 137-164.
 22. Raza Naqvi SA, Matzow T, Finucane C, Nagra SA, Ishfaq MM, Mather SJ, et al. Insertion of a lysosomal enzyme cleavage site into the sequence of a radiolabeled neuropeptide influences cell trafficking in vitro and in vivo. Cancer Biother Radiopharm 2010; 25(1): 89-95.
 23. Behr TM, Goldenberg DM, Becker W. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. Eur J Nucl Med 1998; 25(2): 201-212.
 24. Rolleman EJ, Valkema R, de Jong M, Kooij PP, Krenning EP. Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30(1): 9-15.
 25. Li Y-C, Tan T-Z, Zheng J-G, Zhang C. Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonictinamide derivative and N-hydroxysuccinimidyl S-acetylmercaptoacetyltriglycine: a comparison of radiochemical behaviors and biological properties. World Journal of Gastroenterology: WJG 2008; 14(14): 2235.
 26. Hosseinimehr SJ, Tolmachev V, Orlova A. Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design. Drug Discov Today 2012; 17(21-22): 1224-1232.
 27. Rudnick SI, Adams GP. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. Cancer Biother Radiopharm 2009; 24(2): 155-161.
 28. Torabizadeh SA, Abedi SM, Noaparast Z, Hosseinimehr SJ. Comparative assessment of a ^{99m}Tc labeled H1299.2-HYNIC peptide bearing two different co-ligands for tumor-targeted imaging. Bioorg Med Chem 2017; 25(9): 2583-2592.
 29. Haddad Zahmatkesh M, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Preparation and biological evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-(Ser) 3-D4 peptide for targeting and imaging of non-small-cell lung cancer. Future Oncology 2017; 13(10): 893-905.
 30. Kazemi Z, Zahmatkesh MH, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Biological Evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-EDDA/tricine-(Ser)-D4 Peptide for Tumor Targeting. Curr Radiopharm 2017; 10(2): 123-130.