

In vitro/In vivo Study of a New Bombesin Derivative with Tripeptide (Gly-Gly-Gly) Spacer as Potential Targeted Tumor Imaging Agent

Mohammad Hasankhah¹,
Iman Emrarian²,
Nourollah Sadeghzadeh³,
Seyed Mohammad Abedi⁴

¹ Pharmacy Student, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD Student in Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Radiopharmacy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

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

(Received April 17, 2016 ; Accepted July 19, 2016)

Abstract

Background and purpose: Bombesin is a 14-amino acid peptide with high biological functions which has a high affinity to GRP (Gastrin releasing peptide) receptor. GRP receptors are overexpressed in many malignant tumors such as prostate and breast cancers. The purpose of this study was to prepare [HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³]Bombesin(7-14) to label it easily by ^{99m}Tc and to evaluate it as a potential agent for imaging the tumors that have GRP receptors.

Materials and methods: In this experimental study, the prepared derivative Bombesin was radiolabelled by ^{99m}Tc at 100°C in 10 minutes using the exchange method and radiolabelling analysis was applied by TLC and HPLC. Specific absorption test and specific internalization using prostate cancer cells PC-3 was done by blocking and unblocking the receptors. Biodistribution were determined in normal mice.

Results: More than 95% radiolabelling was obtained. Specific absorption and internalization after 4 hours were 17.9% and 9.5%, respectively in PC-3 cancer cells. Biodistribution data showed rapid clearance from blood with major renal excretion and specific binding to tissues that have GRP receptors such as pancreas.

Conclusion: Conjugated peptide radiolabelled with ^{99m}Tc has promising characteristics as potential agent for imaging the tumors that overexpress the GRP receptors.

Keywords: Bombesin, ^{99m}Tc, GRP receptors, tumor, imaging

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(140): 15-23 (Persian).

مطالعه درون تنی و برون تنی مشتق جدیدی از بومبیزین با فاصله دهنده تری گلايسين به عنوان عامل بالقوه در تصویربرداری هدفمند تومور

محمد حسن خواه^۱

ایمان امراریان^۲

نورالله صادق زاده^۳

سیدمحمد عابدی^۴

چکیده

سابقه و هدف: بومبیزین یک پپتید ۱۴ اسید آمینه ای با فعالیت بیولوژیکی زیاد است که تمایل بالا به گیرنده‌های GRP دارد. گیرنده‌های GRP در تومورهای بدخیم مختلفی از قبیل پروستات و سینه به میزان بالا بیان می‌شود. هدف از این مطالعه آماده کردن [HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³-]Bombesin(7-14) بوده است که بتواند به آسانی با ^{99m}Tc نشان دار شود و به عنوان یک عامل بالقوه تصویربرداری برای تومورهای دارای گیرنده GRP ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۹۴ در دانشکده داروسازی انجام شده است مشتق بومبیزین آماده شده با ^{99m}Tc در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به روش تبادل نشان دار شد و آنالیز رادیوشیمیایی به وسیله TLC و HPLC انجام شد. آزمایش جذب و اینترنالیزیشن اختصاصی با استفاده از سلول‌های سرطانی پروستات PC-3 با گیرنده‌های بلاک شده و بلاک نشده انجام شد. توزیع بیولوژیکی در موش‌های سالم انجام گردید.

یافته‌ها: نشان دارسازی بالای ۹۵ درصد به دست آمد. جذب اختصاصی و اینترنالیزیشن اختصاصی بعد از ۴ ساعت به ترتیب ۱۷/۹ درصد و ۹/۵ درصد در سلول‌های سرطانی PC-3 بود. داده‌ها توزیع بیولوژیکی یک کلیرانس سریع از خون با دفع عمده کلیوی و اتصال اختصاصی به بافت دارای گیرنده GRP از قبیل پانکراس را نشان داد.

استنتاج: کوئزوگه پپتیدی نشان دار شده با ^{99m}Tc ویژگی‌های امید بخشی را به عنوان عامل بالقوه تصویربرداری برای تومورهای بیان کننده بالای گیرنده‌های GRP دارد.

واژه‌های کلیدی: بومبیزین، ^{99m}Tc، گیرنده GRP، تومور، تصویر برداری

مقدمه

پپتید آزاد کننده گاسترین (GRP) یک نوروپپتید ۲۷ آمینواسیدی است که هومولوگ یک پپتید ۱۴ اسید آمینه به نام بومبیزین (BN) استخراج شده از پوست وزغ (bombina bombina) در پستانداران می‌باشد. GRP به طور انتخابی به گیرنده GRP متصل می‌شود. این نوروپپتید با بومبیزین در توالی C-ترمینال آمیدی در هفت آمینو اسید

پپتید آزاد کننده گاسترین (GRP) یک نوروپپتید ۲۷ آمینواسیدی است که هومولوگ یک پپتید ۱۴ اسید آمینه به نام بومبیزین (BN) استخراج شده از پوست وزغ

مؤلف مسئول: نورالله صادق زاده - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: nourollahsadeghzadeh@yahoo.com

۱. دانشجوی دکتری داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته ای، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، گروه رادیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۲/۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۲۹

مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴).

۲- هیدرازینونیکوتین امید (HYNIC) یک لیگاند شلات کننده دو منظوره است که در سال‌های اخیر در طراحی و توسعه رادیو داروهای بر پایه تکنسیوم و رینیوم توجه علاقه‌مندان زیادی را به خود جلب کرده است (۵). HYNIC تنها بخشی از احتیاجات کوئوردینانسی رادیوایزوتوپ را برآورده می‌سازد و کولیگاندهای اضافی برای تکمیل فضای کوئوردینانسی باید به آن پیوندند. دو مورد از کولیگاندهایی که به طور گسترده‌تری مورد استفاده قرار گرفته‌اند، تریسین (tricine) و اتیلن دی آمین دی استیک اسید (EDDA) هستند. EDDA کمپلکس‌هایی را تشکیل می‌دهد که پایداری و مقاومت را هم در شرایط درون تنی (in vivo) و هم در شرایط برون تنی (in vitro) نشان می‌دهند (۶). بومیزین پایداری پایین در in vivo و تجمع در ناحیه شکم دارد و از طرفی دفع از ناحیه کبدی-صفراوی دارد. به همین دلیل تلاش‌های زیادی برای طراحی و توسعه مشتقات بومیزین جهت افزایش پایداری با بهبود هدف قرار دادن تومور و ویژگی‌های فارماکوکینتیک مناسب انجام شده است از قبیل بهینه سازی با شلات کننده‌های مختلف، معرفی و جایگزینی اسیدهای آمینه و مهم‌تر از آن استفاده از اتصال‌دهنده یا جداکننده می‌باشد (۷-۱۱).

در مطالعه قبلی ما نشان‌دارسازی گردید و خلوص رادیو شیمیایی بالای ۹۵ درصد به دست آمد و پایداری بالا در سالین و سرم انسانی را نشان داد (۱۲). در این مطالعه پس از نشان‌دارسازی $[^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC}-(\text{Gly})_3\text{-D-Phe}^{13})\text{-BBN (7-14) NH}_2]$ با ^{99m}Tc ، مطالعه سلولی و توزیع بیولوژیکی در موش سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در سال ۹۴ در دانشکده داروسازی انجام شده است.

پایانی یکسان می‌باشد (۱). نمونه‌های انسانی گیرنده GRP در غلظت‌های زیادی روی غشاهای سلولی سرطان پروستات بیان می‌شوند، در حالی که بافت نرمال پروستات و در بیش تر نمونه‌ها، هایپرپلازی خوش خیم پروستات اغلب گیرنده GRP منفی هستند (۲). علاوه بر سرطان پروستات، گیرنده GRP در چندین نوع تومورهای انسانی دیگر افزایش بیان دارد که شامل سرطان سینه، روده بزرگ، ریه، تخمدان، کلیه و سیستم عصبی مرکزی می‌باشد (۳). به این دلیل آنالوگ‌های GRP می‌توانند به عنوان رادیوهای مولکولی در تصویربرداری و درمان تومورهای سرطان پروستات و سایر سرطان‌های دارای این گیرنده با اتصال به عوامل رادیواکتیو مورد استفاده قرار گیرند (۱). آنالوگ‌های بومیزین سنتزی می‌توانند براساس ساختارشان به دو نوع متفاوت طبقه‌بندی شوند. آنالوگ‌های نوع A کوتاه شده و تنها دارای یک بخش‌اند، معمولاً توالی ۱۴-۷ در انتهای C بومیزین برای شناسایی گیرنده و عملکردهای زیستی ضروری می‌باشد. از سوی دیگر، آنالوگ‌های نوع B در توالی کامل سنتز می‌شوند. در این آنالوگ‌ها معمولاً یک یا چند اسید آمینه به طور انتخابی جایگزین می‌شوند (۱). آنالوگ‌های نوع A به طور کلی مطلوب‌تر به نظر می‌رسد چرا که نسبت به طول کامل پپتید ۱۴ اسید آمینه‌ای نوع B برای کاربردهای (در داخل موجود زنده) با ثبات‌تر است و همیشه به طور شایسته‌ای به گیرنده GRP متصل می‌شود. برای نشان‌دار کردن آنالوگ‌های GRP با مواد رادیواکتیو به‌طور کلی مولکول‌های زیستی به گونه‌ای طراحی می‌شوند که جایگاه اتصال مواد رادیواکتیو (Labelling site) از جایگاه اتصال به گیرنده فاصله داشته باشد (۱). استفاده بسیار گسترده از رادیونوکلیدها در کاربردهای تشخیصی، توجه زیادی را به توسعه مشتقات بومیزین نشان‌دار شده با ^{99m}Tc به وسیله انواع مختلفی از شلات‌کننده‌ها، توالی‌های پپتیدی و گروه‌های فضایی معطوف ساخته است. چندین شلات‌کننده مانند $(\text{triamidethiol})\text{N}_3\text{S}$ ، $(\text{diaminedithiol})\text{DADT}$ ، $(\text{Mercaptoacetyl triglycine})\text{MAG}_3$ و $(\text{tetraamine})\text{N}_4$ برای نشان‌دار کردن آنالوگ‌های BN/GRP با ^{99m}Tc

مواد و دستگاه

پرتکتات آزاد ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) از حلال ۲- بوتانول استفاده شد که پرتکتات آزاد در این حلال دارای R_f برابر ۱ بوده و پپتید نشان دار، تکنسیوم کلونید ($^{99m}\text{TcO}_2$) و تکنسیوم کولیگانند آزاد همگی دارای R_f برابر صفر هستند. جهت تعیین پرتکتات آزاد همراه با تکنسیوم کولیگانند آزاد که به پپتید باند نشده است از حلال ۰/۱ مولار سدیم سترات با pH برابر ۵ استفاده گردید که پپتید نشان دار و تکنسیوم کلونید دارای R_f برابر صفر و پرتکتات آزاد همراه با تکنسیوم کولیگانند آزاد دارای R_f برابر ۱ می‌باشند. برای تعیین میزان تکنسیوم کلونید ایجاد شده از حلال متانل و آمونیوم استات ۱ مولار به نسبت ۱ به ۱ استفاده شد که در این حلال تکنسیوم کلونید دارای R_f برابر صفر و پپتید نشان دار، پرتکتات آزاد و تکنسیوم کولیگانند باند نشده به پپتید همگی دارای R_f برابر ۱ می‌باشند. رادیو اکتیویته توسط TLC scanner اندازه گیری شد. کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (RP-HPLC) برای کونژوگه‌های پپتیدی با سیستم گرادپانی شامل تری فلونورواستیک اسید ۰/۱ درصد در آب (حلال A) و استونیتریل (حلال B) سرعت حلال ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد (۱۲).

تعیین جذب اختصاصی

ابتدا رده سلولی PC-3 دارای بیان بالای گیرنده GRP از انستیتو پاستور خریداری شد و پس از چند بار تعویض محیط کشت، فلاسک‌های حاوی سلول توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده شد و از نظر عدم آلودگی و پوشاندن کامل کف فلاسک بررسی گردید و برای پاساژ دادن آماده شد. به این ترتیب که محیط کشت رویی به طور کامل تخلیه و سلول‌ها با بافر فسفات شستشو داده شدند. سپس ۲ میلی لیتر محلول تریپسین EDTA به سلول‌ها اضافه شد. فلاسک به مدت ده دقیقه به انکوباتور برگردانده شد تا آنزیم اثر کرده و سلول‌ها از کف جدا شوند. فلاسک از انکوباتور خارج شد. با کف دست به کناره‌های آن ضربه وارد گشت و توسط میکروسکوپ اینورت برای حصول اطمینان از جدا شدن

کونژوگه پپتیدی با HYNIC طراحی شد و توسط شرکت Peptron در کشور کره سنتز شد و به وسیله RP-HPLC و طیف سنجی جرمی با خلوص بالای ۹۵ درصد مشخص شد. مواد شیمیایی شامل تریسین، اتیلن دی آمینودی استیک اسید (EDDA)، تری فلونورواستیک اسید از شرکت Fluka و ۲- بوتانول، سدیم سترات، آمونیوم استات، متانول و کلروکلک از شرکت Merk تهیه شد. محیط کشت سلولی، RPMI1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و پنی‌سیلین / استرپتومایسین از Gibco بود. سدیم پرتکتات از ژنراتور تهیه شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. اکتیویته توسط دوز کالیبراتور مدل Capintec CRC-127R ساخت کشور آمریکا اندازه گیری شد. ارزیابی رادیوشیمیایی با استفاده از TLC توسط دستگاه Lablogic mini-scan TLC scanner ساخت کشور انگلستان و RP-HPLC مدل Knauer ساخت کشور آلمان مجهز به دکتور Bioscan, INC مدل B-FC-3200 ساخت کشور آمریکا انجام شد. ستون 250/4.6 Knauer Earospher100 5C18 استفاده شد.

نشان دار سازی با استفاده از تریسین و EDDA به روش تبادل لیگانند

به محلول حاصل از ۴۰ میکرو گرم پپتید $[\text{HYNIC}-(\text{Gly})_3\text{-D-Phe}^{13}\text{-BBN (7-14) NH}_2]$ ۱۵ میلی گرم تریسین و ۵ میلی گرم EDDA در ۰/۵ میلی لیتر آب، ۴۰ میکرو گرم SnCl_2 (۲۰ میکرو لیتر از ۲ mg/ml SnCl_2 , 2H₂O در 0.1 M HCl) اضافه گردید. پس از اضافه کردن ۳۷۰ تا ۱۴۸۰ مگا بکرل پرتکتات سدیم در ۰/۵ میلی لیتر سالیین به این محلول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد (۱۲).

ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی

کروماتوگرافی لایه نازک روی نوارهای سیلیکاژل با استفاده از ۳ حلال انجام شد. برای تعیین میزان

میکرو مول در میلی لیتر نگهداری شدند (۳ خانه بالای هر پلیت). جذب سلولی در دوره‌های زمانی ذکر شده به وسیله برداشت محیط کشت و با دو بار شستن توسط PBS متوقف گردید. سرانجام سلول‌ها با سود ۰/۱ نرمال شستشو داده شد. حاصل شستشو در ۳ خانه بالایی و پایینی در لوله های مربوطه جمع آوری گردید و لوله‌ها در دستگاه گاما کانتیر شمارش شد. با داشتن اکتیویته استاندارد (شاهد)، اکتیویته کل و اکتیویته غیر اختصاصی میزان جذب اختصاصی مورد اندازه گیری قرار گرفت.

تعیین میزان ورود به سلول (Internalization)

در ادامه کار جذب اختصاصی، پس از دوبار شستشو توسط PBS جهت توقف جذب سلولی مجدداً دو بار شستشو به مدت ۱۰ دقیقه توسط بافر گلایسین (PH 2.5) انجام شد. این مرحله بین جذب غشایی (رها شدنی توسط اسید) و وارد شده به داخل سلول (مقاوم به اسید) از رادیولیگاند وجه تمایز قائل می‌گردد. سرانجام سلول‌ها با سود ۰/۱ نرمال شستشو داده شدند. حاصل شستشو در هر مرحله در لوله‌های مربوطه جمع آوری شد و لوله‌ها در دستگاه گاما کانتیر شمارش گردید. با داشتن اکتیویته استاندارد (شاهد)، اکتیویته کل وارد شده و اکتیویته غیر اختصاصی میزان اینترنالیزیشن اندازه گیری شد.

توزیع بیولوژیکی

برای بررسی توزیع بیولوژیکی، پپتید نشان دار به حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از طریق دم به موش نر سالم تزریق گردید. جهت تعیین جذب غیر اختصاصی از رادیو پپتید در ارگان‌ها با گیرنده مثبت، به یک گروه سه تایی از موش سالم ۱۰۰ میکرو گرم پپتید سرد در ۵۰ میکرو لیتر سالیین همراه با رادیو پپتید تزریق شد (حیوانات بلاک شده). بعد از ۱، ۴ و ۲۴ ساعت موش‌ها در گروه‌های سه تایی کشته و ارگان‌های مورد توجه جمع آوری شدند و رادیو اکتیویته در گاما کانتیر اندازه گیری شد. درصد دوز تزریق شده در هر گرم بافت (ID/g درصد) محاسبه گردید.

سلول‌ها از فلاسک چک گردید و ۱۰ میلی لیتر محیط کشت کامل برای غیر فعال کردن تریپسین اضافه شد. سپس با پیپت مخلوط سلول‌ها را بالا پایین کرده تا سوسپانسیون یکنواخت سلولی حاصل شود. پس از آن مقداری از سوسپانسیون سلولی به فلاسک دیگری انتقال یافت. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. به فاصله چند روز سه مرتبه عملیات پاساژ دادن برای به دست آوردن ۱۸ میلیون سلول تکرار شد. برای شمارش سلول‌ها لام نئوبار مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا محیط کشت فلاسک خارج گردید. برای خارج کردن سلول‌های مرده شستشو توسط محیط کشت انجام شد. پس از اضافه کردن تریپسین و اندکی محیط کشت، سوسپانسیونی از سلول‌ها ایجاد شد. بعد از تکان دادن سوسپانسیون ده میکرو لیتر از آن به لام نئوبار آماده، انتقال یافت. سپس سلول‌های هر چهار خانه مربعی شمرده و میانگین گرفته شد. با ضرب کردن عدد ۱۰۰۰۰ در میانگین، تعداد سلول در هر میلی لیتر از سوسپانسیون به دست آمد. پس از شمارش سلول‌ها به هریک از پلیت‌های شش خانه‌ای تعداد ۱ میلیون سلول اضافه شد و حجم نهایی پلیت به ۴ میلی لیتر رسید و به مدت یک شب در انکوباتور ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد محیط کشت از پلیت‌های ۶ چاهکی شامل ۱ میلیون سلول در هر چاهک را برداشته شد و سلول‌ها یک بار با ۲ میلی لیتر محیط کشت مناسب با ۱ درصد سرم جنین گاوی شسته شد. به علاوه ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت مناسب (۱۰ درصد سرم جنین گاوی) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۲/۵ پیکومول پپتید نشان دار به همه شش چاهک حاوی محیط کشت اضافه گردید و سلول‌ها در زمان‌های نیم، یک، دو و چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. برای تعیین جذب غیر اختصاصی، اختصاصی سلول‌ها با رادیو لیگاند در حضور ۱۵۰ میکرو لیتر پپتید سرد با غلظت ۱

آنالیز آماری

محاسبه میانگین‌ها و انحراف استاندارد‌ها برای اینترنالیزیشن و توزیع بیولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شدند. t-test برای تعیین آمار معنی‌دار استفاده گردید. اختلاف‌ها با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($p < 0/05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج از سنجش برون تنی از رادیو پیپتید در سلول‌های PC-3، جذب اختصاصی ۱۷/۵ درصد بعد از ۴ ساعت و اینترنالیزیشن اختصاصی و سریع از ۳/۲ درصد در ۰/۵ ساعت به ۱۱/۴ درصد در ۴ ساعت را نشان داد. هم‌چنین اختلاف معنی‌دار و قابل توجه بین سلول‌های بلاک نشده و بلاک شده در دوره‌های زمانی مختلف نشان داده شد که بیان‌کننده جذب اختصاصی است ($p < 0/05$) (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱).

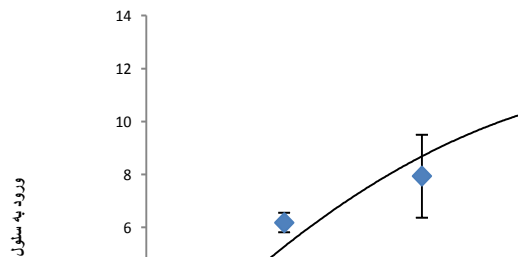
نتایج توزیع بیولوژیکی در موش در جدول شماره ۲، نمودارهای شماره ۲ و ۳ خلاصه شده است. نتایج توزیع بیولوژیکی کلیرانس سریع از خون و بیش‌تر بافت‌ها با مسردف اصلی کلیه را نشان می‌دهد. بالاترین جذب غیراختصاصی در کلیه‌ها بود که می‌تواند به خاطر هیدروفیلیسیته آن باشد. جذب قابل توجهی از رادیو اکتیویته در بافت‌های دارای گیرنده GRP شامل پانکراس مشاهده شده بود. اختصاصی بودن به وسیله بلاک کردن گیرنده از طریق تزریق هم‌زمان پیپتید سرد با کاهش درصد جذب در پانکراس تایید شده بود. ($p < 0/05$) در مقابل ۰/۱۴ درصد، ($p < 0/05$).

جدول شماره ۱: میزان جذب (absorption)

[HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³]-BBN (7-14) NH₂ نشاندار شده با ^{99m}Tc به سلول در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از انکوباسیون ³⁷°C

زمان (دقیقه)	بلاک نشده (انحراف معیار ± میانگین)*	بلاک (انحراف معیار ± میانگین)*
۳۰	۱/۹۵ ± ۱۸/۶۲	۰/۸۹ ± ۶/۲۶
۶۰	۱/۷۶ ± ۲۰/۰۲	۰/۶۵ ± ۶/۱۸
۱۲۰	۳/۰۰ ± ۲۱/۲۰	۰/۷۶ ± ۵/۳۶
۲۴۰	۱/۹۲ ± ۲۳/۵۲	۰/۹۹ ± ۵/۵۶

* تعداد چاهک‌ها PC-3 بلاک شده و بلاک نشده در هر سری آزمایش سه عدد بود.

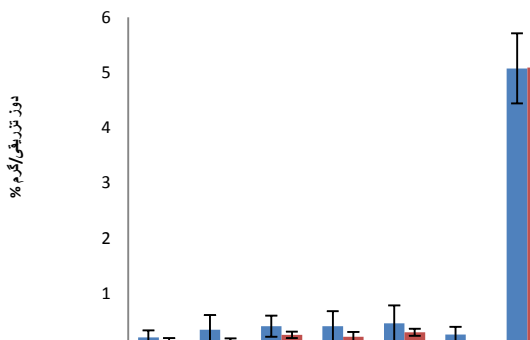


نمودار شماره ۱: میزان ورود به سلول
[HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³]-BBN (7-14) NH₂ (internalization)
نشاندار شده با ^{99m}Tc در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از انکوباسیون ³⁷°C. نتایج به صورت درصد نمایش داده شده است. تعداد چاهک‌ها PC-3 (بلاک شده و بلاک نشده) در هر سری آزمایش سه عدد بود.

جدول شماره ۲: توزیع زیستی [HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³]-BBN (7-14) NH₂ نشاندار شده با ^{99m}Tc در ۱، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق. نتایج برای هر ارگان یا بافت شامل درصد دوز تزریقی در هر گرم می‌باشد.

اندام	زمان انحراف معیار ± میانگین	یک ساعت انحراف معیار ± میانگین	چهار ساعت انحراف معیار ± میانگین	چهار ساعت بلاک انحراف معیار ± میانگین	بیست و چهار ساعت انحراف معیار ± میانگین
خون	۲/۰۱ ± ۶۹	۱/۹ ± ۱۳	۱/۱۵ ± ۰/۳	۰/۱۲ ± ۰/۵	۰/۱۲ ± ۰/۵
قلب	۱/۳۳ ± ۸۴	۰/۳۳ ± ۰/۷	۰/۱۴ ± ۰/۴	۰/۱۸ ± ۰/۴	۰/۱۸ ± ۰/۴
ریه	۱/۴۴ ± ۲۵	۰/۴۰ ± ۰/۱۹	۰/۲۲ ± ۰/۱۴	۰/۲۲ ± ۰/۱۴	۰/۲۲ ± ۰/۱۴
تیروئید و غدد بزاقی	۱/۴۵ ± ۷۷	۰/۴۰ ± ۰/۲۷	۰/۲۰ ± ۰/۱۳	۰/۲۰ ± ۰/۱۳	۰/۲۰ ± ۰/۱۳
کبد	۱/۳۲ ± ۵۴	۰/۴۵ ± ۰/۳۳	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱	۰/۲۵ ± ۰/۱
طحال	۰/۶۲ ± ۳۷	۰/۲۵ ± ۰/۱۴	۰/۱۶ ± ۰/۱۲	۰/۱۶ ± ۰/۱۲	۰/۱۶ ± ۰/۱۲
کلیه	۱۴/۰۶ ± ۰/۷	۵/۰۷ ± ۰/۶۴	۲/۰۷ ± ۰/۱۵	۲/۰۷ ± ۰/۱۵	۲/۰۷ ± ۰/۱۵
معده	۰/۹۵ ± ۴۷	۱/۵ ± ۰/۳۲	۰/۲۸ ± ۰/۴	۰/۲۸ ± ۰/۴	۰/۲۸ ± ۰/۴
عضله	۱/۲۱ ± ۶۵	۰/۴۶ ± ۰/۲۴	۰/۲۵ ± ۰/۰۶	۰/۲۵ ± ۰/۰۶	۰/۲۵ ± ۰/۰۶
استخوان	۰/۹۶ ± ۵۱	۰/۵۵ ± ۰/۲۷	۰/۳۷ ± ۰/۱	۰/۳۷ ± ۰/۱	۰/۳۷ ± ۰/۱
روده	۰/۹۷ ± ۴۴	۱/۴۴ ± ۰/۲۵	۰/۱۳ ± ۰/۰۶	۰/۱۳ ± ۰/۰۶	۰/۱۳ ± ۰/۰۶
پانکراس	۱/۱۵ ± ۵۶	۰/۸۸ ± ۰/۲۰	۰/۱۴ ± ۰/۰۹	۰/۱۴ ± ۰/۰۹	۰/۱۴ ± ۰/۰۹

تعداد موش نر سالم (بلاک شده و بلاک نشده) بررسی شده در هر زمان ۳ عدد بود

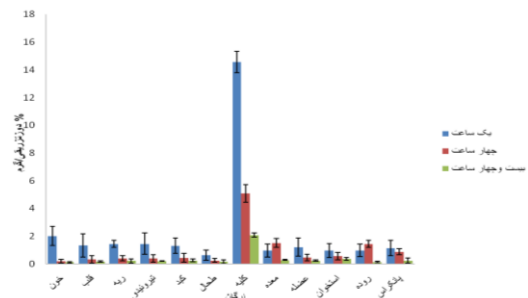


نمودار شماره ۲: توزیع زیستی [HYNIC-(Gly)₃-D-Phe¹³]-BBN (7-14) NH₂ نشاندار شده با ^{99m}Tc در ۴ ساعت پس از تزریق. نتایج برای هر ارگان یا بافت شامل درصد دوز تزریقی در هر گرم می‌باشد تعداد موش نر (بلاک شده و بلاک نشده) بررسی شده در هر زمان ۳ عدد بود

سلول‌های PC-3 دارای گیرنده GRP دارد (۱۴). در مطالعات قبلی مان گزارش کردیم که استفاده از اسید آمینه قطبی و فرم D اسید آمینه به ترتیب باعث تغییر مسیر دفع از کبدی- صفراوی به سیستم کلیوی و افزایش پایداری بومیزین نشان دار می‌شود و میزان ورود به سلول‌های سرطانی PC-3 بالای ۱۰ درصد گزارش شد (۱۶، ۱۵). در این مطالعه میزان ورود اختصاصی به سلول سرطانی و پانکراس شبیه مطالعات قبلی مان (۱۶، ۱۵) و مطالعه LaBella و همکاران (۱۴) بود اما از مطالعه Nock و همکاران (۱۳) کم‌تر بود که این می‌تواند مربوط به توالی پپتید باشد. هم‌چنین این مطالعه شبیه به مطالعات قبلی (۱۶-۱۳) اختلاف معنی‌دار قابل توجه‌ای از جذب را بین سلول‌های بلاک شده و بلاک نشده در دوره‌های زمانی مختلف نشان می‌دهد. کونژوگ شدن HYNIC به مشتق بومیزین طراحی شده، خواص فارماکوکینتیک و چربی دوستی از بومیزین را اصلاح کرده و رادیودارو با مسیر دفع کبدی- صفراوی کم‌تر و با دفع عمده کلیوی به دست می‌آید. این یک نتیجه مهم است زیرا بیش‌تر مشتقات بومیزین نشان دار شده تمایل به تجمع در کبد و روده به دلیل چربی دوستی بالا را دارند (۱۹-۱۷). این مشخصات همراه با ویژگی‌ها بر پایه این رادیوپپتید در مطالعه قبلی مان (۱۲) امیدبخش بوده و کونژوگ پپتیدی نشان دار شده را به‌عنوان یک عامل بالقوه برای تصویربرداری تومورهای دارای گیرنده GRP نشان می‌دهد.

References

- Schroeder R, Van Weerden W, Bangma C, Krenning E, de Jong M. Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues. *Methods* 2009; 48(2): 200-204.
- Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate relation to neoplastic transformation. *Cancer Res* 1999; 59(5): 1152-1159.
- Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartsmann G. Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology* 2007; 73(5-6): 340-345.
- Okarvi SM. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev* 2008; 34(1): 13-26.



نمونه‌دار شش ماهه ۳: توزیع زیستی
 $mTc^{99} [HYNIC-(Gly)_3-D-Phe^{13}]-BBN (7-14) NH_2$ نشاندار با ۹۹mTc در ۱، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق. نتایج برای هر ارگان با بافت شامل درصد دوز تزریقی در هر گرم می‌باشد تعداد موش نر بررسی شده در هر زمان ۳ عدد بود.

بحث

Nock و همکاران مشتق جدیدی از بومیزین تحت عنوان ^{99m}Tc -Demobesin1 را معرفی کردند که تمایل بالا به سلول‌های PC-3 نشان می‌دهند. جذب در تومور بالای ۱۶ درصد و پانکراس بسیار بالا بود و این بالاترین جذبی بود که تاکنون گزارش شده است اما جذب بسیار بالا در کبد را نیز نشان داد (۱۳).

LaBella و همکاران مشتقی از بومیزین را با ^{99m}Tc نشان دار کرده‌اند که با ارزیابی برون‌تنی و درون‌تنی گزارش کردند که پانکراس به‌عنوان ارگان طبیعی دارای گیرنده GRP به‌طور اختصاصی این پپتید نشان دار را جذب می‌کند و هم‌چنین گزارش کردند که رادیوپپتید مورد مطالعه شان تمایل بالا و اختصاصی به

5. Zinn K, Smyth C, Wu Q, Kirkman R, Mountz J, Buchsbaum D, et al. Imaging adenoviral-mediated gene transfer of gastrin releasing peptide receptor (GRPr) using a Tc 99m-labeled bombesin (BBN) analogue. *J Nucl Med*; 1998: Soc Nuclear Medicine Inc 1850 Samuel Morse Dr, Reston, VA 20190-5316 USA.
6. King R, Surfranz MB-U, Finucane C, Biagini SC, Blower PJ, Mather SJ. 99mTc-HYNIC-gastrin peptides: assisted coordination of 99mTc by amino acid side chains results in improved performance both in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 2009; 50(4): 591-598.
7. Van Den Bossche B, Van de Wiele C. Receptor imaging in oncology by means of nuclear medicine: current status. *J Clin Oncol* 2004; 22(17): 3593-3607.
8. Fani M, Maecke HR, Okarvi SM. Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* 2012; 2(5): 481-501.
9. Reubi JC, Mäcke HR, Krenning EP. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* 2005; 46(1 suppl): 67S-75S.
10. Mariani G, Erba PA, Signore A. Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2006; 47(12): 1904-1907.
11. Krenning E, Breeman W, Kooij P, Lameris J, Bakker W, Koper J, et al. Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* 1989; 333(8632): 242-244.
12. Sadeghzadeh N, Pisharaee h, Ghasemi y, Emrarian I. Radiochemical Evaluation of New 99 mTc-labelled Bombesin Derivatives with Tripeptidic (Ser-Ser-Ser) and (Gly-Gly-Gly) Spacer for Targeting GRP Receptor Positive-tumors. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(129): 70-80.
13. Nock B, Nikolopoulou A, Chiotellis E, Loudos G, Maintas D, Reubi J, et al. [99mTc] Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(2): 247-258.
14. LaBella R, Garcia-Garayoa E, Langer M, Bläuenstein P, Beck-Sickinger AG, Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of a 99m Tc (I)-labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol* 2002; 29(5): 553-560.
15. Sadeghzadeh N, Gandomkar M, Najafi R, Shafiei M, Ebrahimi SS, Shafiee A, et al. Preparation and evaluation of a new 99mTc labeled bombesin derivative for tumor imaging. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2010; 283(1): 181-187.
16. Sadeghzadeh N, Gandomkar M, Shafiee M, Mazidi M, Goudarzi M, Mirfallah SH, et al. Synthesis and evaluation of a new radiolabeled bombesin analogue for diagnosis of GRP receptor expressing tumors. *Iran J Nucl Med* 2009; 17(1): 18-26.
17. Lane SR, Nanda P, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa SD, Hoffman TJ, et al. Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists, [64 Cu-NO2A-(X)-BBN (7-14) NH₂], in a prostate tumor xenografted mouse model. *Nucl Med Biol* 2010; 37(7): 751-761.
18. Zhang H, Chen J, Waldherr C, Hinni K, Waser B, Reubi JC, et al. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. *Cancer Res* 2004; 64(18): 6707-6715.

19. De Vincentis G, Scopinaro F, Varvarigou A, Ussof W, Schillaci O, Archimandritis S, et al. Phase I trial of technetium [Leu13] bombesin as cancer seeking agent: possible scintigraphic guide for surgery? Tumori 2002; 88(3): S28-S30.