

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

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

یافته ها: 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 گیرنده های نوروتنسنی به ترتیب، $50/41 \pm 9/76$ و $32/66 \pm 4/00$ نانو مولار تعیین شد. تمایل ورود به سلول های 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 ویژگی های تقریباً مشابه از لحاظ رادیو شیمیایی برای هر دو کمپلکس پپتیدی، پپتیدی نشاندار با EDDA / تریسین از لحاظ شرایط درون تنی ویژگی های مناسب تری نسبت به تریسین نشان داد.

واژه های کلیدی: نوروتنسن، HT-29، تکنسیوم-99m، HYNIC، تریسین، تصویربرداری

مقدمه

رادیو ردیاب های جدید جهت کاربرد در بالین باید توانایی هدف گیری بالایی را در تومور (نسبت اکتیویته تومور/پس زمینه) داشته باشند. توانایی هدف گیری بالا در تومور به طور مؤثر مزایای زیادی مانند بهبود کیفیت

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

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

2. دانشیار، گروه داروسازی هسته ای، 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

تصویربرداری، 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 تصویربرداری پیش از درمان و لوتثیم-177 و ایتريوم-90 به‌عنوان رادیو پپتید برای درمان تومورهای نورو اندوکرینی استفاده می‌شوند (1).

برای نشاندارسازی مشتقات نوروتنسین از شلاتورهای مختلفی مثل DTPA، DOTA، MAG₃ و HYNIC هم‌چنین رادیوایزوتوپ‌هایی مثل ⁶⁸Ga، ¹⁸F، ¹¹¹In و ¹²⁵I 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 گلايسین (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, 13-11). 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 کنوردینانسی با زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه مشخص نشده است بنابراین ماهیت دقیق کمپلکس‌های ^{99m}Tc-HYNIC 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 کولیگاند اشغال می‌شوند (14, 15).

بر اساس مطالعات پیشین، انتخاب کولیگاند 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 لیگاند 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 نوروتنسین را به‌وسیله ^{99m}Tc-HYNIC با استفاده از دو سیستم لیگاند کمکی تریسین و EDDA/تریسین نشان‌دار سازی کردند. نسبت تومور به عضله برای رادیوپپتید کمپلکس شده با هر دو سیستم لیگاند 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 نوروتنسین کونژوگه شده با HYNIC

جدید (5-13) neurotensin HYNIC-[βAla⁷-Tle¹²] معرفی و با تکنسیوم-99m در حضور لیگاند کمکی EDDA/تریسین برای تصویربرداری از سرطان کولون (HT-29، بیان کننده بالای گیرنده نوروتنسن) نشاندار شد (7). همانند مشتقات نوروتنسن نشاندار شده با تکنسیوم-99m، رادیو پپتید جدید میل ترکیبی مطلوبی برای گیرنده نوروتنسن و توانایی مناسبی جهت هدف گیری تومور از خود نشان داد (7). در این مرحله به منظور بهبود جذب تومور و خواص فارماکوکنتیک، آزمایش های برون تنی و درون تنی HYNIC-[βAla⁷-Tle¹²] neurotensin(5-13) نشاندار شده با تکنسیوم-99m در حضور لیگاند کمکی تریسین (از قبیل نشاندار سازی، مطالعه پایداری در سرم انسانی، ارزیابی اتصال اختصاصی نسبت به گیرنده های 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 پیش تر منتشر شده است (7) مقایسه گردید.

مواد و روش ها

مواد و دستگاه

کونژوگه پپتیدی با HYNIC طراحی شده (تصویر شماره 1)، توسط شرکت Pepton در کشور کره سنتز شد و به وسیله RP-HPLC و طیف سنجی جرمی با خلوص بالائی 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

جنین گاوی و پنی سیلین/استرپتومایسین از Gibco بود. رده سلولی HT-29 (سرطان کولو رکتال انسانی) از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. سدیم پر تکتات 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 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 250/4.6 Knauer Earospher100 5C18 استفاده شد. رادیواکتیویته نمونه ها 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. موش های برهنه (نود) از مرکز تحقیقاتی پژوهشکده شمال (انیستیتو پاستور آمل) تهیه و در آنجا نگهداری شدند.

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)

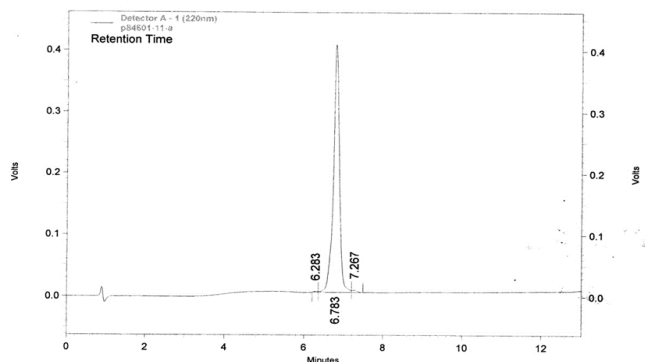
عملیات نشاندار سازی مشتق طراحی شده از نوروتنسن (5-13) با لیگاند کمکی تریسین

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

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



Detector A - 1 (220nm)

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

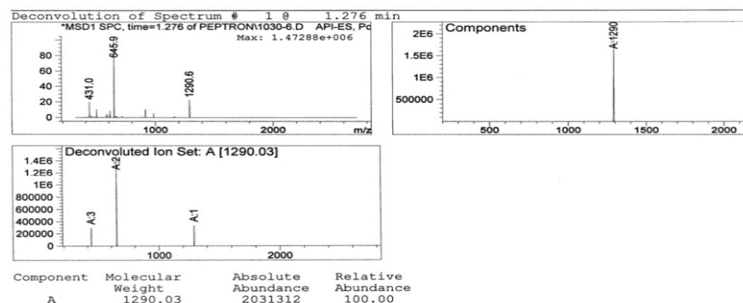
```

-----
Injection Date : 10/30/2014 4:40:12 PM      Location : FIA
Sample Name :                               Inj Volume : 7 µl
Acq. Operator :                               Inj Volume : 7 µl
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] [min]
  -----
1 0.000 Vial 11 P87501-11 120
2 1.105 Vial 12 P84601-11-1 100
3 2.118 Vial 13 2 100
4 3.134 Vial 14 P87807-11 120
5 4.150 Vial 15 P91301-11-1 120
6 5.163 Vial 16 P87803-11 120
7 6.176 Vial 17 P87707-11 120
8 7.190 Vial 18 P90003-11 120
9 8.201 Vial 19 P90301 120
  
```

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 PWHM: 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 -m99 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 -m99 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 -m99

برای تعیین بازده واکنش و خلوص رادیو شیمیایی محصول به روش TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) از کاغذ سیلیکاژل به ابعاد 1×10 سانتی متر استفاده شد. هم چنین برای تأیید نتایج به دست آمده، خلوص رادیوپپتید 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 احیاء شده و کمپلکس تکنسیوم -m99 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 احیاء شده 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 -m99 آزاد و کمپلکس تکنسیوم -m99 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 -m99 همراه لیگاند (های) کمکی از محلول بافر سیترات با pH

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

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

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

برنامه شوی به شکل زیر بود: از شروع شوی 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 شوی ستون به صورت گرادینت با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پایداری این پتید 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.

سپس محلول رویی از میکروفلتر 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 پتیدهای نشان‌دار به پروتئین‌های سرم توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

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

بررسی لیوفیلیسیته یا اندازه‌گیری LogP

در این روش به 1000 میکرولیتر از مخلوط 1:1 از نرمال-اکتانول و آب، 50 میکرولیتر رادیو پتید 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 g سانتریفیوژ گردید تا دو فاز آلی و آبی سه 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:

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

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پتید نشان‌دار برای ورود به سلول

برای انجام آزمایش، سلول‌ها بیان‌کننده بالای رستور نوروتنسن (HT-29) به اندازه 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 ثوبار 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 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در روز آزمایش، پلیت‌ها از انکوباتور خارج

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 غیر نشان‌دار در حجم 500 میکرولیتر محیط کشت (غنی شده با یک درصد FBS) به آن‌ها اضافه شد. به سه چاهک باقی‌مانده که مربوط به خانه‌های غیر بلوک 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 بفر 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 بفر 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

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 اختصاصی، 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، به طور 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 پرپسم 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

تلقیح تومور HT-29 در موش، 10^7 سلول در محیط کشت کامل به صورت زیرجلدی و از ناحیه پشت پای راست حیوان تزریق شد. پس از گذشت 10 تا 14 روز اندازه تومورها به حدود 0/8-0/7 سانتی متر 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 نشان‌دارسازی از طریق ورید دم به موش تزریق شد. نیم ساعت پیش از تزریق پتیدهای نشان‌دارسازی شده به منظور انجام آزمایش بلاکینگ در شرایط درون تنی، به میزان 200 برابر از پتید 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/زایلزین 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 کانتر وزن و اکتیویته آن‌ها شمارش گردید. میزان دریافت اکتیویته در هر ارگان به صورت 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.

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

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

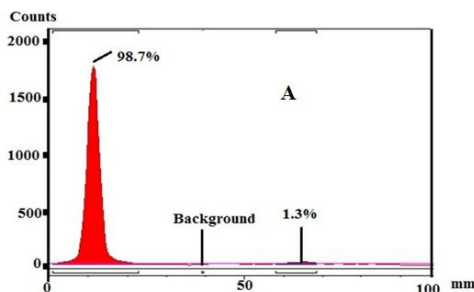
روش‌های آماری

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

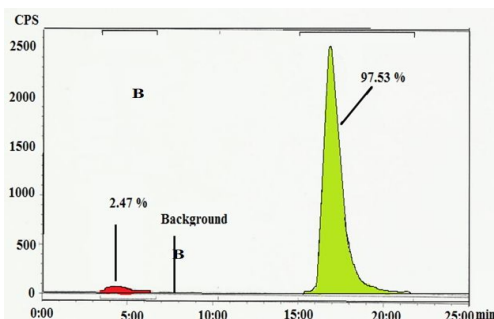
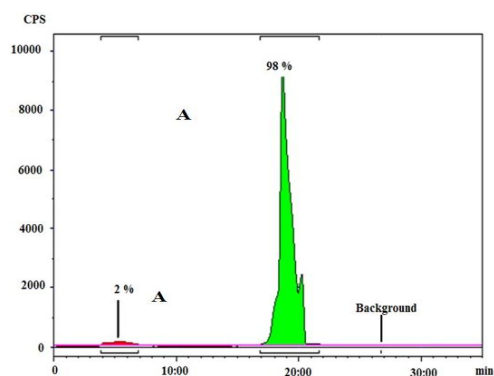
یافته‌ها

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

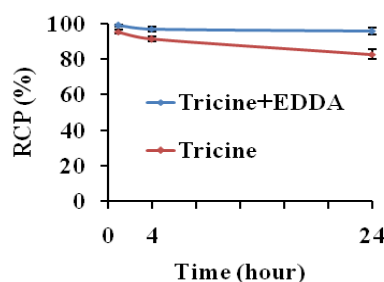
نتایج حاصل از رادیوکروماتوگرام‌های رویشگر هسته‌ای TLC مربوط به هر دو روش نشان‌دارسازی، بازده رادیو شیمیایی بالاتر از 95 درصد را نشان دادند. ناخالصی موجود در واکنش مربوط به تکنسیم احیا و هیدرولیز شده (RHT) است که کم‌تر از یک درصد بود (نمودار شماره 3 و 4). خلوص رادیو شیمیایی توسط رادیوکروماتوگرام‌های HPLC نیز تأیید شد (نمودار شماره 5). پایداری در نرمال سالین برای پتید 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 نشان‌دارسازی 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).



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

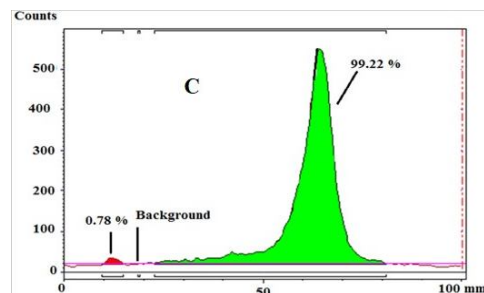
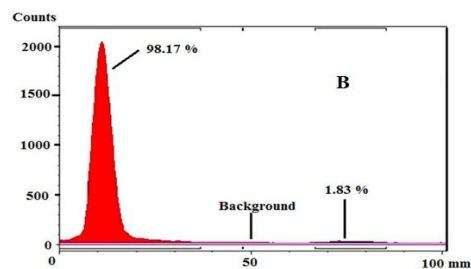


نمودار شماره 5: کروماتوگرام مایع با عملکرد بالا (HPLC) رادیوپپتید با A: تریسین، B: EDDA/تریسین

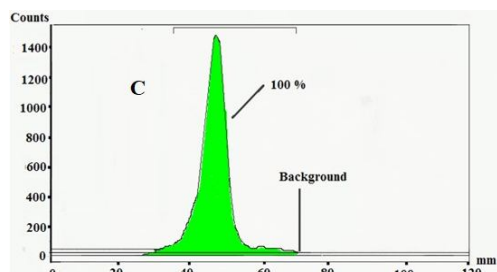
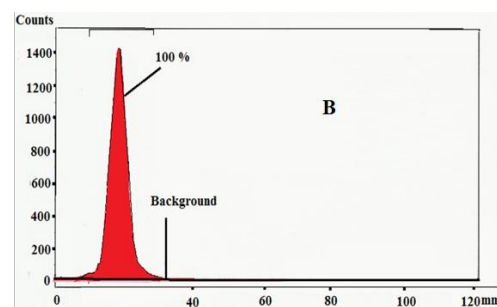
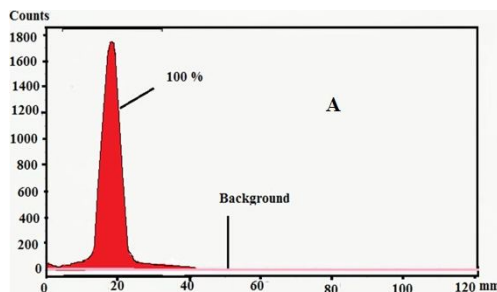


نمودار شماره 6: پایداری پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/تریسین در محلول و دمای اتاق

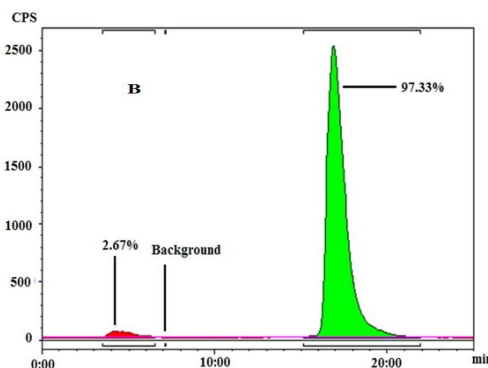
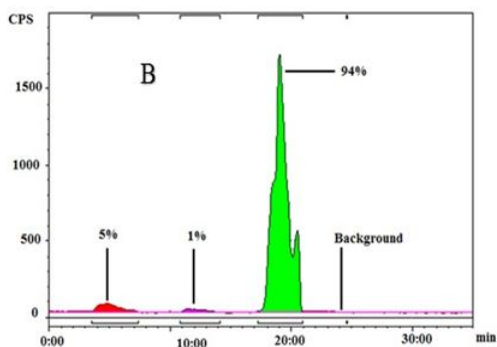
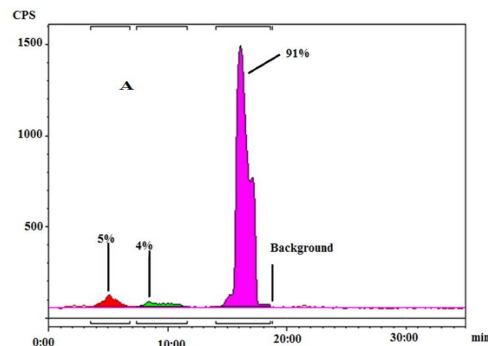
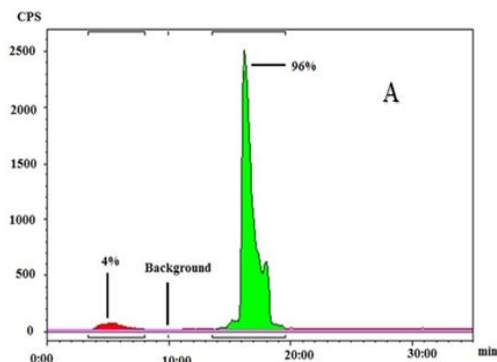
به منظور اثبات بیش تر پایداری در زمان 24 ساعت، آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز انجام شد که در نمودار شماره 7 نشان داده شد.



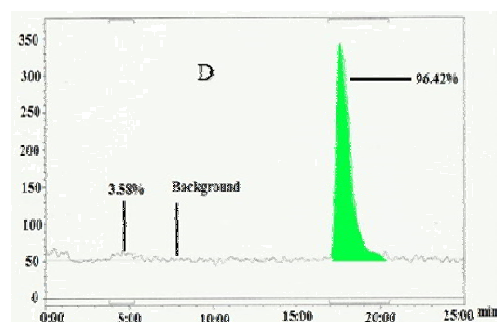
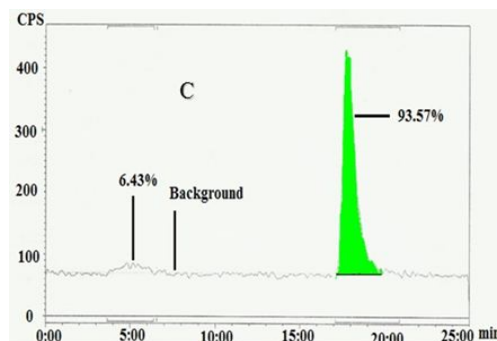
نمودار شماره 3: کروماتوگرام لایه نازک (TLC) رادیوپپتید با تریسین در حلال (A): متیل اتیل کتون، B: بافر سیترات، C: استونیتریل: آب)



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

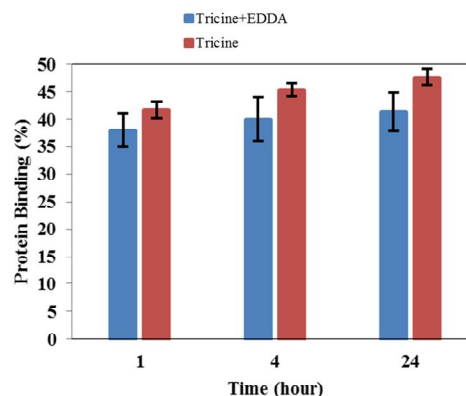
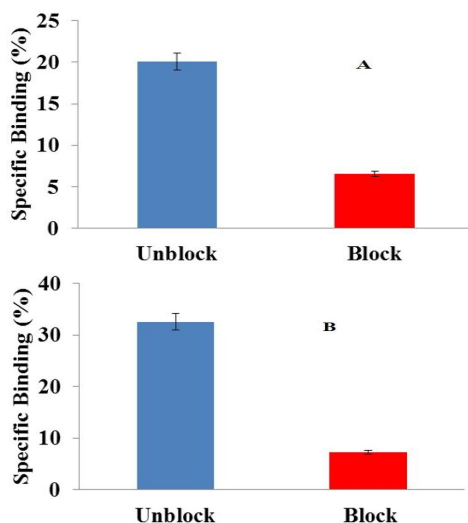


نمودار شماره 7: آنالیز HPLC در سالیان پس از 24 ساعت مربوط به پایداری پپتید نشاندار با A: ترپسین، EDDA:B / ترپسین



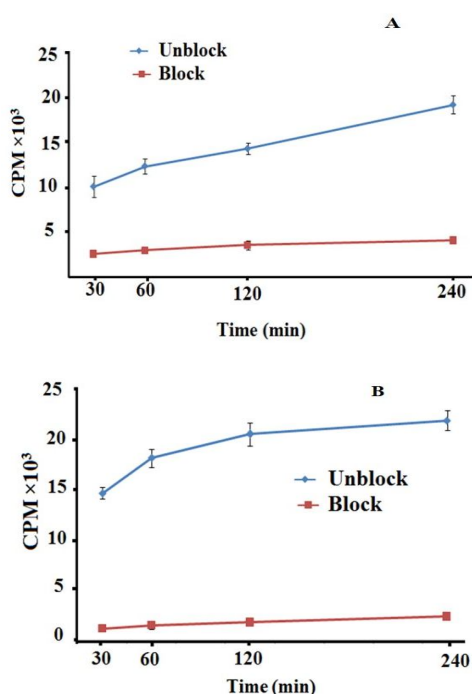
نمودار شماره 8: آنالیز HPLC مربوط به پایداری پپتید نشاندار با ترپسین در سرم انسانی پس از یک ساعت (A) و چهار ساعت (B)، با EDDA / ترپسین پس از یک ساعت (C) و چهار ساعت (D)

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 ترپسین به ترتیب درصد بازده رادیو شیمیایی 96 و 94 درصد و برای EDDA / ترپسین 93 و 96 درصد به دست آمد. تنها یک صد برای ترپسین 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 ترپسین و EDDA / ترپسین در نمودار شماره 9 نشان داده شد.



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

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



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

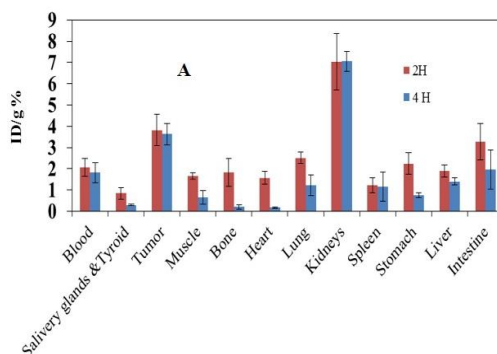
بررسی لیپوفیلیسیته یا اندازه گیری $\log p$

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

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پپتید نشاندار برای ورود به سلول

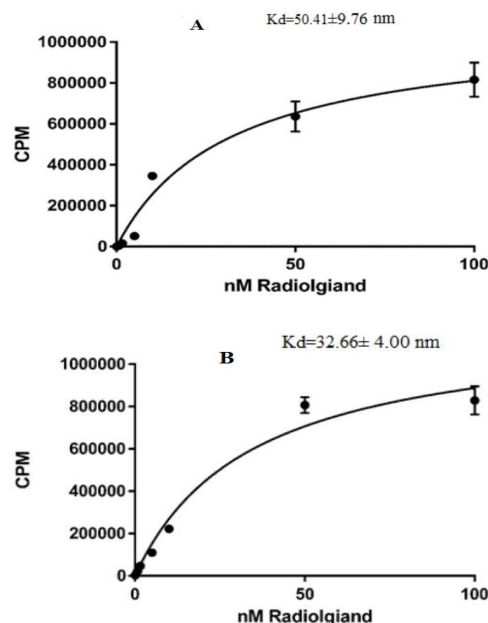
در نتیجه مطالعه بلاک کردن گیرنده ها، اتصال پپتید نشاندار شده با لیگاند کمکی ترسین و EDDA / ترسین در سلول های بلوک نشده به سلول های بلوک شده تفاوتی معنی دار بود ($p < 0/05$) که نشان دهنده اتصال اختصاصی است (نمودار شماره 10). نتایج نشان داد که ورود پپتید نشاندار با EDDA / ترسین نسبت به ترسین بیش 1/5 برابر است. با بررسی کلی نتایج می توان گفت که پپتید نشاندار با EDDA / ترسین 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 ترسین 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 رادیواکتیو 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) کاهش و قابل ملاحظه بود (نمودار شماره 13 و جدول شماره 1) در پپتید 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 پپتید نشان‌دار با تریسین این نسبت از $2/3$ به $5/58$ می‌رسد (جدول شماره 2). کاهش جذب برخلاف پپتید نشان‌دار با تریسین در EDDA/تریسین مشاهده می‌شود که به طور تقریبی نصف می‌شود و نسبت دفع کلیوی پپتید به دفع کبدی برخلاف وقتی که فقط با تریسین نشان‌دار می‌شود کاهش می‌یابد. با بلاک گیرنده‌ها با تزریق پپتید سرد پیش از تزریق پپتید 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) پپتید نشان‌دار

در نتیجه آزمون اشباع‌شدگی و با استفاده از آنالیز رگرسیون غیرخطی، 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 (نمودار شماره 12).

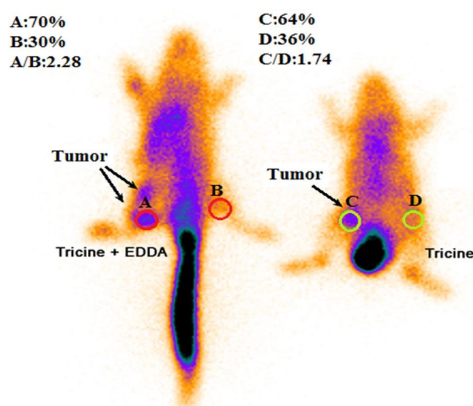


نمودار شماره 12: ثابت تفکیک پپتید نشان‌دار به گیرنده‌های نوروتنسنی در سطح سلول‌های HT-29 با A: تریسین، B: EDDA/تریسین

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

نتایج حاصل از تزریق پپتید 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 پپتید 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 پپتید سرد پیش از تزریق پپتید نشان‌دار شده نسبت جذب توموری کاهش

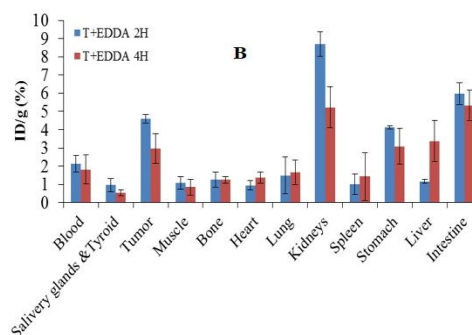
تریسین به بیش تر است. با استفاده از روش ROI(Region of interest) نسبت تومور به عضله برای موش با پتید نشاندار با EDDA/تریسین 2/28 و موش با تریسین 1/74 به دست آمد.



تصویر شماره 2: تصویربرداری با دوربین گاما از موش های 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 نشاندارسازی نوروتنسن 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 نوروتنسن نشاندار شده با تکنسیوم-99m استفاده شده بود (7). خواص فیزیکی و هسته ای مناسب تکنسیوم-99m و همچنین دسترسی و مقرون به صرفه بودن آن، منجر به انتخاب آن برای نشاندار سازی این پتیدی شد (21,20). در این مطالعه، توانایی هدف گیری تومور این پتید کونژوگه HYNIC با استفاده از روش نشاندار تکنسیوم-99m در حضور تریسین نشان داده شد. همچنین توانایی هدف گیری 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 هم لیگاند با بازده رادیوشیمیایی بالا به طور مؤثر با تکنسیوم-99m



نمودار شماره 3: توزیع بیولوژیکی پتید نشاندار در موش های 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 موش های 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)	تریسین (%ID/g)	بلاک (%ID/g)
خون	0.46±0.13	0.41±0.06	0.03±0.00
تیروئید و غدد بزاقی	0.35±0.05	0.27±0.07	0.26±0.07
تومور	0.23±0.58	0.74±0.82	0.05±0.11
عضله	0.34±0.08	0.14±0.65	0.19±0.44
استخوان	0.41±0.26	0.65±0.84	0.14±0.45
قلب	0.24±0.94	0.29±0.56	0.13±0.12
ریه	1.1±0.49	0.26±0.50	0.09±0.28
کلیه ها	0.67±0.70	0.84±0.78	0.13±0.43
طحال	0.56±0.01	0.48±0.73	0.1±0.15
معده	0.08±0.12	0.4±0.44	0.14±0.36
کبد	0.1±0.16	0.48±0.01	0.12±0.02
روده ها	0.6±0.98	0.85±0.27	0.168±0.496

*: 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 ارگان ها در توزیع بیولوژیکی پتید نشاندار با تریسین و EDDA/تریسین در موش های 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

همان طور 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

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

این پایداری کم تر با ترپسین 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 نشانداز شده در سرم انسانی یکی از عواملی است که پایداری درون تنی رادیو داروهای پپتیدی را تعیین می کند. در این مطالعه، پایداری پپتید نشانداز با ترپسین و EDDA/ ترپسین 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 نشانداز، با ترپسین و EDDA/ ترپسین به ترتیب در حدود سه و 4/5 برابر بیش تر بود (نمودار شماره 10) و اتصال اختصاصی با ترپسین 13/5 درصد در مقابل با 25/3 درصد با EDDA/ ترپسین بود. این نشان می دهد که پپتید نشانداز با ترپسین و EDDA/ ترپسین نسبت به گیرنده های نوروتنسینی اتصال اختصاصی دارند. ثابت تفکیک پپتید نشانداز با ترپسین بیش تر از EDDA/ ترپسین است که این نشان دهنده میل ترکیبی بالاتر پپتید نشانداز با EDDA/ ترپسین 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 نشانداز 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،

DOTA با ثابت تفکیک 14 ± 2 نانومولار)؛ اما ثابت تفکیک گزارش شده با همان فارماکوفور با DOTA و ایتريوم-90 با ثابت تفکیک $5/6 \pm 0/7$ نانومولار این فرضیه را به چالش می کشد (6). میزان ورود پپتید نشانداز با EDDA/ ترپسین در مقایسه با پپتید نشانداز با ترپسین بیش 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 نشانداز با ترپسین نشان داد که بیش ترین میزان از تجمع پپتید نشانداز 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 نشانداز در شرایط درون تنی پایدار است و آزادسازی پرتکتات 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 نشانداز 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

نسبت تومور در حالت غیر بلاک به بلاک 3/44 رسیده است. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که اتصال پپتید نشاندار به گیرنده‌های نوروتنسنی به صورت اختصاصی انجام می‌شود. بررسی توزیع بیولوژیک پپتید نشاندار با EDDA/تریسین نشان داد (7) که این رادیوپپتید بیشترین میزان از تجمع در کلیه‌ها بوده است که نشان‌دهنده مسیر دفعی این رادیوپپتید است و در مقایسه با پپتید نشاندار با تریسین کلیرانس کلیوی سریع‌تر بود. الگو تجمع اکتیویته در معده و تیروئید پپتید 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 پپتید 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 پپتید 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 پپتید نشاندار با EDDA/تریسین اندکی بیش‌تر از پپتید 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

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 کولیگاندی تریسین و EDDA/تریسین نشان‌دارسازی شد (8). نسبت تومور به ارگان‌های غیر هدف برای رادیوپپتید با تریسین کم‌تر از رادیوپپتید نشاندار شده با تریسین برای پپتید مورد مطالعه حاضر بود ولی برای رادیوپپتید 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 پپتید کونژوگه با HYNIC نشاندار شده با EDDA/تریسین جذب توموری بالاتر و خواص فارماکوکنتیک بهتری 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 رادیوپپتیدها در پس‌زمینه باشد. در این مطالعه با وجود ویژگی‌های تقریباً مشابه از لحاظ رادیوشیمیایی برای هر دو کمپلکس پپتیدی، کمپلکس پپتیدی نشاندار با لیگاند کمکی EDDA/تریسین از لحاظ شرایط درون تنی ویژگی‌های مناسب‌تری نسبت به کمپلکس پپتیدی 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

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 ^{111}In scintigraphy and ^{68}Ga 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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -technetium 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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 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. ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -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 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -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. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Gastrin Peptides: Assisted Coordination of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 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, Aligholikhamsheh N, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Corrigendum to "An improved $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -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.