ORIGINAL ARTICLE

Comparison of in vitro and in vivo Properties of HYNIC- [βAla^{7}-Tle^{12}] Neurotensin (5-13) Labeled with ^{99m}Tc using Two Co-ligand Systems

Iman Emrariani[1],
Nourollah Sadeghzadeh[2],
Saeid Abediankenari[3],
Seyed Mohammad Abedi[4]

[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 99mTc-labeling of 6-Hydrazinonicotinamide-conjugated neurotensin (HYNIC-[βAla^{7}-Tle^{12}] 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و سوم شماره ویژه نامه 1 آبان سال 1402 (76-59)

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

ایمان امراریان[1]
نورالله صادق زاده[2]
سعید عابدیان کناری[3]
سید محمد عابدی[4]

چکیده

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

مواد و روش‌ها: پس از نشان‌دارسازی، اتصال اختصاصی سلولی، تمایل و ورود سلولی پپتید نشان‌دارشده نسبت به گیرنده‌های نوروتنسینی 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 نشان‌دارشده 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 نوروتنسینی به ترتیب، 9/76±50/41 و 4/00±32/66 نانو مولارتعیین شد. تمایل ورود به سلول‌های HT-29 برای پپتید نشان‌دارشده با EDDA/ تریسین تقریبا 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 وEDDA / تریسین به ترتیب 2/30 و 4/20، 1/74 و 2/28، به‌دست آمد.

استنتاج: باوجود ویژگی‌های تقریباً مشابه ازلحاظ رادیو شیمیایی برای هردو کمپلکس پپتیدی، پپتیدی نشان‌دار با EDDA/ تریسین ازلحاظ شرایط درون تنی ویژگی‌های مناسب‌تری نسبت به تریسین نشان داد.

واژه های کلیدی: نوروتنسین، HT-29، تکنسیوم-99m، 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

مولف مسئول: نورالله صادق زاده - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: nourollahsadeghzadeh@yahoo.com
1. دانشجوی دکتری تخصصی داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، 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، گرو 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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

برای نشاندارسازی مشتقات نوروتنسین از شلاتورهای مختلفی مثل DTPA، DOTA، MAG_3 و HYNIC هم‌چنین رادیوایزوتوپ‌هایی مثل ^{18}F، ^{68}Ga، ^{111}In، ^{125}I 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(8،7).HYNIC (6- هیدرازینونیکوتین آمید) یکی از امیدوارکننده‌ترین عوامل شلات‌کننده برای نشان‌دارسازی با عنصر تکنسیم می‌باشد(10،9). از آن‌جایی که HYNIC نمی‌تواند تمام ظرفیت‌های اتم تکنسیم را کئوردینه کند بنابراین ظرفیت‌های باقیمانده را باید با لیگاندهای کمکی (کولیگاند) تکمیل کرد. لیگاندهای کمکی که معمولاً مورداستفاده قرار می‌گیرند عبارت‌اند از: تریس (هیدروکسی متیل) متیل گلایسین (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 فارماکوکینتیک، توزیع زیستی و درنتیجه توانایی مطلوب هدف‌گیری تومور توسط بیوموکلول‌های نشان‌دار با تکنسیوم - 99m را فراهم می‌کند. از دیگر مزیت‌های استفاده از HYNIC به‌عنوان شلات کننده دو منظوره (BFCA)، روش ساده نشاندارکردن، راندمان بالای نشان‌دارسازی 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. ازآن‌جایی‌که عدد اکسایش تکنسیم، تعداد لیگاندهای کمکی شرکت‌کننده در کمپلکس، حضور احتمالی لیگاندهای دیگر(لیگاندهای اکسو وهالید) و امکان تشکیل پیوندهای کوئوردینانسی با زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه مشخص نشده است بنابراین ماهیت دقیق کمپلکس‌های ^{99m}Tc-HYNIC نامشخص مانده است. بااین‌حال، می‌توان تصور کرد که اتم تکنسیم از طریق نیتروژن انتهایی گروه هیدرازین به HYNIC متصل می‌شود و سایر جایگاه‌ها توسط یک یا چند کولیگاند اشغال می‌شوند(15،14).

بر اساس مطالعات پیشین، انتخاب کولیگاند تأثیر عمیقی بر کارایی نشاندارسازی، توزیع زیستی و هدف‌گیری تومور دارد. هم‌چنین، می‌توان ادعا کرد که هیچ‌یک از لیگاندهای کمکی معمول ایده‌ال 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 نشاندارسازی کردند. نسبت تومور به عضله برای رادیوپپتید کمپلکس شده با هر دو سیستم لیگاند کمکی تقریباً یکسان پس از یک ساعت بود(19،8). در مطالعات دیگر، مقایسه نتایج جذب توموری و خواص فارماکوکنتیک پپتیدکونژوگه با HYNIC نشاندار شده با تکنسیوم-99m توسط تریسین و EDDA/تریسین ضد و نقیض بود(18،30-28). دراین پژوهش یک نوروتنسین کونژوگه شده با HYNIC

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

جدید HYNIC-[βAla^{7}-Tle^{12}] neurotensin (5-13) معرفی و با تکنسیوم -99m در حضور لیگاند کمکی EDDA/ تریسین برای تصویربرداری از سرطان کولون (HT-29، بیان‌کننده بالای گیرنده نوروتنیسن) نشاندار شد(7). همانند مشتقات نوروتنسین نشان‌دارشده با تکنسیوم- 99m، رادیو پپتید جدید میل ترکیبی مطلوبی برای گیرنده نوروتنیسن 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 HYNIC-[βAla^{7}-Tle^{12}] neurotensin(5-13) نشاندارشده با تکنسیوم -99m در حضور لیگاند کمکی تریسین (از قبیل نشاندارسازی، مطالعه پایداری در سرم انسانی، ارزیابی اتصال اختصاصی نسبت به گیرنده‌های نوروتنسین 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.

مواد و روش‌ها

مواد ودستگاه

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 بالائی 95 درصد شناسایی و تأیید شد (نمودار شماره 1 و 2).

مواد شیمیایی شامل تریسین، اتیلن دی آمینودی استیک اسید (EDDA)، تری فلوئورواستیک اسید از شرکت Fluka و 2-بوتانون، 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 تکنتات از ژنراتور تهیه‌شده توسط سازمان انرژی اتمی ایران به دست آمد. اکتیویته توسط دوز کالیبراتور مدل Capintec CRC-127R ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری 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 Earospher100 250/4.6 5C18 استفاده شد. رادیواکتیویته نمونه‌ها در هر دو آزمایش برون تنی و درون تنی با استفاده از آشکارساز NaI(Tl)مجهزبه سیستم شمارش گاما (دلشید، تهران، ایران) ارزیابی شد. موش‌های 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 نوروتنسین کونژوگه با HYNIC (Ac-Lys (HYNIC)-Pro-βAla-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle- leu-COOH)

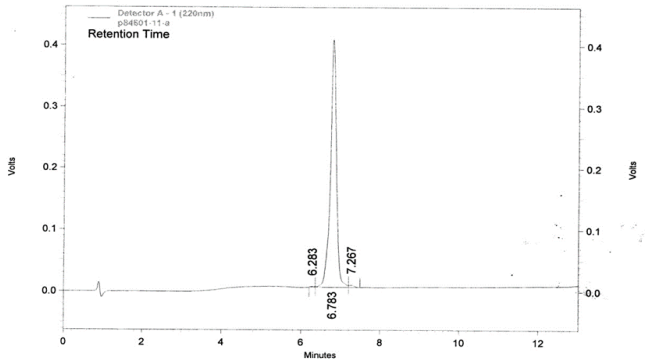
عملیات نشاندارسازی مشتق طراحی شده از نوروتنسین (5-13) با لیگاند کمکی تریسین

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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)

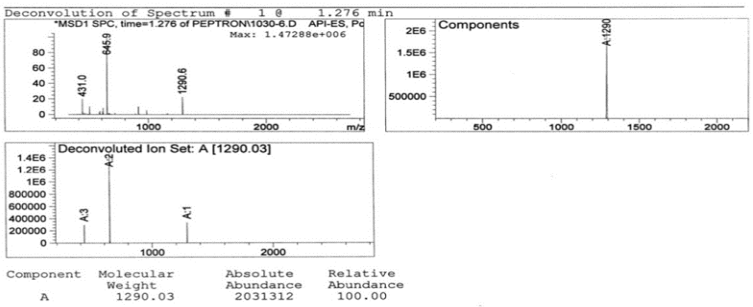
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	6.283	5934	0.138	920	0.226
2	6.783	4254637	99.153	402396	98.868
3	7.267	30392	0.708	3689	0.906
Totals		4290963	100.000	407005	100.000

نمودار شماره 1: آنالیز HPLC مشتق جدید نوروتنسین کونژوگه با HYNIC

```
=====================================================================
Injection Date  : 10/30/2014 4:40:12 PM
Sample Name     :                                   Location : FIA
Acq. Operator   :
Acq. Instrument : Instrument 1                    Inj Volume : 7 µl
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    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 PWHH:             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 %
```



Component	Molecular Weight	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	1290.03	2031312	100.00

نمودار شماره 2: طیف MS مشتق جدید نوروتنسین کونژوگه با HYNIC

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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 میلی‌گرم تریسین توزین و نیم میلی‌لیتر نرمال سالین (که 15 دقیقه به آن گاز ازت دمیده شده بود) اضافه گردید تا حل شود. سپس 25 میکروگرم پپتید از محلول استوک (یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر در آب دیو نیزه) به ویال حاوی تریسین اضافه شد. سپس 40 میکروگرم قلع (II) کلرید که در اسیدکلریک 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 پرتکنتات-99m در حجم 100 میکرولیتر زیر هود و تحت شرایط ایمنی و پشت شیشه سربی به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت 15 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی‌گراد در حمام خشک قرار گرفت.

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

نخست داخل میکرو تیوپ 15 میلی‌گرم تریسین و پنج میلی‌گرم EDDA توزین و نیم میلی‌لیتر نرمال سالین که به مدت 15 دقیقه توسط گاز ازت دمیده شده بود به آن اضافه شد تا حل شود. سپس 25 میکروگرم پپتید از محلول استوک به ویال حاوی تریسین و EDDA اضافه شد. سپس 40 میکروگرم قلع (II) کلرید که در اسیدکلریک 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 پرتکنتات-99m در حجم 50 میکرولیتر زیر هود و تحت شرایط ایمنی و پشت شیشه سربی به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد در حمام خشک قرار گرفت. قابل‌ذکر است که pH نهایی مخلوط واکنش کنترل و تقریباً خنثی بود.

کنترل کیفی و بررسی پایداری کمپلکس‌های تهیه‌شده از مشتق نوروتنسین 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 سانتی‌متر استفاده شد. هم‌چنین برای تأیید نتایج به دست آمده، خلوص رادیوپپتید سنتز شده با HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا) نیز موردبررسی قرار گرفت.

به مخلوط واکنش پس از پایان واکنش برای انجام آنالیز اجازه داده می شد تا سرد شود. نوارهای سیلیکاژل پیش از لکه‌گذاری داخل آون خشک می شدند. حجم لکه‌گذاری دو میکرولیتر در ابتدای یک سانتی‌متری نوارهای سیلیکاژل بود. نوارها پس از بالا آمدن حلال نیز خشک می شدند. حجم تزریق توسط سرنگ هامیلتون به ستون کروماتوگرافی 10 میکرولیتر بود. ستون کروماتوگرافی پیش از تزریق توسط متانول شستشو داده می شد.

در روش TLC از حلال متیل اتیل کتون برای تعیین مقدار سدیم پرتکنتات آزاد استفاده شد. در هنگام استفاده از این فاز متحرک، پیک مربوط به پپتید نشان‌دار به همراه تکنیسیم هیدرولیز و احیاشده و کمپلکس تکنسیوم-99m همراه لیگاند (های) کمکی (در صورت وجود) در R_f صفر و پیک مربوط به سدیم پرتکنتات آزاد در جلوی مسیر حرکت فاز متحرک مشاهده می‌شود. 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. هم‌چنین برای تشخیص میزان تکنسیوم-99m همراه لیگاند(های) کمکی از محلول بافرسیترات با pH

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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

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

ب) محلول 0/1درصد از اسید تری فلوئورو 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 به‌صورت گرادیانت با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود. پایداری این پپتید نشان‌دار شده در حلال نرمال سالین و در سرم انسانی موردبررسی قرار گرفت. پایداری در نرمال سالین، در زمان‌های 1، 4 و 24 ساعت بررسی شد و در هر ساعت نیز سه بار توسط نوارسیلیکاژل موردبررسی 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 جمع آوری گردید. برای پایداری در سرم انسانی، 10 میکرولیتر از نمونه با 90 میکرولیتر از سرم انسانی که از خون تازه گرفته‌شده تهیه شده بود، مخلوط گردید و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در زمان‌های ۱،۴ و 24 ساعت، با 200 میکرولیتر اتانول خالص مخلوط شد و با سرعت g 3000 در دمای چهار درجه به مدت هفت دقیقه سانتریفیوژ گردید تا رسوب حاصل شده ته نشین شود. 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:

100 × (مجموع اکتیویته رسوب و محلول فوقانی/ مقدار اکتیویته رسوب)=درصد اتصال

بررسی لیپوفیلیسیته 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 g 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:

(میزان اکتیویته‌ی لایه‌ی آبی/میزان اکتیویته لایه نرمال-اکتانول) Log P = Log

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پپتید نشاندار برای ورود به سلول

برای انجام آزمایش، سلول‌ها بیان‌کننده بالای رسپتور نوروتنسین (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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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 به‌تمامی 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 قرارگرفته 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 و30 دقیقه قرارگرفتن در انکوباتور لیز و به صورت جداگانه داخل لوله‌های مجزا جمع‌آوری شدند. در پایان کار میزان فعالیت پرتویی لوله‌های مربوطه با استفاده از دستگاه شمارش‌گر گاما اندازه‌گیری شد.

تعیین ثابت تفکیک (K_d) پپتید نشاندار

به‌منظور بررسی قدرت و تمایل اتصال به گیرنده‌های نوروتنسینی 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 به‌صورتی‌که در هر بشقابک حدود یک میلیون سلول قرار گرفت و هر بشقابک برای یک غلظت اختصاص داده شد. پس از تقریباً 24 ساعت انکوباسیون سلول ها، 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. به‌مدت یک ساعت مانند قبل در CO_2 انکوباتور و در دمای 37°C انکوبه شدند. برای تعیین اتصال غیراختصاصی، پس از گذشت زمان موردنظر تمامی بشقابک ها 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 0/1، 0/2، 0/4، 0/8، 1/6، 5، 10، 50 و 100 نانومولار بودند. پس از افزایش محلول‌ها، بشقابک های 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 جمع آوری 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 مورداستفاده ماده از نوع CD-1 بوده و در هنگام استفاده وزنی برابر 25-20 گرم داشتند. برای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

تلقیح تومور HT-29 در موش، 10^7 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 0/8-0/7 سانتی‌متر مکعب رسید، توزیع زیستی ترکیب‌های نشاندار در موش‌های توموری موردبررسی 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 پپتیدهای نشاندارسازی 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 موش ها جمع‌آوری و پس از انتقال به تیوب‌های گاما کانتر وزن و اکتیویته آن‌ها شمارش گردید. میزان دریافت اکتیویته در هر ارگان به‌صورت درصد دوز تزریقی بر وزن هر ارگان محاسبه شد. نتایج گزارش‌شده توزیع بیولوژیکی در هر ارگان، میانگینی از مقادیر مشاهده‌شده 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 پپتیدهای نشان‌دار تزریق شد. پس از گذشت دو ساعت از تزریق، موش‌ها با کتامین/زایلازین بی‌هوش شدند و تصویربرداری از آن‌ها صورت گرفت.

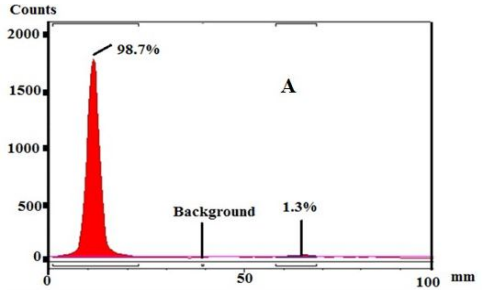
روش‌های آماری

برای محاسبه تجزیه‌وتحلیل آماری از آزمون تی دو مستقل استفاده شد. اگر مقادیر P<0/05، آزمون‌ها معنی‌دار درنظر گرفته می‌شدند.

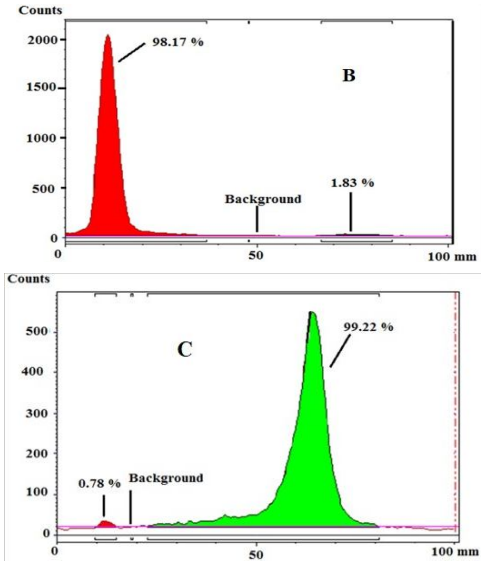
یافته‌ها

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

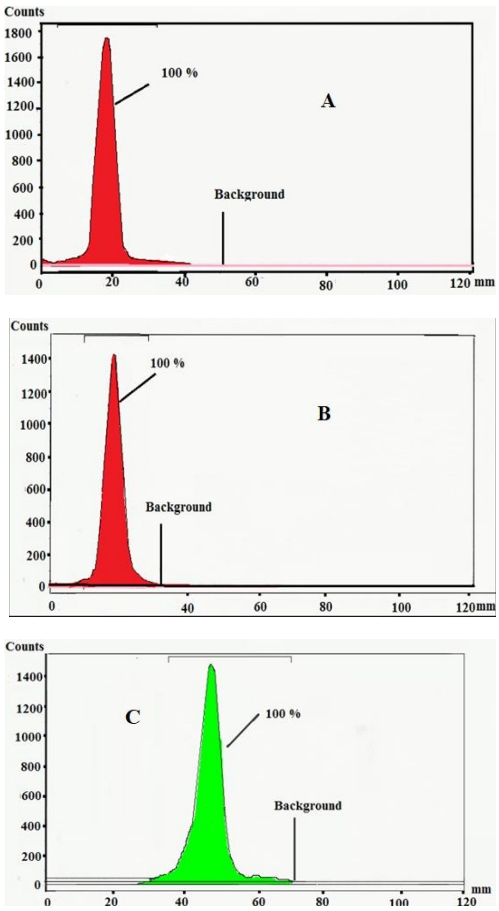
نتایج حاصل از رادیوکروماتوگرام‌های روبشگر هسته‌ای TLC مربوط به هر دو روش نشاندارسازی، بازده رادیو شیمیایی بالاتر از 95 درصد را نشان دادند. ناخالصی موجود در واکنش مربوط به تکنسیم احیا و هیدرولیز شده (RHT) است که کم‌تر از یک درصد بود (نمودار شماره 3 و 4). خلوص رادیوشیمیایی توسط رادیوکروماتوگرام‌های HPLC نیز تأیید شد (نمودار شماره 5). پایداری در نرمال سالین برای پپتید نشان‌دار با لیگاند کمکی تریسین وEDDA/ تریسین توسط نوارهای سیلیکاژل در زمان های 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).



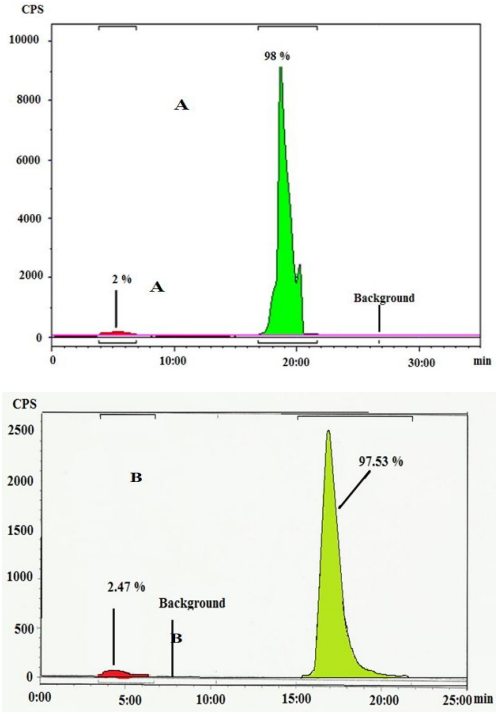
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]



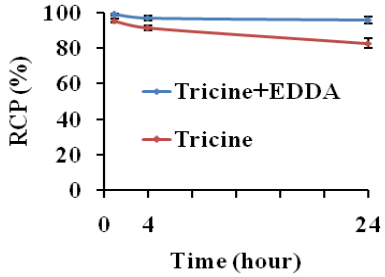
نمودار شماره 3: کروماتوگرام لایه نازک (TLC) رادیوپپتید با تریسین در حلال (A: متیل اتیل کتون، B: بافر سیترات، C: استو نیتریل: آب)



نمودار شماره 4: کروماتوگرام لایه نازک (TLC) رادیوپپتید با EDDA/ تریسین در حلال (A: متیل اتیل کتون، B: بافر سیترات، C: آمونیوم استات: متانل)



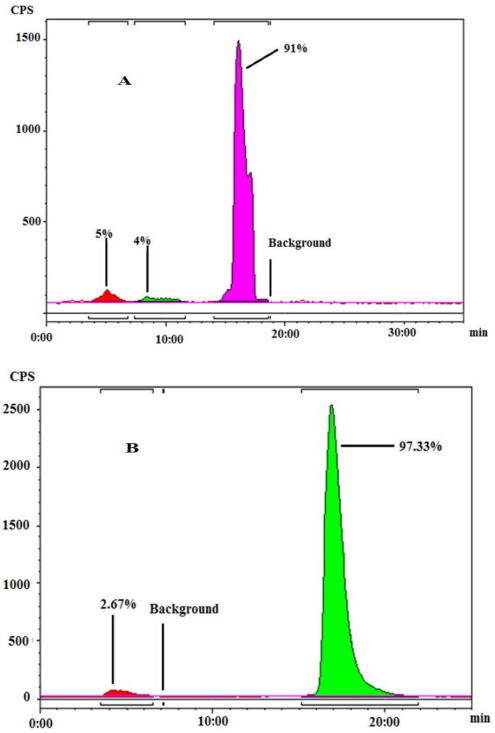
نمودار شماره 5: کروماتوگرام مایع با عملکرد بالا (HPLC) رادیوپپتید با A: تریسین، B: EDDA / تریسین



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

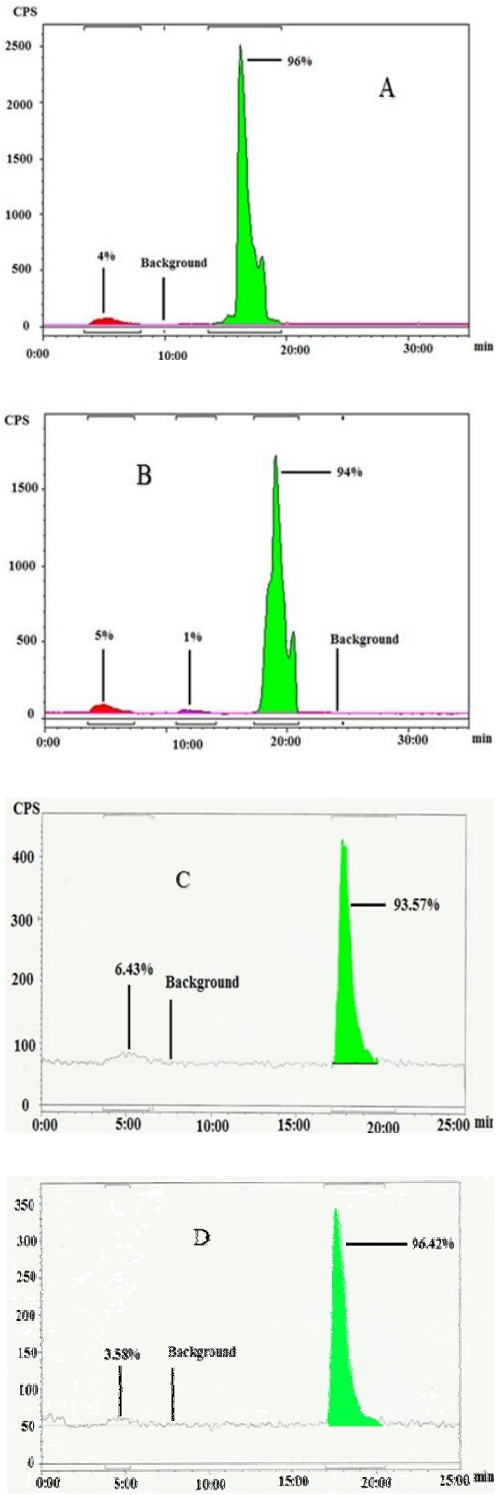
به منظور اثبات بیش‌تر پایداری در زمان 24 ساعت، آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نیز انجام شد که در نمودار شماره 7 نشان داده شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]



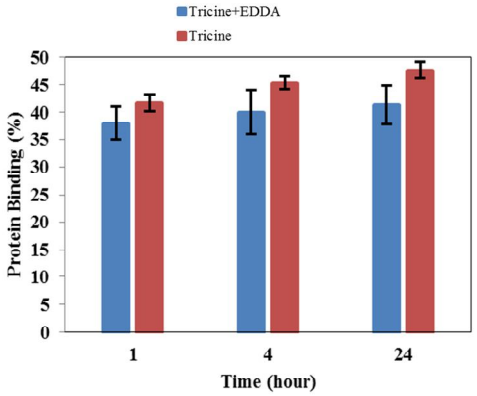
نمودار شماره 7: آنالیز HPLC در سالین پس از 24 ساعت مربوط به پایداری پپتید نشاندار با A: تریسین، B:EDDA / تریسین

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 زمان های یک و چهار ساعت توسط آنالیز HPLC نیز موردبررسی قرار گرفت که برای تریسین به ترتیب درصد بازده رادیو شیمیایی 96 و 94 درصد و برایEDDA / 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]



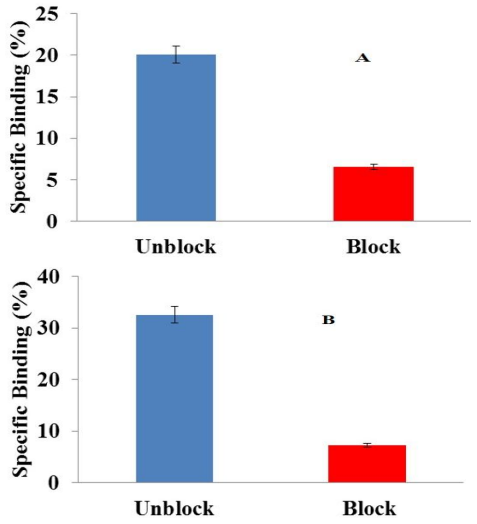
نمودار شماره 9: درصد اتصال پروتئینی پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/ تریسین

بررسی لیپوفیلیسیته یا اندازه‌گیری log p

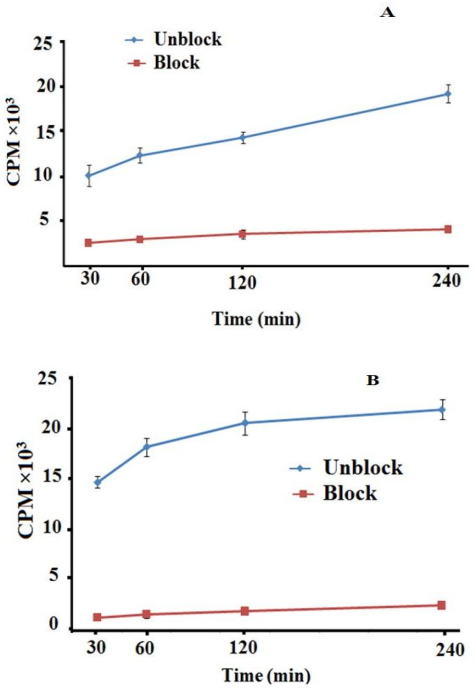
نتایج نشان داد که ضریب تقسیم پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/ تریسین به ترتیب 3/78±0/18- و 3/61±0/16- است؛ که نشان از هیدروفلیسیته بالای آن‌ها است.

بررسی اتصال اختصاصی و تمایل پپتید نشاندار برای ورود به سلول

درنتیجه مطالعه بلاک کردن گیرنده‌ها، اتصال پپتید نشان‌دار شده با لیگاند کمکی تریسین وEDDA / تریسین در سلول‌های بلوک نشده به سلول‌های بلوک شده تفاوتی معنی‌دار بود ($p<0/05$) که نشان‌دهنده اتصال اختصاصی است (نمودار شماره 10). نتایج نشان داد که ورود پپتید نشاندار با EDDA/ تریسین نسبت به تریسین بیش 1/5 برابر است. با بررسی کلی نتایج می‌توان گفت که پپتید نشاندار با EDDA/ تریسین پس از طی زمان چهار ساعت به مقدار تقریبی حدود 18 درصد وارد سلولهای HT-29 می‌شود، درصورتی‌که این مقدار برای پپتید نشان‌دار با تریسین به تنهایی نه درصد است (نمودار شماره 11).



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

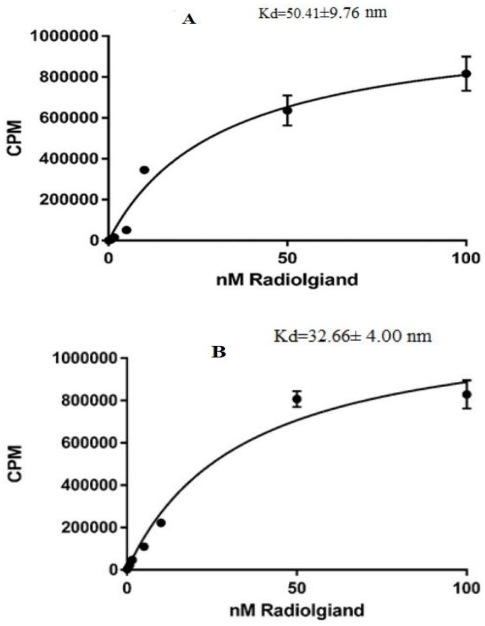


نمودار شماره 11: تمایل پپتید نشاندار برای ورود به درون سلول‌های HT-29 با A: تریسین، B:EDDA/ تریسین. مقادیر بصورت میانگین± احراف استاندار نمایش داده شده است و تعداد بشقابک سلولی در هر بخش سه عدد بوده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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 نوروتنسینی به ترتیب، 9/76±50/41 و 4/00±32/66 نانو مولار تعیین شد (نمودار شماره 12).

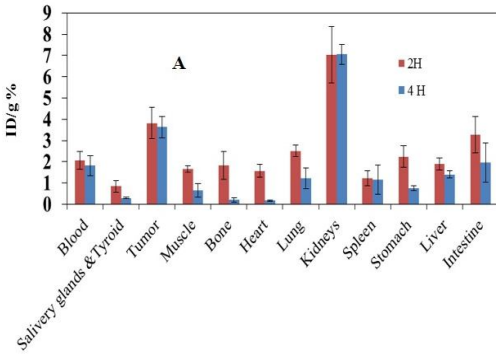


نمودار شماره 12: ثابت تفکیک پپتید نشاندار به گیرنده‌های نوروتنسین در سطح سلول های HT-29 با A: تریسین، B:EDDA / تریسین

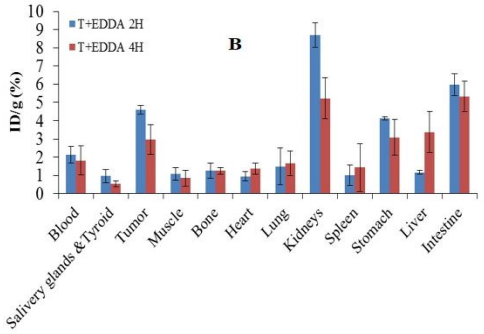
بررسی توزیع زیستی پپتید نشان‌دار در موش حامل تومور HT-29

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 پیدا کرد به‌طوری‌که 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. ازاین‌رو 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 قابل‌ملاحظه 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 به‌طور تقریبی نصف می‌شود و نسبت دفع کلیوی پپتید به دفع کبدی برخلاف وقتی‌که فقط با تریسین نشاندار می‌شود کاهش می‌یابد. با بلاک گیرنده‌ها با تزریق پپتید سرد پیش از تزریق پپتید نشاندار نسبت غیر بلاک به بلاک بیش‌تر و برابر 7/55 است (نمودار شماره 13 و جدول شماره 2). نتایج به دست آمده برای هر ارگان یا بافت به‌جز روده که تنها شامل درصد دوز تزریقی است، به‌صورت درصد دوز تزریقی در هر گرم است و به‌صورت انحراف استاندارد± میانگین نمایش داده شده است. تعداد موش بررسی‌شده در هر زمان سه عدد بوده است.



[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]



نمودار شماره 13: توزیع بیولوژیکی پپتید 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 بررسی‌شده در هر زمان سه عدد بوده است.

جدول شماره 1: توزیع بیولوژیکی پپتید 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	0/46±2/13	0/64±1/14	0/41±2/06	0/03±1/80
تیروئید و غدد بزاقی	0/35±0/95	0/27±0/67	0/26±0/84	0/26±3/07
تومور	0/23±4/58	* 0/32±0/61	0/74±3/82	* 0/05±1/11
عضله	0/34±1/08	0/4±0/89	0/14±1/65	0/19±1/44
استخوان	0/41±1/26	0/51±1/08	0/65±1/84	0/14±1/45
قلب	0/24±0/94	0/52±0/99	0/29±1/56	0/13±1/12
ریه	1±1/49	0/82±1/29	0/26±2/50	0/09±2/08
کلیه ها	0/67±8/70	0/84±5/78	1/33±7/03	0/13±10/43
طحال	0/56±1/01	0/48±0/73	0/36±1/22	0/1±1/15
معده	0/08±4/12	0/4±1/44	0/49±2/24	1/14±3/63
کبد	0/1±1/16	0/48±1/01	0/28±1/90	0/12±2/02
روده‌ها	0/6±5/98	1/23±2/77	0/85±3/27	1/68±4/96

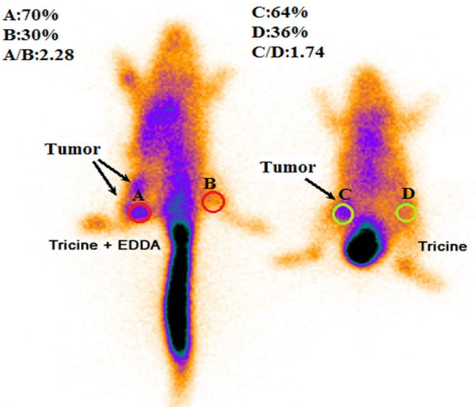
*: تفاوت بین بلاک و بلاک نشده معنا دار است (P<0/05)، روده به صورت درصد دوز تزریقی (%ID) بیان شده است.

جدول شماره 2: نسبت جذب تومور به ارگان‌ها در توزیع بیولوژیکی پپتید 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	
	EDDA/ تریسین	تریسین	EDDA/ تریسین	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 پپتید نشاندار با EDDA/ تریسین نسبت به پپتید نشان‌دار با تریسین به بیش‌تر است. با استفاده از روش ROI(Region of interest) نسبت تومور به عضله برای موش با پپتید 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 پپتید نشان‌دار با تریسین (سمت راست) و EDDA/ تریسین (سمت چپ)

بحث

قبلاً تکنسیوم -99m برای نشاندارسازی نوروتنسین کونژوگه شده با HYNIC [HYNIC-[βAla7-Tle12] neurotensin (5-13)] در حضور EDDA/ تریسین به‌منظور 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 به‌صرفه بودن آن، منجر به انتخاب آن برای نشاندار سازی این پپتیدی شد(21،20). در این مطالعه، توانایی هدف‌گیری تومور این پپتید کونژوگه HYNIC با استفاده از روش نشاندار تکنسیوم -99m در حضور تریسین نشان داده شد. هم‌چنین توانایی هدف‌گیری تومور پپتید نشاندار شده با تریسین و EDDA/ تریسین باهم مقایسه گردید. نتایج نشان داد که این پپتید کونژوگه HYNIC در حضور هر دو سیستم هم لیگاند با بازده رادیوشیمیایی بالا به‌طور مؤثر با تکنسیوم -m99

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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

این پایداری کم‌تر با تریسین می‌تواند به علت داشتن فرم‌های ایزومری است که معمولاً کمپلکس‌های با پایداری کم‌تری با تکنسیوم-99m تشکیل می‌دهد(16). پایداری پپتیدهای نشاندار شده در سرم انسانی یکی از عواملی است که پایداری درون‌تنی رادیو داروهای پپتیدی را تعیین می‌کند. 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 سلول‌های 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 بیش‌تر بود (نمودار شماره 10) و اتصال اختصاصی با تریسین 13/5 درصد در مقابل با 25/3 درصد باEDDA / تریسین بود. این نشان می‌دهد که پپتید نشاندار با تریسین و EDDA/ تریسین نسبت به گیرنده‌های نوروتنسینی اتصال اختصاصی دارند. ثابت تفکیک پپتید نشاندار با تریسین بیش‌تر از EDDA/تریسین است که این نشان‌دهنده میل ترکیبی بالاتر پپتید نشاندار با EDDA/ تریسین به گیرنده‌های نوروتنسینی است. بااین‌وجود 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، شلات‌کننده دومنظوره یا لیگاند کمکی مربوط نمی‌شود. الشکر و همکاران میل ترکیبی مشابهی را برای این فارماکوفور از طریق نشاندارکردن توسط رادیو ایزوتوپ‌های مختلف و شلات کننده دومنظوره گزارش کرده اند (DTPA و ایندیوم-111 با ثابت تفکیک 2±16 نانومولار، DOTA و ایندیوم-111 با ثابت تفکیک 1±15 نانو مولار، DOTA با ثابت تفکیک 2±14 نانومولار)؛ اما ثابت تفکیک گزارش شده با همان فارماکوفور با DOTA و ایتریوم-90 با ثابت تفکیک 5/6±0/7 نانومولار این فرضیه را به چالش می‌کشد(6). میزان ورود پپتید نشاندار با EDDA/ تریسین در مقایسه با پپتید نشاندار با تریسین بیش 1/5 برابر بیش‌تر پس از گذشت چهار ساعت مجاورت با سلول‌های HT-29 بود. این نتایج در مقایسه با مطالعات قبلی تأیید می‌کند که پپتیدها در مقایسه با قطعات آنتی بادی و مولکول‌های افی بادی، به نسبت بیش‌تر وارد سلول می‌شوند. البته باید توجه داشت که تغییرات کمی روی پپتیدهای کوچک می‌تواند سرعت ورود آن‌ها به سلول را تغییر دهد(22).

بررسی توزیع بیولوژیک پپتید نشاندار با تریسین نشان داد که بیش‌ترین میزان از تجمع پپتید نشاندار در کلیه‌ها بوده است که نشان‌دهنده مسیر دفعی این رادیوپپتید است. تجمع کم اکتیویته در معده و تیروئید حیوان می‌توان گفت که پپتید نشاندار در شرایط درون تنی پایدار است و آزادسازی پرتکنتات سدیم در بدن موش ناچیز است. تجمع در تومور دو و چهار ساعت پس از تزریق پپتید به‌ترتیب برابر با 3/82 و 3/63 (%ID/g) بوده است. اگرچه در توزیع زیستی پروتئین‌های نشاندار شده کوچک (کم‌تر 60 کیلودالتون) تجمع در کلیه‌ها یک الگوی متداول است(23). اما به نظر می‌رسد که پپتیدها با حضور اسیدهای آمینه با بار مثبت در توالی تجمع بالایی در کبد می‌توانند داشته باشد(24). باید توجه داشت که استفاده از شلاتورها و لیگاندهای کمکی متفاوت، می‌تواند روی الگوی توزیع زیستی رادیو داروها مؤثر باشد. برای مثال مشتقات HYNIC می‌توانند ترکیباتی با قدرت هیدروفیلی بیش‌تر تولید کرده، در پایان تجمع در کلیه در این مشتقات نسبت به ترکیباتی که از شلاتورهای دیگر استفاده می‌کنند بیش‌تر 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 کاهش‌یافته و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

نسبت تومور در حالت غیر بلاک به بلاک 3/44 رسیده است. این یافته‌ها تأیید می‌کنند که اتصال پپتید نشاندار به گیرنده‌های نوروتنسینی به‌صورت 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 طوری‌که 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 به‌صورت 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 تشکیل‌شده 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 رسپتورهای مورد هدف نقش مهمی در این امر ایفا می‌کند(27). در یک مطالعه یک مشتق جدید از نوروتنسین با دو سیستم کولیگاندی تریسین و EDDA/ تریسین نشان‌دارسازی شد(8). نسبت تومور به ارگان‌های غیر هدف برای رادیوپپتید با تریسین کم‌تر از رادیوپپتید نشاندارشده 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 لیگاندهای کمکی EDDA/تریسین و تریسین را مقایسه می‌کند. در برخی مطالعات نشان داده شد که پپتیدکونژوگه با HYNIC نشاندارشده با EDDA/ تریسین جذب توموری بالاتر و خواص فارماکوکنتیک بهتری نسبت به تریسین داشته که در پایان کیفیت تصویربرداری بهتر بوده است(28). در صورتی‌که در مطالعات دیگر نتیجه برعکس بود(18،29،30). این می‌تواند به دلیل تفاوت در توزیع اکتیویته رادیو پپتیدها در پس‌زمینه باشد. در این مطالعه باوجود ویژگی‌های تقریباً مشابه ازلحاظ رادیو شیمیایی برای هردو کمپلکس پپتیدی، کمپلکس پپتیدی نشاندار با لیگاند کمکی EDDA/ تریسین ازلحاظ شرایط درون تنی ویژگی‌های مناسب‌تری نسبت به کمپلکس پپتیدی نشاندارباً 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

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 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-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 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 ^{99mTc}-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. ^{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.
17. Khodadust F, Ahmadpour S, Aligholikhamseh N, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. Corrigendum to "An improved ^{99mTc}-HYNIC-(Ser)3-LTVSPWY peptide with EDDA/tricine as co-ligands for targeting and imaging of HER2 overexpression

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]

tumor" [EJMECH 144, (2018) 767-773]. Eur J Med Chem 2018; 157: 782.

18. Shaghaghi 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-acetylmercaptoacetyltriglycline: 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 ^{99mTc}-HYNIC-EDDA/tricine-(Ser)-D4 Peptide for Tumor Targeting. Curr Radiopharm 2017; 10(2): 123-130.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-18]