

^{99m}Tc(CO)₃-Labeled 1-(3-Nitropyridin-2-yl) Piperazine as Potential Radioligand for 5-HT₇ Receptors

Sajjad Molavipordanjani

Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 7, 2024; Accepted December 11, 2024)

Abstract

Background and purpose: The serotonin receptor (5-HTR) family includes seven distinct members, with the serotonin seven receptor (5-HT₇R) being the newest addition to this family. The 5-HT₇R contributes to different physiological and pathological processes including glioblastoma multiforme (GBM). The standard treatment for GBM involves a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, GBM tumors are highly diffuse and exhibit a significant risk of recurrence. As a result, the use of advanced monitoring techniques, such as nuclear medicine imaging, is essential. This study aims to develop an effective radiotracer for imaging 5-HT₇R overexpression in GBM by utilizing a radiolabeled aryl piperazine derivative (^{99m}Tc(CO)₃-[5]).

Materials and methods: In this experimental study, compound **5** 1-(3-nitropyridin-2-yl) piperazine was designed, synthesized, and characterized, then radiolabeled with *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ to produce ^{99m}Tc(CO)₃-[5]. Quality control tests, including high- γ performance liquid chromatography (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC) were performed to determine the radiochemical purity. The specific binding study was performed using various cell lines, including U-87 MG, MCF-7, SKBR3, HT-29, and A549. The affinity of ^{99m}Tc(CO)₃-[5] for 5-HT₇R was evaluated using the U87-MG cell line and the maximum binding capacity (B_{max}) and dissociation constant (K_d) were calculated.

Results: The initial radiochemical purity of ^{99m}Tc(CO)₃-[5] was greater than 95% (RCP>95%). This radiotracer displayed moderate affinity for the U87-MG cell line's 5-HT₇R and lower affinity for MCF-7, SKBR3, HT-29, and A549 cell lines. The calculated B_{max} and K_d of the radioligands were 48±9.23nM and 2.94±0.09×10⁵.

Conclusion: Compound **5** can be quantitatively radiolabeled with *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ resulting in the radiotracer (^{99m}Tc(CO)₃-[5]). The initial radiochemical purity of this radiotracer is approximately 95%; however, its stability decreases over time. ^{99m}Tc(CO)₃-[5] recognizes the 5-HT₇R on the surface of U87-MG cells and binds to this receptor with moderate affinity.

Keywords: imaging, SPECT, U87-MG, serotonin receptor, glioblastoma

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 34 (240): 14-25 (Persian).

Corresponding Author: Sajjad Molavipordanjani - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: Sajjad.molavi@gmail.com)

۱- (۳- نیتروپریدین-۲- ایل) پپرازین نشاندار شده با تکنسیوم تری کربونیل به عنوان رادیولیگاند بالقوه برای گیرنده های 5-HT₇

سجاد مولوی پردنجانی

چکیده

سابقه و هدف: خانواده گیرنده سروتونین (5-HT₇) شامل ۷ عضو مختلف است. گیرنده سروتونین ۷ (5-HT₇R) جدیدترین عضو این خانواده است. 5-HT₇R در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف از جمله گلیوبلاستوما مولتی فرم (GBM) دخالت دارد. درمان استاندارد GBM ترکیبی از جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی است. با این حال، تومورهای GBM بسیار پراکنده هستند و احتمال عود بالایی دارند، بنابراین استفاده از تکنیک های نظارتی مختلف مانند تصویربرداری پزشکی هسته ای ضروری است. هدف از این مطالعه ارائه یک رادیوتریسر (Radiotracer) مناسب برای تصویربرداری از بیان بیش از حد 5-HT₇R در گلیوبلاستوما مولتی فرم با استفاده از مشتق آریل پپرازین نشاندار شده (5-[^{99m}Tc(CO)₃]) است.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر، ۱- (۳- نیتروپریدین-۲- ایل) پپرازین (ترکیب ۵) طراحی، سنتز، شناسایی و با $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ نشاندار شد و 5-[^{99m}Tc(CO)₃] با خلوص رادیوشیمیایی کمی به حد دست آمد. آزمایش های کنترل کیفیت شامل HPLC و TLC برای تعیین خلوص رادیوشیمیایی انجام شد. مطالعه اتصال اختصاصی با استفاده از رده های سلولی مختلف (U-87 MG، MCF-7، SKBR3، HT-29، A549) انجام شد. میل ترکیبی 5-[^{99m}Tc(CO)₃] به 5-HT₇R بیان شده در سطح رده سلولی U87-MG با استفاده از ثابت تفکیک (Kd) و Bmax ارزیابی شد.

یافته ها: خلوص رادیوشیمیایی اولیه 5-[^{99m}Tc(CO)₃] بیش از ۹۵ درصد بود. این رادیوتریسر تمایل متوسطی را به گیرنده های 5-HT₇R در رده سلولی U87-MG نشان داد، در حالی که تمایل کمی برای اتصال به SKBR3، MCF-7، HT-29 و A549 دارد. B_{max} و ثابت تفکیک (Kd) به ترتیب ۴۸±۹/۲۳ نانو مولار و ۲/۹۴±۰/۰۹×۱۰^۵ محاسبه شدند.

استنتاج: براساس یافته های این مطالعه، ترکیب ۵ را می توان به صورت کمی با $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ نشاندار کرد. رادیوتریسر تهیه شده 5-[^{99m}Tc(CO)₃] به گیرنده های 5-HT₇R در رده سلولی U87-MG با میل ترکیبی متوسط متصل می شد.

واژه های کلیدی: تصویربرداری، U87-MG، SPECT، گیرنده سروتونین، گلیوبلاستوما

مقدمه

یکی از قدیمی ترین و متنوع ترین گروه های گیرنده های مغزی، خانواده گیرنده های ۵- هیدروکسی ۷ زیر کلاس شامل گیرنده های 5-HT_{1A-F}، 5-HT_{2A-C}، تریتامین یا همان سروتونین (5-HT) است. این خانواده به

مؤلف مسئول: سجاد مولوی پردنجانی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی E-mail: Sajjad.molavi@gmail.com

استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۸/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۹/۲۱

5-HT₃، 5-HT₄، 5-HT_{5A-B}، 5-HT₆ و 5-HT₇ تقسیم می‌شود. گیرنده سروتونین شماره ۷ (5-HT₇R) جدیدترین عضو این خانواده است و میزان بیان بالایی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) و دستگاه گوارش (GI) دارد (۲،۱). شواهد نشان می‌دهد که این گیرنده از نظر عملکردی در طیف وسیعی از سرطان‌ها، از جمله کارسینوم کبدی (۳)، سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی (۴)، سرطان‌های ریه با سلول غیرکوچک (۵،۶) و گلیوبلاستوما دخالت دارد (۷). در همین راستا، این گیرنده به عنوان یک هدف بالقوه برای درمان و تشخیص سرطان توجه زیادی را به خود جلب کرد.

گلیوما یکی از شایع‌ترین تومورهای مغزی است که تقریباً ۵۰ درصد از سرطان‌های مغز را تشکیل می‌دهد. به دلیل ناهمگونی قابل توجه آن‌ها، مدیریت این تومورها دشوار است و پیش‌آگهی ضعیفی دارند. خط اول درمان گلیوبلاستوما مولتی‌فرم (GBM) جراحی است و پس از آن رادیوتراپی و شیمی‌درمانی انجام می‌شود (۸). با این حال، تومورهای GBM بسیار پراکنده هستند که منجر به درصد بالای عود بیماری بعد از درمان می‌شود (۹)، بنابراین بیماران باید به طور مداوم با تکنیک‌های تشخیصی مختلف مانند توموگرافی کامپیوتری (CT) و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) تحت نظر باشند. عیب اصلی استفاده از CT و MRI این است که نمی‌توانند عود را از نکروز ناشی از درمان متمایز کنند (۱۰)، از این رو استفاده از روش‌های تصویربرداری پزشکی هسته‌ای مانند توموگرافی گسیل پوزیترون (PET) و توموگرافی کامپیوتری گسیل تک‌فوتون (SPECT) می‌تواند مفید باشد. رادیوتریسرهاى مختلف PET و SPECT، از جمله فلودئوکسی‌گلوکز ([¹⁸F]-FDG)، تالیوم-²⁰¹Tl، [^{99m}Tc]MIBI ([^{99m}Tc]-sestamibi)، [^{99m}Tc]-هگزامتیل پروپیلن آمین-اکسیم ([^{99m}Tc]HMPAO) و [^{99m}Tc]-تروفسمین کاربرد بالینی برای ارزیابی و نظارت GBM دارد. برای این منظور، رادیو داروهای PET و

SPECT می‌توانند عود بیماری را از نکروز ناشی از درمان تشخیص دهند. از این رو، آن‌ها می‌توانند معایب CT و MRI را پوشش دهند. رادیو ردیاب‌های مبتنی بر اسید آمینه مانند [¹¹C]-MET، [¹⁸F]-FET و [¹⁸F]-FDOPA برای درجه‌بندی و پیش‌آگهی GBM مفید هستند. با این حال، چربی دوستی کم آن‌ها باعث جذب ناکافی مغز می‌شود. قابل توجه، [¹¹C]DR4446، [¹⁸F]SB-269970، [¹⁸F]2FP3 و [¹¹C]Cimbi-806 به عنوان رادیوتریسر انتخابی 5-HT₇R معرفی شده‌اند (۱۶-۱۱). قابل ذکر است که این رادیوتریسرها از افینیت کم، سنتز و خالص‌سازی پیچیده برخوردار هستند و جذب کم مغز (به دلیل تعامل با P-گلیکوپروتئین) پایینی دارند. بنابراین، تحقیقات برای یافتن یک عامل تصویربرداری مناسب 5-HT₇R ادامه دارد (۲۰-۱۷).

طیف گسترده‌ای از ترکیبات به عنوان لیگاندهای بالقوه 5-HT₇R معرفی شده‌اند. در میان آن‌ها، مشتقات آریل پیرازین بسیار امیدوارکننده هستند. مطالعه قبلی ما نشان می‌دهد که مشتقات پریدیل پیرازین و فیل پیرازینیل می‌توانند 5-HT₇R را تشخیص دهند (۲۳-۲۱). نقطه ضعف اصلی مشتقات پریدیل پیرازین نشاندار شده با ^{99m}Tc در مطالعه قبلی، جذب کم آن‌ها در بافت مغز بود. بنابراین، در این مطالعه ابتدا ۲-نیتروپریدیل پیرازین با استفاده از تکنسیوم تری کرینیل نشاندار می‌شود ([^{99m}Tc(CO)₃]-[5]) و سپس تست‌های کنترل کیفیت، از جمله خلوص اولیه رادیوشیمیایی (RCP) و پایداری سرم و سالی، با استفاده از HPLC و TLC مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و اتصال ویژه ترکیب نشاندار شده به رده‌های سلولی مختلف (U-87 MG، MCF-7، SKBR3، HT-29، A549) انجام می‌شود. برای ارزیابی میل ترکیبی [^{99m}Tc(CO)₃]-[5] نسبت به 5-HT₇R در رده سلولی U87-MG، Bmax و ثابت تفکیک (Kd) مورد محاسبه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

اطلاعات عمومی

در مطالعه تجربی حاضر، تمام مواد شیمیایی از شرکت‌های Sigma-Aldrich یا Merck خریداری شده و به همان صورت استفاده شدند. پیشرفت و تکمیل واکنش‌ها توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با ورقه‌های آلومینیومی F254 ۶۰ سیلیکاژل زیر لامپ UV (۲۵۴ نانومتر) بررسی شد. نقاط ذوب در لوله‌های موین باز با استفاده از دستگاه نقطه ذوب FALC (FALC، ایتالیا) تعیین شد. برای ثبت NMR از طیف‌سنج Bruker 500 استفاده شد و شیفت‌های شیمیایی به صورت δ (ppm) ارائه می‌شوند. شکافتگی پیک‌ها با یک حرف تک (s)، دوتایی (d)، سه‌گانه (t) یا چندگانه (m) اختصاص داده می‌شود. طیف جرمی ترکیبات با استفاده از آشکارساز انتخابی جرم (USA, CA, HP 5937 Agilent Technologies) به دست آمد. سدیم پرتکنات ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) از یک ژنراتور رادیونوکلئید $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (ایزوتوپ پارس، تهران، ایران) با استفاده از نرمال سالین به عنوان شوینده دوشیده شد. رادیواکتیویته نمونه‌ها (In vitro و in vivo) با سیستم گاما شمارنده (دلشید، تهران، ایران) مجهز به آشکارساز (NaI(Tl)) اندازه‌گیری شد.

کروماتوگرام نمونه‌ها بر روی سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس تحلیلی (Knauer Germany, RP-HPLC) مجهز به پیش‌ستون، Eurospher 100-5، ستون C18 با ابعاد $4/6 \times 250$ میلی‌متر و آشکارساز گاما Lablogic ثبت شد. کروماتوگرام رادیوتریسرها با نرم افزار تجزیه و تحلیل تصویر لورا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یک سیستم حلال متشکل از آب (حلال A) و استونیتریل (حلال B) به عنوان شوینده استفاده شد. گرادیان با حلال A و B به شرح زیر اجرا شد: ۵-۱۰ دقیقه، ۱۰۰ درصد A؛ ۲۵-۵ دقیقه، ۱۰۰ درصد A تا ۱۰۰ درصد B؛ ۳۰-۲۵ دقیقه، ۱۰۰ درصد B تا ۱۰۰ درصد C؛ زمان کل ۳۰ دقیقه تمام

حلال‌ها قبل از کروماتوگرافی فیلتر و گاز زدایی شدند. سرعت جریان اعمال شده ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

سنتز لیگاند

سنتز لیگاند شامل چندین مرحله می‌باشد که در پژوهش قبلی ما گزارش شده است (۲۲). در اینجا به‌طور خلاصه به سنتز ترکیب لیگاند نهایی اشاره می‌شود. محلول کلرونیتروپیریدین (۶/۶۵۷ گرم، ۴۲ میلی‌مول) در استونیتریل (۵۰ میلی‌لیتر) به صورت قطره‌ای به محلول پیرازین (۹/۳ گرم، ۱۰۵ میلی‌مول) در استونیتریل (۲۰۰ میلی‌لیتر) در دمای اتاق اضافه شد. پس از ۴ ساعت، تکمیل واکنش توسط TLC تایید شد. محصول خام با کروماتوگرافی ستونی با استفاده از MeOH/DCM (۵:۹۵) خالص شد. پس از خالص‌سازی، ۸ گرم از ترکیب ۵ (بازده < ۹۱ درصد) به دست آمد (۲۲).

mp 84-86 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.12 (s, 1H, NH piperazine), 2.95 (m, 4H, CH_2 piperazine ring), 3.41 (m, 4H, CH_2 piperazine ring), 6.72 (dd, 1H, $J = 8.0$ and 4.8 Hz, H-5 pyridine ring), 8.10 (dd, 1H, $J = 8.0$ and 1.6 Hz, H-4 pyridine ring), 8.30 (dd, 1H, $J = 4.8$ and 2.0 Hz, H-6 pyridine ring). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 45.79 (2C, piperazine), 49.27 (2C, piperazine), 113.24 (1C, C-5 pyridine ring), 132.81 (1C, C-3 pyridine ring), 135.65 (1C, C-4 pyridine ring), 151.76 (1C, C-6 pyridine ring), 152.97 (1C, C-2 pyridine ring). MS (m/z, %): 208 (M^+ , 11), 191 (5), 178 (10), 161 (28), 152 (5), 146 (15), 136 (33), 120 (100), 107 (22), 93 (27), 85 (27), 79 (58), 69 (27), 56 (971). Anal. Calcd. for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 51.92; H, 5.81; N, 26.91. Found: C, 51.83; H, 5.92; N, 26.83.

نشانداری سازی

آماده‌سازی $fac\text{-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

پیش‌ساز نشانداری سازی $fac\text{-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ طبق روش گزارش شده قبلی با تغییرات جزئی سنتز شد. به‌طور خلاصه، سدیم کربنات (۵/۵ میلی‌گرم) در ۱/۲ میلی‌لیتر آب برای تزریق حل شد. سپس، محلول به یک ویال شیشه‌ای مهر و موم شده با ورودی و خروجی گاز

منوکسید کربن و NaBH_4 (به عنوان عامل کاهشدهنده، ۶ میلی گرم)، دی هیدرات تارتارات سدیم (به عنوان لیگاند انتقال، ۱۵ میلی گرم) اضافه شد. فشار گاز منوکسید کربن در حدود ۳-۵ اتمسفر حفظ شد و دما به ۸۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت. در حالی که گاز CO در حال تزریق بود، $\text{Na}^{99\text{mTc}}\text{CO}_4$ تازه دوشیده شده به میزان ۱۰ میلی کوری به محلول اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه، ورودی گاز منوکسید کربن برداشته شد و محلول واکنش تا دمای اتاق خنک شد. pH محلول واکنش با استفاده از یک محلول خنثی کننده متشکل از ۱۸۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۱ نرمال و ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱ مولار بر روی ۸/۵ تنظیم شد (۲۴).

نشاندسازی

محلولی از ترکیب ۵ با غلظت ۵ میلی مولار در سالیان بافر فسفات و اتانول با pH=۷/۴ تهیه شد. برای تهیه رادیوتریسره های نهایی، ۱۰ میکرولیتر از محلول لیگاند در یک میکرولوله قرار داده شد و محلول $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ با حجم حدود ۵۰ میکرولیتر و اکتیویته حدود ۲۰ مگابکرل به آن اضافه شد و حجم نهایی با استفاده از بافر فسفات و اتانول به ۱۰۰ میکرولیتر رسید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس خلوص رادیوشیمیایی یا همان RCP رادیولگاندها $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ توسط RP-HPLC و ITLC تعیین شد (۲۳).

پایداری در محلول سالیان

۱۰۰ میکرولیتر $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ (۱۰MBq ~ با نرمال سالیان (۹۰۰ μL) رقیق شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مقاطع زمانی مختلف (۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه)، RCPs نمونه ها با RP-HPLC بررسی شد.

پایداری در سرم موش

پایداری $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ در سرم موش با انکوبه کردن در ۲۵۰ میکرولیتر سرم موش در دمای ۳۷ درجه

سانتی گراد تا ۲ ساعت اندازه گیری شد. سپس سرم دو بار با اتانول (۱:۱) مخلوط شد تا تمام پروتئین ها رسوب کنند. نمونه ها به مدت ۱ دقیقه مخلوط و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. بخش رویی جدا شد و توسط RP-HPLC و TLC مورد سنجش قرار گرفت.

تعیین Log D

برای تعیین ضرایب تقسیم $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ میزان ۵۰ میکرولیتر با اکتیویته ۱۰ مگابکرل به مخلوطی از ۱-۱ کتانول و آب (۱۰۰۰ میکرولیتر کتانول و ۹۵۰ میکرو لیتر بافر فسفات سالیان با pH=۷/۴) اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه به هم زده شد و مخلوط شیری به دست آمد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا فازهای آلی و آبی جدا شوند. سپس رادیواکتیویته فاز آلی (۵۰ میکرولیتر) و فاز آبی (۵۰ میکرولیتر) با استفاده از شمارنده گاما اندازه گیری شد. آزمایش سه بار تکرار شد و Log D برای $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ طبق رابطه شماره ۱ محاسبه شد:

آزمایش اتصال ویژه در شرایط آزمایشگاهی

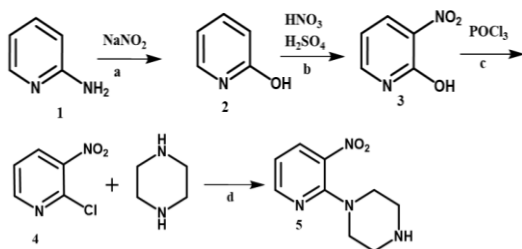
اتصال اختصاصی سلولی $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ به رده های سلولی مختلف مانند MCF-7، U-87 MG، SKBR3 و HT-29 مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا سلول ها (۱۰^۵ × ۱/۰ سلول) در یک ردیف از صفحات ۱۲ چاهی (چهار چاهک برای هر رده سلولی) با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 (۱ میلی لیتر) حاوی ۱۰ درصد (v/v) سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco) به عنوان محیط کشت، کشت داده شدند. قبل از آزمایش، سلول ها در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در روز آزمایش، محیط کشت سلولی به آرامی تخلیه شد و با یک محیط کشت سرد بدون FBS شستشو داده شد. محلولی از $^{99\text{mTc}}\text{CO}_3-[\text{5}]$ در محیط کشت سلولی عاری از FBS با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار

رادایواکتیویته اتصال از رادایواکتیویته در سلول‌های مسدود شده تعیین شد. در مرحله بعد، اتصال ویژه برای هر لیگاند رادیویی در هر غلظت با کم کردن اتصال غیر اختصاصی از کل اتصال اندازه‌گیری شد. در نهایت، K_D و B_{max} برای $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ با تحلیل رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم افزار 8 GraphPad Prism (نسخه ۸، ۰، ۲) محاسبه شد.

یافته‌ها

سنتز ترکیب ۵

ترکیب ۵ بر اساس گزارش‌های قبلی سنتز شد و مورد ارزیابی و شناساسایی قرار گرفت. فرآیند کلی سنتز در شمای (تصویر شماره ۱) قابل مشاهده است.



تصویر شماره ۱: شمای کلی سنتز ترکیب شماره ۵

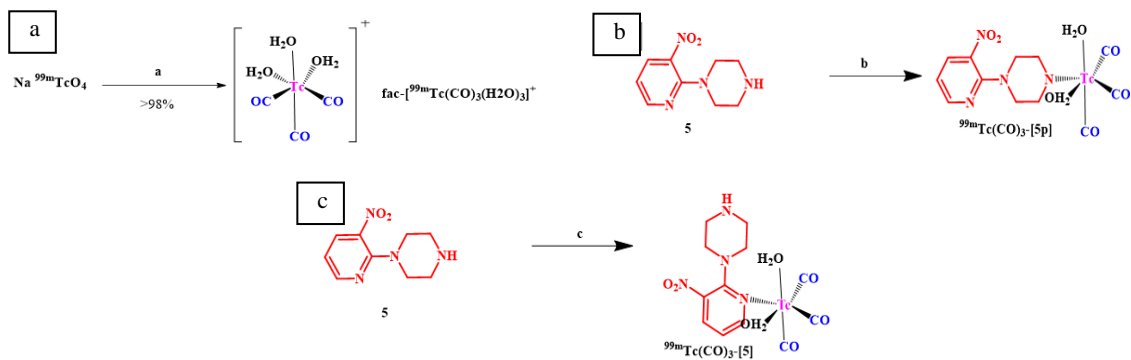
نشانداری، کنترل کیفی و پایداری

فرآیند نشانداری در دو مرحله مختلف انجام شد. ابتدا پیش ساز $fac-[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ سنتز شد و سپس با ترکیب ۷ واکنش داده شد تا $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ به دست آید (تصویر شماره ۲). با توجه به داده‌های موجود در تصویر شماره ۳ الف، زمان بازداری برای ترکیب شماره ۵ برابر با ۱۱/۳۸ دقیقه می‌باشد. زمان بازداری برای این ترکیب بعد از نشانداری شدن یعنی برای $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ برابر است با ۱۴ دقیقه (تصویر شماره ۳ ب) و خلوص رادیو شیمیایی ارزیابی شده با HPLC معادل ۹۵/۵ درصد است (تصویر شماره ۳ ج). از سوی دیگر بررسی‌های انجام شده با TLC هیچ گونه ناخالص کلونیدی را نشان نمی‌دهد.

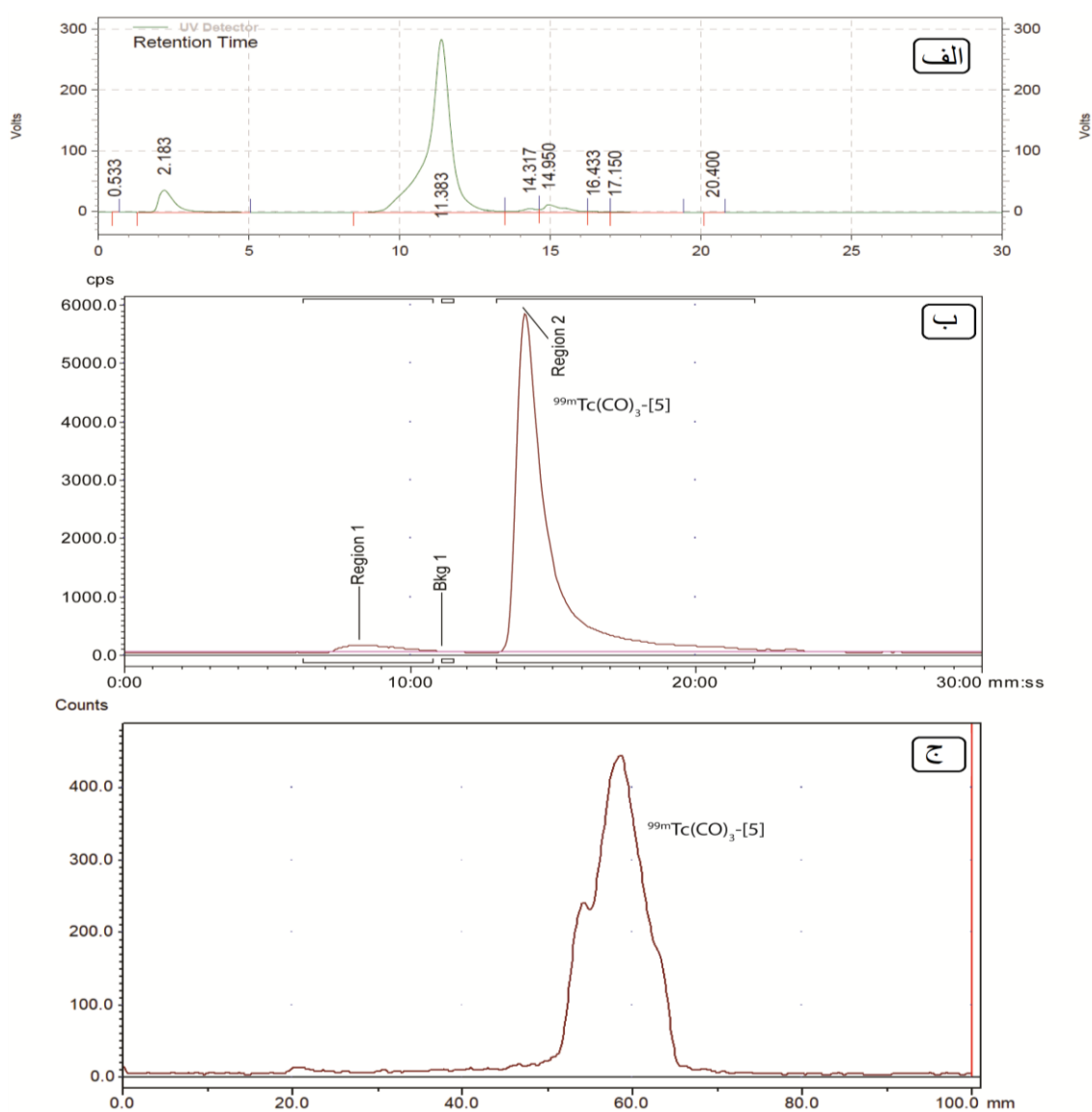
تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر از محلول رادیو ترایسرسر به هر چاهک اضافه شد. پس از ۱ ساعت در انکوبه شدن، محیط کشت خارج شد و سلول‌ها با محیط کشت سرد بدون FBS شستشو داده شدند. پس از ترپسینزاسیون، سلول‌ها جمع آوری، شمارش و رادایواکتیویته آن‌ها به صورت شمارش در دقیقه به ازای یک سلول (CPM/cell) ثبت شد. پارامتر CPM/cell برای هر رده سلول محاسبه شد. روش مشابهی برای مطالعات بلوک روی رده سلولی U87-MG اعمال شد. در مطالعات بلوک، پیموزید، هالوپریدول یا لیگاند سرد (ترکیب ۵) با غلظت نهایی ۴ میکرومولار به عنوان لیگاند بلوکه کننده استفاده شد. مطالعات بلوک نیز با استفاده از روشی مشابه با آزمایش اتصال ویژه انجام شد، اما قبل از افزودن $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ ، رده سلولی U87-MG با پیموزید، هالوپریدول یا لیگاند سرد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بقیه آزمایش و محاسبات مشابه روش فوق بود.

اندازه‌گیری ثابت تفکیک

ثابت تفکیک (K_D) و حداکثر تعداد محل‌های اتصال (B_{max}) برای $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ در رده سلول U-87 MG با استفاده از روش اتصال اشباع مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه، سلول‌های U-87 MG ($10^5 \times 10^5$ سلول در هر چاهک) در ۱ میلی‌لیتر از محیط RPMI 1640 با ۱۰ درصد FBS (v/v) همراه با ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین کشت داده شدند. غلظت‌های مختلف $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ (۰، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) در محیط RPMI 1640 بدون FBS تهیه شد. سپس، هر غلظت $[5]-^{99m}Tc(CO)_3$ به چهار چاه مختلف اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. در نهایت، محیط کشت سلولی برداشته شد و سلول‌ها با محیط سرد بدون FBS شستشو داده شدند. سلول‌های هر چاه جدا شده و در یک لوله آزمایش جمع آوری شد و رادایواکتیویته آن‌ها اندازه‌گیری شد. اتصال غیر اختصاصی با کم کردن کل

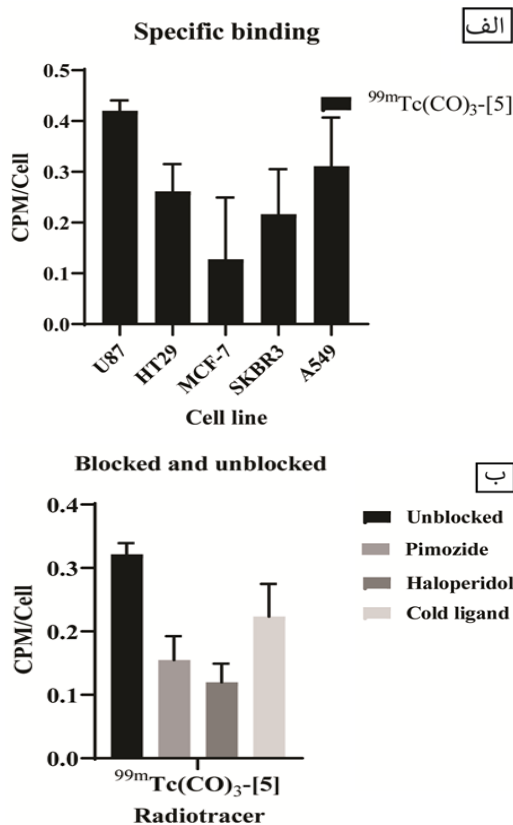


تصویر شماره ۴: روند نشاندارسازی ترکیب شماره ۵: الف: سنتز پیش ساز $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ برای نشاندارسازی لیگاند. ب: ساختار احتمالی ترکیب نشاندار با احتمال پایین. ج: ساختار احتمالی ترکیب نشاندار با احتمال بالا



تصویر شماره ۳: کنترل کیفی $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}[5]$ (الف) گروماتوگرام ترکیب شماره ۵ با استفاده از دکتور UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر (ب) گروماتوگرام HPLC ترکیب شماره $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}[5]$ با استفاده از دکتور گاما (ج) گروماتوگرام TLC ترکیب شماره $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}[5]$ با استفاده از دکتور گاما در متانول و دی کلرومتان (1:1)

برای $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ به ترتیب $1/61$ ، $3/31$ ، $2/0$ و $1/35$ می باشد. پیموزاید، هالوپریدول، یا لیگاند سرد به عنوان عوامل مسدود کننده مورد آزمایش قرار گرفتند که به ترتیب باعث کاهش 52 ، 62 و 32 درصدی در اتصال رادیوتریسر به گیرنده می شوند (تصویر شماره ۴ب).

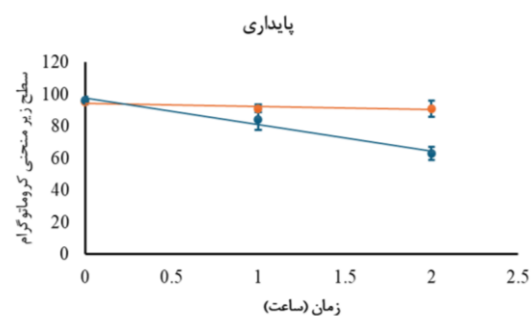


تصویر شماره ۵: الف) مطالعه اتصال ویژه $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ به رده های سلولی سلولی U87-MG، HT29، MCF-7، SKBR3 و A549. ب) مطالعه بلوک و غیربلوک روی رده سلولی U87-MG با استفاده از مقدار اضافی پیموزاید، هالوپریدول (عامل مسدود کننده گیرنده D2)، یا لیگاند سرد به عنوان عوامل مسدود کننده. لیگاندهای رقیب با غلظت 4 میکرومولار اعمال شدند

محاسبه K_D و B_{max} با استفاده از سنجش اتصال اشباع K_D و B_{max} با استفاده از سنجش اتصال اشباع برای $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ محاسبه شدند. در همین راستا K_D و B_{max} به ترتیب $48/07 \pm 9/37$ نانومولار و $2/94 \pm 0/09 \times 10^5$ محاسبه گردید (تصویر شماره ۶).

پایداری در محلول سالین و در سرم موش

بررسی پایداری $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ در سالین نشان دهنده پایداری آن تا دو ساعت بعد از نشاندار شدن و تا حدود 94 درصد می باشد. پایداری در سرم در حدود یک ساعت بعد از نشاندارسازی حدود $84 \pm 6/5$ درصد است که در دو ساعت به $63 \pm 4/0$ درصد افت می نماید (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: نتایج پایداری $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ در سالین (خط نارنجی) و در سرم موش (خط آبی رنگ)

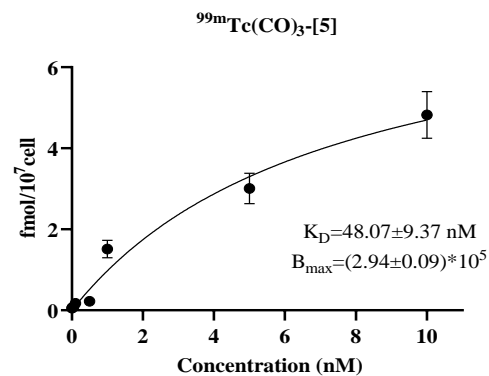
تعیین $\text{Log } D$

ضرایب تقسیم $\text{Log } D_{\text{pH } 7.4}$ برآورد شده برای $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ با استفاده از توزیع آن بین فاز آبی (بافر فسفات سالین) و فاز آلی (ان-اکتانول) برای رادیوتریسر $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ برابر $0/37 \pm 0/04$ بود.

اتصال ویژه در شرایط آزمایشگاهی

پتانسیل $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ برای شناسایی $5\text{-HT}_7\text{R}$ بر روی رده های سلولی مختلف سرطانی بررسی شد. رده های سلولی انتخاب شده شامل $5\text{-HT}_7\text{R}$ ، $U87\text{-MG}$ ، $MCF\text{-7}$ ، $SKBR3$ و $A549$ می شود که هر کدام مقادیر متفاوتی از $5\text{-HT}_7\text{R}$ را بیان می کنند (تصویر شماره ۵). با توجه به تصویر شماره ۴-الف، $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-[5]}$ به طور قابل توجهی بیش تر از رده های سلولی دیگر به سلول های $U87\text{-MG}$ با بیان بیش از حد $5\text{-HT}_7\text{R}$ متصل می شوند. نسبت های اتصال $U87\text{-MG}/HT29$ ، $U87\text{-MG}/A549$ و $U87\text{-MG}/SKBR3$ ، $U87\text{-MG}/MCF7$

در مطالعات قابل مشاهده می‌باشد). این ترکیب دارای یک حلقه پریدینی است که می‌تواند با پیش ماده تکنسیوم تری کربونیل وارد واکنش شده و نشاندار شود (۲۵، ۲۶). پیک مربوط به نشاندار شدن و تهیه ^{99m}Tc(CO)₃-[5] در HPLC سطح منحنی برابر ۹۵/۵ درصد دارد و از سوی دیگر کروماتوگرام مربوط به TLC یک عدد پیک نشان می‌دهد و هیچگونه رادیواکتیویته‌ای در مبدا مشاهده نمی‌شود (تصویر شماره ۳). در نتیجه داده‌های مربوط به کنترل کیفی مرحله نشاندارسازی حاکی از آن است که خلوص رادیوشیمیایی این رادیوتریسر (تصویر شماره ۳) معادل ۹۵/۵ درصد است، که برای کاربردهای مد نظر قابل قبول می‌باشد. زمان بازداری برای ترکیب شماره ۵ برابر با ۱۱/۳۸ دقیقه می‌باشد. زمان بازداری برای این ترکیب بعد از نشاندار شدن برای ^{99m}Tc(CO)₃-[5] برابر است با ۱۴ دقیقه است که نشان دهنده تغییر در لیوفیلیسته بعد از نشاندار شدن است. اندازه‌گیری Log D برای ^{99m}Tc(CO)₃-[5] نشان دهنده مقدار ۰/۳۷±۰/۰۴ می‌باشد که بیانگر لیوفیل بودن این رادیودارو می‌باشد. در مقایسه با ترکیبات بررسی شده در مطالعات قبلی که Log D آنها در محدوده ۰/۷ تا ۱/۲ بود، ^{99m}Tc(CO)₃-[5] آب دوست تر به نظر می‌رسد (۲۳-۲۱). رده‌های سلولی مختلف، از جمله SKBR3، MCF-7، HT-29، U87-MG، A549، و برای مطالعه اتصال ویژه استفاده شد (تصویر شماره ۵الف). این رده‌های سلولی اعضای مختلف خانواده گیرنده 5-HT₇R را بیان می‌کنند. بیان اعضای مختلف خانواده سروتونین در این رده‌های سلولی به شرح زیر است: HT29 بیانگر 5-HT₁R، 5-HT₃R و 5-HT₄R است (۲۶). رده سلولی MCF-7 بیانگر 5-HTR_{3A} و 5-HTR_{2A} است (۲۷). SKBR3 سطوح پایینی از گیرنده‌های سروتونین را بیان می‌کند (۲۶). رده سلولی A549 در سطح خود 5-HTR_{1A}، 5-HTR_{1B}، 5-HTR_{1E/F}، 5-HTR₂، 5-HTR₃، 5-HTR₄ و 5-HTR₇ (سطح متوسط) را بیان می‌کند (۲۶)، و رده سلولی U78-MG میزان بیان بالایی از گیرنده‌های 5-HTR₇ را



تصویر شماره ۶: نمودار B_{max} و K_D ترکیب نشاندار ^{99m}Tc(CO)₃-[5]

بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بیماری GBM گیرنده‌های سروتونین ۷ را بیش از حد بیان می‌کند. از این رو، این گیرنده به عنوان یک هدف درمانی و تشخیصی بالقوه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در مطالعات قبلی ما آریل پیرازین‌هایی همچون 1-(3-nitropyridin-2-yl)piperazine و پیرازین به عنوان رادیولیکاندهای گیرنده 5-HT₇R ارزیابی شدند (تصاویر شماره ۱ و ۲). این رادیوتریسرها ویژگی‌های برجسته‌ای از جمله تمایل بالا به گیرنده و انتخاب پذیری بالا به عنوان لیگاندهای این گیرنده نشان می‌دهند، هر چند معمولاً از جذب ناکافی در مغز رنج می‌برند (۲۳-۲۱).

در آخرین مطالعاتی که تیم ما بر روی رادیولیکاندهای گیرنده 5-HT₇R انجام داده‌اند، مشتقات نشاندار شده متفاوتی از جمله ^{99m}TcN-[6]، ^{99m}TcN-[7]، ^{99m}Tc(CO)₃-[6]، ^{99m}Tc(CO)₃-[7]، ^{99m}Tc-PHH و ^{99m}Tc-MPHH مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در این پژوهش ^{99m}Tc(CO)₃-[5] به عنوان یکی دیگر از رادیولیکاندهای گیرنده 5-HT₇R مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲۳-۲۱).

در همین راستا ابتدا ترکیب شماره ۵ (تصویر شماره ۱) سنتز و برای اولین بار با استفاده از تکنسیوم تری کربونیل نشاندار شد (تمام روش‌های سنتزی و آنالیزها

مستقیم و غیر ویژه آن به سطح سلول می باشد. این پدیده حتی در مطالعات بلوک سلولی هم قابل مشاهده است و منجر به بلوک نشدن کامل اتصال رادیوتریسر به سطح سلول های U87-MG می شود (تصویر شماره ۵ب). در پایان می توان گفت که رادیوتریسر [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ توانایی اتصال به گیرنده های 5-HTR₇ را دارا می باشد هر چند پایداری نسبتاً پایین (تصویر شماره ۴) این ترکیب از بررسی های درون تنی ویژگی های آن جلوگیری می نماید. [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ به عنوان مشتق پریدیل پیرازین تمایل خوبی به گیرنده های 5-HTR₇ را نشان می دهد. پایداری [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ در عدم حضور سرم قابل قبول است، هر چند که در حضور سرم پایداری ترکیب مذکور افت می نماید. از این رو به نظر می رسد تغییرات ساختاری برای بهبود پایداری این رادیوتریسر و زمینه سازی برای بررسی های بیولوژیک اجتناب ناپذیر می باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح تحقیقاتی ۸۶۵۸ و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1399.940 به انجام رسیده است.

References

1. Pithadia AB, Jain SM. 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials. *J Clin Med Res* 2009; 1(2): 72-80. PMID: 22505971.
2. McCorvy JD, Roth BL. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 2015; 150: 129-142. PMID: 25601315.
3. Fatima S, Shi X, Lin Z, Chen GQ, Pan XH, Wu JC, et al. 5-Hydroxytryptamine promotes hepatocellular carcinoma proliferation by influencing β -catenin. *Mol Oncol* 2016; 10(2): 195-212. PMID: 26474915.
4. Gautam J, Banskota S, Regmi SC, Ahn S, Jeon YH, Jeong H, et al. Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT(7) receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 75. PMID: 27871326.
5. Ayaz G, Halici Z, Albayrak A, Karakus E, Cadirci E. Evaluation of 5-HT₇ Receptor Trafficking on In Vivo and In Vitro Model of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Cell Injury in Rats and LPS-Treated A549 Cells. *Biochem Genet* 2017; 55(1): 34-47. PMID: 27586707.

نشان می دهد. بنابراین، جذب رادیودارو در هر رده سلولی با بیان 5-HTR₇ ارتباط دارد. در میان رده سلولی، U87-MG بالاترین [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ را به U87-MG A549 (CPM/Cell 0.42 ± 0.03) نشان داد. رده سلولی با بیان متوسط گیرنده ها نیز جذب خوبی از رادیوتریسر را نشان می دهد و این در حالی است که سایر رده های سلولی جذب کمتری را نشان می دهند (تصویر شماره ۴ الف)، که به دلیل بیان سطح کمتری از گیرنده های 5-HTR₇ است. از این رو، رده سلولی U87-MG برای محاسبه K_D و B_{max} انتخاب شده است. K_D محاسبه شده برای [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ نسبت به ترکیبات پیشین شامل [6]- ^{99m}TcN ، [7]- ^{99m}TcN ، [6]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ، [7]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ و ^{99m}Tc -MPHH و ^{99m}Tc -PHH مقدار بالاتری دارد که نشان دهنده تمایل کم تر آن به گیرنده های 5-HTR₇ می باشد (۲۳-۲۱). از سوی دیگر B_{max} محاسبه شده برای [5]- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ بیش از ۱۰ برابر ترکیبات پیشین می باشد. البته قابل ذکر است که این پدیده به دلیل ناپایداری نسبی این رادیوتریسر در مقایسه با سایر رادیوتریسرهای ذکر شده می باشد که موجب رهاسازی بخش رادیواکتیو از ترکیب مذکور و اتصال

6. Mahé C, Bernhard M, Bobirnac I, Keser C, Loetscher E, Feuerbach D, et al. Functional expression of the serotonin 5-HT₇ receptor in human glioblastoma cell lines. *Br J Pharmacol* 2004; 143(3): 404-410. PMID: 15339860.
7. Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, et al. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *J Clin Oncol* 2010; 28(14): 2467-2474. PMID: 20368557.
8. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol Ther* 2015; 152: 63-82. PMID: 25944528.
9. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* 2017; 127(2): 415-426. PMID: 28145904.
10. Kosaka N, Tsuchida T, Uematsu H, Kimura H, Okazawa H, Itoh H. 18F-FDG PET of common enhancing malignant brain tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190(6): W365-369. PMID: 18492879.
11. Grosu AL, Astner ST, Riedel E, Nieder C, Wiedenmann N, Heinemann F, et al. An interindividual comparison of O-(2-[18F] fluoroethyl)-L-tyrosine (FET)- and L-[methyl-11C] methionine (MET)-PET in patients with brain gliomas and metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(4): 1049-1058. PMID: 21570201.
12. Rapp M, Heinzl A, Galldiks N, Stoffels G, Felsberg J, Ewelt C, et al. Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *J Nucl Med* 2013; 54(2): 229-235. PMID: 23232275.
13. Rapp M, Heinzl A, Galldiks N, Stoffels G, Felsberg J, Ewelt C, et al. Diagnostic performance of 18F-FET PET in newly diagnosed cerebral lesions suggestive of glioma. *J Nucl Med* 2013; 54(2): 229-235. PMID: 23232275.
14. Hutterer M, Nowosielski M, Putzer D, Jansen NL, Seiz M, Schocke M, et al. [18F]-fluoroethyl-L-tyrosine PET: a valuable diagnostic tool in neuro-oncology, but not all that glitters is glioma. *Neuro Oncol* 2013; 15(3): 341-351. PMID: 23335162.
15. Becherer A, Karanikas G, Szabó M, Zettinig G, Asenbaum S, Marosi C, et al. Brain tumour imaging with PET: a comparison between [18F] fluorodopa and [11C] methionine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30(11): 1561-1567. PMID: 14579097.
16. Zhang MR, Haradahira T, Okauchi J, Kida T, Obayashi SH, Suzuki K, et al. Synthesis and preliminary PET study of the 5-HT₇ receptor antagonist [¹¹C] DR4446. *J Label Compd Radiopharm* 2002; 45(10): 857-866.
17. Hansen HD, Constantinescu CC, Barret O, Herth MM, Magnussen JH, Lehel S, et al. Evaluation of [¹⁸F] 2FP3 in pigs and non-human primates. *J Labelled Comp Radiopharm* 2019; 62(1): 34-42. PMID: 30414212.
18. Colomb J, Becker G, Forcellini E, Meyer S, Buisson L, Zimmer L, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of a new series of radiolabeled ligands for 5-HT₇ receptor PET neuroimaging. *Nucl Med Biol* 2014; 41(4): 330-337. PMID: 24607435.
19. Herth MM, Hansen HD, Ettrup A, Dyssegaard A, Lehel S, Kristensen J, et al. Synthesis and evaluation of [¹¹C] Cimbi-806 as a potential PET ligand for 5-HT₇ receptor imaging. *Bioorg Med Chem* 2012; 20(14): 4574-4581. PMID: 22682922.

20. Saednia S, Emami S, Molavipordanjani S, Abedi SM, Amiri FT, Hosseinimehr SJ. Synthesis and Biological Evaluation of (99m) Tc-Labeled Phenylpiperazine Derivatives as Selective Serotonin-7 Receptor Ligands for Brain Tumor Imaging. *Mol Pharm* 2021; 18(6): 2360-2374. PMID: 34027660.
21. Karimi M, Mardanshahi A, Irannejad H, Mohammad Abedi S, Molavipordanjani S. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc-labeled 1-(2-Pyridyl) piperazine derivatives as radioligands for 5HT (7) receptors. *Bioorg Chem* 2023; 135: 106486. PMID: 36965286.
22. Mardanshahi A, Vaseghi S, Hosseinimehr SJ, Abedi SM, Molavipordanjani S. ^{99m}Tc (CO)₃-labeled 1-(2-Pyridyl) piperazine derivatives as radioligands for 5-HT (7) receptors. *Ann Nucl Med* 2024; 8(2): 139-153. PMID: 38032496.
23. Molavipordanjani S, Emami S, Mardanshahi A, Talebpour Amiri F, Noaparast Z, Hosseinimehr SJ. Novel ^{99m}Tc-2-arylimidazo [2,1-b] benzothiazole derivatives as SPECT imaging agents for amyloid-β plaques. *Eur J Med Chem* 2019; 175: 149-161. PMID: 31078865.
24. Purohit A, Liu S, Ellars CE, Casebier D, Haber SB, Edwards DS. Pyridine-containing 6-hydrazinonicotinamide derivatives as potential bifunctional chelators for ^{99m}Tc-labeling of small biomolecules. *Bioconjug Chem* 2004; 15(4): 728-737. PMID: 15264859.
25. Hayes TR, Lyon PA, Barnes CL, Trabue S, Benny PD. Influence of functionalized pyridine ligands on the radio/chemical behavior of [M(I)(CO)₃] (+) (M= Re and (99m) Tc) 2+1 complexes. *Inorg Chem* 2015; 54(5): 1528-1534. PMID: 25590985.
26. Hejazi SH, Ahangari G, Deezagi A. Alternative Viewpoint Against Breast Cancer Based on Selective Serotonin Receptors 5HTR3A and 5HTR2A Antagonists that can Mediate Apoptosis in MCF-7 Cell Line. *Curr Drug Discov Technol* 2015; 12(4): 240-249. PMID: 26768715.