

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΜΠΟΜΠΕΣΙΝΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ^{99m}Tc ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΑΥΙΔ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Αθήνα
2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΜΠΟΜΠΕΣΙΝΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ^{99m}Tc ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΑΥΙΔ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Αθήνα
2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΕΣ ΜΠΟΜΠΕΣΙΝΗΣ ΕΠΙΣΗΜΑΣΜΕΝΟΙ ΜΕ ^{99m}Tc ΓΙΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΑΥΙΔ ΧΑΡΑΛΑΜΠΙΔΗΣ

A.M.:102701

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταμπάκη - Χατζηπαναγιώτη Δέσποινα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Σταμπάκη - Χατζηπαναγιώτη Δέσποινα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μερτής Κωνσταντίνος: Ομότιμος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Μάινα - Νock Θεοδοσία: Ερευνήτρια Α, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σταμπάκη - Χατζηπαναγιώτη Δέσποινα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μερτής Κωνσταντίνος: Ομότιμος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Μάινα - Νock Θεοδοσία: Ερευνήτρια Α, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”)

Σιαφάκα - Καπάδαη Αθανασία, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μαυρή - Βαβαγιάννη Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Γαλανοπούλου Ντία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Μεθενίτης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ημερομηνία Εξέτασης: 01/10/2012

Στη Σοφία και στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί πολύ μεγάλη πρόοδος στη διαγνωστική ογκολογία με την εφαρμογή εξειδικευμένων ραδιοεπισημασμένων ενώσεων (ραδιοφαρμάκων) μοριακής στόχευσης. Κυρίως η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων πεπτιδίων τα οποία παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα για εφαρμογή στη κλινική ογκολογία, όπως ταχεία βιοκινητική, μεγάλη ικανότητα διείσδυσης στον καρκινικό ιστό λόγω μικρού μοριακού βάρους και χαμηλή αντιγονικότητα. Τα ραδιοπεπτίδια αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με βιομόρια-στόχους, δηλαδή πρωτεϊνικούς υποδοχείς, οι οποίοι υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Επομένως λειτουργούν ως μεταφορείς διαγνωστικών ή θεραπευτικών ραδιονουκλιδίων στους ιστούς στόχους (καρκινικές εστίες), παρέχοντας δυνατότητα απεικόνισης τους ή και καταστροφής τους.

Η μπομπεσίνη (BBN) είναι ένα δεκατετραπεπτίδιο με μεγάλη συγγένεια για τους υποδοχείς του γαστροεκλυτικού πεπτιδίου (GRP-Rs) οι οποίοι υπερεκφράζονται σε πολλούς συνήθεις ανθρώπινους όγκους, όπως σε καρκίνο του προστάτη και του μαστού.

Στη παρούσα διατριβή περιγράφεται η σύνθεση και η προκλινική αξιολόγηση νέων ανταγωνιστών μπομπεσίνης επισημασμένων με ^{99m}Tc για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση GRP-R θετικών όγκων.

Ως οδηγός-ένωση χρησιμοποιήθηκε ο ανταγωνιστής μπομπεσίνης [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13), στην οποία έγιναν επεμβάσεις στο N-τελικό άκρο, στο C-τελικό άκρο και/ή στη πεπτιδική αλυσίδα.

Ως ραδιονουκλίδιο επιλέχθηκε το ^{99m}Tc λόγω των ιδανικών του πυρηνικών ιδιοτήτων. Για τη σταθερή συναρμογή του ^{99m}Tc χρησιμοποιήθηκε τετραμίνη ανοικτής αλυσίδας τύπου $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (2,3,2-tet). Η επισήμανση ήταν σχεδόν ποσοτική και τα επισημασμένα πεπτίδια παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα όπως επιβεβαιώθηκε με ραδιοχημικό έλεγχο.

Η συγγένεια των νέων αναλόγων για τον GRP-R μελετήθηκε με πειράματα ανταγωνιστικής δέσμευσης έναντι [^{125}I -Tyr⁴]BBN σε μεμβράνες κυττάρων PC-3 και βρέθηκε ιδιαίτερα υψηλή, υψηλότερη ακόμα και από την ένωση αναφοράς [Tyr⁴]BBN καταδεικνύοντας την ευνοϊκή επίδραση του τετραμινικού υποκαταστάτη στο N-τελικό

άκρο των πεπτιδίων αυτών. Η ικανότητα δέσμευσης μετά τη συναρμογή του ραδιομετάλλου μελετήθηκε αντιπροσωπευτικά για το [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin 8 με πειράματα δέσμευσης κορεσμού υποδοχέων σε κύτταρα PC-3. Η συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R ήταν ιδιαίτερα υψηλή, με τιμή $K_d = 0.24 \pm 0.03$ nM, καταδεικνύοντας ότι η παρουσία του (ραδιο)μεταλλικού συμπλόκου στο N-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας ευνοεί τη δέσμευση στον GRP-R.

Πειράματα δέσμευσης των ραδιοπεπτιδίων της παρούσας διατριβής σε κύτταρα PC-3 έδειξαν ποσοστά δέσμευσης ανάλογα της συγγένειας του κάθε αναλόγου και την απουσία εσωτερίκευσης, η οποία είναι συμβατή με συμπεριφορά ανταγωνιστή. Η ανταγωνιστική δράση επιβεβαιώθηκε επιλεκτικά για τα Demobesin 8 και Demobesin 10 σε κύτταρα HEK-GRPR.

Η μεταβολική σταθερότητα του [^{99m}Tc]Demobesin 8 μελετήθηκε σε πλάσμα αίματος, ομογενοποίημα νεφρών ποντικού και ούρα ποντικίου. Το [^{99m}Tc]Demobesin 8 αποικοδομείται αργά στο πλάσμα ενώ στα νεφρά αποικοδομείται ταχέως σε υδροφιλικούς μεταβολίτες. Ανάλυση με HPLC ούρων που συλλέχθηκαν 30 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοπεπτιδίου έδειξε πλήρη αποικοδόμησή του.

Τα αποτελέσματα των μελετών βιοκατανομής κατά την ενδοφλέβια χορήγηση των επισημασμένων αναλόγων σε υγιή και παθολογικά πρότυπα πειραματοζώων συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μελετών *in vitro*. Διαπιστώθηκε ταχεία απομάκρυνση από το αίμα και το υπόστρωμα με κύρια οδό απέκκρισης το ουροποιητικό σύστημα.

Η κύρια οδός απέκκρισης του [^{99m}Tc]Demobesin 8 είναι διαμέσου των νεφρών προς τα ούρα και όχι μέσω του ηπατοχολικού συστήματος λόγω υψηλής υδροφιλικότητας. Αυτό αναμένεται να οδηγήσει σε ταχύτερη κάθαρση και σε μείωση της ραδιενέργειας υποστρώματος άρα και σε πιθανή ευκρινέστερη απεικόνιση GRP-R θετικών όγκων. Η υψηλότερη ειδική πρόσληψη στα όργανα που εκφράζουν φυσιολογικά τον GRP-R όπως είναι το πάγκρεας παρατηρήθηκε για το [^{99m}Tc]Demobesin 8. Η διαδικασία για όλα τα ραδιοπεπτιδία διαμεσολαμβάνεται από τους GRP-Rs, όπως αποδείχθηκε κατόπιν *in vivo* αποκλεισμού των θέσεων δέσμευσης με συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN με το εκάστοτε ραδιοπεπτιδίο. Σε ποντίκια τύπου SCID στα οποία έχουν μεταμοσχευθεί ανθρώπινα ετερομοσχεύματα PC-3 το [^{99m}Tc]Demobesin 8 πέτυχε και πάλι τις υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον όγκο.

Σε σύγκριση με άλλα πεπτιδία ανταγωνιστές μπομπεσίνης της βιβλιογραφίας το [^{99m}Tc]Demobesin 8 έδειξε υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R και υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον πειραματικό όγκο. Επιπλέον σύγκριση με τα ραδιοπεπτιδία - αγωνιστές όπως [^{99m}Tc]Demobesin 3-6 επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότερη στόχευση GRP-R - θετικών καρκινωμάτων από ραδιοπεπτιδία-ανταγωνιστές.

Η παρούσα διατριβή οδήγησε με επιτυχία στην ανάπτυξη νέων ^{99m}Tc-ραδιοεπισημασμένων ανταγωνιστών μπομπεσίνης για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση GRP-R θετικών όγκων στον άνθρωπο. Η προκλινική αυτή αξιολόγηση κατέδειξε ως ραδιοπεπτιδίο επιλογής το [^{99m}Tc]Demobesin 8 δεδομένου ότι συνδυάζει σημαντικά κριτήρια για κλινική εφαρμογή, όπως σταθερότητα, ταχεία και υψηλή *in vivo* στόχευση των GRP-Rs και ταχεία κάθαρση από παρακείμενους ιστούς και επομένως σε υψηλής ευκρίνειας απεικονίσεις.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ραδιοεπισημασμένοι ανταγωνιστές μπομπεσίνης

Λέξεις κλειδιά: ^{99m}Tc, διαγνωστική ογκολογία, GRP-Rs, μελέτες βιοκατανομής

ABSTRACT

In recent years important progress has been made in diagnostic oncology by applying specialized site-specific radiolabeled compounds. Research is mainly focusing on the development of radiolabeled peptides because they offer several advantages such as rapid biokinetics, high penetration capacity into cancer tissue due to their low molecular weight and low antigenicity. Radiopeptides interact selectively with target-biomolecules (peptide receptors) which are overexpressed on the surface of cancer cells. Therefore, they act as transporters of diagnostic or therapeutic radionuclides to the target (malignant lesions), providing the possibility of high contrast imaging or cell damage.

Bombesin is a 14-amino acid peptide with high affinity for gastrin releasing peptide receptors (GRP-Rs) which are overexpressed in a variety of human tumors including prostate and breast cancers.

In the present thesis, the synthesis and preclinical evaluation of novel bombesin antagonists radiolabeled with ^{99m}Tc for potential application in targeted diagnostic imaging of GRP-R⁺ tumors, is described.

Synthesis of the new peptides was based on the bombesin antagonist peptide [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13) and modifications occurred at the N-terminus, C-terminus and/or at the peptide chain of this antagonist.

The radionuclide of choice was ^{99m}Tc because of its ideal nuclear properties. A bifunctional tetraamine precursor $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (2,3,2-tet) was used for the stable binding of ^{99m}Tc . Incorporation of ^{99m}Tc by the tetraamine unit was almost quantitative as it was confirmed by chromatographic analysis.

Binding affinity of the new analogs for the GRP-R was studied with competition binding experiments in PC-3 cell membranes and it was high, even higher than the peptide of reference [Tyr⁴]BBN. These results show the favorable effect of the tetraamine complex at the N-terminus of the new peptides. Also the binding affinity of the radiolabeled peptide was studied for [$^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}$]Demobesin 8 by saturation binding experiments in whole PC-3 cells and it was significantly high ($K_d = 0.24 \pm 0.03$ nM) indicating that the presence of the $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O})_2\text{N}_4]^+$ complex at the N-terminus of the peptide affects positively the binding affinity to GRP-R.

Metabolic studies for [^{99m}Tc]Demobesin 8 were conducted in mouse plasma, kidney homogenates and urine. [^{99m}Tc]Demobesin 8 survived long enough in mouse plasma, whereas in kidney homogenates it rapidly degraded in hydrophilic

metabolites and it is finally excreted into urine. HPLC analysis in urine that were collected 30 min after the intravenous injection of the radiopeptide showed full degradation in the kidneys.

Biodistribution studies in healthy and pathological animal models after intravenous injection of the radiolabeled peptides confirmed the *in vitro* results. The radioactivity rapidly cleared from the blood and background tissues and it was excreted mainly via kidneys and the urinary system.

As it was mentioned before the main route of excretion of [^{99m}Tc]Demobesin 8 is via the kidneys and the urinary system and not through the hepatobiliary system due to high hydrophilicity. This is expected to lead in rapid excretion from background tissues and hence a possible better imaging of GRP-R positive tumors. Also higher uptake in organs that expressing GRP-R such as pancreas was observed for [^{99m}Tc]Demobesin 8. The process was GRP-R mediated, as shown by *in vivo* receptor blockade by co-injection of excess of [Tyr⁴]BBN with each radiopeptide. In SCID mice bearing human PC-3 xenografts expressing the human GRP-R, [^{99m}Tc]Demobesin 8 achieved the higher uptake in tumor.

In comparison with other radiolabeled bombesin antagonists, which are known in the literature, [^{99m}Tc]Demobesin 8 showed the highest binding affinity for GRP-R and also *in vivo* the highest tumor uptake. Moreover compared with agonist radiopeptides such as [^{99m}Tc]Demobesin 3-6 showed the more effective targeting of GRP-R by antagonist peptides.

In conclusion, this thesis successfully led in the development of new ^{99m}Tc-radiolabeled bombesin antagonists for diagnostic imaging of GRP-R positive tumors in human. This preclinical evaluation showed as the radiopeptide of choice [^{99m}Tc]Demobesin 8 because satisfied important criteria and combined a variety of favorable properties for successful application in the targeted diagnostic imaging of GRP-R positive tumors such as favorable pharmacokinetics, metabolic stability as well as rapid and high *in vivo* GRP-R targeting which can led to satisfactory tumor images

SUBJECT AREA: Radiolabeled bombesin antagonists

KEYWORDS: ^{99m}Tc, diagnostic oncology, GRP-Rs, biodistribution studies

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. Διάγνωση στην ογκολογία.....	2
1.1 Γενικά.....	2
1.2. Διαγνωστικές μέθοδοι	4
1.2.1. Παρεμβατικές μέθοδοι	4
1.3.2. Μη παρεμβατικές μέθοδοι.....	5
2. Απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι.....	8
2.1. Γενικά.....	8
2.2. Απεικονιστικές μέθοδοι μη iontίζουσας ακτινοβολίας	8
2.2.1. Μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging - M.R.I.)	8
2.2.3. Υπερηχογραφία (UltraSonography- US).....	11
2.2.4. Οπτική απεικόνιση (Optical imaging)	13
2.3. Απεικονιστικές μέθοδοι iontίζουσας ακτινοβολίας.....	14
2.3.1. Ακτινογραφία (radiography)	14
3.Τεχνικές πυρηνικής ιατρικής	19
3.1 Τεχνική PET.....	19
3.2. Τεχνική SPECT	22
3.3. Διαφορές PET-SPECT	24
3.4. Υβριδικές απεικονιστικές διατάξεις.....	24
4. Τεχνητίο και Ιατρική Διάγνωση.....	26
4.1. Τεχνητίο.....	26
4.2. Ιδιότητες τεχνητίου.....	27
4.3. Ραδιονουκλίδια του τεχνητίου με ιατρική εφαρμογή.....	27
4.4. Παραγωγή ^{99m}Tc	29
4.5. Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	30
4.6. Σύνθεση ραδιοφαρμάκων με ^{99m}Tc	32
4.7. Χημεία του τεχνητίου στα χρησιμοποιούμενα ραδιοφάρμακα	36

4.8. Ραδιοφάρμακα Tc 1 ^{ης} γενιάς	50
4.9. Ραδιοφάρμακα Tc 2 ^{ης} γενιάς	50
4.10. Ραδιοφάρμακα Tc 3 ^{ης} γενιάς.....	51
5. Μοριακή στόχευση του καρκίνου με ραδιοφάρμακα	52
5.1. Έννοια της «μαγικής σφαίρας»	52
5.2. Ενσωμάτωση ραδιομετάλλου σε βιομόριο.....	53
5.2.2. Επισήμανση μέσω διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη (bifunctional chelator approach).....	54
5.3. Ραδιοεπισημασμένα αντισώματα στην ογκολογία.....	56
5.4. Ραδιοπεπτίδια στην ογκολογία	57
5.5. Υποδοχείς πεπτιδίων	58
5.6. Σχεδιασμός πεπτιδικών ραδιοφαρμάκων	63
5.7. Μεταλλικά ραδιονουκλίδια στο σχεδιασμό ραδιοπεπτιδίων.....	64
5.8. Επιλογή χηλικού υποκαταστάτη στη σύνθεση ραδιοπεπτιδίων	65
5.9. Πρώτο εγκεκριμένο ραδιοπεπτίδιο - OctreoScan®	68
5.10. Ραδιοεπισημασμένα ανάλογα μπομπεσίνης.....	70
6. Σχεδιασμός αναλόγων	78
7. Σκοπός της εργασίας	86
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	88
8. Σύνθεση σειράς αναλόγων Demobesin.....	89
8.1. Αντιδραστήρια-Υλικά	89
8.2. Όργανα-Συσκευές.....	90
8.3 Σύζευξη.....	91
8.4. Αποπροστασία	95
9. Επισήμανση - Ραδιοχημικός Έλεγχος	98
9.1. Αντιδραστήρια-Υλικά	98
9.2. Όργανα	99
9.3. Επισήμανση με ^{99m} Tc.....	99

9.4. Ραδιοχημική ανάλυση	100
9.5. Επισήμανση με ^{99m}Tc και προσθήκη φορέα ^{99g}Tc	101
9.6. Ραδιοϊωδίωση.....	102
10. Βιολογική αξιολόγηση	103
10.1. Κυτταροκαλλιέργειες	103
10.1.2. Όργανα.....	104
10.1.3. Καλλιέργεια κυττάρων	104
10.1.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων	105
10.1.5. Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών	106
10.1.6. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης μεμβρανών	106
10.1.7. Αποθήκευση κυττάρων.....	107
10.2. <i>In vitro</i> αξιολόγηση	108
10.2.1. Αντιδραστήρια.....	108
10.2.2. Όργανα.....	109
10.2.3. Πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης.....	110
10.2.4. Πειράματα δέσμησης κορεσμού.....	110
10.2.5. Πειράματα Εσωτερίκευσης	112
10.2.7.1. Επώαση σε πλάσμα ποντικίου	113
10.2.7.2. Επώαση σε ομοιογενοποιημένα νεφρού και ήπατος	114
10.2.7.3. Συλλογή ούρων	115
10.3. <i>In vivo</i> αξιολόγηση.....	116
10.3.1 Αντιδραστήρια.....	116
10.3.2. Όργανα.....	117
10.3.3. Πειράματα βιοκατανομής	117
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	120
11. Σύνθεση Πεπτιδικών Αναλόγων	121
11.1. Demobesin 2	121
11.2. Demobesin 7	127
11.3. Demobesin 8-12.....	131
12. Ραδιοχημεία	137

12.1. [^{99m} Tc]Demobesin.....	137
12.2. Επισήμανση με ^{99m} Tc και προσθήκη φορέα ^{99g} Tc	141
12.3. Σύνθεση του [^{185/187} Re]Demobesin 8.....	143
12.4. Ταυτοποίηση δομής του [^{99m} Tc]Demobesin 8.....	145
12.5. Ραδιοϊωδίωση.....	148
13. <i>In vitro</i> αξιολόγηση.....	151
13.1. Μελέτες ανταγωνιστικής δέσμησης (competition binding).....	151
13.2. Μελέτες δέσμησης κορεσμού (saturation binding assays).....	156
13.3 Λειτουργικές μελέτες.....	159
13.4 Μελέτες εσωτερίκευσης (internalization experiments).....	161
14. Μελέτες μεταβολικής σταθερότητας	164
15. <i>In vivo</i> αξιολόγηση επισημασμένων αναλόγων	167
15.1. Βιοκατανομή σε υγιή ποντίκια	168
15.2. Βιοκατανομή σε ποντίκια με πειραματικούς όγκους PC-3	176
15.3. Βιοκατανομή σε ποντίκια με πειραματικούς όγκους HEK293-GRPR	187
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	190
Συντμήσεις.....	198
Πίνακας Αμινοξέων.....	203
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	204
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	205

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1.:** Συχνότητα εμφάνισης και ποσοστά θνησιμότητας των πιο συχνά εμφανιζόμενων καρκίνων παγκοσμίως στις αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες χώρες (σελ. 3)
- Σχήμα 4.1:** Σχηματισμός και διάσπαση του ^{99m}Tc και ^{99g}Tc (σελ. 30)
- Σχήμα 4.2:** Παραγωγή του ^{99m}Tc από την γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ μετά την έκλυση του συστήματος (σελ.31)
- Σχήμα 4.3.:** Τετραεδρική διαμόρφωση του TcO_4^- (σελ. 38)
- Σχήμα 4.4.:** Πυρήνες του Tc^V (σελ. 38)
- Σχήμα 4.5. :** Το σύμπλοκο του TcO^{3+} με τον τετρασχιδή υποκαταστάτη PnAO (σελ. 40)
- Σχήμα 4.6.:** Απεικόνιση εγκεφάλου (αριστερά) στο οποίο στα κόκκινα και κίτρινα μέρη απεικονίζεται υψηλή αιματική ροή ενώ στα μπλε χαμηλή με τη χρησιμοποίηση του ραδιοφαρμάκου Ceretec[®] (δεξιά) (σελ. 40)
- Σχήμα 4.7.:** Παραδείγματα συμπλόκων Tc με υποκαταστάτες N_2S_2 , N_3S (σελ. 41)
- Σχήμα 4.8.:** Απεικόνιση της δομής του εμπορικού σκευάσματος Neurolite[®] (σελ. 41)
- Σχήμα 4.9.:** Α) σύμπλοκο με κυκλική τετραμίνη Β) σύμπλοκο με υποκαταστάτη S_2P_2 (σελ. 42)
- Σχήμα 4.10.:** Δομή του Myoniew[®] (αριστερά), απεικόνιση του μυοκαρδίου (δεξιά) (σελ. 43)
- Σχήμα 4.11.:** Παραδείγματα συμπλόκων Tc που περιλαμβάνουν τον πυρήνα $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ (σελ. 44)
- Σχήμα 4.12.:** Δομή του ραδιοφαρμάκου $[\text{^{99m}TcN}(\text{noet})_2]$ (σελ. 44)
- Σχήμα 4.13.:** Παραδείγματα συμπλόκων του τύπου $[\text{^{99m}Tc}(\text{N})(\text{PNP})(\text{XY})]^{0/+}$ (σελ. 45)
- Σχήμα 4.14.:** Ο υποκαταστάτης HYNIC (αριστερά), παράδειγμα $\text{Tc}(\text{HYNIC})$ συμπλόκου (δεξιά) (σελ. 46)
- Σχήμα 4.15.:** Δομή των ραδιοφαρμάκων απεικόνισης του μυοκαρδίου Cardiotech[®] και Technecard[®] (σελ. 46)
- Σχήμα 4.16.:** Η δομή του ραδιοφαρμάκου $[\text{^{99m}Tc}(\text{MIBI})_6]^+$ ή Cardiolite[®] (σελ. 48)
- Σχήμα 4.17.:** Σύμπλοκα του $[\text{Tc}^I(\text{CO})_3]^+$ με Α) ιστιδίνη (αριστερά) Β) PADA (δεξιά) (σελ. 49)
- Σχήμα 5.1.:** Άμεση επισήμανση πεπτιδίου με ^{99m}Tc (σελ. 53)
- Σχήμα 5.2.:** Μέθοδος προεπισήμανσης για τη δημιουργία βιοενεργών μορίων (BM) με ^{99m}Tc (σελ. 55)
- Σχήμα 5.3.:** Μέθοδος μεταεπισήμανσης για τη δημιουργία βιοενεργών μορίων (BM) με ^{99m}Tc (σελ. 56)
- Σχήμα 5.4.:** Αναπαράσταση της διαμόρφωσης των GPCRs (αριστερά), δομή της ροδοψίνης, πρώτου μέλους της υπερικογένειας των GPCRs του οποίου αναλύθηκε η δομή (δεξιά) (σελ. 59)
- Σχήμα 5.5.:** Πορεία μεταγωγής του εξωκυττάριου σήματος από τους GPCRs μέσω των πρωτεϊνών-G (σελ. 60)
- Σχήμα 5.6.:** Σχηματική αναπαράσταση ραδιοπεπτιδίου που δεσμεύεται στον υποδοχέα-στόχο στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου (σελ. 63)
- Σχήμα 5.7.:** Χημικοί υποκαταστάτες ικανοί να δεσμεύουν μεταλλικά ραδιονουκλίδια (σελ. 67)
- Σχήμα 5.8.:** Δομή του συμπλόκου ραδιομετάλλου - χηλικού υποκαταστάτη τύπου τετραμίνης ανοικτής αλυσίδας (σελ. 67)

Σχήμα 5.9.: Δομή της SS-14 (αριστερά) και του κυκλικού οκταπεπτιδίου Octreotide (δεξιά) (σελ. 69)

Σχήμα 5.10.: Δομή της μπομπεσίνης (σελ. 70)

Σχήμα 5.11.: Δομή του GRP ποντικού όπου φαίνεται η διαμόρφωση με τις επτά α-έλικες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (σελ. 72)

Σχήμα 5.12.: Αυτοραδιογραφία GRP-R σε τομή ιστού επιθητικού καρκινώματος μαστού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού A: Χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη B: Αυτοραδιογραφία GRP-R με [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN όπου φαίνεται η ολική του δέσμευση. IDC: πορώδες καρκίνωμα μαστού, b: φυσιολογικός ιστός μαστού (σελ. 73)

Σχήμα 5.13.: A: Τομή με χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη B: Αυτοραδιογραφία GRPR σε καρκίνο του προστάτη με [¹²⁵I-Tyr⁴]BN, όπου παρατηρείται έντονη αμαύρωση της καρκινικής περιοχής και όχι της υπερπλασίας του προστάτη, Ca: καρκίνος, pH: υπερπλασία προστάτη (σελ. 73)

Σχήμα 5.14.: Δομή του [¹¹¹In-DTPA-ACMrip⁵,Tha⁶,βAla¹¹,Tha¹³,Nie¹⁴]BN(5-14) (σελ. 75)

Σχήμα 5.15.: Απεικόνιση της δομής του ¹⁷⁷Lu-AMBA (σελ. 76)

Σχήμα 5.16.: Απεικόνιση της δομής του ^{99m}Tc-RP527 (σελ. 77)

Σχήμα 6.1.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 1 (σελ. 81)

Σχήμα 6.2.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 2 (σελ. 81)

Σχήμα 6.3.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 7 (σελ. 82)

Σχήμα 6.4.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 8 (σελ. 82)

Σχήμα 6.5.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 9 (σελ. 83)

Σχήμα 6.6.: Δομή του πεπτιδικών αναλόγου Demobesin 10 (σελ 83)

Σχήμα 6.7.: Δομή των πεπτιδικών αναλόγων Demobesin 11 (πάνω), Demobesin 12 (κάτω) (σελ. 84)

Σχήμα 11.1: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 2 σε διάλυμα. 1^ο Στάδιο: Σύζευξη του (Boc)₄N₄COOH στο N- τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας (σελ. 122)

Σχήμα 11.2: Μηχανισμός αντίδρασης HATU κατά την σύζευξη του Boc₄N₄COO⁻ στη N-τελική αμινομάδα της πεπτιδικής αλληλουχίας (σελ. 123)

Σχήμα 11.3: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 2 σε διάλυμα. 2^ο στάδιο: Αποπροστασία με επίδραση TFA παρουσία θειοανισόλης και H₂O για την δέσμευση κατιόντων (σελ. 124)

Σχήμα 11.4. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 2. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρωματογράφο συνδεδεμένο με ανιχνευτή UV-Vis PDA (σελ. 125)

Σχήμα 11.5: Φάσμα ESI-MS του Demobesin 2 (σελ. 126)

Σχήμα 11.6: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 7 σε διάλυμα. 1^οστάδιο: σύζευξη του συνδετικού μορίου Fmoc-PEG₂-COOH στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου - 2^οστάδιο: Σύζευξη του (Boc₄)N₄COOH στο N- τελικό άκρο του συνδετικού μορίου (σελ. 128)

Σχήμα 11.7: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 7 σε διάλυμα. 3^ο στάδιο: Αποπροστασία με επίδραση TFA παρουσία θειοανισόλης και H₂O για την δέσμευση κατιόντων (σελ. 129)

Σχήμα 11.8: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 7 (Σύστημα 2) (σελ. 130)

Σχήμα 11.9: Φάσμα ESI-MS του Demobesin 7 (σελ. 130)

Σχήμα 11.10.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 8 (Σύστημα 3) (σελ. 131)

Σχήμα 11.11: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 8 (σελ. 132)

Σχήμα 11.12.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 9 (Σύστημα 4) (σελ. 132)

Σχήμα 11.13: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 9 (σελ. 133)

Σχήμα 11.14.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 10 (Σύστημα 4) (σελ. 133)

Σχήμα 11.15: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 10 (σελ. 134)

Σχήμα 11.16.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 11 (Σύστημα 5) (σελ. 134)

Σχήμα 11.17: Φάσμα Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 11 (σελ. 135)

Σχήμα 11.18.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 12 (Σύστημα 5) (σελ. 135)

Σχήμα 11.19.: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 12 (σελ. 136)

Σχήμα 12.1: Χαρακτηριστική αντίδραση επισήμανσης με ^{99m}Tc για το Demobesin 2 (σελ. 138)

Σχήμα 12.2. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 8. A) Φωτομετρική ανίχνευση B) Ραδιομετρική ανίχνευση. Πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο συνδεδεμένο παράλληλα με ανιχνευτή UV-Vis PDA και ανιχνευτή-γ (Σύστημα 6) (σελ. 140)

Σχήμα 12.3. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 9 Ραδιομετρική ανίχνευση (Σύστημα 6) (σελ. 140)

Σχήμα 12.4. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 8 24 h μετά την επισήμανση (Σύστημα 6) (σελ. 141)

Σχήμα 12.5.: Χρωματογράφημα HPLC [$^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}$]Demobesin 8. A) Φωτομετρική ανίχνευση B) Ραδιομετρική ανίχνευση. Πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο συνδεδεμένο παράλληλα με ανιχνευτή UV-Vis (280 nm) και ανιχνευτή-γ (Σύστημα 6) (σελ. 143)

Σχήμα 12.6.: Σύνθεση του [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8 (σελ. 144)

Σχήμα 12.7: Χρωματογράφημα HPLC του [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8 (Σύστημα 8) (σελ. 145)

Σχήμα 12.8.: Φάσμα ESI-MS του [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8 (σελ. 145)

Σχήμα 12.9.: Συγκριτική HPLC ανάλυση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 (ραδιομετρικό ίχνος) με το [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8 (φωτομετρικό ίχνος). Σύστημα 5 (σελ. 148)

Σχήμα 12.10.: Μηχανισμός ραδιοϊωδίωσης της τυροσίνης με χρήση της χλωραμίνης-T (σελ. 149)

Σχήμα 12.11.: HPLC ανάλυση του μίγματος επισήμανσης του [Tyr^4]BBN με ^{125}I . (A): Μετά την προσθήκη χλωραμίνης-T και επώαση για 60 -90 sec. (B): Μετά από προσθήκη διθειοθρεϊτόλης και θέρμανση στους 80°C για 1 h (Σύστημα 9) (σελ. 150)

Σχήμα 13.1: Καμπύλες ανταγωνιστικής δέσμησης για ένα πληθυσμό υποδοχέων (σελ. 152)

Σχήμα 13.2.: Ανταγωνιστική αναστολή της δέσμησης του [$^{125}\text{I-Tyr}^4$]BBN στους GRP-Rs σε μεμβράνες καρκινικών κυττάρων PC-3 από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Demobesin (σελ. 154)

Σχήμα 13.3.: Καμπύλες ειδικής δέσμησης κορεσμού για ένα πληθυσμό υποδοχέων (σελ. 157)

Σχήμα 13.4. Καμπύλες ολικής (total binding) και μη ειδικής δέσμησης (non specific binding) κορεσμού και καμπύλη ειδικής δέσμησης (specific binding) όπως προκύπτει από την αφαίρεση της μη ειδικής από την ολική δέσμηση (σελ. 158)

Σχήμα 13.5.: Δόσο-εξαρτώμενη εξειδικευμένη δέσμηση του [$^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}$]Demobesin 8 στους GRP-Rs σε ολόκληρα κύτταρα PC-3 (σελ. 159)

Σχήμα 13.6.: Εσωτερίκευση των ραδιοεπισημασμένων αναλόγων μετά από δέσμευσή τους στους GRP-Rs κατά την επώασή τους με PC-3 κύτταρα στους 37°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό εσωτερίκευσης σε σχέση με την ολική ποσότητα του πεπτιδίου που προστέθηκε (σελ. 160)

Σχήμα 13.7.: Εσωτερικήυση των GRP-Rs παρουσία μμπομπεσίνης, Demobesin 8 και Demobesin 10 (σελ. 163)

Σχήμα 14.1.: HPLC ανάλυση δείγματος πλάσματος αίματος μετά από επώασή του με [^{99m}Tc]Demobesin 8 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. (Σύστημα 5) (σελ. 165)

Σχήμα 14.2.: HPLC ανάλυση δείγματος νεφρών ποντικού που συλλέχθηκαν 0 και 15 min μετά τη χορήγηση [^{99m}Tc]Demobesin 8. (Σύστημα 5) (σελ. 166)

Σχήμα 14.3.: HPLC ανάλυση δείγματος ούρων ποντικού που συλλέχθηκαν 30 min μετά τη χορήγηση [^{99m}Tc]Demobesin 8. (Σύστημα 5) (σελ.166)

Σχήμα 15.1.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 2, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h pi σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 169)

Σχήμα 15.2.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 7, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h pi σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 170)

Σχήμα 15.3.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 8, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h pi σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 171)

Σχήμα 15.4.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 11, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h pi σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 172)

Σχήμα 15.5.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 12, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h pi σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 173)

Σχήμα 15.6.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στο πάγκρεας, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g (σελ. 175)

Σχήμα 15.7.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στα νεφρά, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g (σελ. 175)

Σχήμα 15.8.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 2, 1 h, 4 h και 24 h pi σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol

[Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 178)

Σχήμα 15.9.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 2, 1 h, 4 h και 24 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 179)

Σχήμα 15.10.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 8, 1 h, 4 h και 24 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 180)

Σχήμα 15.11.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 11, 1 h, 4 h και 24 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 181)

Σχήμα 15.12.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 12, 1 h, 4 h και 24 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 182)

Σχήμα 15.13.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 1, 1 h, 4 h και 24 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας (σελ. 183)

Σχήμα 15.14.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στον όγκο, για τα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g (σελ. 183)

Σχήμα 15.15.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στο πάγκρεας, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1,2,7,8,11,12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g (σελ. 185)

Σχήμα 15.16.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στα νεφρά, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g (σελ. 185)

Σχήμα 15.17.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 8, 4 h *pi* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους HEK-GRPR. (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης),

ΒΙ=αίμα, Λι=ήπαρ, Ηε=καρδιά, Κί=νεφρά, St=στομάχι, Ιη=έντερο, Sp=σπλήνας, Μυ=μυς,
Lu=πνεύμονες, Ρα=πάγκρεας (σελ. 188)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 2.1.:** Σύγχρονη διάταξη μαγνητικής τομογραφίας (σελ.9)
- Εικόνα 2.2.:** Απεικόνιση όγκου(δεξιό τμήμα μετωπιαίου λοβού), στον εγκέφαλο με τη χρήση μαγνητικής τομογραφίας (σελ. 11)
- Εικόνα 2.3.:** Υπερηχογράφημα ήπατος με χρήση ειδικών σκιαγραφικών, που αποκαλύπτει ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (σελ. 13)
- Εικόνα 2.4.:** Σχηματική αναπαράσταση των δύο διαφορετικών τεχνικών οπτικής απεικόνισης (σελ. 14)
- Εικόνα 2.5.:** Ραδιογραφία θώρακα όπου απεικονίζεται όγκος στον πνεύμονα (αριστερό τμήμα) (σελ.15)
- Εικόνα 2.6.:** Σύγχρονο απεικονιστικό σύστημα αξονικής τομογραφίας (σελ. 16)
- Εικόνα 2.7.:** Αξονική τομογραφία με ένδειξη καρκίνου του παγκρέατος (σελ. 17)
- Εικόνα 2.8.:** Σχηματική αναπαράσταση της εφαρμογής της θεωρίας της «μαγικής σφαίρας» στο σχεδιασμό ραδιοφαρμάκων (σελ. 18)
- Εικόνα 3.1. :** Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PET camera (αριστερά) και σύγχρονη απεικονιστική διάταξη PET(δεξιά) (σελ. 20)
- Εικόνα 3.2.:** PET απεικόνιση ασθενή με σάρκωμα τύπου Ewing (σελ. 20)
- Εικόνα 3.3.:** Σύγχρονη διάταξη SPECT με τρεις κεφαλές (σελ. 23)
- Εικόνα 3.4.:** Απεικόνιση μετά από [¹⁸F]FDG-PET/CT ασθενή με καρκίνο του άνω δεξιά πνεύμονα (αριστερά) και απεικόνιση με SPECT/CT καρκίνου με οστική μετάσταση στο θώρακα (δεξιά) (σελ. 25)
- Εικόνα 4.1.:** Η θέση του Tc στον Περιοδικό Πίνακα (σελ.26)
- Εικόνα 4.2.:** Γεννήτρια ⁹⁹Mo/^{99m}Tc που αποτελείται από χρωματογραφική στήλη ιονανταλλαγής με υλικό πλήρωσης αλουμίνα (Al₂O₃) (σελ. 30)
- Εικόνα 5.1.:** Απεικόνιση ασθενούς μετά από χορήγηση ^{99m}Tc-RP527 (σελ.77)
- Εικόνα 13.1.** Μηχανισμός εσωτερίκευσης των GPCR διαμέσου κυστιδίων επικαλλυμένων με κλαθρίνη (σελ. 161)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.1.:** Σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες (σελ. 6)
- Πίνακας 3.1.:** Κυριότερα ραδιονουκλίδια με εφαρμογή στην τεχνική PET (σελ. 21)
- Πίνακας 3.2.:** Κυριότερα ραδιονουκλίδια με εφαρμογή στην τεχνική SPECT (σελ. 24)
- Πίνακας 4.1. :** Γενικές, φυσικές και ατομικές ιδιότητες του Tc (σελ. 27)
- Πίνακας 4.2.:** Ραδιονουκλίδια του τεχνητίου (σελ. 28)
- Πίνακας 4.3.:** Σημαντικότερα ισότοπα του Re (σελ. 33)
- Πίνακας 4.4.:** Οξειδωτικές βαθμίδες του Tc και σχέση ηλεκτρονιακής και στερεοχημικής διαμόρφωσης (σελ. 37)
- Πίνακας 5.1.:** Χαρακτηριστικά παραδείγματα έκφρασης υποδοχέων ενδογενών πεπτιδίων και οι νεοπλασίες στις οποίες υπερεκφράζονται (σελ. 62)
- Πίνακας 5.2.:** Ραδιονουκλίδια για την ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών ραδιοπεπτιδίων (σελ.65)
- Πίνακας 5.3.:** Σύγκριση των $^{99m}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ (σελ.70)
- Πίνακας 11.1.:** Δεδομένα MS Demobesin 2 (σελ. 126)
- Πίνακας 11.2.:** Δεδομένα MS Demobesin 7 (σελ.131)
- Πίνακας 11.3.:** Δεδομένα MS Demobesin 8 (σελ. 132)
- Πίνακας 11.4.:** Δεδομένα MS Demobesin 9 (σελ. 133)
- Πίνακας 11.5.:** Δεδομένα MS Demobesin 10 (σελ.134)
- Πίνακας 11.6.:** Δεδομένα MS Demobesin 11 (σελ.135)
- Πίνακας 11.7.:** Δεδομένα MS Demobesin 12 (σελ. 136)
- Πίνακας 11.8.:** Συγκεντρωτικά αναλυτικά δεδομένα για τα πεπτιδία (σελ.136)
- Πίνακας 12.1:** Συγκεντρωτικά αναλυτικά χαρακτηριστικά των επισημασμένων αναλόγων (σελ. 139)
- Πίνακας 12.2.:** Δεδομένα MS [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8 (σελ. 145)
- Πίνακας 13.1.** Η ικανότητα δέσμευσης των πεπτιδίων για τον GRP-R (σελ. 155)
- Πίνακας 14.1.:** Αποτελέσματα μεταβολικής μελέτης του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε πλάσμα, ομογενοποίημα νεφρών και ούρα ποντικού (σελ. 166)
- Πίνακας 15.1.:** Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 2 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 169)
- Πίνακας 15.2.:** Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 7 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 170)
- Πίνακας 15.3.:** Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 171)

Πίνακας 15.4.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 11 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 172)

Πίνακας 15.5.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 12 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 173)

Πίνακας 15.6.: Συγκριτική αξιολόγηση των [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g (σελ. 174)

Πίνακας 15.7: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 2 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 1798)

Πίνακας 15.8: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 7 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 179)

Πίνακας 15.9: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 180)

Πίνακας 15.10: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 11 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 181)

Πίνακας 15.11: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 12 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 182)

Πίνακας 15.12: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 1 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 183)

Πίνακας 15.13.: Συγκριτική αξιολόγηση των [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g (σελ. 184)

Πίνακας 15.14.: Λόγος όγκου/υποστρώματος σε 1 h, 4 h και 24 h μετά την χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 (σελ. 187)

Πίνακας 15.15.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους HEK-GRPR ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης) (σελ. 188)

Πίνακας Σ.1.: Εκτόπιση [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN από τους hGRP-Rs σε μεμβράνες κυττάρων PC-3 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των Demobesin 1, Demobesin 2, Demobesin 7-12 και [Tyr⁴]BBN ως ένωση αναφοράς (σελ. 191)

Πίνακας Σ.2.: Ποσοστά ειδικής πρόσληψης σε καρκινικά κύτταρα PC-3 μετά από 2 h επώαση των επισημασμένων πεπτιδίων στους 37⁰C (σελ. 192)

Πίνακας Σ.3.: Αποτελέσματα βιοκατανομής με χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin X σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino (block: για in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 100 μg [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο) (σελ. 193)

Πίνακας Σ.4.: Αποτελέσματα βιοκατανομής με χορήγηση του κάθε ραδιοπεπτιδίου σε ποντίκια τύπου SCID που έφεραν ανθρώπινα ετερομοσχεύματα PC-3 (block: για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 100 μg [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο) (σελ. 195)

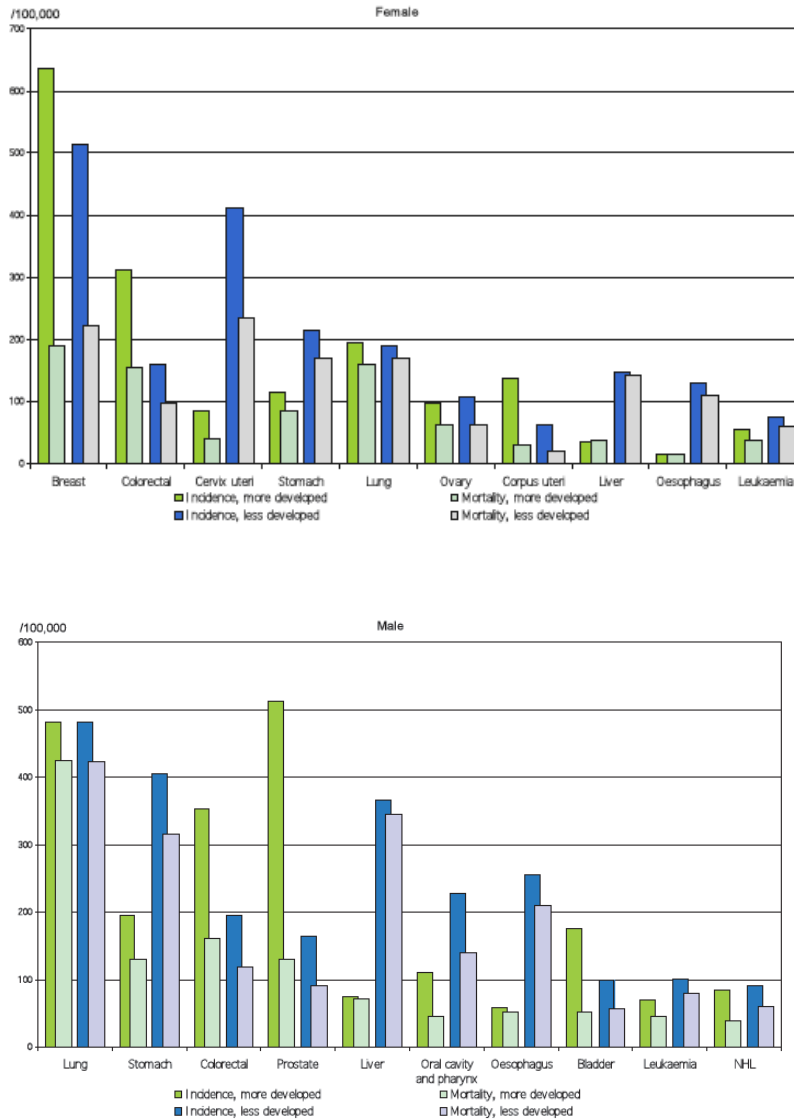
Πίνακας Σ.5.: Βιβλιογραφική σύγκριση του ανταγωνιστή Demobesin 8 με άλλα πεπτίδια ανταγωνιστές μιομπεσίνης (σελ. 196)

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Διάγνωση στην ογκολογία

1.1 Γενικά

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται παγκοσμίως μια δραματική αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου. Αυτή συνδέεται με τους σύγχρονους και αγχώδεις ρυθμούς ζωής, τη κακή διατροφή αλλά και την σε μεγάλη έκταση μόλυνση του φυσικού περιβάλλοντος. Με βάση τα πορίσματα της Παγκόσμιας Έκθεσης για το Καρκίνο (World Cancer Report) του World Health Organization (WHO) για το 2008 [1], το 2004 οι κακοήθεις όγκοι ήταν υπεύθυνοι για το 12% των περίπου 56 εκατομμυρίων θανάτων παγκοσμίως από όλες τις αιτίες. Σε πολλές χώρες, περισσότερο από το 25% των πρόωρων θανάτων οφείλεται σε διάφορα είδη καρκίνου. Η ίδια έκθεση αναφέρει ότι το έτος 2008, 12.4 εκατομμύρια άνθρωποι ανέπτυξαν κακοήθεις όγκους (6.7 εκατομμύρια άνδρες και 5.7 εκατομμύρια γυναίκες) και συνολικά 7.6 εκατομμύρια άτομα πέθαναν από τη νόσο. Η έκθεση επίσης αποκαλύπτει ότι στα αναπτυσσόμενα κράτη η θνησιμότητα λόγω καρκίνου είναι διπλάσια σε σχέση με αυτή στα αναπτυσσόμενα. Η αύξηση των νέων περιστατικών αναμένεται να είναι από 10.9 εκατομμύρια το 2002, σε 30 εκατομμύρια το 2030. Αυτή θα οφείλεται κυρίως στη σταθερά αυξανόμενη γήρανση των πληθυσμών αλλά και στην επέκταση του καπνίσματος και στην υιοθέτηση ανθυγιεινών τρόπων ζωής. Σύμφωνα με τον WHO, ο πιο κοινά εμφανιζόμενος καρκίνος είναι του πνεύμονα με 1.500.000 και ο καρκίνος του μαστού με 1.300.000 κρούσματα ετησίως αντίστοιχα. Ακολουθούν ο καρκίνος του παχέος εντέρου με 1.150.000, ο καρκίνος του στομάχου με 900.000 και ο καρκίνος του προστάτη και των όρχεων με 660.000 κρούσματα ετησίως (Σχήμα 1.1. και Σχήμα 1.2.).



Σχήμα 1.1.: Συχνότητα εμφάνισης και ποσοστά θνησιμότητας των πιο συχνά εμφανιζόμενων καρκίνων παγκοσμίως στις αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες [1]

Ωστόσο, σύμφωνα με τα πορίσματα του WHO, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου, η θνησιμότητα των ασθενών έχει μειωθεί, εξαιτίας κυρίως των διαρκώς εξελισσόμενων μεθόδων αντιμετώπισης. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει επίσης η αλματώδης εξέλιξη της διάγνωσης στην ογκολογία τις τελευταίες δεκαετίες.

Η διάγνωση στην ογκολογία αφορά στην σωστή ανατομική εντόπιση της πρωτογενούς νεοπλασματικής εστίας και τυχόν μεταστάσεων αλλά και στη βελτίωση των γνώσεων γύρω από μια σειρά βιολογικών παραμέτρων που λαμβάνουν χώρα σαν ρυθμιστές της δημιουργίας, ανάπτυξης και ενδεχόμενης διασποράς του

καρκίνου, ώστε να σχεδιαστεί η καταλληλότερη θεραπεία αλλά και να αξιολογούνται τα αποτελέσματά της.

1.2. Διαγνωστικές μέθοδοι

Οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ογκολογία χωρίζονται σε παρεμβατικές και μη παρεμβατικές. Οι παρεμβατικές είναι αυτές που πραγματοποιούνται με χειρουργική επέμβαση ή με εισαγωγή κάποιας συσκευής στον ασθενή (χειρουργικές μέθοδοι, βιοψία, ενδοσκοπικές μέθοδοι). Οι μη παρεμβατικές αντιθέτως δεν είναι επίπονες ή δύσκολες για τον ασθενή και πραγματοποιούνται με συλλογή αίματος, ούρων ή με χρήση απεικονιστικών διαγνωστικών συσκευών (βιοχημικές μέθοδοι, γενετικές δοκιμές, απεικονιστικές μέθοδοι). Ως εκ τούτου αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη των μη παρεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων και ειδικά στη παρούσα διατριβή των απεικονιστικών διαγνωστικών μεθόδων πυρηνικής ιατρικής.

1.2.1. Παρεμβατικές μέθοδοι

Οι παρεμβατικές μέθοδοι χωρίζονται σε:

α) Χειρουργικές, όπου κατά τη διάρκεια μιας χειρουργικής επέμβασης μπορεί να εντοπιστεί μια νεοπλασία, οπότε αυτή αφαιρείται και εξετάζεται με βιοψία.

β) Ενδοσκοπικές, όπου με τη χρησιμοποίηση μιας συσκευής που αποτελείται από λεπτό ευλύγιστο σωλήνα, φωτεινή πηγή και μεγεθυντικό φακό και κατόπιν εισαγωγής της στην εξεταζόμενη περιοχή γίνεται λήψη φωτογραφιών της νεοπλασματικής εστίας αλλά και τυχόν λήψη δειγμάτων για βιοψία. Η ενδοσκόπηση είναι σχετικά ανώδυνη, ασφαλής και δεν έχει παρενέργειες. Χρησιμοποιείται κυρίως για την απεικόνιση του εσωτερικού τμήματος του γαστρεντερικού συστήματος (οισοφάγος, στομάχι, παχύ και λεπτό έντερο), του ουροποιητικού συστήματος, της ρινικής κοιλότητας και του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Η εξέλιξη της τεχνολογίας έχει οδηγήσει και σε διάφορες παραλλαγές της μεθόδου όπως είναι η ενδοσκοπική υπερηχογραφία (endoscopic ultrasonography EUS) [2,3,4,5] και η ενδοσκοπική κάψουλα (capsule endoscopy) [6,7,8,9]. Η ενδοσκοπική υπερηχοτομογραφία, είναι μια νέα απεικονιστική μέθοδος, η οποία συνδυάζει τις τεχνικές της ενδοσκόπησης και της υπερηχογραφίας. Πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση ειδικών ενδοσκοπίων που εκπέμπουν υπέρηχους κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης. Η μέθοδος βοηθά πολύ στην έγκαιρη διάγνωση, η οποία είναι

καθοριστικής σημασίας στην επιβίωση και τη θεραπεία του ασθενούς, καθώς και στη σταδιοποίηση του καρκίνου ώστε να αξιολογηθεί η δυνατότητα χειρουργικής αντιμετώπισης. Η τεχνική της ενδοσκοπικής κάψουλας χρησιμοποιεί κάμερα ενσωματωμένη μέσα σε διάφανη κάψουλα μήκους μερικών mm, την οποία καταπίνει ο ασθενής και η οποία μεταδίδει εικόνες ασύρματα καθώς προωθείται στον πεπτικό σωλήνα μέσω του περισταλτισμού. Με τον τρόπο αυτό, απεικονίζεται όλη η έκταση που διατρέχει και διαγιγνώσκονται πιθανές νεοπλασματικές εστίες. Χρησιμοποιείται κυρίως για την απεικόνιση του εσωτερικού τμήματος του γαστρεντερικού συστήματος.

γ) Βιοψία, όπου γίνεται εκτομή μέρους (βιοψία διάνοιξης) ή ολόκληρου του όγκου (βιοψία εκτομής) με χειρουργική επέμβαση ή ενδοσκόπηση και στη συνέχεια λεπτομερής εξέταση του με μικροσκόπιο. Συνήθως προτιμάται η βιοψία-εκτομή καθώς παρέχει μεγαλύτερη ποσότητα καρκινικού ιστού για εξέταση αλλά και απομάκρυνση του όγκου. Η λήψη δείγματος του όγκου πραγματοποιείται με χρήση βελόνας (τεχνικές fine needle aspiration, cutting needle και core needle) ή με αποφολίδωση κυττάρων με τη χρησιμοποίηση ενδοσκόπησης. Η εξέταση του δείγματος γίνεται με διάφορες τεχνικές όπως ανοσοϊστοχημεία, κυτταρομετρία ροής, ιστοχημεία, ηλεκτρονική μικροσκοπία, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η βιοψία παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το είδος της κακοήθειας, το βαθμό επιθετικότητας και διαφοροποίησης του όγκου, τον αριθμό των εξεταζομένων λεμφαδένων με διήθηση του όγκου και τη παρουσία ή μη υποδοχέων ορμονών. Ωστόσο μπορεί να υπάρχουν και λανθασμένα συμπεράσματα, λόγω ανεπαρκούς δειγματοληψίας του ιστού καθώς είναι πιθανό ένας κακοήθης όγκος να υπάρχει αλλά να μην έχει συμπεριληφθεί στον υπό εξέταση ιστό.

1.3.2. Μη παρεμβατικές μέθοδοι

Περιλαμβάνουν τις βιοχημικές δοκιμές, τις γενετικές δοκιμές και τις μεθόδους απεικόνισης:

α) Βιοχημικές δοκιμές: Πραγματοποιούνται συνήθως στο αίμα (εξέταση λευκών και ερυθρών κυττάρων, αιμοπετάλια), στα ούρα (πρωτεϊνουρία) και στους ιστούς. Επίσης εξετάζονται οι καρκινικοί δείκτες, οι οποίοι είναι μόρια που παράγονται από ορισμένα νεοπλάσματα και δεν συναντούνται σε φυσιολογικά διαφοροποιημένους ιστούς. Τα μόρια αυτά είναι συνήθως το καρκινοεμβρυϊκό

αντιγόνο, αντιγόνα σχετιζόμενα με όγκους, ορμόνες, ένζυμα και πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα και είναι προϊόντα φυσιολογικών γονιδίων. Η εξέτασή τους πραγματοποιείται στον όγκο μετά την βιοψία, στο πλάσμα του αίματος και σε άλλα βιολογικά υγρά. Χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, αλλά και για την ένδειξη υποτροπών γρηγορότερα από άλλες διαγνωστικές μεθόδους. Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες:

Πίνακας 1.1.: Σημαντικότεροι καρκινικοί δείκτες

Καρκινικοί δείκτες	Όγκοι
PSA (prostate-specific antigen) - ειδικό προστατικό αντιγόνο	Καρκίνος προστάτη
CEA (carcinoembryonic antigen) - καρκινοεμβρυικό αντιγόνο	Καρκίνος παχέος εντέρου
CA 15-3 (cancer antigen) - καρκινικό αντιγόνο	Καρκίνος μαστού
CA 19-9	Καρκίνος παγκρέατος
CA 125	Καρκίνος ωοθηκών, επιθηλιακός όγκος
SCC (squamous cell carcinoma) - καρκίνωμα πλακώδους	Καρκίνος πλακώδους επιθηλίου και οισοφάγου
AFP (alpha feroprotein) – α λιποπρωτεΐνη	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
HCG (human chorionic gonadotrophin) - ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη	Καρκίνος των όρχεων, των ωοθηκών, του στομάχου, του παγκρέατος
PAP (prostatic acid phosphatase) - προστατική όξινη φωσφατάση)	Καρκίνος του προστάτη, καρκίνος των όρχεων, λέμφωμα τύπου Non- Hodgkin
NSE (neuron specific enolase) – ειδική ενολάση των νευρώνων	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

Οι καρκινικοί δείκτες πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες διαγνωστικές τεχνικές για την αποφυγή λανθασμένων αποτελεσμάτων. Αυτά μπορεί να οφείλονται στο ότι:

- i) κάθε ασθενής με καρκίνο δεν έχει πάντα αυξημένα επίπεδα των αντίστοιχων δεικτών
- ii) πολλοί καρκινικοί δείκτες δεν είναι εξειδικευμένοι για ένα είδος καρκίνου
- iii) αυξημένα επίπεδα κάποιων καρκινικών δεικτών μπορεί να παρατηρούνται και σε ασθενείς με άλλες καλοήθεις παθήσεις.

β) Γενετικές δοκιμές: Χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του γενετικού «δακτυλικού» αποτυπώματος της νεοπλασματικής νόσου, καθώς ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα γενετικών ανωμαλιών που επηρεάζουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την επαγωγή ή την καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Πραγματοποιούνται με αναλύσεις της αλληλουχίας του DNA (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης αντιγραφής – RT-PCR) καθώς και με αναλύσεις χρωμοσωμικών ανωμαλιών (φθορισμομετρία in situ υβριδισμού – FISH)

γ) Απεικονιστικές μέθοδοι: Χρησιμοποιούνται στην έρευνα του καρκίνου και στη κλινική ογκολογία και περιγράφονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο (κεφάλαιο 2)

2. Απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι

2.1. Γενικά

Ο κλάδος της ιατρικής απεικόνισης έχει γνωρίσει εντυπωσιακή πρόοδο τα τελευταία τριάντα χρόνια. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1970 και την παρουσίαση του πρώτου Υπολογιστικού Αξονικού Τομογράφου (Computer Axial Tomography – CAT), μέχρι και σήμερα, μια πλειάδα απεικονιστικών συστημάτων έχει εξελιχθεί και ενταχθεί στη καθημερινή χρήση της ιατρικής επιστήμης για τις ανάγκες της πρόγνωσης και διάγνωσης.

Οι απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- α) αυτές που δεν χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία (υπερηχογραφία, μαγνητική τομογραφία)
- β) αυτές που χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία (ραδιογραφία, αξονική τομογραφία, πυρηνική ιατρική).

Οι απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι πλεονεκτούν, στο ότι είναι μη παρεμβατικές μέθοδοι με αποτέλεσμα ο ασθενής να έχει λιγότερες επιπλοκές και να μην ταλαιπωρείται. Αυτές που χρησιμοποιούν ιοντίζουσα ακτινοβολία θέλουν προσοχή κατά τη χρησιμοποίησή τους, κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό και ασφαλή μέτρα ακτινοπροστασίας, ώστε να μην είναι επιβλαβείς για τον ασθενή και το ιατρικό προσωπικό.

2.2. Απεικονιστικές μέθοδοι μη ιοντίζουσας ακτινοβολίας

2.2.1. Μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging - M.R.I.)

Το φαινόμενο της απεικόνισης με μαγνητικό συντονισμό (Εικόνα 2.1.) ανακαλύφθηκε από τους E. Purcell και F. Bloch το 1946, ενώ η πρώτη ιδέα χρησιμοποίησης της για την ανίχνευση όγκων στο ανθρώπινο σώμα, διατυπώθηκε από τον R. Damadian το 1972 [10]. Ο P. Lauterbur πραγματοποίησε για πρώτη φορά *in vivo* απεικονίσεις ιστών και οργάνων ασθενών το 1973. Οι P. Mansfield και P. Lauterbur τιμήθηκαν το 2003 με το βραβείο Nobel ιατρικής για τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της μαγνητικής τομογραφίας [11,12].



Εικόνα 2.1.: Σύγχρονη διάταξη μαγνητικής τομογραφίας

Η απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό βασίζεται στην ύπαρξη μαγνητικής ροπής σε πυρήνες που περιέχουν περιττό αριθμό πρωτονίων (π.χ. ^1H , ^{23}Na , ^{31}P , ^{19}F , ^{13}C). Κάθε τέτοιος πυρήνας έχει μία στροφορμή (spin), που τον καθιστά ένα μικροσκοπικό, ανιχνεύσιμο μαγνήτη.

Οι σημερινές εφαρμογές της απεικόνισης με μαγνητικό συντονισμό βασίζονται κυρίως στη διέγερση των πυρήνων του υδρογόνου. Οι πυρήνες του υδρογόνου έχουν ένα πρωτόνιο και βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς αυτός περιέχει νερό σε πολύ μεγάλο ποσοστό (~ 75%). Οι πυρήνες που έχουν spin διαφορετικό από μηδέν εμφανίζουν μαγνητική ροπή, συμπεριφέρονται σαν μαγνητικά δίπολα και είναι δυνατό να παρουσιάσουν το φαινόμενο του μαγνητικού συντονισμού. Όταν ο ασθενής τοποθετηθεί στο εσωτερικό του μαγνητικού τομογράφου, τα μαγνητικά δίπολα των πυρήνων υδρογόνου του σώματος ευθυγραμμίζονται με τη φορά του εξωτερικού πεδίου. Με τη εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικού πεδίου που οφείλεται σε ακτινοβολήση στη περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, οι πυρήνες υδρογόνου απορροφούν ενέργεια και εκτρέπονται από την ευθυγράμμιση τους με το εξωτερικό πεδίο. Όταν σταματήσει η εφαρμογή του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, οι διεγερμένοι πυρήνες επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση εκπέμποντας ραδιοκύματα που ανιχνεύονται από τον μαγνητικό τομογράφο. Η ταχύτητα επαναφοράς των πυρήνων υδρογόνου στη θέση ισορροπίας, μετά την παύση της ραδιοσυχνότητας, καθορίζεται από τις παραμέτρους T1 (επιμήκης χρόνος επαναφοράς – spin lattice relaxation) και T2 (εγκάρσιος χρόνος επαναφοράς – spin spin relaxation), οι οποίες εξαρτώνται από τη χημική σύσταση των ιστών. Η ένταση του σήματος εξαρτάται από τις δύο παραπάνω παραμέτρους αλλά και από την περιεκτικότητα κάθε ιστού ή οργάνου σε νερό.

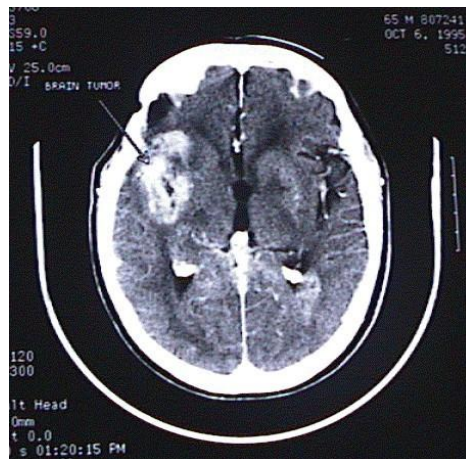
Η ανίχνευση των όγκων βασίζεται στο ότι τα πρωτόνια σε διαφορετικούς ιστούς επιστρέφουν στη κατάσταση ισορροπίας με διαφορετικούς ρυθμούς. Η αλλαγή των παραμέτρων στον ανιχνευτή, έχει σαν επιθυμητό αποτέλεσμα να δημιουργείται αντίθεση μεταξύ διαφορετικών τύπων σωματικού ιστού (π.χ. όγκου με παρακείμενους ιστούς). Για την ενίσχυση του σήματος του μαγνητικού συντονισμού είναι δυνατόν να χορηγηθούν κατάλληλα σκιαγραφικά στον ασθενή (π.χ. σύμπλοκα του γαδολινίου [13,14] και νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου [15,16]). Η ενίσχυση της αντίθεσης βασίζεται στη μεταβολή των χρόνων μαγνητικής αποκατάστασης. Οι χρησιμοποιούμενες ουσίες είναι κυρίως παραμαγνητικά ιόντα και παραμαγνητικά σύμπλοκα. Πρόκειται για μόρια ή ιόντα που διαθέτουν ένα ασύζευτο (μονήρες) ηλεκτρόνιο. Το ηλεκτρόνιο αυτό έχει μεγάλη μαγνητική ροπή. Όταν μια παραμαγνητική ουσία βρεθεί μέσα σε μαγνητικό πεδίο οι μαγνητικές ροπές προσανατολίζονται παράλληλα με τις δυναμικές γραμμές του πεδίου. Το αποτέλεσμα είναι η μεταβολή της έντασης του τοπικού πεδίου με αντίστοιχες μεταβολές στους χρόνους μαγνητικής αποκατάστασης των γειτονικών ιστών (που παρουσιάζουν διαγνωστικό ενδιαφέρον). Αυτό που ενδιαφέρει, ως προς την ενίσχυση της αντίθεσης, είναι η ελάττωση του χρόνου μαγνητικής αποκατάστασης. Η ελάττωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος που προέρχεται από τον εξεταζόμενο ιστό. Η ελάττωση του χρόνου μαγνητικής αποκατάστασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραμαγνητικής ουσίας και του τετραγώνου της μαγνητικής ροπής. Η χορήγηση των σκιαγραφικών ουσιών μπορεί να γίνει με ενδοαγγειακή έγχυση, από το στόμα ή και με εισπνοή. Ως σκιαγραφικά ενδοαγγειακής έγχυσης έχουν προταθεί τα ιόντα γαδολινίου (Gd^{3+}), χρωμίου (Cr^{3+}) και μαγγανίου (Mn^{2+}) συνδεδεμένα με χημικά σύμπλοκα όπως EDTA και DTPA. Ως ουσίες χορηγούμενες από το στόμα έχουν προταθεί διαλυτά μεταλλικά ιόντα όπως σιδηρούχο νιτρικό αμμώνιο και αδιάλυτες ουσίες όπως οξαλικό γαδολίνιο. Τέλος για χορήγηση με εισπνοή έχει προταθεί το μοριακό οξυγόνο το οποίο διαθέτει δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια (με παράλληλα spin) και συνεπώς είναι παραμαγνητικό. Εκτός από τις σκιαγραφικές ουσίες που επηρεάζουν τους χρονικούς T1, T2 έχουν προταθεί και ουσίες που επηρεάζουν την πυκνότητα πρωτονίων χωρίς όμως σημαντικές εφαρμογές μέχρι στιγμής.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μαγνητικής τομογραφίας είναι πολλά. Παρέχει τρισδιάστατες εικόνες πολύ καλής χωροταξικής ανάλυσης. Επίσης προσφέρει την δυνατότητα πολλών επαναλήψεων και ευελιξίας στην εφαρμογή, γιατί ο ασθενής δεν

επιβαρύνεται με ιοντίζουσες ακτινοβολίες. Επίσης παρέχει τη δυνατότητα εφαρμογής της σε όλες σχεδόν τις ανατομικές περιοχές.

Παρουσιάζει όμως και αρκετά μειονεκτήματα. Η μεγάλη χρονική διάρκεια εκτέλεσης ορισμένων εξετάσεων μπορεί να προκαλέσει δυσφορία στον ασθενή, ενώ δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις ασθενών με καρδιακό βηματοδότη. Οι χρησιμοποιούμενες συσκευές έχουν πολύ μεγάλο κόστος τόσο για την αγορά τους, όσο και για την συντήρησή τους. Επίσης, οι μετρήσεις μπορεί να επηρεαστούν από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία και η χημική σύσταση ή αιματική ροή του εξεταζόμενου ιστού κατά την χρονική στιγμή που εκτελείται η μαγνητική τομογραφία.

Η μαγνητική τομογραφία στην διαγνωστική ογκολογία χρησιμοποιείται για τη διάγνωση καρκινικών εστιών στον εγκέφαλο, στο μυοσκελετό αλλά και ηπατικών μεταστάσεων (Εικόνα 2.2.). Συνήθως χρησιμοποιείται σαν επικουρική μέθοδος και όχι σαν πρώτη απεικονιστική μέθοδος στην ογκολογία λόγω του υψηλού κόστους της.



Εικόνα 2.2.: Απεικόνιση όγκου (δεξιό τμήμα μετωπιαίου λοβού) στον εγκέφαλο με τη χρήση μαγνητικής τομογραφίας

2.2.3. Υπερηχογραφία (UltraSonography- US)

Οι υπέρηχοι αναπτύχθηκαν αρχικά για στρατιωτική χρήση καθώς και για χρήση στη ναυσιπλοΐα. Στην Ιατρική χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για διαγνωστικούς λόγους τη δεκαετία του 1950 από τους I. Elder και C. Hertz στο Lund University [17,18].

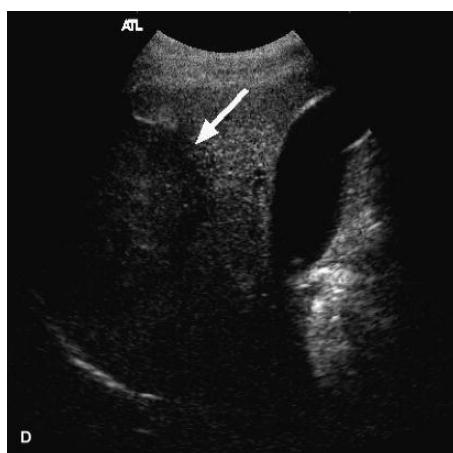
Στην υπερηχογραφία χρησιμοποιείται μια διάταξη εκπομπής υπερήχων, η οποία μεταδίδει ηχητικούς παλμούς υψηλής συχνότητας στον ασθενή. Κατά τη διάδοση του ηχητικού παλμού μέσα στο σώμα, ένα μέρος του επιστρέφει πίσω κάθε φορά, προερχόμενο από ένα διαφορετικό μέτωπο ιστού που παρεμβάλλεται κατά τη

διάδοση του. Η χρονική καθυστέρηση μεταξύ της παραγωγής του παλμού και της επιστροφής του, είναι ανάλογη του βαθμού της ανάκλασης από τον ανιχνευτή (probe), ο οποίος παράγει ηχητικούς παλμούς προσδιορισμένους κατά διεύθυνση και κατά απόσταση διάδοσης [19]. Αυτοί οι ηχητικοί παλμοί κατόπιν απεικονίζονται σε σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η υπερηχογραφία παρουσιάζει κάποια βασικά πλεονεκτήματα καθώς είναι απλή, δεν παρουσιάζει παρενέργειες, οι διατάξεις είναι σχετικά χαμηλού κόστους και είναι εύχρηστη. Επίσης η διαδικασία της σάρωσης είναι γρήγορη και άνετη για τον ασθενή και προσφέρει δυναμική απεικόνιση των οργάνων – ιστών του σώματος.

Στα μειονεκτήματά της συμπεριλαμβάνονται, η χαμηλή ικανότητα σκιαγράφησης των ιστών που συνδέουν, υποστηρίζουν ή περιβάλλουν δομές και όργανα του σώματος όπως είναι τα αιμοφόρα αγγεία, τα νεύρα, οι μυς, ο συνδετικός ιστός, ο λιπώδης ιστός αλλά και η μικρή επαναληψιμότητα της καθώς εξαρτάται από την ικανότητα και την εμπειρία του χειριστή.

Στη διαγνωστική ογκολογία χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη όγκων στα νεφρά, γυναικολογικών καρκίνων, ηπατικών όγκων, πρωτογενών όγκων ή διηθημένων λεμφαδένων στο λαιμό και στη βουβωνική χώρα (Εικόνα 2.3.). Η ευαισθησία της υπερηχογραφίας ως προς την διάγνωση καρκινικών όγκων έχει βελτιωθεί πολύ με τη χρησιμοποίηση ειδικών σκιαγραφικών μέσων, όπως των μικροφουσαλίδων αδρανούς αερίου (ultrasonography-specific microbubble contrast agents) [20,21].



Εικόνα 2.3.: Υπερηχογράφημα ήπατος με χρήση ειδικών σκιαγραφικών, που αποκαλύπτει ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

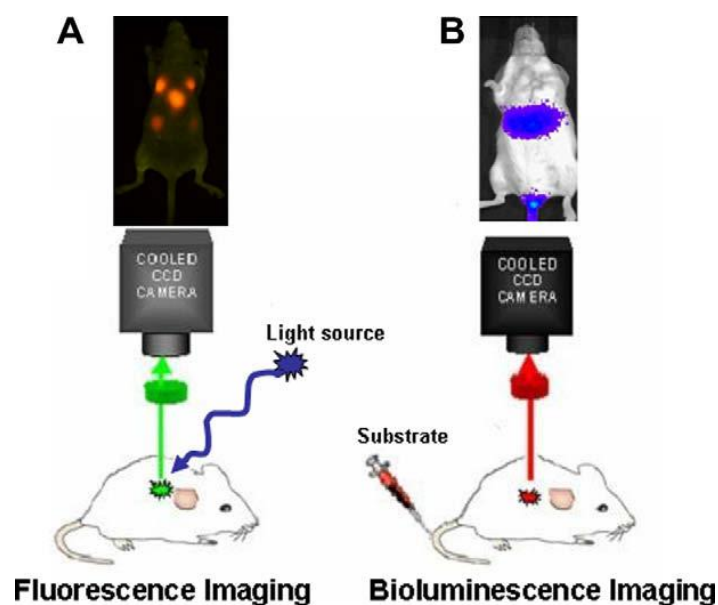
2.2.4. Οπτική απεικόνιση (Optical imaging)

Η οπτική απεικόνιση είναι μια ταχέως αναπτυσσόμενη μέθοδος η οποία προς το παρόν δεν χρησιμοποιείται στη κλινική ογκολογία παρά μόνο στην προκλινική έρευνα του καρκίνου σε πειραματόζωα. Χρησιμοποιεί την εγγύς – υπέρυθρη (near – infrared) περιοχή του φάσματος και ανιχνεύει ανατομικές ή βιοχημικές ιδιότητες του εξεταζόμενου ιστού ή οργάνου.

Πραγματοποιείται με δύο διαφορετικές τεχνικές [22] (Εικόνα 2.4.):

α) απεικόνιση φθορισμού (fluorescence imaging – FLI). Σε αυτή ένας φθορίζων ιχνηθέτης (π.χ. χρωστικές της κυανίνης), ο οποίος έχει εισαχθεί στον ασθενή διεγείρεται από εξωτερική πηγή φωτός. Κατά την μετάπτωσης του στη στοιχειώδη κατάσταση φθορίζει λόγω της αυθόρμητης εκπομπής ενός πρωτονίου. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με κατάλληλη κάμερα (charged coupled device CDD).

β) απεικόνιση βιοφωταύγειας (bioluminescence imaging – BLI). Βασίζεται στη φωταύγεια που εκπέμπει η επίδραση του ενζύμου λουσιφεράση κατά την αλληλεπίδραση στο κατάλληλο υπόστρωμα. Η ανίχνευση πραγματοποιείται με CDD, στη περιοχή του ορατού φωτός (400-700 nm) ή στη περιοχή του εγγύς-υπέρυθρου (~ 800 nm).



Εικόνα 2.4.: Σχηματική αναπαράσταση των δύο διαφορετικών τεχνικών οπτικής απεικόνισης

Η οπτική απεικόνιση πλεονεκτεί στο ότι είναι πολύ γρήγορη, εύχρηστη και χαμηλού κόστους. Ωστόσο παρουσιάζει και αρκετά μειονεκτήματα, καθώς έχει χαμηλή χωροταξική ανάλυση (spatial resolution)¹.

2.3. Απεικονιστικές μέθοδοι ιοντίζουσας ακτινοβολίας

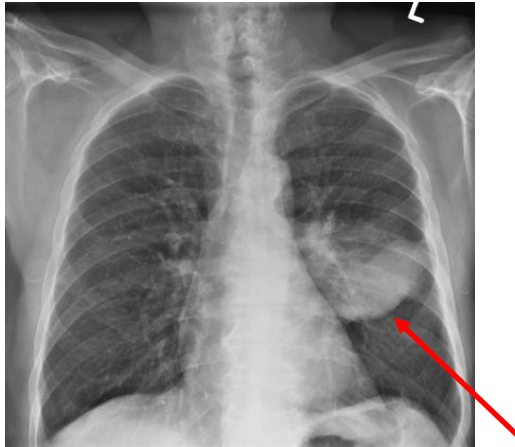
Στις απεικονιστικές μεθόδους ιοντίζουσας ακτινοβολίας, η πηγή της ακτινοβολίας βρίσκεται είτε έξω από το σώμα του ασθενή, όπως στις τεχνικές ακτίνων-Χ (ραδιογραφία και αξονική τομογραφία), είτε μέσα στο σώμα του ασθενή (πυρηνική ιατρική).

2.3.1. Ακτινογραφία (radiography)

Η ανακάλυψη των ακτίνων-Χ από τον W.C. Röntgen το 1895 [23,24] οδήγησε στη χρησιμοποίηση της ακτινογραφίας για την απεικόνιση του ανθρώπινου σώματος. Σύμφωνα με τη τεχνική αυτή, μια δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει στο εξεταζόμενο σώμα. Οι ακτίνες-Χ ανάλογα με τη πυκνότητα των ιστών που συναντούν απορροφώνται λιγότερο ή περισσότερο και στη συνέχεια “παγιδεύονται” από ανιχνευτή (φιλμ ευαίσθητο σε ακτίνες-Χ), δίνοντας μια δισδιάστατη (2D) απεικόνιση.

Τα πλεονεκτήματα της ακτινογραφίας είναι ότι σαν μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και ευρέως διαθέσιμη, με αποτέλεσμα να αποτελεί τη δεύτερη πιο διαδεδομένη μέθοδο των εξετάσεων που χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Ωστόσο στη διαγνωστική ογκολογία δεν χρησιμοποιείται εκτεταμένα, παρά μόνο στις περιπτώσεις όπου ο όγκος ή η καρκινική εστία απορροφά τις ακτίνες-Χ σε σημαντικά διαφορετικό βαθμό από ότι οι περιβάλλοντες ιστοί. Κυριότερες εφαρμογές της στη διαγνωστική ογκολογία είναι για την εξέταση περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και των οστών (Εικόνα 2.5.).

¹ Spatial resolution: η ικανότητα μιας απεικονιστικής διάταξης να διακρίνει τη διαφορετικότητα δύο δομών που βρίσκονται πολύ κοντά η μία με την άλλη σε μια εικόνα



Εικόνα 2.5.: Ραδιογραφία θώρακα όπου απεικονίζεται όγκος στον πνεύμονα (αριστερό τμήμα)

2.3.2. Αξονική τομογραφία (Computed Tomography CT)

Η υπολογιστική τομογραφία ή αξονική τομογραφία (CT) [25] (Εικόνα 2.6.), θεωρείται η σημαντικότερη εξέλιξη στη διαγνωστική των ακτίνων Χ από την εποχή της ανακάλυψής τους. Η υπολογιστική τομογραφία βασίζεται στην ανακατασκευή (reconstruction) της εικόνας της εσωτερικής μορφολογίας των διαφόρων οργάνων του σώματος, με τη σύνθεση πολλαπλών προβολών εγκάρσιων τομών του εξεταζόμενου οργάνου. Η διαδικασία ανακατασκευής της εικόνας γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστικού συστήματος. Η πρώτη εφαρμογή ανακατασκευής εικόνας στη διαγνωστική ακτινολογία περιγράφηκε από τον J. Frank στο Αμβούργο το 1938. Ο Godfret Newbold Hounsfield του ερευνητικού εργαστηρίου της EMI, ήταν αυτός που το 1967 κατασκεύασε και χρησιμοποίησε το πρώτο σύστημα Υπολογιστικής Τομογραφίας. Για αυτή τη συμβολή του στη διαγνωστική Ιατρική τιμήθηκε μαζί με τον A.M. Cormack με το βραβείο Nobel Ιατρικής το 1979 [11,17,26].

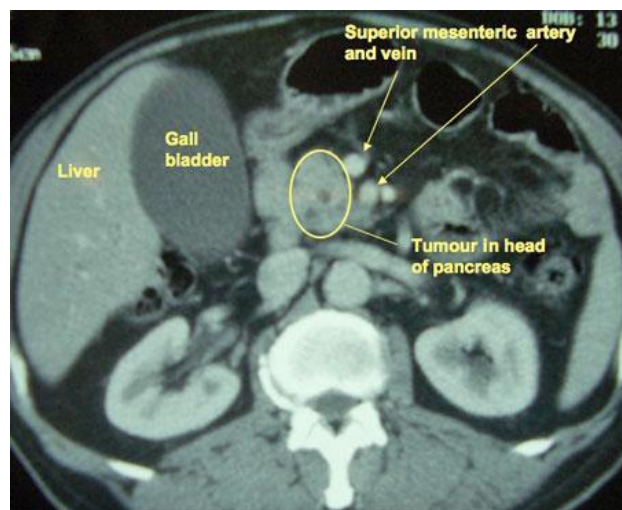


Εικόνα 2.6.: Σύγχρονο απεικονιστικό σύστημα αξονικής τομογραφίας

Στη CT, η λυχνία ακτίνων Χ κινείται γύρω από το σώμα του ασθενή και εκπέμπει λεπτή δέσμη ακτινοβολίας. Αυτή αφού διαπεράσει την περιοχή εξέτασης, εξέρχεται εξασθενημένη, λόγω της απορρόφησης ενέργειας από τους διάφορους ιστούς του σώματος που παρεμβάλλονται στη διαδρομή της. Οι διάφορες τιμές εξασθένισης της ακτινοβολίας από κάθε προβολή, καταγράφονται με τη βοήθεια ανιχνευτών (detectors), που βρίσκονται σε αντιδιαμετρική θέση με την εστία της λυχνίας ακτίνων Χ. Οι ανιχνευτές μετατρέπουν τις ακτίνες Χ σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία μέσω ηλεκτρονικών διατάξεων, μεταφέρονται με κωδικοποιημένη μορφή στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου μετά από επεξεργασία και ανασύνθεση των πληροφοριών, πραγματοποιείται η τρισδιάστατη απεικόνιση της εξεταζόμενης περιοχής.

Η συνεχής εξέλιξη της τεχνολογίας έχει οδηγήσει στους υπολογιστικούς τομογράφους 5^{ης} γενιάς. Αυτοί βασίζονται στην παραγωγή δέσμης ηλεκτρονίων, η οποία αφού επιταχυνθεί, εστιάζεται και οδηγείται μαγνητικά μέσω πηνίων στις “ανόδους” (target rings) για τη λήψη πολλαπλών τομών. Έτσι επιτυγχάνεται χρόνος σάρωσης 50 ms και διαδοχική λήψη 17 τομών ανά δευτερόλεπτο, με αποτέλεσμα βελτιστοποίηση της διαγνωστικής αξίας, ταχεία απεικόνιση του όγκου ή του σώματος και λήψη τρισδιάστατων εικόνων μεγάλης χωροταξικής ανάλυσης.

Η αξονική τομογραφία χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως διαγνωστικό εργαλείο στη ογκολογία λόγω της σχετικά ευρείας διαθεσιμότητας (Εικόνα 2.7.). Πλεονεκτεί έναντι της συμβατικής ραδιογραφίας καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα. Η ολόσωμη αξονική τομογραφία ωστόσο, αποφεύγεται γενικώς στη κλινική ογκολογία, λόγω ακτινοβόλησης του ασθενή με υψηλές δόσεις ακτινοβολίας.



Εικόνα 2.7.: Αξονική τομογραφία με ένδειξη καρκίνου του παγκρέατος

2.3.3. Πυρηνική Ιατρική (Nuclear Medicine)

Η πυρηνική ιατρική αποτελεί κλάδο της ιατρικής και στηρίζεται στη χρησιμοποίηση ενώσεων ραδιονουκλιδίων που ονομάζονται ραδιοφάρμακα. Τα ραδιοφάρμακα χορηγούνται στον ασθενή κυρίως ενδοφλέβια και εντοπίζονται σε ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό, επιτρέποντας την απεικόνιση και τη μελέτη του. Η απεικόνιση στηρίζεται σε ανίχνευση της εκπνεύμενης από το ραδιονουκλίδιο ακτινοβολίας από ειδικές εξωτερικές απεικονιστικές διατάξεις. Οι τεχνικές της πυρηνικής ιατρικής πλεονεκτούν σε σχέση με τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους, καθώς οι πληροφορίες που λαμβάνονται αφορούν την φυσιολογία και λειτουργικότητα του ιστού ή του οργάνου, σε αντίθεση με τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους που παρέχουν κυρίως πληροφορίες για δομικές και μορφολογικές αλλοιώσεις που μπορεί να οφείλονται σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκίνος). Επομένως η πυρηνική ιατρική παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία, δεδομένου ότι πρώτα λαμβάνουν χώρα οι λειτουργικές διαταραχές και κατόπιν επέρχονται οι μορφολογικές αλλοιώσεις [27,28].

Τα πλεονεκτήματα της πυρηνικής ιατρικής που οδήγησαν στην ευρεία εξάπλωσή της είναι πολλά. Η συνεχής εξέλιξη της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται στον σχεδιασμό των απεικονιστικών διατάξεων οδηγούν σε αποτελεσματικότερες και πιο αξιόπιστες *in vivo* διαγνώσεις [29,30]. Επίσης η ανακάλυψη ειδικών μορίων στόχων που μπορεί να συνδέονται με ασθένειες, οδήγησε σύμφωνα με την θεωρία της «μαγικής σφαίρας» που εκφράστηκε από τον Paul Ehrlich [31] (§ 5.1,) στο σχεδιασμό εξειδικευμένων ραδιοϊχνηθετών (ραδιοφάρμακα μοριακής στόχευσης), ικανών για *in vivo* απεικόνιση βιοχημικών διεργασιών με μεγάλη ευαισθησία (Εικόνα 2.8.).



Εικόνα 2.8.: Σχηματική αναπαράσταση της εφαρμογής της θεωρίας της «μαγικής σφαίρας» στο σχεδιασμό ραδιοφαρμάκων

Τα ραδιοφάρμακα στη πυρηνική ιατρική χορηγούνται σε ιδιαίτερα μικρές συγκεντρώσεις (~pM). Αντίθετα σε άλλες χρησιμοποιούμενες απεικονιστικές διαγνωστικές μεθόδους χρησιμοποιούνται για αποτελεσματική απεικόνιση υψηλές συγκεντρώσεις σκιαγραφικών (10^{-6} έως 10^{-2} M), που μπορούν να οδηγήσουν σε κορεσμό του μελετούμενου συστήματος.

1. Τεχνικές πυρηνικής ιατρικής

Κατά τον σχεδιασμό και ανάπτυξη ραδιοφαρμάκων για *in vivo* εφαρμογή, πρωταρχικό λόγο έχει η επιλογή του κατάλληλου διαγνωστικού ραδιονουκλιδίου. Το ιδανικό διαγνωστικό ραδιονουκλίδιο πρέπει να παράγεται εύκολα, γρήγορα και με μικρό κόστος. Πρέπει να παρέχει προϊόν υψηλής καθαρότητας και υψηλής ειδικής ραδιενέργειας². Η ακτινοβολία που εκπέμπεται κατά τη διάσπαση του θα πρέπει να είναι φωτονιακή (γ - ακτινοβολία) ή ποζιτρόνια (β^+) χωρίς ή με πολύ μικρή εκπομπή σωματιδιακής ακτινοβολίας (α ή β^- σωματίδια). Η ημιπερίοδος ζωής του ραδιονουκλιδίου να είναι τέτοια, ώστε η ολοκλήρωση της παρασκευής του ραδιοφαρμάκου και η χορήγηση του για την εξέταση να γίνεται χωρίς άσκοπη ακτινοβόληση του ασθενή. Οι απεικονιστικές διατάξεις αλλά και οι νέες τάσεις που κυριαρχούν στην πυρηνική ιατρική αναφέρονται στα επόμενα υποκεφάλαια.

3.1 Τεχνική PET

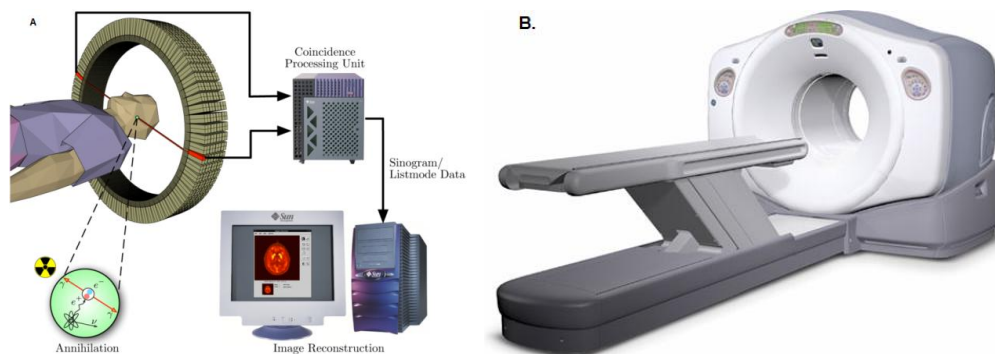
Η ιδέα της τεχνικής PET (Positron Emission Tomography) [32-34], δηλαδή της τομογραφίας με εκπομπή ποζιτρονίων, αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1950 αρχικά από τους David E. Kuhl και Roy Edwards στο Πανεπιστήμιο της Πεννσυλβάνια. Οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές βελτιώθηκαν περαιτέρω από τους Michel Ter-Pogossian και Michael E. Phelps [35,36] στο Washington University School of Medicine, όπου το 1974 αναπτύχθηκε η πρώτη PET κάμερα με εφαρμογή σε κλινικές μελέτες

Στη τεχνική PET χρησιμοποιούνται ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια ως πηγή της ακτινοβολίας. Το ποζιτρόνιο (β^+) αποτελεί την αντίυλη του ηλεκτρονίου (β^-) και ουσιαστικά είναι ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόνιο. Μετά την εκπομπή του, το ποζιτρόνιο διανύει μερικά mm στον ιστό του ασθενούς, και χάνει ένα μεγάλο μέρος της κινητικής του ενέργειας μέσω ιονισμού και διέγερσης των γειτονικών μορίων και ατόμων. Η πορεία του συνεχίζεται μέχρι να συναντήσει και να αλληλεπιδράσει τυχαία με ένα ηλεκτρόνιο. Λόγω της σύγκρουσης γίνεται εξαΰλωση του ζεύγους ποζιτρονίου – ηλεκτρονίου και παράγεται ένα ζεύγος φωτονίων γ - ακτινοβολίας και ενέργειας 511 keV, τα οποία κινούνται σε αντιδιαμετρική μεταξύ τους κατεύθυνση. Ανιχνεύονται όταν προσπίπτουν στον σπινθηριστή στη συσκευή ανίχνευσης.

² Η ειδική ραδιενέργεια είναι το συνολικό ποσό ραδιενέργειας ανά μονάδα μάζας του πεπτιδίου (Ci/mmol)

Στην PET προσδιορίζεται έμμεσα το σημείο προέλευσης του ποζιτρονίου, ανιχνεύοντας το ζεύγος φωτονίων που παράγεται κατά την εξαύλωση του. Στη συνέχεια με κατάλληλο υπολογιστικό σύστημα παράγεται η τομογραφική εικόνα.

Στην εικόνα 3.1.A. παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας της κάμερας PET, στην Εικόνα 3.1.B. μια σύγχρονη PET διάταξη, ενώ στην Εικόνα 3.2. μία PET απεικόνιση ασθενή:



Εικόνα 3.1. : Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας της PET camera (αριστερά) και σύγχρονη απεικονιστική διάταξη PET(δεξιά)



Εικόνα 3.2.: PET απεικόνιση ασθενή με σάρκωμα τύπου Ewing

Ένα απεικονιστικό σύστημα PET αποτελείται από τη τράπεζα εξέτασης του ασθενή και από ένα δακτύλιο στον οποίο υπάρχει η ανιχνευτική διάταξη. Η διάταξη αυτή περιέχει πολλαπλούς δακτυλίους ανιχνευτών φωτονιακής ακτινοβολίας. Ο κάθε ανιχνευτής αποτελείται από συστοιχίες σπινθηριστικών κρυστάλλων και φωτοπολλαπλασιαστών. Οι σπινθηριστικοί κρύσταλλοι που χρησιμοποιούνται πρέπει να έχουν καλή χωρική διακριτική ικανότητα, μεγάλη απορροφητική ικανότητα και μεγάλη ευαισθησία, μικρή σταθερά χρόνου εκπομπής των δευτερογενών φωτονίων οπότε και καλή χρονική διακριτική ικανότητα και μεγάλη παραγωγή σπινθηρισμών. Οι κυριότεροι σπινθηριστικοί κρύσταλλοι που χρησιμοποιούνται στη

τεχνική PET είναι οι NaI(Tl), CsF, Bi₄(GeO₄)₃, Lu₂(SiO₄), Gd₂SiO₅. Η διέγερση των ατόμων του κρυστάλλου από την πρόσκρουση της ακτινοβολίας οδηγεί σε παραγωγή φωτός (σπινθηρισμός). Ειδικοί φωτοηλεκτροί μεταφέρουν το σπινθηρισμό στη κάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή και παράγουν ηλεκτρόνια. Στη διαδρομή τους τα ηλεκτρόνια ενισχύονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρονικό σήμα με ισχύ ανάλογη του αριθμού των παραγόμενων σπινθηρισμών. Το σύνολο των ηλεκτρονικών σημάτων, με τη βοήθεια κατάλληλου υπολογιστικού συστήματος μετατρέπεται τελικά σε τρισδιάστατη τομογραφική απεικόνιση της εξεταζόμενης περιοχής. Μόνο τα ζεύγη φωτονίων που ανιχνεύονται ταυτόχρονα λαμβάνονται υπόψη στη τελική απεικόνιση. Ο προσδιορισμός της κατεύθυνσης του ζεύγους φωτονίου επιτυγχάνεται με ηλεκτρονική ευθυγράμμιση (electronic collimation). Η θέση της πηγής του ποζιτρονίου υπολογίζεται πάνω στην ευθεία γραμμή που συνδέει τους δύο ανιχνευτές (line of response LOR).

Τα ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική PET συνήθως έχουν σχετικά μικρό χρόνο ημιζωής. Τα πιο σημαντικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. [37]:

Πίνακας 3.1.: Κυριότερα ραδιονουκλίδια με εφαρμογή στην τεχνική PET

Ραδιονουκλίδιο	t _{1/2} (min)	Τρόπος διάσπασης (%)	Ενέργεια διάσπασης (MeV)	Τρόπος Παραγωγής
¹¹ C	20.3	β ⁺	0.96	Κυκλοτρόνιο, ¹⁴ N(p,α) ¹¹ C
¹³ N	9.97	β ⁺	1.19	Κυκλοτρόνιο, ¹⁶ O(p,n) ¹³ N
¹⁵ O	2.03	β ⁺	1.70	Κυκλοτρόνιο, ¹⁵ N(p,α) ¹⁵ O ή ¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O
¹⁸ F	109.8	β ⁺ (97), EC (3)	0.64	Κυκλοτρόνιο, ¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F
⁶⁴ Cu	774			
⁶⁸ Ga	67.8	β ⁺ (90), EC (10)	1.89	Γεννήτρια ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga
⁸⁶ γ	882	β ⁺ (33), EC (66)	1.25(11), 1.6(5), 2.02 (40), 2.34 (11)	Κυκλοτρόνιο, ⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ γ
¹²⁴ I	4608	β ⁺ (25), EC (75)	0.79, 1.53, 2.13	Κυκλοτρόνιο, ¹²⁴ Te(p,n) ¹²⁴ I

EC: σύλληψη ηλεκτρονίου (electron capture), β⁺: ποζιτρόνιο

Τα ραδιονουκλίδια PET παρασκευάζονται είτε με αντιδράσεις βομβαρδισμού με δέσμη φορτισμένων σωματιδίων από κυκλοτρόνιο, είτε με διάσπαση ενός μακρόβιου μητρικού ραδιονουκλιδίου χρησιμοποιώντας γεννήτρια ραδιονουκλιδίων. Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στο ότι ενσωματώνονται απευθείας σε φυσικά βιομόρια, χωρίς να αλλάζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Τα ραδιονουκλίδια αυτά αποτελούν τη βάση για τη παραγωγή ραδιοφαρμάκων ειδικών για διαφορετικές

βιολογικές εργασίες εμπλεκόμενες στον καρκίνο, όπως η σύνθεση μεμβρανών ($[^{11}\text{C}]$ χολίνη), ο μεταβολισμός της γλυκόζης ($[^{18}\text{F}]$ φθορο-2-δεοξυ-D-γλυκόζη - $[^{18}\text{F}]$ FDG), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ($[^{18}\text{F}]$ φθοροθυμιδίνη - $[^{18}\text{F}]$ FLT) και η αιματική ροή ($[^{15}\text{O}]$ H₂O). Η PET βρίσκει εφαρμογή σε πολύ σημαντικούς τομείς της ιατρικής όπως η νευρολογία – νευροχειρουργική, η καρδιολογία και η ογκολογία (π.χ. στον εντοπισμό όγκων, διαχωρισμό καλοήθων και κακοήθων όγκων, εντοπισμό μεταστάσεων καρκίνου, ποσοτική εκτίμηση αιμάτωσης του όγκου, αξιολόγηση απόκρισης στη θεραπεία).

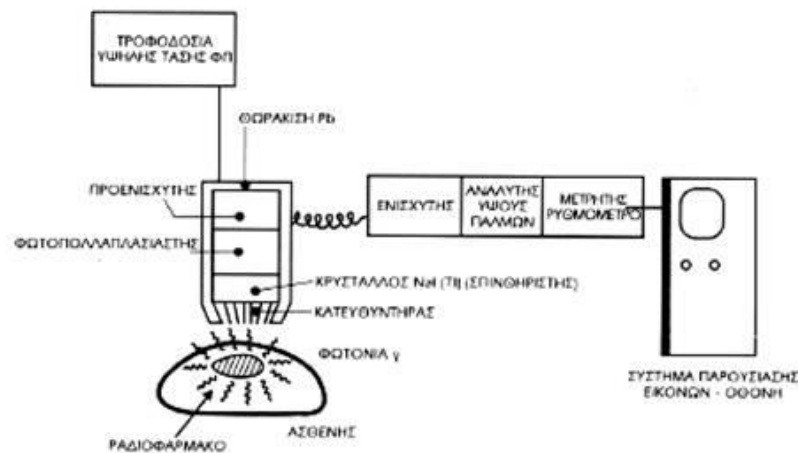
Η εφαρμογή στη διαγνωστική ογκολογία της PET μέσρι σήμερα έχει γίνει κυρίως με τη χρησιμοποίηση του $[^{18}\text{F}]$ FDG. Το μόριο αυτό έχει την τάση να συσσωρεύεται σε καρκινικά κύτταρα με αυξημένο μεταβολισμό γλυκόζης. Κατόπιν το μόριο φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση και κατακρατείται στον ενδοκυττάριο χώρο καθώς το φωσφορυλιωμένο FDG δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να μεταφερθεί στο εξωκυττάριο χώρο, λόγω φορτίου. Ωστόσο, το $[^{18}\text{F}]$ FDG είναι ένας μη ειδικός ραδιοϊχνηθέτης κακοηθειών καθώς συσσωρεύεται και σε άλλες εστίες έντονης μεταβολικής δραστηριότητας (π.χ. φλεγμονές, εγκέφαλος) περιορίζοντας έτσι την διαγνωστική αξία της μεθόδου [38]. Επίσης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση διαδικασιών που δεν βρίσκονται σε έξαρση (π.χ. νευροενδοκρινείς όγκοι που είναι σε κατάσταση λανθάνοντος μεταβολισμού).

Η πρόσληψη $[^{18}\text{F}]$ FDG ποικίλει σε διάφορες μορφές καρκίνου ωστόσο έχει αποδεδειγμένη διαγνωστική αξία για ορισμένους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του μαστού.

3.2. Τεχνική SPECT

Η τεχνική SPECT [32,33,39,40,41] (Single Photon Emission Tomography) ανιχνεύει τη φωτονιακή ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται από το ραδιενεργό άτομο. Μια διάταξη SPECT (Εικόνα 3.3) περιλαμβάνει μία ή περισσότερες κεφαλές (γ-κάμερες), οι οποίες περιστρέφονται γύρω από το σώμα του ασθενούς, παρέχοντας τρισδιάστατη τομογραφική απεικόνιση. Η γ-κάμερα αναπτύχθηκε από τον Hal Anger το 1957 στο Lawrence Berkeley National Laboratory. Αποτελείται από τον κατευθυντήρα, τον σπινθηριστικό κρύσταλλο, από ένα ή περισσότερους επίπεδους ανιχνευτές συνδεδεμένους με φωτοπολλαπλασιαστές και από ένα υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης ηλεκτρονικών δεδομένων. Η ακτινοβολία γ προσπίπτει στον

κατευθυντήρα από μόλυβδο ή βολφράμιο ο οποίος αποτελείται από πολλές παράλληλες οπές. Τα φωτόνια διαπερνούν τον κατευθυντήρα μόνο όταν εκπέμπονται παράλληλα ως προς τη διεύθυνση των οπών και έτσι επιλέγονται. Κατόπιν η ακτινοβολία γ οδηγείται στον σπινθηριστικό κρύσταλλο, διεγείροντας το υλικό του και προκαλώντας την εκπομπή σπινθηρισμών. Αυτοί κατευθύνονται στον φωτοπολλαπλασιαστή και μετατρέπονται σε ηλεκτρονικό σήμα. Αυτό μετά από κατάλληλη επεξεργασία και αφού ενισχυθεί, παρέχει την απεικόνιση της μελετώμενης περιοχής του σώματος με τη χρησιμοποίηση υπολογιστικού συστήματος (Σχήμα 3.1.).



Σχήμα 3.1.: Σχηματική αναπαράσταση της γ - κάμερα



Εικόνα 3.3.: Σύγχρονη διάταξη SPECT με δύο κεφαλές

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ραδιονουκλίδια στη SPECT τεχνική [42] παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.:

Πίνακας 3.2.: Κυριότερα ραδιονουκλίδια με εφαρμογή στην τεχνική SPECT

Ραδιονουκλίδιο	$t_{1/2}$ (min)	Διάσπαση (%)	Ενέργεια διάσπασης (MeV)	Τρόπος Παραγωγής
^{99m}Tc	6.02	γ , IT	0.14	Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$
^{111}In	67.2	Auger e^- , EC	0.17(90), 0.25(94)	Κυκλοτρόνιο, $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$
^{123}I	13.0	γ , EC	0.16	Κυκλοτρόνιο, $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$
^{131}I	192.5	γ , β^-	0.36(81.2), 0.61(89.4)	Αντιδραστήρας, $^{130}\text{Te}(n,\gamma)^{131}\text{I}$
^{201}Tl	73	γ , EC	0.13, 0.17	Κυκλοτρόνιο, $^{203}\text{Tl}(p,3n)^{201}\text{Tl}$
^{67}Ga	78.1	γ , EC	0.09(38), 0.18(21), 0.3(16)	Κυκλοτρόνιο, $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$
EC: σύλληψη ηλεκτρονίου (electron capture), β^- : σωματιδιακή ακτινοβολία, IT: εσωτερική μετατροπή (internal conversion)				

3.3. Διαφορές PET-SPECT

Οι δύο τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως στα εξής [43,44]:

α) Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η διαλογή των φωτονίων που συμβάλλουν στη δημιουργία της τελικής εικόνας. Στην PET γίνεται με ταυτόχρονη ανίχνευση (coincidence detection) δύο φωτονίων αντιδιαμετρικής κατεύθυνσης, ενώ στη SPECT γίνεται με τη βοήθεια του κατευθυντήρα (mechanical collimation). Η παρουσία του κατευθυντήρα μειώνει την ευαισθησία σε σχέση με την PET.

β) Οι ανιχνευτές της SPECT είναι διατεταγμένοι σε επίπεδα πλαίσια και όχι σε δακτυλίους όπως στην PET. Όταν χρησιμοποιηθούν μία ή περισσότερες κεφαλές που περιστρέφονται γύρω από το αντικείμενο μελέτης, παρέχεται τρισδιάστατη τομογραφική απεικόνιση.

γ) Επειδή το σύστημα ανίχνευσης της SPECT μπορεί να διαχωρίσει τις ενέργειες διαφορετικών ραδιονουκλιδίων, η SPECT μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες χορήγησης πολλαπλών ραδιοϊχνηθετών στον ίδιο ασθενή.

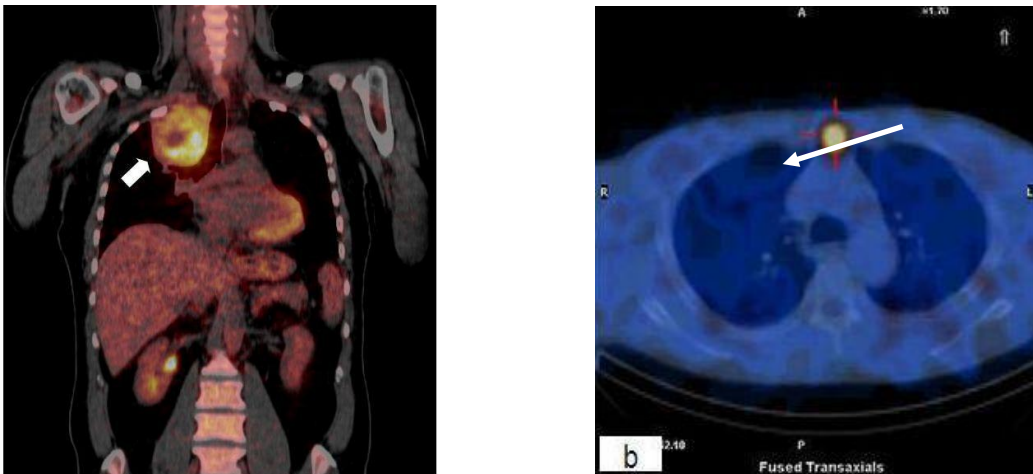
3.4. Υβριδικές απεικονιστικές διατάξεις

Η ακριβέστερη διάγνωση και ανατομική εντόπιση των παθολογικών εστιών γίνεται με τη χρήση υβριδικών απεικονιστικών διατάξεων. Αυτές συνδυάζουν τη παροχή λειτουργικών πληροφοριών (PET/SPECT) με μορφολογικά-ανατομικά δεδομένα (MRI, CT, US).

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες στη διαγνωστική ογκολογία υβριδικές απεικονιστικές διατάξεις είναι οι PET/CT και SPECT/CT [45-50].

Η PET/CT αρχικά χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη για την απεικόνιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [51], του καρκίνου του οισοφάγου [52], του παχέος εντέρου [53-55] των ωοθηκών, της κεφαλής-τραχήλου, του μαστού [56], του παγκρεατικού καρκίνου [57], του μελανώματος [58] και του λεμφώματος. Από το 2003 χρησιμοποιήθηκε για τον καρκίνο του θυρεοειδούς, ενώ σε περισσότερες νεοπλασίες αναμένεται να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον [59] (Εικόνα 3.4.).

Επιπλέον τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει η ανάπτυξη συστημάτων SPECT/MRI, PET/MRI, PET/SPECT/CT ώστε να χρησιμοποιηθούν σύντομα στη κλινική πράξη. Τα συστήματα αυτά πλεονεκτούν καθώς παρέχουν λειτουργικές και ανατομικές πληροφορίες αλλά καθιστούν δυνατή και τη χρονική συσχέτιση δύο διαφορετικών βιολογικών διεργασιών όπως και την ταυτόχρονη απεικόνιση περισσότερων μοριακών στόχων.



Εικόνα 3.4.: Απεικόνιση μετά από [^{18}F]FDG-PET/CT ασθενή με καρκίνο του άνω δεξιά πνεύμονα (αριστερά) και απεικόνιση με SPECT/CT καρκίνου με οστική μετάσταση στο θώρακα (δεξιά)

4. Τεχνήτιο και Ιατρική Διάγνωση

4.1. Τεχνήτιο

Το τεχνήτιο είναι το χημικό στοιχείο με το μικρότερο ατομικό αριθμό χωρίς σταθερό ισότοπο και αποτελεί «το ελαφρύτερο» ραδιενεργό στοιχείο. Συμβολίζεται ως Tc (technetium) και έχει ατομικό αριθμό 43. Ανήκει στη δεύτερη σειρά των στοιχείων μετάπτωσης, στην ομάδα VIIB του Περιοδικού Πίνακα (Εικόνα 4.1).

Group #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period																		
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	(117) (Uus)	118 Uuo
* Lanthanoids	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu			
** Actinoids	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr			

Εικόνα 4.1.: Η θέση του Tc στον Περιοδικό Πίνακα

Πριν την ανακάλυψη του τεχνητίου, πολλές από τις ιδιότητες του είχαν προβλεφθεί από τον ρώσο χημικό Dmitri Mendeleev [60], ο οποίος παρατήρησε ένα κενό στον περιοδικό πίνακα και έδωσε στο πιθανό στοιχείο της θέσης αυτής το όνομα εκαμαγγάνιο (Em). Το τεχνήτιο ανακαλύφθηκε τελικά το 1937, από τους ερευνητές Emilio Segrè και Carlo Perrier [61,62]. Η ονομασία του προέρχεται από την ελληνική λέξη “τεχνητός”, καθώς ήταν το πρώτο στοιχείο το οποίο παρασκευάστηκε εργαστηριακά χωρίς προηγουμένως να έχει ανακαλυφθεί στη φύση [63,64].

Πολλές προσπάθειες έγιναν από την εποχή της ανακάλυψης του να ανιχνευτεί φυσικό τεχνήτιο. Τελικά το 1962, απομονώθηκε σε πολύ μικρές ποσότητες (~0.2

ng/kg) [65] φυσικό ^{99}Tc στο ορυκτό pitchblende στη περιοχή του Βελγικού Κονγκό ως προϊόν σχάσης του ουρανίου-238.

4.2. Ιδιότητες τεχνητίου

Το τεχνητίο ανήκει στην έβδομη ομάδα του περιοδικού πίνακα και βρίσκεται μεταξύ των στοιχείων ρήνιο (Re) και μαγγάνιο (Mn). Αναμένεται οι χημικές ιδιότητες του, να είναι μεταξύ των χημικών ιδιοτήτων των στοιχείων αυτών. Ωστόσο η χημεία του Tc μοιάζει κυρίως με του Re, όσον αφορά τη δραστικότητα του. Οι συνηθισμένες οξειδωτικές του βαθμίδες είναι 0, +1, +3, +4, +5 και +7 [66]. Στον Πίνακα 4.1. παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κυριότερες ιδιότητες του τεχνητίου:

Πίνακας 4.1. : Γενικές, φυσικές και ατομικές ιδιότητες του Tc

Γενικές Ιδιότητες	
Όνομα, Σύμβολο, Ατομικός Αριθμός	Τεχνητίο, Tc, 43
Κατηγορία στοιχείου	Μέταλλο μεταπτώσεως
Ομάδα, Περίοδος	7, 5
Ατομικό Βάρος	98 (0) g mol ⁻¹
Ηλεκτρονιακή απεικόνιση	Kr 4d ⁵ 5s ²
Φυσικές Ιδιότητες	
Φάση (θερμοκρασία δωματίου)	Στερεά
Πυκνότητα (θερμοκρασία δωματίου)	11 g cm ⁻³
Σημείο τήξεως	2157 °C
Σημείο ζέσεως	4256 °C
Ατομικές Ιδιότητες	
Οξειδωτικές καταστάσεις	7,6,5,4,3,2,1,0,-1,
Ενέργεια Ιονισμού	1 st : 702 kJ mol ⁻¹ 2 nd : 1470 kJ mol ⁻¹
Άλλες Ιδιότητες	
Κρυσταλλική δομή	Εξαγωνική
Μαγνητική ροπή	Παραμαγνητικό

4.3. Ραδιονουκλίδια του τεχνητίου με ιατρική εφαρμογή

Είναι γνωστά πολλά ισότοπα του τεχνητίου με ατομικές μάζες που κυμαίνονται μεταξύ 90 και 111 (Πίνακας 4.2.). Το ^{99m}Tc είναι ένα μετασταθερό (m: metastable) νουκλίδιο και αποτελεί το σημαντικότερο ραδιονουκλίδιο στην απεικονιστική διάγνωση ασθενειών. Ιατρικά άρχισε να χρησιμοποιείται τη δεκαετία του 1960 για την απεικόνιση του θυρεοειδούς αδένα. Πλέον, ποσοστό άνω του 80% των

ραδιοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη διαγνωστική πυρηνική ιατρική είναι ραδιοφάρμακα του ^{99m}Tc [67].

Πίνακας 4.2.: Ραδιονουκλίδια του τεχνητίου

Νουκλίδιο	Μάζα	Τρόπος παραγωγής	Ενέργεια διάσπασης (keV)	$t_{1/2}$
^{90}Tc	89.923810	$^{92}\text{Mo}(p,3n)$	β^+ (7900, 6950), γ (948)	8.7 s
^{90m}Tc		$^{92}\text{Mo}(p,3n)$	β^+ , γ (1054, 948, 945)	49.2 s
^{91}Tc	90.918430	$^{92}\text{Mo}(p,2n)$	β^+ , γ (2451, 1639, 1605)	3.14 min
^{91m}Tc		$^{92}\text{Mo}(p,2n)$	β^+ , γ (653, 503, 928)	3.3. min
^{92}Tc	91.915257	$^{92}\text{Mo}(d,2n)$, $^{92}\text{Mo}(p,n)$	β^+ (4300, 4100), γ (1510, 773, 329)	4.23 min
^{93}Tc	92.910246	$^{92}\text{Mo}(d,n)$, $^{92}\text{Mo}(p,\gamma)$	β^+ (807), EC, γ (1363, 1522, 1478)	2.75 h
^{93m}Tc		$^{92}\text{Mo}(d,n)$, $^{92}\text{Mo}(p,\gamma)$, $^{93}\text{Nb}(\alpha,4n)$	IT (392), EC, γ (2645, 3129, 3221)	43.5 min
^{94}Tc	93.909654	$^{93}\text{Nb}(\alpha,3n)$, $^{94}\text{Mo}(d,2n)$, $^{94}\text{Mo}(p,n)$, $^{93}\text{Nb}(^3\text{He},2n)$	EC, β^+ (800), γ (871,850, 916)	4.883 h
^{94m}Tc		$^{93}\text{Nb}(\alpha,3n)$, $^{94}\text{Mo}(d,2n)$, $^{94}\text{Mo}(p,n)$	β^+ (2420), γ (871, 1869, 1522)	52.0 min
^{95}Tc	94.907657	$^{95}\text{Mo}(p,n)$, $^{94}\text{Mo}(d,n)$, $^{95}\text{Mo}(d,2n)$	EC, γ (766, 1074, 948)	20.0 h
^{95m}Tc		$^{95}\text{Mo}(p,2n)$, $^{94}\text{Mo}(d,n)$, $^{95}\text{Mo}(d,2n)$	EC, β^+ (700, 492), IT, γ (204, 582, 835)	61 d
^{96}Tc	95.907870	$^{93}\text{Nb}(\alpha,n)$, $^{96}\text{Mo}(p,n)$, $^{96}\text{Mo}(d,2n)$	EC, γ , (778, 850, 813)	4.28 d
^{96m}Tc		$^{93}\text{Nb}(\alpha,n)$, $^{96}\text{Mo}(p,n)$, $^{96}\text{Mo}(d,2n)$	IT, EC, γ (778, 1200,481)	51.5 min
^{97}Tc	96.906364	daughter ^{97}Ru , $^{97}\text{Mo}(d,2n)$	EC	2.6×10^6 y
^{97m}Tc		$^{96}\text{Mo}(d,n)$, $^{97}\text{Mo}(p,n)$, $^{97}\text{Mo}(d,2n)$	IT (965)	90.1 d
^{98}Tc	97.907215	$^{98}\text{Mo}(p,n)$	β^- (397), γ (745, 652)	4.2×10^6 y
^{99}Tc	98.906254	Fission,daughter ^{99}Mo	β^- (292, 203)	2.13×10^6 y
^{99m}Tc		daughter ^{99}Mo	IT (140), β^- , γ (322, 233)	6.006 h
^{100}Tc	99.907657	$^{99}\text{Tc}(n,\gamma)$, $^{100}\text{Mo}(p,n)$, $^{103}\text{Rh}(n,\alpha)$	β^- (3380, 2880), γ (540, 591, 1512)	15.8 s
^{101}Tc	100.907327	daughter ^{101}Mo	β^- (1320, 1070), γ (307, 545, 127)	14.22 min
^{102}Tc	101.909208	daughter ^{102}Mo	β^- (4150, 3400, 2200), γ (475, 105, 268)	5.28 s
^{102m}Tc		$^{102}\text{Ru}(n,p)$ fission	β^- (1600, 3200), γ (475, 628, 630), IT	4.35 min
^{103}Tc	102.909172	fission $^{104}\text{Ru}(n,np)$, $^{104}\text{Ru}(\gamma,p)$	β^- (2200, 2000), γ (136, 346, 210)	54.2 s
^{104}Tc	103.911460	fission $^{104}\text{Ru}(n,p)$	β^- (5100), γ (358, 531, 535)	18.3 min
^{105}Tc	104.911820	fission	β^+ (3400), γ (143, 108, 159)	7.7 min
^{106}Tc	105.914510	fission	β^- , γ (270, 2239, 1969)	36 s
^{107}Tc	106.915230	fission	β^+ , γ (103, 106, 177)	21.2 s
^{108}Tc	107.918420	fission	β^- , γ (242, 732, 708)	5.17 s

^{109}Tc	108.919580	fission	β^-	0.86 s
^{110}Tc		fission	β^+ , γ (241)	0.92 s
^{111}Tc			β^+	0.30 s
β^+ : ραδιενεργός διάσπαση εκπομπής ποζιτρονίου, β^- : ραδιενεργός διάσπαση εκπομπής ηλεκτρονίου, EC (electron capture): σύλληψη ηλεκτρονίου, IT (internal transmission): εσωτερική μετάδοση				

Η μεγάλη χρήση του ^{99m}Tc οφείλεται σε μια σειρά πλεονεκτημάτων, όπως:

α) Έχει ιδανικές πυρηνικές ιδιότητες. Κατά τη διάσπασή του εκπέμπει μονοφωτονιακή γ -ακτινοβολία ενέργειας 140 keV. Η ακτινοβολία αυτή, απορροφάται από τους κρυστάλλους ιωδιούχου νατρίου ενεργοποιημένους με θάλλιο NaI(Tl), που χρησιμοποιούνται στις σύγχρονες απεικονιστικές γ κάμερες και παρέχει πολύ καλής ποιότητας απεικονίσεις. Δεν εκπέμπει σωματιδιακή ακτινοβολία, με εξαίρεση την εκπομπή ηλεκτρονίων Auger τα οποία είναι χαμηλής ενέργειας. Επομένως η δόση ακτινοβολίας στο ιατρικό προσωπικό και τον ασθενή είναι ελάχιστη. Έχει χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$) 6.03 h, ο οποίος είναι αρκετός για την παραγωγή του ραδιοφαρμάκου, τη χορήγηση στον ασθενή, την εντόπιση στο όργανο-στόχο, την λήψη των κατάλληλων απεικονίσεων αλλά και για τη μη προβληματική διαχείριση των καταλοίπων. Επίσης είναι αρκετά μικρός, ώστε να επιτρέπεται η χορήγηση δόσεων της τάξης των mCi, χωρίς ο ασθενής να δέχεται υψηλή δόση ραδιενέργειας.

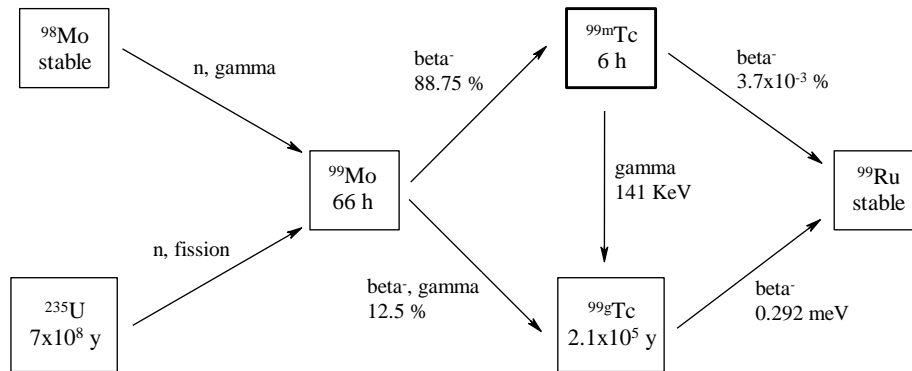
β) Παραλαμβάνεται εύκολα, με μικρό κόστος, από γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ [68], ως στείρο διάλυμα υπερτεχνητικών ιόντων σε υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα και υψηλή ειδική ραδιενέργεια.

γ) Το ραδιοφάρμακο μπορεί να παρασκευαστεί εύκολα στην κλινική, χωρίς την ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου προσωπικού, με την χρησιμοποίηση εμπορικά διαθέσιμης γεννήτριας $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ και τυποποιημένων προσκευασμάτων ραδιοφαρμάκων του ^{99m}Tc (kits) [69] (§ 4.6.3.).

4.4. Παραγωγή ^{99m}Tc

Το ^{99m}Tc προκύπτει από τη β^- διάσπαση του ^{99}Mo . Το ^{99}Mo παράγεται σε πυρηνικό αντιδραστήρα με βομβαρδισμό φυσικού μολυβδαινίου ή εμπλουτισμένου μολυβδαινίου (^{98}Mo), με θερμά νετρόνια ($^{98}\text{Mo}(n,\gamma)^{99}\text{Mo}$). Αν και παραλαμβάνεται σε υψηλή ραδιονουκλιδική καθαρότητα, η ειδική του ραδιενέργεια δεν είναι υψηλή. Παραλαβή ^{99}Mo σε υψηλή ραδιοχημική και ραδιονουκλιδική καθαρότητα, αλλά και υψηλή ειδική ραδιενέργεια (10^4 Ci per gram) γίνεται από σχάση φυσικού ουρανίου ή

εμπλουτισμένου ^{235}U . Το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ αποδιεγείρεται με ισομερή μετάπτωση σχεδόν ποσοτικά στη βασική κατάσταση $^{99\text{g}}\text{Tc}$ με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων ενέργειας 140 keV. Ένα πολύ μικρό ποσοστό ($4 \times 10^{-3} \%$) των διασπάσεων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ οδηγούν απευθείας στο σταθερό ισότοπο ^{99}Ru με ταυτόχρονη εκπομπή β^- ακτινοβολίας. Στο Σχήμα 4.1. παρατίθεται η πορεία σχηματισμού και διάσπασης του $^{99\text{m}}\text{Tc}$:



Σχήμα 4.1: Σχηματισμός και διάσπαση του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ και $^{99\text{g}}\text{Tc}$

4.5. Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$

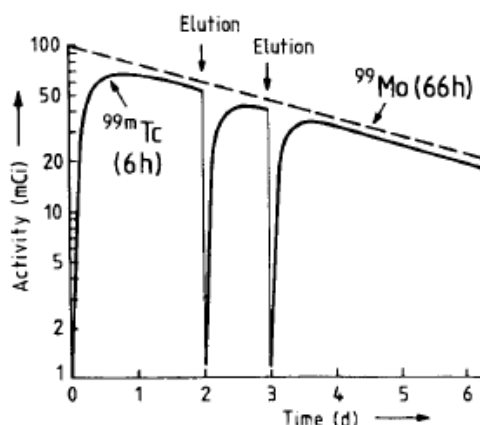
Η παραγωγή του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ γίνεται από γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Αυτή είναι μία διάταξη (Εικόνα 4.2) που επιτρέπει το γρήγορο διαχωρισμό του θυγατρικού ραδιονουκλιδίου $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ από το αντίστοιχο μητρικό $^{99}\text{MoO}_4^-$ με βάση τις διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες. Γενικά, σε μια τέτοια διάταξη το μητρικό ραδιονουκλίδιο έχει χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο από το θυγατρικό με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η παραλαβή του θυγατρικού ραδιονουκλιδίου σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα [70].



Εικόνα 4.2.: Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ που αποτελείται από χρωματογραφική στήλη ιονανταλλαγής με υλικό πλήρωσης αλουμίνα (Al_2O_3)

Η πρώτη γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ παρασκευάστηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1950 στο Brookhaven National Laboratory (BNL) στη Νέα Υόρκη, από τους Walter Tucker και Margaret Greene. Ο επικεφαλής του τομέα παραγωγής ραδιοϊσοτόπων του Brookhaven, Powell Richards ήταν ο πρώτος που πρότεινε στο 7^ο Διεθνές Πυρηνικό Συνέδριο στη Ρώμη το 1960 τη χρήση του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ για διαγνωστικούς σκοπούς στην Ιατρική [71,72]. Μεταξύ του 1963 και 1966 το ενδιαφέρον για τη χρήση του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ως διαγνωστικού μέσου αυξήθηκε κατακόρυφα. Από το 1966 και μετά, λόγω της συνεχούς αυξανόμενης ζήτησης των γεννητριών $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ξεκίνησε η βιομηχανική παραγωγή των γεννητριών. Η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ διατέθηκε από την Nuclear Consultants, Inc. και την Union Carbide Nuclear Corporation.

Η διάταξη μιας γεννήτριας $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ αποτελείται από μια χρωματογραφική στήλη ιονταλλαγής που περιέχει ως υλικό πλήρωσης αλουμίνα (Al_2O_3). Το ^{99}Mo κατακρατείται ως $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ιόν στη στήλη. Το μητρικό ^{99}Mo μεταπίπτει αυθόρμητα σε $^{99\text{m}}\text{Tc}$ και τα ιόντα $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ μετατρέπονται σε υπερτεχνητικό ανιόν $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Το $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ εκλούεται με διάλυμα φυσιολογικού ορού (NaCl 0.15 M). Το $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ επειδή είναι μονοανιοντικό, έχει μειωμένη ικανότητα συγκράτησης στη στήλη σε σχέση με το $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ και απομονώνεται από τη στήλη. Μετά το τέλος κάθε έκλουσης, το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ αρχίζει και πάλι να αναγεννάται από το μητρικό ^{99}Mo μέσα στη στήλη, ενώ διασπάται ταυτόχρονα προς $^{99\text{g}}\text{Tc}$ εκπέμποντας γ-ακτινοβολία. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως μεταβατική ισορροπία (Σχήμα 4.2.).



Σχήμα 4.2: Παραγωγή του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ από την γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ μετά την έκλουση του συστήματος

Η ραδιενέργεια A_T του ^{99m}Tc που εκπέμπεται σε χρόνο t ως ποσοστό της ραδιενέργειας A_M του μητρικού νουκλιδίου ^{99}Mo , υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$A_T/A_M = \delta \lambda_T / \lambda_T - \lambda_M \times [1 - e^{-(\lambda_T - \lambda_M)t}]$$

όπου:

$\delta = 87.2\%$, η πιθανότητα διάσπασης του ^{99}Mo σε ^{99m}Tc

$\lambda_T = 0.1155 \text{ h}^{-1}$, η σταθερά διάσπασης του ^{99m}Tc

$\lambda_M = 0.0105 \text{ h}^{-1}$, η σταθερά διάσπασης του ^{99}Mo

Το διάλυμα $^{99m}\text{TcO}_4^-$ που εκλύεται από μια σύγχρονη γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, είναι στείρο και ελεύθερο πυρετογόνων και η ραδιονουκλιδική και ραδιοχημική του καθαρότητα είναι σύμφωνη με τους κανονισμούς και τις διατάξεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας [73].

Οι σύγχρονες γεννήτριες περιβάλλονται από ένα παχύ στρώμα μολύβδου με σκοπό να προστατεύεται ο ασθενής και το ιατρικό προσωπικό από την έκθεση στην ακτινοβολία.

4.6. Σύνθεση ραδιοφαρμάκων με ^{99m}Tc

4.6.1. Ταυτοποίηση δομής του ραδιοφαρμάκου

Κατά τον σχεδιασμό και ανάπτυξη ενός νέου ραδιοφαρμακευτικού σκευάσματος είναι απαραίτητο να είναι αποσαφηνισμένη η σύσταση και η δομή του. Οι κλασικές μέθοδοι ανάλυσης δομής (IR, NMR, UV/Vis, κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, MS) δεν μπορούν να εφαρμοσθούν για λόγους ακτινοπροστασίας δεδομένου ότι απαιτούν ποσότητες mg. Λόγω της υψηλής ειδικής ραδιενέργειας του ^{99m}Tc (520 Ci/μmol), οι ποσότητες αυτές θα οδηγούσαν σε ισχυρή δόση ακτινοβολίας.

Η ταυτοποίηση της δομής του ραδιοφαρμάκου πραγματοποιείται με τους εξής τρόπους:

α) Συντίθενται και χαρακτηρίζονται οι αντίστοιχες ενώσεις με το ραδιονουκλίδιο του τεχνητίου ^{99g}Tc . Αυτό εκπέμπει ασθενή β^- - ακτινοβολία ($E_{\max} = 292 \text{ keV}$) με ημιπερίοδο ζωής $t_{1/2} = 2.13 \times 10^5 \text{ y}$ και είναι διαθέσιμο σε ποσότητες της τάξης των mg. Για το χειρισμό του αρκεί η εφαρμογή των γενικά αποδεκτών κανόνων ακτινοπροστασίας. Η δομή της αντίστοιχης ένωσης με ^{99g}Tc μελετάται με τις κλασικές μεθόδους ανάλυσης και κατόπιν πραγματοποιείται χρωματογραφική σύγκριση, με

συγχορήγηση της ένωσης με ^{99g}Tc με την αντίστοιχη του ^{99m}Tc , με HPLC με ραδιομετρική (για το ^{99m}Tc) και φωτομετρική (για το ^{99g}Tc) ανίχνευση. Αν οι χρόνοι έκλουσης είναι ίδιοι θεωρείται ότι οι ενώσεις του ^{99m}Tc και ^{99g}Tc έχουν την ίδια δομή [74,75]. Η μέθοδος υστερεί λόγω δυσκολίας διαχείρισης των μακρόβιων ραδιενεργών καταλοίπων αλλά και επειδή ο μεγάλος χρόνος ημιζωής του ^{99g}Tc μπορεί να προκαλέσει μόλυνση των αναλυτικών οργάνων.

β) Χρησιμοποιείται ρήνιο (Re) που έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με το Tc. Η ανακάλυψη του ρηνίου πραγματοποιήθηκε το 1925 [76,77]. Το Re με ατομικό αριθμό 75, ανήκει στη 3^η σειρά των στοιχείων μετάπτωσης της 7ης ομάδας. Στη φύση το Re απαντάται σε μίγμα δύο ισότοπων, ως ^{185}Re σε ποσοστό 37.4 % που είναι σταθερό και ως ^{187}Re σε ποσοστό 62.6 % που είναι μη σταθερό αλλά έχει πολύ μεγάλο χρόνο ημιζωής ($\sim 10^{10}$ y).

Στο Πίνακα 4.3. παρουσιάζονται τα κυριότερα ισότοπα του Re:

Πίνακας 4.3.: Σημαντικότερα ισότοπα του Re

Ισότοπο	Χρόνος ημιζωής	Τρόπος διάσπασης
^{185}Re	σταθερό	
^{186}Re	3.72 d	% EC = 7.4%, β^- = 92.5%
^{187}Re	4.35×10^{10} y	% β^- = 100%
^{188}Re	17.02 h	% β^- = 100%
^{192}Re	16 s	% β^- = 100%

EC: σύλληψη ηλεκτρονίου (electron capture), β^- : σωματιδιακή ακτινοβολία

Τα ισότοπα ^{186}Re και ^{188}Re εκπέμπουν ισχυρή β^- ακτινοβολία που είναι κυτταροτοξική, οπότε κατάλληλα σχεδιασμένα ραδιοφαρμάκα των δύο αυτών ραδιονουκλιδίων χρησιμοποιούνται στη θεραπεία ασθενών με κακοήθεις όγκους [78]. Το ^{186}Re έχει εμβέλεια 5 mm στα μαλακά μόρια των ιστών και χρησιμοποιείται για την θεραπεία μικρών όγκων ενώ το ^{188}Re με αντίστοιχη εμβέλεια 11 mm [79] χρησιμοποιείται για την θεραπεία μεγαλύτερων σε μέγεθος όγκων.

Οι ομοιότητες στη χημεία του τεχνητίου και του ρηνίου οφείλονται στην αντίστοιχη ατομική ακτίνα που είναι αποτέλεσμα της λανθανιδικής συστολής του ρηνίου. Η λανθανιδική συστολή περιγράφει την ελάττωση του μεγέθους του ατόμου αυξανόμενου του ατομικού αριθμού, ανά μήκος της περιόδου των λανθανιδών. Αυτή η ελάττωση οφείλεται στην αντίστοιχη αύξηση του φορτίου του πυρήνα. Η αύξηση του μεγέθους - λόγω προσθήκης νέου φλοιού - κατά την μετάβαση από τη 2^η στη 3^η σειρά στοιχείων μετάπτωσης, αντισταθμίζεται από την ελάττωση του μεγέθους λόγω

της λανθανιδικής συστολής με αποτέλεσμα το μέγεθος των ατόμων και ιόντων 3^{ης} σειράς να είναι σχεδόν το ίδιο με το αντίστοιχο των ατόμων της 2^{ης} σειράς [80-82].

Λόγω της λανθανιδικής συστολής η ατομική ακτίνα του Re είναι μικρότερη συγκριτικά σε σχέση με την αναμενόμενη από τον Περιοδικό Πίνακα, οπότε οι ατομικές ακτίνες των στοιχείων Tc και Re είναι παρόμοιες. Έτσι αναμένεται ανάλογα σύμπλοκα Tc και Re να έχουν παρόμοια δομή αλλά και παρόμοιες φυσικές ιδιότητες (π.χ. μέγεθος, λιποφιλικότητα κ.α.). Ωστόσο οι ενώσεις του Re είναι πιο δύσκολο να αναχθούν, οξειδώνονται ευκολότερα και είναι κινητικά πιο αδρανείς σε σχέση με του Tc (83). Αν σε HPLC ανάλυση, μία ένωση του Tc εμφανίσει ίδιο χρόνο έκλουσης με μία αντίστοιχη του Re, τότε θεωρείται ότι έχουν παρόμοια δομή (84). Τα παραπάνω συμπεράσματα έχουν επιβεβαιωθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και φασματοσκοπία NMR για σύμπλοκα Tc και Re με χημικούς υποκαταστάτες άκυκλης τετρααμίνης, όπου παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα αυτά έχουν οκταεδρική δομή τύπου $trans-[M^V(O_2)(N_4)]^+$, με τα τέσσερα άτομα τετρααμίνης να βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και τα δύο άτομα O κάθετα σε αυτό, σε θέση *trans* μεταξύ τους και ενωμένα με διπλό δεσμό με το μέταλλο (85).

4.6.2. Επισήμανση πρόδρομης³ ένωσης με ^{99m}Tc

Γίνεται έκλυση της στήλης της γεννήτριας ⁹⁹Mo/^{99m}Tc με υδατικό διάλυμα 0.15 M NaCl (φυσιολογικός ορός) και λαμβάνεται το Na^{99m}Tc^{VII}O₄. Για να γίνει η συναρμογή του ραδιομετάλλου στο πεπτίδιο πρέπει αυτό να αναχθεί από την οξειδωτική κατάσταση VII συνήθως στην οξειδωτική κατάσταση V. Η αναγωγή πραγματοποιείται με κατάλληλο αναγωγικό μέσο παρουσία συστήματος υποκαταστατών. Η αναγωγή του ^{99m}TcO₄⁻ μπορεί να οδηγήσει σε ^{99m}Tc^{IV}, το οποίο σε υδατικό διάλυμα υδρολύεται στο μη επιθυμητό κolloειδές τεχνήτιο ^{99m}Tc^{IV}O₂·xH₂O που επηρεάζει την απόδοση του ραδιοεπισημασμένου προϊόντος. Η παρουσία του οδηγεί σε μείωση της ποιότητας απεικόνισης καθώς καθιστά δύσκολη την καλή απεικόνιση όγκων στη κοιλιακή χώρα γιατί συσσωρεύεται στο ήπαρ και στη σπλήνα. Προς αποφυγή σχηματισμού του κolloειδούς τεχνητίου προστίθεται, βοηθητικός υποκαταστατής ο οποίος σχηματίζει με το ραδιομέταλλο ένα ενδιάμεσο “χαλαρό” σύμπλοκο σταθεροποιώντας το στην οξειδωτική βαθμίδα V. Κατόπιν γίνεται

³ Πρόδρομη ένωση χαρακτηρίζεται το ραδιοφάρμακο πριν την ενσωμάτωση του ραδιονουκλιδίου στο μόριο του

αντικατάσταση του βοηθητικού υποκαταστάτη από το σύστημα υποκαταστατών του πρόδρομου φαρμάκου ώστε να προκύψει το επιθυμητό ραδιοφάρμακο. Σαν βοηθητικοί υποκαταστάτες χρησιμοποιούνται οργανικά οξέα (π.χ. κιτρικό) και πολυαλκοόλες (π.χ. αιθυλενογλυκόλη).

Η αναγωγή του $^{99m}\text{TcO}_4^-$ μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορα αναγωγικά αντιδραστήρια όπως Cu(I), Fe(II), Cr(II). Συνήθως όμως χρησιμοποιείται ο Sn(II) (ως $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητάς του, της αναγωγικής αποτελεσματικότητας του σε ποικίλες συνθήκες καθώς και της χαμηλής του τοξικότητας.

Κατά την παρασκευή ραδιοφαρμάκου για κλινική χρήση σε ασθενείς πρέπει να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις [86]:

α) η σύνθεση του ραδιοφαρμάκου πρέπει να ολοκληρώνεται γρήγορα και να πραγματοποιείται με υψηλή ραδιοχημική απόδοση ώστε να αποφεύγεται η συγχορήγηση ραδιενεργών παραπροϊόντων στον ασθενή.

β) η σύνθεση του ραδιοφαρμάκου θα πρέπει να πραγματοποιείται σε κατάλληλο μέσο για ενδοφλέβια χρήση (π.χ. φυσιολογικός ορός)

γ) τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να μην είναι τοξικά και η επισήμανση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε στείρες και ελεύθερες πυρετογόνων συνθήκες.

4.6.3. Τυποποιημένα προσκευάσματα ραδιοφαρμάκων του ^{99m}Tc (“kits”) [67,87]

Οι παραπάνω προϋποθέσεις (§ 4.6.2.) ικανοποιούνται όταν χρησιμοποιηθούν τυποποιημένα προσκευάσματα ραδιοφαρμάκων του ^{99m}Tc ή όπως είναι γνωστά “kits”. Αυτά είναι μίγματα στείρα και ελεύθερα πυρετογόνων μη ραδιενεργών συστατικών, τα οποία λυοφιλοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε γυάλινα σφραγισμένα φιαλίδια και διατίθενται στο εμπόριο.

Ένα τυποποιημένο προσκεύασμα ραδιοφαρμάκων περιέχει συνήθως, εκτός από τη χημική ένωση που πρόκειται να επισημανθεί με το ραδιομέταλλο, και τα εξής:

- Αναγωγικό μέσο (συνήθως SnCl_2)
- Βοηθητικό υποκαταστάτη για την αποφυγή σχηματισμού του μη επιθυμητού $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

- Αντιοξειδωτικό προς αποφυγή οξειδωσης του SnCl₂ από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο
- Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα γιατί το pH επηρεάζει την επισήμανση και την υδρόλυση του Sn⁺² και πρέπει να είναι το κατάλληλο για χορήγηση στον ασθενή
- Αντιμικροβιακές ουσίες ώστε να είναι στείρο και κατάλληλο για χορήγηση στον ασθενή
- Διαλυτοποιητές για την εύκολη διαλυτοποίηση των συστατικών του

Μετά την παρασκευή τους, τα kits μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η «ανασύσταση» του kit πραγματοποιείται λίγο πριν την χρήση του ραδιοφαρμάκου κατά την επισήμανση με ^{99m}Tc, δηλαδή με απλή προσθήκη διαλύματος έκλυσης της γεννήτριας ^{99m}TcO₄⁻ και σύντομη επώαση του μίγματος με ή χωρίς θέρμανση.

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα kits παρασκευάζονται σύμφωνα με τους κανονισμούς Good Manufacturing Practice - GMP (Καλής Πρακτικής Παρασκευής Φαρμάκων) και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής και Αμερικανικής Φαρμακοποιίας [88].

4.7. Χημεία του τεχνητίου στα χρησιμοποιούμενα ραδιοφάρμακα

Η πλούσια οξειδοαναγωγική χημεία του τεχνητίου έχει μελετηθεί διεξοδικά [89-96]. Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του είναι [Kr]4d⁵5s² με 7 ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα. Οι οξειδωτικές του βαθμίδες κυμαίνονται από +7 έως -1. Η πιο σταθερή οξειδωτική βαθμίδα είναι η +7 όπου το Tc βρίσκεται στην μορφή [^{99m}TcO₄]⁻. Για να γίνει η συναρμογή του σε οργανικά μόρια πρέπει να αναχθεί σε χαμηλότερη οξειδωτική βαθμίδα. Η οξειδωτική βαθμίδα του Tc εξαρτάται από το αναγωγικό μέσο, τις συνθήκες επισήμανσης και το σύστημα υποκαταστατών.

Στον Πίνακα 4.4. συνοψίζονται οι οξειδωτικές βαθμίδες και οι στερεοχημικές διαμορφώσεις του τεχνητίου:

Πίνακας 4.4.: Οξειδωτικές βαθμίδες του Tc και σχέση ηλεκτρονιακής και στερεοχημικής διαμόρφωσης

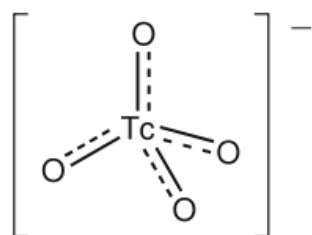
Οξειδωτική κατάσταση	Γεωμετρία συναρμογής	Αριθμός συναρμογής	Παράδειγμα
+7 (d^0)	τριγωνικό πρίσμα	9	$[\text{TcH}_9]^{2-}$
	τετράεδρο	4	TcO_4^-
+6 (d^1)	τετράεδρο	4	TcO_4^{2-}
	τετραγωνική πυραμίδα	5	$[\text{TcNCl}_4]^-$
+5 (d^2)	οκτάεδρο	6	$[\text{Tc}(\text{O}_2)(\text{N}_4)]^+$ $[\text{Tc}(\text{NCS})_6]^-$ $[\text{TcO}_2(\text{tetrafosmin})]^+$
	δωδεκάεδρο	8	$[\text{Tc}(\text{Diars})_2\text{Cl}_4]^+$
	τετραγωνική πυραμίδα	5	$[\text{TcOCl}_4]^-$ $[\text{TcO}(\text{glyc})_2]^-$ $[\text{TcO}(\text{L,L-ECD})]$
+4 (d^3)	οκτάεδρο	6	$[\text{TcCl}_6]^{2-}$
+3 (d^4)	οκτάεδρο	6	$[\text{Tc}(\text{diars})_2\text{Cl}_2]^+$
	πενταγωνική πυραμίδα	7	$[\text{Tc}(\text{CN})_7]^{4+}$
+2 (d^5)	οκτάεδρο	6	$\text{Tc}(\text{Diars})_2\text{Cl}_2$ $[\text{TcCl}_2(\text{PhP}(\text{OEt})_2)_4]$
+1 (d^6)	οκτάεδρο	6	$[\text{Tc}(\text{CNC}(\text{CH}_3)_3)_6]^+$
0 (d^7)	οκτάεδρο	6	$\text{Tc}_2(\text{CO})_{10}$
- 1 (d^8)	τριγωνική διπυραμίδα	5	$[\text{Tc}_2(\text{CO})_5]^-$

Έχουν συντεθεί σταθερά σύμπλοκα του Tc με βαθμό συναρμογής από 4 έως 9 και με το μέταλλο να βρίσκεται σε οξειδωτική βαθμίδα από -1 έως +7. Στα υποκεφάλαια 4.7.1 έως 4.7.4. παρουσιάζονται αναλυτικά οι πιο σταθερές και μελετημένες οξειδωτικές βαθμίδες του Tc.

4.7.1 Οξειδωτική βαθμίδα Tc(VII)

Το $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ήταν το πρώτο ραδιοφάρμακο με ^{99m}Tc που χρησιμοποιήθηκε στον άνθρωπο για διαγνωστική απεικόνιση του θυρεοειδή. Η δράση του πραγματοποιείται μιμούμενο τη συμπεριφορά του I^- οπότε δεσμεύεται επιλεκτικά στον μεταφορέα του ιωδίου με αποτέλεσμα να εντοπίζεται επιλεκτικά στον θυρεοειδή αδένα [97].

Η ηλεκτρονιακή του διαμόρφωση είναι d^0 , έχει δομή τετραέδρου με το μεταλλικό ιόν να βρίσκεται στο κέντρο και τα τέσσερα άτομα O στις κορυφές του. Το μήκος του δεσμού Tc-O είναι 1.711 Å (Σχήμα 4.3.):

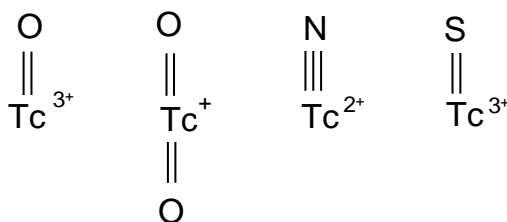


Σχήμα 4.3.: Τετραεδρική διαμόρφωση του TcO_4^-

4.7.2. Οξειδωτική βαθμίδα Tc(V)

Το Tc^V παραλαμβάνεται με αναγωγή του υπερτεχνητικού ιόντος $^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4^-$. Έχει ηλεκτρονιακή διαμόρφωση d^2 οπότε έχει μεγάλο έλλειμμα ηλεκτρονίων και συνδέεται με άτομα που είναι ισχυροί δότες ηλεκτρονίων όπως O, N, S σχηματίζοντας τους παρακάτω πυρήνες (Σχήμα 4.4.):

- μονοοξο-πυρήνας, TcO^{3+}
- *trans*-διοξο-πυρήνας, *trans*- $[\text{TcO}_2]^+$
- νιτριδο-πυρήνας, TcN^{2+}
- θειο-πυρήνας, TcS^{3+}



Σχήμα 4.4.: Πυρήνες του Tc^V

Οι πυρήνες του Tc(V) σταθεροποιούνται με τη δέσμευση ποικιλίας υποκαταστατών που έχουν ως άτομα-δότες (O, N, P, S, As).

Τα σύμπλοκα που προκύπτουν είναι διαμαγνητικά ή ελαφρώς παραμαγνητικά και οι μαγνητικές ιδιότητες οφείλονται στην παραμόρφωση των τροχιακών η οποία επάγεται από τις πολικές ομάδες Tc-X (X: O, N, S). Η γεωμετρία και η σταθερότητα του συμπλόκου καθορίζονται από τους υποκαταστάτες που συνδέονται στον μεταλλικό πυρήνα.

1) Μονοοξο-πυρήνας [Tc=O]³⁺

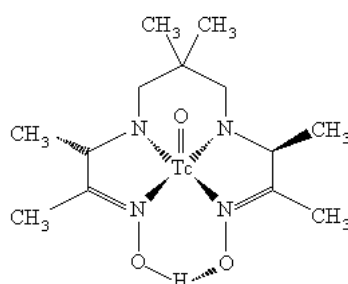
Είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος πυρήνας των Tc^V-συμπλόκων σε ραδιοφάρμακα του ^{99m}Tc. Μία οξο-ομάδα από το [^{99m}Tc^{VII}O₄]⁻ παραμένει συνδεδεμένη με το Tc οπότε σχηματίζεται ο μονοοξο-πυρήνας [Tc=O]³⁺, ενώ οι υπόλοιπες πρωτονιώνονται και απομακρύνονται με τη μορφή νερού.

Η σταθεροποίηση του πυρήνα [Tc=O]³⁺ πραγματοποιείται με τη σύμπλεξη υποκαταστατών που περιέχουν άτομα που είναι ισχυροί δότες ηλεκτρονίων (O, N, S, P). Τα σύμπλοκα με πυρήνα [Tc=O]³⁺ είναι κυρίως πενταϋποκαταστημένα λόγω του “*trans effect*” με συνηθέστερη δομή αυτή της τετραγωνικής πυραμίδας με τα τέσσερα άτομα – δότες να σχηματίζουν την βάση της πυραμίδας και το οξυγόνο του πυρήνα να βρίσκεται στην κορυφή. Το “*trans effect*” εμφανίζεται σε τετραγωνικά επίπεδα και οκταεδρικά σύμπλοκα, όπου ορισμένοι υποκαταστάτες εμφανίζουν αστάθεια όταν βρίσκονται σε θέση *trans* ως προς κάποιους άλλους λόγω ηλεκτρονιακών επιδράσεων [98,99]. Η θέση *trans* ως προς το οξυγόνο είναι ευκίνητη γιατί ουσιαστικά αυξάνεται το μήκος δεσμού μεταξύ μετάλλου και *trans* υποκαταστάτη, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται τελικά πενταϋποκαταστημένα σύμπλοκα. Ωστόσο κάποιες σπανιότερες φορές ένας κατάλληλος υποκαταστάτης μπορεί να καλύψει την θέση αυτή και να σχηματιστούν εξαϋποκαταστημένα σύμπλοκα. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία εξαϋποκαταστημένων συμπλοκών είναι οι περιφερειακοί υποκαταστάτες που καταλαμβάνουν τις ισημερινές θέσεις να μην καλύπτουν επαρκώς το ηλεκτρονιακό έλλειμμα του μετάλλου. Ο έκτος υποκαταστάτης μπορεί να είναι κυανομάδα, αλογόνο, RO⁻ (όπου R: αλκυλομάδα, φαινυλομάδα, H) ή μία όξο ομάδα γέφυρα μεταξύ δύο μεταλλικών κέντρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εξαϋποκαταστημένου συμπλόκου είναι το [TcO(CN)₅]⁻.

Τα μονοοξο-σύμπλοκα εμφανίζουν σε φάσμα IR μια ισχυρή απορρόφηση στη περιοχή συχνοτήτων 890-1020 cm⁻¹ η οποία αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του

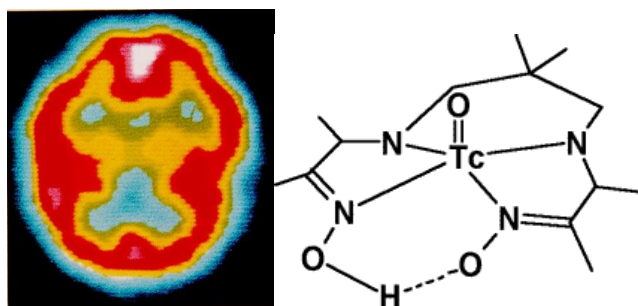
δεσμού Tc=O και η τιμή της εξαρτάται από το είδος των υποκαταστατών. Το μήκος δεσμού του Tc=O είναι 1.61 – 1.68 Å.

Ο πυρήνας $[Tc=O]^{3+}$ είναι πολύ συχνά εμφανιζόμενος στην ανάπτυξη Tc^V-συμπλόκων γιατί σταθεροποιεί το Tc^V με ποικιλία υποκαταστατών και μικτών συστημάτων αυτών (π.χ. 3+1, 2+2). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τετρασχιδής υποκαταστάτης PnAO (3,3,9,9 τετραμέθυλο-4,8, διαζαενδεκάνιο-2,10 διοξίμη) [100] με τον οποίο ο πυρήνας $[Tc=O]^{3+}$ σχηματίζει το σταθερό σύμπλοκο $[TcO(PnAO)]$. Ο σχηματισμός του συμπλόκου επιτυγχάνεται με αποπρωτονίωση δύο ατόμων N των αμινομάδων και ενός της οξίμης και σταθεροποίηση μέσω κυκλοποίησης με σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου. (Σχήμα 4.5.)[101].



Σχήμα 4.5. : Το σύμπλοκο του TcO³⁺ με τον τετρασχιδή υποκαταστάτη PnAO

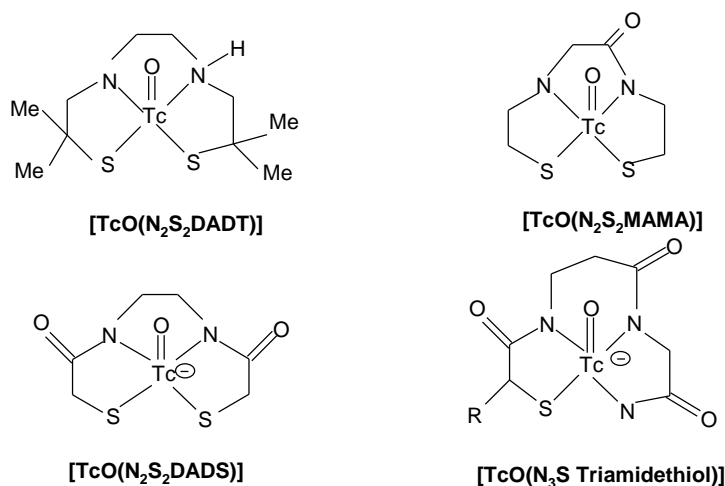
Η μελέτη αυτών των συμπλόκων οδήγησε στο γνωστό εμπορικό σκεύασμα με πυρήνα $[Tc=O]^{3+}$, το Ceretec[®][102]. Το Ceretec[®] ($[^{99m}Tc]HM-PAO$) όπου HM-PAO είναι ο υποκαταστάτης εξαμεθυλοπροπυλενοαμινο-οξίμη, χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της αιματικής ροής του εγκεφάλου (Σχήμα 4.6.)[103]. Το σύμπλοκο αυτό είναι ουδέτερο και λιπόφιλο οπότε διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η κατακράτηση του στον εγκέφαλο οφείλεται στη διάσπαση και παγίδευση του, πιθανώς λόγω δράσης της γλουταθειόνης. Επειδή έχει δύο ασύμμετρα κέντρα απαντάται σε D-L και σε meso μορφή. Από τα δύο αυτά ισομερή το πιο ασταθές στο εσωτερικό του εγκεφάλου είναι η D-L μορφή η οποία παραμένει καθηλωμένη στον εγκέφαλο καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ότι η D,L μορφή του συμπλόκου να είναι πιο αποτελεσματική σαν ραδιοφάρμακο από την meso μορφή.



Σχήμα 4.6.: Απεικόνιση εγκεφάλου (αριστερά) στο οποίο στα κόκκινα και κίτρινα μέρη απεικονίζεται υψηλή αιματική ροή ενώ στα μπλε χαμηλή με τη χρησιμοποίηση του ραδιοφαρμάκου Ceretec® (δεξιά)

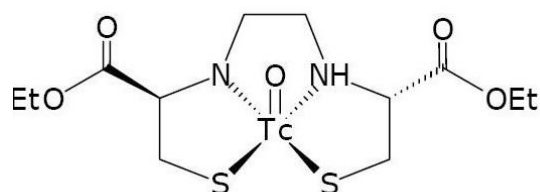
Επίσης ο πυρήνας $[Tc=O]^{3+}$, μπορεί να σχηματίσει σταθερά σύμπλοκα με υποκαταστάτες διθειόλες ή αμινοθειόλες:

- N_2S_2 DADS – όπου DADS: διαμιδοδιθειόλες [104]
- N_2S_2 MAMA – όπου MAMA: μονοαμιδομονοαμινοδιθειόλες [105]
- N_2S_2 DADT – όπου DADT: διαμινοδιθειόλες [106]
- N_3S τριαμιδοθειόλες [107,108] (Σχήμα 4.7.)



Σχήμα 4.7.: Παραδείγματα συμπλόκων Tc με υποκαταστάτες N_2S_2 , N_3S

Το Neurolite ($[^{99m}Tc]ECD$ (Σχήμα 4.8.))[109,110] (όπου ECD είναι ο εστέρας της αιθυλενοκυστεΐνης) αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω κατηγορίας συμπλόκων και χρησιμοποιείται επίσης για την απεικόνιση της αιματικής ροής του εγκεφάλου. Λόγω του ότι είναι ουδέτερο σύμπλοκο και εμφανίζει λιποφιλικότητα διαπερνάει επίσης τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Κατόπιν πραγματοποιείται ενζυματική υδρόλυση μιας εστερομάδας από μία εστεράση των εγκεφαλικών κυττάρων, οπότε το πιο υδρόφιλο προϊόν που προκύπτει παγιδεύεται εντός του εγκεφάλου. Χαρακτηριστικό είναι ότι η L-L μορφή είναι εκείνη που υδρολύεται προς τον αντίστοιχο μονοεστέρα.



Σχήμα 4.8.: Απεικόνιση της δομής του εμπορικού σκευάσματος Neurolite®

2) *trans*-διοξο-πυρήνας, *trans*-[TcO₂]⁺

Περιέχει δύο άτομα οξυγόνου τα οποία συνδέονται με το μέταλλο και βρίσκονται σε θέση *trans* μεταξύ τους. Όταν το κεντρικό άτομο του Tc^V έχει ένα μονοοξο-πυρήνα και το ηλεκτρονιακό του έλλειμμα δεν καλύπτεται από υποκαταστάτες, τότε ένα μόριο H₂O από τον διαλύτη συνδέεται σε θέση *trans* ως προς την υπάρχουσα οξο-ομάδα και κατόπιν αποπρωτονιώνεται, οπότε δημιουργείται ο *trans*-διοξο-πυρήνας, *trans*-[TcO₂]⁺.

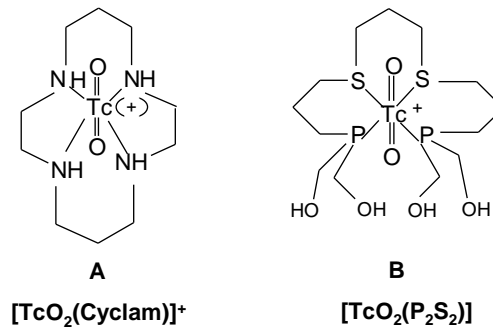
Τα σύμπλοκα με *trans*-διοξο-πυρήνα είναι εξαϋποκαταστημένα και σχηματίζουν οκταεδρικά σύμπλοκα. Η συχνότητα δόνησης του δεσμού O=Tc=O κυμαίνεται στη περιοχή 790-860 cm⁻¹ και εξαρτάται από το είδος των υποκαταστατών. Το μήκος του δεσμού Tc=O είναι 1.75 Å [111].

Τα σύμπλοκα με *trans*-διοξο-πυρήνα σταθεροποιούνται με ουδέτερους υποκαταστάτες που περιέχουν άτομα αζώτου ως δότες και που έχουν την δυνατότητα δημιουργίας π – δεσμών (εκχώρηση ηλεκτρονίων από τα *p* τροχιακά του υποκαταστάτη στα κενά π συμμετρίας *d_{xz}* και *d_{yz}* τροχιακά του μετάλλου) όπως:

- μονοσχιδείς (π.χ. πυριδίνη, ιμιδαζόλιο)
- δισχιδείς (π.χ. αιθυλενοδιαμίνη, 1,2-διαμινο-προπάνιο)
- τετρασχιδείς (π.χ. cyclam ή 1,4,8,11-κυανομάδες) (Σχήμα 4.9. Α)

Επίσης χρησιμοποιούνται και:

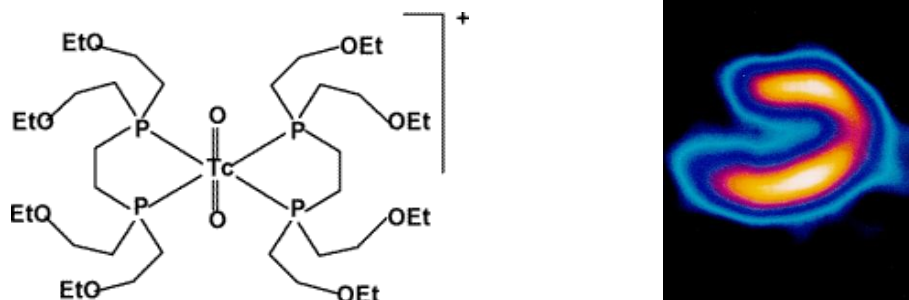
- διφωσφίνες (π.χ. διθειο-διφωσφίνη) [112,113] (Σχήμα 4.9. Β)
- διαρσίνες



Σχήμα 4.9.: A) σύμπλοκο με κυκλική τετραμίνη B) σύμπλοκο με υποκαταστάτη S₂P₂

Οι υποκαταστάτες τύπου S₂P₂ λόγω του συνδυασμού θειοαιθερικών ομάδων και διφωσφινών, σχηματίζουν *in vitro* και *in vivo* σταθερά σύμπλοκα *trans*-[TcO₂]⁺. Η υδατοδιαλυτότητα τους οφείλεται στο θετικό φορτίο του τελικού συμπλόκου αλλά και στη παρουσία των υδροξυαιθυλομαδων στους υποκαταστάτες της φωσφίνης [114-116] (Σχήμα 4.9.).

Το μοναδικό εμπορικά διαθέσιμο ραδιοφάρμακο με πυρήνα *trans*-[TcO₂]⁺ είναι το [^{99m}TcO₂(tetrofosmin)₂] (όπου tetrofosmin: 1,2-δισ[δισ(2-αιθοξυαιθυλο)φωσφινο-αιθάνιο] με εμπορική ονομασία Myoview[®] [117] (Σχήμα 4.10.).



Σχήμα 4.10.: Δομή του Myoview[®] (αριστερά), απεικόνιση του μυοκαρδίου (δεξιά)

Η δομή του είναι οκταεδρική, με τα τέσσερα άτομα φωσφόρου να καταλαμβάνουν το ισημερινό επίπεδο και την διοξο-ομάδα να είναι κάθετη σε αυτό. Οι οκτώ αιθοξο-ομάδες χρησιμεύουν στην ταχεία απομάκρυνση του ραδιοφαρμάκου από τον ασθενή καθώς υδρολύονται στο ήπαρ από ειδικά ένζυμα. Αυτό έχει ως συνέπεια το σύμπλοκο να γίνεται υδρόφιλο και το ραδιοφάρμακο να απομακρύνεται από το ήπαρ εύκολα ενώ αντίθετα κατακρατείται από τα καρδιακά κύτταρα. Έτσι

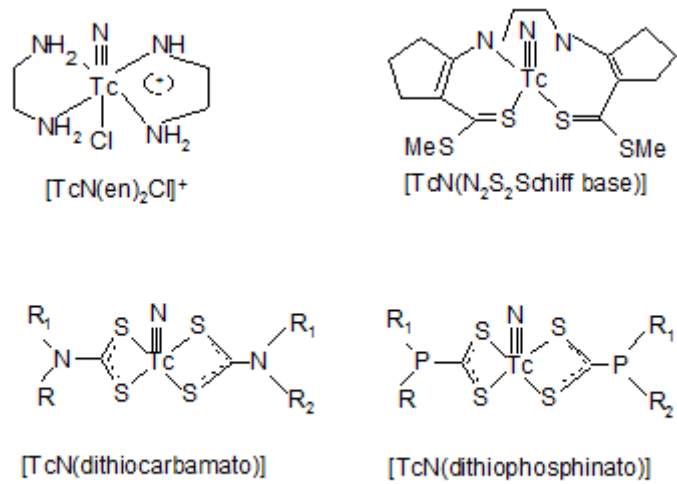
επιτυγχάνονται πολύ καλές απεικονίσεις του μυοκαρδίου χωρίς να επικαλύπτονται από την ηπατική περιοχή λόγω της εκπομπής ραδιενέργειας από το ήπαρ.

Τα τελευταία χρόνια τα σύμπλοκα με πυρήνα *trans*-[TcO₂]⁺ έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για χρήση τους στην επισήμανση με ^{99m}Tc πεπτιδίων. Αυτό οφείλεται στα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν λόγω της εύκολης παρασκευής τους με αναγωγή του ^{99m}TcO₄⁻, της βιολογικής τους σταθερότητας και της εύκολης απομάκρυνσης τους από τα νεφρά λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους.

3) Πυρήνας [Tc≡N]²⁺

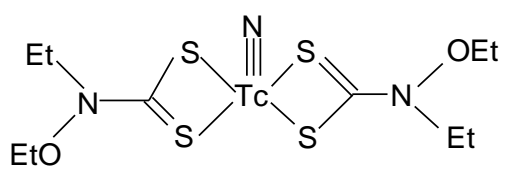
Ο πυρήνας [Tc≡N]²⁺ είναι ισοηλεκτρονιακός με τον [Tc=O]³⁺. Ο νιτριδο-υποκαταστάτης είναι ισχυρός π-δότης και παρουσιάζει μεγάλη ικανότητα να σταθεροποιεί το Tc^V. Σχηματίζεται με αναγωγή του [^{99m}Tc^{VII}O₄]⁻ με υδραζίνη ή παράγωγά της παρουσία κατάλληλων υποκαταστατών. Η δόνηση τάσης του δεσμού Tc≡N παρουσιάζει χαρακτηριστική IR απορρόφηση στα 1050-1070 cm⁻¹ και το μήκος του δεσμού είναι 1.58 – 1.63 Å.

Σχηματίζει πενταϋποκατεστημένα σύμπλοκα με δομή τετραγωνικής πυραμίδας με ποικιλία υποκαταστατών όπως κυκλικές ή άκυκλες τετρααμίνες, αμινοφωσφίνες, αιθυλενοδιαμίνη, φωσφίνες, τρισχιδεΐς βάσεις Schiff κ.α. [118-123] (Σχήμα 4.11.)



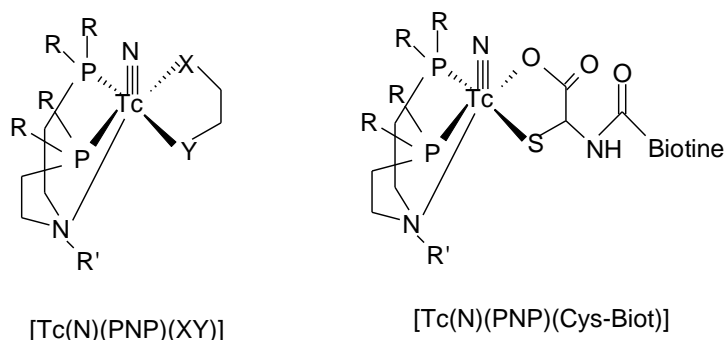
Σχήμα 4.11.: Παραδείγματα συμπλόκων Tc που περιλαμβάνουν τον πυρήνα $[Tc \equiv N]^{2+}$

Το πρώτο εγκεκριμένο ραδιοφάρμακο του τύπου αυτού με εφαρμογή στην καρδιολογία είναι το $[^{99m}TcN](noet)_2$ (noet= N – αιθυλο N – αιθοξύ –διθειοκαρβαμίδιο) [124] (Σχήμα 4.12.).



Σχήμα 4.12.: Δομή του ραδιοφαρμάκου $[^{99m}TcN](noet)_2$

Επίσης μπορεί να δώσει με ορισμένους υποκαταστάτες, όπως αμίνες και φωσφίνες, εξαϋποκατεστημένα σύμπλοκα με δομή πρίσματος πυραμίδας. Ενώσεις που φέρουν το θραύσμα $[^{99m}Tc(N)(PXP)]^{2+}$ όπου X: N, P, O (π.χ. PNP: αμινοδιφωσφίνη) [125] μπορούν να αντιδράσουν με δισχιδαίς υποκαταστάτες (YZ) οι οποίοι περιέχουν άτομα – δότες ηλεκτρονίων (π.χ. O, N, S) προς σχηματισμό σταθερών μικτών-υποκαταστάτων συμπλόκων του τύπου $[^{99m}Tc(N)(PXP)(YZ)]^{0/+}$ (Σχήμα 4.13.).



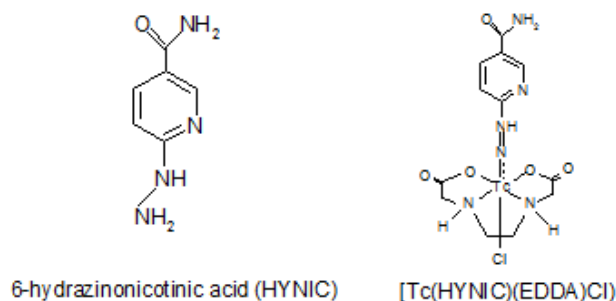
Σχήμα 4.13.: Παραδείγματα συμπλόκων του τύπου $[^{99m}Tc(N)(PNP)(XY)]^{0/+}$

4) Πυρήνας $[Tc=S]^{3+}$

Ο πυρήνας $[Tc=S]^{3+}$ είναι ασταθής σε υδατικό διάλυμα οπότε γίνεται εύκολη αντικατάσταση του S από το O παρουσία ατμοσφαιρικού αέρα. Τα πιο αντιπροσωπευτικά σύμπλοκα της κατηγορίας αυτής είναι τα $[TcS\{HB(Pz)_3\}Cl_2]$ (όπου $HB(Pz)_3^-$: υδρο-τρις(1-πυραζολυλ)βορικό ανιόν) και $[AsPh_4][TcS(edt)_2]$ (όπου edt: 1,2-διθειο-αιθάνιο) τα οποία συντέθηκαν σε μη υδατικό περιβάλλον υπό ατμόσφαιρα αργού, απουσία οξυγόνου και νερού.[126]

5) Tc(HYNIC) – σύμπλοκα

Ο υποκαταστάτης HYNIC (6-υδραζινο-νικοτινικό οξύ) (Σχήμα 4.14.) χρησιμοποιείται για την επισήμανση με ^{99m}Tc πεπτιδικών αναλόγων σωματοστατίνης [127], λιποσωμάτων τύπου Stealth [128], προσδετών του υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb/IIIa και του φολικού οξέος. [129]



Σχήμα 4.14.: Ο υποκαταστάτης HYNIC (αριστερά), παράδειγμα $Tc(HYNIC)$ συμπλόκου (δεξιά)

Το πιο γνωστό ραδιοφάρμακο της κατηγορίας αυτής είναι το Aromate[®] ($[^{99m}Tc]$ Annexin V) που βρίσκει εφαρμογή στην απεικόνιση της απόπτωσης, καθώς

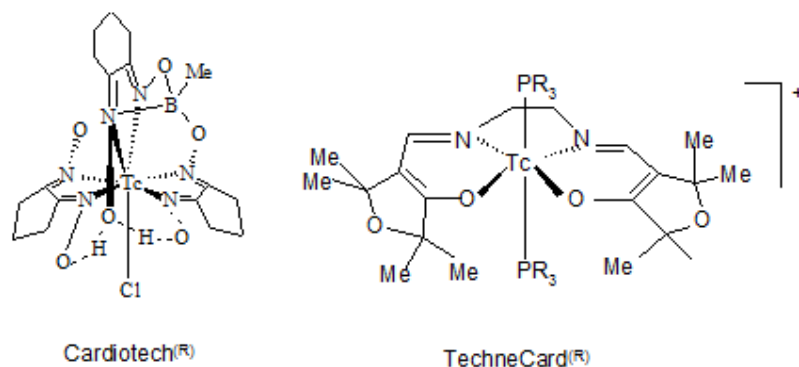
στηρίζεται στην υψηλή συγγένεια δέσμευσης του για την πρωτεΐνη φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε διαδικασία απόπτωσης [130,131].

Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης του HYNIC ως υποκαταστάτη είναι ότι οδηγεί σε ταχεία και υψηλής απόδοσης επισήμανση με ^{99m}Tc . Επίσης επειδή μπορεί να καταλάβει μόνο μία ή δύο θέσεις συναρμογής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικίλοι συμπληρωματικοί υποκαταστάτες (co-ligands) για να συμπληρώσουν τη σφαίρα συναρμογής του μετάλλου. Τέτοιοι υποκαταστάτες είναι κυρίως υδρόφιλες ενώσεις (π.χ. tricine, EDDA). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να τροποποιείται εύκολα η υδροφιλικότητα και η φαρμακοκινητική των τελικών $^{99m}\text{TcHYNIC-BM}$ (BM: βιομόριο). Οι συμπληρωματικοί υποκαταστάτες που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι οι tricine (N-τρις(υδροξυμεθυλογλυκίνη), EDDA (αιθυλενοδιαμινοδιοξικό οξύ) και glucoheptonate (γλυκοεπτονικό). Μειονεκτούν στο ότι η σταθερότητά τους είναι μικρή και στη παρουσία πολλών διαφορετικών ειδών τελικών συμπλόκων στο διάλυμα λόγω των διαφορετικών τρόπων σύνδεσης του HYNIC και των συμπληρωματικών υποκαταστατών. Αντίθετα αν χρησιμοποιηθεί τριαδικό σύστημα υποκαταστατών (HYNIC, tricine, φωσφίνη) δημιουργούνται σύμπλοκα Tc του τύπου $[^{99m}\text{Tc}](\text{HYNIC-BM})(\text{tricine})(\text{φωσφίνη})$ τα οποία είναι πολύ σταθερά σε διάλυμα.

4.7.3. Οξειδωτική βαθμίδα Tc(III)

Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του Tc(III) είναι d^4 . Λόγω αυτής της ηλεκτρονιακής διαμόρφωσης του μετάλλου, για να δημιουργηθούν σταθερά σύμπλοκα απαιτούνται υποκαταστάτες με ικανότητα π -οπισθοσύνδεσης. Χρησιμοποιούνται φωσφίνες, αρσίνες, αλογονίδια, καρβονύλια, βάσεις Schiff και σχηματίζονται εξαυποκατεστημένα σύμπλοκα με στερεοχημική δομή οκταέδρου. Λιγότερο συχνά είναι τα εφταυποκατεστημένα σύμπλοκα με τη χρησιμοποίηση υποκαταστατών σχετικά μικρού μεγέθους ώστε να αποφεύγεται η στερεοχημική παρεμπόδιση.

Το πρώτο εγκεκριμένο ραδιοφάρμακο της κατηγορίας αυτής είναι το Cardiotech[®] ($[^{99m}\text{Tc}]$ Teboroxime) (Σχήμα 4.15. αριστερά)



Σχήμα 4.15.: Δομή των ραδιοφαρμάκων απεικόνισης του μυοκαρδίου *Cardiotech[®]* και *Technecard[®]*

Το [^{99m}Tc]Teboroxime είναι επταϋποκατεστημένο σύμπλοκο που ανήκει στην κατηγορία των συμπλόκων τύπου BATO (boronic acid adducts of technetium dioximes). Οι έξι θέσεις συναρμογής του καταλαμβάνονται από τα άτομα N των τριών μορίων διοξίμης και η έβδομη από ένα άτομο Cl. Οι δύο ομάδες διοξίμης συνδέονται μέσω ενός παραγώγου βορονικού οξέος, ενώ η μία από αυτές μοιράζεται με την τρίτη διοξίμη δύο πρωτόνια [132].

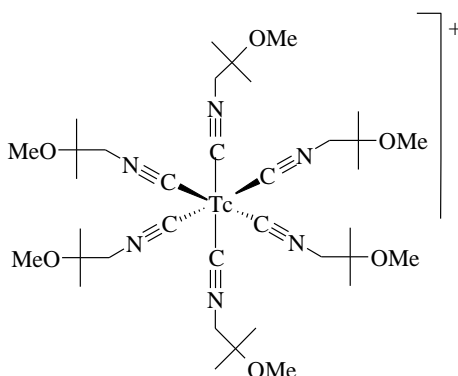
Επίσης για την απεικόνιση του μυοκαρδίου χρησιμοποιείται το [^{99m}Tc]Q12 με εμπορική ονομασία Technecard[®] (Σχήμα 4.15. δεξιά). Το [^{99m}Tc]Q12 αντιστοιχεί σε σύμπλοκα του τύπου [^{99m}Tc(L)(PR₃)₂]⁺ (όπου L: τετρασχιδής υποκαταστάτης τύπου N₂O₂ και PR₃: φωσφίνη, τα οποία αναφέρονται μαζί σαν σύμπλοκα Q) [133].

4.7.4. Οξειδωτική βαθμίδα Tc(I)

Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του Tc(I) είναι d⁶ χαμηλού spin. Σχηματίζει κυρίως μονοκατιοντικά σύμπλοκα εξαϋποκαταστημένα, κινητικά αδρανή και με δομή οκταέδρου. Το Tc(I) σταθεροποιείται με υποκαταστάτες οι οποίοι σχηματίζουν π-δεσμούς οπισθοσύνδεσης με το Tc, όπως φωσφίνες, ισονιτρίλια και καρβονύλια.

Οι οργανομεταλλικές ενώσεις του Tc σε χαμηλές οξειδωτικές βαθμίδες δεν είχαν λάβει την απαιτούμενη προσοχή μέχρι την ανακάλυψη, από τους Davison et al., ότι όταν χρησιμοποιηθούν ως υποκαταστάτες μονοσχιδή ισονιτρίλια σχηματίζονται σχεδόν ποσοτικά πολύ σταθερά υδατοδιαλυτά οργανομεταλλικά σύμπλοκα του τύπου [Tc(CNR)₆]⁺[134]. Το πρώτο επιτυχημένο ραδιοφάρμακο αυτής της μελέτης ήταν το [^{99m}Tc(MIBI)₆]⁺ ή όπως είναι πιο γνωστό ^{99m}Tc-Sestamibi (όπου MIBI: 2-μεθοξυ-2-μεθυλοπροπυλοϊσοκυανίδιο) με εμπορική ονομασία Cardiolite[®] (Σχήμα 4.14.) που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση του μυοκαρδίου [135]. Επίσης

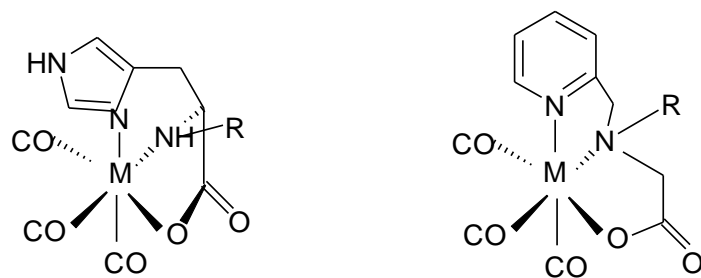
το ^{99m}Tc -Sestamibi χρησιμοποιείται και στη διαγνωστική ογκολογία με την εμπορική ονομασία Milaforma[®] για διάγνωση του καρκίνου του μαστού [136].



Σχήμα 4.16.: Η δομή του ραδιοφαρμάκου $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$ ή Cardiolite[®]

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.16. η διάταξη του $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$ είναι οκταεδρική. Η δράση του $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$ βασίζεται στη παρατήρηση ότι τα μονοκατιονικά σύμπλοκα τείνουν να συσσωρεύονται στο μυοκάρδιο. Επίσης η παρουσία των μεθοξυ-ομάδων προσδίδει υψηλή λιποφιλικότητα και βοηθάει στη συσσώρευση στο μυοκάρδιο. Η απομάκρυνση του ραδιοφαρμάκου είναι ταχεία μέσω του ήπατος, καθώς σε αυτό οι αιθερομάδες υδρολύονται ενζυματικά προς τις αντίστοιχες αλκοόλες.

Πρόσφατα οι Alberto et al., ανέπτυξαν μια νέα σειρά οργανομεταλλικών ενώσεων του Tc(I), της μορφής $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ [137]. Αρχικά έγινε η σύνθεση του συμπλόκου *fac*- $[\text{Tc}^I(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ το οποίο είναι σταθερό σε υδατικό περιβάλλον και μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα άλλων συμπλόκων με ανταλλαγή των ευκίνητων μορίων H_2O με διάφορους μονο-, δι- και τριδραστικούς υποκαταστάτες όπως αμίνες, θειοαιθέρες, φωσφίνες και θειόλες ώστε να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων. Πολύ σημαντική εφαρμογή των τρικαρβονυλο-συμπλόκων είναι η ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων ή πρωτεϊνών. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί ιστιδίνη και πυριδινυλο-N,N-ιμινοδιοξικό οξύ (PADA) ως τριδραστικοί υποκαταστάτες (Σχήμα 4.17.). Αυτοί φέρουν σύστημα ατόμων-δοτών (NNO) με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύνδεση σε βιοδραστικές ενώσεις (π.χ. κατά την ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων της σωματοστατίνης και της νευροτενσίνης).



Σχήμα 4.17.: Σύμπλοκα του $[Tc^I(CO)_3]^+$ με A) ιστιδίνη (αριστερά) B) PADA (δεξιά)

4.8. Ραδιοφάρμακα Tc 1^{ns} γενιάς

Η πρώτη ιατρική απεικόνιση με τη χρησιμοποίηση Tc πραγματοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 για την απεικόνιση του θυρεοειδούς, όπου το ραδιομέταλλο χορηγήθηκε με τη μορφή του $^{99m}TcO_4^-$. Τα επόμενα χρόνια αναπτύχθηκαν ραδιοφάρμακα για την απεικόνιση των οστών, της καρδιάς, των νεφρών, του εγκεφάλου και άλλων οργάνων.

Χαρακτηριστικά τέτοια ραδιοφάρμακα είναι τα $[^{99m}Tc]MDP$ (MDP: φωσφονικοί υποκαταστάτες) [138], $[^{99m}Tc]EHIDA$ (EHIDA: N-(2,6-διαιθυλοκετανιλιδο)ιμινο-διοξικό οξύ) [139], $[^{99m}Tc]DTPA$ (DTPA: διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ) για την απεικόνιση οστικών μεταστάσεων, ήπατος και νεφρών αντίστοιχα. Το κοινό χαρακτηριστικό των ραδιοφαρμάκων 1^{ns} γενιάς είναι ότι η δομή των συμπλόκων δεν έχει αποσαφηνιστεί.

4.9. Ραδιοφάρμακα Tc 2^{ns} γενιάς

Η ανάπτυξη των ραδιοφαρμάκων 2^{ns} γενιάς πραγματοποιήθηκε στη δεκαετία του 1980. Σε αντίθεση με τα ραδιοφάρμακα 1^{ns} γενιάς η δομή τους είναι καθορισμένη και το ραδιομέταλλο βρίσκεται σε καθορισμένη οξειδωτική βαθμίδα [140,141]. Ο καθορισμός της δομής τους οφείλεται στο ότι στη δεκαετία αυτή έγινε δυνατή η ευρεία παραγωγή του ^{99g}Tc από πυρηνικούς αντιδραστήρες, οπότε έγινε εφικτή η

πραγματοποίηση δομικών μελετών με σύνθεση των αντίστοιχων συμπλόκων σε μακροσκοπικό επίπεδο.

Τα ραδιοφάρμακα Tc 2^{ns} γενιάς δρουν ανιχνεύοντας μεταβολές στην αιματική ροή που οφείλονται σε παθολογικές καταστάσεις. Τα ραδιοφάρμακα αυτά σχεδιάστηκαν με τέτοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (π.χ. φορτίο, μέγεθος, λιποφιλικότητα) ώστε να συντελούν στη ταχύτερη και αποτελεσματικότερη εντόπιση στα όργανα ενδιαφέροντος. Χαρακτηριστικά τέτοια ραδιοφάρμακα είναι τα Cardiolite[®] ή [$^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6$]⁺, Technecard[®] ή [^{99m}Tc]Q12 κ.α.

4.10. Ραδιοφάρμακα Tc 3^{ns} γενιάς

Η ανάπτυξη των ραδιοφαρμάκων 3^{ns} γενιάς ή όπως είναι γνωστά «μοριακών ραδιοφαρμάκων», πραγματοποιήθηκε στις αρχές δεκαετίας του 1990 και συνδυάστηκε με τη μετάβαση από τη περίοδο των μη εξειδικευμένων ραδιοϊχνηθετών στην εποχή των σύγχρονων εξειδικευμένων ραδιοφαρμάκων μοριακής στόχευσης [142,143].

Τα μοριακά ραδιοφάρμακα περιλαμβάνουν ένα βιοδραστικό μόριο (π.χ. μονοκλωνικό αντίσωμα ή πεπτιδίο) στο οποίο έχει ενσωματωθεί το ραδιονουκλίδιο και αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με βιομόρια-στόχους του βιολογικού υποστρώματος. Οι στόχοι τους είναι βιομοριακά συστήματα υψηλής εξειδίκευσης-χαμηλής χωρητικότητας, όπως μεμβρανικοί και ενδοκυττάριοι υποδοχείς ορμονών, αντιγόνα ή ένζυμα των οποίων η έκφραση εξαρτάται από συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση.

Ο σωστός σχεδιασμός του ραδιοφαρμάκου έχει πολύ μεγάλη σημασία. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη το φορτίο, το μέγεθος, η λιποφιλικότητα του και το σχήμα του τελικού μοριακού ραδιοφαρμάκου ώστε να γίνεται επιτυχής μεταφορά και αλληλεπίδραση με το βιομόριο-στόχο της παθολογικής εστίας. Επίσης θα πρέπει η ειδική ραδιενέργεια του ραδιοφαρμάκου να είναι υψηλή ώστε να αποφεύγεται η συγχορήγηση περίσσειας «ψυχρού» πρόδρομου φαρμάκου. Η τελευταία αναμένεται να προκαλέσει μερικό ή ολικό κορεσμό του βιομοριακού συστήματος-στόχου μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της απεικόνισης και της ραδιονουκλιδικής θεραπείας.

Πολλά βιομόρια έχουν μελετηθεί ως προς τη δυνατότητά τους να αποτελέσουν το «μέσο μεταφοράς» ραδιονουκλιδίων στα αντίστοιχα βιομόρια-στόχους. Η μελέτη αυτή έχει οδηγήσει στην έγκριση από τον FDA σειράς ραδιοφαρμάκων

(επισημασμένων πεπτιδίων και αντισωμάτων) για διαγνωστική απεικόνιση και θεραπεία του καρκίνου (π.χ. Octreoscan[®], OncoSint[®], Apomate[®], Zevalin[®] κ.α.).

5. Μοριακή στόχευση του καρκίνου με ραδιοφάρμακα

5.1. Έννοια της «μαγικής σφαίρας»

Η έννοια της «μαγικής σφαίρας» (magic bullet) εκφράστηκε από τον Paul Ehrlich στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και αφορούσε την ανάγκη ανάπτυξης φαρμάκων μοριακής στόχευσης. Αρχικά η έννοια αυτή περιέγραφε ένα χημικό στοιχείο που είχε

την ικανότητα να στοχεύει εξειδικευμένα μικροοργανισμούς και χρησιμοποιήθηκε στην αρχή για τη θεραπεία της ελονοσίας με τη χρήση κυανού του μεθυλενίου.

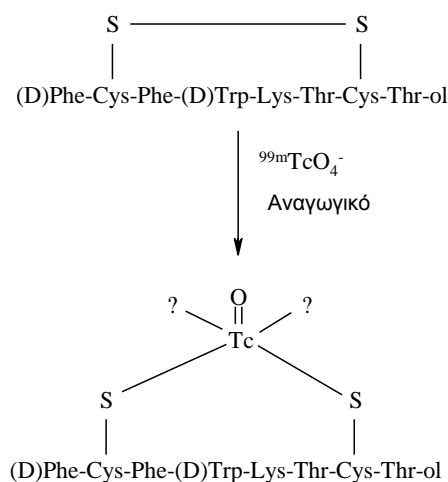
Η αρχή της «μαγικής σφαίρας» βρήκε εφαρμογή σε διάφορα πεδία της ιατρικής όπως η ογκολογία, η ανοσολογία, η αιματολογία και η φαρμακοχημεία και για τη θεωρία αυτή ο Paul Ehrlich τιμήθηκε με το βραβείο Nobel ιατρικής το 1908.

5.2. Ενσωμάτωση ραδιομετάλλου σε βιομόριο

Η ενσωμάτωση του ραδιομετάλλου σε ένα βιομόριο μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση επισήμανση (direct labeling) [143] είτε με επισήμανση μέσω διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάστη (bifunctional chelator approach) [144]

5.2.1 Άμεση επισήμανση (direct labeling)

Η μέθοδος αυτή ραδιοεπισήμανσης στηρίζεται στην υψηλού βαθμού θειοφιλικότητα των ραδιομετάλλων Tc και Re που έχει ως αποτέλεσμα να δεσμεύονται απευθείας στις δραστικές σουλφυδριλικές ομάδες (π.χ. ενός πεπτιδίου). Η δέσμευση πραγματοποιείται παρουσία αναγωγικού αντιδραστηρίου το οποίο χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης του πεπτιδίου σε ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (Σχήμα 5.1.) [145]. Βρήκε εφαρμογή στην επισήμανση αναλόγων σωματοστατίνης που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης όπως τα octreotide, lanreotide και vapreotide.



Σχήμα 5.1.: Άμεση επισήμανση πεπτιδίου με ${}^{99m}\text{Tc}$

Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι περιορίζεται σε πεπτίδια που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς και η αναγωγή τους δεν μεταβάλλει τις βιολογικές ιδιότητες του πεπτιδίου. Επίσης κανένα από τα επισημασμένα πεπτίδια δεν είναι καλά χαρακτηρισμένο και η ακριβής δομή των συμπλόκων δεν είναι γνωστή. Τα επισημασμένα με τη μέθοδο αυτή πεπτίδια είναι πολύ λιπόφιλα και απεκκρίνονται κυρίως από τον οργανισμό μέσω του ηπατοχολικού συστήματος, ενώ παρουσιάζουν και μικρή *in vivo* σταθερότητα.

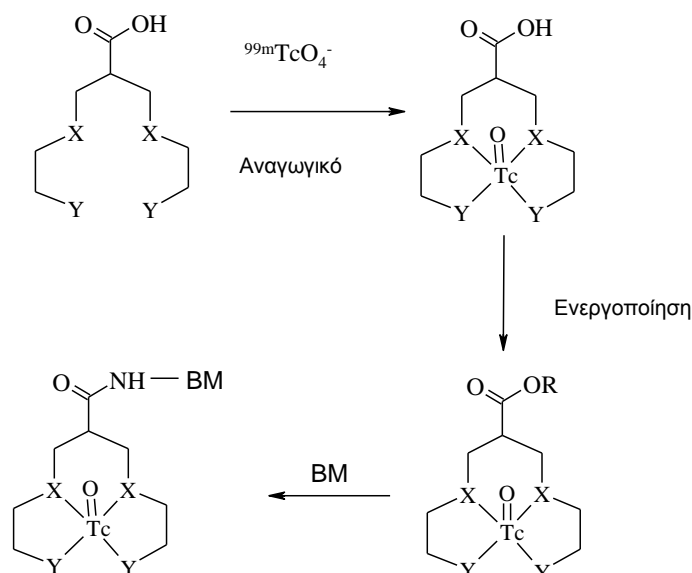
Λόγω των παραπάνω μειονεκτημάτων η μέθοδος αυτή δεν έχει βρει ιδιαίτερη εφαρμογή και χρησιμοποιείται κυρίως για την επισήμανση μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπου λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους τους δεν διαταράσσεται ιδιαίτερα η διαμόρφωση και η βιοδραστικότητά τους.

5.2.2. Επισήμανση μέσω διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη (bifunctional chelator approach)

Η επισήμανση με το ραδιομέταλλο πραγματοποιείται μέσω ενός διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη (Bifunctional Chelating Agent, BFCA). Χρησιμοποιούνται δύο βασικές στρατηγικές, η μέθοδος της προεπισήμανσης (prelabeling) και η μέθοδος της μεταεπισήμανσης (postlabeling).

α) Μέθοδος προεπισήμανσης (prelabeling)

Περιλαμβάνει το σχηματισμό του συμπλόκου ραδιομέταλλο - υποκαταστάτης πριν την σύζευξη του συμπλόκου στο βιοενεργό μόριο (Σχήμα 5.2.)



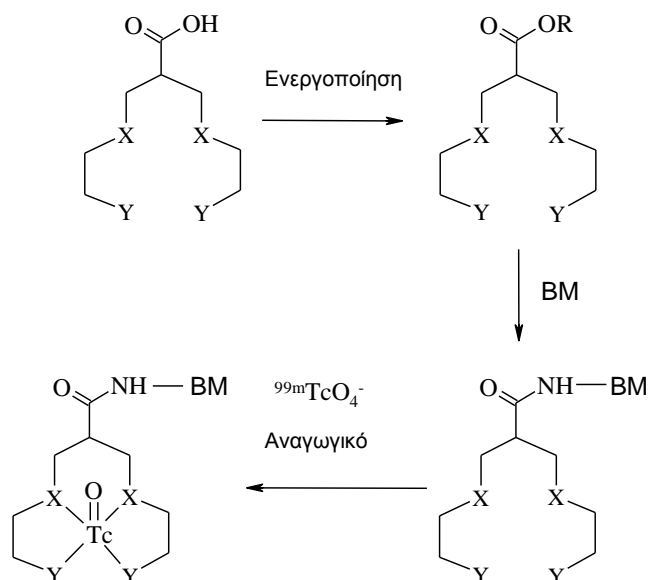
Σχήμα 5.2.: Μέθοδος προεπισήμανσης για τη δημιουργία βιοενεργών μορίων (BM) με ^{99m}Tc

Η μέθοδος αυτή προτιμάται όταν η επισήμανση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη υδατικά διαλύματα ή υπό έντονες συνθήκες και το βιοενεργό μόριο είναι ευαίσθητο στις συνθήκες αυτές. Ωστόσο είναι μία μέθοδος χρονοβόρα καθώς απαιτούνται πολλά στάδια για τη παρασκευή και τον καθαρισμό του ραδιοφαρμάκου, με αποτέλεσμα να μην είναι η ιδανική για κλινικές εφαρμογές ρουτίνας.

Χρησιμοποιείται κυρίως για την επισήμανση αντισωμάτων αλλά και μικρών πεπτιδίων όπως οι κυκλικοί ανταγωνιστές του υποδοχέα GPIIb/IIIa με χημικούς υποκαταστάτες τύπου N_2S_2 , N_3S [146].

B) Μέθοδος μεταεπισήμανσης (postlabeling)

Στην μέθοδο αυτή αρχικά προσδένεται ο χημικός υποκαταστάτης σε επιλεγμένη θέση στο βιοενεργό μόριο και μετά πραγματοποιείται η επισήμανση (Σχήμα 5.3.). Θεωρείται η πιο κατάλληλη μέθοδος για την ανάπτυξη και παρασκευή εμπορικά διαθέσιμων ραδιοφαρμάκων ^{99m}Tc [147,148].



Σχήμα 5.3.: Μέθοδος μεταεπιθήμανσης για τη δημιουργία βιοενεργών μορίων (BM) με ^{99m}Tc

5.3. Ραδιοεπισημασμένα αντισώματα στην ογκολογία

Η πρώτη κλινική εφαρμογή της θεωρίας της «μαγικής σφαίρας» στην ογκολογία ήταν στα μέσα της δεκαετίας του 1970, με τη χορήγηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAbs) ή θραυσμάτων τους για την θεραπεία του καρκίνου. Χρησιμοποιήθηκαν MAbs, ικανά να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένα αντιγόνα-καρκινικούς δείκτες (π.χ. πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες κ.α.) που βρίσκονται στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων, ως φορείς ραδιονουκλιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν διαγνωστικά ραδιονουκλίδια για τη στοχευμένη διάγνωση (ραδιοανοσοδιάγνωση) ή θεραπευτικά ραδιονουκλίδια για την θεραπεία (ραδιοανοσοθεραπεία) [149,150]. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ραδιοανοσοδιαγνωστικού φαρμάκου είναι το [^{99m}Tc]arcitumomab (εμπορική ονομασία CEA-Scan[®]), που είναι MAb κατά του καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου επισημασμένο με ^{99m}Tc και χρησιμοποιείται για την ραδιοανοσοδιάγνωση του καρκίνου του εντέρου. Επίσης άλλο εγκεκριμένο από το FDA φάρμακο είναι το OncoScint[®], που είναι ένα επισημασμένο με ^{111}In μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι για διάγνωση της επανεμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου και καρκίνου των ωοθηκών [151].

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια δέσμευσης για το αντιγόνο και υψηλή επιλεκτικότητα.

Ωστόσο παρουσιάζουν και σημαντικά μειονεκτήματα όπως είναι:

- Υψηλό κόστος παραγωγής
- Μικρή ικανότητα διείσδυσης στον καρκινικό ιστό άρα και χαμηλή πρόσληψη ραδιενέργειας από τον όγκο λόγω του υψηλού μοριακού βάρους τους (~ 150000 Da)
- Αργή αιματική κάθαρση λόγω του υψηλού μοριακού βάρους τους
- Χαμηλούς λόγους όγκος/υπόστρωμα άρα και χαμηλή απεικονιστική ευκρίνεια λόγω της χαμηλής συσσώρευσης ραδιενέργειας στον όγκο και της αργής αιματικής κάθαρσης ιδίως στους μικρούς χρόνους μετά τη χορήγηση
- Ισχυρή αντιγονικότητα, επαγωγή διαδικασιών ανοσολογικής απόκρισης με πιθανότητα αναφυλακτικού σοκ λόγω της μη ανθρώπινης προέλευσής τους (μύες)

Κατά κύριο λόγο στην πυρηνική ογκολογία τα ραδιοεπισημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και θεραπεία κακοήθων νεοπλασιών του αίματος, του λεμφικού συστήματος (λευκαιμίες, λεμφώματα).

5.4. Ραδιοπεπτίδια στην ογκολογία

Τα πεπτίδια είναι μικρού μεγέθους βιομόρια τα οποία αποτελούνται από αμινοξέα που ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας χημικό δεσμό που ονομάζεται πεπτιδικός δεσμός (CONH). Συμμετέχουν στις περισσότερες θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες καθώς ελέγχουν την κυτταρική λειτουργία, την διακυτταρική επικοινωνία, την ανοσοαπόκριση, μέσω αλληλεπιδράσεων πεπτιδίων-πρωτεϊνών. Τα πεπτίδια δρουν ως ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες.

Η εφαρμογή των ραδιοπεπτιδίων στην πειραματική και κλινική ογκολογία γνώρισε μεγάλη άνθηση στα τελευταία 30 χρόνια και ήταν αποτέλεσμα του τεράστιου ερευνητικού έργου που είχε προηγηθεί από την επιστημονική κοινότητα πάνω στη ανάπτυξη νέων μεθόδων σύνθεσης πεπτιδίων καθώς και στο χαρακτηρισμό τους.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό υποδοχέων πεπτιδορμονών σε κυτταρικές σειρές και ιστούς ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και σε *in vivo* μελέτες.

Πλέον η εκτεταμένη χρήση τους αφορά στην απεικονιστική διάγνωση ή ραδιονουκλιδική θεραπεία νεοπλασιών. [152,153].

5.4.1. Πλεονεκτήματα πεπτιδίων για την ανάπτυξη ραδιοφαρμάκων

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά των πεπτιδίων για την ανάπτυξη εξειδικευμένων ραδιοφαρμάκων σε σύγκριση με ραδιοεπισημασμένα αντισώματα είναι τα εξής:

- Συντίθενται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες με αυτοματοποιημένες μεθόδους σύνθεσης και με χαμηλό κόστος
- Παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιδεκτικότητα σε χημική τροποποίηση της δομής τους (συνθετικά πεπτίδια)
- Είναι ανθεκτικά σε έντονες συνθήκες ραδιοεπίσημανσης (π.χ. υψηλή θερμοκρασία)
- Λόγω του μικρού μεγέθους τους τα πεπτιδικά ραδιοφάρμακα έχουν:
 - i) ταχεία και υψηλή ικανότητα διείσδυσης στο καρκινικό ιστό – στόχο,
 - ii) δεν προκαλούν ανοσολογικές αντιδράσεις κατά τη χορήγησή τους στους ασθενείς
 - iii) εμφανίζουν ταχεία αιματική κάθαρση και απομάκρυνση από τους παρακείμενους ιστούς

5.4.2. Μειονεκτήματα πεπτιδίων

Τα πεπτίδια ωστόσο εμφανίζουν και μερικά μειονεκτήματα όπως:

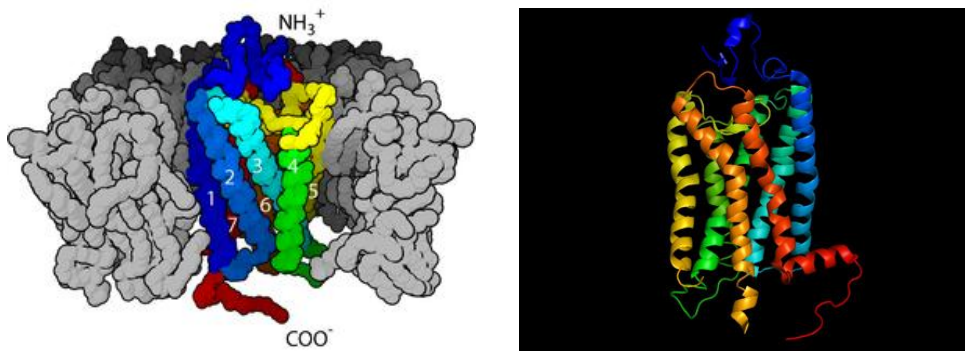
- Μικρό χρόνο ημιζωής στο βιολογικό περιβάλλον, καθώς είναι ευαίσθητα στη δράση των πεπτιδασών και των πρωτεασών στο πλάσμα του αίματος με πιθανό αποτέλεσμα να υφίστανται ταχεία πρωτεόλυση
- Η εισαγωγή του ραδιονουκλιδίου μπορεί να επηρεάσει τη αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με τον υποδοχέα λόγω πιθανών αλλαγών στη διαμόρφωση του πεπτιδίου

5.5. Υποδοχείς πεπτιδίων

Είναι πολύ σημαντικό κατά την ανάπτυξη ραδιοφαρμάκων 3^{ης} γενιάς να ταυτοποιηθούν βιομόρια-στόχοι εύκολα προσβάσιμοι και σε υψηλή πυκνότητα έκφρασης. Τα βιομόρια στόχοι είτε βρίσκονται μέσα στο κύτταρο (π.χ. DNA, m-RNA, πρωτεΐνες) είτε στη κυτταρική μεμβράνη (π.χ. υποδοχείς, αντιγόνα).

Οι υποδοχείς πεπτιδίων ανήκουν στην υπερικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCRs: G-protein coupled receptors) [154,155].

Οι GPCRs απαρτίζουν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από μια εξωκυτταρική αμινο-τελική περιοχή, επτά διαμεμβρανικές α -έλικες οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους ποικίλων μεγεθών, και μια ενδοκυτταρική καρβοξυ-τελική περιοχή (σχήμα 5.4) [156]. Το εξωκυττάριο N-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να είναι γλυκοζυλιωμένο. Οι εξωκυττάριοι βρόγχοι περιέχουν συχνά μόρια κυστεΐνης που μέσω δισουλφιδικών δεσμών μπορούν να σταθεροποιήσουν την διαμόρφωση του υποδοχέα. Το κυτταροπλασματικό C-τελικό άκρο του μορίου είναι μεγαλύτερου μήκους από το N-τελικό και εκεί εντοπίζεται η περιοχή δέσμησης της G-πρωτεΐνης.

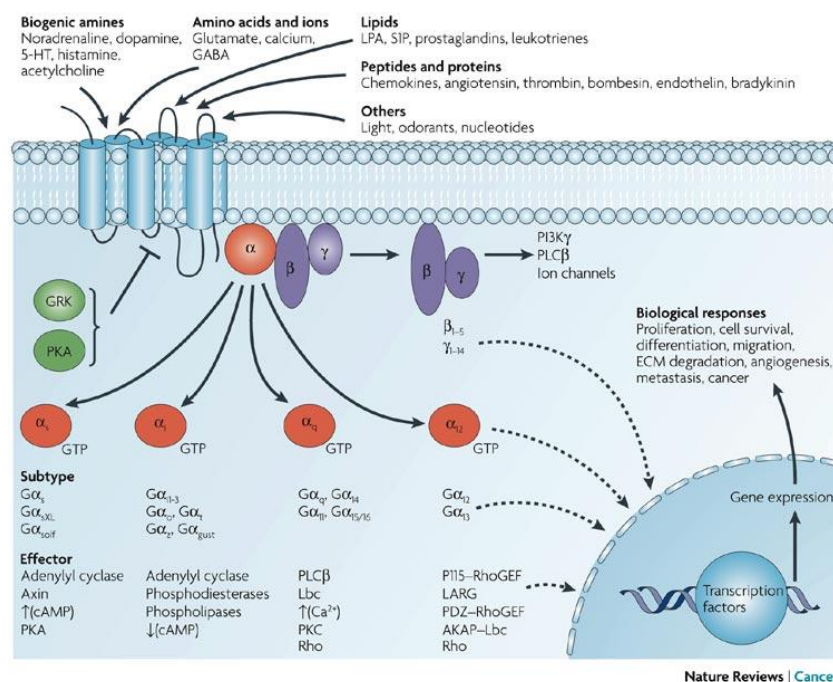


Σχήμα 5.4.: Αναπαράσταση της διαμόρφωσης των GPCRs (αριστερά), δομή της ροδοψίνης, πρώτου μέλους της υπερικογένειας των GPCRs του οποίου αναλύθηκε η δομή [157] (δεξιά)

Οι GPCRs επάγουν τη μετάδοση του εξωκυττάριου σήματος (signal transduction) [158], δηλαδή της δέσμησης του προσδέτη, σε ενδοκυττάριο μέσω της σύζευξης των κυτταροπλασματικών τους περιοχών με μέλη της μιας οικογένειας G πρωτεϊνών δηλαδή ετεροτριμερικών συμπλεγμάτων πρωτεϊνικών υπομονάδων (α , β και γ υπομονάδες) που δεσμεύουν GTP (G πρωτεΐνες). Όταν ο υποδοχέας είναι ανενεργός, η υπομονάδα $G\alpha$ είναι συζευγμένη με ένα μόριο διφωσφορικής γουανωσίνης (GDP). Η σύνδεση του πεπτιδίου στον υποδοχέα έχει ως συνέπεια αλλαγές στη διαμόρφωση της G πρωτεΐνης και την ανταλλαγή, του συνδεδεμένου με την G πρωτεΐνη GDP, με τριφωσφορική γουανωσίνη (GTP) και παράλληλη απόσπασση της υπομονάδας $G\beta\gamma$. Η ενεργοποιημένη πλέον G πρωτεΐνη (το σύμπλεγμα $G\alpha$ -GTP και η $G\beta\gamma$), απομακρύνεται από τον υποδοχέα και ξεκινά την μετάδοση του σήματος διεγείροντας μια σειρά από σηματοδοτικά μόρια (π.χ.

αδενυλική κυκλάση, φωσφολιπάση A₂). Αυτά με τη σειρά τους διεγείρουν ή αναστέλλουν τη παραγωγή δευτερογενών μηνυμάτων (π.χ. cAMP, διακυλογλυκερόλη, τριφωσφορική 1,4,5-ινοσιτόλη, cGMP-φωσφοδιεστεράση), την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca⁺⁺ ή τη διάνοιξη/κλείσιμο ιοντικών καναλιών. Τα δευτερογενή μηνύματα κατόπιν ενεργοποιούν άλλους ενδοκυττάρους στόχους (π.χ. μικρές πρωτεΐνες-GTP των οικογενειών ras και rho, μέλη των κινασών MAPK (mitogen activated protein kinases), οπότε δημιουργείται πληθώρα σηματοδοτικών δικτύων που έχουν ως τελικό αποδέκτη τον πυρήνα του κυττάρου (Σχήμα 5.5).

Η δράση της G πρωτεΐνης περιορίζεται από την ίδια, μέσω της εγγενούς δράσης της ως GTPάσης που διαθέτει και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση του GTP σε GDP και την απενεργοποίηση της G πρωτεΐνης. Κάθε υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιήσει έναν μεγάλο αριθμό G πρωτεϊνών πριν τερματιστεί η μετάδοση του σήματος από την εσωτερίκευση του υποδοχέα.



Σχήμα 5.5.: Πορεία μεταγωγής του εξωκυττάρου σήματος από τους GPCRs μέσω των πρωτεϊνών-G [158]

Ο φυσιολογικός ρόλος των GPCRs, περιλαμβάνει τον έλεγχο πληθώρας ανθρώπινων φυσιολογικών διεργασιών μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται, η απελευθέρωση ορμονών και ενζύμων από ενδοκρινείς και εξωκρινείς αδένες, οι ανοσολογικές αντιδράσεις, η απάντηση του αμφιβληστροειδή σε φωτεινά ερεθίσματα, ο έλεγχος του καρδιακού ρυθμού, η νευροδιαβίβαση και η κυτταρική μετανάστευση.

Οι GPCRs παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, στον πολλαπλασιασμό και στην πρόοδο της νόσου (αγγειογένεση, μετάσταση). Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να υπονομεύουν τις φυσιολογικές λειτουργίες των GPCRs με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται αυτόνομα ικανοποιώντας τις αυξημένες ανάγκες σε οξυγόνο, να αποφεύγουν την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα και να εισβάλουν σε παρακείμενους ή μη ιστούς.

Έχει παρατηρηθεί έκφραση των GPCRs σε μεγαλύτερη πυκνότητα σε σχέση με τους παρακείμενους υγιείς ιστούς ή σε σχέση με τον αρχικό υγίη ιστό προέλευσης (υπερέκφραση) σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους. [159]. Οι υποδοχείς συνεισφέρουν στη διαδικασία ανάπτυξης του όγκου μέσω ενεργοποίησης τους από αγωνιστές που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απελευθερώνονται είτε από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (αυτοκρινείς οδοί) είτε από κύτταρα του στρώματος (παρακρινείς οδοί).

Η μελέτη της έκφρασης υποδοχέων πεπτιδορμονών σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς γίνεται με πολλές τεχνικές όπως:

- Ανάλυση δέσμησης στους υποδοχείς *in vitro*
- Αυτοραδιογραφία υποδοχέων
- Υβριδισμός *in situ*
- Ανοσοϊστοχημεία
- Αλυσιδωτή αντίδραση της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)
- Ανάλυση κατά Northern

Η υπερέκφραση των υποδοχέων ρυθμιστικών πεπτιδίων σε καρκινικά κύτταρα τους καθιστά ιδανικούς στόχους για την διαγνωστική απεικόνιση ή ραδιοθεραπεία όγκων. Τα μόρια στόχευσης υποδοχέων πεπτιδορμονών χρησιμοποιούνται σαν φορείς είτε διαγνωστικών ή θεραπευτικών ραδιονουκλιδίων [160] είτε κυτταροτοξικών φαρμάκων [161], καθώς το μόριο στόχευσης αναγνωρίζει και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα που υπερεκφράζεται στον όγκο. Στον Πίνακα 5.1. παρουσιάζονται οι κυριότεροι τύποι υποδοχέων που υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Ο σχεδιασμός των ραδιοπεπτιδίων γίνεται συνήθως από μητρικές ενώσεις – αγωνιστές λόγω της ιδιότητας των GPCRs να μεταναστεύουν στο εσωτερικό του κυττάρου μετά τη δέσμηση πεπτιδίων αγωνιστών [162,163]. Αυτή η εσωτερίκευση έχει σαν αποτέλεσμα τη παρατεταμένη παραμονή του ραδιονουκλιδίου (ενσωματωμένου στο αρχικό ραδιοπεπτίδιο ή σε προϊόντα ενδοκυττάριας αποικοδόμησής του) στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό οδηγεί είτε σε ενίσχυση του

διαγνωστικού σήματος και της απεικονιστικής ευκρίνειας στη περίπτωση των διαγνωστικών ραδιοπεπτιδίων είτε σε αποτελεσματικότερη ακτινοβολήση του γενετικού υλικού στη περίπτωση των θεραπευτικών ραδιοπεπτιδίων. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες [164,165] έδειξαν ότι ραδιοπεπτίδια που έχουν ως μητρικές ενώσεις ανταγωνιστές εμφανίζουν πολύ υψηλές τιμές πρόσληψης στον όγκο με αποτελέσματα συχνά καλύτερα από τα ραδιοπεπτίδια με μητρικές ενώσεις αγωνιστές. Έτσι υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για την μελέτη του πεδίου των πεπτιδίων - ανταγωνιστών.

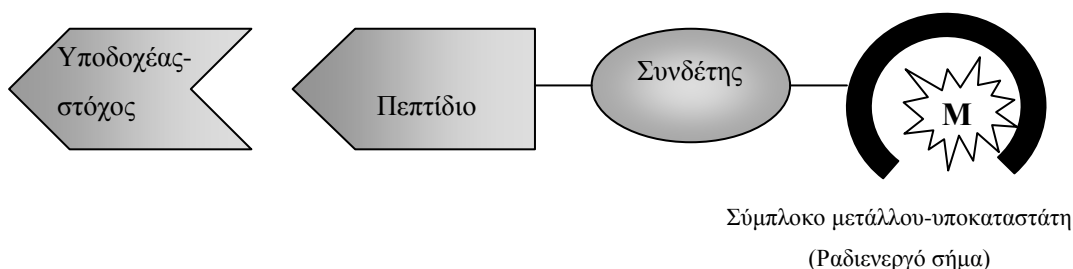
Πίνακας 5.1.: Χαρακτηριστικά παραδείγματα έκφρασης υποδοχέων ενδογενών πεπτιδίων και οι νεοπλασίες στις οποίες υπερεκφράζονται

Πεπτίδιο	Αριθμός αμινοξέων	Υποδοχέας	Όγκος που εκφράζει τον υποδοχέα
Μπομπεσίνη (BBN)	14	NMB-R (BB1-R), GRP-R (BB2-R), BRS-3 (BB3-R)	Καρκίνος προστάτη, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος μαστού, καρκίνος παχέος εντέρου, γαστρίνωμα, μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, γλοιωβλάστωμα
Σωματοστατίνη (SRIF) SS14 Σωματοστατίνη (SRIF) SS28	14 28	sst ₁ , sst ₂ , sst ₃ , sst ₄ , sst ₅	Νευροενδοκρινικοί όγκοι, λέμφωμα Non-Hodgkin's, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος μαστού
Χολοκυστοκινίνη (CCK) / γαστρίνη	8,33,39 ή 58/17 ή 34	CCK ₁ -R, CCK ₂ -R	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος παγκρέατος, αστροκύτωμα
Ορμόνη διέγερσης των μελανοκυττάρων (α-MSH)	13	α-MSH-R	Μελάνωμα
Νευροτενσίνη (NT)	13	NTSR ₁ , NTSR ₂ , NTSR ₃	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ποροειδές εξωκρινικό καρκίνωμα του παγκρέατος, σάρκωμα Ewing, μενιγγίωμα
Νευροπεπτίδιο Υ (NPY)	36	Y ₁ -R, Y ₂ -R, Y ₃ -R, Y ₄ - R, Y ₅ -R	Ενδοκρινικοί όγκοι, καρκίνος του μαστού, καρκίνος των κοκκιωδών κυττάρων, νευροβλάστωμα
Αγγειοδραστικό εντερικό πολυπεπτίδιο (VIP) / Πεπτίδιο ενεργοποίησης της υποφυσιακής αδενυλικής κυκλάσης (PACAP)	28/27 ή 38	VPAC ₁ -R, VPAC ₂ -R / PAC ₁ -R	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος παχέος εντέρου, καρκίνος στομάχου, καρκίνος παγκρέατος
Εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH)	10	LHRH-R	Καρκίνος μαστού, καρκίνος προστάτη
Ουσία P	11	NK1-R, NK2-R, NK3-R	Νευρογλοιαικοί όγκοι, καρκίνος μαστού, αστροκύτωμα,

5.6. Σχεδιασμός πεπτιδικών ραδιοφαρμάκων

Ένα ραδιοπεπτίδιο που θα χρησιμοποιηθεί στη κλινική ογκολογία συνήθως αποτελείται από τα εξής μέρη (Σχήμα 5.6.):

- Φυσικό πεπτίδιο ή ένα μεταβολικά σταθεροποιημένο πεπτιδικό ανάλογο
- Ραδιονουκλίδιο
- Κατάλληλο χηλικό υποκαταστάτη για σταθερή συναρμογή του ραδιομετάλλου (στη περίπτωση που θα χρησιμοποιηθούν για επισήμανση ραδιοαλογόνα π.χ. ^{131}I , ^{18}F , αντί του χηλικού υποκαταστάτη θα χρησιμοποιηθεί προσθετική ομάδα)
- Ένα συνδετικό μόριο μεταξύ πεπτιδικού τμήματος και υποκαταστάτη (π.χ. κατάλοιπα σακχάρων, πολυκαρβοξυλικές ενώσεις, υδρόφιλα αμινοξέα), που να μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση των φυσικοχημικών (π.χ. υδροφιλικότητα) ή των βιολογικών ιδιοτήτων τους (σταθερότητα στο βιολογικό περιβάλλον)



Σχήμα 5.6.: Σχηματική αναπαράσταση ραδιοπεπτιδίου που δεσμεύεται στον υποδοχέα-στόχο στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου

Η σύνδεση του ραδιονουκλιδίου στο πεπτίδιο γίνεται μέσω διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη, ο οποίος σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με το ραδιομέταλλο και συνδέεται ομοιοπολικά με το πεπτίδιο. Το συνδετικό μόριο χρησιμοποιείται για την αύξηση της απόστασης του συμπλόκου «ραδιομέταλλο – χηλικός υποκαταστάτης» από την πεπτιδική αλυσίδα ώστε να διαφυλάσσεται η βιολογική δραστηριότητα του τελικού ραδιοπεπτιδίου και η ικανότητα δέσμευσης στον υποδοχέα. Επίσης μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση των φυσικοχημικών (π.χ. υδροφιλικότητα) ιδιοτήτων του ραδιοπεπτιδίου.

Τα πεπτιδικά ραδιοφάρμακα πρέπει να πληρούν τις εξής προϋποθέσεις για να είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς:

- Να διατηρούν την ικανότητα δέσμευσης του πεπτιδίου στον υποδοχέα *in vitro* και *in vivo*
- Να πραγματοποιείται ποσοτική συναρμογή του ραδιομέταλλου σε συνθήκες απλές και εφαρμόσιμες στο κλινικό περιβάλλον
- Να έχουν σταθερότητα στο βιολογικό περιβάλλον, δηλαδή μεταβολική σταθερότητα στο πεπτιδικό κομμάτι και θερμοδυναμική/κινητική σταθερότητα στο σύμπλοκο ραδιομέταλλο-χηλικός υποκαταστάτης. Η μεταβολική σταθερότητα κατά τον σχεδιασμό του πεπτιδικού ραδιοφαρμάκου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους παρέμβασης στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς να επηρεαστεί η ικανότητα αλληλεπίδρασης του μητρικού μορίου με τον αντίστοιχο υποδοχέα. Έτσι πραγματοποιείται εισαγωγή D-αμινοξέων στη θέση των L-αμινοξέων, αντικατάσταση δισουλφιδικού δεσμού από θειοαιθερικό δεσμό, αντικατάσταση των φυσικών με μη φυσικά αμινοξέα, κυκλοποίηση, αντικατάσταση αμινο με ιμινο-ομάδες, αναγωγή πεπτιδικών δεσμών, κάλυψη των άκρων της πεπτιδικής αλυσίδας (terminal capping).
- Το ραδιοπεπτίδιο να έχει υψηλή ειδική ραδιενέργεια (συνολικό ποσό ραδιενέργειας ανά μονάδα μάζας του πεπτιδίου) ώστε να αποφεύγεται η παρουσία μη επισημασμένου πεπτιδίου που μπορεί να επιφέρει κορεσμό των θέσεων δέσμευσης και αποτυχία της *in vivo* στόχευσης αλλά και να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες στον ασθενή μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα
- Να είναι υδρόφιλα ώστε να απεκκρίνονται από τον ασθενή μέσω του ουροποιητικού συστήματος και των νεφρών και όχι μέσω του ηπατοχολικού συστήματος, οπότε καθίσταται δυνατή η ευκρινής απεικόνιση νεοπλασματικών εστιών στη κοιλιακή χώρα. Χημικές τροποποιήσεις στην πεπτιδική αλυσίδα όπως αντικατάσταση λιπόφιλων με υδρόφιλα αμινοξέα (π.χ. Tyr αντί Phe) μπορούν να συμβάλλουν στη ρύθμιση της φαρμακοκινητικής του ραδιοφαρμάκου ευνοώντας την απέκκριση μέσω των νεφρών.

5.7. Μεταλλικά ραδιονουκλίδια στο σχεδιασμό ραδιοπεπτιδίων

Η ολοένα αυξανόμενη εξέλιξη στη σύγχρονη ραδιοφαρμακευτική και πυρηνική ιατρική οδήγησε στην ανάπτυξη ραδιοπεπτιδίων με ποικίλα ραδιομέταλλα για εφαρμογή στη διαγνωστική και θεραπευτική ογκολογία. Στον Πίνακα 5.2. συνοψίζονται μερικά από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ραδιομέταλλα:

Πίνακας 5.2.: Ραδιονουκλίδια για την ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών ραδιοπεπτιδίων

Διαγνωστικά ραδιοπεπτιδία				
Ραδιομέταλλο	t_{1/2} (h)	Διάσπαση	Τρόπος παραγωγής	Αντιπροσωπευτικά ραδιοπεπτιδία
^{99m} Tc	6.02	γ, IT	Γεννήτρια ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc	[^{99m} Tc]EDDA/HYNIC-TOC [166]
¹¹¹ In	67.2	Auger e ⁻ , EC	Κυκλοτρόνιο, ¹¹² Cd(p,2n) ¹¹¹ In	[¹¹¹ In-DTPA ⁰]octreotide [167]
⁶⁷ Ga	78.1	γ, EC	Κυκλοτρόνιο, ^{68z} Zn(p,2n) ⁶⁷ Ga	[⁶⁷ Ga-DOTA ⁰ ,Tyr ³]octreotide [18]
⁶⁸ Ga	1.14	β ⁺ , EC	Γεννήτρια ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	[⁶⁸ Ga-DOTA ⁰ ,Tyr ³]octreotide [169]
⁶⁴ Cu	12.9	β ⁺ , β ⁻ , EC	Αντιδραστήρας, κυκλοτρόνιο ⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu	[⁶⁴ Cu-TETA ⁰ ,Tyr ³]octreotide [170]
⁸⁶ Y	14.7	β ⁺ , EC	Κυκλοτρόνιο ⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y	[⁸⁶ Y-DOTA-DPhe ¹ -Tyr ³]-octreotide [171]
Θεραπευτικά ραδιοπεπτιδία				
Ραδιομέταλλο	t_{1/2} (d)	Διάσπαση	Τρόπος παραγωγής	Αντιπροσωπευτικά ραδιοπεπτιδία
⁹⁰ Y	2.67	β ⁻	Γεννήτρια ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y	[⁹⁰ Y-DOTA ⁰]octreotide [172]
¹¹¹ In	2.83	Auger, EC	Κυκλοτρόνιο ¹¹² Cd(p,n) ¹¹¹ In	[¹¹¹ In-DTPA ⁰]octreotide [173]
¹⁷⁷ Lu	6.71	β ⁻ , γ	Αντιδραστήρας ¹⁷⁶ Yb(n,γ) ¹⁷⁷ Yb ¹⁷⁷ Lu	[¹⁷⁷ Lu-DOTA ⁰ Tyr ³]octreotate [174]
EC: σύλληψη ηλεκτρονίου (electron capture), β ⁺ : ποζιτρόνιο, β ⁻ : σωματιδιακή ακτινοβολία, IT: εσωτερική μετάδοση (internal transmission)				

5.8. Επιλογή χηλικού υποκαταστάτη στη σύνθεση ραδιοπεπτιδίων

Για τη σταθερή συναρμογή του μετάλλου, κατά την ανάπτυξη ενός ραδιοπεπτιδίου, απαιτείται η παρουσία κατάλληλου διλειουργικού χηλικού υποκαταστάτη. Αυτός παρέχει τη κατάλληλη ομάδα ατόμων - δότων για σταθερή πρόσδεση του ραδιομετάλλου και μια λειτουργική ομάδα μέσω της οποίας συνδέεται ομοιοπολικά στο πεπτιδίο. Ο χηλικός υποκαταστάτης συζεύγνεται στο πεπτιδίο συνήθως μέσω ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του υποκαταστάτη και της N-τελικής αμινομάδας του πεπτιδίου.

Ο ιδανικός χηλικός υποκαταστάτης θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις ώστε το μεταλλικό σύμπλοκο να έχει την επιθυμητή *in vivo* συμπεριφορά:

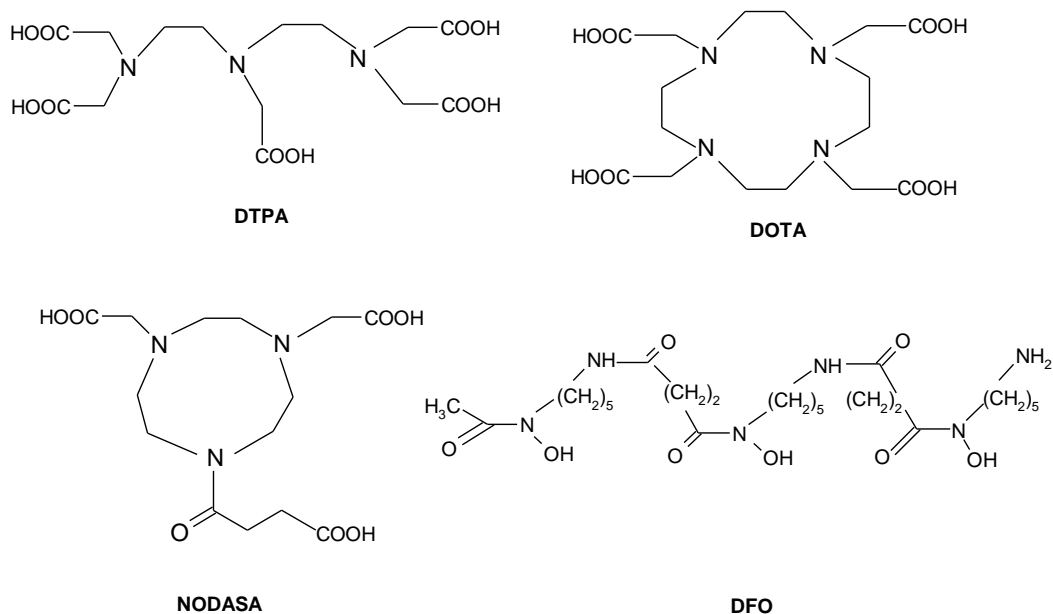
α) Το σύμπλοκο ραδιομετάλλου-χηλικού υποκαταστάτη να είναι κινητικά αδρανές και θερμοδυναμικό σταθερό, ώστε να αποφεύγεται η αποικοδόμησή του στο βιολογικό περιβάλλον

β) Να οδηγεί σε σχηματισμό υδρόφιλου συμπλόκου με το ραδιομέταλλο ώστε να ευνοείται η απέκκριση μέσω των νεφρών στα ούρα. Το φορτίο και το είδος των ομάδων του υποκαταστάτη μπορούν να επηρεάσουν την λιποφιλικότητα του συμπλόκου

γ) Το ραδιοπεπτίδιο να συναρμόζεται στον χηλικό υποκαταστάτη με υψηλή ραδιοχημική απόδοση και υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα υπό συνθήκες που να μπορούν να εφαρμοστούν εύκολα στην κλινική πράξη.

Ένας υποκαταστάτης που θεωρείται καθολικός για τα περισσότερα δισθενή και τρισθενή ραδιομέταλλα με κλινικό ενδιαφέρον είναι η ένωση DOTA (1,4,7,10-τετρααζακυκλοδεκαν-1,4,7,10 τετραοξικό οξύ), καθώς σχηματίζει σύμπλοκα με μέταλλα διαφόρων ιοντικών ακτίνων με πολύ υψηλές σταθερές σχηματισμού. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση ποικιλίας ραδιομετάλλων σε ανάλογα πεπτιδορμονών (σχήμα 5.7.). Η επισήμανση με ^{111}In πραγματοποιείται με DTPA (δισθειλενοτριάμινο πενταοξικό οξύ), ενώ για την επισήμανση με ^{67}Ga και ^{68}Ga χρησιμοποιούνται οι υποκαταστάτες NODASA (1,4,7-τριαζακυκλοεναν-1-ηλεκτρικό οξύ-4,7-διοξικό οξύ) και DFO (desferrioxamine-B) (σχήμα 5.7.)

Η επισήμανση με $^{99\text{m}}\text{Tc}$ πραγματοποιείται με πληθώρα ειδικών υποκαταστατών όπως έχει ήδη αναφερθεί (§ 4.7.), δεδομένου ότι η χημεία του Tc και του Re είναι ιδιαίτερη. Ενδεικτικά έχουν χρησιμοποιηθεί τριαμινοθειόλες, διαμινοθειόλες, HYNIC, διθειαδιφωσφίνες κ.α.

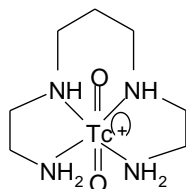


Σχήμα 5.7.: Χηλικοί υποκαταστάτες ικανοί να δεσμεύουν μεταλλικά ραδιονουκλίδια

5.8.1. Τετραμίνες ανοικτής αλυσίδας ως υποκαταστάτες

Κατά τον σχεδιασμό των ραδιοεπιιδίων που μελετήθηκαν στη παρούσα διατριβή, οι υποκαταστάτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σταθερή συναρμογή του Tc ήταν τετραμίνες ανοικτής αλυσίδας [175-178] του τύπου $H_2NCH_2CH_2NH(CH_2)_nNHCH_2CH_2NH_2$ (2,n,2-tet).

Η τετραμίνη με $n=3$ (2,3,2-tet) είναι αυτή που σχηματίζει τα σταθερότερα σύμπλοκα με το ^{99m}Tc . Αυτό οφείλεται στον κατάλληλο αριθμό μεθυλενομάδων ο οποίος ευνοεί την ταυτόχρονη συναρμογή των τεσσάρων ατόμων N. Παράλληλα ελαχιστοποιεί την στερεοχημική τάση δεδομένου ότι σχηματίζονται εναλλάξ πενταμελής, εξαμελής και πενταμελής δακτύλιος. Τα σύμπλοκα αυτά είναι μονοκατιονικά, οκταεδρικής δομής με πυρήνα $^{99m}TcO_2^+$ (σχήμα 5.8.)



Σχήμα 5.8.: Δομή του συμπλόκου ραδιομετάλλου - χηλικού υποκαταστάτη τύπου τετραμίνης ανοικτής αλυσίδας

Η άκυκλη τετραμίνη παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

α) Οδηγεί σε επισήμανση με ^{99m}Tc σχεδόν ποσοτική και σε ραδιοπεπτίδια υψηλής ειδικής ραδιενέργειας ($\geq 1 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) και υψηλής ραδιοχημικής καθαρότητας με ευκολία χρήσης στη κλινική πράξη.

β) Σχηματίζει με το ^{99m}Tc σύμπλοκα σταθερά στο βιολογικό περιβάλλον. Η σταθερότητα αυτή οφείλεται στην οκταεδρική τους δομή με το μέταλλο και τα τέσσερα άτομα αζώτου να βρίσκονται στο επίπεδο της βάσης, ενώ δύο άτομα οξυγόνου βρίσκονται σε θέσεις *trans* μεταξύ τους στις κορυφές του οκτάεδρου. Σχηματίζονται έτσι εξαϋποκατεστημένα σύμπλοκα και οι θέσεις συναρμογής του μετάλλου είναι όλες κατειλημμένες, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα να μην υπόκεινται εύκολα σε αντιδράσεις αντικατάστασης από ανταγωνιστικούς χηλικούς υποκαταστάτες του βιολογικού υποστρώματος (π.χ. ενδογενείς θειόλες).

γ) Τα σύμπλοκα $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O}_2)(\text{N}_4)]^+$ που σχηματίζονται είναι μονοκατιοντικά γιατί το Tc έχει αριθμό οξειδωσης +5 και οι τέσσερις αμινομάδες της τετραμίνης δεν αποπρωτονιώνονται, οπότε το συνολικό φορτίο του συμπλόκου είναι +1. Αυτό σε συνδυασμό με τη παρουσία των δύο ατόμων οξυγόνου στον πυρήνα, τα καθιστά υδρόφιλα οπότε και κατάλληλα για απεικόνιση όγκων στην κοιλιακή χώρα και στο γαστρεντερικό σύστημα. Επίσης λόγω του θετικού φορτίου των μεταλλικών συμπλόκων τα επισημασμένα πεπτίδια εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα στόχευσης των υποδοχέων - στόχων πιθανόν λόγω ηλεκτροστατικών έλξεων με αρνητικά φορτισμένα υπόλοιπα σακχάρων στο εξωκυττάριο τμήμα πολλών GPCRs [179,180].

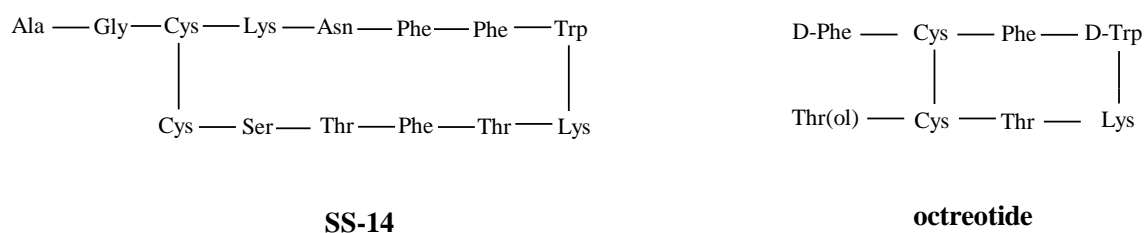
Τα παραπάνω πλεονεκτήματα οδήγησαν στη χρησιμοποίηση του υποκαταστάτη άκυκλης τετραμίνης για τη σύνθεση μιας σειράς ραδιοπεπτιδίων Tc (π.χ. ανάλογα μπομπεσίνης (BBN) [181], σωματοστατίνης (SS) [182], γαστρίνης [183]). Επειδή η χημεία των μετάλλων Tc και Re είναι παρόμοια, το σύστημα τετραμίνης παρέχει την προοπτική της σύνθεσης αντίστοιχων θεραπευτικών ραδιοπεπτιδίων με $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ για εφαρμογή στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση όγκων.

5.9. Πρώτο εγκεκριμένο ραδιοπεπτίδιο - OctreoScan[®]

Το πρώτο ραδιοπεπτίδιο που εγκρίθηκε το 1994 από το FDA ήταν το $[\text{}^{111}\text{In}]\text{DTPA-octreotide}$ με εμπορική ονομασία OctreoScan[®], για την απεικονιστική διάγνωση νευροενδοκρινικών όγκων [184]. Διατίθεται εμπορικά ως τυποποιημένο

λυοφιλοποιημένο προσκείμενο. Η ανασύσταση του και ο σχηματισμός του γίνεται με απλή προσθήκη διαλύματος $^{111}\text{InCl}_3$.

Το octreotide είναι κυκλικό οκταπεπτιδίο (σχήμα 5.9.) και αποτελεί ένα συνθετικό, μεταβολικά σταθεροποιημένο πεπτιδικό ανάλογο της σωματοστατίνης. Η SS είναι μια κυκλική πεπτιδική ορμόνη με δύο βιολογικά ενεργές μορφές (SS-14 με 14 κατάλοιπα αμινοξέων και SS-28 με 28 κατάλοιπα αμινοξέων). Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε διαφορετικοί υπότυποι υποδοχέων σωματοστατίνης στον άνθρωπο (sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 , sst_5) οι οποίοι υπερεκφράζονται σε ποικιλία καρκίνων (π.χ. νευροενδοκρινείς όγκοι, όγκοι κεντρικού νευρικού συστήματος κ.α.).



Σχήμα 5.9.: Δομή της SS-14 (αριστερά) και του κυκλικού οκταπεπτιδίου Octreotide (δεξιά)

Το octreotide πλεονεκτεί έναντι της SS-14, καθώς αυτή έχει μικρή μεταβολική σταθερότητα *in vivo* (2-3 min). Το octreotide παρουσιάζει υψηλή συγγένεια κυρίως για τον υπότυπο sst_2 ενώ η SS-14 και για τους πέντε υπότυπους.

Ωστόσο το OctreoScan[®] παρουσιάζει και μειονεκτήματα τα οποία οφείλονται κυρίως στη χρήση του ^{111}In . Αυτό έχει σχετικά υψηλό κόστος παραγωγής από κυκλοτρόνιο και μειωμένη διαθεσιμότητα. Επίσης λόγω της εκπομπής ηλεκτρονίων Auger υπάρχει και αυξημένη δόση ακτινοβολίας στον ασθενή. Ωστόσο το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι ότι οδηγεί σε απεικονίσεις χαμηλής ευκρίνειας.

Για τους παραπάνω λόγους το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ προτιμάται κατά το σχεδιασμό διαγνωστικών ραδιοπεπτιδίων σε σχέση με το ^{111}In . Στον Πίνακα 5.3. παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των δύο ραδιονουκλιδίων:

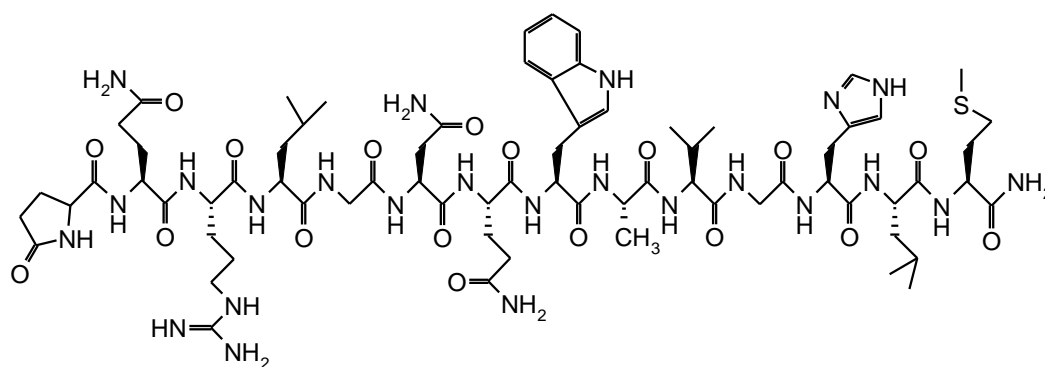
Πίνακας 5.3.: Σύγκριση των $^{99m}\text{Tc}/^{111}\text{In}$

Ραδιοουκλίδιο	^{99m}Tc	^{111}In
γ ακτινοβολία (E_{\max} , keV)	141 Ιδανική για ανίχνευση με SPECT camera	171, 245 Απεικόνιση χαμηλής ευκρίνειας
$t_{1/2}$ (h)	6.02	67.2 Παρατεταμένη έκθεση ασθενή και ιατρικού προσωπικού στην ακτινοβολία
Σωματιδιακή ακτινοβολία	-	Auger e^-
Παραγωγή	Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ Χαμηλό κόστος Εύκολη παραγωγή και διάθεση	Κυκλοτρόνιο, $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$

5.10. Ραδιοεπισημασμένα ανάλογα μπομπεσίνης

5.10.1. Πεπτιδικά ανάλογα μπομπεσίνης

Τα τελευταία χρόνια πολύ μεγάλο ενδιαφέρον στην Πυρηνική Ιατρική έχει εστιαστεί στο φυσικό δεκατετραπεπτιδίο μπομπεσίνη (bombesin-BBN) το οποίο για πρώτη φορά απομονώθηκε από το δέρμα του Ευρωπαϊού βατράχου *Bombina bombina* [185] (Σχήμα 5.10.):



H-Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂

Σχήμα 5.10.: Δομή της μπομπεσίνης

Τα ενδογενή πεπτιδικά ανάλογα της μπομπεσίνης στα θηλαστικά είναι τα :

- Γαστρίνοεκλυτικό πεπτιδίο (gastrin releasing peptide-GRP) που αποτελείται από 27 αμινοξέα

- Νευρομεδίνη C (neuromedin C – NMC) που αποτελείται από 10 αμινοξέα και αντιστοιχεί στο GRP(18-27)
- Νευρομεδίνη B (neuromedin B- NMB) που αποτελείται από 10 αμινοξέα (Πίνακας 5.4.)

Πίνακας 5.4.: Πεπτιδική αλληλουχία της μπομπεσίνης και των πεπτιδικών αναλόγων της

BBN:	pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂
GRP:	Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Thr-Lys- Met-Tyr-Pro-Arg -Gly-Asn- His -Trp-Ala- Val -Gly-His- Leu -Met-NH ₂
NMC:	Gly-Asn- His -Trp-Ala- Val -Gly-His- Leu -Met-NH ₂
NMB:	Gly-Asn- Leu -Trp-Ala- Thr -Gly-His- Phe -Met-NH ₂

Παρατηρείται ότι τα τέσσερα πεπτίδια παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των δέκα τελευταίων αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Όπως έχει αναφερθεί [186] το C-τελικό 8πεπτίδιο αποτελεί το ελάχιστο πεπτιδικό σύστημα που απαιτείται ώστε να πραγματοποιηθεί δέσμευση στον υποδοχέα με πλήρη συγγένεια δέσμευσης.

Τα φυσικά ανάλογα της BBN είναι ρυθμιστικά πεπτίδια και μπορούν να δράσουν ως εξής:

- Επηρεάζουν την απελευθέρωση ορμονών από το γαστροεντερικό σύστημα και το πάγκρεας [187,188]
- Επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα
- Διεγείρουν την ανάπτυξη φυσιολογικών ιστών όπως του επιθηλίου των βρόγχων και του γαστρεντερικού συστήματος [189]
- Έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου (π.χ. διεγείρουν την ανάπτυξη του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα μέσω ενός αυτοκρινούς βρόγχου GRP/GRP-R [190], έχουν μιτογόνο δράση σε κύτταρα Swiss 3T3 [191], το GRP διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις κυτταρικές σειρές PC-3 και DU-145 του ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη [192])

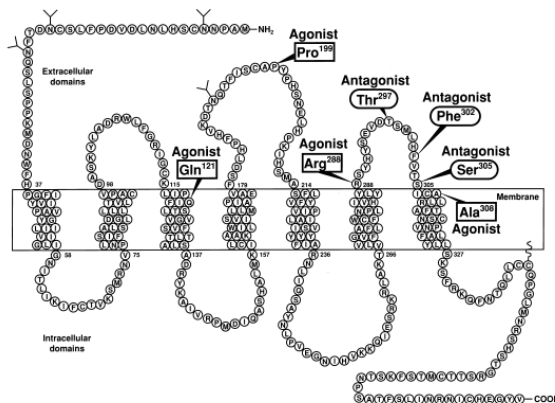
5.10.2 Υποδοχείς βομπεσίνης της υπεροικογένειας των GPCRs

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις υπότυποι υποδοχέων πεπτιδικών αναλόγων βομπεσίνης [193] που ανήκουν στην υπεροικογένεια των GPCRs (Σχήμα 5.11.), οι:

α) υποδοχέας νευρομεδίνης Β (NMB-R) ή BB₁-R

β) υποδοχέας γαστρίνοεκλυτικού πεπτιδίου (GRP-R) ή BB₂-R

γ) υποδοχέας bombesin 3 ή BB₃-R (ορφανός υποδοχέας)



Σχήμα 5.11.: Δομή του GRP-R ποντικού όπου φαίνεται η διαμόρφωση με τις επτά α-έλικες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη

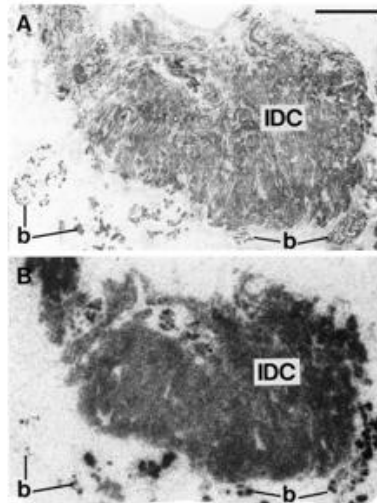
Για τα πεπτιδικά ανάλογα βομπεσίνης παρατηρείται διαφορετική συγγένεια για κάθε υπότυπο υποδοχέων. Τα GRP και NMC έχουν υψηλότερη συγγένεια για τον GRP-R ενώ το NMB έχει για τον NMB-R. Αντίθετα για το BB₃-R δεν έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα κάποιος ενδογενής προσδέτης οπότε θεωρείται ορφανός υποδοχέας. Η βομπεσίνη αλληλεπιδρά με παρόμοια συγγένεια και στους δύο ανθρώπινους υπότυπους GRP-R και NMB-R αλλά όχι στον BB₃-R [194]

5.10.3. Σχέση GRP-R και καρκίνου

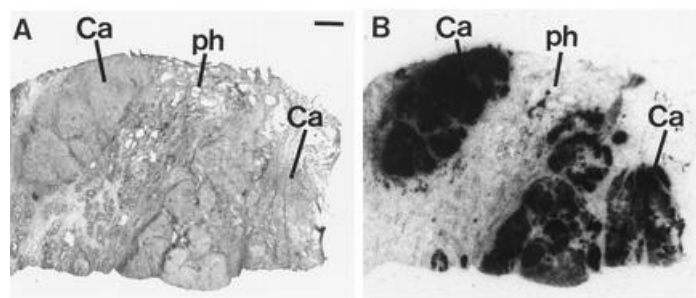
Ο GRP-R εκφράζεται φυσιολογικά κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα και συνεισφέρει στην εκδήλωση διαφόρων φυσιολογικών δράσεων συγκεκριμένων πεπτιδικών αναλόγων βομπεσίνης.

Επίσης ο GRP-R εμπλέκεται σε αρκετά είδη καρκίνου χωρίς ωστόσο να είναι σαφής ο βιολογικός του ρόλος, καθώς φαίνεται να σχετίζεται με τη γένεση και εξέλιξη της νεοπλασίας μέσω αλληλεπίδρασης με πεπτιδία που έχουν μιτογόνο δράση [195,196].

Ο GRP-R έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς συνήθεις ανθρώπινους όγκους [197-202], όπως ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού, το γαστρίνωμα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα. Μελέτες *in vitro* αυτοραδιογραφίας του GRP-R σε τομές ιστών ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και καρκίνου του προστάτη έδειξαν την υψηλή πυκνότητα έκφρασης του GRP-R τόσο σε πρωτογενείς όγκους όσο και σε μεταστατικές εστίες σε σχέση με τους παρακείμενους ιστούς (Σχήμα 5.12.,5.13.):



Σχήμα 5.12.: Αυτοραδιογραφία GRP-R σε τομή ιστού επιθηλικού καρκινώματος μαστού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού A: Χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη B: Αυτοραδιογραφία GRP-R με [125 I-Tyr 4]BBN όπου φαίνεται η ολική του δέσμευση. IDC: πορώδες καρκίνωμα μαστού, b: φυσιολογικός ιστός μαστού



Σχήμα 5.13.: A: Τομή με χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη B: Αυτοραδιογραφία GRPR σε καρκίνο του προστάτη με [125 I-Tyr 4]BBN, όπου παρατηρείται έντονη αμάυρωση της καρκινικής περιοχής και όχι της υπερπλασίας του προστάτη, Ca: καρκίνος, pH: υπερπλασία προστάτη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η *in vivo* απεικόνιση GRP-Rs μπορεί να εφαρμοστεί για την επιλεκτική στόχευση τους με τη χρησιμοποίηση πεπτιδικών αναλόγων μπομπεσίνης αλλά και για τη στοχευμένη ραδιοθεραπεία καρκίνων που υπερεκφράζουν GRP-Rs.

Επίσης έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές διάγνωσης και θεραπείας καρκίνων που υπερεκφράζουν τον GRP-R όπως:

α) Αντι-GRP/GRP-R αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία νεοπλασιών [203].

β) Χρησιμοποιούνται (ακόμα σε πειραματικό στάδιο) πεπτιδικά ανάλογα μπομπεσίνης ως φορείς κυτοτοξικών ουσιών (π.χ. δοξορουμπισίνη, 2-πυρρολινοδοξορουμπισίνη) για την αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών [204,205]

γ) Έχουν αναπτυχθεί συνθετικοί ανταγωνιστές μπομπεσίνης. Αυτοί στοχεύουν επιλεκτικά υποδοχείς μπομπεσίνης και έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών όγκων σε πρότυπα πειραματοζώων και ίσως στο μέλλον να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μακρόχρονη θεραπευτική αγωγή σε ασθενείς με GRP-R θετικούς καρκίνους.

5.10.4. Χρήση ραδιοεπισημασμένων αναλόγων μπομπεσίνης για καρκίνο του προστάτη

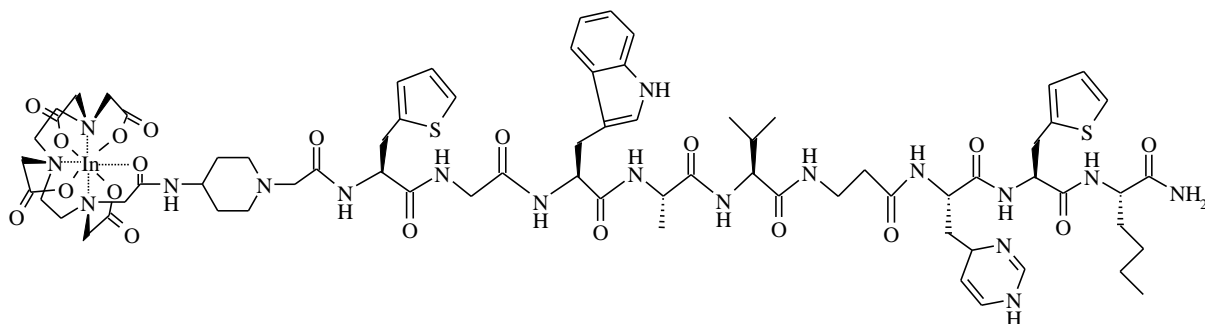
Ο καρκίνος του προστάτη είναι σήμερα ο συχνότερος καρκίνος στους άνδρες, και αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από κακοήθεια μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Αφορά κυρίως άνδρες 50-80 ετών, συχνά δε παραμένει κλινικά ασυμπτωματικός μέχρις ότου φθάσει σε προχωρημένο στάδιο. Αν όμως διαγνωσθεί σε αρχικό στάδιο, οι θεραπευτικές επιλογές είναι πολλές και η επιβίωση του ασθενούς στην πενταετία πλησιάζει το 100%. Τα αίτια του καρκίνου του προστάτη παραμένουν άγνωστα, ωστόσο κλινικές μελέτες δείχνουν μία αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης του με την πάροδο της ηλικίας, όπως και μια πιθανή γενετική προδιάθεση στην ανάπτυξη του. Ο εργαστηριακός έλεγχος του καρκίνου του προστάτη περιλαμβάνει αρχικά τον προσδιορισμό της τιμής του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA). Το PSA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που παράγεται κυρίως από τα κύτταρα των αδένων και πόρων του προστάτη και βρίσκεται στον ορό του αίματος. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας του καρκίνου του προστάτη εξαρτάται από την σταδιοποίηση του όγκου, την ηλικία και το προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενούς. Η χειρουργική θεραπεία περιλαμβάνει την ριζική προστατεκτομή και την διουρηθρική προστατεκτομή. Επίσης πραγματοποιούνται ορμονοθεραπείες στον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του προστάτη, οι οποίες αυξάνουν το προσδόκιμο

επιβίωσης ασθενών, ωστόσο δεν βοηθούν στη περίπτωση ασθενών με καρκίνο του προστάτη μη εξαρτώμενου από ανδρογόνα [206].

Όπως έχει αποδειχθεί τόσο από *in vitro* αυτοραδιογραφία των υποδοχέων σε δείγματα όσο και από *in situ* υβριδισμό για την ανίχνευση mRNA υποδοχέων BBN σε δείγματα ανθρώπινων καρκινικών ιστών προστάτη, υπάρχει σχεδόν ομοιογενής υπερέκφραση των GRP-Rs σε αντίθεση με φυσιολογικό ιστό προστάτη ή καλοήθεις υπερπλασίες όπου ο GRP-R είτε εκφράζεται σε χαμηλή πυκνότητα είτε δεν εκφράζεται. Είναι εμφανές, λόγω των παραπάνω, ότι οι GRP-Rs αποτελούν τους ιδανικούς «στόχους», διαγνωστικών και θεραπευτικών ραδιοεπισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων BBN.

Αρχικά έγινε ραδιοϊώδωση της μπομπεσίνης ώστε να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση όγκων με SPECT [207,208]. Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα πρώτα επισημασμένα ανάλογα μπομπεσίνης με ^{18}F για χρησιμοποίηση στην απεικόνιση όγκων με PET [209].

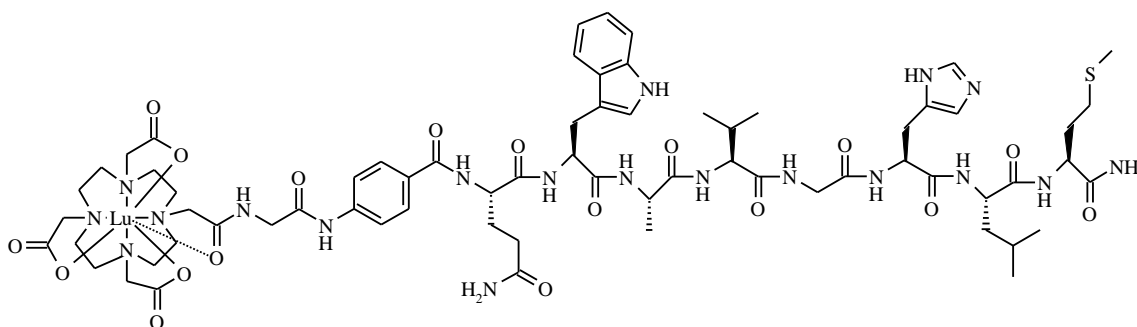
Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο ραδιονουκλίδιο είναι το ^{111}In το οποίο επιλέχθηκε για την επισήμανση μιας σειράς πεπτιδικών αναλόγων μπομπεσίνης. Για τη δέσμευση του ^{111}In υποκαταστάτες όπως το DTPA και το DOTA συζεύχθηκαν στο N-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας [210]. Τα ραδιοπεπτίδια αυτά είχαν υψηλή υδροφιλικότητα και υψηλές τιμές πρόσληψης *in vivo* στον GRP-R σε πειραματόζωα [211-213]. Στο σχήμα 5.14. δίνεται χαρακτηριστικό παράδειγμα αναλόγου BBN επισημασμένου με ^{111}In για χρήση του στη διάγνωση καρκίνου του προστάτη.



Σχήμα 5.14.: Δομή του [^{111}In -DTPA-ACMrip⁵,Tha⁶,βAla¹¹,Tha¹³,Nie¹⁴]BBN(5-14)

Ανάλογα μπομπεσίνης με υποκαταστάτες DOTA και επισημασμένα με θεραπευτικά ραδιονουκλίδια (π.χ. $^{90}\text{Y}^{+3}$, $^{177}\text{Lu}^{+3}$, $^{149}\text{Pm}^{+3}$, $^{53}\text{Sm}^{+3}$) χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία GRP-R θετικών καρκίνων [214-216]. Στο Σχήμα 5.15. απεικονίζεται η δομή του ^{177}Lu -AMBA, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα θεραπευτικού

αναλόγου μιομπεσίνης επισημασμένου με ^{177}Lu για ραδιοθεραπεία GRP-R-θετικών καρκίνων



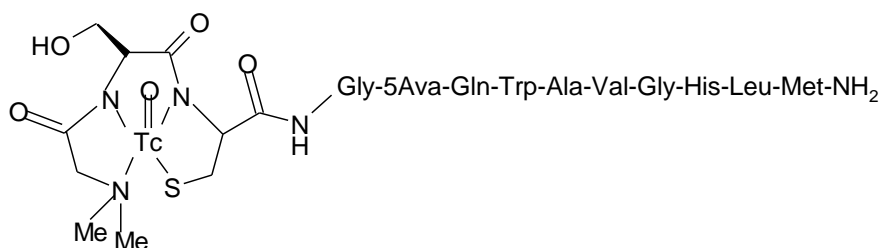
Σχήμα 5.15.: Απεικόνιση της δομής του $^{177}\text{Lu-AMBA}$

Ραδιομέταλλα όπως τα $^{64}\text{Cu}^{+2}$ και $^{68}\text{Ga}^{+3}$ χρησιμοποιήθηκαν επίσης για επισημάνση αναλόγων μιομπεσίνης για εφαρμογή στη απεικόνιση PET [217-219].

Κυρίως όμως έγινε ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων αναλόγων μιομπεσίνης με $^{99\text{m}}\text{Tc}$ λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων του (§ 4.3.) για εφαρμογή στην διαγνωστική απεικόνιση όγκων [220,221]. Οι νέες δυνατότητες που εμφανίστηκαν στην διαγνωστική ογκολογία με την ανάπτυξη της τεχνικής SPECT/CT οδήγησαν στην σύνθεση πολλών $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -επισημασμένων αναλόγων μιομπεσίνης.

Ένα από τα πρώτα πεπτίδια που παρασκευάστηκε και επισημάνθηκε με $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ήταν το $[\text{Lys}^3(^{99\text{m}}\text{Tc-DADT})]\text{BBN}$. Αυτό έχει ως πυρήνα τον $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}^{3+}$ και έγινε εισαγωγή του χημικού υποκαταστάτη τύπου N_2S_2 (DADT) στο κατάλοιπο Lys στο $[\text{Lys}^3]\text{BBN}$. Είχε όμως το μειονέκτημα ότι παρουσίαζε ένα υψηλό ποσοστό μη επιθυμητής ηπατοχολικής απέκκρισης με συνέπεια να μην βοηθάει στην ευκρινή απεικόνιση πιθανών όγκων στην κοιλιακή χώρα [222]. Με σύζευξη του DADT στο $[\text{DTPA}^1, \text{Lys}^3, \text{Tyr}^4]\text{BBN}$ παρασκευάστηκε ένα πιο υδρόφιλο – λόγω της παρουσίας των καρβοξυλικών ομάδων του DTPA - πεπτίδιο, το οποίο παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τον GRP-R και απεκρίνεται μέσω του ουροποιητικού συστήματος [223,224]. Με σύζευξη χημικού υποκαταστάτη τύπου N_3S σε BBN ή BBN (7-14), είτε απευθείας είτε μέσω συνδετικού μορίου, παρασκευάστηκαν σύμπλοκα με πυρήνα $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}^{3+}$ [225,226]. Χαρακτηριστικό τέτοιο ραδιοπεπτίδιο είναι το $^{99\text{m}}\text{Tc-RP527}$ που στο N-τελικό άκρο του BBN(7-14) συζεύγνεται μέσω του συνδετικού μορίου γλυκίνη-5-αμινοβαλερικό οξύ, το $^{99\text{m}}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O-N}_3\text{S}$ [227]. Το $^{99\text{m}}\text{Tc-RP527}$ (Σχήμα 5.16.) ήταν το πρώτο ραδιοπεπτίδιο το οποίο μέσω κλινικών μελετών αποδείχθηκε κατάλληλο για

απεικόνιση GRP-R θετικών όγκων, ωστόσο ήταν ασταθές *in vivo* και έδειξε υψηλό ποσοστό – μη επιθυμητής - ηπατοχολικής απέκκρισης.



Σχήμα 5.16.: Απεικόνιση της δομής του $^{99m}\text{Tc-RP527}$



Εικόνα 5.17.: Απεικόνιση ασθενούς μετά από χορήγηση $^{99m}\text{Tc-RP527}$

Επίσης έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, ανάλογα μπομπεσίνης που έχουν τον πυρήνα $[\text{trans-}^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}_2]^+$ [228,229]. Με σύζευξη του σταθερού στην ατμόσφαιρα υδροφιλικού υποκαταστάτη τύπου P_2S_2 σε BBN(7-14) παρασκευάστηκαν ραδιοπεπτίδια με υψηλή συγγένεια δέσμευσης στον GRP-R και καλή *in vivo* ικανότητα δέσμευσης στον GRP-R σε ποντίκια. Τα ανάλογα Demobesin 3-6 εμφάνισαν υψηλή συγγένεια δέσμευσης στον GRP-R και γρήγορη εσωτερίκευση. Επίσης *in vivo* τα Demobesin 3 και Demobesin 4 εμφάνισαν υψηλές τιμές πρόσληψης στον όγκο και γρήγορη απομάκρυνση από τους ιστούς που δεν εμφανίζουν GRP-Rs διαμέσου του ουροποιητικού συστήματος. Αντίθετα τα Demobesin 5 και Demobesin 6 εμφάνισαν *in vivo* χαμηλότερες τιμές πρόσληψης στον όγκο και υψηλότερη ηπατοχολική απέκκριση.

Η αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων επισήμανσης της μπομπεσίνης οδήγησε στη σύνθεση αναλόγων της μορφής $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{I}}\text{-fac}(\text{CO})_3(\text{X})\text{-Dpr}(\text{Ser})_3]\text{BBN}(7-14)$ όπου (X=H₂O ή P(CH₂OH)₃ [230,231]) (όπου Dpr: διαμινοπροπιονικό οξύ).

Σειρά αναλόγων μπομπεσίνης συντέθηκε με τροποποιήσεις στην πεπτιδική αλυσίδα όπου έγινε αντικατάσταση της Leu¹³ και ή της Met¹⁴ από κυκλοεξυλαλανίνη (Cha) και νορλευκίνη (Nle) αντίστοιχα ώστε να αυξηθεί η σταθερότητα στο πλάσμα

του αίματος. Επιπρόσθετα σε κάποια ανάλογα χρησιμοποιήθηκε ως συνδετικό μόριο βAla-βAla ή Lys(sha)-βAla-βAla (όπου sha: σικιμικό οξύ). Όλα αυτά τα ανάλογα είχαν σαν υποκαταστάτη τον *retroN^α*-καρβοξυμεθυλοιστιδίνη (N^αHis)Ac και επισημάνθηκαν με *fac*-[^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Η εισαγωγή του συνδετικού μορίου οδήγησε σε πολύ καλές τιμές πρόσληψης στον όγκο ενώ οι τροποποιήσεις στη πεπτιδική αλυσίδα οδήγησαν σε αύξηση της σταθερότητας του πεπτιδίου στο πλάσμα [232].

6. Σχεδιασμός αναλόγων

Στη παρούσα διατριβή σχεδιάστηκαν πεπτιδικά ανάλογα μμπομπεσίνης, επισημασμένα με ^{99m}Tc, για την *in vitro* και η *in vivo* αξιολόγηση τους με σκοπό την εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση GRP-R - θετικών καρκινωμάτων. Χρησιμοποιήθηκε ^{99m}Tc καθώς αποτελεί το πιο κατάλληλο διαγνωστικό ραδιονουκλίδιο της πυρηνικής ιατρικής λόγω των ιδανικών πυρηνικών ιδιοτήτων του αλλά και της εύκολης παραλαβής του σε στείρο διάλυμα υπερτεχνητικών ιόντων σε υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα, υψηλή ειδική ραδιενέργεια (520 Ci/μmol) και με μικρό κόστος από γεννήτρια ⁹⁹Mo/^{99m}Tc.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής επιλέχθηκαν πεπτιδία-ανταγωνιστές αντί πεπτιδίων-αγωνιστών για τους εξής λόγους:

- Στο πεδίο της ογκολογίας για πιθανή εφαρμογή στην απεικονιστική διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου μέχρι τώρα χρησιμοποιούνταν ραδιοεπισημασμένα πεπτιδία αγωνιστές. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα εσωτερίκευσης τους μετά από τη δέσμευσή τους στον υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενίσχυση του διαγνωστικού σήματος και της απεικονιστικής ευκρίνειας. Επίσης κατά τη ραδιοθεραπεία η είσοδος του ραδιονουκλιδίου στο καρκινικό κύτταρο μπορεί να οδηγήσει στη αποτελεσματικότερη καταστροφή του γενετικού του υλικού. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ραδιοεπισημασμένοι ανταγωνιστές σωματοστατίνης παρότι δεν εσωτερικεύονται έχουν υψηλότερη ικανότητα *in vivo* στόχευσης υποδοχέων σωματοστατίνης σε όγκους και αυτό αποδίδεται στο ότι προσδένονται σε περισσότερες θέσεις δέσμευσης [233].
- Στο πεδίο των GRP-Rs έχει πρόσφατα δειχθεί ότι το πεπτιδίο ανταγωνιστής [^{99m}Tc]Demobesin 1 προσλαμβάνεται σε υψηλό ποσοστό σε πειραματικούς όγκους PC-3 σε σχέση με τους αντίστοιχους αγωνιστές. Ωστόσο ο μηχανισμός για το φαινόμενο της υψηλότερης ικανότητας *in vivo* στόχευσης των GRP-Rs λόγω της δέσμευσης σε περισσότερες θέσεις δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί.

- Όπως έχει αναφερθεί όλα τα πεπτίδια αγωνιστές ενεργοποιούν τον υποδοχέα με αποτέλεσμα μια σειρά απο φαρμακολογικές δράσεις, διότι οδηγούν στη μεταγωγή μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου. Ενώ στη σωματοστατίνη η δράση αυτή είναι κατασταλτική και δεν δημιουργεί δυσάρεστα συμπτώματα, σε πολλά άλλα πεπτίδια παρατηρούνται πολύ δυσάρεστα έως επικίνδυνα συμπτώματα για τον ασθενή. Πιο συγκεκριμένα για τη μπομπεσίνη αναφέρονται τα εξής: διέγερση της έκκρισης των γαστρικών υγρών [234], παγκρεατική - χολική διέγερση [235], επίδραση στο νεφρικό σύστημα [236], επίδραση στη κινητικότητα του εντέρου [237], υπεργλυκαιμία [238], αίσθηση κορεσμού [239], απελευθέρωση εντερικών πεπτιδίων τα οποία αυξάνουν στη συνέχεια τις συγκεντρώσεις στο πλάσμα της γλυκαγόνης, της ινσουλίνης και των πολυπεπτιδίων του παγκρέατος [240]. Επειδή λοιπόν αυτά τα πεπτίδια ακόμα και σε πολύ μικρές ποσότητες έχουν τέτοια δράση είναι προβληματική η χορήγησή τους στον άνθρωπο.
- Τα πεπτίδια-ανταγωνιστές δεν ενεργοποιούν τους υποδοχείς, οπότε δεν αναμένεται να συνεισφέρουν στη καρκινογένεση, στον πολλαπλασιασμό και στη πρόοδο της νόσου μετά από μακροχρόνια χορήγηση. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ανταγωνιστές του υποδοχέα του GRP αναστέλλουν την ανάπτυξη πειραματικών προτύπων καρκίνου του προστάτη *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες αλλά και *in vivo* σε καρκινικά ετερομοσχέυματα σε πειραματόζωα [241].
- Σε πεπτίδια ανταγωνιστές επίσης έχει παρατηρηθεί ταχεία απομάκρυνση της ραδιενέργειας από τους φυσιολογικούς ιστούς (υπόστρωμα) σε αντίθεση με τον όγκο, με αποτέλεσμα υψηλούς λόγους όγκου/υποστρώματος και ευκρινή απεικόνιση των καρκινικών εστιών. Ο μηχανισμός ωστόσο για το φαινόμενο αυτό δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Ο στόχος της εργασίας ήταν η εκμετάλλευση των ευνοϊκών αυτών χαρακτηριστικών για την ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων ανταγωνιστών μπομπεσίνης με επιθυμητή βιολογική απόκριση και κυρίως βιοασφάλεια και αποτελεσματικότητα στη στόχευση των GRP-Rs⁺.

Σχεδιάστηκε και συντέθηκε σειρά ραδιοπεπτιδίων χρησιμοποιώντας σαν ένωση-οδηγό τον ανταγωνιστή μπομπεσίνης [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13). Στην ίδια ένωση-οδηγό είχε στηριχθεί και η σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 1 (Σχήμα 1).

Χρησιμοποιήθηκε άκυκλη τετραμίνη για τη δέσμευση του ^{99m}Tc , καθώς παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως:

- Η σύμπλεξη του ^{99m}Tc πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες.
- Κατά την επισήμανση το ραδιοπεπτίδιο παραλαμβάνεται σε υψηλή ειδική ραδιενέργεια ($>1 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) η οποία είναι ικανοποιητική για εφαρμογή στην *in vivo* στόχευση συστημάτων υψηλής συγγένειας - χαμηλής χωρητικότητας (π.χ. GRP- Rs).
- Υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα των σχηματιζομένων ραδιοπεπτιδίων καθώς η ενσωμάτωση του ^{99m}Tc από τις άκυκλες τετραμίνες είναι σχεδόν ποσοτική οπότε δεν απαιτείται απομόνωση των επισημασμένων συμπλόκων με HPLC μετά την επισήμανση.
- Υψηλή υδροφιλικότητα καθώς τα σύμπλοκα $[\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O}_2)(\text{N}_4)]^+$ είναι υδρόφιλα λόγω του θετικού φορτίου τους και των δύο ατόμων οξυγόνου του πυρήνα $\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}_2^+$. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα ραδιοπεπτίδια να απομακρύνονται γρήγορα από τους παρακείμενους ιστούς κυρίως διαμέσου των νεφρών και του ουροποιητικού συστήματος και όχι διαμέσου του ηπατοχολικού συστήματος. Η ηπατοχολική απέκκριση είναι ανεπιθύμητη γιατί δυσκολεύει την ανίχνευση πρωτογενών όγκων ή/και μεταστάσεων στην κοιλιακή χώρα.
- Κινητική σταθερότητα καθώς το Tc σχηματίζει εξαϋποκατεστήμενα σύμπλοκα με τετραμίνες με αποτέλεσμα οι θέσεις συναρμογής του μετάλλου να είναι όλες κατειλημμένες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα σύμπλοκα που σχηματίζονται να έχουν υψηλή σταθερότητα στο βιολογικό περιβάλλον καθώς είναι κινητικά αδρανή σε αντιδράσεις αντικατάστασης από ανταγωνιστικούς υποκαταστάτες του βιολογικού υποστρώματος (π.χ. ενδογενείς θειόλες).

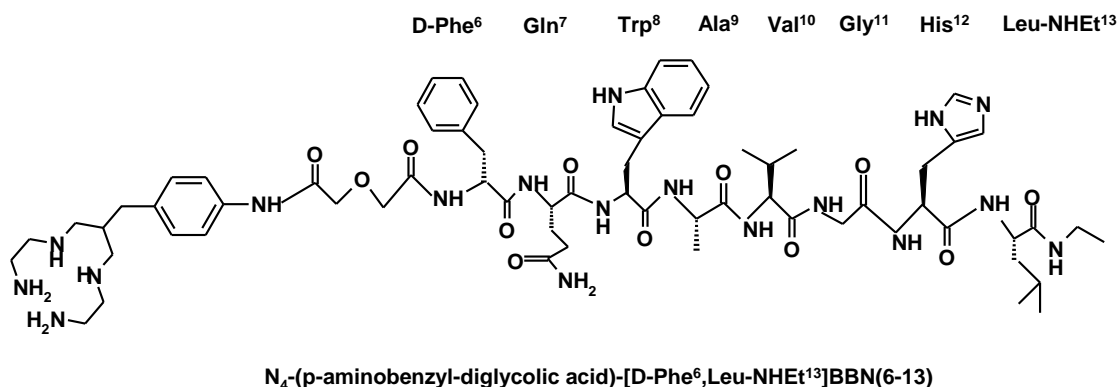
Οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στον ανταγωνιστή μπομπεσίνης $[\text{D-Phe}^6, \text{Leu-NHEt}^{13}]\text{BBN}(6-13)$ ήταν οι εξής:

α) Στο N-τελικό άκρο αλλάζοντας τη θέση του διλειτουργικού χημικού υποκαταστάτη με την εισαγωγή ή όχι διαφορετικών συνδετικών μορίων (ανάλογα Demobesin 2, Demobesin 7, Demobesin 8):

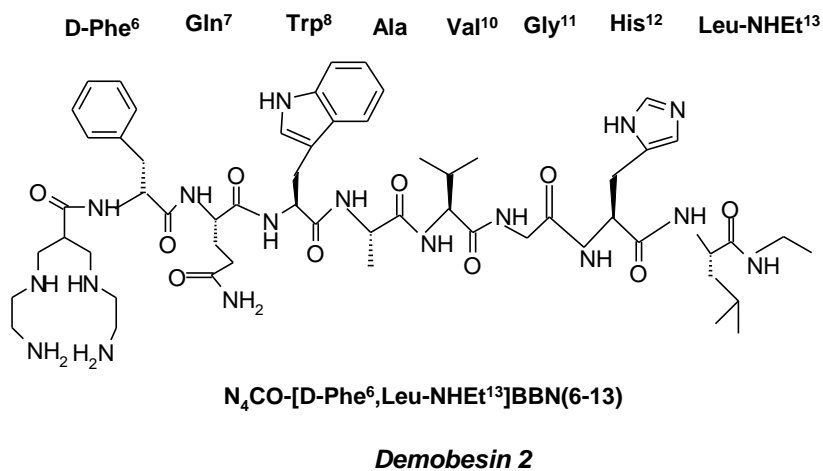
- Στο Demobesin 2 (Σχήμα 2), ο χημικός υποκαταστάτης, συνδέθηκε απευθείας στο πεπτίδιο.
- Στο Demobesin 7 (Σχήμα 3) χρησιμοποιήθηκε ως συνδετικό μόριο το PEG_2 με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της θέσης του διλειτουργικού χημικού υποκαταστάτη τύπου άκυκλης τετραμίνης N_4 , σε σχέση με το τμήμα

αναγνώρισης του υποδοχέα, στη συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R αλλά και στις βιολογικές ιδιότητες του επισημασμένου πεπτιδίου.

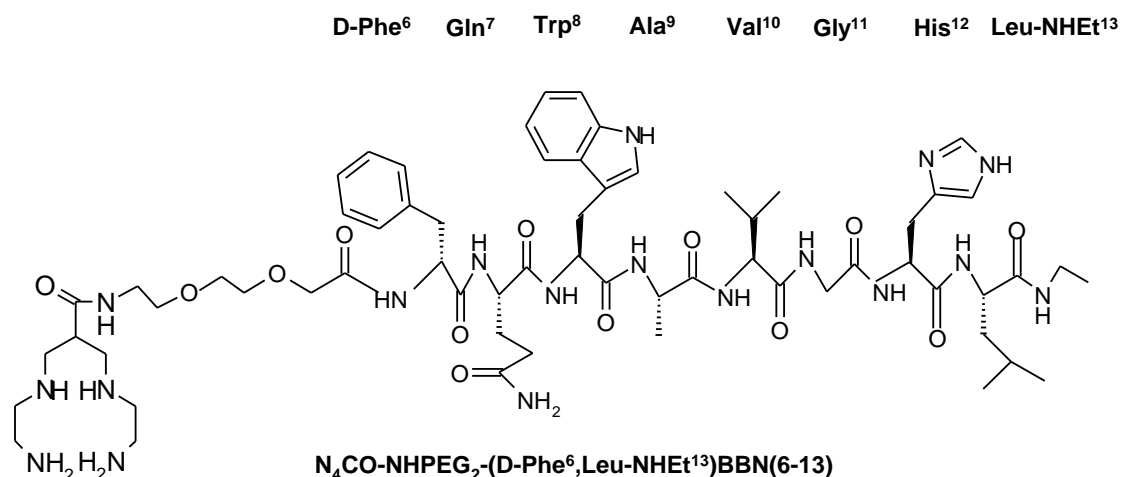
- Το Demobesin 8 (Σχήμα 4) συντέθηκε ώστε να προσομοιάζει στη δομή με το Demobesin 1, το οποίο πειραματικά είχε επιθυμητά αποτελέσματα αλλά ενσωματώνει διλειτουργικό N₄-παράγωγο που μπορεί να συντεθεί σε λιγότερα στάδια και με μεγαλύτερη ευκολία.



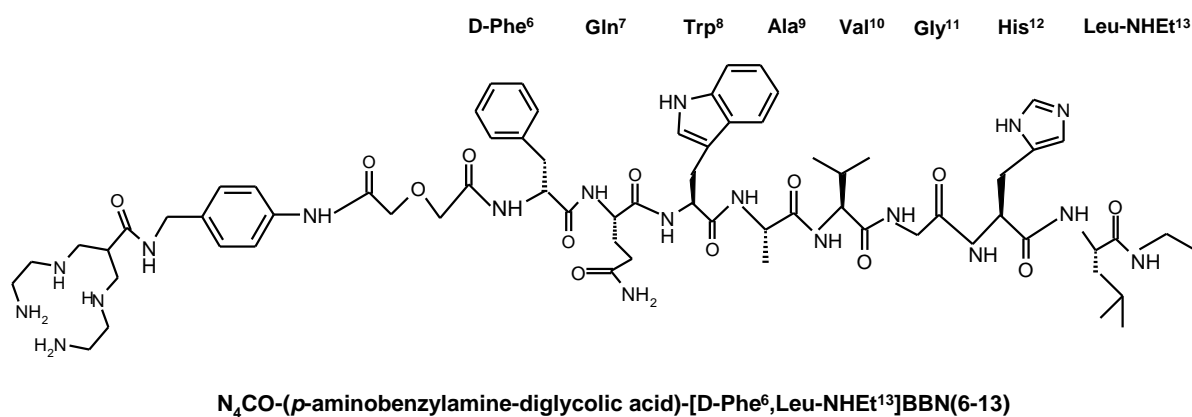
Σχήμα 6.1.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 1



Σχήμα 6.2.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 2

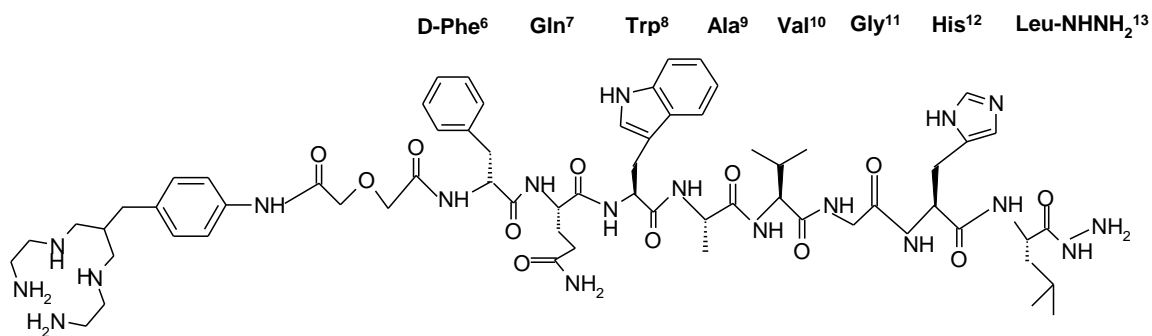


Σχήμα 6.3.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 7



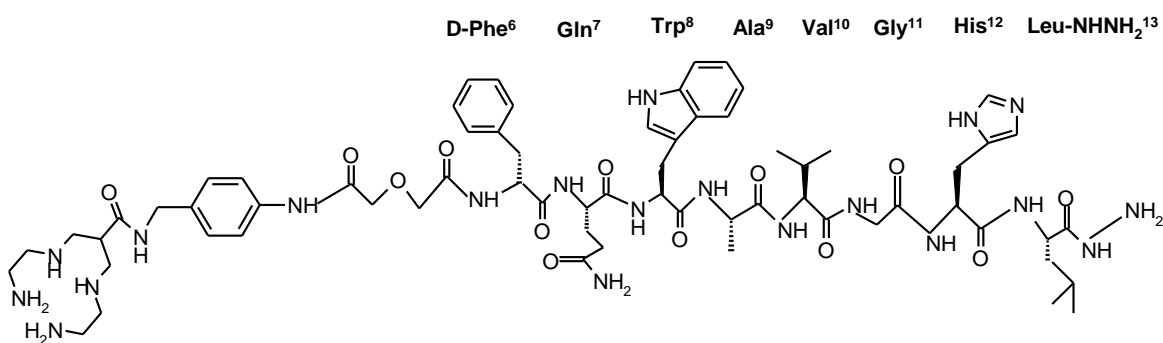
Σχήμα 6.4.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου Demobesin 8

β) Στο C-τελικό άκρο. Τα ανάλογα Demobesin 9 (σχήμα 5) και Demobesin 10 (σχήμα 6) αποτελούν τα αντίστοιχα υδραζίδια των Demobesin 1 και Demobesin 8 (σχήμα 5) και φέρουν στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου πυρηνόφιλη ομάδα (π.χ. Leu-NHNH₂¹³ αντί Leu-NHEt¹³). Η αύξηση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της ομάδας στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης στον GRP-R [242,243].



N₄-(p-aminobenzyl-diglycolic acid)-[D-Phe⁶,Leu-NHNH₂¹³]BBN(6-13)

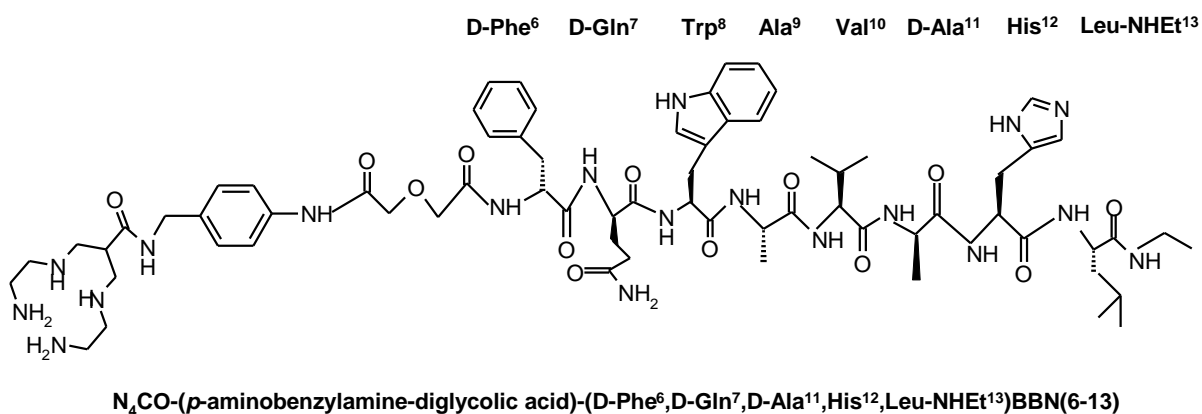
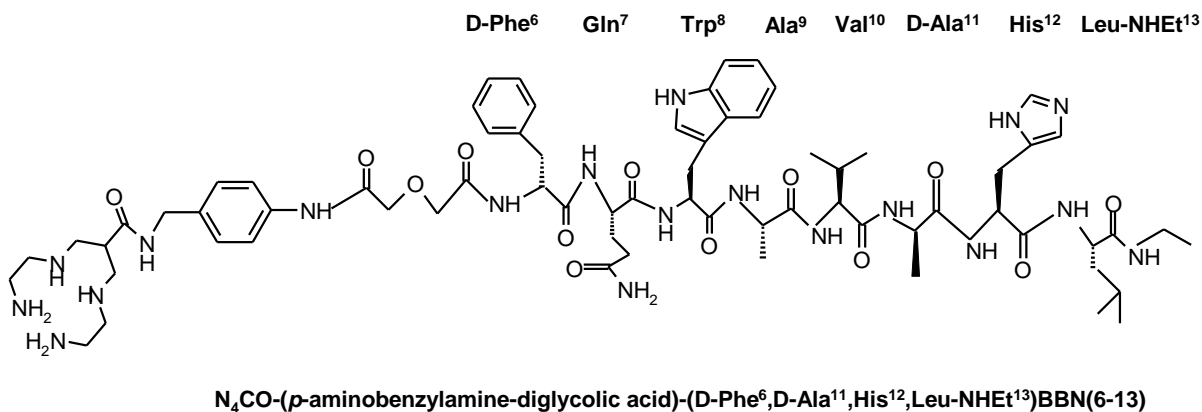
Σχήμα 6.5.: Δομή του πεπτιδικού αναλόγου *Demobesin 9*



N₄CO-(p-aminobenzyl-diglycolic acid)-[D-Phe⁶,Leu-NHNH₂¹³]BBN(6-13)

Σχήμα 6.6.: Δομή του πεπτιδικών αναλόγου *Demobesin 10*

γ) Στο πεπτιδικό τμήμα. Οι αλλαγές περιελάμβαναν για το *Demobesin 11* αντικατάσταση της Gly¹¹ από D-Ala¹¹ ενώ για το *Demobesin 12* επιπλέον αντικατάσταση της Gln⁷ με DGln⁷ (σχήμα 7). Οι τροποποιήσεις αυτές είχαν σαν σκοπό να αυξήσουν σταδιακά τη μεταβολική σταθερότητα των αναλόγων [244].



Σχήμα 6.7.: Δομή των πεπτιδικών αναλόγων Demobesin 11 (πάνω), Demobesin 12 (κάτω)

Ο επιτυχής σχεδιασμός των ραδιοεπισημασμένων αναλόγων και η αξιολόγησή τους ως προς την δυνατότητα απεικόνισης GRP-Rs θετικών όγκων πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών σταδίων που περιλάμβαναν *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Ο τελικός στόχος ήταν να αξιολογηθούν ποιες από τις παραπάνω τροποποιήσεις οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα ως προς την ικανότητα στόχευσης GRP-R⁺ όγκων. Πιο συγκεκριμένα έγιναν τα εξής:

- α) *in vitro* αξιολόγηση η οποία περιέλαβε:
- Προσδιορισμό συγγένειας των πεπτιδίων για τον GRP-R με μελέτες ανταγωνιστικής δέσμησης τους έναντι [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN σε μεμβράνες κυττάρων PC-3.
 - Προσδιορισμό της συγγένειας του επισημασμένου πεπτιδίου [^{99m}Tc]Demobesin 8 για τον GRP-R με πειράματα δέσμησης κορεσμού σε κύτταρα PC-3.
 - Μελέτες εσωτερίκευσης.

- Μελέτες μεταβολικής σταθερότητας. Μελετήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O})_2(\text{N}_4)]^+$ στο βιολογικό περιβάλλον αλλά και η σταθερότητα της πεπτιδικής αλυσίδας έναντι της δράσης των πεπτιδασών σε πλάσμα και σε ομογενοποίημα νεφρών ποντικίου.
- Λειτουργικές μελέτες για το χαρακτηρισμό ενός πεπτιδίου ως ανταγωνιστή ή αγωνιστή με μελέτη της επαγωγής της εσωτερίκευσης.
 - β) *in vivo* αξιολόγηση, με σκοπό τον προσδιορισμό του ποσοστού πρόσληψης των ραδιοπεπτιδίων στον όγκο σε σύγκριση με το ποσοστό στους φυσιολογικούς ιστούς, που περιελάμβανε:
 - Βιοκατανομή των επισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων σε υγιή πειραματόζωα. Σκοπός ήταν να μελετηθεί η φαρμακοκινητική δηλαδή η ικανότητα ταχείας κάθαρσης και μείωση της ραδιενέργειας υποστρώματος αλλά και η ικανότητα στόχευσης στα όργανα που εκφράζουν φυσιολογικά τον GRP-R σε υψηλή πυκνότητα, όπως είναι το πάγκρεας. Πειράματα *in vivo* αποκλεισμού των υποδοχέων με σκοπό να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματική εντόπιση της ραδιενέργειας στα όργανα στόχους, λόγω εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης με τον GRP-R.
 - Βιοκατανομή των επισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων σε πειραματόζωα με ανθρώπινα ετερομοσχεύματα καρκίνου του προστάτη PC-3 ώστε να μελετηθεί η ικανότητα πρόσληψης στον όγκο.
 - Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η σύγκριση του πεπτιδικού αναλόγου με την υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R με άλλα αντίστοιχα ανάλογα της βιβλιογραφίας ώστε να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα αυτά διεξοδικότερα.

7. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση, η *in vitro* και η *in vivo* αξιολόγηση πεπτιδικών αναλόγων μπομπεσίνης, επισημασμένων με ^{99m}Tc , για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση GRP-R - θετικών καρκίνων. Χρησιμοποιήθηκε ^{99m}Tc καθώς αποτελεί το πιο κατάλληλο διαγνωστικό ραδιονουκλίδιο της πυρηνικής ιατρικής λόγω των ιδανικών πυρηνικών ιδιοτήτων του.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής επιλέχθηκαν πεπτιδια-ανταγωνιστές αντί πεπτιδίων-αγωνιστών. Ο στόχος της εργασίας ήταν η εκμετάλλευση των ευνοϊκών χαρακτηριστικών της βιοασφάλειας και υψηλής συγγένειας για την ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων ανταγωνιστών μπομπεσίνης με επιθυμητή βιολογική απόκριση και κυρίως αποτελεσματικότητα στη στόχευση των GRP-R⁺ όγκων.

Στηριζόμενοι σε αυτό σχεδιάστηκε και συντέθηκε σειρά ραδιοπεπτιδίων χρησιμοποιώντας σαν ένωση-οδηγό τον ανταγωνιστή μπομπεσίνης [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13). Στην ίδια ένωση-οδηγό είχε στηριχθεί και η σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου [^{99m}Tc]Demobesin 1 με ελκυστικά βιολογικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιήθηκε άκυκλη τετραμίνη για τη δέσμευση του ^{99m}Tc καθώς παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα.

Οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στον ανταγωνιστή μπομπεσίνης [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13) ήταν οι εξής:

α) Στο N-τελικό άκρο αλλάζοντας τη θέση του διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη με την εισαγωγή ή όχι διαφορετικών συνδετικών μορίων (ανάλογα Demobesin 2, Demobesin 7, Demobesin 8):

- Στο Demobesin 2 ο χημικός υποκαταστάτης, συνδέθηκε απευθείας στο πεπτιδίο.
- Στο Demobesin 7 χρησιμοποιήθηκε ως συνδετικό μόριο το PEG₂ με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της θέσης του διλειτουργικού χημικού υποκαταστάτη τύπου άκυκλης τετραμίνης N₄, σε σχέση με το τμήμα αναγνώρισης του υποδοχέα, στη συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R αλλά και στις βιολογικές ιδιότητες του επισημασμένου πεπτιδίου.
- Στο Demobesin 8 συντέθηκε ώστε να προσομοιάζει στη δομή με το Demobesin 1, το οποίο πειραματικά είχε επιθυμητά αποτελέσματα αλλά να μπορεί να συντεθεί σε λιγότερα στάδια και με μεγαλύτερη ευκολία.

β) Στο C-τελικό άκρο. Τα ανάλογα Demobesin 9 και Demobesin 10 αποτελούν τα αντίστοιχα υδραζίδια των Demobesin 1 και Demobesin 8 και φέρουν στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου πυρηνόφιλη ομάδα (Leu-NHNH₂¹³ αντί Leu-NHEt¹³).

γ) Στο πεπτιδικό τμήμα. Οι αλλαγές περιελάμβαναν για το Demobesin 11 αντικατάσταση της Gly¹¹ από D-Ala¹¹ ενώ για το Demobesin 12 επιπλέον αντικατάσταση της Gln⁷ με DGln⁷. Οι τροποποιήσεις αυτές είχαν σαν σκοπό να αυξήσουν σταδιακά τη μεταβολική σταθερότητα των αναλόγων.

Ο επιτυχής σχεδιασμός των ραδιοεπισημασμένων αναλόγων και η αξιολόγησή τους ως προς την δυνατότητα απεικόνισης GRP-Rs θετικών όγκων πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών σταδίων που περιλάμβαναν *in vitro* και *in vivo* πειράματα με τελικό στόχο την αξιολόγηση των παραπάνω τροποποιήσεων και την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων ως προς την ικανότητα στόχευσης GRP-R⁺ όγκων.

Επίσης, σαν τελικός στόχος με μεγάλο ενδιαφέρον έχει η σύγκριση του πεπτιδικού αναλόγου με την υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R με άλλα αντίστοιχα ανάλογα της βιβλιογραφίας ώστε να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα αυτά διεξοδικότερα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. Σύνθεση σειράς αναλόγων Demobesin:

8.1. Αντιδραστήρια-Υλικά

Εξαφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτριαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλοουρίας	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU)	Fluka, Buchs, Switzerland
N-αιθυλοδιισοπροπυλαμίνη	N-ethyl-diisopropylamine, DIEA, Hunig's base	Fluka, Buchs, Switzerland
N-μεθυλοπυρρολιδίνη	N-methylpyrrolidone, NMP	Fluka, Buchs, Switzerland
Πιπεριδίνη	Piperidine	Fluka, Buchs, Switzerland
Τριφθοροοξικό οξύ	Trifluoroacetic acid, TFA	Fluka, Buchs, Switzerland
Θειοανισόλη	Thioanisol	Fluka, Buchs, Switzerland
Διμεθυλοφορμαμίδιο	Dimethylformamide, DMF	Fluka, Buchs, Switzerland
Φίλτρα Millex-GV 0.22 μm		Millipore, Milford, USA
Διαχωριστική μικροστήλη OASIS HLB (200 mg, 6 mL)		Waters, Vienna, Austria
Πλάκες αλουμινίου 0.2 mm, silica gel 60F ₂₅₄		Fluka, Buchs, Switzerland
0.2% (w/v) νινυδρίνη σε βουτανόλη		
[D-Phe ⁶ ,Leu-NHEt ¹³]BBN(6-13)		Bachem, Bubendorf Switzerland
N,N',N'',N'''-τετρα-(τερτ-βουτοξυκαρβονυλο)-6-(ρ-καρβοξυ)-1,4,8,11-τετρααζαενδεκάνιο		N,N',N'',N'''-tetra-(tert-butoxycarbonyl)-6-(p-carboxy)-1,4,8,11-tetraazaundecane (Boc) ₄ N ₄
2-[2-(Fmoc-αμινο)αιθοξυ]αιθοξυοξικό οξύ		2-[2-(Fmoc amino)ethoxy]ethoxyacetic acid (Fmoc-NH-PEG ₂ -COOH)
Demobesin 8: N ₄ CO-(p-aminobenzylamine-diglycolic acid)-[D-Phe ⁶ ,Leu-NHEt ¹³]BBN(6-13)		Pi-Chem, Gratz, Austria
Demobesin 9: N ₄ -(p-aminobenzyl-diglycolic acid)-[D-Phe ⁶ ,Leu-NHNH ₂ ¹³]BBN(6-13)		Pi-Chem, Gratz, Austria
Demobesin 10: N ₄ CO-(p-aminobenzylamine-diglycolic acid)-[D-Phe ⁶ ,Leu-NHNH ₂ ¹³]BBN(6-13)		Pi-Chem, Gratz, Austria
Demobesin 11: N ₄ CO-(p-aminobenzylamine-diglycolic acid)-[D-Phe ⁶ ,D-Ala ¹¹ ,Leu-NHEt ¹³]BBN(6-13)		Pi-Chem, Gratz, Austria
Demobesin 12: N ₄ CO-(p-aminobenzylamine-diglycolic acid)-[D-Phe ⁶ ,D-Gln ⁷ ,D-Ala ¹¹ ,Leu-NHEt ¹³]BBN(6-13)		Pi-Chem, Gratz, Austria

Η σειρά πεπτιδικών αναλόγων Demobesin 8-12 συντέθηκε σύμφωνα με την στρατηγική σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες ήταν αναλυτικής καθαρότητας και δεν υπέστησαν περαιτέρω κατεργασία. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση HPLC ήταν καθαρότητας HPLC, διηθήθηκαν από φίλτρο Millipore διαμέτρου πόρων 0.22 μm και απαερώθηκαν με ρεύμα He.

8.2. Όργανα-Συσκευές

Χρωματογράφος Waters με σύστημα ανάμιξης διαλυτών Waters 600 συνδεδεμένο με ανιχνευτή UV-Vis διάταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector) Waters 996 και αναλυτικές στήλες ανάστροφης φάσης:

- Symmetry Shield (RP-18, 5 μm, 3.9 mm × 150 mm)
- XTerra (RP-8, 5 μm, 4.6 mm × 20 mm)
- XTerra (RP-18, 5 μm, 3.9 mm × 20 mm)
- Ημιπαρασκευαστική στήλη Waters Spherisorb SAX column (10 μm, 4 × 250 mm)

Αντλία RV3 Rotary Vane Pump

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis Phoenix-2000 V

Περιστροφικός συμπυκνωτής κενού Rotavapor R-114

Έλεγχος του χρωματογράφου, συλλογή και επεξεργασία δεδομένων με λογισμικό Millennium Software

Φασματογράφος μάζας ηλεκτροψεκασμού (ES-MS) AQA Navigator

Waters, Vienna, Austria

*Edwards High Vacuum International
West, Sussex, UK*

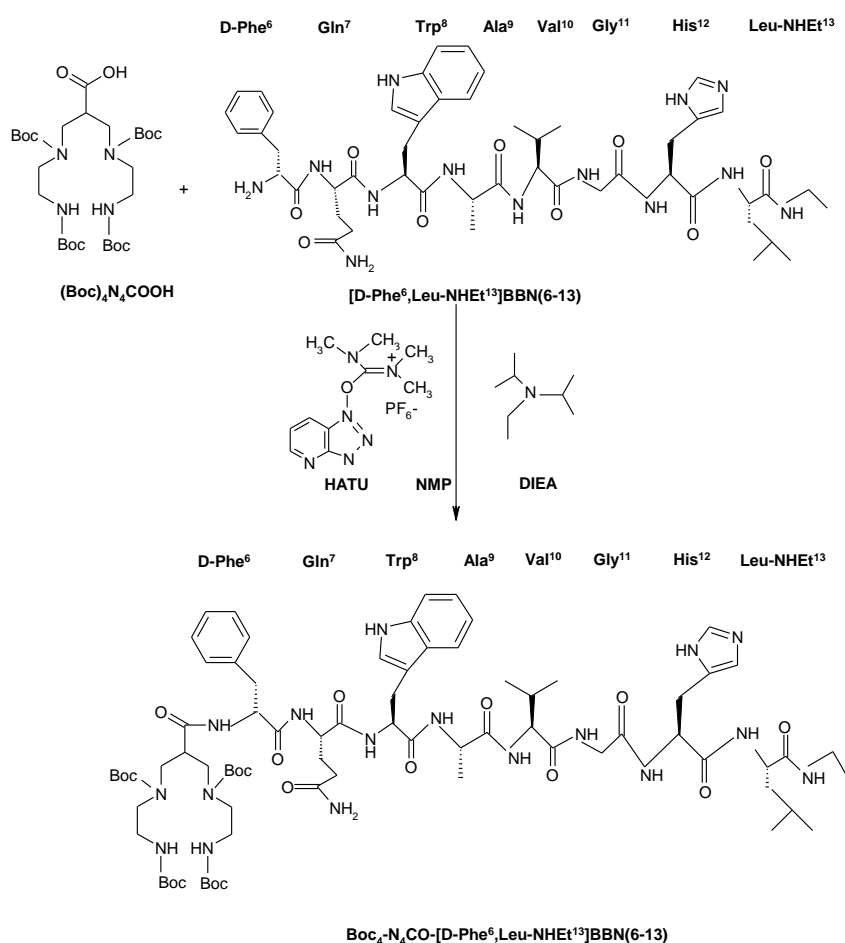
*Biotech Engineering Management
Co., Ltd., UK*

*Buchi, Postfach, Switzerland
Waters, Vienna, Austria*

Finnigan, San Jose/CA, USA

8.3 Σύζευξη

8.3.1. Demobesin 2



Η σύζευξη του $\text{Boc}_4\text{-N}_4$ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ουρονικών παραγώγων, και ειδικότερα χρησιμοποιώντας HATU. Πιο συγκεκριμένα, 7.2 μmol (4.4 mg) Boc -προστατευμένου τετραμινικού υποκαταστάτη ($\text{Boc}_4\text{-N}_4$), διαλύθηκαν σε 500 μL CH_2Cl_2 . Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος αντιδραστήριου σύζευξης 15.5 μmol (3.1 mg) HATU σε DMF και προσθήκη 16 μmol (2.74 μL) DIEA. Η αντίδραση ενεργοποίησης διήρκεσε 3 min, οπότε το μίγμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 3.75 μmol (3.7 mg) $[\text{D-Phe}^6, \text{Leu-NHEt}^{13}]\text{BBN}(6-13)$ και προστέθηκαν 400 μL DMF. Η αντίδραση σύζευξης ολοκληρώθηκε σε 20 min υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ο σχηματισμός του $(\text{Boc})_4\text{N}_4$ -τροποποιημένου πεπτιδίου καθώς και η απουσία ελεύθερου πεπτιδίου επιβεβαιώθηκαν με TLC. Συγκεκριμένα η πλάκα εμφανίστηκε σε UV και ακολούθως ψεκάστηκε με διάλυμα νινυδρίνης και θερμάνθηκε στους $\sim 110^\circ\text{C}$. Δεν εμφανίστηκε έγχρωμη κηλίδα, όπως θα συνέβαινε κατά την παρουσία ασύζευκτης N-τελικής αμινομάδας.

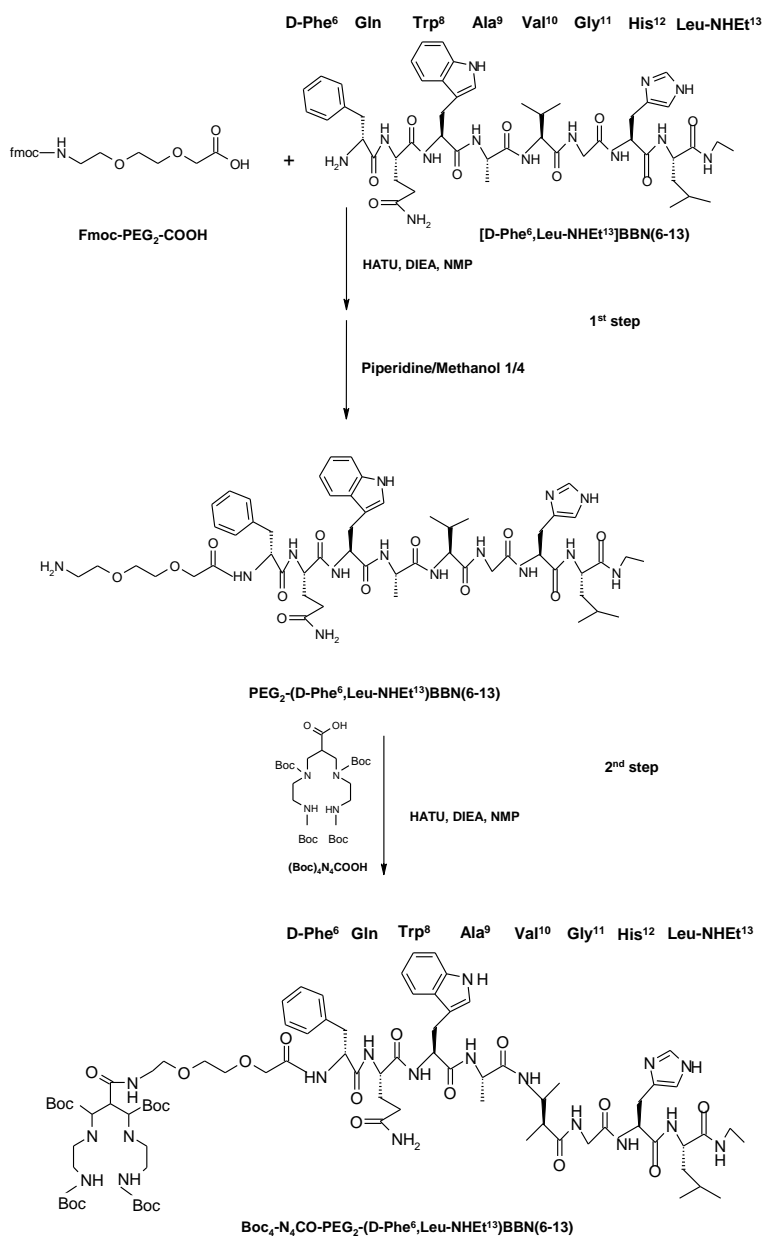
TLC (after 20 min at RT) SiO₂:

Eluent system: CHCl₃/MeOH/conc. NH₃=100:10:1

R_f Boc-N₄CO-[D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13): 0.3 (UV-detection)

Το μίγμα της αντίδρασης σύζευξης, μετά την πάροδο 75 min, αναμείχθηκε με 30 mL AcOEt και ακολούθησε έκπλυση της οργανικής φάσης με H₂O (2 φορές). Η οργανική φάση συλλέχθηκε, απομακρύνθηκε ο διαλύτης και έγινε αζεοτροπική εκχύλιση με EtOH στον περιστροφικό συμπυκνωτή κενού. Το υπόλειμμα με το ακατέργαστο πεπτιδίο παρέμεινε στους -30°C σε ατμόσφαιρα N₂ έως το επόμενο βήμα.

8.3.2. Demobesin 7



Σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιείχε 15.3 μmol (5.9 mg) Fmoc-NH-PEG₂-COOH, προστέθηκαν 27.89 μmol (10.6 mg) αντιδραστηρίου σύζευξης HATU διαλυτοποιημένο σε 200 μL NMP. Ακολούθησε προσθήκη 23.1 μmol (2.9 mg σε 4 μL) DIEA και το μίγμα μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 3.2 μmol (5 mg) του πεπτιδίου [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13). Το μίγμα εκπλύθηκε (4 × 100 μL NMP), επωάστηκε για 30 min και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιείχε 10 mL CH₂Cl₂ και 10 mL H₂O. Προστέθηκε 1 M NaHCO₃ (1 mL), ώστε το pH από όξινο (pH 4) να γίνει ασθενώς βασικό (pH 8-9). Το προϊόν της αντίδρασης εκχυλίστηκε από το μίγμα αντίδρασης σε CH₂Cl₂ (οργανική φάση) όπως έδειξε η ανάλυση HPLC. Αντίθετα, η N-μεθυλοपुरολιδίνη και το HATU παρέμειναν στην υδατική φάση. Η οργανική φάση συμπυκνώθηκε στον περιστροφικό συμπυκνωτή κενού και το διάλυμα αποθηκεύτηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό στους -20°C.

HPLC (Σύστημα 4)

t_R Fmoc-Demobesin 7: 11.3 min

Ακολούθησε η Fmoc-αποπροστασία. Πιο συγκεκριμένα σε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν στο Fmoc-προστατευμένο πεπτίδιο, 4.5 mL MeOH και 1.4 mL πιπεριδίνης. Το μίγμα επωάστηκε για 30 min και συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού στους 40°C μέχρι όγκου 2-3 mL. Κατόπιν μεταφέρθηκε σε διαχωριστική μικροστήλη OASIS HLB που περιείχε 2 mL 0.1% TFA. Ακολούθησε έκπλυση με 15 mL 0.1% TFA και έκλουση του Fmoc-αποπροστατευμένου πεπτιδίου με μίγμα 90% MeCN/10% TFA(0.1%). Το διάλυμα συμπυκνώθηκε με παροχή ήπιου ρεύματος N₂ στους 60⁰-70⁰C μέχρι τελικού όγκου 1 mL. Αναλύθηκε με HPLC και κατόπιν απομακρύνθηκε ο διαλύτης μέχρις 1 mL με παροχή ήπιου ρεύματος N₂ στους 60°C. Το υπόλειμμα υπέστη περαιτέρω ξήρανση υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h.

HPLC (Σύστημα 4)

t_R Fmoc-deprotected Demobesin 7: 7.7 min

Η σύζευξη του Boc₄-N₄ πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί στην 8.3.1. Πιο συγκεκριμένα, 12 μmol (4.6 mg) αντιδραστηρίου σύζευξης HATU διαλύθηκαν σε

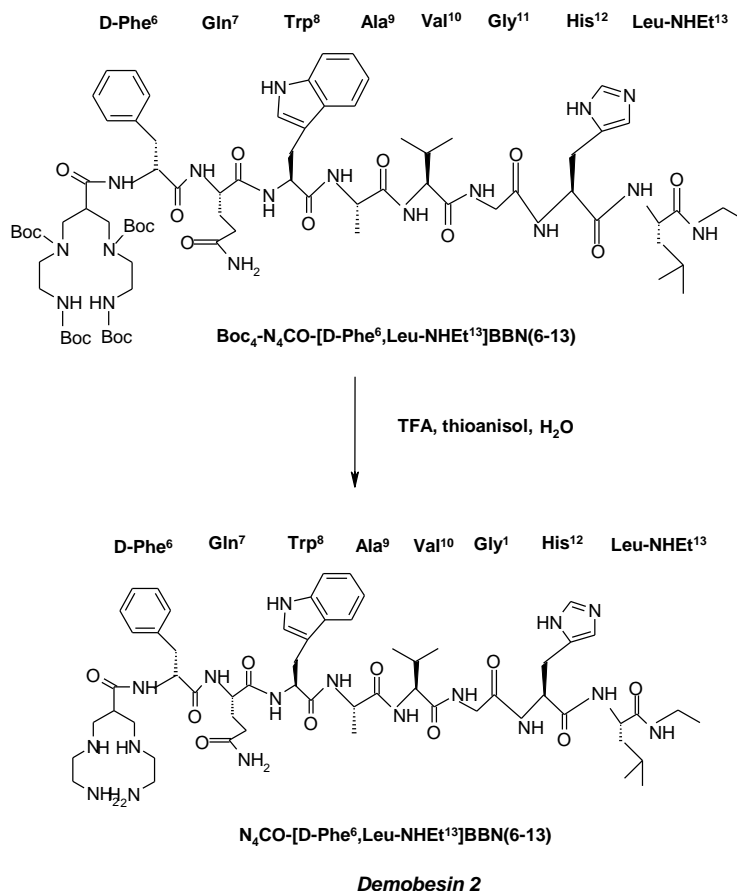
200 μL NMP και προστέθηκαν σε 7.2 μmol (6.6 mg) Boc₄-N₄. Ακολούθησε προσθήκη DIEA 23.1 μmol (2.99 mg, 3.95 μL) επώαση για 2 min, προσθήκη στο υπόλειμμα που περιείχε το αποπροστατευμένο πεπτιδίο και έκπλυση με 400 μL N-μεθυλοπυρολιδίνη, ώστε ο τελικός όγκος του μίγματος αντίδρασης να είναι 600 μL . Η αντίδραση σύζευξης ολοκληρώθηκε σε 20 min υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και ο σχηματισμός του (Boc)₄N₄-τροποποιημένου πεπτιδίου καθώς και η απουσία ελεύθερου πεπτιδίου επιβεβαιώθηκαν με TLC και HPLC ανάλυση. Συγκεκριμένα η πλάκα εμφανίστηκε σε UV και ακολούθως ψεκάστηκε με διάλυμα νινυδρίνης και θερμάνθηκε στους ~110⁰C, οπότε δεν εμφανίστηκε έγχρωμη κηλίδα επιβεβαιώνοντας την απουσία πρωτοταγούς αμίνης (N-τελικής αμινομάδας). Ακολούθησε καθαρισμός του μίγματος σε διαχωριστική μικροστήλη OASIS, συμπύκνωση μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂ και αποθήκευση του Boc₄-N₄-NHPEG₂-[D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13) στους -20⁰C.

HPLC (Σύστημα 4)

t_R Boc-Demobesin 7: 12.0 min

8.4. Αποπροστασία

8.4.1. Demobesin 2



Το πεπτιδίο Boc₄-N₄-(D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³)BBN(6-13) διαλυτοποιήθηκε σε 5 mL CHCl₃/MeOH, μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο και συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού με την παροχή ρεύματος N₂ στους 50⁰C. Ακολούθησε προσθήκη μίγματος TFA, θειοανισόλης, H₂O (HPLC grade) (500 μL, 91/5/4 v/v/v) υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων ολοκληρώθηκε σε 30 min και κατόπιν προστέθηκε ψυχρό διάλυμα 12 mL NaOH 0.5 M. Το μίγμα αραιώθηκε με 10 mL H₂O και έγινε εκχύλιση τρεις φορές με CHCl₃. Η υδατική φάση συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε στον περιστροφικό συμπυκνωτή έως 2 mL υπό κενό στους 65⁰C. Το διαυγές διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική μικροστήλη Oasis HLB (200 mg, 6 mL), έγινε έκπλυση με H₂O, έκλουση του Boc-αποπροστατευμένου πεπτιδίου με σταδιακή έκλουση από 80/20 MeOH/H₂O που περιέχει 0.1% TFA, δείγμα του αναλύθηκε με HPLC. Ακολούθησε συμπύκνωση και καθαρισμός με την χρησιμοποίηση ημιπαρασκευαστικής HPLC στήλης Spherisorb (10 μm 4 mm × 250 mm). Απομακρύνθηκε ο διαλύτης υπό κενό και το Demobesin 2

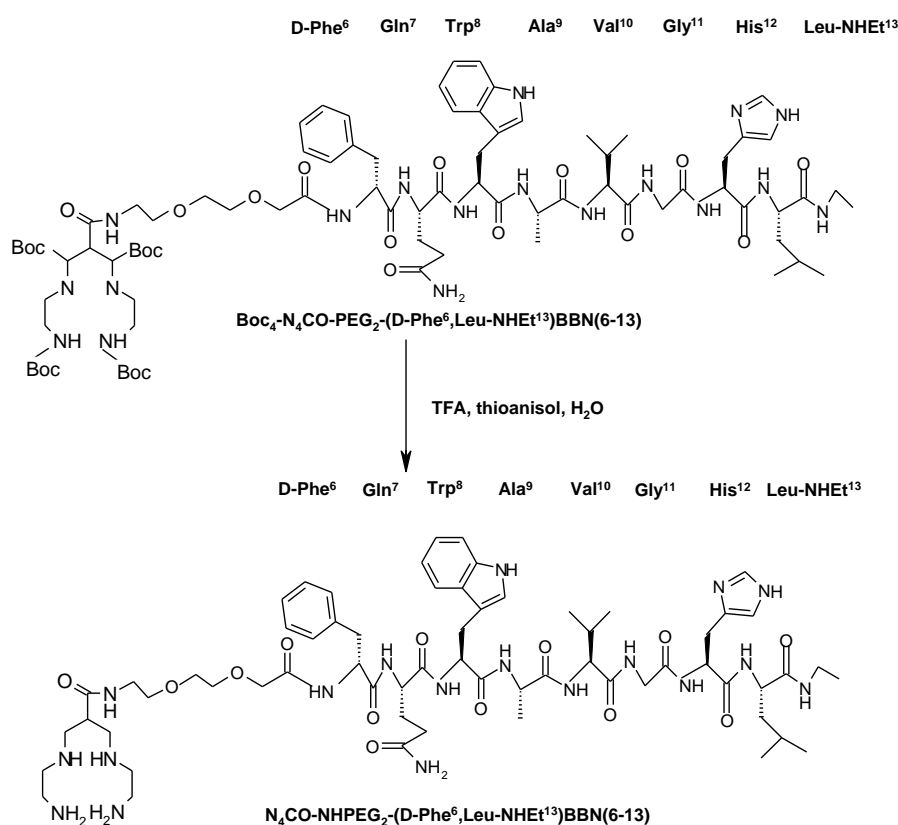
λυοφιλοποιήθηκε. Τέλος αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

Απόδοση= 55%

HPLC (Σύστημα 1)

t_{R} Demobesin 2: 13.0 min

8.4.2. Demobesin 7



Στο γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε το Boc₄-N₄-NHPEG₂-[D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]-BBN(6-13) προστέθηκε μίγμα TFA, θειοανισόλης, H₂O (HPLC grade) (500 μL , 91/5/4 v/v/v) υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα επωάστηκε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε προσθήκη 12 mL ψυχρού διαλύματος 0.5 M NaOH. Η θειοανισόλη απομακρύνθηκε με εκχύλιση σε CH₂Cl₂, ακολούθησε προσθήκη 15 mL EtOH και συμπύκνωση της υδατικής φάσης υπό κενό στους 65^oC. Το διαυγές διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική μικροστήλη OASIS HLB (200 mg, 6 mL), έγινε έκπλυση με H₂O και έκλουση του Boc-αποπροστατευμένου πεπτιδίου με σταδιακή έκλουση από 80/20 MeOH/H₂O που περιέχει 0.1% TFA. Απομακρύνθηκε ο

διαλύτης υπό κενό, το πεπτίδιο λυοφιλοποιήθηκε και η καθαρότητά του ελέγχθηκε με αναλυτική HPLC. Τέλος, αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίησή του.

Απόδοση= 65%

HPLC (Σύστημα 9)

t_R Demobesin 7: 33.4 min

ES-MS

m/z, Demobesin 7=1.315,9 ($M+H^+$, 20), 658,7 ($(M+2H^+)/2$, 100)

9. Επισήμανση - Ραδιοχημικός Έλεγχος

9.1. Αντιδραστήρια-Υλικά

[Tyr ⁴]BBN, H-Glu-Gln-Arg-Tyr- Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly- His-Leu-Met-NH ₂ Na ^{99m} TcO ₄		<i>Bachem, Bubendorf, Switzerland</i>
		<i>Γεννήτρια ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, Cis International, Larmor Baden, France</i>
Chloramine-T trihydrate	Χλωραμίνη-T	<i>Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland</i>
⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc Generator System	Γεννήτρια ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc	<i>Cis International, Larmor Baden, France</i>
[^{99g} Tc]NH ₄ TcO ₄		<i>Oak Ridge National Laboratories, Oak Ridge, USA</i>
		<i>MDS Nordion, Fleurus, Belgium</i>
[¹²⁵ I]Na		<i>Fluka, Buchs, Switzerland</i>
Dithiothreitol (DTT)		<i>Fluka, Buchs, Switzerland</i>
Methionine	Μεθειονίνη	<i>Fluka, Buchs, Switzerland</i>
BSA Fraction V	Αλβουμίνη εμβρύου βοός BSA	<i>Applichem, Darmstadt, Germany</i>
3 mm CHR χρωματογραφικό χαρτί		<i>Whatman International Ltd, Maidstone, UK</i>
Ταινίες ινών υάλου επιστρωμένες με silica gel ITLC-SG		<i>Pall Corporation, New York, USA</i>
Φίλτρο μεμβράνης Nylon 66, 0.45 μm		<i>Supelco, Bellefonte, USA</i>
Φίλτρο μεμβράνης Porafil, CA, 0.45 μm		<i>Macherey, Nagel, Duren, Germany</i>

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών: 0.5 M Na₂HPO₄/0.5 M Na₃PO₄ 2/1 (pH 11.5)

PBS pH~7.4 (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl)

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω κατεργασία.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση HPLC ήταν καθαρότητας HPLC, διηθήθηκαν από φίλτρο Millipore διαμέτρου πόρων 0.22 μm και απαερώθηκαν με ρεύμα He.

9.2. Όργανα

Αυτόματος μετρητής γ-ακτινοβολίας πολλαπλών δειγμάτων κρυστάλλου NaI(Tl) Auto-Gamma® 5000 Series

Canberra Packard, Manchester, UK

Αντλία RV3 Rotary Vane Pump

Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK

Χρωματογράφος Waters με σύστημα ανάμιξης διαλυτών Waters 600 συνδεδεμένο με

Waters, Vienna, Austria

i) Ανιχνευτή UV-Vis διάταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector) Waters PDA 996

Waters, Vienna, Austria

ii) Ραδιομετρικό ανιχνευτή Gabi

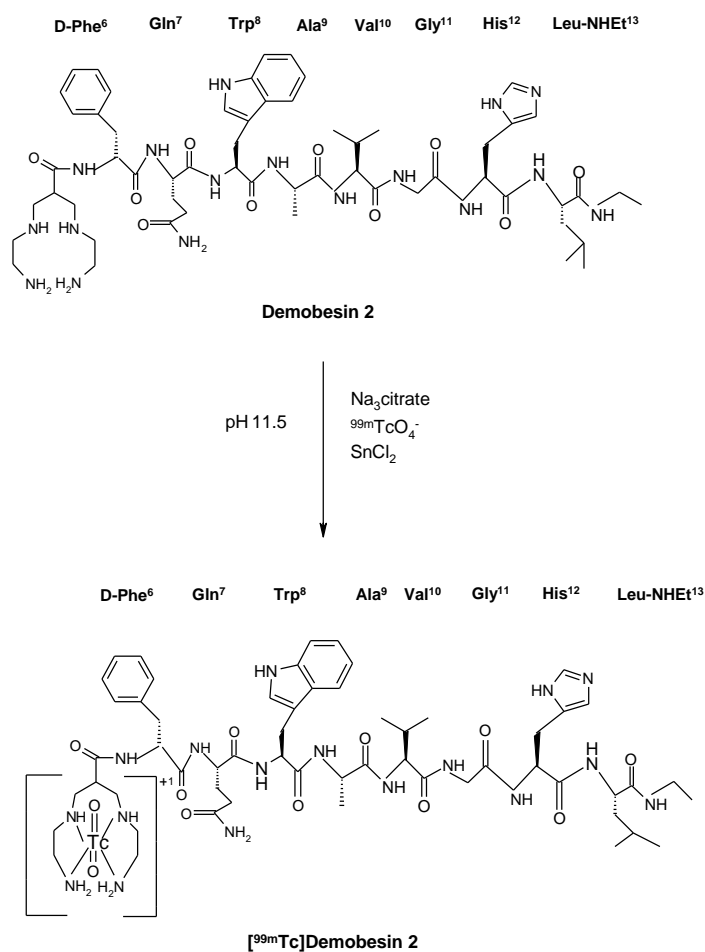
Raytest, RSM Analytische Instrumente, GmbH, Straubenhardt Germany)

και αναλυτικές στήλες ανάστροφης φάσης:

- Symmetry Shield (RP-18, 5 μm, 3.9 mm × 150 mm)
- Xridge Shield (RP-8, 5 μm, 4.6 mm × 20 mm)
- XTerra (RP-18, 5 μm, 3.9 mm × 20 mm)

Waters, Vienna, Austria

9.3. Επισήμανση με ^{99m}Tc



Κάθε λυοφιλοποιημένο πεπτιδικό ανάλογο διαλύθηκε σε 50 mM CH₃COOH/EtOH 8/2 v/v σε τελική συγκέντρωση 1 mM (διάλυμα I), διαμοιράστηκε σε κλάσματα των 50 µL σε φιαλίδια τύπου Eppendorf τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf προστέθηκαν 50 µL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 11.5) 0.5 M και 0.5 µmol (0.1 M, 5 µL) κιτρικό νάτριο. Ακολούθησε προσθήκη ^{99m}TcO₄⁻ από έκλυση γεννήτριας (415 µL, 370-470 MBq ή 10-20 mCi), 15 nmol διαλύματος (I) και φρέσκο διάλυμα SnCl₂ σε EtOH (30 µg, 15 µL). Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και το pH του ρυθμίστηκε στη τιμή 7 με την προσθήκη διαλύματος 10 µmol HCl (1M 10 µL).

9.4. Ραδιοχημική ανάλυση

Το μίγμα επισήμανσης αναλύθηκε με συνδυασμό RP-HPLC και ITLC μέχρι και 24 h μετά την επισήμανση. Η απόδοση της επισήμανσης μελετήθηκε με αναλυτική HPLC, με τα ραδιοπεπίδια να εκλούνται ως εξής:

RP-HPLC

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 2: 13.6 min (Σύστημα 6)

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 7: 6.8 min (Σύστημα 7)

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8: 13.9 (Σύστημα 6)

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 11: 14.9 min (Σύστημα 8)

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 12: 14.0 min (Σύστημα 8)

Στα επισημασμένα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin 9 και [^{99m}Tc]Demobesin 10 η ανάλυση HPLC έδειξε πλήθος παραπροϊόντων, οπότε κρίθηκαν ως μη κατάλληλα για περαιτέρω βιολογική αξιολόγηση.

Η ανίχνευση της παρουσίας ραδιοχημικών προσμίξεων, όπως κολλοειδούς τεχνητίου (^{99m}TcO₂·xH₂O) και υπερτεχνητικών ανιόντων (^{99m}TcO₄⁻) πραγματοποιήθηκε με ταχεία χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας Instant Thin Layer Chromatography (ITLC).

Ανίχνευση ^{99m}TcO₂·x H₂O:

Κλάσμα (<1 µL) του μίγματος επισήμανσης τοποθετήθηκε σε λωρίδα χαρτιού ή ITLC-SG και αναπτύχθηκε μέχρι απόσταση 10 cm από το αρχικό σημείο σε σύστημα διαλυτών 1 M CH₃COONH₄/MeOH 1/1 (v/v). Η λωρίδα χαρτιού ή ITLC-SG αφέθηκε να στεγνώσει και κόπηκε σε δύο τμήματα:

1^ο τμήμα = αρχικό σημείο + 1cm: $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

2^ο τμήμα = υπόλοιπο λωρίδας: $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{citrate}$ και $[^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin}$

Η ραδιενέργεια του κάθε τμήματος μετρήθηκε σε μετρητή-γ ακτινοβολίας.

$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ $R_f = 0$;

$[^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin}$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Κιτρικό}$ $R_f = 1$

Ανίχνευση $^{99m}\text{TcO}_4^-$:

Κλάσμα (< 1 μL) του επισημασμένου προϊόντος τοποθετήθηκε σε λωρίδα χαρτιού ή ITLC-SG ταινία. Η ταινία αναπτύχθηκε μέχρι απόσταση 10 cm από το αρχικό σημείο σε σύστημα ανάπτυξης ακετόνης. Η λωρίδα χαρτιού ή ITLC-SG αφέθηκε να στεγνώσει και κόπηκε σε δύο τμήματα:

1^ο τμήμα = αρχικό σημείο + 7 cm: $[^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin}$, $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

2^ο τμήμα = μέτωπο: $^{99m}\text{TcO}_4^-$

Η περιεχόμενη ραδιενέργεια μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.

$^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Κιτρικό}$ $R_f = 0$

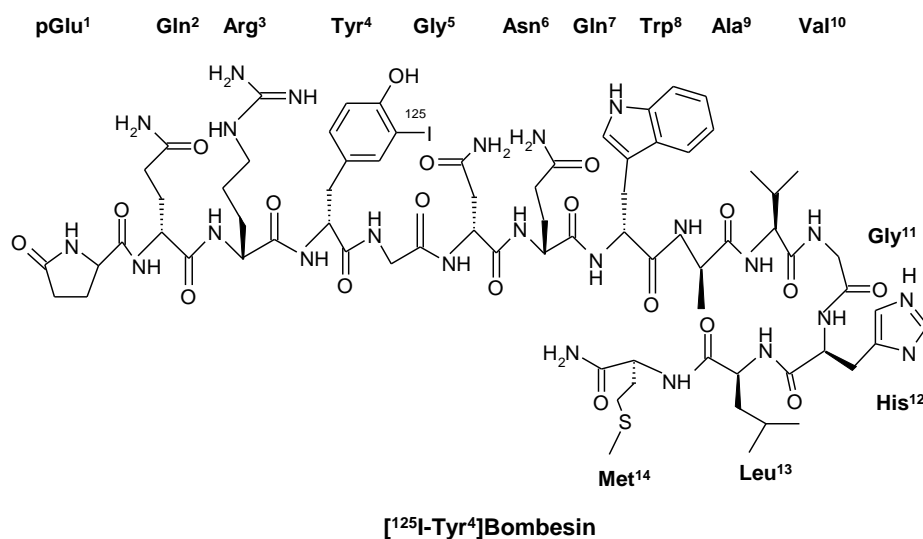
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ $R_f = 1$

9.5. Επισημάνση με ^{99m}Tc και προσθήκη φορέα ^{99g}Tc

Χρησιμοποιήθηκε $\text{NH}_4^{99g}\text{TcO}_4$ ως πηγή ^{99g}Tc . Αρχικά αναμίχθηκαν 400 mg $\text{NH}_4^{99g}\text{TcO}_4$, 40 mL απεσταγμένο H_2O και 40 mL MeOH και το ελαιώδες που προέκυψε θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο στους 50°C υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Ακολούθησε προσθήκη 2 mL διαλύματος H_2O_2 30%, 2 mL διαλύματος NH_3 , ανάδευση στους 50°C μέχρις ξηρού και παραλαβή του καθαρού $\text{NH}_4^{99g}\text{TcO}_4$.

Κατόπιν 50 μL (5 mCi) διαλύματος $^{99m}\text{TcO}_4^-$ αναμίχθηκαν με 0.1 M κιτρικό νάτριο (0.2 μmol, 2 μL), 0.5 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.1 μmol, 20 μL), διάλυμα 1 mM $\text{NH}_4^{99g}\text{TcO}_4$ (5 μL), 1 mM διαλύματος Demobesin (30 nmol, 30 μL), 5 μL φρέσκου διαλύματος SnCl_2 σε EtOH και το μίγμα αφέθηκε για επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα αναλύθηκε με HPLC και κατόπιν έγινε απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων $[^{99g/99m}\text{Tc}]\text{Demobesin}$.

9.6. Ραδιοϊώδισή



Σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf, προστέθηκαν 30 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.2 M, 6 nMol [Tyr⁴]BBN διαλύματος H₂O/1,2-προπανιοδιόλη (7/3 v/v), 0.1 nMol (10 μ L) διαλύματος [¹²⁵I]NaI σε φυσιολογικό ορό (~200 μ Ci), 3 μ L πρόσφατου υδατικού διαλύματος χλωραμίνης-T (1 μ g/ μ L) και αφέθηκε να αντιδράσει για 60-90 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 300 μ L 1.5 M διαλύματος DTT σε 0.2 M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, επώαση για 60 min στους 80°C και καθαρισμός με HPLC.

Το ραδιοϊώδιωμένο πεπτιδίδιο απομονώθηκε με αναλυτική HPLC ανάστροφης φάσης χρησιμοποιώντας το σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης: 0.1 % TFA σε H₂O/ MeCN (από 15% σε 45% σε 60 min) και ρυθμό ροής 1 mL/min. Το κλάσμα το οποίο περιείχε το ραδιοϊώδιωμένο πεπτιδίδιο συλλέχθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιείχε 3 μ mol (30 μ L 0.1 M) μεθειονίνης σε H₂O.

Για τα πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης, 500 μ L από το κλάσμα που περιείχε το ραδιοϊώδιωμένο πεπτιδίδιο αραιώθηκε με 3 mL PBS (pH 7.4, 0.5 % BSA), προστέθηκαν 3 μ mol (30 μ L 0.1 M) μεθειονίνης και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε σε κλάσματα των 200 μ L σε φιαλίδια τύπου Eppendorf στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση του.

RP-HPLC (Σύστημα 9)

t_R [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN : 23.5 min

t_R [Tyr⁴]BBN: 19.5 min

10. Βιολογική αξιολόγηση

10.1. Κυτταροκαλλιέργειες

10.1.1. Αντιδραστήρια

PC-3 Human Prostate Cancer Cells	PC-3 Κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη	<i>ATCC-LGC Promochem, Teddington, UK</i>
GRPR transfected HEK293	HEK-GRPR κύτταρα	
Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I		<i>Gibco, Grand Island, USA</i>
Fetal Bovine Serum (FBS)	Ορός εμβρύου βοός	<i>Gibco, Grand Island, USA</i>
Pen/Strep 10000 U/mL/10000 µg/mL	Πενικιλίνη 10000 U/mL / στρεπτομυκίνη 10000 µg/mL	<i>Biochrom AG, Berlin, Germany</i>
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02% w/v)	Θρυψίνη/EDTA 0.05 %/0.02 % (w/v)	<i>Biochrom AG, Berlin, Germany</i>
DMSO HYBRI-MAX (sterile filtered)		<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany</i>
L-glutamine	L-γλουταμίνη	<i>Biochrom AG, Berlin, Germany</i>
Tissue Culture Flask 75 cm ²	Φιάλες καλλιέργειας 75 cm ²	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany</i>
Cryogenic vials	Πλαστικά κρυογονικά φιαλίδια	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany</i>
Cell scraper	Ξύστρα για κύτταρα	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany</i>
G418 (geneticin sulphate)		<i>Gibco, Carlsbad, CA, USA</i>
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	Τρις(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο	<i>Merck, Darmstadt, Germany</i>
Ethylenediaminetetracetic acid disodium salt, EDTA	Δινάτριο άλας του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος	<i>Carlo Erba, Milan, Italy</i>
Bovine serum Albumin BSA	Αλβουμίνη εμβρύου βοός	<i>Sigma Diagnostics, St. Louis, USA</i>
Protein Assay Kit II	Χρωστική Coomassie Blue Plus	<i>Bradford Assay Reagent- Pierce, Rockford, USA</i>
<i>PBS pH~7.4 (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl)</i>		

10.1.2. Όργανα

Επωαστικός κλίβανος CO ₂	<i>Smart Cell- Heal Force, Hong Kong</i>
Εστία κάθετης νηματικής ροής αέρος Safe 2000-class II-(Laminar Air Flow)	<i>Holten, Denmark</i>
Ανάστροφο μικροσκόπιο τύπου 7002	<i>Wang Biomedical, Netherlands</i>
ρΗμετρο pH 211 microprocessor pH meter	<i>Hanna Instruments Srl, Sarreola di Rubano, Italy</i>
Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer-improved, βάθος θαλάμου 0.1 mm	<i>Poly-Optik GmbH, Germany</i>
Cryo 1 ⁰ C freezing container	<i>Nalgene Brand Products, NY, USA</i>
Δοχείο Dewars B 2035	<i>Cryo Diffusion, Lery, France</i>
Φυγόκεντρος T23-MLW	<i>Engelsdorf-Germany</i>
Ομογενοποιητής BIOBLOCK 94349	<i>Fischer Scientific Bioblock Illkirch-Cedex, France</i>
Ψυχόμενη Φυγόκεντρος Universal 32R με κεφαλή 1617	<i>Hettich International Kirchleugern, Germany</i>
Υπερφυγόκεντρος, CS120GX με κεφαλή τύπου S100AT6	<i>Hitachi Koki Co. Ltd., Japan</i>
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	<i>Du[®]-65, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA</i>

10.1.3. Καλλιέργεια κυττάρων

A) Κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του προστάτη PC-3

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I στο οποίο είχε προστεθεί, υπό άσηπτες συνθήκες στην εστία κάθετης νηματικής ροής, 10% (v/v) FBS⁴, 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη. Το φιαλίδιο με τα κύτταρα ανασύρθηκε από το δοχείο υγρού αζώτου και αφέθηκε για λίγη ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν, μέσα στην εστία κάθετης νηματικής ροής, σε φιάλη που περιείχε το θρεπτικό υλικό. Η φιάλη τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο, σε υγρή ατμόσφαιρα που περιέχε 5% CO₂ στους 37⁰C. Την επόμενη μέρα αλλάχθηκε το θρεπτικό υλικό ώστε να απομακρυνθεί το (ψυχρό) διάλυμα κατάψυξης (FBS+5%DMSO) και επανατοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο CO₂. Η φιάλη εξεταζόταν καθημερινά στο οπτικό μικροσκόπιο και όταν η καλλιέργεια είχε μεγάλο αριθμό κυττάρων, γινόταν ανακαλλιέργεια σε αναλογία 1:3. Αρχικά απομακρύνονταν το θρεπτικό υλικό, ακολούθησε προσθήκη 4 mL διαλύματος Trypsin/EDTA και το μίγμα επώαστηκε στους 37⁰C για 5-10 min ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού ώστε να

⁴ Το FBS υπέστη θερμική απενεργοποίηση στους 56⁰C για 30 min σε υδατόλουτρο.

σταματήσει η δράση της θρυψίνης και έγινε ανακατανομή σε νέες φιάλες σε αναλογία 1:3 με την προσθήκη θρεπτικού υλικού. Οι φιάλες μεταφέρθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στις συνθήκες που αναφέρθηκαν πριν. Κατόπιν καθημερινής εξέτασης των καλλιέργειών στο οπτικό μικροσκόπιο, ανανεωνόταν το θρεπτικό υλικό των κυττάρων ή όταν οι καλλιέργειες είχαν μεγάλο αριθμό κυττάρων, ανακαλλιεργούνταν σε αναλογία 1:3 όπως πριν.

B) Κύτταρα HEK293-GRPR

Χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I στο οποίο είχε προστεθεί 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum), 100 U/mL πενικιλίνη, 100 µg/mL στρεπτομυκίνη και 375 mg G418 αντιβιοτικού ανά 500 mL θρεπτικού υλικού. Για την καλλιέργεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται για τα κύτταρα PC-3.

10.1.4. Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Ετοιμάστηκε διάλυμα Trypan Blue⁵ σε PBS 0.25% (w/v). Υπό άσηπτες συνθήκες στην εστία κάθετης νηματικής ροής έγινε συλλογή των κυττάρων από μία φιάλη καλλιέργειας. Απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και ακολούθησε προσθήκη 4 mL διαλύματος Trypsin/EDTA. Το μίγμα αφέθηκε για επώαση στους 37°C για 5-10 min ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και συλλέχθηκαν τα κύτταρα στη φιάλη. Κατόπιν έγινε ανάμειξη 50 µL εναιωρήματος κυττάρων με 50 µL διαλύματος χρωστικής σε φιαλίδιο Eppendorf. Με πιπέττα μεταφέρθηκε ποσότητα στο αιματοκυτόμετρο και με το μικροσκόπιο μετρήθηκαν τα βιώσιμα κύτταρα (τα μη χρωματισμένα κύτταρα). Η τεχνική έχει ως εξής:

Το αιματοκυτόμετρο αποτελείται από 2 περιοχές μέτρησης στις οποίες υπάρχουν από 4 μεγάλα τετράγωνα που το καθένα έχει εμβαδόν επιφάνειας 1 mm² και βάθος 0.1 mm, οπότε κάθε τετράγωνο αντιστοιχεί σε τελικό όγκο 0.1 mm³. Ο αριθμός κυττάρων ανά mL ισούται με το μέσο αριθμό κυττάρων ανά τετράγωνο × 2 × 10⁴.

⁵ Η μέτρηση χρησιμοποιεί τη χρωστική Trypan Blue η οποία χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα.

10.1.5. Απομόνωση κυτταρικών μεμβρανών

Τα κύτταρα, χωρίς να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό, αποκολλήθηκαν από τον πυθμένα της φιάλης με την βοήθεια ξύστρας υπό άσηπτες συνθήκες στην εστία κάθετης νηματικής ροής, και έγινε συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος και ήπια φυγοκέντρηση για 5 min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε προσθήκη 4-5 mL PBS ανά φιάλη ώστε να γίνει έκπλυση των κυττάρων και φυγοκέντρηση για 5 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Έγινε απόχυση του υπερκείμενου και στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 1 mL διαλύματος Tris/EDTA ανά φιάλη σε θερμοκρασία 4⁰C σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια έγινε λύση των κυττάρων και ομογενοποίηση σε ειδικό γυάλινο σωλήνα με την χρησιμοποίηση ειδικού ομογενοποιητικού εμβόλου στους 4⁰C σε παγόλουτρο. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 450 g (2.600 rpm) για 10 min στους 4⁰C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο, ενώ απομακρύνθηκε το ίζημα στο οποίο συγκεντρώθηκαν τα βαρύτερα στοιχεία των κυττάρων όπως οι πυρήνες. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στα 45.000 g (26.000 rpm) για 15 min στους 4⁰C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα, που αποτελεί το μεμβρανικό παρασκεύασμα, επαναιωρήθηκε με την προσθήκη 100 μL διαλύματος Tris/EDTA ανά φιάλη και ομογενοποιήθηκε. Το μίγμα μοιράστηκε ανά 100 μL σε φιαλίδια τύπου Eppendorf τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80 ⁰C.

10.1.6. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης μεμβρανών

Πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας το Protein Assay Kit II της Bio-Rad με BSA ως πρότυπο σύγκρισης. Στη συγκεκριμένη συσκευασία περιέχεται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250. Παρασκευάστηκε διάλυμα BSA σε H₂O συγκέντρωσης 5.48 mg/mL και από αυτό με αραιώση σειρά πρότυπων διαλυμάτων συγκεντρώσεων (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL). Αραιώθηκε το μεμβρανικό παρασκεύασμα με H₂O (HPLC grade) σε αναλογία 1:10. Σε σειρά από σωληνάκια προστέθηκαν 70 μL από τα πρότυπα διαλύματα BSA καθώς και 2100 μL διαλύματος χρωστικής. Επίσης σε ένα σωληνάκι προστέθηκαν 70 μL από το αραιωμένο μεμβρανικό παρασκεύασμα και 2100 μL διαλύματος χρωστικής. Έγινε βαθμονόμηση του φωτόμετρου με διάλυμα που περιείχε 70 μL H₂O και 2100 μL χρωστικής (τυφλό). Τα σωληνάκια παρέμειναν για 10 min και μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων σε μήκος κύματος 595 nm σε φασματοφωτόμετρο. Η

συγκέντρωση της πρωτεΐνης των μεμβρανών προσδιορίστηκε με πρότυπη καμπύλη, που σχεδιάστηκε ως συνάρτηση των τιμών απορροφήσεων των συγκεντρώσεων της σειράς των προτύπων διαλυμάτων BSA, με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Microsoft Excel.

10.1.7. Αποθήκευση κυττάρων

Παρασκευάστηκε διάλυμα κατάψυξης (freezing medium) FBS + 5% DMSO. Απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από τις φιάλες καλλιέργειας και έγινε προσθήκη 4 mL διαλύματος Trypsin/EDTA και επώαση του μίγματος στους 37⁰C για 5-10 min ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού, ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης, και έγινε ήπια φυγοκέντρηση για 10 λεπτά. Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν με σταδιακή προσθήκη 1 mL (ανά φιάλη) ψυχρού διαλύματος κατάψυξης και μοιράστηκε σε πλαστικά κρυογονικά φιαλίδια. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στο cryofreezing container ώστε να γίνει σταδιακή ψύξη με ρυθμό -1⁰C/min παρουσία ισοπροπανόλης και μεταφέρθηκαν σε καταψύκτη στους -80⁰C για μία ημέρα. Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν για αποθήκευση στο υγρό N₂ σε δοχείο Dewars.

10.2. *In vitro* αξιολόγηση

10.2.1. Αντιδραστήρια

PC-3 Human Prostate Cancer Cells	Κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη PC-3	ATCC-LGC Promochem, Teddington, UK
GRPR transfected HEK293	HEK-GRPR κύτταρα	
BSA Fraction V	Αλβουμίνη βοοειδούς ορού BSA	Applichem, Darmstadt, Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	Ορός εμβρύου βοός	Gibco, Grand Island, USA
HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ	Applichem, Darmstadt, Germany
Bacitracin	Βακιτρακίνη	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland
[Tyr ⁴]BBN		Bachem, Bubendorf, Switzerland
Glycine	Γλυκίνη	Riedel-de Haën, Seelze, Germany
Φίλτρα ινών υάλου GF/B, 4 ^{1/2} × 12 ^{1/4}		Adi Hassel Ingenieur Buro, Munich, Germany
Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I		Gibco, Grand Island, USA
Pen/Strep 10000 U/mL/10000 µg/mL	Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη 10000 U/mL / 10000 µg/mL	Biochrom AG, Berlin, Germany
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02% w/v)	Θρυψίνη/EDTA 0.05 %/0.02 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin, Germany
Δοκιμαστικοί σωλήνες RIA διαστάσεων 75 mm × 12 mm		Βιολογική, Αθήνα
TC-Plate 6 well, sterile	Δισκία των 6 φρεατίων	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
TC-Plate 6 well, Poly-D-Lysine coated, sterile	Πλάκες καλλιέργειας κυττάρων 6 φρεατίων, επικαλυμμένες με Poly-D-Lysine	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
Χρωστική Coomassie Blue Plus		Bradford Assay Reagent-Pierce, Rockford, USA
Heparin	Ηπαρίνη	LEO pharmaceutical products, Ballerup, Denmark
Ηθμοί τύπου Millex GV (διάμετρος πόρων 0.22 µ)		Millipore, Milford, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane, H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο	Merck, Darmstadt, Germany
D(+)-sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	D(+)-σουκρόζη (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Janssen Chimica, Beerse,

3 mm CHR χρωματογραφικό χαρτί

Belgium
Whatman International
Ltd, Maidstone, UK

Αρσενικά ποντίκια Swiss albino (7-8 εβδομάδων, 20-30 g)

Εκτροφείο
πειραματοζώων ΕΚΕΦΕ
«Δημόκριτος»

Διάλυμα δέσμευσης, pH 7.4 (50 mM HEPES, 5.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL βακιτρακίνης, 1% BSA)

Διάλυμα έκπλυσης, pH 7.4 10 mM HEPES, 150 mM NaCl)

Διάλυμα εσωτερικής Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I, 1% heat-inactivated FBS

PBS 0.5% BSA

Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης, pH 2.8 (50 mM glycine, 0.1 M NaCl)

10.2.2. Όργανα

Χρωματογράφος Waters με σύστημα ανάμιξης διαλυτών Waters 600 συνδεδεμένο με ανιχνευτή UV-Vis διάταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector) Waters 996

Waters, Vienna, Austria

Στήλη αναστροφής φάσης Waters Symmetry Shield (RP-18, 5 μm, 3.9 mm × 150 mm)

Waters, Vienna, Austria

Αυτοματοποιημένη συσκευή διήθησης πολλαπλών δειγμάτων Brandel M-48 Cell Harvester

Adi Hassel Ingenieur Buro, Munich, Germany

Αντλία RV3 Rotary Vane Pump

Edwards High Vacuum International, West Sussex,
UK

Αυτόματος μετρητής γ-ακτινοβολίας πολλαπλών δειγμάτων κρυστάλλου NaI(Tl) Auto-Gamma[®] 5000 Series

Canberra Packard, Manchester, UK

Εστία κάθετης νηματικής ροής αέρος Safe 2000-class II- (Laminar Air Flow)

Holten, Denmark

Επιπαστικός κλίβανος CO₂ Smart Cell

Heal Force, Hong Kong

Θάλαμος-shaker τύπου M 201-OR

MPM Instruments srl, Bernareggio, Italy

Πεχάμετρο

Zinon, Αθήνα

Ψυχόμενη Φυγόκεντρος Universal 32R

Hettich International, Kirchleugern, Germany

Φυγόκεντρος Microfuge E

Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA

Ομογενοποιητής Ultra-Turrax T25

Janke & Kunkel, IKA-Labor Technik, Staufen,
Germany

Αιματοκυτταρόμετρο Neubauer-improved, βάθος θαλάμου 0.1 mm

Poly-Optik GmbH, Germany

Ανάστροφο μικροσκόπιο τύπου 7002

Wang Biomedical, Netherlands

10.2.3. Πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ομογενοποίημα μεμβρανών κυττάρων PC-3 (χρησιμοποιήθηκαν 25 μg / δοκιμαστικό σωλήνα ή 0.125 μg / mL). Την ημέρα του πειράματος παρασκευάστηκαν το διάλυμα του ραδιοπροσδέτη [^{125}I -Tyr 4]BBN (30000 cpm-40000 cpm ή 70 μL / δοκιμαστικό σωλήνα) καθώς και διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου πεπτιδίου (10^{-12} M, 10^{-11} M, 3×10^{-11} M, 10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M). Ετοιμάστηκαν τριάδες δοκιμαστικών σωλήνων (3×12 δοκιμαστικοί σωλήνες για την μέτρηση της ειδικής δέσμησης, 3 δοκιμαστικοί σωλήνες για την μέτρηση της ολικής δέσμησης) και τοποθετήθηκαν σε πάγο. Προστέθηκαν 70 μL διαλύματος [^{125}I -Tyr 4]BBN (30.000-40.000 cpm), 30 μL από το αντίστοιχο διάλυμα του εξεταζόμενου πεπτιδίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες για την μέτρηση της ειδικής δέσμησης ή 30 μL διαλύματος δέσμησης στους δοκιμαστικούς σωλήνες για την μέτρηση της ολικής δέσμησης και 200 μL εναιωρήματος μεμβρανών κυττάρων, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 300 μL . Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν για επώαση για 45 min στους 22 $^{\circ}\text{C}$ με ήπια ανάδευση. Τα φίλτρα ινών ύαλου τοποθετήθηκαν για 1 h στο διάλυμα δέσμησης. Ο τερματισμός της επώασης πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων σε πάγο. Το μίγμα επώασης διηθήθηκε από φίλτρα ινών υάλου σε αυτοματοποιημένη συσκευή διήθησης. Τα φίλτρα πλύθηκαν με 4×2.5 mL ψυχρού διαλύματος έκπλυσης, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και μετρήθηκε η περιεχόμενη ραδιενέργεια στον μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ο προσδιορισμός της τιμής IC $_{50}$ πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα PRISM 2.01 (Graph Pad Software, San Diego, USA). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του προσδέτη η οποία αναστέλλει το 50% της ειδικής δέσμησης του ραδιοπροσδέτη και είναι και ενδεικτική της συγγένειας του πεπτιδίου για τον GRP-R.

10.2.4. Πειράματα δέσμησης κορεσμού

Μία έως δύο μέρες πριν από την εκτέλεση του πειράματος, συλλέχθηκαν τα κύτταρα σε δισκία των 6 φρεατίων, τα οποία παρέμειναν στον επωαστικό κλίβανο για 24 ή 48 h αντίστοιχα ώστε τα φρεάτια να φθάσουν σε πληρότητα κυττάρων

προσκολλημένων στο πυθμένα. Αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και ακολούθησε προσθήκη 4 mL διαλύματος Trypsin/EDTA. Το μίγμα αφέθηκε για επώαση στους 37°C για 5-10 min ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και συλλέχθηκαν τα κύτταρα. Το εναιώρημα των κυττάρων μοιράστηκε σε 11 δισκία των 6 φρεατίων και μεταφέρθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C (το ένα δισκίο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των κυττάρων). Την ημέρα του πειράματος τα δισκία μεταφέρθηκαν σε παγόλουτρο, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και πλύθηκαν με 2 × 2 mL ψυχρού διαλύματος εσωτερίκευσης. Από αρχικό διάλυμα [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin συγκέντρωσης 1200 nM ετοιμάστηκαν διαλύματα διαδοχικών αραιώσεων (0.24, 1.2, 2.4, 3.6, 7.2, 16.8, 24, 36, 48, 240 nM).

Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 1100 μL διαλύματος δέσμευσης και στη συνέχεια προστέθηκαν στα 3 φρεάτια κάθε πλακιδίου καλλιέργειας 50 μL διαλύματος δέσμευσης (για τον προσδιορισμό της ολικής δέσμευσης) και στα υπόλοιπα τρία φρεάτια 50 μL [^{99g}Tc/^{99m}Tc]BBN συγκέντρωσης 6 μM (για τον προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμευσης). Σε όλα τα φρεάτια προστέθηκαν 50 μL διαλύματος [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin, διαφορετικής συγκέντρωσης ανά δισκίο των 6 φρεατίων, και αφέθηκαν για επώαση στους 4°C για 1.5 h. Η επώαση τερματίστηκε με αφαίρεση του υπερκείμενου και στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS-BSA. Προστέθηκαν 2 × 0.6 mL NaOH ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων και λύση τους και το περιεχόμενο του κάθε φρεατίου μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η περιεχόμενη ραδιενέργεια των συλλεγμένων κλασμάτων μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ο προσδιορισμός των τιμών K_d και B_{max} έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα PRISM 2.01 (Graph Pad Software, San Diego, USA).

Παράλληλα μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ενός δισκίου των 6 φρεατίων, σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.4. Υπολογίστηκε έτσι ο μέσος όρος του αριθμού κυττάρων ανά φρεάτιο σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$\begin{aligned} \text{Αριθμός κυττάρων / mL} &= \text{αριθμός κυττάρων ανά τετράγωνο} \times 2 \times 10^4 \\ \text{Αριθμός κυττάρων / φρεάτιο} &= \text{Αριθμός κυττάρων / mL} \times 3 \text{ mL / φρεάτιο} \end{aligned}$$

10.2.5. Πειράματα Εσωτερίκευσης

Τα PC-3 κύτταρα συλλέχθηκαν την προηγούμενη ημέρα από την εκτέλεση του πειράματος, όπως περιγράφηκε στη παράγραφο 3.2.4.B. Το εναιώρημα των κυττάρων διαμοιράστηκε σε δισκία των 6 φρεατίων (περίπου $1.0-1.5 \times 10^6$ κύτταρα ανά φρεάτιο) και μεταφέρθηκαν στον επωαστικό κλίβανο CO₂ στους 37°C. Την ημέρα του πειράματος παρασκευάστηκε διάλυμα [Tyr⁴]BBN σε διάλυμα εσωτερίκευσης ή σε διάλυμα PBS-BSA (5 mL, τελικής συγκέντρωσης 1 μM) για το προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμησης, καθώς και διάλυμα του ραδιοπροσδέτη [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε διάλυμα PBS-BSA (5 mL, 300000 cpm / 150 μL, 150 fmol).

Τα δισκία μεταφέρθηκαν σε πάγο και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υλικό υπό κενό. Τα κύτταρα πλύθηκαν με 2 × 2 mL ψυχρού διαλύματος εσωτερίκευσης. Ακολούθησε σε κάθε φρεάτιο προσθήκη 1.2 mL διαλύματος εσωτερίκευσης θερμοκρασίας 37°C. Σε μια σειρά τριών φρεατίων (επάνω) προστέθηκαν 150 μL διαλύματος εσωτερίκευσης, ενώ για το προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμησης στην άλλη σειρά τριών φρεατίων του δισκίου (κάτω) προστέθηκε διάλυμα [Tyr⁴]BBN σε διάλυμα PBS-BSA (150 μL, τελικής συγκέντρωσης 1 μM). Στο τέλος προστέθηκαν σε όλα τα φρεάτια 150 μL [^{99m}Tc]Demobesin σε διάλυμα PBS-BSA.

Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στους 37°C και σε χρόνους 5, 15, 30, 60, 120 min. Η επώαση τερματίστηκε με τοποθέτηση των πλακών καλλιέργειας σε πάγο, απομάκρυνση του μίγματος επώασης, συλλογή του σε δοκιμαστικούς σωλήνες RIA και ταχεία πλύση των κυττάρων με 1 mL ψυχρού διαλύματος PBS-BSA. Τα κύτταρα επώασθηκαν με προσθήκη 2 × 0.6 mL ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης για 2 × 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έγινε συλλογή του υπερκείμενου το οποίο περιέχει το κλάσμα του δεσμευμένου στην κυτταρική μεμβράνη ραδιοπεπτιδίου, και τα κύτταρα πλύθηκαν με 0.6 mL διαλύματος PBS-BSA. Το κλάσμα του εσωτερικευμένου ραδιοπεπτιδίου απομονώθηκε με μηχανική αποκόλληση και λύση των κυττάρων μετά την προσθήκη 2 × 0.6 mL διαλύματος 1 N NaOH για μικρό χρονικό διάστημα. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν στους αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες RIA. Η ραδιενέργεια των συλλεγμένων κλασμάτων μετρήθηκε με μετρητή γ-ακτινοβολίας. Υπολογίστηκε το ποσοστό της

εσωτερικευμένης ως προς την ολική δεσμευμένη ραδιενέργεια σε συνάρτηση με τον χρόνο, με την χρησιμοποίηση λογισμικού προγράμματος Microsoft Excel.

10.2.6. Λειτουργικές μελέτες

Για να μελετηθεί η ανταγωνιστική δράση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν λειτουργικές μελέτες από την ερευνητική ομάδα του J.C. Reubi όπως:

α) Επαγωγή της εσωτερίκευσης του GRP-R.

β) Τυχόν παρεμπόδιση της επαγωγής της εσωτερίκευσης αγωνιστή παρουσία ανταγωνιστή.

Η ανταγωνιστική δράση μελετήθηκε επιλεκτικά για τα Demobesin 8 και Demobesin 10 σε κύτταρα HEK-GRPR. Η διαδικασία έγινε με χρήση μικροσκοπίου συνεστίασης και φθορίζοντος αντισώματος.

10.2.7. Μελέτες Μεταβολισμού

10.2.7.1. Επώαση σε πλάσμα ποντικίου

Το πειραματόζωο αναισθητοποιήθηκε με αιθέρα και θυσιάστηκε με καρδιεκτομή. Το αίμα συλλέχθηκε από την καρδιά με σύριγγα σε σωληνάκια Eppendorf του 1.5 ml σε πάγο, επικαλυμμένα με διάλυμα ηπαρίνης σε 0.9 % (w/v) NaCl. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 1960 g στους 4°C και έγινε συλλογή του πλάσματος. Δείγματα (12.5 µL) του [^{99m}Tc]Demobesin 8 επώαστηκαν με φρέσκο πλάσμα (37.5 µL) στους 37°C και κλάσματα απομονώθηκαν μετά από 0, 15, 30, 60 και 120 min. Ακολούθησε προσθήκη αιθανόλης σε αναλογία προς το κλάσμα 2/1 v/v και φυγοκέντρηση στα 2000 g (10000 rpm) για 10 min. Το υπερκείμενο από κάθε κλάσμα διηθήθηκε σε ηθμούς τύπου Millex GV και αναλύθηκε με HPLC για την ύπαρξη μεταβολιτών:

HPLC Σύστημα 6)

0 min:

t_R ^{99m}Tc]Demobesin 8: 28.1 min, 98.7 %

t_R ραδιομεταβολιτών: 0.4 min, 0.28 %

15 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8: 28.2 min, 78.5 %

t_R ραδιομεταβολιτών: 0.4 min, 14.8 %; 17.9 min, 2.6 %; 24.1 min, 0.9 %, 25.04 min 1.2 %, 26.4 min 1.4%, 27.2 min 0.5 %

30 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8: 28.2 min, 67.6 %

t_R ραδιομεταβολιτών: 0.4 min, 21.5 %; 18 min, 6.4 %; 24.1 min, 0.8 %, 25.1 min 2.8 %, 26.7 min 0.7 %

60 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8: 28.2 min, 46.1 %

t_R ραδιομεταβολιτών: 0.4 min, 36.3 %; 17.9 min, 11.7 %; 24.1 min, 1.2 %, 25 min 4.7 %

120 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8: 28.2 min, 21.5 %

t_R ραδιομεταβολιτών: 0.4 min, 49.8 %; 18 min, 18.5 %, 24.2 min 1 %, 25.1 min 8.6 %, 26.7 min 0.6 %

Για να διαπιστωθεί αν η κορυφή στην αρχή του χρωματογραφήματος (t_R : 0.4 min) αντιστοιχεί σε μεταβολίτη ή σε $^{99m}\text{TcO}_4^-$ δείγμα του μίγματος των 60 min αναλύθηκε με TLC σε σύστημα ανάπτυξης ακετόνης. Η ταινία αναπτύχθηκε ως τα 10 cm από το αρχικό σημείο, αφέθηκε να στεγνώσει και μετά κόπηκε σε 2 τμήματα:

1^ο τμήμα (αρχικό σημείο + 7 cm) = αρχή : [^{99m}Tc]Demobesin

2^ο τμήμα (υπόλοιπο της ταινίας) = μέτωπο: $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Η περιεχόμενη ραδιενέργεια μετρήθηκε στον γ-μετρητή.

10.2.7.2. Επώαση σε ομοιογενοποιήματα νεφρού και ήπατος

Το πειραματόζωο αναισθητοποιήθηκε με αιθέρα και θανατώθηκε με καρδιακτομή. Αφαιρέθηκαν τα νεφρά ή το ήπαρ, εκπλύθηκαν γρήγορα σε ψυχρό διάλυμα 50 mM TRIS/0.2 M sucrose pH 7.4 και μεταφέρθηκαν σε δοχείο φυγοκέντρησης που περιείχε διπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος σε παγόλουτρο. Τα όργανα τεμαχίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Ultra-Turrax T25 για 1 min στους 4^οC. Σε σωληνάκια Eppendorf τοποθετήθηκαν 12.5 μL του αναλόγου [^{99m}Tc]Demobesin 8 (250 μCi) μαζί με 37.5 μL ομογενοποιήματος νεφρών ή ήπατος και επωάστηκαν στους 37^οC για 0, 15 και 30 min. Προστέθηκαν 100 μL EtOH και τα μίγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 g (10000 rpm). Τα υπερκείμενα

διαλύματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf και κλάσματα τους αναλύθηκαν με HPLC:

Ομοιογενοποίηση νεφρών (Σύστημα 10):

0 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8 = 28.2 min, 98.3 %

t_R ραδιομεταβολιτών = 0.4 min, 0.4 %; 26.2 min, 1 %; 27.1 min, 0.25 %

15 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8 28.2 min, 2 %

t_R ραδιομεταβολιτών = 0.4 min, 0.5 %; 1.1 min, 4.3 %; 11.4 min, 1.7 %; 15.0 min, 3.3 %

Ομοιογενοποίηση ήπατος (Σύστημα 10):

15 min:

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8 = 28.2 min, 11 %

t_R ραδιομεταβολιτών = 0.4 min, 0.5 %; 17.8 min, 2.25 %; 24 min, 19.4 %; 24.9 min, 60.4 %, 25.7 min 5.4 %, 26.6 min 1%

10.2.7.3. Συλλογή ούρων

Σε ποντίκι ενέθηκαν στη φλέβα της ουράς 100 μL (1 mCi) διαλύματος [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε 0.9 % NaCl/EtOH 90/10. Το πειραματόζωο παρέμεινε για 30 min σε μεταβολικό κλουβί με παροχή νερού. Το πειραματόζωο αναισθητοποιήθηκε με αιθέρα και θανατώθηκε με καρδιεκτομή. Τα ούρα συλλέχθηκαν από την ουροδόχο κύστη με τη βοήθεια σύριγγας. Δείγμα (20 μL , 213 μCi) φυγοκεντρήθηκε για 10 min στα 2000 g (10000 rpm) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια. Η ανάλυση δείγματος του υπερκείμενου έγινε με HPLC:

HPLC (Σύστημα 10)

t_R [^{99m}Tc]Demobesin 8 = 28.2 min 3 %

t_R ραδιομεταβολιτών = 0.4 min 0.6 %, 0.8 min 12.7 %, 17.9 min 53.5 %, 24.9 min 30.1%

Δείγμα του υπερκείμενου αναλύθηκε με TLC χρωματογραφία σε σύστημα ανάπτυξης ακετόνης ώστε να διαπιστωθεί αν η κορυφή στην αρχή του χρωματογραφήματος ($t_R = 0.4$ min) αντιστοιχεί σε μεταβολίτη ή σε $^{99m}\text{TcO}_4$ όπως περιγράφηκε πριν.

10.3. *In vivo* αξιολόγηση

10.3.1 Αντιδραστήρια

PC-3 Human Prostate Cancer Cells	Κύτταρα ανθρώπινου καρκίνου του προστάτη PC-3	ATCC-LGC Promochem, Teddington, UK
GRPR transfected HEK293	HEK-GRPR κύτταρα	
BSA Fraction V	Αλβουμίνη εμβρύου βοός BSA	Applichem, Darmstadt, Germany
[Tyr ⁴]Bombesin		Bachem, Bubendorf, Switzerland
Dulbecco's MEM GLUTAMAX-I		Gibco, Grand Island, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Ορός εμβρύου βοός	Gibco, Grand Island, USA
Pen/Strep 10000 U/mL/10000 µg/mL	Πενικιλίνη 10000 U/mL / Στρεπτομυκίνη 10000 µg/mL	Biochrom AG, Berlin, Germany
Trypsin/EDTA (0.05%/0.02% w/v)	Θρυψίνη/EDTA 0.05 %/0.02 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin, Germany
Propylenglycol	Προπυλενογλυκόλη	Fluka, Buchs, Switzerland
Σωληνάκια αιματοκρίτη		
Surgical blades	Χειρουργικές λεπίδες	Paramount surgimed ltd., New Delhi, India
Single use syringe pyrogen-free	Σύριγγες αποστειρωμένες 1 mL	PentaFerte, Campli, Italy
Sterilized food	Τροφή αποστειρωμένη	Mucedola Srl, Milano, Italy
Δοκιμαστικοί σωλήνες RIA διαστάσεων 75 mm × 12 mm		Βιολογική, Αθήνα
Κλουβιά 1284L με κάλυμμα εφοδιασμένο με ειδικό μικροβιοκρατές φίλτρο από 100% πολυεστέρα		Tecniplast LABO-CHEM, Αθήνα
Θηλυκά ποντίκια τύπου SCID (6-8 εβδομάδων, 15-20 g)		Εκτροφείο πειραματόζωων ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
SCID: Severely compromised immunodeficient		
Αρσενικά ποντίκια Swiss albino (6-8 εβδομάδων, 20-30 g)		Εκτροφείο πειραματόζωων ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

PBS pH~7.4 (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 140 mM NaCl)

Τα πειράματα με ζώα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Εθνικούς και Ευρωπαϊκούς κανονισμούς χρήσης πειραματόζωων και τα πρωτόκολλα πειραματισμού είχαν εγκριθεί από το Ελληνικό Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

10.3.2. Όργανα

Εστία κάθετης νηματικής ροής αέρος Safe 2000-class II- (Laminar Air Flow)	<i>Holten, Denmark</i>
Θάλαμος νηματικής ροής (laminair) GELAIRE Class 100	<i>Gelman Instrument S.p.A., Milano, Italy</i>
Φυγόκεντρος T23-MLW	<i>Engelsdorf-Germany</i>
Αυτόματος μετρητής γ-ακτινοβολίας πολλαπλών δειγμάτων κρυστάλλου NaI(Tl) Auto-Gamma® 5000 Series	<i>Canberra Packard, Manchester, UK</i>

10.3.3. Πειράματα βιοκατανομής

A. Πειράματα σε υγιή ποντίκια

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αρσενικά ποντίκια Swiss albino χωρισμένα σε ομάδες τριών ή τεσσάρων ανά χρονικό σημείο. Κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ειδική διάταξη (παγίδα), ακινητοποιήθηκε και ενέθηκαν από τη φλέβα της ουράς του 100 μL διαλύματος [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Demobesin X (όπου X: 2, 7, 8, 11, 12) σε 0.9 % NaCl/EtOH 90/10 (100 μL , 4-6 μCi , 10 pmol). Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και θανατώθηκαν με καρδιαεκτομή, μετά την πάροδο 1, 4 και 24 h. Επίσης σε μία ομάδα πειραματόζωων συγχορηγήθηκε ψυχρό πεπτιδίο 100 μL (100 μg , 40 nmol) [Tyr⁴]BBN σε H₂O / προπυλενογλυκόλη 70/30 μαζί με το ραδιοπεπτιδίο για την επιβεβαίωση της ειδικής πρόσληψης στον GRP-R. Η ομάδα αυτή θανατώθηκε μετά την πάροδο 4 h. Τα πειραματόζωα ζυγίστηκαν αφού προηγουμένως αποκόπηκε η ουρά. Το αίμα συλλέχθηκε αμέσως σε προζυγισμένους σωλήνες αιματοκρίτη, ενώ τα όργανα ενδιαφέροντος (καρδιά, ήπαρ, νεφρά, στομάχι, έντερα, σπλήνα, μυς, πνεύμονες, πάγκρεας), συλλέχθηκαν αμέσως, ζυγίστηκαν, μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες RIA και μετρήθηκε η ραδιενέργεια τους σε μετρητή γ-ακτινοβολίας και έγινε διόρθωση των μετρήσεων παρουσία πρότυπου διαλύματος του ραδιοπεπτιδίου το οποίο αντιστοιχούσε στο 10% της χορηγούμενης δόσης. Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής υπολογίστηκαν σαν χορηγούμενη δόση ανά γραμμάριο (%ID/g) με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Microsoft Excel.

B. Εμφύτευση καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια SCID

Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε υπό άσηπτες συνθήκες από τις φιάλες καλλιέργειας και έγινε προσθήκη 4 mL διαλύματος Trypsin/EDTA και επώαση του μίγματος στους 37°C για 5-10 min ώστε να γίνει αποκόλληση των κυττάρων. Προστέθηκαν 5 mL θρεπτικού υλικού, ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης, έγινε συλλογή των κυττάρων και μέτρηση τους όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.2.4 και ακολούθησε ήπια φυγοκέντρηση για 10 min ώστε να διαχωριστούν τα κύτταρα από το θρεπτικό υλικό. Έγινε απόχυση του υπερκείμενου και έκπλυση των κυττάρων με αποστειρωμένο PBS (5 mL ανά φιάλη) και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Η έκπλυση των κυττάρων έγινε άλλες δύο φορές. Μετά την απόχυση του υπερκείμενου προστέθηκε ποσότητα 150 μL φυσιολογικού ορού (0.9 % w/v NaCl) ανά φιάλη. Το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύτηκε πολύ καλά και μοιράστηκε ανά 170 μL σε αριθμό από αποστειρωμένα σωληνάκια Eppendorf ίσο με τον αριθμό των πειραματόζων στα οποία θα γίνει εμφύτευση. Η εμφύτευση των καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια τύπου SCID έγινε υποδόρια στη περιοχή του μηρού. Τα πειραματόζωα παρέμειναν στα ειδικά πλαστικά κλουβιά στο θάλαμο οριζόντιας νηματικής ροής, σε θερμοκρασία σταθερή στους 25°C και με παροχή αποστειρωμένης τροφής και αποστειρωμένου νερού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι στα ποντίκια ώστε να διαπιστωθεί η πορεία ανάπτυξης των όγκων. Εμφανείς όγκοι αναπτύχθηκαν στην περιοχή της εμφύτευσης μετά την πάροδο 2-3 εβδομάδων.

Γ. Πειράματα σε ποντίκια με όγκους PC-3 ή HEK-GRPR

Η βιοκατανομή πραγματοποιήθηκε σε θηλυκά SCID ποντίκια χωρισμένα σε ομάδες τριών ή τεσσάρων. Κάθε πειραματόζωο τοποθετήθηκε σε ειδική διάταξη (παγίδα), ακινητοποιήθηκε και ενέθηκαν από τη φλέβα της ουράς του 100 μL διαλύματος [^{99m}Tc]Demobesin X σε 0.9 % NaCl/EtOH 90/10 (100 μL, 5-6 μCi, 10 pmol). Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και θανατώθηκαν με καρδιεκτομή, μετά την πάροδο 1, 4 και 24 h. Επίσης σε μία ομάδα πειραματόζων συγχορηγήθηκε ψυχρό πεπτίδιο 100 μL (100 μg, 40 nmol) [Tyr⁴]BBN σε H₂O/προπυλενογλυκόλη 70/30 μαζί με 100 μL [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 2, 7, 8,

11, 12), ώστε να επιβεβαιωθεί η ειδική πρόσληψη. Η ομάδα αυτή θανατώθηκε μετά την πάροδο 4 h. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω για την συλλογή των οργάνων καθώς και του όγκου. Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής υπολογίστηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 10.3.3.A.

Τα χρωματογραφικά συστήματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο αναλύονται διεξοδικά στη σελίδα 204.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

11. Σύνθεση Πεπτιδικών Αναλόγων

11.1. Demobesin 2

Η σύνθεση του Demobesin 2 πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα και ολοκληρώθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (Σχήμα 1.1.) έγινε σύζευξη του προστατευμένου τετραμινικού υποκαταστάτη στο N-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας και στο δεύτερο στάδιο έγινε απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων (Σχήμα 1.3.).

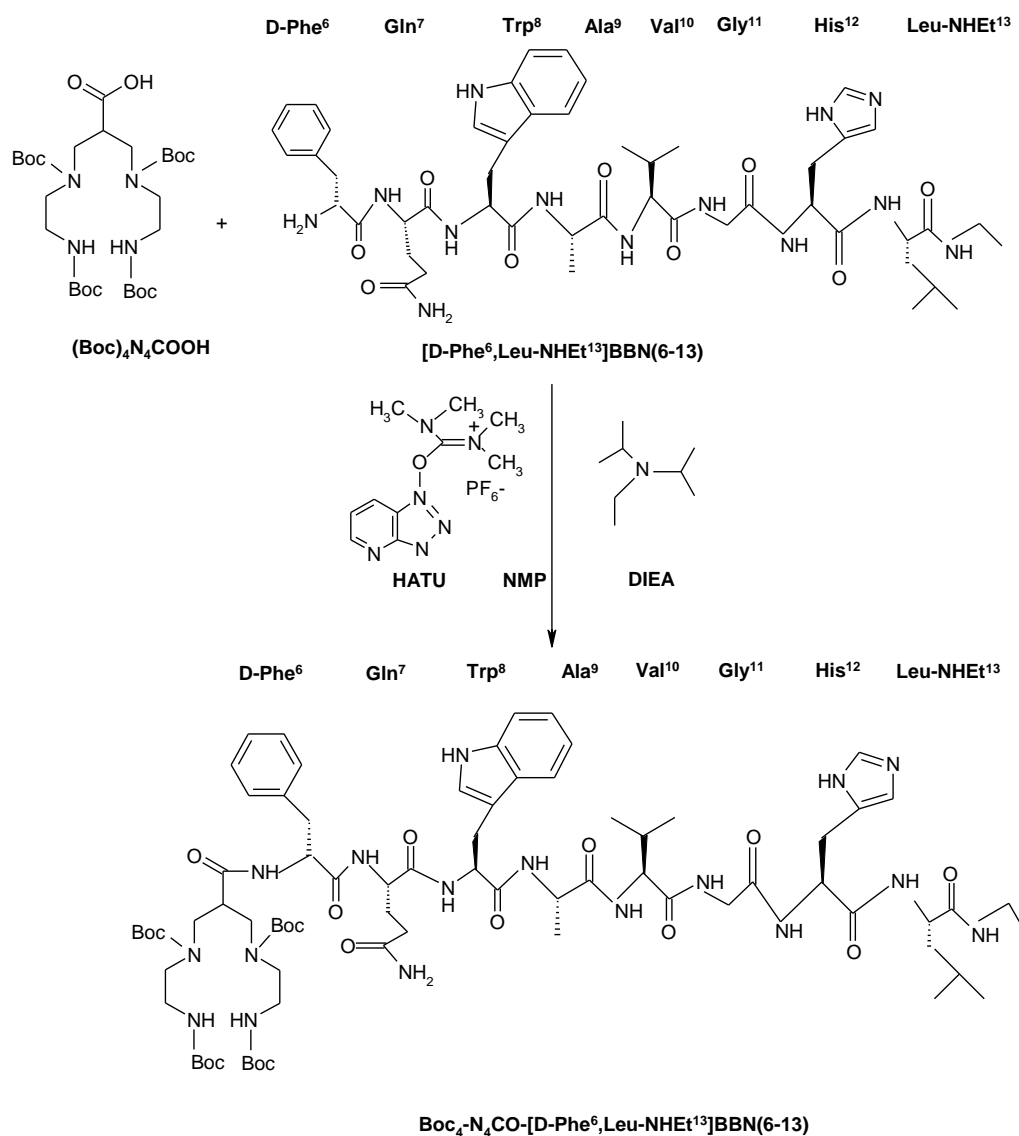
Για την προστασία του χηλικού υποκαταστάτη τύπου άκυκλης τετραμίνης χρησιμοποιήθηκε η ουρεθανικού τύπου τριτοταγής βουτοξυκαρβονυλομάδα (Boc). Η Boc-προστατευτική ομάδα δρα μειώνοντας την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του N λόγω μεσομέρειας, άρα και την νουκλεοφιλικότητα του ατόμου του αζώτου της αμινομάδας, οδηγώντας σε αποφυγή των παράπλευρων αντιδράσεων των αμινομάδων αυτών με τις καρβοξυλομάδες γειτονικών μορίων.

Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε με την δημιουργία αμιδικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλομάδας του Boc₄-N₄-COOH και της N-τελικής πρωτοταγούς αμινομάδας της D-Phe⁶ του πεπτιδίου παρουσία του αντιδραστηρίου σύζευξης HATU [245] και της οργανικής βάσης DIEA.

Το HATU ήταν διαλυτοποιημένο σε πολικό διαλύτη (MeCN), ενώ το Boc₄-N₄-COOH ήταν διαλυτοποιημένο σε μη πολικό διαλύτη (CH₂Cl₂) και προστέθηκε σε περίσσεια σε σχέση με το πεπτίδιο ώστε να γίνει πλήρης σύζευξη. Το πεπτίδιο λόγω της υδροφιλικότητάς του διαλυτοποιείται δύσκολα σε αυτό το μίγμα διαλυτών και για την πλήρη διαλυτοποίησή του προστέθηκε NMP. Δεν χρησιμοποιείται H₂O για την πλήρη διαλυτοποίησή του γιατί η βασικότητα των των OH⁻ στο αλκαλικό περιβάλλον θα υπερίσχυε αυτή της πρωτοταγούς αμίνης, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αντίδρασης. Το HATU συμβάλει στη σύζευξη παρεμποδίζοντας την ρακεμίωση. Έτσι αποφεύγεται η δημιουργία διαστερεομερών των οποίων ο διαχωρισμός είναι δύσκολος και τα οποία πιθανόν να μεταβάλλουν την βιολογική δράση του πεπτιδίου. Το HATU παίζει ρόλο βοηθητικού πυρηνόφιλου αντιδραστηρίου και παρουσία της οργανικής βάσης DIEA ενεργοποιεί την καρβοξυλομάδα του Boc₄-N₄-COOH σχηματίζοντας με αυτήν ενεργό εστέρα.

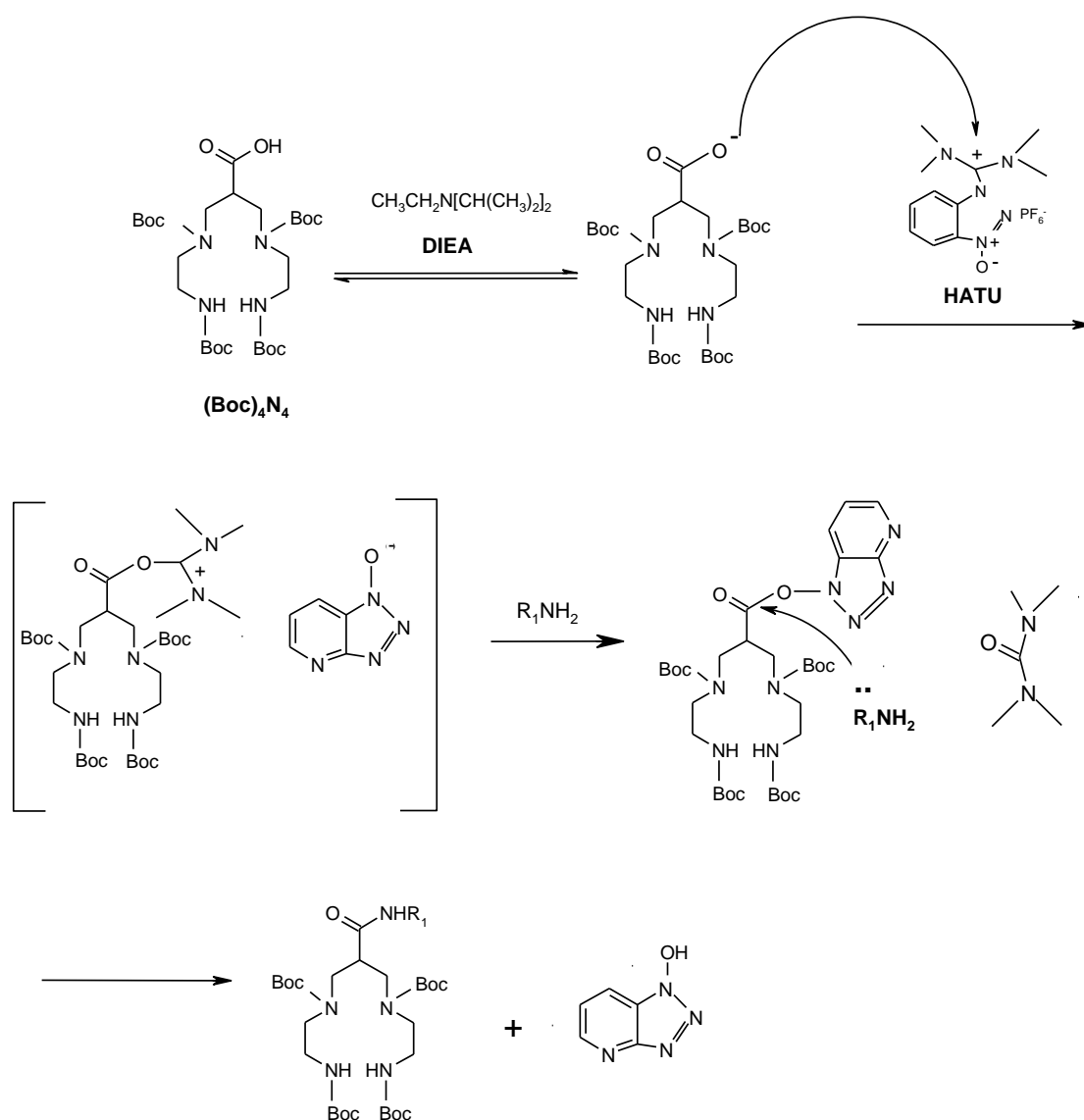
Η βάση DIEA είναι τριτοταγής αμίνη, έχει μη πυρηνόφιλες ιδιότητες [246] και βοηθάει στην αποπρωτονίωση του Boc₄-N₄-COOH σε Boc₄-N₄-COO⁻ [247]

απαραίτητη για την αντίδραση σύζευξης. Στη συνέχεια ο ενεργοποιημένος εστέρας σχηματίζει αμιδικό δεσμό με την πρωτοταγή αμινομάδα της D-Phe⁶ του πεπτιδίου.



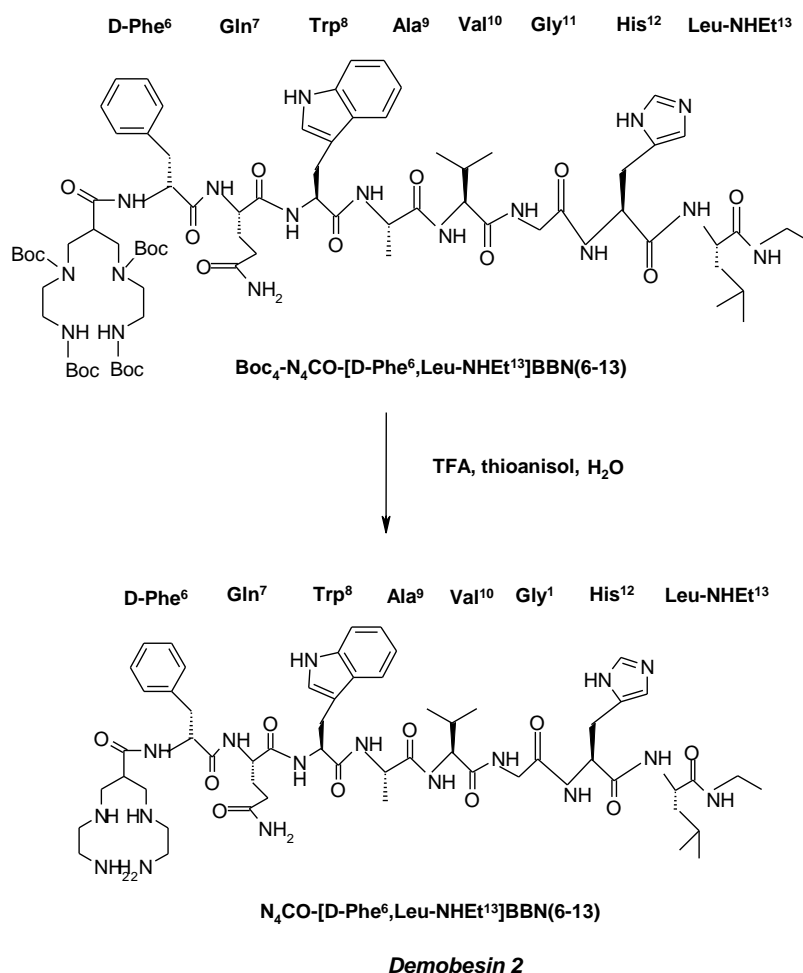
Σχήμα 11.1: Πορεία σύνθεσης του *Demobesin 2* σε διάλυμα. 1^ο Στάδιο: Σύζευξη του $(\text{Boc})_4\text{N}_4\text{COOH}$ στο N- τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας

Ο μηχανισμός δράσης του HATU παρουσία DIEA [248] παρατίθεται στο Σχήμα 11.2:



Σχήμα 11.2: Μηχανισμός αντίδρασης HATU κατά την σύζευξη του $\text{Boc}_4\text{N}_4\text{COO}^-$ στη Ν-τελική αμινομάδα της πεπτιδικής αλληλουχίας

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων με τη χρήση TFA παρουσία θειοανισόλης και H_2O όπως περιγράφεται στο Σχήμα 11.3.:



Σχήμα 11.3: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 2 σε διάλυμα. 2^ο στάδιο: Αποπροστασία με επίδραση TFA παρουσία θειοανισόλης και H₂O για την δέσμευση κατιόντων

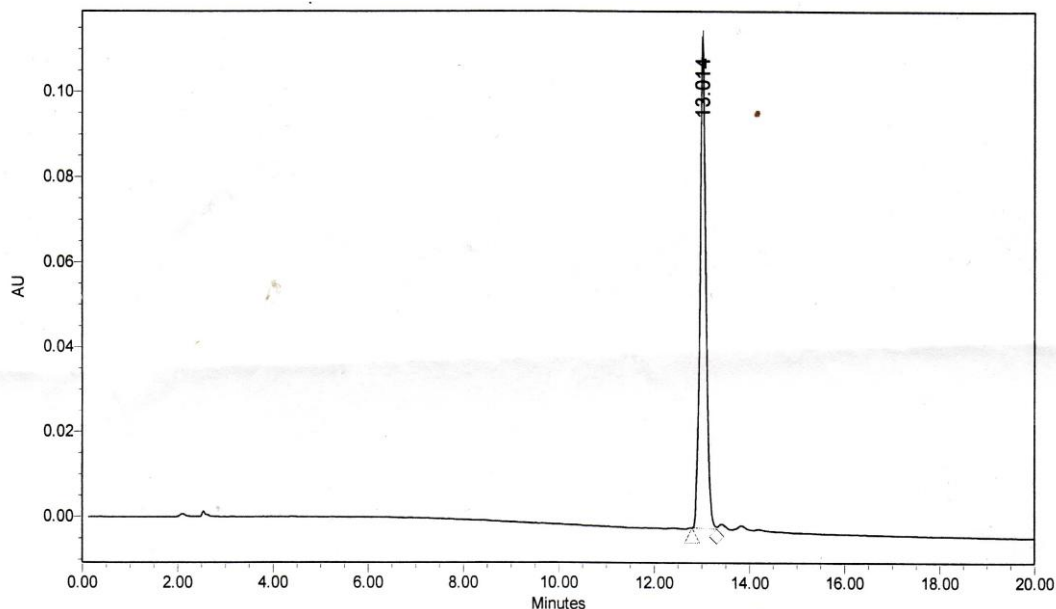
Η θειοανισόλη και το H₂O δρουν ως δεσμευτές των τριτοταγών βουτυλοκατιόντων που σχηματίζονται κατά την απομάκρυνση της ομάδας Boc, τα οποία είναι σταθερά και μπορούν να προσβάλλουν τις νουκλεόφιλες πλάγιες αλυσίδες αμινοξέων όπως της Trp.

Το Demobesin 2 μετά από καθαρισμό με ημι-παρασκευαστική HPLC παραλήφθηκε σε χημικά καθαρή μορφή όπως διαπιστώθηκε από τον έλεγχο καθαρότητας που πραγματοποιήθηκε με αναλυτική HPLC (Σχήμα 11.4). Η απόδοση του τελικού προϊόντος ήταν 55% όπως υπολογίστηκε με βάση την ποσότητα του πεπτιδίου, δεδομένου ότι το Boc₄N₄COOH είχε προστεθεί σε περίσσεια.

RP-HPLC:

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 1. Το Demobesin 2 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 13.0$ min και σε υψηλή καθαρότητα.

Το χρωματογράφημα λαμβάνεται μετά από φωτομετρική ανίχνευση. Παρουσιάζεται το φωτομετρικό ίχνος στα 280 nm γιατί σε αυτό το μήκος κύματος το πεπτιδίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση λόγω της Trp⁸.

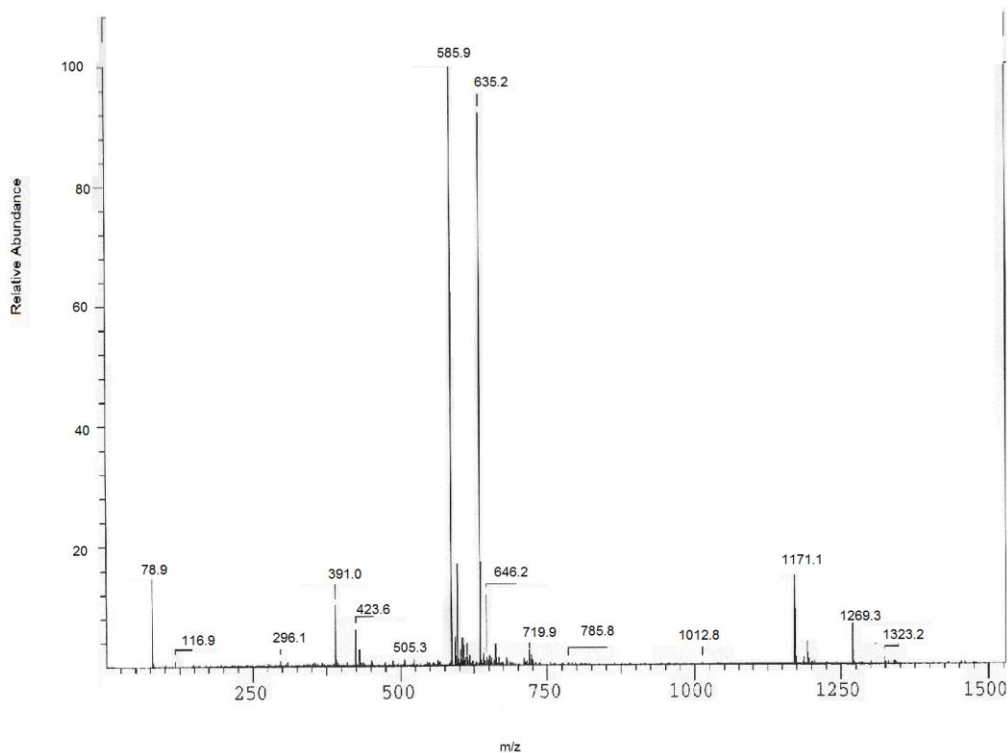


Σχήμα 11.4. Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 2. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρωματογράφο συνδεδεμένο με ανιχνευτή UV-Vis PDA

ES-MS

Η επιβεβαίωση του αναμενόμενου θεωρητικού μοριακού βάρους έγινε με φασματομετρία μάζας θετικών ιόντων με εφαρμογή της μεθόδου ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI-MS (Σχήμα 1.5). Κατά τη μέθοδο αυτή προκαλείται ήπιος ιοντισμός των προϊόντων σε ιόντα που συχνά φέρουν πολλαπλά φορτία. Το φορτίο σε κάθε ιόν και η μοριακή μάζα του πεπτιδίου προσδιορίστηκαν με ειδικά σχεδιασμένους αλγορίθμους. Το φάσμα μάζας έδωσε χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται στα ιοντικά θραύσματα του Demobesin 2 που προκύπτουν και αντιστοιχούν στο λόγο της μάζας m προς το φορτίο τους z (m/z). Το MB του Demobesin 2 [M] είναι 1169.7 Η κορυφή που αντιστοιχεί σε m/z 1171.1 αποδίδεται στο κατιόν που προκύπτει από την πρόσληψη ενός πρωτονίου από το Demobesin 2, οπότε δίνει το ιοντικό θραύσμα $[M+H]^+$, ενώ κορυφή που αντιστοιχεί σε m/z 585.9, αποδίδεται στο κατιόν που προκύπτει από την πρόσληψη δύο πρωτονίων από το

Demobesin 2, οπότε δίνει το ιοντικό θραύσμα $[M+2H]^{2+}/2$. Οι κορυφές που εμφανίζονται σε m/z 635.3 και m/z 1269.3, των οποίων οι διαφορές σε σχέση με τις m/z 635.3 και m/z 1171.1 είναι αντίστοιχα 49 και 98, είναι πιθανόν να οφείλονται στη παρουσία στο δείγμα MeOH και το σχηματισμό δεσμού-H με το H₂O.



Σχήμα 11.5: Φάσμα ESI-MS του Demobesin 2

Στον πίνακα 11.1 δίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος μάζας του Demobesin 2 και η απόδοσή τους στα αντίστοιχα ιοντικά θραύσματα:

Πίνακας 11.1.: Δεδομένα MS Demobesin 2

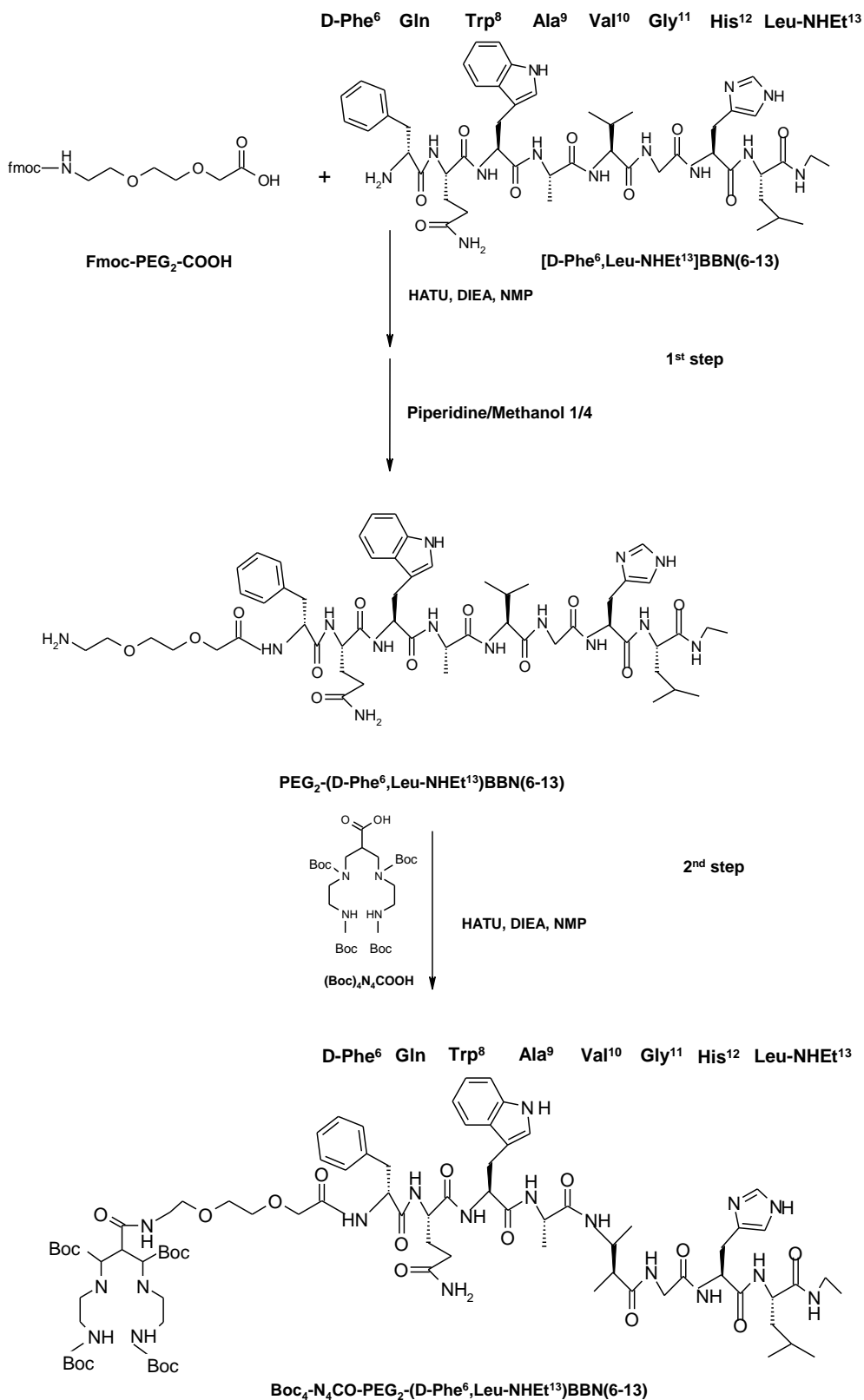
	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1169.7	-	-
$[M + H]^+$	1170.7	1171.1	12
$[M + 2H]^{2+}/2$	585.85	585.9	100

11.2. Demobesin 7

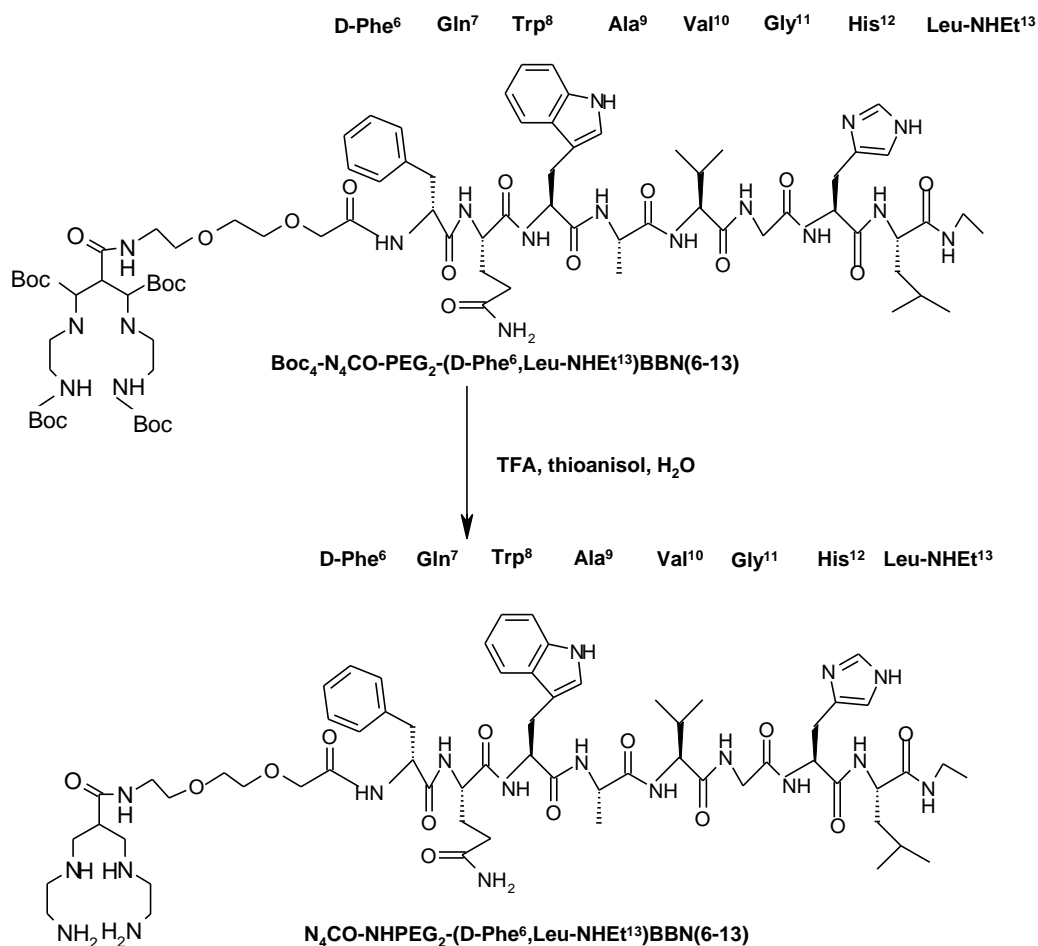
Η σύνθεση του Demobesin 7 πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα και ολοκληρώθηκε σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο έγινε σύζευξη του συνδετικού μορίου Fmoc-PEG₂-COOH και απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας με πιπεριδίνη, στο δεύτερο στάδιο σύζευξη του προστατευμένου τετρααμινικού υποκαταστάτη στο N-τελικό άκρο του συνδετικού μορίου (Σχήμα 11.6.), ενώ στο τρίτο στάδιο έγινε απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων (Σχήμα 11.7.).

Η εισαγωγή του συνδετικού μορίου πραγματοποιήθηκε παρουσία αντιδραστηρίου σύζευξης HATU και DIEA σε διαλύτη NMP ώστε να απομακρύνει το σύμπλοκο [^{99m}Tc^V(O)₂(N₄)]⁺ από το τμήμα αναγνώρισης του υποδοχέα. Σκοπός ήταν να μελετηθεί ποια θέση του διλειτουργικού χηλικού υποκαταστάτη στη πεπτιδική αλυσίδα ήταν πιο ευνοϊκή για την αύξηση της συγγένειας δέσμησης για τον GRP-R αλλά και για άλλες βιολογικές ιδιότητες του επισημασμένου πεπτιδίου.

Η απομάκρυνση της Fmoc-προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες, παρουσία μίγματος πιπεριδίνης και MeOH. Η σύζευξη του Boc-προστατευμένου τετρααμινικού υποκαταστάτη έγινε σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε στην §11.1. μεταξύ της καρβοξυλομάδας του Boc₄-N₄-COOH και της τελικής αμινομάδας, όπως προέκυψε μετά τη σύζευξη σε αυτή του συνδετικού μορίου.



Σχήμα 11.6: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 7 σε διάλυμα. 1^ο στάδιο: σύζευξη του συνδετικού μορίου Fmoc-PEG₂-COOH στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου - 2^ο στάδιο: Σύζευξη του (Boc₄)N₄COOH στο N-τελικό άκρο του συνδετικού μορίου

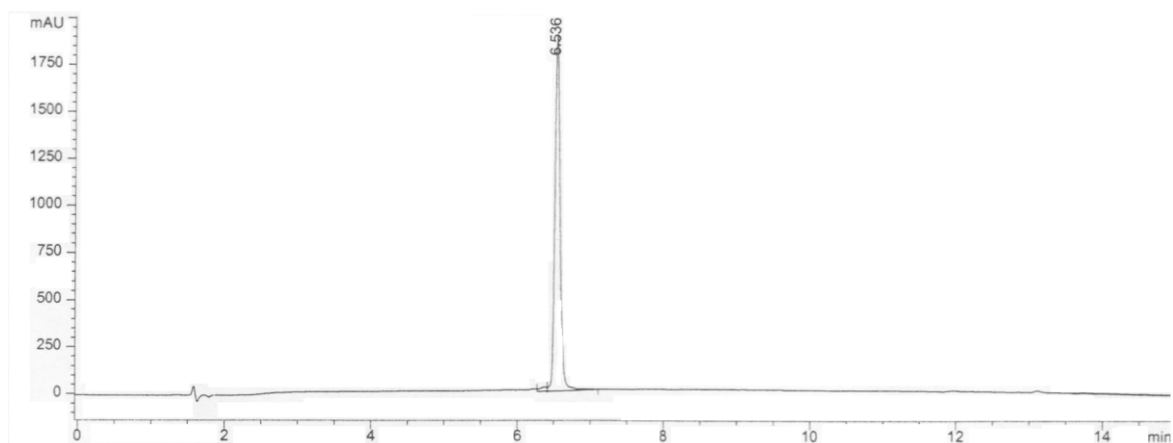


Σχήμα 11.7: Πορεία σύνθεσης του Demobesin 7 σε διάλυμα. 3^ο στάδιο: Αποπροστασία με επίδραση TFA παρουσία θειοανισόλης και H₂O για την δέσμευση κατιόντων

Το Demobesin 7 μετά από καθαρισμό με ημι-παρασκευαστική HPLC παραλήφθηκε σε χημικά καθαρή μορφή όπως αποδείχθηκε από τον έλεγχο καθαρότητας που πραγματοποιήθηκε με αναλυτική HPLC (Σχήμα 1.8.) και με απόδοση 65% ως προς τη χρησιμοποιούμενη ποσότητα του πεπτιδίου.

RP-HPLC

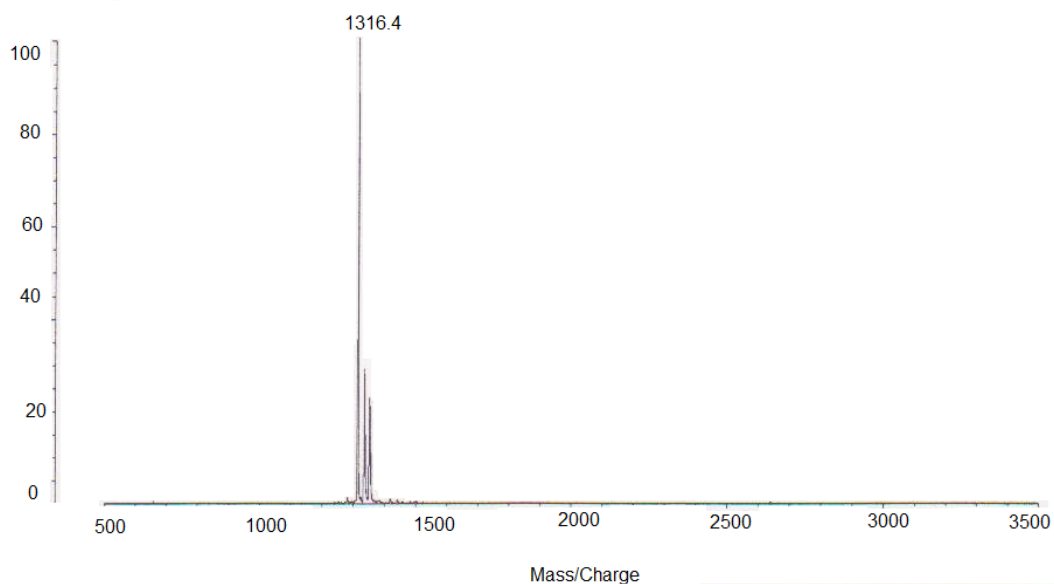
Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 2. Το Demobesin 7 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 6.5$ min και σε υψηλή καθαρότητα (Σχήμα 11.8.).



Σχήμα 11.8: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 7 (Σύστημα 2)

Maldi - TOF MS

Η αναμενόμενη δομή του Demobesin 7 επιβεβαιώθηκε με φασματομετρία μάζας Maldi-TOF MS (Σχήμα 11.9.). Το φάσμα μάζας έδωσε χαρακτηριστική κορυφή που αποδίδεται στο Demobesin 7 και αντιστοιχεί στο λόγο της μάζας m προς το φορτίο του z (m/z). Το MB του Demobesin 7 [M] είναι 1315.6. Η κορυφή που αντιστοιχεί σε m/z 1316.4 αποδίδεται στο κατιόν που προκύπτει από την πρόσληψη ενός πρωτονίου από το Demobesin 7, οπότε δίνει το $[M+H]^+$.



Σχήμα 11.9: Φάσμα Maldi-TOF MS του Demobesin 7

Στον Πίνακα 11.2 δίνεται η χαρακτηριστική κορυφή του φάσματος μάζας του Demobesin 7 και η απόδοσή της:

Πίνακας 11.2.: Δεδομένα MS Demobesin 7

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1315.6		
[M + H ⁺] ⁺	1316.6	1316.4	100

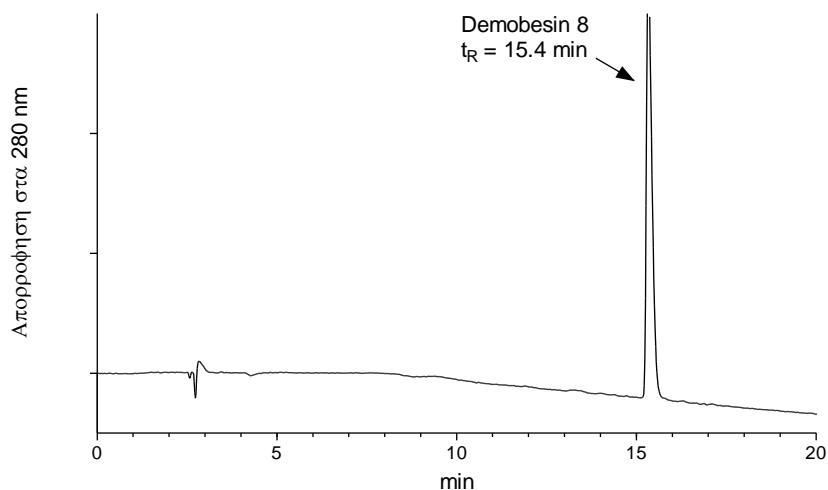
11.3. Demobesin 8-12

Τα πεπτιδικά ανάλογα Demobesin 8-12 συντέθηκαν σε στερεή φάση και η σύνθεση τους δεν αναφέρεται εδώ. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά στοιχεία για το καθένα από αυτά με αναλύσεις HPLC που αφορούν την καθαρότητα και Maldi-TOF MS για τον χαρακτηρισμό τους. Στα Σχήματα 11.10.-11.19. παρατίθενται αντιπροσωπευτικά χρωματογράφημα HPLC καθώς και τα αντίστοιχα Maldi-TOF MS:

Demobesin 8:

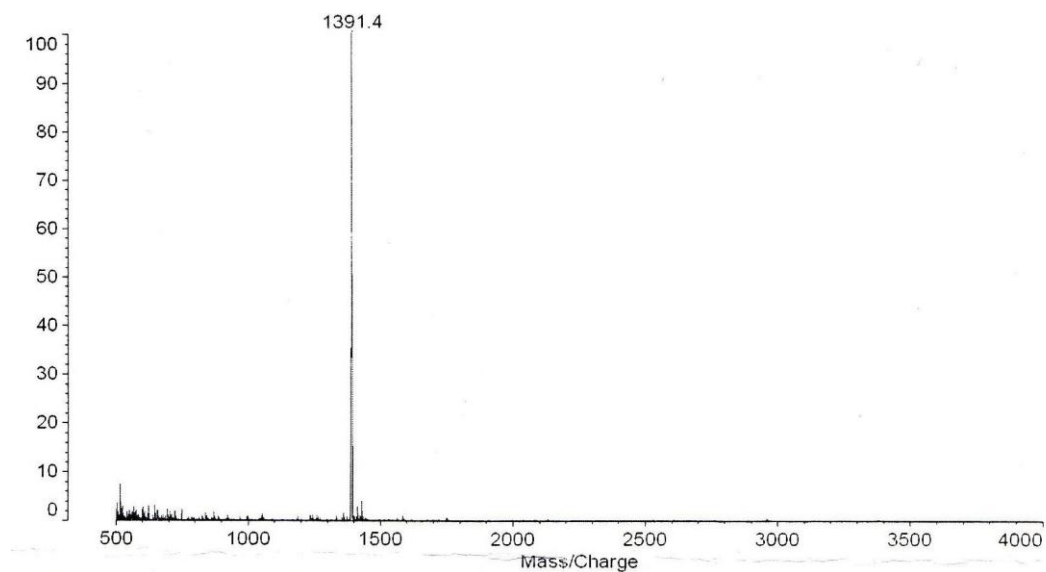
RP-HPLC

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 3. Το Demobesin 8 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 15.4$ min και σε καθαρότητα ~ 95%. (Σχήμα 11.10.).



Σχήμα 11.10.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 8 (Σύστημα 3)

Maldi - TOF MS



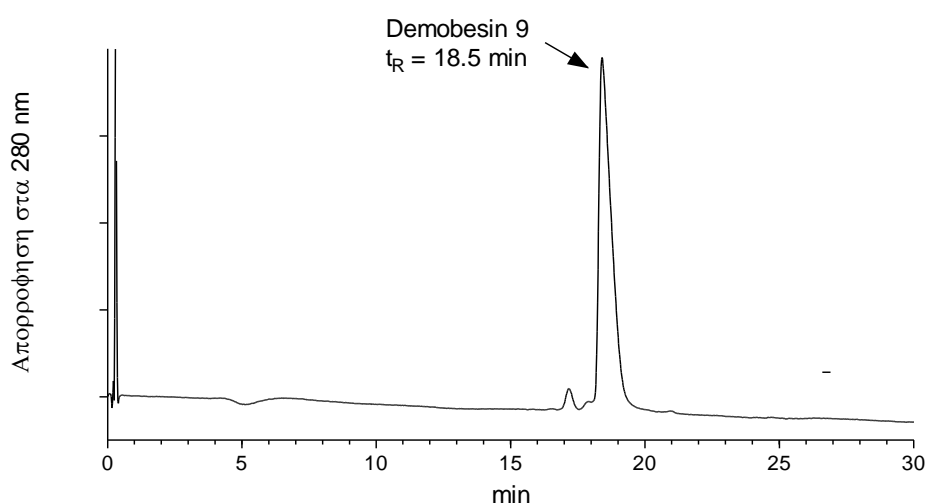
Σχήμα 11.11: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 8

Πίνακας 11.3.: Δεδομένα MS Demobesin 8

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1390.7		
[M + H] ⁺	1391.7	1391.4	100

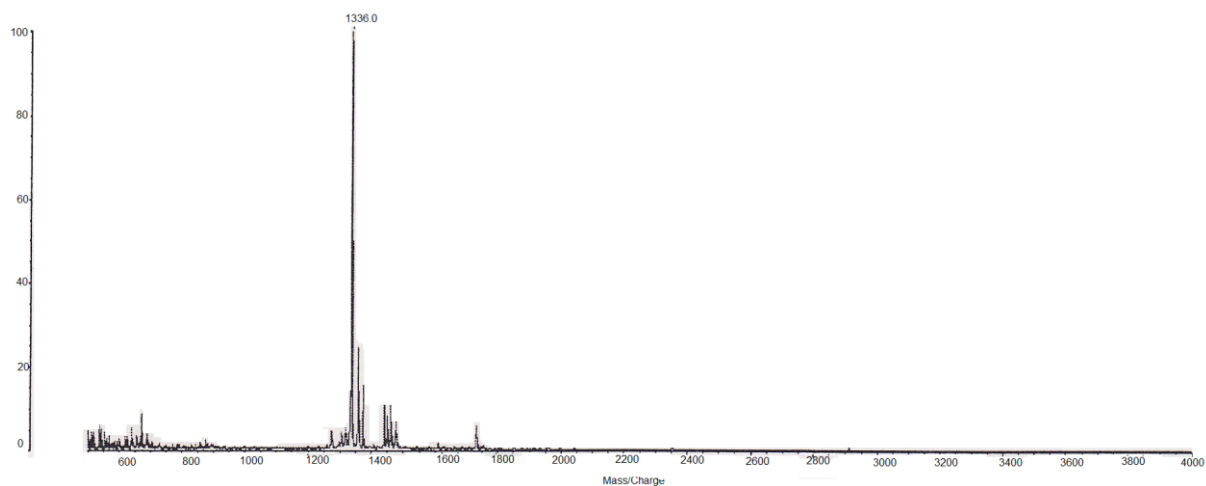
Demobesin 9:

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 4. Το Demobesin 9 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 18.4$ min και σε καθαρότητα ~ 96% (Σχήμα 11.12.).



Σχήμα 11.12.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 9 (Σύστημα 4)

Maldi - TOF MS



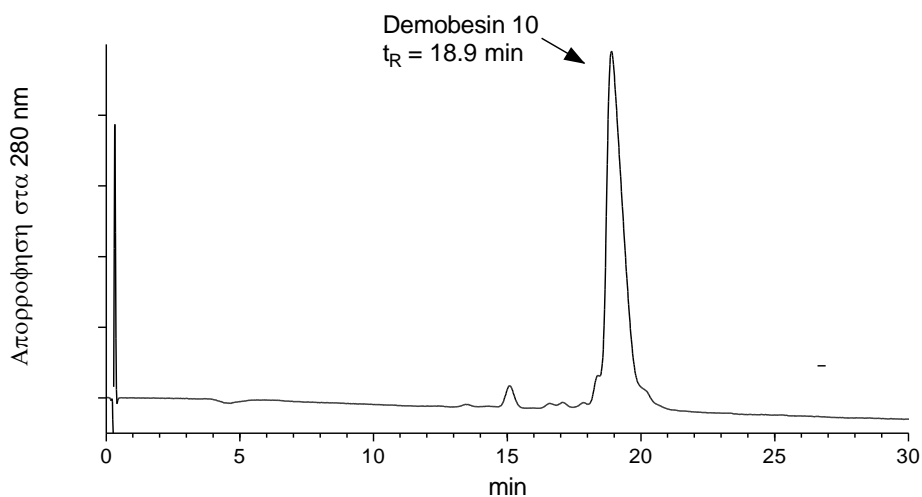
Σχήμα 11.13: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 9

Πίνακας 11.4.: Δεδομένα MS Demobesin 9

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1337.0		
[M + H] ⁺	1338.0	1336.0	100

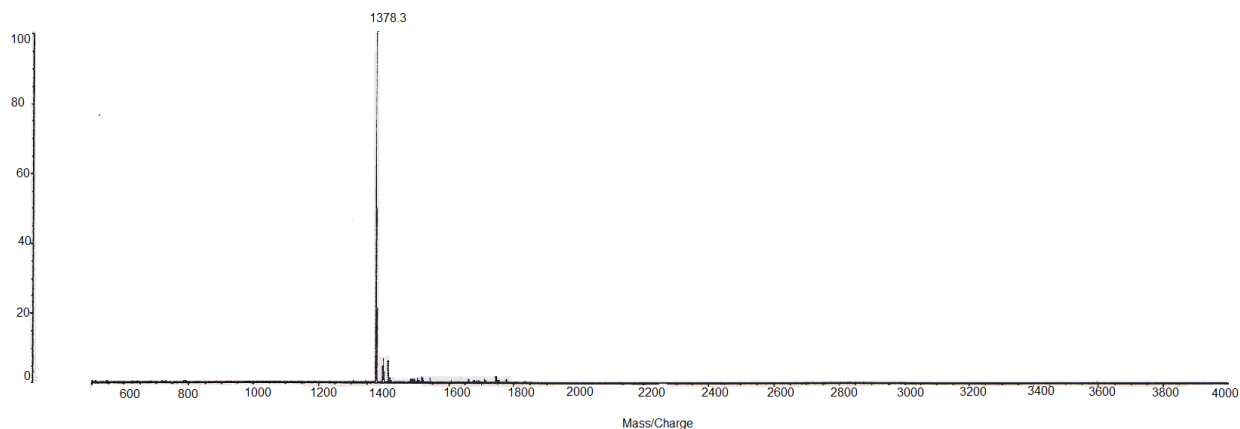
Demobesin 10:

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 4. Το Demobesin 10 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 18.9$ min και σε καθαρότητα ~ 92%. (Σχήμα 11.14.)



Σχήμα 11.14.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 10 (Σύστημα 4)

Maldi - TOF MS



Σχήμα 11.15: Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 10

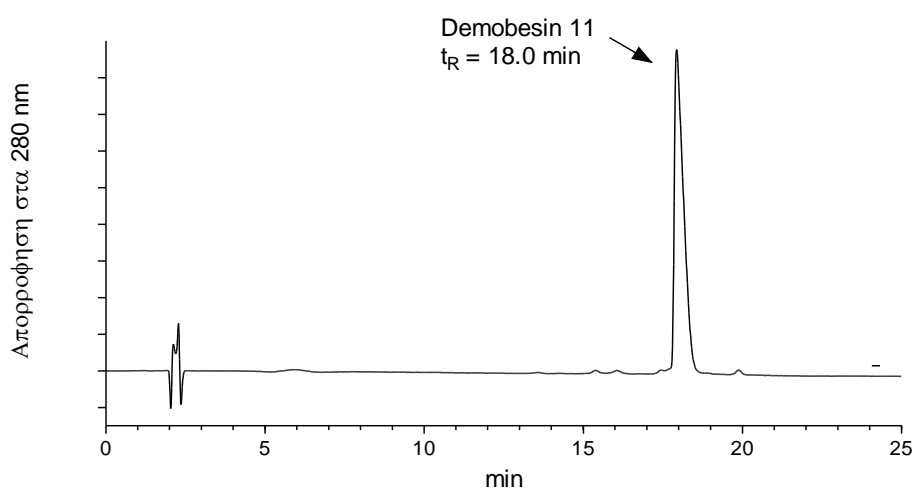
Πίνακας 11.5.: Δεδομένα MS Demobesin 10

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1377.6		
[M + H] ⁺	1378.6	1378.3	100

Demobesin 11:

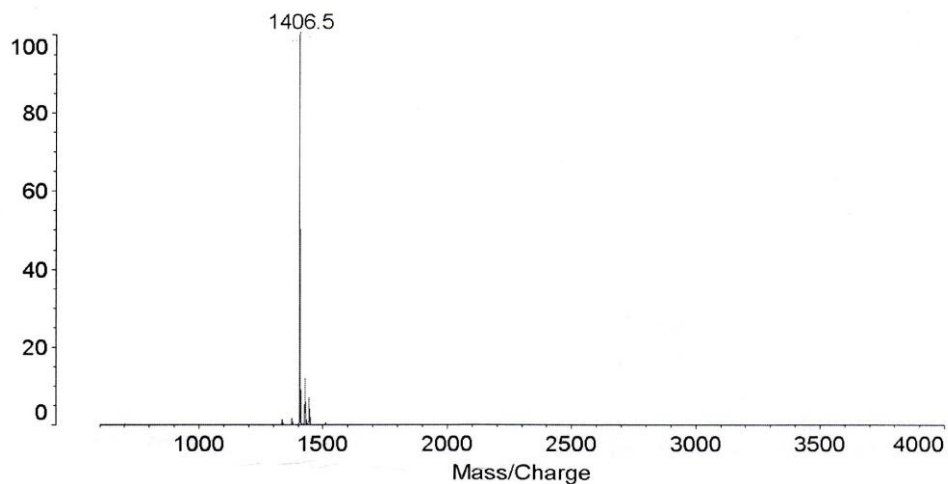
RP-HPLC

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 5. Το Demobesin 11 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 18.0$ min και σε υψηλή καθαρότητα ~ 97%. (Σχήμα 11.16.)



Σχήμα 11.16.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 11 (Σύστημα 5)

Maldi - TOF MS



Σχήμα 11.17: Φάσμα Φάσμα MALDI-TOF MS του Demobesin 11

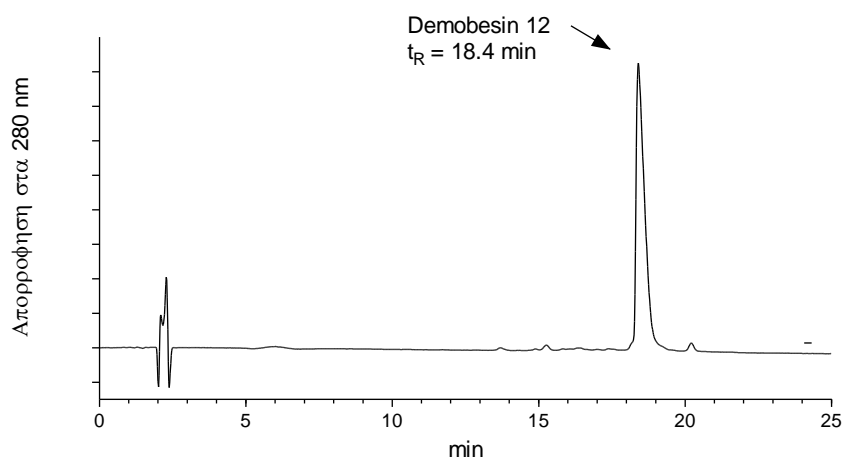
Πίνακας 11.6.: Δεδομένα MS Demobesin 11

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1404.7		
[M + H ⁺] ⁺	1405.7	1406.5	100

Demobesin 12:

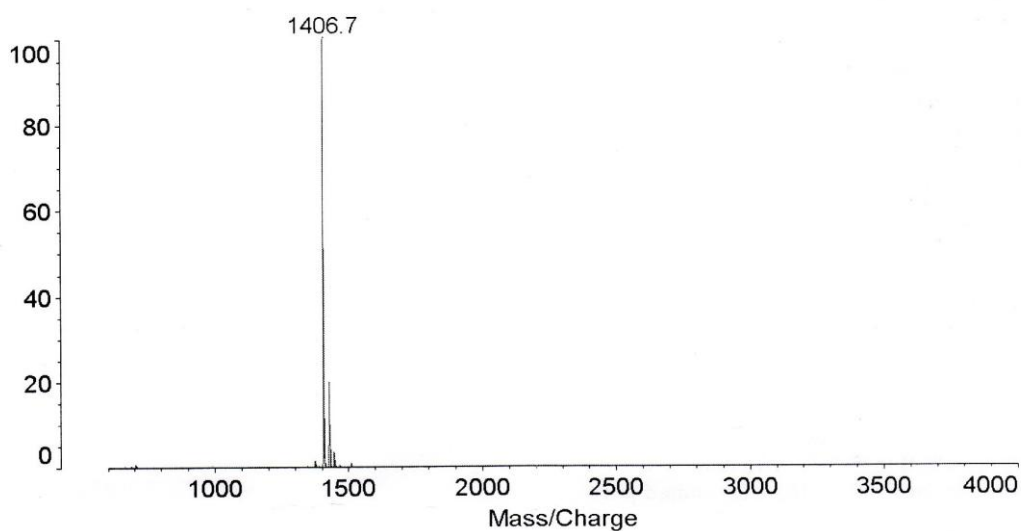
RP-HPLC

Χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα 5. Το Demobesin 12 ανιχνεύτηκε σε $t_R = 18.4$ min και σε υψηλή καθαρότητα > 97% (Σχήμα 11.18).



Σχήμα 11.18.: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC Demobesin 12 (Σύστημα 5)

Maldi - TOF MS



Σχήμα 11.19.: Φάσμα MALDI-TOF MS που Demobesin 12

Πίνακας 11.7.: Δεδομένα MS Demobesin 12

	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z	% αφθονία
[M]	1404.7		
[M + H] ⁺	1405.7	1406.7	100

Πίνακας 11.8.: Συγκεντρωτικά αναλυτικά δεδομένα για τα πεπτίδια

Πεπτίδιο	Καθαρότητα (%)	Αναμενόμενο MW, m/z (g/mol)	m/z [M+H] ⁺	RP-HPLC t _R (min) *
Demobesin 2	>98%	1169.7	1171.1	13.0 ¹
Demobesin 7	>97%	1315.6	1316.6	6.5 ²
Demobesin 8	>95%	1390.7	1391.4	15.4 ³
Demobesin 9	>96%	1337.0	1336.0	18.4 ⁴
Demobesin 10	>92%	1377.6	1378.3	18.9 ⁴
Demobesin 11	>95%	1404.7	1406.5	18.0 ⁵
Demobesin 12	>95%	1404.7	1406.7	18.4 ⁵

*Τα Συστήματα 1 έως 5 που αναφέρονται εδώ περιγράφονται αναλυτικά στη σελίδα 207.

12. Ραδιοχημεία

12.1. [^{99m}Tc]Demobesin

Η επισήμανση των πεπτιδικών αναλόγων με ^{99m}Tc [248,249] έγινε με ανάμιξη διαλύματος υπερτεχνητικών ανιόντων (^{99m}TcO₄⁻) παρουσία του εκάστοτε πεπτιδίου, φρέσκου διαλύματος χλωριούχου κασσιτέρου (SnCl₂) και κιτρικών ιόντων σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 11.5) και επώαση του μίγματος για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου (Σχήμα 12.1.).

Το SnCl₂ χρησιμοποιήθηκε ως αναγωγικό αντιδραστήριο για την αναγωγή του Tc από την οξειδωτική βαθμίδα VII στην V, ώστε να είναι εφικτή η συναρμογή. Χρησιμοποιείται περίσσεια SnCl₂ επειδή μέρος του μπορεί να οξειδωθεί σε Sn(IV) από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο [250].

Η αναγωγή του ^{99m}TcO₄⁻ από τον SnCl₂ μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό κολλοειδούς τεχνητίου (^{99m}Tc^{IV}O₂.xH₂O) το οποίο επηρεάζει την ραδιοχημική απόδοση σχηματισμού του επισημασμένου πεπτιδίου. Τα κιτρικά ιόντα προστίθενται στο μίγμα επισήμανσης ως βοηθητικός χημικός υποκαταστάτης για την αποφυγή σχηματισμού του ^{99m}Tc^{IV}O₂.xH₂O παρεμποδίζοντας την περαιτέρω αναγωγή του ραδιομετάλλου και σταθεροποιώντας το Tc^V με σχηματισμό του ενδιάμεσου «χαλαρού» συμπλόκου Tc^V-κιτρικό οξύ.

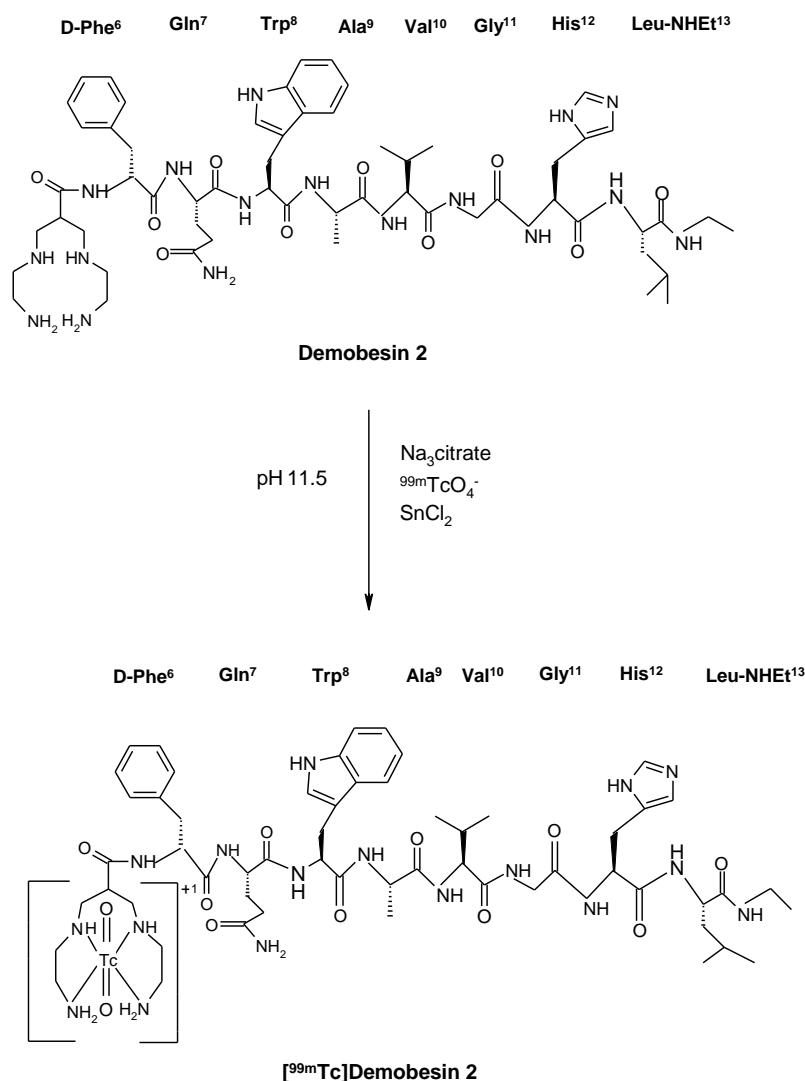
Η επισήμανση ολοκληρώθηκε σε αλκαλικό περιβάλλον με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων. Στο αλκαλικό περιβάλλον της αντίδρασης, οι αμινομάδες του N₄ βρίσκονται σε μη πρωτονιωμένη μορφή⁶, με αποτέλεσμα να ευνοείται η συναρμογή του ραδιομετάλλου από τον τετραμινικό υποκαταστάτη [251]. Όπως αναφέρεται στην § 5.8.1., το σύμπλοκο που σχηματίζεται κατά την επισήμανση αναμένεται να είναι μονοκατιονικό οκταεδρικής δομής και περιέχει τον πυρήνα *trans*-TcO₂⁺. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7 με προσθήκη HCl. Η επισήμανση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς να απαιτείται θέρμανση [252,253] διευκολύνοντας τους χειρισμούς.

⁶ Διάλυμα 1 M NaClO₄ log *k*₁ 10.28, log *k*₂ 9.64 log *k*₃ 7.43 log *k*₄ 6.09

Διάλυμα 0.1 M KNO₃ log *k*₁ 10.02, log *k*₂ 9.24 log *k*₃ 6.89 log *k*₄ 5.53

Όλα τα ραδιοπεπτίδια παραλήφθηκαν με υψηλή καθαρότητα και απόδοση επισήμανσης > 97% εκτός από την περίπτωση των Demobesin 9 και Demobesin 10, όπου η επισήμανση έδωσε πλήθος παραπροϊόντων πιθανόν λόγω επίδρασης του υδραζιδικού C-τελικού άκρου τους με το μέταλλο.

Η ειδική ραδιενέργεια των ραδιοεπισημασμένων πεπτιδίων ήταν ~1 Ci/μmol πεπτιδίου η οποία θεωρείται ικανοποιητική για εφαρμογή στην *in vivo* στόχευση των υποδοχέων [254].



Σχήμα 12.1: Χαρακτηριστική αντίδραση επισήμανσης με ^{99m}Tc για το Demobesin 2

Τα ραδιοεπισημασμένα ανάλογα ελέγχθηκαν με παράλληλες αναλύσεις HPLC και ITLC [255].

HPLC

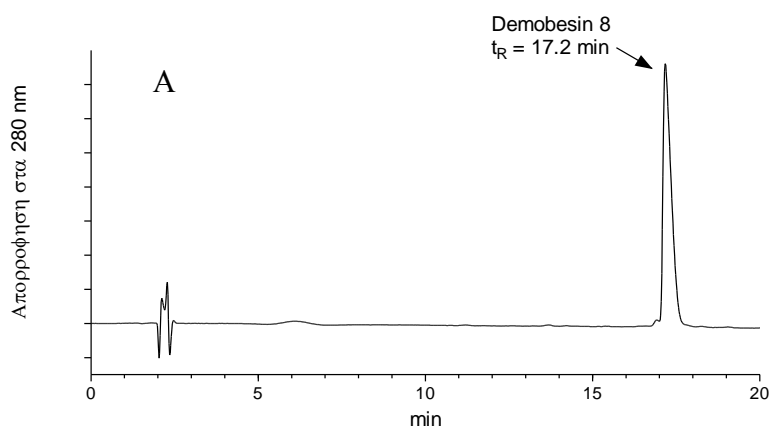
Επειδή η συγκέντρωση των ραδιοπεπτιδίων που ελέγχονται με HPLC είναι στην κλίμακα των nM απαιτείται ανιχνευτής γ. Προσδιορίστηκε η ραδιοχημική καθαρότητα του κάθε επισημασμένου αναλόγου καθώς και η πιθανή παρουσία κοινών ραδιοχημικών προσμίξεων όπως $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($t_R=3.8$ min) και ^{99m}Tc -κιτρικά ($t_R=1.4-1.8$ min). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 12.1.

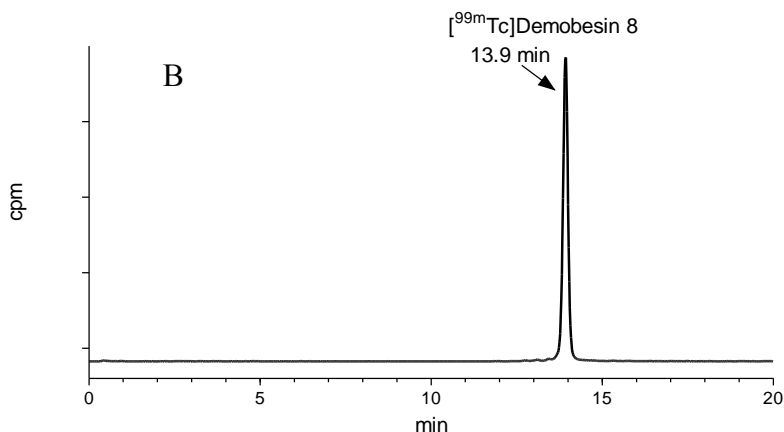
Πίνακας 12.1: Συγκεντρωτικά αναλυτικά χαρακτηριστικά των επισημασμένων αναλόγων:

Ραδιοπεπτίδιο	RP-HPLC t_R (min)
$[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 2	13.6 ⁶
$[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 7	6.8 ⁷
$[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 8	13.9 ⁶
$[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 11	14.9 ⁸
$[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 12	14.0 ⁸

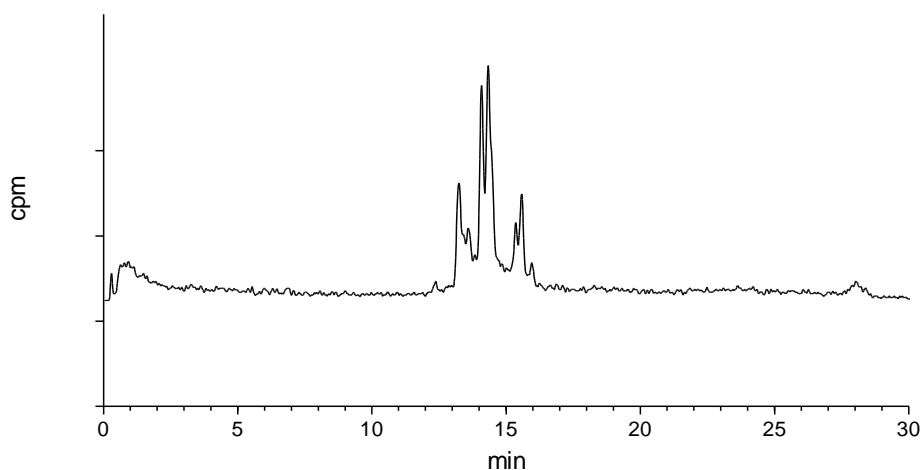
Τα χρωματογραφικά συστήματα 6 έως 8 που αναφέρονται εδώ περιγράφονται αναλυτικά στη σελίδα 207.

Στο σχήμα 12.2 παρατίθεται χαρακτηριστικό χρωματογράφημα (φωτομετρικό και ραδιομετρικό ίχνος) του μίγματος επισήμανσης του $[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 8, ενώ στο σχήμα 12.3. παρατίθεται χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του μίγματος επισήμανσης του $[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 9, όπου και φαίνεται ο σχηματισμός πλήθους παραπροϊόντων.





Σχήμα 12.2. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 8. A) Φωτομετρική ανίχνευση B) Ραδιομετρική ανίχνευση. Πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο συνδεδεμένο παράλληλα με ανιχνευτή UV-Vis PDA και ανιχνευτή-γ (Σύστημα 6)



Σχήμα 12.3. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 9 Ραδιομετρική ανίχνευση (Σύστημα 6)

ITLC

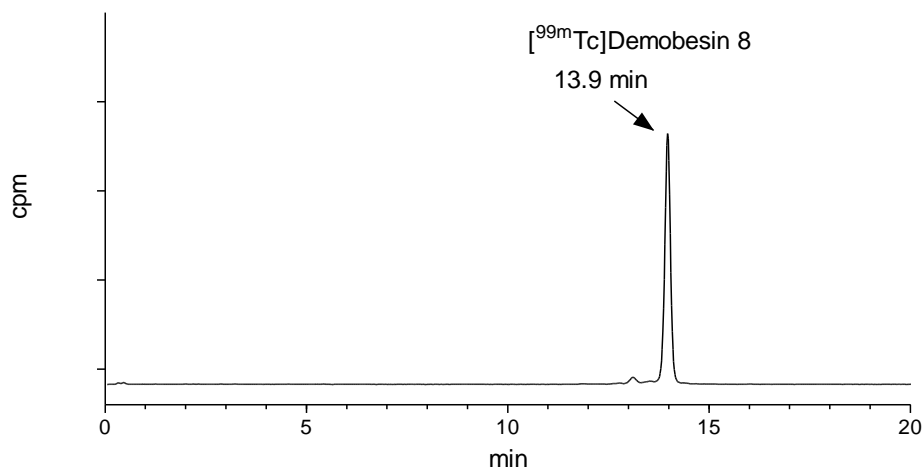
Αναλύθηκαν μίγματα επισήμανσης χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης.

Για την ανίχνευση του $^{99m}\text{TcO}_4^-$ χρησιμοποιήθηκε ακετόνη ενώ για την ανίχνευση κολλοειδούς τεχνητίου χρησιμοποιήθηκε μίγμα $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{MeOH}$ 1/1 (v/v).

Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υψηλή καθαρότητα των επισημασμένων πεπτιδίων, την απουσία υπερτεχνητικών ανιόντων και απέκλεισαν τον σχηματισμό κολλοειδούς $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας των ραδιοπεπτιδίων με συνδυασμό HPLC και ITLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν για τα επισημασμένα ανάλογα

υψηλή σταθερότητα ακόμα και 24 h μετά την επισήμανση. Για παράδειγμα για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρατηρείται υψηλή σταθερότητα (> 97%) ακόμα και 24 h μετά την επισήμανση (Σχήμα 12.4.).



Σχήμα 12.4. Χρωματογράφημα HPLC [^{99m}Tc]Demobesin 8 24 h μετά την επισήμανση (Σύστημα 6)

12.2. Επισήμανση με ^{99m}Tc και προσθήκη φορέα ^{99g}Tc

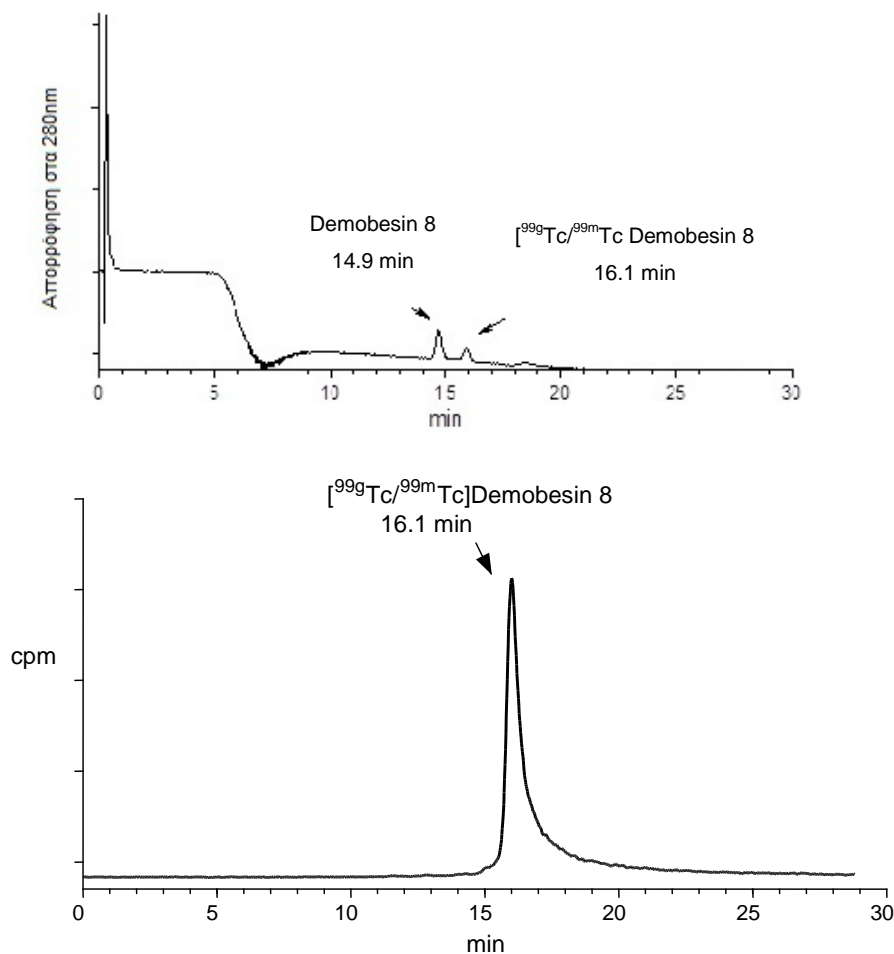
Για την μελέτη της δέσμευσης κορεσμού υποδοχέων GRP απαιτείται σειρά συγκεντρώσεων ραδιοπεπτιδίου 0.01 nM – 10 nM. Η ειδική ραδιενέργεια του ^{99m}Tc είναι υψηλή (520 Ci/μmol), οπότε η παρασκευή διαλυμάτων με υψηλή συγκέντρωση ^{99m}Tc θα οδηγούσε σε υψηλή εκπομπή ακτινοβολίας γ. Προς αποφυγή προβλημάτων ακτινοπροστασίας αλλά και για την λήψη ραδιοπεπτιδίων επαρκούς μάζας, προστέθηκε επαρκής και ακριβώς ποσοτικοποιημένη συγκέντρωση ^{99g}Tc κατά τη σύνθεση του ραδιοπεπτιδίου. Το ^{99g}Tc είναι ψευδο-σταθερό ραδιονουκλίδιο (τεχνητό φορέας) που εκπέμπει ασθενή β-ακτινοβολία με $t_{1/2} 2.11 \times 10^5$ y. Η προσθήκη ^{99g}Tc είχε σαν αποτέλεσμα τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα να έχουν την απαιτούμενη μάζα, ενώ παράλληλα η παρουσία του ^{99m}Tc επέτρεπε το προσδιορισμό του δεσμευμένου στον υποδοχέα ραδιοπεπτιδίου λόγω της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας γ.

Η επισήμανση με ^{99m}Tc και η προσθήκη φορέα ^{99g}Tc, πραγματοποιήθηκαν με ανάμιξη διαλύματος ^{99m}TcO₄⁻, διαλύματος NH₄^{99g}TcO₄, του πεπτιδίου, παρουσία SnCl₂ ως αναγωγικού, και κιτρικών ανιόντων σε pH 11.5 και παραμονή του μίγματος για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα SnCl₂

σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την επισήμανση με ^{99m}Tc ώστε να γίνει πλήρης αναγωγή των $^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}/^{99g}\text{Tc}^{\text{VII}}$ σε $^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}/^{99g}\text{Tc}^{\text{V}}$. Κατόπιν πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις RP-HPLC και χρωματογραφίας επί χάρτου.

RP-HPLC

$[^{99m}\text{Tc}/^{99g}\text{Tc}]$ Demobesin 8 όπου φαίνεται ότι ο σχηματισμός ήταν ποσοτικός (>97%), η απομόνωση του ασφαλούς και οδήγησε σε προϊόντα υψηλής καθαρότητας.



Σχήμα 12.5.: Χρωματογράφημα HPLC $[^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 8. Φωτομετρική ανίχνευση (πάνω). Ραδιομετρική ανίχνευση (κάτω). Πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο συνδεδεμένο παράλληλα με ανιχνευτή UV-Vis (280 nm) και ανιχνευτή-γ (Σύστημα 6).

Το $[^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 8 απομονώθηκε με επιτυχία από το μίγμα της αντίδρασης με ημιπαρασκευαστική HPLC .

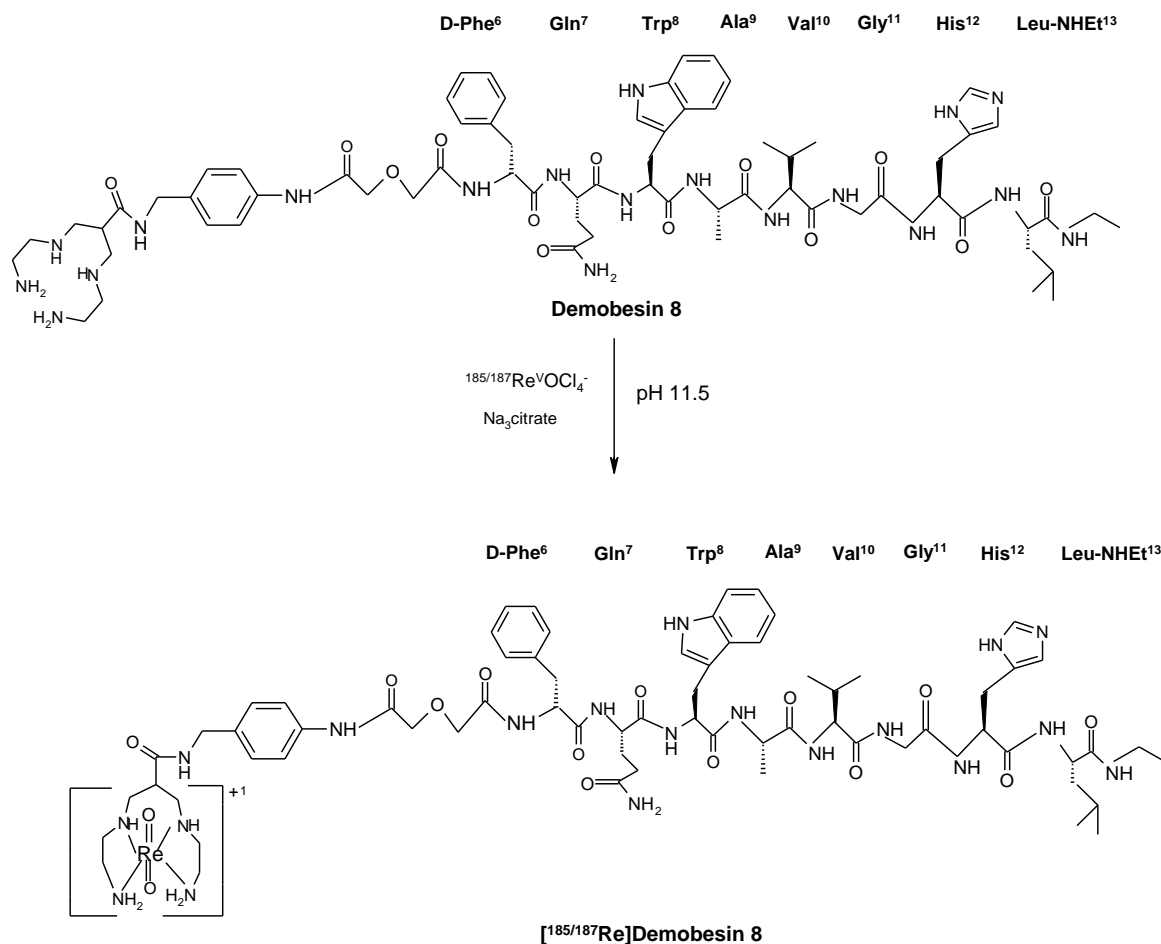
Χρωματογραφία επί χάρτου

Σκοπός της ανάλυσης ήταν να προσδιοριστεί το ποσοστό του $[\text{}^{99g}\text{Tc}/\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ μέχρι και 24 h μετά το πέρας της αντίδρασης. Κατά την διάρκεια των 24 h το $[\text{}^{99g}\text{Tc}/\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin 8}$ παρέμεινε στους 4°C. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα ανάπτυξης με κινητή φάση ακετόνη (§ 12.1. σελ. 123). Ανιχνεύθηκε πολύ μικρό ποσοστό $[\text{}^{99g}\text{Tc}/\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ ακόμα και μετά από 24 h, δηλαδή το σύμπλοκο του μετάλλου με το τετρααμινικό υποκαταστάτη είναι σταθερό στις συνθήκες φύλαξης του.

12.3. Σύνθεση του $[\text{}^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin 8}$

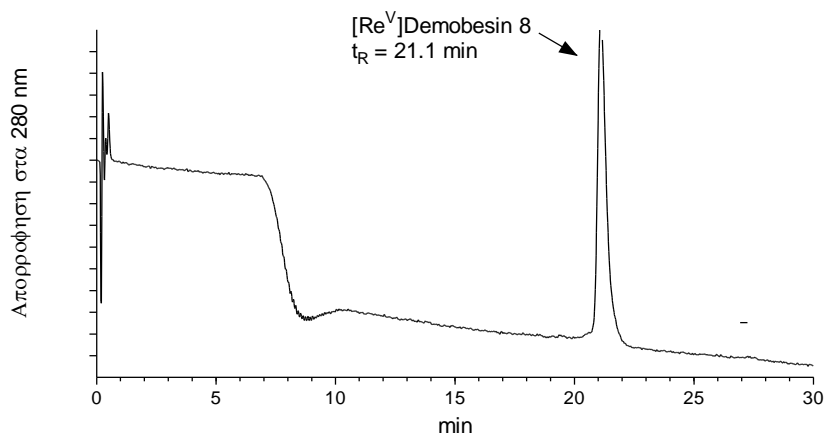
Παρασκευάστηκε το σύμπλοκο του πεπτιδικού αναλόγου με $^{185/187}\text{Re}^7$ με τη μέθοδο ανταλλαγής υποκαταστατών. Χρησιμοποιήθηκε Demobesin 8, πρόδρομο σύμπλοκο του οξορρηνίου $[(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}][\text{}^{185/187}\text{Re}^{\text{V}}\text{OCl}_4]$ [256] το οποίο έχει διαλυτοποιηθεί σε MeOH, παρουσία περίσσειας κιτρικών ανιόντων σε υδατικό αλκαλικό περιβάλλον. Στο αλκαλικό περιβάλλον της αντίδρασης (pH 11.5) οι αμινοομάδες του τετρααμινικού υποκαταστάτη (N_4) βρίσκονται σε μη πρωτονιωμένη μορφή, με αποτέλεσμα να ευνοείται η συναρμογή του ραδιομετάλλου από αυτόν. Το $^{185/187}\text{Re}^{\text{V}}$ δεσμεύεται σταθερά από τα τέσσερα άτομα-δότες του N_4 με τη μορφή $\textit{trans}\text{-}[\text{}^{185/187}\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})_2(\text{N}_4)]^+$, και προκύπτει το επιθυμητό σύμπλοκο $[\text{}^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin 8}$. Τα $[\text{}^{185/187}\text{Re}^{\text{V}}(\text{O})_2(\text{N}_4)]^+$ σύμπλοκα είναι μονοκατιονικά και φέρουν πυρήνα διοξορρηνίου με τα 2 άτομα οξυγόνου σε θέση “*trans*” μεταξύ τους να καταλαμβάνουν τις κορυφές του οκταέδρου ενώ τα 4 άτομα αζώτου του τετρααμινικού υποκαταστάτη να σχηματίζουν το επίπεδο της βάσης του [27 βιβλ. εισαγωγής]. Στο σχήμα 12.6. φαίνεται η πορεία σύνθεσης του $[\text{}^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin 8}$.

7. Το στοιχείο ρήνιο υπάρχει στη φύση ως μίγμα δύο μη ραδιενεργών νουκλιδίων των ^{185}Re και ^{187}Re



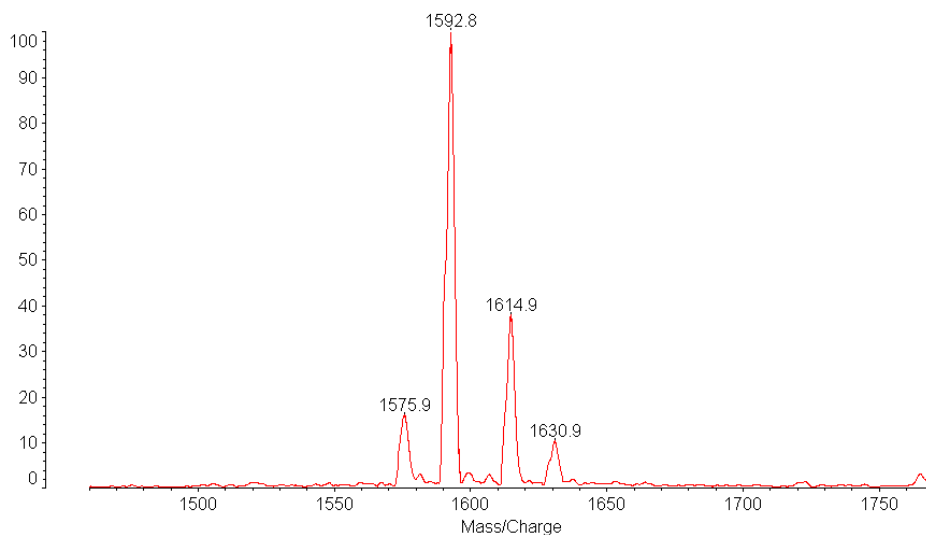
Σχήμα 12.6.: Σύνθεση του [^{185/187}Re]Demobesin 8

Το προϊόν απομονώθηκε με RP-HPLC και κατόπιν λυοφιλοποίησης παραλήφθηκε σε μορφή λευκής σκόνης με απόδοση >97%. Στο σχήμα 12.7. παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του [^{185/187}Re]Demobesin 8.



Σχήμα 12.7: Χρωματογράφημα HPLC του [^{185/187}Re]Demobesin 8 (Σύστημα 8)

Επίσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση ESI-MS [257-259] (σχήμα 12.8.), κατά την οποία επιβεβαιώθηκε η δομή του [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8. Στον πίνακα 12.2. παρατίθενται οι χαρακτηριστικές κορυφές και η απόδοσή τους στα αντίστοιχα ιοντικά θραύσματα για το [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8:



Σχήμα 12.8.: Φάσμα ESI-MS του [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8

Πίνακας 12.2.: Δεδομένα MS [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8

	Αναμενόμενο MW (g/mol)	m/z	ποσοστό %
[$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin 8	1608.67		
[M + H ⁺ -H ₂ O] ⁺	1591.67	1592.8	100
[M + Na ⁺ -H ₂ O] ⁺	1613.67	1614.9	40
[M + K ⁺ -H ₂ O] ²⁺	1629.67	1630.9	10

12.4. Ταυτοποίηση δομής του [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Demobesin 8

Για την ταυτοποίηση της δομής των ραδιοπεπτιδίων, λόγω της υψηλής ειδικής ραδιενέργειας του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (520 Ci/μmol) αλλά και για λόγους ακτινοπροστασίας, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι κλασικές μέθοδοι χαρακτηρισμού (κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, NMR, IR, UV/Vis) γιατί οι απαιτούμενες αναλυτικές συγκεντρώσεις θα περιείχαν επικίνδυνα υψηλά ποσοστά ραδιενέργειας. Πιθανή μείωση των ποσοστών ραδιενέργειας με χρησιμοποίηση χαμηλών συγκεντρώσεων

των μελετούμενων συμπλόκων βρίσκεται εκτός των ορίων ευαισθησίας των μεθόδων αυτών [260]. Η διερεύνηση της δομής του ραδιοπεπτιδίου γίνεται με σύνθεση του αντίστοιχου ^{99g}Tc ή $^{185/187}\text{Re}$ συμπλόκου.

12.4.1. Ταυτοποίηση δομής με σύνθεση του αντίστοιχου ^{99g}Tc -συμπλόκου

Γίνεται σύνθεση του αντίστοιχου ^{99g}Tc -συμπλόκου σε επαρκή ποσότητα (mg) και χαρακτηρίζεται με τις κλασικές χημικές μεθόδους. Κατόπιν πραγματοποιείται HPLC ανάλυση και με σύγκριση των χρόνων έκλουσης των συμπλόκων ^{99m}Tc και ^{99g}Tc διαπιστώνεται αν τα σύμπλοκα είναι ισοδομικά.

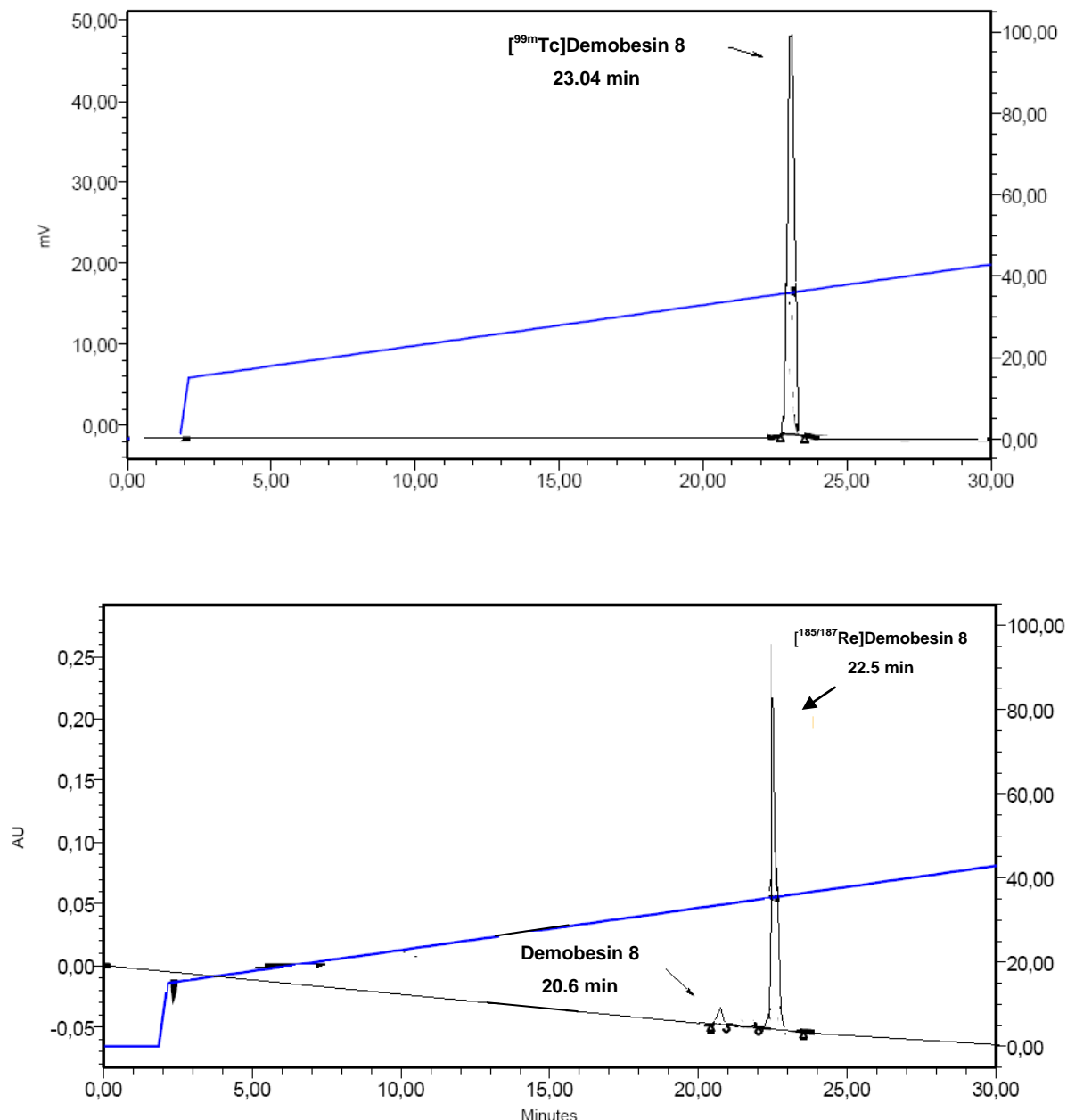
Ωστόσο η χρησιμοποίηση του ^{99g}Tc δεν ενδείκνυται πάντοτε γιατί είναι εκπομπός β-ακτινοβολίας με μεγάλη ημιπερίοδο ζωής ($t_{1/2} = 2.1 \times 10^5 \text{ y}$) και η πιθανή χρήση του θα οδηγούσε σε μόλυνση των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών οργάνων. Επίσης η απομόνωση κρυστάλλων πεπτιδίων συζευγμένων με σύμπλοκα ^{99g}Tc είναι δύσκολη λόγω της υψηλής υδροφιλικότητας τους.

12.4.2. Ταυτοποίηση δομής με σύνθεση του αντίστοιχου [$^{185/187}\text{Re}$]Demobesin

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στηρίζεται στην ομοιότητα στη χημεία των συμπλόκων τεχνητίου και ρηνίου. Τα στοιχεία Tc και Re ανήκουν στην 2^η και 3^η σειρά αντίστοιχα των στοιχείων μετάπτωσης της VIIB ομάδα του Περιοδικού Πίνακα. Το Re έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με το Tc λόγω του φαινομένου της λανθανιδικής συστολής (§ 4.6.1.). Επομένως οι ατομικές τους ακτίνες είναι παρόμοιες και ανάλογα σύμπλοκα Tc και Re αναμένονται να έχουν παρόμοια δομή, παρόμοιες παραμέτρους δεσμών αλλά και παρόμοιες φυσικές ιδιότητες και χημική συμπεριφορά. Πράγματι έχει διαπιστωθεί με φασματοσκοπία NMR και κρυσταλλογραφία ακτίνων X ότι οι άκυκλες τετραμίνες σχηματίζουν με Tc και Re σύμπλοκα τύπου *trans*-[$\text{M}^{\text{V}}(\text{O})_2\text{N}_4$]⁺ (όπου M = Tc ή Re) [261-263]. Η δομή αυτών των συμπλόκων είναι οκταεδρική με τα τέσσερα άτομα N της τετραμίνης να βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και τα δύο άτομα οξυγόνου να βρίσκονται σε θέση *trans* μεταξύ τους και να καταλαμβάνουν τις δύο κορυφές του οκταέδρου ενωμένα με διπλό δεσμό με το μέταλλο. Τα μήκη δεσμών O=M=O (M= Tc ή Re) έχει διαπιστωθεί ότι είναι παρόμοια και για τα δύο στοιχεία.

Αρχικά παρασκευάζεται το αντίστοιχο σύμπλοκο με $^{185/187}\text{Re(V)}$ και ταυτοποιείται η δομή του. Κατόπιν γίνεται HPLC ανάλυση, κατά την οποία γίνεται συνέκλουση του $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Demobesin}$ με το αντίστοιχο $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin}$. Αν ο χρόνος έκλουσης του $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Demobesin}$ προσομοιάζει με αυτόν του αντιστοίχου $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin}$, τότε το σύμπλοκο του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ θεωρείται ότι έχει παρόμοια δομή με τα αντίστοιχο $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin}$.

Στο σχήμα 12.9. παρατίθενται χρωματογράφημα για το $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Demobesin}$ 8 (ραδιομετρικό ίχνος) και για το $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin}$ 8 (UV-Vis) στις ίδιες συνθήκες ανάλυσης. Οι χρόνοι έκλουσης είναι παρόμοιοι. Η μικρή διαφορά στους χρόνους έκλουσης οφείλεται στο ότι τα σύμπλοκα του Re είναι πιο υδρόφιλα από τα αντίστοιχα σύμπλοκα του Tc με αποτέλεσμα το $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin}$ να εκλούεται λίγο νωρίτερα.

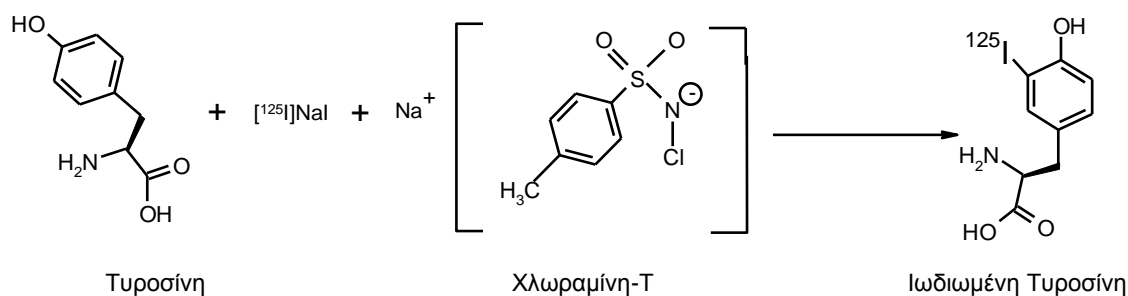


Σχήμα 12.9.: Συγκριτική HPLC ανάλυση του $[^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin 8}$ (ραδιομετρικό ίχνος) με το $[^{185/187}\text{Re}]\text{Demobesin 8}$ (φωτομετρικό ίχνος). Σύστημα 5

12.5. Ραδιοϊώδιωση

Για τα πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης χρησιμοποιήθηκε ως ραδιοπροσδέτης το $[^{125}\text{I}\text{-Tyr}^4]\text{BBN}$. Το $[^{125}\text{I}\text{-Tyr}^4]\text{BBN}$ παρασκευάστηκε με ραδιοϊώδιωση του καταλοίπου Tyr^4 [264]. Το οξειδωτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χλωραμίνη-T ενώ η πηγή ^{125}I ήταν το $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$. Το διάλυμα χλωραμίνης-T πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο γιατί παρουσία αέρα αποικοδομείται

ταχέως απελευθερώνοντας χλώριο. Η εισαγωγή του ^{125}I έγινε σε θέση όρθο ως προς την -OH ομάδα της Tyr. Η προσθήκη της χλωραμίνης-T ευνοεί την οξειδωση του I^- ($[\text{I}^{125}]\text{NaI}$) στο δραστικό I^+ . Το I^+ , προσβάλλει την φαινολική ομάδα της τυροσίνης, με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση ενός H^+ του φαινολικού δακτυλίου της Tyr, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.10.:

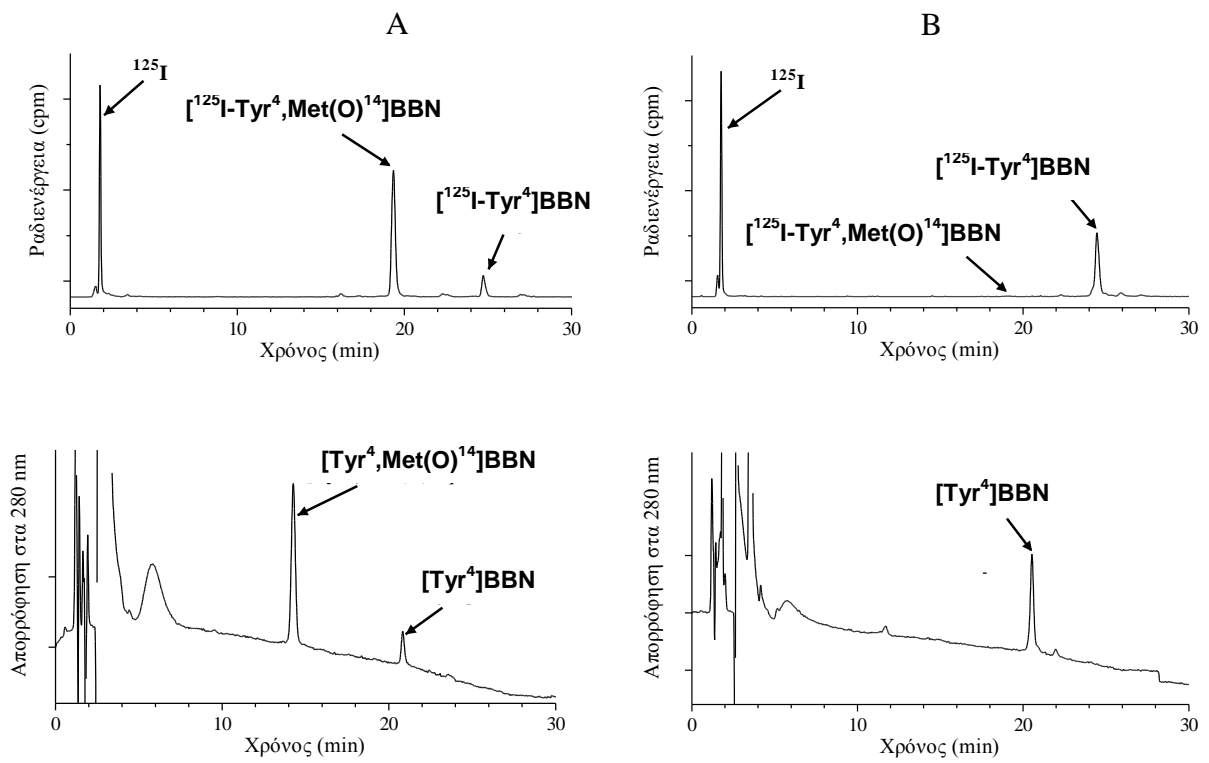


Σχήμα 12.10.: Μηχανισμός ραδιοϊωδίωσης της τυροσίνης με χρήση της χλωραμίνης-T

Ακολούθησε επώαση του μίγματος της αντίδρασης για 60-90 sec σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη διθειοθρεϊτόλης και επώαση για 60 min στους 80°C . Η διθειοθρεϊτόλη απενεργοποιεί την περίσσεια της χλωραμίνης-T. Επίσης επαναγάγει την οξειδωμένη μεθειονίνη στη θέση 14, η οποία με την επίδραση της χλωραμίνης-T είχε οξειδωθεί.

Η HPLC ανάλυση του μίγματος αντίδρασης αμέσως μετά την προσθήκη της χλωραμίνης-T δίνεται στο σχήμα 12.11A. Στις χρησιμοποιούμενες συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης, το $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^4]\text{BBN}$ εκλύεται σε $t_{\text{R}}=24.5$ min, το ελεύθερο (περίσσεια) ^{125}I σε $t_{\text{R}}=1.8$ min ενώ το οξειδωμένο παράγωγο $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^4, \text{Met}(\text{O})^{14}]\text{BBN}$ σε $t_{\text{R}}=19.4$ min. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$ μετατρέπεται στο οξειδωμένο ανάλογο $[\text{Tyr}^4, \text{Met}(\text{O})^{14}]\text{BBN}$.

Επίσης πραγματοποιήθηκε HPLC ανάλυση μετά την ολοκλήρωση της επώασης για 60 min στους 80°C (σχήμα 12.11. B). Η επιτυχής αναγωγή του $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^4, \text{Met}(\text{O})^{14}]\text{BBN}$ στο $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^4]\text{BBN}$ αποδεικνύεται από την απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής του οξειδωμένου αναλόγου σε $t_{\text{R}}=19.4$ min. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm έδειξε την πλήρη αναγωγή του $[\text{Tyr}^4, \text{Met}(\text{O})^{14}]\text{BBN}$ σε $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$. Η διαφορά στους χρόνους έκλυσης των $[\text{I}^{125}\text{-Tyr}^4]\text{BBN}$ και $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$, διευκολύνει την ασφαλή απομόνωση του ραδιοϊωδιωμένου προϊόντος σε υψηλή χημική καθαρότητα.



Σχήμα 12.11.: HPLC ανάλυση του μίγματος επισήμανσης του $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$ με ^{125}I . (A): Μετά την προσθήκη χλωραμίνης-T και επώαση για 60 -90 sec. (B): Μετά από προσθήκη διθειοθρεϊτόλης και θέρμανση στους 80°C για 1 h (Σύστημα 9).

13. *In vitro* αξιολόγηση

Σκοπός ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων και των αντίστοιχων ραδιοπεπτιδίων στον υποδοχέα-στόχο (GRP-R). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης, πειράματα δέσμησης κορεσμού, πειράματα εσωτερίκευσης και μελέτες μεταβολισμού. Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσματα κυττάρων που αυθόρμητα υπερεκφράζουν τον GRP-R, όπως μεμβράνες καρκινικών κυττάρων ή καρκινικά κύτταρα PC-3 και κύτταρα HEK293 επιμολυσμένα ώστε να εκφράζουν μόνιμα τον GRP-R (HEK293-GRPR).

13.1. Μελέτες ανταγωνιστικής δέσμησης (competition binding)

Μελετήθηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων με τον GRP-R [265], με αξιολόγηση της ανταγωνιστικής δέσμησης στους υποδοχείς παρουσία κατάλληλου ραδιοπροσδέτη [266].

Αρχή μεθόδου:

Τα πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης βασίζονται στην αντίδραση:



όπου:

[R]: συγκέντρωση ελεύθερων υποδοχέων

[L]*: συγκέντρωση ελεύθερου ραδιοπροσδέτη πριν την αντίδραση

[I]: συγκέντρωση ελεύθερου προσδέτη πριν την αντίδραση

[RL]*: συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα – ραδιοπροσδέτη

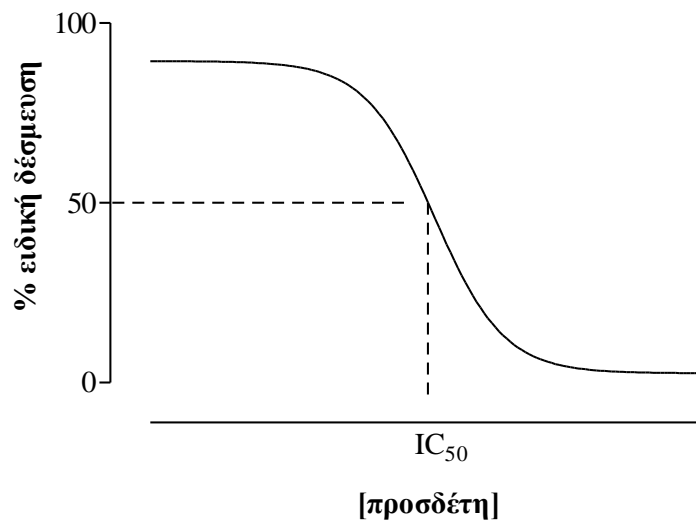
[RI]: συγκέντρωση συμπλόκου υποδοχέα – προσδέτη

[L']*: συγκέντρωση ελεύθερου ραδιοπροσδέτη μετά την αντίδραση

[I']: συγκέντρωση ελεύθερου προσδέτη μετά την αντίδραση

Η μελέτη ανταγωνιστικής δέσμησης πραγματοποιείται μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του εξεταζόμενου πεπτιδίου (προσδέτης) και διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του ραδιοπροσδέτη, με απαραίτητη προϋπόθεση το σύστημα να βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Όταν η συγκέντρωση του προσδέτη είναι μηδενική όλοι οι υποδοχείς καταλαμβάνονται από τον ραδιοπροσδέτη, όσο όμως

αυξάνεται η συγκέντρωση του προσδέτη, αυτός δρα ανταγωνιστικά προς τον αδιοπροσδέτη για την κάλυψη των θέσεων δέσμευσης. Έτσι προκύπτει μια σιγμοειδής καμπύλη η κορυφή (top) της οποίας αντιστοιχεί σε τιμή ίση με τη δέσμευση του ραδιοπροσδέτη στον υποδοχέα απουσία προσδέτη (total binding), ενώ η βάση (bottom) της είναι ενδεικτική της μη ειδικής δέσμευσης (non specific binding). Η σταθερά IC_{50} (inhibitory concentration) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του προσδέτη η οποία αναστέλλει το 50% της ειδικής δέσμευσης του ραδιοπροσδέτη (Σχήμα 13.1.). Η τιμή αυτή είναι χαρακτηριστική για το εκάστοτε πεπτιδίο σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο ραδιοπροσδέτη και ενδεικτική της συγγένειας του για τον GRP-R. Όσο πιο χαμηλή είναι η τιμή του IC_{50} τόσο πιο υψηλή είναι η συγγένεια για τον υποδοχέα γιατί απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση του πεπτιδίου για την κάλυψη του 50% των διαθέσιμων θέσεων δέσμευσης.



Σχήμα 13.1: Καμπύλες ανταγωνιστικής δέσμευσης για ένα πληθυσμό υποδοχέων

Η καμπύλη ανταγωνιστικής δέσμευσης περιγράφεται από την εξίσωση:

$$Y = NSB + (TB - NSB) / (1 + 10^{X - \log IC_{50}})$$

όπου:

TB: total binding / ολική δέσμευση του ραδιοπροσδέτη απουσία προσδέτη σε *cpm*

NSB: non specific binding / μη ειδική δέσμευση του ραδιοπροσδέτη σε *cpm*

IC₅₀: inhibitory concentration

X: δέσμευση του ραδιοπροσδέτη απουσία προσδέτη σε *cpm*

Η τιμή της ειδικής δέσμευσης (specific binding) του ραδιοπροσδέτη υπολογίζεται από την σχέση:

$$\%SB = (X-NSB/TB-NSB) \times 100$$

όπου:

SB: specific binding / ειδική δέσμευση του ραδιοπροσδέτη σε *cpm*

X: δέσμευση του ραδιοπροσδέτη

TB: total binding / ολική δέσμευση του ραδιοπροσδέτη απουσία προσδέτη σε *cpm*

NSB: non specific binding / μη ειδική δέσμευση του ραδιοπροσδέτη σε *cpm*

Κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων ανταγωνιστικής δέσμευσης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

α) Ο ραδιοπροσδέτης πρέπει να έχει υψηλή συγγένεια και επιλεκτικότητα για τον υποδοχέα αλλά και χαμηλή μη ειδική δέσμευση (<10% της συνολικής δέσμευσης). Επίσης η ειδική ραδιενέργειά του πρέπει να επαρκεί για την αποτελεσματική εντόπιση των υποδοχέων. Ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης του ραδιοπροσδέτη γίνεται με πειράματα δέσμευσης κορεσμού (§ 13.3.) και η συγκέντρωση που επιλέγεται βρίσκεται στην “οροφή” της καμπύλης που έχει προκύψει.

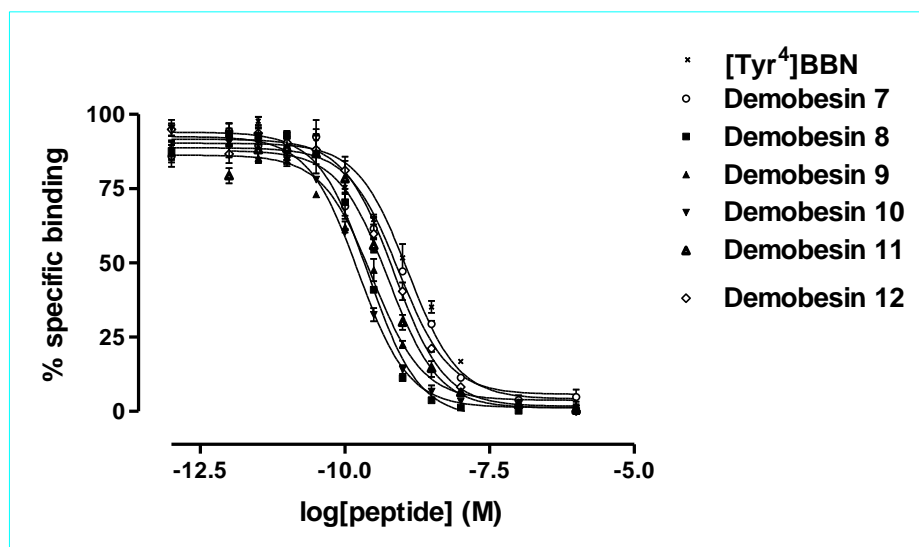
β) Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και ο ιστός που χρησιμοποιείται ως πηγή των υποδοχέων. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του ιστού που περιέχει τους υποδοχείς τόσο μεγαλύτερη είναι η ολική δέσμευση. Για να μην υπάρχει όμως και παράλληλη αύξηση της μη ειδικής δέσμευσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται συγκέντρωση πρωτεΐνης η οποία να οδηγεί σε μη ειδική δέσμευση <10% της ολικής. Στα πειράματα ανταγωνιστικής δέσμευσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν πηγές υποδοχέων, μεμβράνες κυττάρων αλλά και ολόκληρα κύτταρα σε καλλιέργεια.

γ) Οι συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος (θερμοκρασία, χρόνος, pH). Η επώαση γίνεται συνήθως στους 37⁰C. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις όπου ένα πεπτιδίο είναι ευαίσθητο στη δράση των ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα πιθανή αποικοδόμηση του, πραγματοποιείται στους 4⁰C. Ο χρόνος επώασης πρέπει να είναι αρκετός ώστε το σύστημα υποδοχέα – προσδέτη να φτάσει σε ισορροπία. Για να προσδιοριστεί ο χρόνος επώασης που απαιτείται ώστε το σύστημα να φτάσει σε ισορροπία, γίνεται η επώαση υποδοχέα – ραδιοπροσδέτη και

ο προσδιορισμός της ειδικής δέσμευσης σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Για την εκτέλεση του πειράματος, επιλέγεται χρόνος επώασης μεταξύ των χρόνων επώασης, όπου η ειδική δέσμευση βρίσκεται σταθερή. Το pH πρέπει να κυμαίνεται στη φυσιολογική τιμή (7.4) έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα με τα *in vivo* αποτελέσματα.

δ) Ο διαχωρισμός του ελεύθερου από τον δεσμευμένο ραδιοπροσδέτη. Συνήθως γίνεται διήθηση υπό κενό σε ηθμούς ινών υάλου. Μειονεκτεί λόγω της αυξημένης μη ειδικής δέσμευσης του ραδιοπροσδέτη στους ηθμούς. Για την αποφυγή της γίνεται πλύση των ηθμών με μεγάλες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος.

Για την συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες καρκινικών κυττάρων PC-3. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 37°C, σε pH 7.4, με χρόνο επώασης 60 min. Ως ραδιοπροσδέτης χρησιμοποιήθηκε [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN με υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R. Η [Tyr⁴]BBN αποτέλεσε την ένωση αναφοράς. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μελετώμενα πεπτιδία ανέστειλαν την ειδική δέσμευση του [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN στον GRP-R με έναν δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 13.2. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων των πειραμάτων δέσμευσης κορεσμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Prism™ 2.01 (GraphPad Software, San Diego CA).



Σχήμα 13.2.: Ανταγωνιστική αναστολή της δέσμευσης του [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN στους GRP-Rs σε μεμβράνες καρκινικών κυττάρων PC-3 από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Demobesin

Οι τιμές IC₅₀ για την σειρά των πεπτιδίων παρατίθενται στον Πίνακα 13.1. Για λόγους σύγκρισης συμπεριλαμβάνεται και το Demobesin 1.

Πίνακας 13.1. Η ικανότητα δέσμησης των πεπτιδίων για τον GRP-R

Πεπτίδιο	Μεμβράνες κυττάρων PC-3 Τιμές IC ₅₀ (nM)
[Tyr ⁴]BBN	1.22 ± 0.18 nM
Demobesin 1	0.70 ± 0.08 nM
Demobesin 2	0.70 ± 0.03 nM
Demobesin 7	0.93 ± 0.08 nM
Demobesin 8	0.26 ± 0.03 nM
Demobesin 9	0.30 ± 0.03 nM
Demobesin 10	0.17 ± 0.01 nM
Demobesin 11	0.56 ± 0.09 nM
Demobesin 12	0.71 ± 0.08 nM

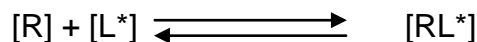
Τα αποτελέσματα δείχνουν πολύ καλύτερες τιμές συγγένειας δέσμησης των μελετώμενων πεπτιδίων στον GRP-R σε σχέση με την ένωση αναφοράς [Tyr⁴]BBN. Η μεγαλύτερη ικανότητα δέσμησης παρουσιάζεται για τα ανάλογα Demobesin 9 και Demobesin 10. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την αύξηση της συγγένειας δέσμησης στον GRP-R με την εισαγωγή πυρηνόφιλης ομάδας στο C-τελικό άκρο του [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13) [242,243]. Τα δύο αυτά ανάλογα δεν έχουν περαιτέρω *in vivo* ενδιαφέρον λόγω της μη δυνατότητας καλής επισήμανσής τους με ^{99m}Tc (§12.1.). Από τα υπόλοιπα πεπτίδια την υψηλότερη συγγένεια δέσμησης για τον GRP-R -υψηλότερη και από το Demobesin 1- εμφανίζει το Demobesin 8. Επίσης υψηλή συγγένεια δέσμησης εμφανίζουν τα Demobesin 11 και Demobesin 12, τα οποία προέρχονται από τροποποιήσεις στη πεπτιδική αλυσίδα του Demobesin 8.

13.2. Μελέτες δέσμησης κορεσμού (saturation binding assays)

Σκοπός είναι ο προσδιορισμός της ειδικής δέσμησης ενός ραδιοπροσδέτη στους υποδοχείς-στόχους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του [267-270].

Αρχή μεθόδου:

Κατά την επώαση ενός πληθυσμού υποδοχέων-στόχων με ένα ραδιοπεπτιδίο (ραδιοπροσδέτη) για χρονικό διάστημα τέτοιο, ώστε το σύστημα να βρεθεί σε κατάσταση ισορροπίας, σχηματίζεται το σύμπλοκο ραδιοπροσδέτη – υποδοχέα το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση:



όπου:

R: η συγκέντρωση των ελεύθερων υποδοχέων

*L** (ή *F*, *free*): συγκέντρωση του μη δεσμευμένου ραδιοπροσδέτη

*RL** (ή *B*, *Bound*): συγκέντρωση του σχηματιζόμενου συμπλόκου

Για ένα πληθυσμό υποδοχέων η παραπάνω αντίδραση περιγράφεται από την σχέση:

$$[B] = [B]_{\max} \cdot [F] / (K_d + F) \text{ (σχέση 3.1.)}$$

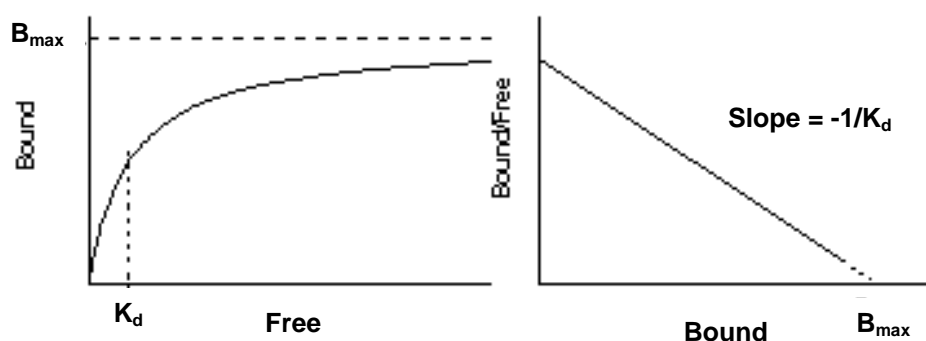
όπου:

K_d : σταθερά διάστασης σε κατάσταση ισορροπίας. Οι συνήθεις τιμές του K_d κυμαίνονται μεταξύ 10 pM και 10 nM. Αν οι τιμές του K_d είναι πολύ χαμηλότερες από τα 10 pM ο ρυθμός διάστασης είναι πολύ αργός και είναι δύσκολο να επιτευχθεί ισορροπία. Αν το K_d έχει πολύ υψηλότερες τιμές από τα 10 nM, ο ρυθμός διάστασης θα είναι πολύ γρήγορος με αποτέλεσμα να χάνονται πιθανές θέσεις δέσμησης.

B_{\max} : ο μέγιστος αριθμός των θέσεων δέσμησης δηλαδή των υποδοχέων. Εκφράζεται σε θέσεις δέσμησης / κύτταρο ή ποσότητα δεσμευμένου ραδιοπεπτιδίου / mg πρωτεΐνης. Οι συνήθεις τιμές είναι 10-1000 fmol θέσεων δέσμησης / mg πρωτεΐνης

Στο σχήμα 13.2. αριστερά, φαίνεται η καμπύλη που προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση ενώ δεξιά παρατίθεται το διάγραμμα Scatchard όπου το K_d είναι το αρνητικό αντίστροφο της κλίσης της ευθείας και το B_{\max} είναι η τετμημένη επί την αρχή.

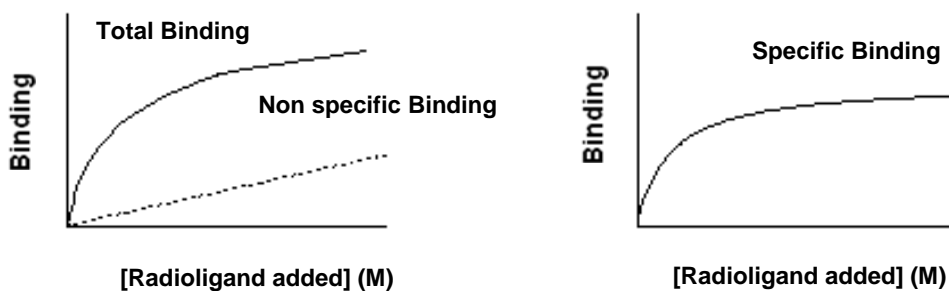
Η K_d εκφράζει την συγγένεια του ραδιοπροσδέτη για τον υποδοχέα και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του ραδιοπροσδέτη που χρειάζεται για την κάλυψη του μισού των θέσεων δέσμευσης. Στο σημείο αυτό η συγκέντρωση του δεσμευμένου ραδιοπροσδέτη είναι ίση με το μισό της τιμής B_{max} . Η συγγένεια του ραδιοπροσδέτη είναι τόσο μεγαλύτερη για τους υποδοχείς όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_d .



Σχήμα 13.3.: Καμπύλες ειδικής δέσμησης κορεσμού για ένα πληθυσμό υποδοχέων

Στα πειράματα δέσμησης κορεσμού θεωρείται ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ραδιοπροσδέτη είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ραδιοπροσδέτη που έχει προστεθεί. Πρακτικά η σχέση 3.1. ισχύει όταν η συγκέντρωση του δεσμευμένου ραδιοπροσδέτη δεν υπερβαίνει το 10% της συγκέντρωσης του ολικού ραδιοπροσδέτη.

Ο ραδιοπροσδέτης μπορεί να δεσμευτεί όχι μόνο στους υποδοχείς αλλά και σε μη ειδικές θέσεις στην κυτταρική μεμβράνη. Για τον προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμησης γίνεται παράλληλη επώαση των υποδοχέων με το ραδιοπροσδέτη παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ενός “ψυχρού” πεπτιδίου (προσδέτης) με υψηλή συγγένεια για τους εν λόγω υποδοχείς. Όλοι οι υποδοχείς έτσι καταλαμβάνονται από τον προσδέτη οπότε ο ραδιοπροσδέτης έχει μόνο την δυνατότητα της μη ειδικής δέσμησης. Ο προσδιορισμός της ειδικής δέσμησης του ραδιοπροσδέτη στους υποδοχείς γίνεται με αφαίρεση της μη ειδικής δέσμησης από την ολική δέσμηση σε κάθε συγκέντρωση. (Σχήμα 13.4.).



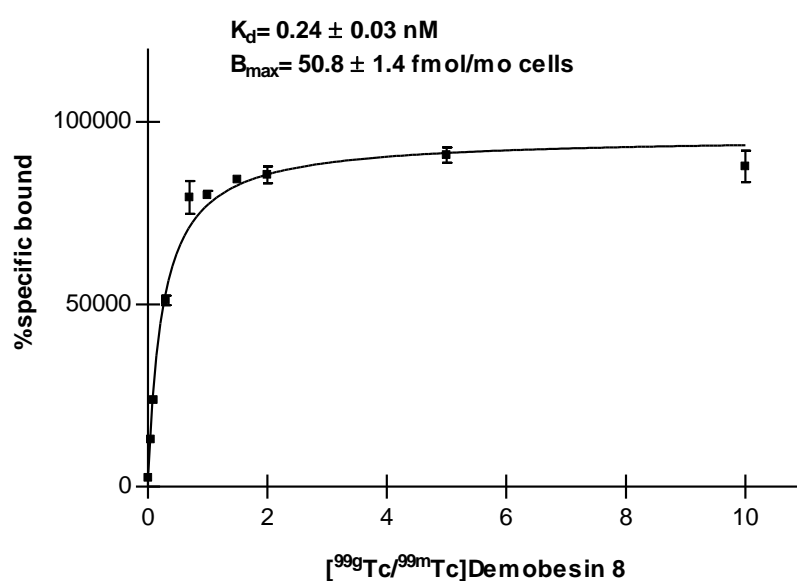
Σχήμα 13.4. Καμπύλες ολικής (*total binding*) και μη ειδικής δέσμευσης (*non specific binding*) κορεσμού και καμπύλη ειδικής δέσμευσης (*specific binding*) όπως προκύπτει από την αφαίρεση της μη ειδικής από την ολική δέσμευση

Η ποσότητα του “ψυχρού πεπτιδίου” θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να αποκλείσει όλες τις ειδικές θέσεις δέσμευσης, οπότε εμπειρικά χρησιμοποιείται συγκέντρωση “ψυχρού” πεπτιδίου περίπου 100 φορές της τιμής του K_d για τον υποδοχέα.

Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του ιστού που περιέχει τους υποδοχείς τόσο μεγαλύτερη είναι η ολική δέσμευση. Ωστόσο είναι δυνατόν να αυξηθεί και η μη ειδική δέσμευση. Για αυτό η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται θα πρέπει να οδηγεί σε μη ειδική δέσμευση <10% της ολικής. Για τις περισσότερες περιπτώσεις ιστών χρησιμοποιούνται 50-500 μg μεμβρανικής πρωτεΐνης/mL. Οι παράμετροι K_d και B_{\max} , προκύπτουν υποθέτοντας ότι συγκέντρωση του ελεύθερου ραδιοπροσδέτη δεν μεταβάλλεται.

Για τη μελέτη της δέσμευσης κορεσμού των ραδιοπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα PC-3. Λόγω της μεγάλης ειδικής ραδιενέργειας του ^{99m}Tc (520 Ci/ μmol) η ετοιμασία των ραδιοπεπτιδίων έγινε με την προσθήκη ποσότητας ^{99g}Tc έτσι ώστε να είναι δυνατή και ασφαλής η ετοιμασία συγκεντρώσεων των ραδιοπεπτιδίων >1 nM. Η μη ειδική δέσμευση προσδιορίστηκε με την προσθήκη περίσσειας [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο. Η επώαση των ολόκληρων κυττάρων με το ραδιοπεπτίδιο έγινε στους 4⁰C. Στη θερμοκρασία αυτή περιορίζεται αποτελεσματικά η εσωτερίκευση του συμπλόκου ραδιοπεπτιδίου-υποδοχέα, αλλά απενεργοποιούνται ένζυμα που μπορούν να αποικοδομήσουν το πεπτίδιο. Η διάρκεια επώασης, ώστε το σύστημα (υποδοχέας – μόριο προσδέτης) να φτάσει σε ισορροπία ήταν 1.5 h

Στο Σχήμα 13.5. απεικονίζεται η καμπύλη δέσμευσης κορεσμού για το [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin 8. Παρατηρήθηκε μια ισχυρή και δόσοεξαρτώμενη αλληλεπίδραση με μία τάξη θέσεων δέσμευσης υψηλής συγγένειας στα PC-3. Η τιμή της K_d (0.24 ± 0.03 nM) εκφράζει την πολύ υψηλή συγγένεια δέσμευσης του [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin 8 για τον GRP-R. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η εισαγωγή του ραδιομετάλλου και η δημιουργία του συμπλόκου [^{99m}Tc(O)₂(N₄)⁺ δεν έχει αρνητική επίπτωση στην συγγένεια δέσμευσης του ραδιοπεπτιδίου με τον GRP-R. Η συγγένεια δέσμευσης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με άλλων ραδιοεπισημασμένων αναλόγων μπομπεσίνης [271-276,181].



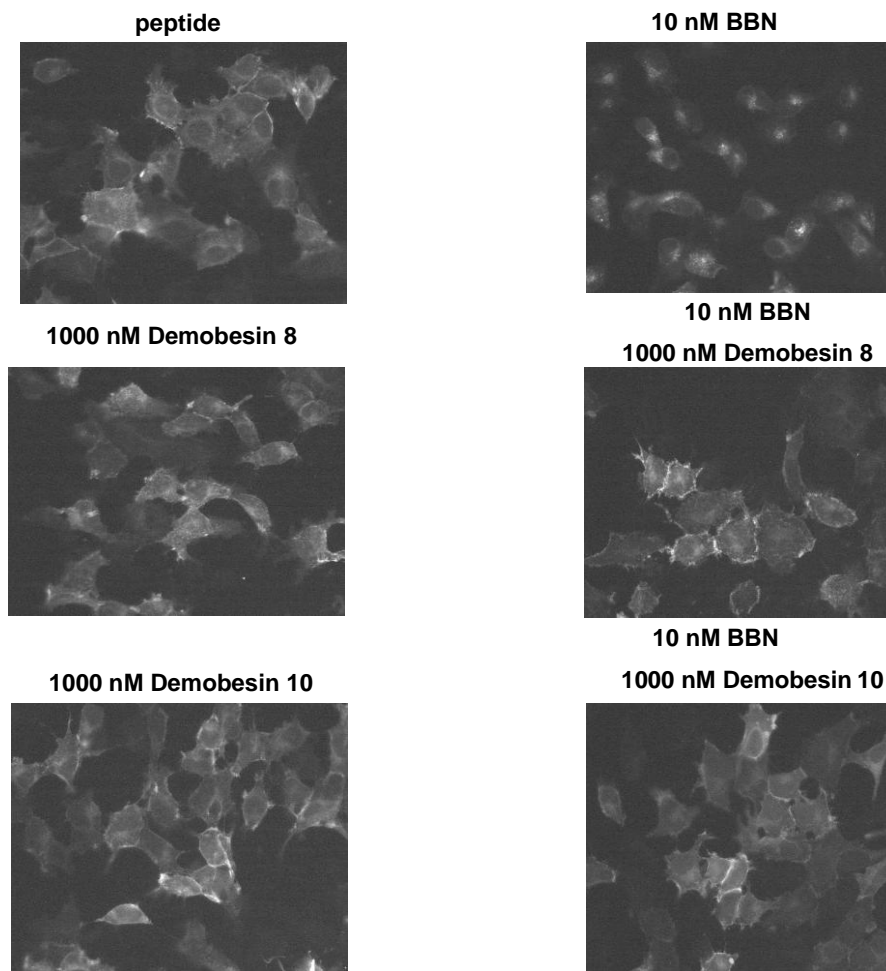
Σχήμα 13.5.: Δόσο-εξαρτώμενη ειδική δέσμευση του [^{99g}Tc/^{99m}Tc]Demobesin 8 στους GRP-Rs σε κύτταρα PC-3

Η τιμή του B_{max} βρέθηκε 50.8 ± 1.4 fmol/ 10^6 κύτταρα και κυμαίνεται στο εύρος τιμών που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για την συγκεκριμένη καρκινική σειρά [277].

13.3 Λειτουργικές μελέτες

Για να μελετηθεί η ανταγωνιστική δράση των πεπτιδίων έγιναν οι λεγομένες λειτουργικές μελέτες, δηλαδή μελετήθηκε η επαγωγή της εσωτερίκευσης του GRP-R και η τυχόν παρεμπόδιση της επαγωγής της εσωτερίκευσης αγωνιστή παρουσία των νέων αναλόγων. Η ανταγωνιστική δράση επιβεβαιώθηκε επιλεκτικά για τα Demobesin 8 και Demobesin 10 σε κύτταρα HEK-GRPR. Η διαδικασία έγινε με χρήση μικροσκοπίου συνεστίασης και φθορίζοντος αντισώματος. Τα Demobesin 8

και Demobesin 10 προσδέθηκαν στους υποδοχείς χωρίς να προκαλέσουν την ενεργοποίησή τους, καθώς δεν παρατηρήθηκε εσωτερίκευση των GRP-Rs ακόμα και σε πολύ υψηλή συγκέντρωση των δύο πεπτιδίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι η επαγωγή εσωτερίκευσης των GRP-Rs από την BBN που είναι πεπτίδιο-αγωνιστής παρεμποδίστηκε παρουσία Demobesin 8 ή Demobesin 10, δηλαδή και τα δύο πεπτίδια παρουσίασαν καθαρά ανταγωνιστική δράση (σχήμα 13.6).

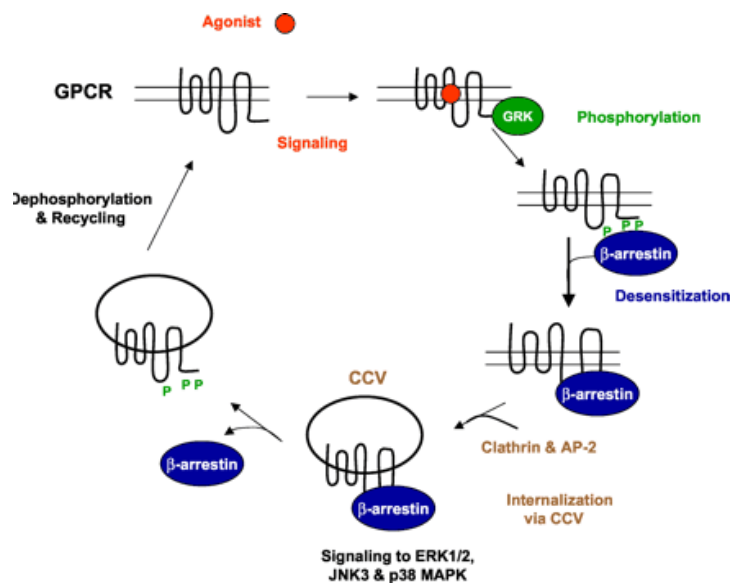


Σχήμα 13.6.: Εσωτερίκευση των GRP-Rs παρουσία BBN, Demobesin 8 και Demobesin 10

13.4 Μελέτες εσωτερίκευσης (internalization experiments)

Αρχή μεθόδου:

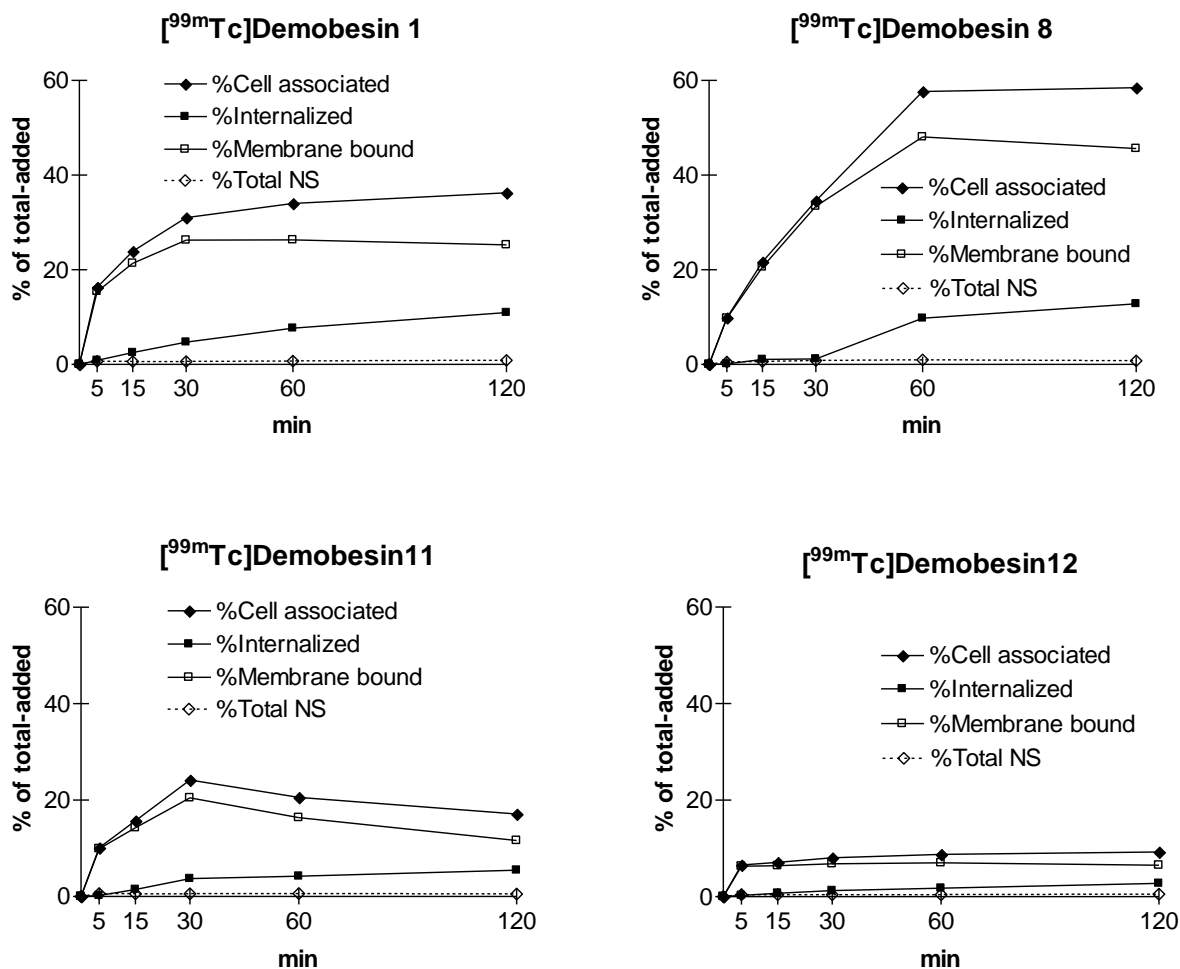
Η εσωτερίκευση είναι μια διαδικασία ενδοκυττάρωσης η οποία είναι χαρακτηριστική των μεμβρανικών πεπτιδικών υποδοχέων της υπεροικογένειας των GPCRs [278-282]. Τα πεπτίδια αγωνιστές ενεργοποιούν τον υποδοχέα με αποτέλεσμα μια σειρά απο φαρμακολογικές δράσεις διότι οδηγούν στη μεταγωγή μηνυμάτων από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο. Η ενδοκυτταρική κατανομή των GPCRs και του ραδιοπροσδέτη καθορίζεται από τους διάφορους τρόπους μετακίνησής τους στο εσωτερικό του κυττάρου. Ο πιο χαρακτηριστικός μηχανισμός εσωτερίκευσης είναι αυτός που πραγματοποιείται μέσω κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη (Εικόνα 13.1.) Η πρόσδεση ενός πεπτιδίου-αγωνιστή σε ένα GPCR οδηγεί στο διαχωρισμό των α από τις $\beta\gamma$ υπομονάδες των πρωτεϊνών-G. Η υπομονάδα $\beta\gamma$ ενεργοποιεί τις κινάσες των υποδοχέων που συζεύγνυνται με τις πρωτεΐνες (GRKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα. Ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας, με τη βοήθεια της β -αρρεστίνης, ενσωματώνεται σε κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη και μεταφέρεται στα ενδοσωμάτια. Το ποσό του πεπτιδίου-αγωνιστή που μεταφέρεται στο ενδοκυττάριο χώρο μαζί με τον υποδοχέα εξαρτάται από την ταχύτητα ενδοκύττωσης του υποδοχέα και τη συγγένεια του αγωνιστή για τον υποδοχέα. Ο υποδοχέας, λόγω του όξινου περιβάλλοντος των ενδοσωματίων, είτε αποφωσφορυλιώνεται και επιστρέφει στη κυτταρική μεμβράνη με απελευθέρωση του προσδέτη, είτε αποικοδομείται στα λυσοσώματα.



Εικόνα 13.1. Μηχανισμός εσωτερίκευσης των GPCR διαμέσου κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη

Η μελέτη της ικανότητας ή όχι εσωτερίκευσης του ραδιοεπισημασμένου πεπτιδίου έχει μεγάλη σημασία ως προς την κλινική του εφαρμογή. Όταν το επισημασμένο πεπτίδιο δρα σαν αγωνιστής αναμένεται, λόγω συσσώρευσης της ραδιενέργειας στον ενδοκυττάριο χώρο και παρατεταμένης έκθεσης του γενετικού υλικού του καρκινικού κυττάρου σε αυτήν, αύξηση της διαγνωστικής ευαισθησίας και αύξηση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τα πεπτίδια-αγωνιστές προτιμούνται στο πεδίο των ραδιοπεπτιδίων. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες [283,165] έδειξαν ότι τα πεπτίδια-ανταγωνιστές σωματοστατίνης είναι αποτελεσματικότερα στην *in vivo* στόχευση πεπτιδικών υποδοχέων σε όγκους.

Η ικανότητα εσωτερίκευσης των επισημασμένων πεπτιδίων μελετήθηκε με επώαση τους σε καρκινικά κύτταρα PC-3 στου 37°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η εσωτερίκευση εξαρτάται από την θερμοκρασία και σε θερμοκρασίες < 16°C αναστέλλεται. Η διάκριση της εσωτερικευμένης ραδιενέργειας από αυτή που είναι δεσμευμένη στη κυτταρική μεμβράνη έγινε με έκπλυση των κυττάρων με όξινο ρυθμιστικό διάλυμα, όπου γίνεται διάσταση του συμπλόκου ραδιοπεπτιδίου – υποδοχέα και απομάκρυνση του ραδιοπροσδέτη από την κυτταρική μεμβράνη. Το ποσό της ραδιενέργειας που απομένει αντιστοιχεί στην ενδοκυττάρια ακτινοβολία. Στο Σχήμα 13.7. δίνεται η καμπύλη εσωτερίκευσης σε συνάρτηση με το χρόνο. Για λόγους σύγκρισης παρατίθεται η καμπύλη εσωτερίκευσης για το [^{99m}Tc]Demobesin 1.



Σχήμα 13.7.: Εσωτερίκευση των ραδιοεπισημασμένων αναλόγων μετά από δέσμευσή στους GRP-Rs κατά την επώασή τους με PC-3 κύτταρα στους 37°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό εσωτερίκευσης σε σχέση με την ολική ποσότητα του πεπτιδίου που προστέθηκε.

Το ποσοστό εσωτερίκευσης όλων των ραδιοεπισημασμένων αναλόγων είναι σημαντικά χαμηλό, γεγονός το οποίο συνάδει με συμπεριφορά ανταγωνιστή. Για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρατηρήθηκε ότι ένα πολύ υψηλό ποσοστό (58.5%) παρέμεινε δεσμευμένο στη κυτταρική μεμβράνη ακόμα και μετά από 2 h σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ανάλογα που εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά δέσμευσης στη κυτταρική μεμβράνη αλλά και με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 (36.3%) που παρουσίαζε έως τώρα το υψηλότερο ποσοστό δέσμευσης στη κυτταρική μεμβράνη μετά από 2 h.

14. Μελέτες μεταβολικής σταθερότητας

Σκοπός είναι η μελέτη της σταθερότητας του ραδιοπεπτιδίου στο βιολογικό περιβάλλον. Κατά την χορήγηση ραδιοπεπτιδίων για διαγνωστικούς ή για ραδιοθεραπευτικούς σκοπούς είναι επιθυμητή η αποτελεσματική εντόπιση της ακτινοβολίας στις θέσεις-στόχους. Έτσι αφενός πρέπει να είναι σταθερό το πεπτιδικό τμήμα έναντι της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων αλλά επιπλέον να είναι σταθερό και το σύμπλοκο ραδιομετάλλου – χηλικού υποκαταστάτη σε αντιδράσεις αντικατάστασης.

Η σταθερότητα του πεπτιδικού τμήματος του ραδιοπεπτιδίου εξαρτάται από το μέγεθος της πεπτιδικής αλυσίδας, καθώς μακριά πεπτιδική αλυσίδα σημαίνει περισσότερες προσφερόμενες θέσεις στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Η σταθερότητα του συμπλόκου ραδιομετάλλου – χημικού υποκαταστάτη επηρεάζεται από το όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων αλλά και από την πιθανή δέσμευση του ραδιομετάλλου από πρωτεΐνες του ορού [284,285].

Στην παρούσα διατριβή έγινε η μελέτη της σταθερότητας του [^{99m}Tc]Demobesin 8. Οι μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν *in vitro* στο πλάσμα του αίματος και σε ομογενοποίηση νεφρών ποντικίου. Επιπλέον, έγινε και ανάλυση των ούρων τα οποία συλλέχθηκαν 30 min μετά τη χορήγηση [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε υγιή ποντίκια για ανίχνευση πιθανών ραδιομεταβολιών.

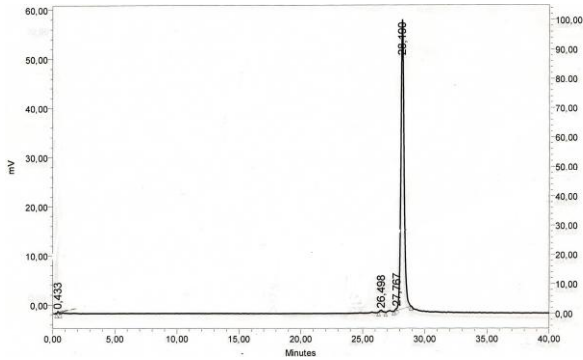
Στο Σχήμα 14.1. παρατίθεται η ανάλυση HPLC του [^{99m}Tc]Demobesin 8 μετά από επώασή του στους 37°C για 0, 15, 30, 60 και 120 min σε πλάσμα αίματος. Η ανάλυση των δειγμάτων έδειξε ότι μετά από 15 min επώασης σε πλάσμα παρέμεινε ακέραιο ποσοστό >78% του [^{99m}Tc]Demobesin 8, καταδεικνύοντας τον σχετικά αργό ρυθμό καταβολισμού του σε σχέση με τον χρόνο που απαιτείται για να μεταφερθεί στο όργανο-στόχο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Μετά από 60 min επώασης παρέμεινε ακέραιο ποσοστό περίπου 46%.

Η επώαση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε ομογενοποίηση νεφρών ποντικίου και η χρωματογραφική ανάλυση των ληφθέντων δειγμάτων (Σχήμα 14.2.) αποκάλυψε ταχεία αποικοδόμησή του. Μετά από 15 min ανιχνεύθηκε περίπου 2% του αρχικού ραδιοπεπτιδίου.

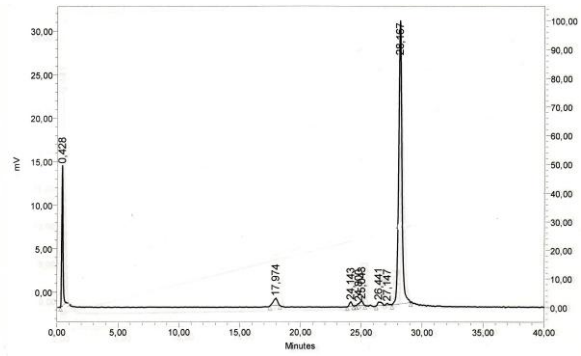
Η ανάλυση ούρων που συλλέχθηκαν 30 min μετά τη χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 (Σχήμα 14.3.) σε ποντίκι έδειξε σχεδόν πλήρη αποικοδόμησή του (παρέμεινε ποσοστό περίπου 3%).

Η ανάλυση με χρωματογραφία επί χάρτου δειγμάτων πλάσματος και ούρων έδειξε μη απελευθέρωση $^{99m}\text{TcO}_4^-$, καταδεικνύοντας την *in vivo* σταθερότητα του συμπλόκου $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{O})_2\text{N}_4]^+$ σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [286-288].

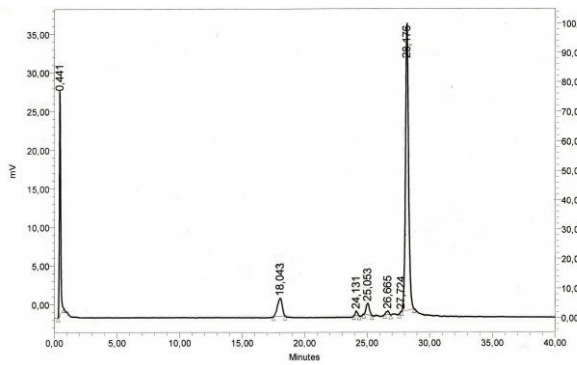
0 min:



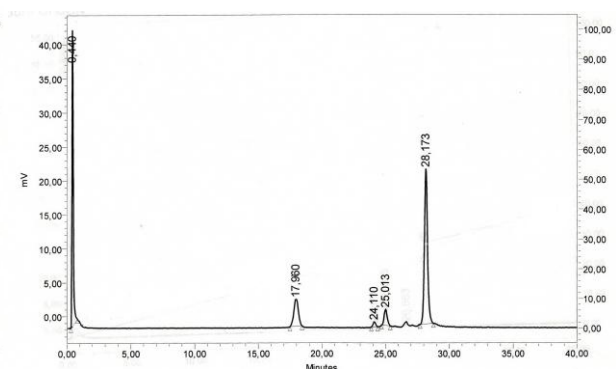
15 min:



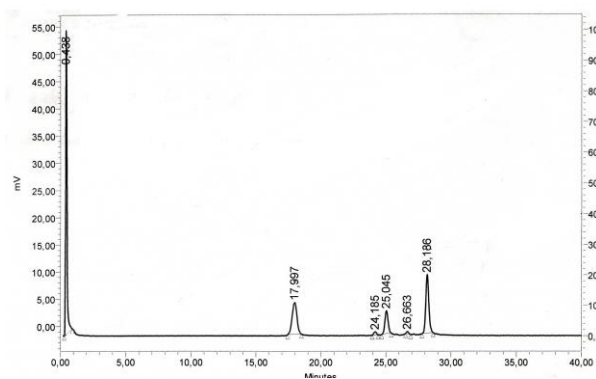
30 min:



60 min:

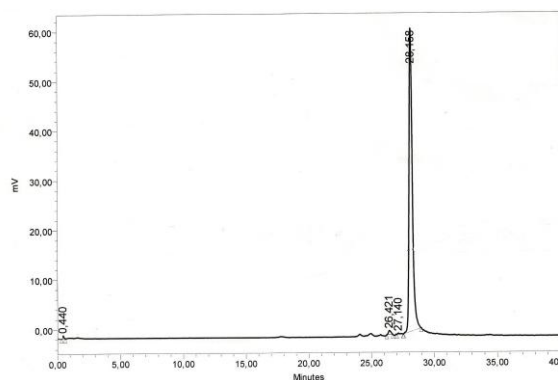


120 min:

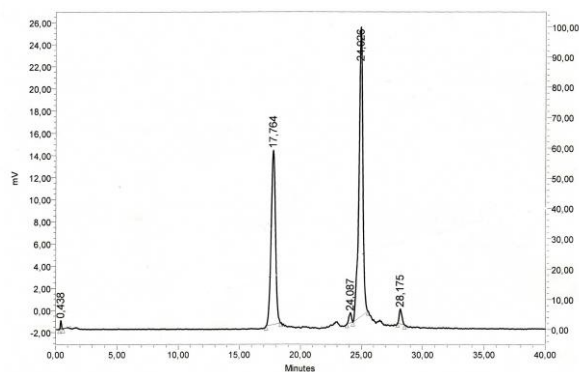


Σχήμα 14.1.: HPLC ανάλυση δείγματος πλάσματος αίματος μετά από επώαση $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Demobesin } 8$ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (Σύστημα 5).

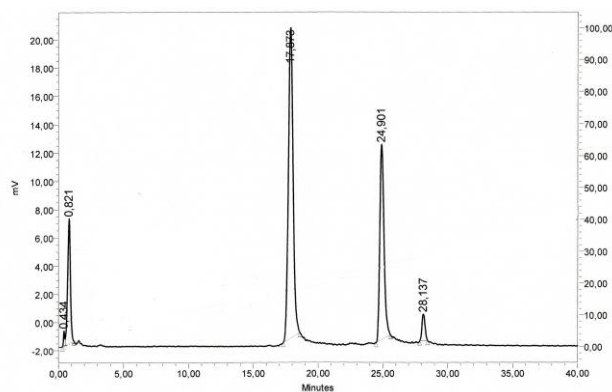
0 min:



15 min:



Σχήμα 14.2.: HPLC ανάλυση δείγματος νεφρών ποντικού που συλλέχθηκαν 0 και 15 min μετά τη χορήγηση [^{99m}Tc]Demobesin 8 (Σύστημα 5).



Σχήμα 14.3.: HPLC ανάλυση δείγματος ούρων ποντικού που συλλέχθηκαν 30 min μετά τη χορήγηση [^{99m}Tc]Demobesin 8 (Σύστημα 5).

Τα αποτελέσματα της μεταβολικής μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 14.1.:

Πίνακας 14.1.: Αποτελέσματα μεταβολικής μελέτης του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε πλάσμα, ομογενοποίηση νεφρών και ούρα ποντικού

Χρόνος (min)	% σταθερό [^{99m}Tc]Demobesin 8		
	Πλάσμα	Ομογενοποίηση νεφρών	Ούρα
0	99.0	98.5	100.0
15	78.5	2.0	
30	67.6		3.0
60	46.1		
120	21.6		

15. *In vivo* αξιολόγηση επισημασμένων αναλόγων

Σκοπός της *in vivo* αξιολόγησης ήταν η μελέτη της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς των επισημασμένων αναλόγων. Αποτελεί το τελευταίο στάδιο πριν την περαιτέρω τυχόν κλινική τους αξιολόγηση. Πραγματοποιήθηκε σε υγιή και παθολογικά πρότυπα πειραματοζώων. Η αξιολόγηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τις εξής μεθόδους:

α) Μετρήσεις της ραδιενέργειας στους ιστούς και στα όργανα – στόχους μετά την θανάτωση και ανατομή των πειραματοζώων.

β) Μελέτες απεικόνισης με λήψη εικόνων από τα πειραματόζωα με κατάλληλη κάμερα.

γ) Μελέτες ποσοτικής αυτοραδιογραφίας με λήψη τομών ολόκληρου του ζώου ή του οργάνου – στόχου.

Στις μελέτες βιοκατανομής γίνεται ενδοφλέβια χορήγηση της ραδιοεπισημασμένης ουσίας στο πειραματόζωο. Μετά την θανάτωσή του συλλέγονται δείγματα αίματος καθώς και τα όργανα ενδιαφέροντος, ζυγίζονται και προσδιορίζεται το ποσό της ραδιενέργειας στο μετρητή γ-ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως ποσοστό της χορηγούμενης δόσης ανά όργανο (% ID/org) ή ανά γραμμάριο βάρους οργάνου (%ID/g):

$$\% \text{ δόση ανά όργανο} = \text{cpm δείγματος} \times \text{βάρους οργάνου} / \text{cpm 1\% προτύπου} \times \text{βάρους δείγματος} \quad (1)$$

$$\% \text{ δόση ανά γραμμάριο οργάνου} = \text{cpm δείγματος} / \text{cpm 1\% προτύπου} \times \text{βάρους δείγματος} \quad (2)$$

$$\% \text{ δόση στο αίμα} = \text{cpm δείγματος} \times 0.07 \times \text{βάρους σώματος} / \text{cpm 1\% προτύπου} \times \text{βάρους δείγματος αίματος} \quad (3)$$

$$\% \text{ δόση στους μυς} = \text{cpm δείγματος μυών} \times 0.43 \times \text{βάρους σώματος} / \text{cpm 1\% προτύπου} \times \text{βάρους δείγματος μύος} \quad (4)$$

Στη σχέση (3) ο αριθμός 0.07 χρησιμοποιείται γιατί λαμβάνεται υπόψη ότι το ποσοστό του αίματος αντιστοιχεί στο 7% του βάρους του σώματος του πειραματοζώου. Στη σχέση (4) ο αριθμός 0.43 χρησιμοποιείται γιατί λαμβάνεται υπόψη ότι το βάρος των μυών αποτελεί το 43% του βάρους του σώματος του πειραματοζώου.

Για την διόρθωση των μετρήσεων σε σχέση με τον χρόνο υποδιπλασιασμού του ραδιονουκλιδίου χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα που αντιστοιχεί στο 10% της χορηγούμενης δόσης. Κατόπιν 1 mL από αυτό το διάλυμα μεταφέρεται σε σωληνάκια

και τοποθετείται στο μετρητή γ-ακτινοβολίας στην αρχή και στο τέλος των δειγμάτων προς μέτρηση. Η εξίσωση που δίνει το πρότυπο 1% είναι η:

$$\text{Πρότυπο 1\%} = (\Sigma / N \times D) - \text{cpm ουράς}/100$$

όπου:

Σ: σύνολο cpm δειγμάτων προτύπου

N: σύνολο δειγμάτων προτύπου

D: συντελεστής αραίωσης της χορηγούμενης δόσης κατά την ετοιμασία του προτύπου διαλύματος

Όταν η χορήγηση του ραδιοπεπτιδίου γίνεται από την φλέβα της ουράς, αφαιρούνται οι κρούσεις της ουράς γιατί είναι δυνατόν ποσότητα του ραδιοπεπτιδίου να παραμείνει στην ουρά χωρίς να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος.

15.1. Βιοκατανομή σε υγιή ποντίκια

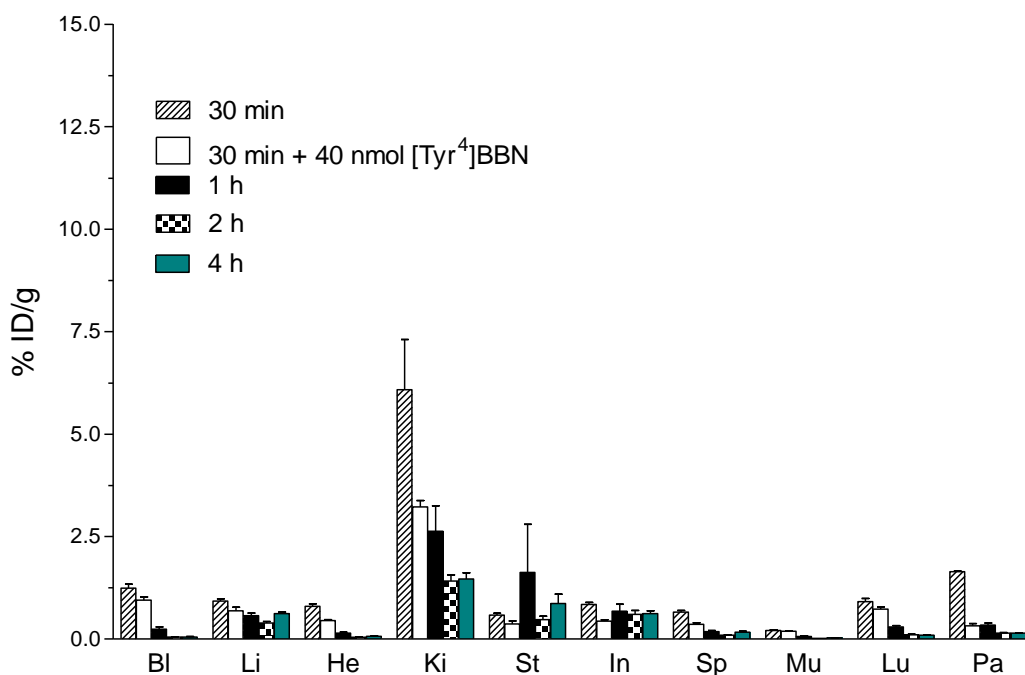
Μελέτες βιοκατανομής των αναλόγων πραγματοποιήθηκαν σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino σε 1, 4 και 24 ρι, με σκοπό να εξαχθούν τα πρώτα συμπεράσματα ως προς την πρόσληψη των ραδιοπεπτιδίων σε όργανα που εκφράζουν φυσιολογικά τον GRP-R σε υψηλή πυκνότητα, όπως το πάγκρεας. Η αποτελεσματική εντόπιση της ραδιενέργειας στα όργανα-στόχους, λόγω εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης του ραδιοπεπτιδίου με τους GRP-Rs, επιβεβαιώθηκε με πειράματα *in vivo* αποκλεισμού των υποδοχέων. Αυτά πραγματοποιήθηκαν με την συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN (40 nmol) μαζί με το ραδιοπεπτιδίο (10 pmol).

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 15.1.- 15.5. και στα σχήματα 15.1.-15.5.

Πίνακας 15.1.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 2 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου *Swiss albino* ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	30 min	30 min*	1 h	2 h	4 h
Αίμα	1.24 ± 0.19	0.95 ± 0.15	0.24 ± 0.11	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Ήπαρ	0.93 ± 0.11	0.69 ± 0.12	0.57 ± 0.12	0.39 ± 0.07	0.62 ± 0.08
Καρδιά	0.79 ± 0.11	0.44 ± 0.06	0.14 ± 0.06	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Νεφρά	6.08 ± 2.46	3.22 ± 0.31	2.62 ± 1.24	1.41 ± 0.29	1.46 ± 0.29
Στομάχι	0.58 ± 0.09	0.36 ± 0.16	1.62 ± 2.34	0.47 ± 0.16	0.86 ± 0.46
Έντερο	0.84 ± 0.09	0.43 ± 0.07	0.67 ± 0.35	0.60 ± 0.19	0.61 ± 0.15
Σπλήνας	0.66 ± 0.08	0.36 ± 0.07	0.18 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.17 ± 0.03
Μυς	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.01
Πνεύμονες	0.91 ± 0.15	0.73 ± 0.11	0.29 ± 0.07	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Πάγκρεας	1.64 ± 0.03	0.32 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02

* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

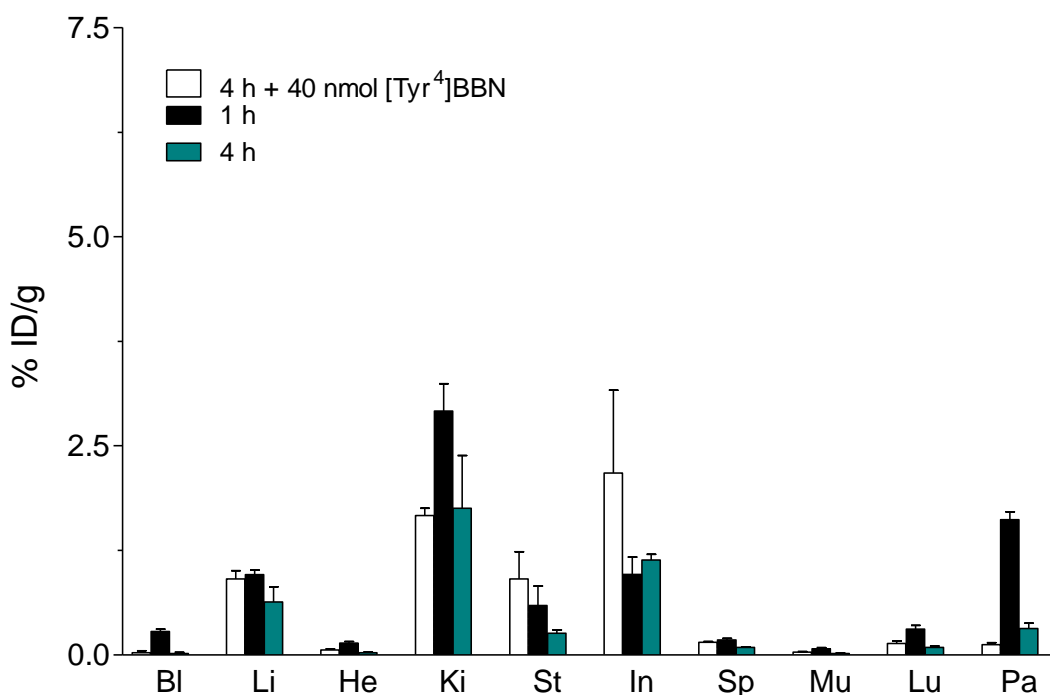


Σχήμα 15.1.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 2, 30 min, 1 h, 2 h και 4 h *in vivo* σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου *Swiss albino*, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Κί=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.2.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 7 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*
Αίμα	0.24 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Ήπαρ	0,96 ± 0.06	0.63 ± 0.18	0.91 ± 0.10
Καρδιά	0.14 ± 0.02	0.03 ± 0.005	0.06 ± 0.01
Νεφρά	2.92 ± 0.33	1.75 ± 0.63	1.67 ± 0.09
Στομάχι	0.59 ± 0.23	0.26 ± 0.04	0.91 ± 0.32
Έντερο	0.96 ± 0.21	1.13 ± 0.07	1.61 ± 0.24
Σπλήνας	0.18 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Μυς	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.01
Πνεύμονες	0.31 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.03
Πάγκρεας	1.62 ± 0.09	0.32 ± 0.06	0.12 ± 0.02

* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

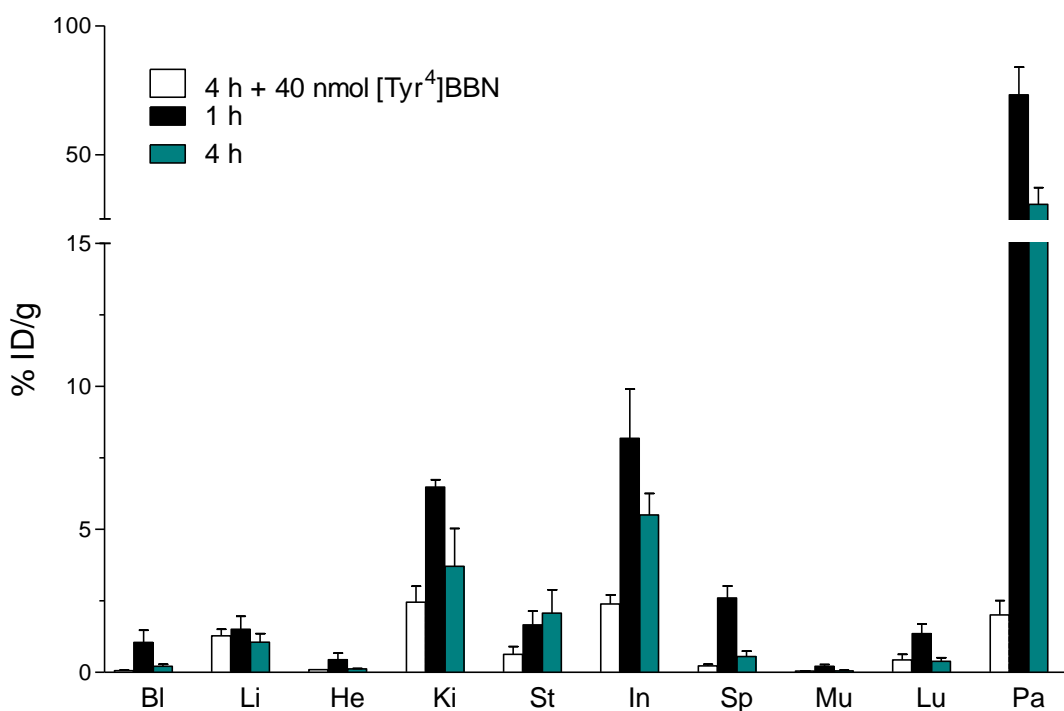


Σχήμα 15.2.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 7, 1 h, 4 h *pi* σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.3.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*
Αίμα	1.05 ± 0.36	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Ήπαρ	1.51 ± 0.39	1.04 ± 0.21	1.28 ± 0.18
Καρδιά	0.45 ± 0.20	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Νεφρά	7.71 ± 2.13	3.45 ± 1.14	2.46 ± 0.46
Στομάχι	1.66 ± 0.42	2.53 ± 0.76	0.62 ± 0.23
Έντερο	8.19 ± 1.49	5.60 ± 0.98	2.39 ± 0.25
Σπλήνας	2.17 ± 0.80	0.69 ± 0.21	0.23 ± 0.04
Μυς	0.22 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Πνεύμονες	1.36 ± 0.28	0.31 ± 0.08	0.44 ± 0.15
Πάγκρεας	73.22 ± 9.36	30.21 ± 8.82	2.00 ± 0.42

* (+ 40 nmol [Tyr^4]BBN)

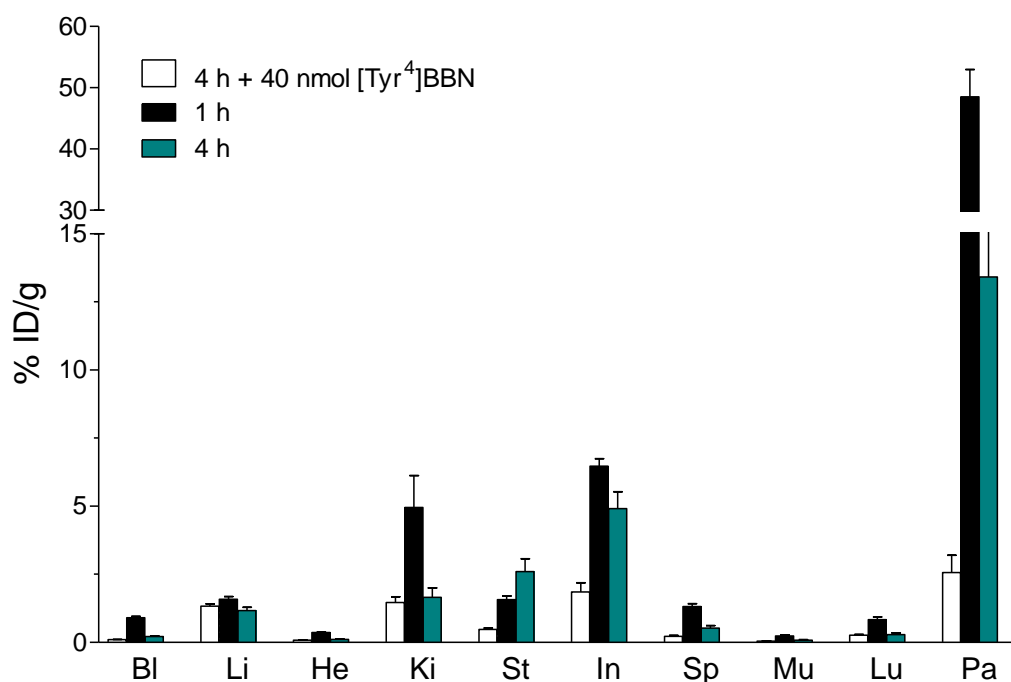


Σχήμα 15.3.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 8, 1 h, 4 h *in vivo* σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.4: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 11 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*
Αίμα	0.90 ± 0.08	0.21 ± 0.05	0.10 ± 0.02
Ήπαρ	1.59 ± 0.17	1.16 ± 0.22	1.33 ± 0.12
Καρδιά	0.36 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.08 ± 0.01
Νεφρά	4.96 ± 2.01	1.65 ± 0.59	1.46 ± 0.29
Στομάχι	1.57 ± 0.22	2.60 ± 0.80	0.47 ± 0.07
Έντερο	6.48 ± 0.48	4.91 ± 1.08	1.85 ± 0.47
Σπλήνας	1.32 ± 0.19	0.53 ± 0.17	0.22 ± 0.05
Μυς	0.23 ± 0.06	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.02
Πνεύμονες	0.84 ± 0.17	0.28 ± 0.12	0.26 ± 0.05
Πάγκρεας	48.51 ± 7.67	13.42 ± 2.92	2.56 ± 0.89

* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

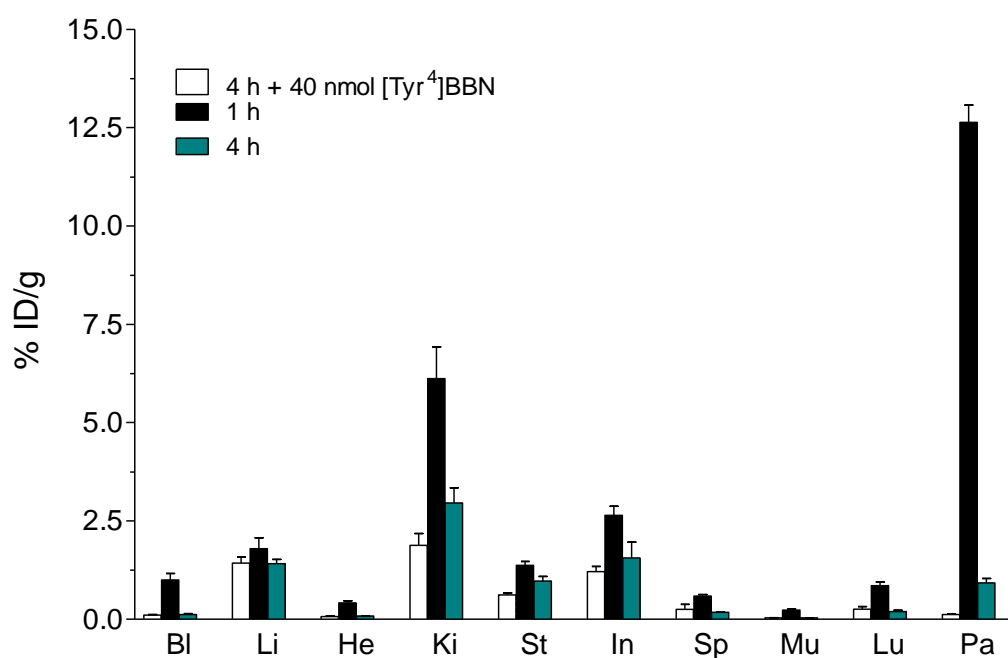


Σχήμα 15.4.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 11, 1 h, 4 h *in vivo* σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.5: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 12 σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*
Αίμα	1.00 ± 0.28	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.02
Ήπαρ	1.79 ± 0.48	1.41 ± 0.20	1.42 ± 0.23
Καρδιά	0.42 ± 0.09	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Νεφρά	6.12 ± 1.40	2.96 ± 0.67	1.87 ± 0.43
Στομάχι	1.37 ± 0.18	0.97 ± 0.22	0.61 ± 0.08
Έντερο	2.63 ± 0.41	1.56 ± 0.70	1.21 ± 0.19
Σπλήνας	0.59 ± 0.07	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.18
Μυς	0.23 ± 0.05	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Πνεύμονες	0.86 ± 0.16	0.20 ± 0.05	0.26 ± 0.09
Πάγκρεας	12.63 ± 0.76	0.92 ± 0.20	0.12 ± 0.01

* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)



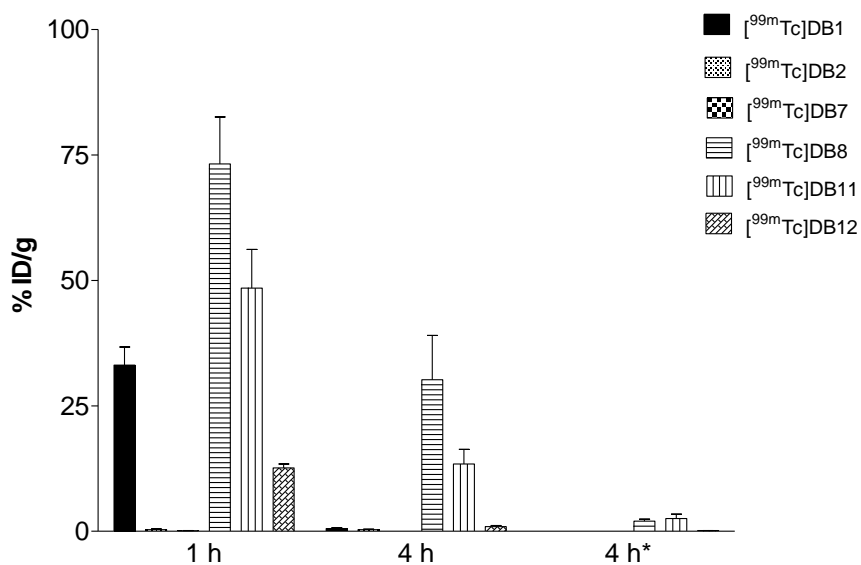
Σχήμα 15.5.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 12, 1 h, 4 h *pi* σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), BI=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Παρατηρήθηκε ότι τα επισημασμένα πεπτίδια απομακρύνθηκαν γρήγορα από την κυκλοφορία του αίματος. Για παράδειγμα το ποσοστό πρόσληψης στο αίμα για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ήταν αρχικά μικρό ($1.05 \pm 0.36\%$ ID/g σε 1 h *pi*) και μειώθηκε ακόμα περισσότερο με τη πάροδο του χρόνου ($0.17 \pm 0.02\%$ ID/g σε 4 h *pi*). Η

κάθαρση έγινε διαμέσου των νεφρών ($7.71 \pm 2.13\%$ ID/g σε 1 h pi) στα ούρα. Αντίθετα το ποσοστό ηπατικής πρόσληψης ήταν μικρό (1.51 ± 0.39 ID/g σε 1 h pi). Η παρουσία των δύο ατόμων οξυγόνου του πυρήνα $Tc^V(O)_2^+$, αλλά και του θετικού φορτίου του μονοκατιονικού συμπλόκου $[^{99m}Tc^V(O)_2(N_4)]^+$, προσδίδει στα πεπτίδια αυτά γενικά υδρόφιλο χαρακτήρα και αναμένεται η κύρια οδός απέκκρισής τους να είναι μέσω του ουροποιητικού συστήματος. Στον Πίνακα 15.6. και στα Σχήματα 15.6. – 15.7. παρατίθενται τα συγκριτικά αποτελέσματα βιοκατανομής επιλεκτικά για το πάγκρεας και τα νεφρά.

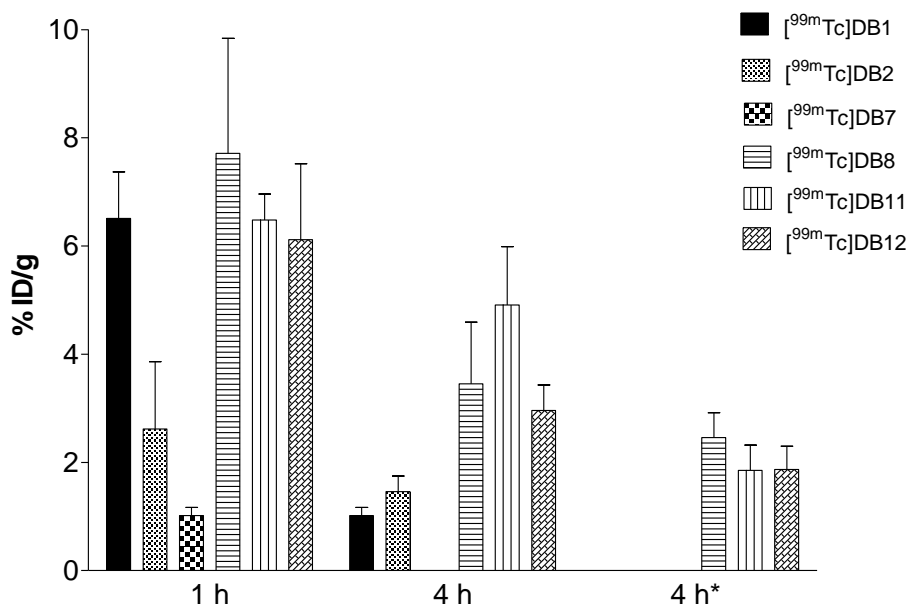
Πίνακας 15.6.: Συγκριτική αξιολόγηση των $[^{99m}Tc]Demobesin X$ (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου *Swiss albino*

		%ID/g	
		Πάγκρεας	Νεφρά
$[^{99m}Tc]Demobesin 1$	1 h	33.13 ± 3.63	6.51 ± 0.86
	4 h	0.52 ± 0.15	1.02 ± 0.15
$[^{99m}Tc]Demobesin 2$	1 h	0.34 ± 0.11	2.62 ± 1.24
	4 h	0.14 ± 0.02	1.46 ± 0.29
$[^{99m}Tc]Demobesin 7$	1 h	1.61 ± 0.09	2.92 ± 0.27
	4 h	0.30 ± 0.05	1.75 ± 0.51
	4 h + 40 nmol $[Tyr^4]BBN$	0.12 ± 0.02	-
$[^{99m}Tc]Demobesin 8$	1 h	73.22 ± 9.36	7.71 ± 2.13
	4 h	30.21 ± 8.82	3.45 ± 1.14
	4 h + 40 nmol $[Tyr^4]BBN$	2.00 ± 0.42	-
$[^{99m}Tc]Demobesin 11$	1 h	48.51 ± 7.67	6.48 ± 0.48
	4 h	13.42 ± 2.92	4.91 ± 1.08
	4 h + 40 nmol $[Tyr^4]BBN$	2.56 ± 0.89	-
$[^{99m}Tc]Demobesin 12$	1 h	12.63 ± 0.76	6.12 ± 1.40
	4 h	0.92 ± 0.20	2.96 ± 0.67
	4 h + 40 nmol $[Tyr^4]BBN$	0.12 ± 0.01	-



* (+ 40 nmol $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$)

Σχήμα 15.6.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στο πάγκρεας, για τα $[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino



* (+ 40 nmol $[\text{Tyr}^4]\text{BBN}$)

Σχήμα 15.7.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στα νεφρά, για τα $[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino

Για το πάγκρεας (όργανο-στόχος) παρατηρήθηκε υψηλή τιμή πρόσληψης για το $[^{99m}\text{Tc}]$ Demobesin 8 ($73.22 \pm 9.36\%$ ID/g σε 1 h pi), που παραμένει υψηλή (αν και

μειωμένη πάνω από 50%) ακόμα και μετά από 4 h pi ($30.21 \pm 8.82\%$ ID/g). Η μείωση πιθανόν να οφείλεται στην έντονη ενζυμική δραστηριότητα που παρατηρείται στο πάγκρεας. Υψηλές τιμές πρόσληψης παρατηρήθηκαν για το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ($48.51 \pm 7.67\%$ ID/g 1 h pi), ενώ λίγο χαμηλότερες για το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ($12.63 \pm 0.76\%$ ID/g 1 h pi), των οποίων η δομή προέρχεται από τροποποιήσεις της πεπτιδικής αλυσίδας του [^{99m}Tc]Demobesin 8. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις τιμές συγγένειας δέσμευσης για τον GRP-R. Για τα [^{99m}Tc]Demobesin 2 και [^{99m}Tc]Demobesin 7 παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας ($0.34 \pm 0.11\%$ ID/g 1 h pi και $0.10 \pm 0.05\%$ ID/g 1 h pi αντίστοιχα), πολύ χαμηλότερες από την αντίστοιχη για το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ($33.13 \pm 3.63\%$ ID/g 1 h pi).

Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων δέσμευσης κορεσμού σε κύτταρα PC-3 ($K_d 0.24 \pm 0.03$) και φανερώνουν την υψηλή συγγένεια του [^{99m}Tc]Demobesin 8 για τον GRP-R. Η εντόπιση της ραδιενέργειας στα όργανα-στόχους λόγω εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης του ραδιοπεπτιδίου με τους GRP-R, επιβεβαιώθηκε με πειράματα *in vivo* αποκλεισμού των υποδοχέων με συγχορήγηση περισσειας [Tyr^4]BBN (40 nmol) με το ραδιοπεπτίδιο (10 pmol). Πράγματι η τιμή πρόσληψης στο πάγκρεας μειώθηκε δραστικά (π.χ. για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 από $30.21 \pm 8.82\%$ ID/g 4 pi, σε $2.00 \pm 0.42\%$ ID/g). Επίσης οι αυξημένες τιμές πρόσληψης που παρατηρήθηκαν στο έντερο, οφείλονται εν μέρει στη φυσιολογική έκφραση του GRP-R στον ιστό και όχι μόνο σε ηπατοχολική απέκκριση της ραδιενέργειας, όπως αποδείχτηκε με πειράματα *in vivo* αποκλεισμού των υποδοχέων (από $5.60 \pm 0.98\%$ ID/g 4 h pi σε $2.39 \pm 0.25\%$ ID/g 4 h pi + 40 nmol [Tyr^4]BBN).

15.2. Βιοκατανομή σε ποντίκια με πειραματικούς όγκους PC-3

Σκοπός ήταν η αξιολόγηση της πρόσληψης των ραδιοπεπτιδίων σε πειραματικούς όγκους που υπερεκφράζουν τον GRP-R και παράλληλα η μελέτη της φαρμακοκινητικής τους.

Οι μελέτες βιοκατανομής, πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID μετά από υποδόρια εμφύτευση καρκινικών κυττάρων PC-3 στο μηρό των πειραματόζων. Η γενετική ανωμαλία SCID (Severely Compromised Immunodeficiency) χαρακτηρίζεται από την πλήρη έλλειψη της ικανότητας του

ανοσοποιητικού συστήματος να συντονίζει και να παρέχει κατάλληλη βιολογική απόκριση λόγω της έλλειψης τυπικών T και B λεμφοκυττάρων ή της ύπαρξης μη τυπικών T και B λεμφοκυττάρων. Τα ποντίκια τύπου SCID χαρακτηρίζονται από μία σπάνια μετάλλαξη στο χρωμόσωμα 16, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή δραστικότητα του ενζύμου Prkdc (καταλυτικό πολυπεπτίδιο τύπου πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από DNA) το οποίο εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Επειδή δεν γίνεται φυσιολογικά ο ανασυνδυασμός των [V(D)J] περιοχών των γονιδίων, διακόπτεται η φυσιολογική ωρίμανση των T και B λεμφοκυττάρων. Τα ποντίκια τύπου SCID παρουσιάζουν για το λόγο αυτό, ανοσοανεπάρκεια, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να μην μπορεί να καταπολεμήσει ασθένειες ή μολύνσεις από ιούς και βακτήρια, αλλά ούτε και να απορρίψει εμφύτευση καρκινικών όγκων και ξένων ιστών [289]. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, τα ποντίκια τύπου SCID χρησιμοποιούνται πολύ συχνά σαν πειραματόζωα για την μελέτη της βιολογίας του ανοσοποιητικού συστήματος και για την μελέτη τεχνικών εμφύτευσης κυττάρων με άριστα αποτελέσματα. Έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως φορείς εμφυτευμάτων φυσιολογικών και κακοήθων ιστών. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί για την δοκιμή της ασφάλειας νέων εμβολίων ή φαρμακευτικών σκευασμάτων που προορίζονται για ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Τα κύτταρα PC-3 προέρχονται από ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη και χρησιμοποιήθηκαν ως πιο κατάλληλα για τα *in vivo* πειράματα. Υπάρχουν διαφορές στην ικανότητα δέσμευσης αναλόγων στους αντίστοιχους GRP-Rs μεταξύ τρωκτικών και ανθρώπου [290-292]. Οι μελέτες εκτελούνται σε παθολογικά πρότυπα που προσομοιάζουν κατά το δυνατόν την ανθρώπινη κατάσταση. Για το σκοπό αυτό επιλέγονται πειραματικοί όγκοι ανθρώπινης προέλευσης (ετερομοσχεύματα* PC-3)

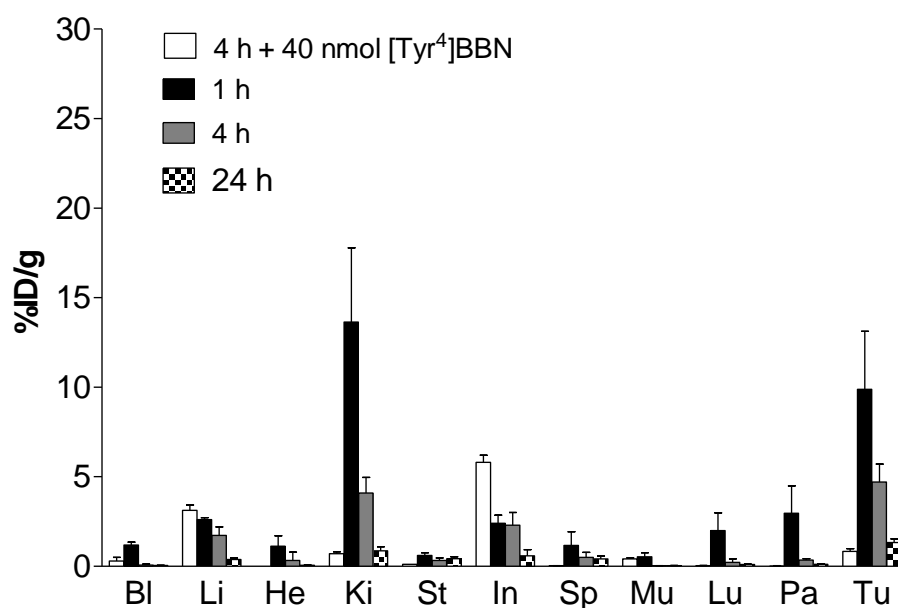
* Μοσχεύματα που εμφυτεύονται σε ένα SCID ποντίκι και προέρχονται από διαφορετικό είδος.

Στους Πίνακες 15.7. έως 15.12. και στα Σχήματα 15.8. έως 15.13. παρατίθενται τα αποτελέσματα των βιοκατανομών:

Πίνακας 15.7: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 2 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr 4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*	24 h
Αίμα	1.19 ± 0.16	0.07 ± 0.06	0.29 ± 0.21	0.05 ± 0.01
Ήπαρ	2.61 ± 0.11	1.72 ± 0.48	3.12 ± 0.31	0.39 ± 0.08
Καρδιά	1.13 ± 0.58	0.33 ± 0.47	0.01 ± 0.00	0.06 ± 0.01
Νεφρά	13.64 ± 4.15	4.10 ± 0.87	0.70 ± 0.11	0.87 ± 0.22
Στομάχι	0.61 ± 0.15	0.33 ± 0.14	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.11
Έντερο	2.40 ± 0.45	2.30 ± 0.70	5.81 ± 0.40	0.59 ± 0.35
Σπλήνας	1.16 ± 0.77	0.50 ± 0.29	0.03 ± 0.01	0.42 ± 0.16
Μυς	0.54 ± 0.22	0.03 ± 0.01	0.42 ± 0.05	0.04 ± 0.01
Πνεύμονες	1.99 ± 1.00	0.23 ± 0.18	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.03
Πάγκρεας	2.97 ± 1.52	0.35 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Όγκος	9.88 ± 3.25	4.71 ± 1.00	0.84 ± 0.15	1.33 ± 0.20

* (+ 40 nmol [Tyr 4]BBN)

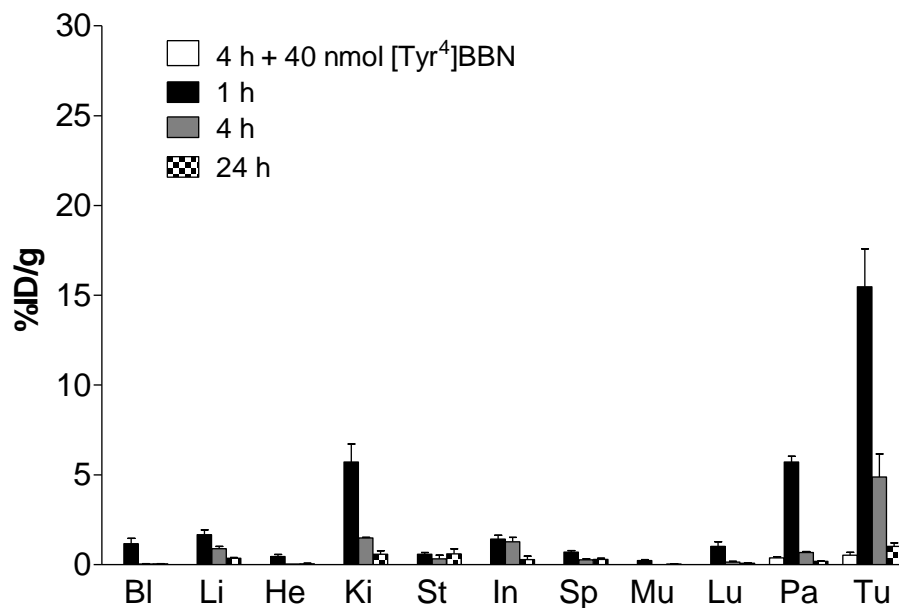


Σχήμα 15.8.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 2, 1 h, 4 h και 24 h *in vivo* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr 4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 2 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.8.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 7 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*	24 h
Αίμα	1.15 ± 0.37	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.47 ± 0.01
Ήπαρ	1.67 ± 0.34	0.89 ± 0.14	2.11 ± 0.43	0.36 ± 0.05
Καρδιά	0.45 ± 0.14	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.06 ± 0.02
Νεφρά	5.71 ± 1.23	1.48 ± 0.03	2.38 ± 0.56	0.58 ± 0.23
Στομάχι	0.58 ± 0.12	0.32 ± 0.23	0.45 ± 0.34	0.59 ± 0.35
Έντερο	1.42 ± 0.27	1.27 ± 0.27	2.85 ± 0.39	0.28 ± 0.23
Σπλήνας	0.71 ± 0.10	0.27 ± 0.06	1.33 ± 0.37	0.29 ± 0.08
Μυς	0.22 ± 0.07	0.15 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Πνεύμονες	1.02 ± 0.32	0.14 ± 0.05	0.55 ± 0.26	0.08 ± 0.02
Πάγκρεας	5.71 ± 0.41	0.68 ± 0.06	0.37 ± 0.09	0.19 ± 0.02
Όγκος	15.48 ± 2.59	4.78 ± 1.47	0.53 ± 0.20	1.02 ± 0.25

* (+ 40 nmol [Tyr^4]BBN)

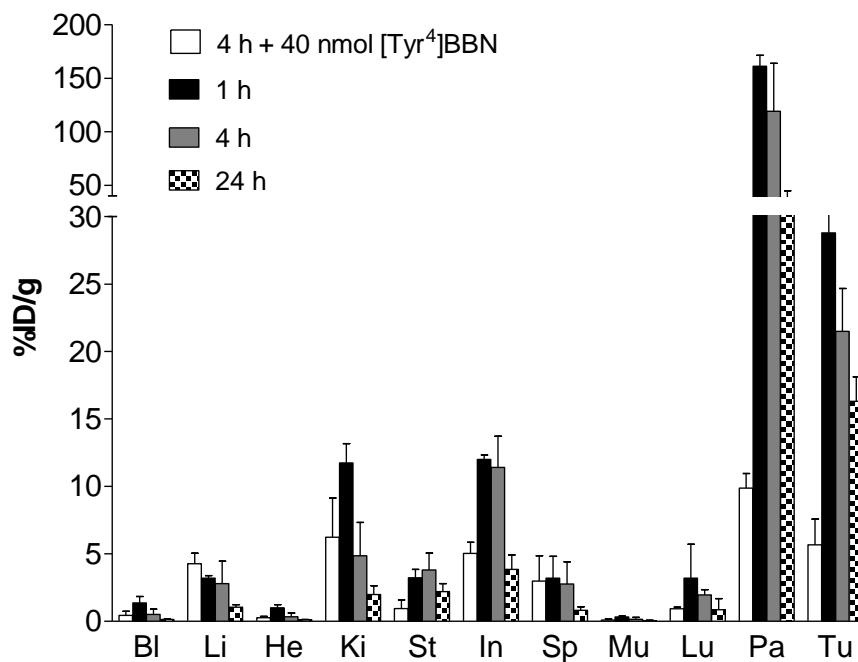


Σχήμα 15.9.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 7, 1 h, 4 h και 24 h *in vivo* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχρόνηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 7 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), BI=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.9.: Αποτελέσματα βιοκατανόμησης [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*	24 h
Αίμα	1.36 ± 0.47	0.50 ± 0.40	0.43 ± 0.31	0.13 ± 0.03
Ήπαρ	3.19 ± 0.20	2.78 ± 1.67	4.26 ± 0.79	1.05 ± 0.19
Καρδιά	0.99 ± 0.25	0.33 ± 0.28	0.27 ± 0.10	0.11 ± 0.02
Νεφρά	11.75 ± 0.42	4.87 ± 2.46	6.22 ± 2.92	1.99 ± 0.65
Στομάχι	3.23 ± 0.62	3.81 ± 1.26	0.95 ± 0.62	2.20 ± 0.58
Έντερο	12.01 ± 0.32	11.40 ± 2.33	5.04 ± 0.82	3.85 ± 1.06
Σπλήνας	3.20 ± 1.61	2.76 ± 1.64	2.98 ± 1.88	0.81 ± 0.26
Μυς	0.32 ± 0.07	0.15 ± 0.15	0.10 ± 0.06	0.05 ± 0.02
Πνεύμονες	3.19 ± 2.53	1.95 ± 0.40	0.93 ± 0.12	0.86 ± 0.81
Πάγκρεας	161.00 ± 10.37	119.04 ± 44.87	9.88 ± 1.08	30.26 ± 14.65
Όγκος	28.80 ± 4.13	21.49 ± 3.18	5.66 ± 1.92	16.32 ± 1.82

* (+ 40 nmol [Tyr^4]BBN)

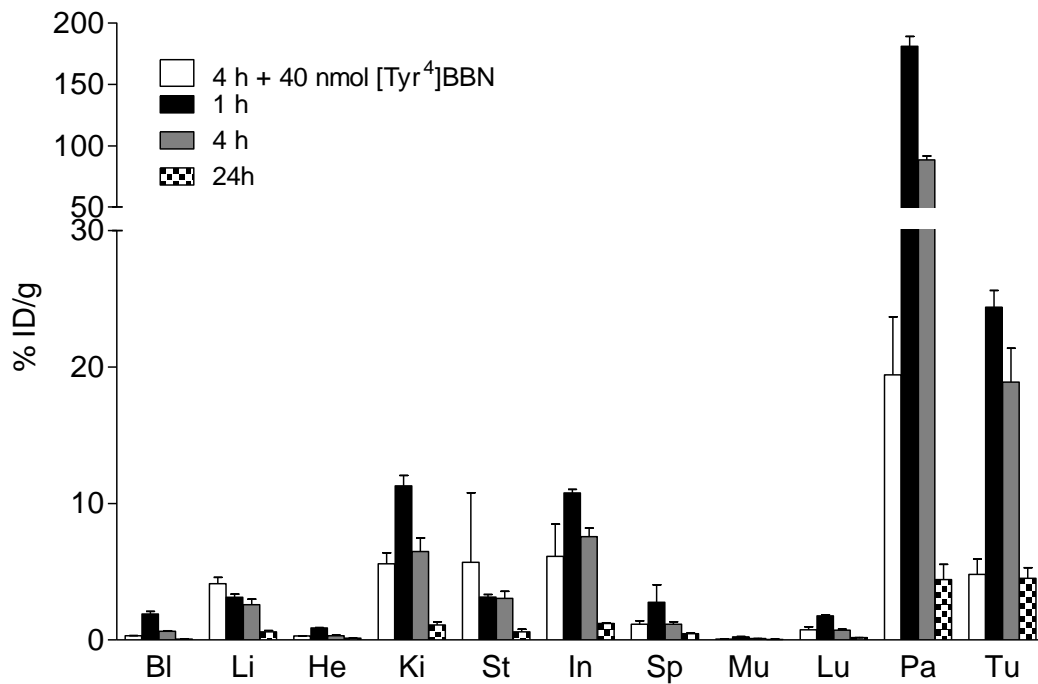


Σχήμα 15.10.: Βιοκατανόμηση [^{99m}Tc]Demobesin 8, 1 h, 4 h και 24 h *in vivo* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.10.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 11 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*	24 h
Αίμα	1.98 ± 0.37	0.62 ± 0.11	0.32 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Ήπαρ	3.14 ± 0.46	2.59 ± 0.80	4.13 ± 0.62	0.61 ± 0.17
Καρδιά	0.88 ± 0.05	0.32 ± 0.07	0.29 ± 0.03	0.14 ± 0.02
Νεφρά	11.29 ± 1.53	6.49 ± 1.97	5.57 ± 1.15	1.10 ± 0.38
Στομάχι	3.15 ± 0.37	3.06 ± 1.05	5.70 ± 7.21	0.60 ± 0.32
Έντερο	10.77 ± 0.52	7.58 ± 1.26	6.14 ± 3.32	1.22 ± 0.06
Σπλήνας	2.77 ± 2.56	1.16 ± 0.34	1.15 ± 0.37	0.48 ± 0.06
Μυς	0.25 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Πνεύμονες	1.76 ± 0.18	0.71 ± 0.15	0.76 ± 0.28	0.17 ± 0.02
Πάγκρεας	181.05 ± 15.78	88.39 ± 6.23	19.43 ± 6.01	4.43 ± 1.92
Όγκος	24.39 ± 2.45	18.91 ± 4.98	4.82 ± 1.55	4.54 ± 1.30

* (+ 40 nmol [Tyr^4]BBN)

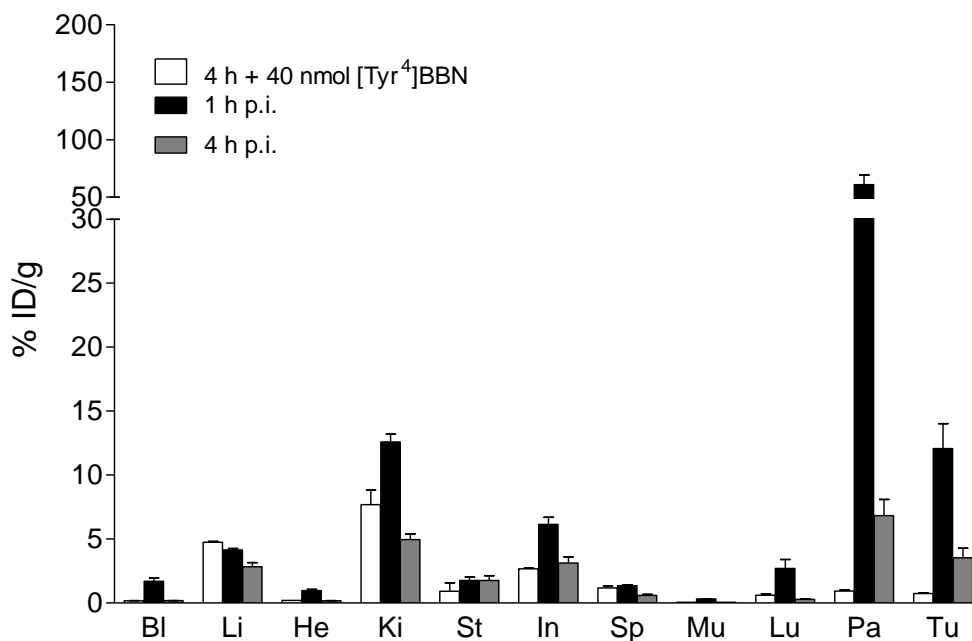


Σχήμα 15.11.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 11, 1 h, 4 h και 24 h *in vivo* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Πίνακας 15.11.: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 12 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [^{99m}Tc]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*
Αίμα	1.69 ± 0.35	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.04
Ήπαρ	4.16 ± 0.19	2.83 ± 0.64	4.73 ± 0.11
Καρδιά	0.98 ± 0.15	0.16 ± 0.04	0.20 ± 0.01
Νεφρά	12.59 ± 1.03	4.96 ± 0.88	7.68 ± 1.65
Στομάχι	1.75 ± 0.51	1.75 ± 0.77	0.91 ± 0.93
Έντερο	6.14 ± 0.96	3.11 ± 0.98	2.67 ± 0.06
Σπλήνας	1.33 ± 0.15	0.58 ± 0.15	1.17 ± 0.19
Μυς	0.31 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Πνεύμονες	2.69 ± 1.24	0.28 ± 0.05	0.60 ± 0.16
Πάγκρεας	60.98 ± 11.67	6.83 ± 2.55	0.92 ± 0.11
Όγκος	12.08 ± 3.35	3.53 ± 1.49	0.74 ± 0.07

* (+ 40 nmol [^{99m}Tc]BBN)



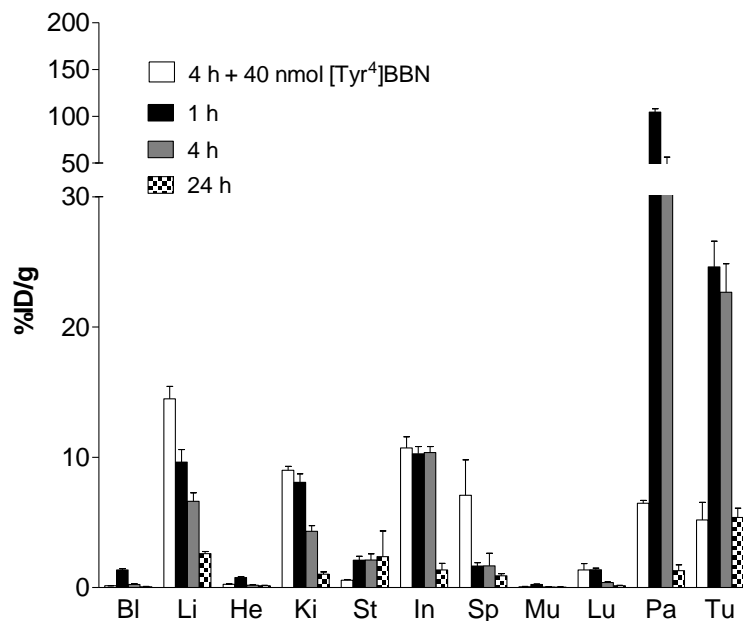
Σχήμα 15.12.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 12, 1 h, 4 h και 24 h p.i σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [^{99m}Tc]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Επίσης για λόγους σύγκρισης παρατίθενται στο Πίνακα 15.12 και στο Σχήμα 15.13, οι τιμές που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για το [^{99m}Tc]Demobesin 1:

Πίνακας 15.12: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 1 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3 ως % ID/g, (για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχωρήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	1 h	4 h	4 h*	24 h
Αίμα	1.36 ± 0.09	0.24 ± 0.06	0.14 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Ήπαρ	9.62 ± 0.97	6.62 ± 0.66	14.48 ± 0.96	2.61 ± 0.16
Καρδιά	0.76 ± 0.08	0.19 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.14 ± 0.03
Νεφρά	8.08 ± 0.65	4.33 ± 0.44	9.01 ± 0.30	1.02 ± 0.18
Στομάχι	2.10 ± 0.30	2.12 ± 0.48	0.57 ± 0.04	2.37 ± 1.98
Έντερο	10.27 ± 0.55	10.36 ± 0.46	10.72 ± 0.85	1.35 ± 0.51
Σπλήνας	1.66 ± 0.25	1.68 ± 0.94	7.08 ± 2.72	0.90 ± 0.17
Μυς	0.24 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Πνεύμονες	1.37 ± 0.12	0.38 ± 0.05	1.35 ± 0.49	0.15 ± 0.02
Πάγκρεας	104.39 ± 3.59	49.82 ± 6.69	6.48 ± 0.20	1.29 ± 0.46
Όγκος	24.61 ± 1.98	22.66 ± 2.20	5.19 ± 1.35	5.38 ± 0.72

* (+ 40 nmol [Tyr^4]BBN)

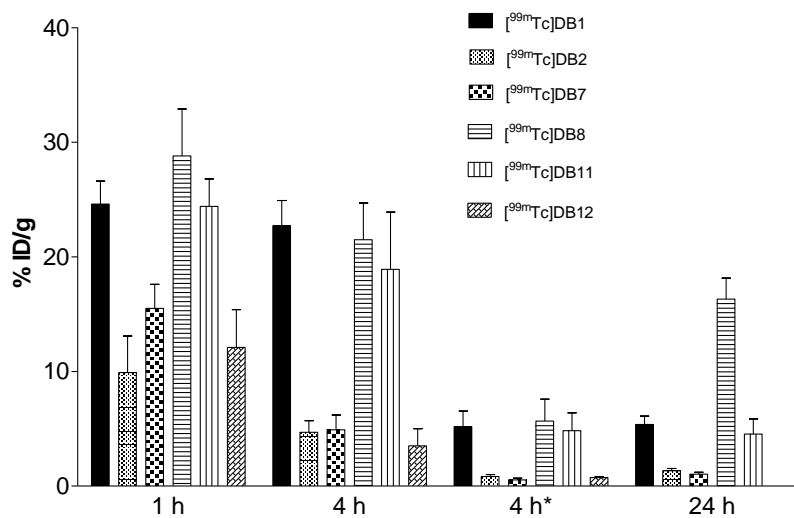


Σχήμα 15.13.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 1, 1 h, 4 h και 24 h *in vivo* σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3, (για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχωρήγηση 40 nmol [Tyr^4]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας

Στον Πίνακα 15.13. παρατίθενται τα συγκριτικά αποτελέσματα βιοκατανομής για τον όγκο, το πάγκρεας και τα νεφρά:

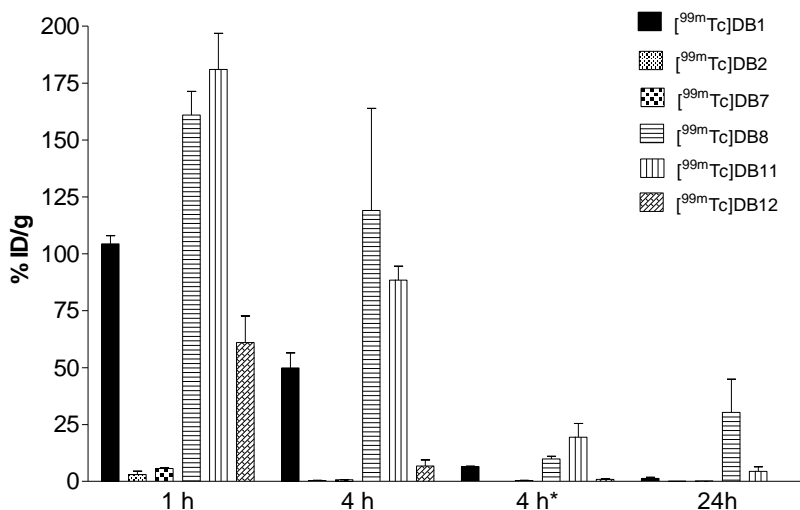
Πίνακας 15.13: Συγκριτική αξιολόγηση των [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1,2,7,8,11,12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους PC-3

		%ID/g		
		Όγκος	Πάγκρεας	Νεφρά
^{99m} Tc]Demobesin 1	1 h	24.6 ± 2.0	104.4 ± 3.6	8.1 ± 0.6
	4 h	22.7 ± 2.2	49.8 ± 6.7	4.4 ± 0.4
	24 h	5.4 ± 0.7	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.2
^{99m} Tc]Demobesin 2	1 h	9.9 ± 3.2	3.0 ± 1.8	13.6 ± 4.8
	4 h	4.7 ± 1.0	0.3 ± 0.1	4.1 ± 0.9
	24 h	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.2
^{99m} Tc]Demobesin 7	1 h	15.5 ± 2.1	5.7 ± 0.3	5.7 ± 1.0
	4 h	4.9 ± 1.3	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.0
	24 h	1.0 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.2
^{99m} Tc]Demobesin 8	1 h	28.8 ± 4.1	161.0 ± 10.4	11.7 ± 1.4
	4 h	21.5 ± 3.2	93.3 ± 8.1	4.9 ± 1.4
	24 h	16.3 ± 1.8	30.3 ± 14.6	2.0 ± 0.6
^{99m} Tc]Demobesin 11	1 h	24.4 ± 2.4	181.0 ± 15.8	11.3 ± 1.5
	4 h	18.9 ± 5.0	88.4 ± 6.2	6.5 ± 2.0
	24 h	4.5 ± 1.3	4.4 ± 1.9	1.1 ± 0.4
^{99m} Tc]Demobesin 12	1 h	12.1 ± 3.3	61.0 ± 11.7	12.6 ± 1.0
	4 h	3.5 ± 1.5	6.8 ± 2.5	5.0 ± 0.9



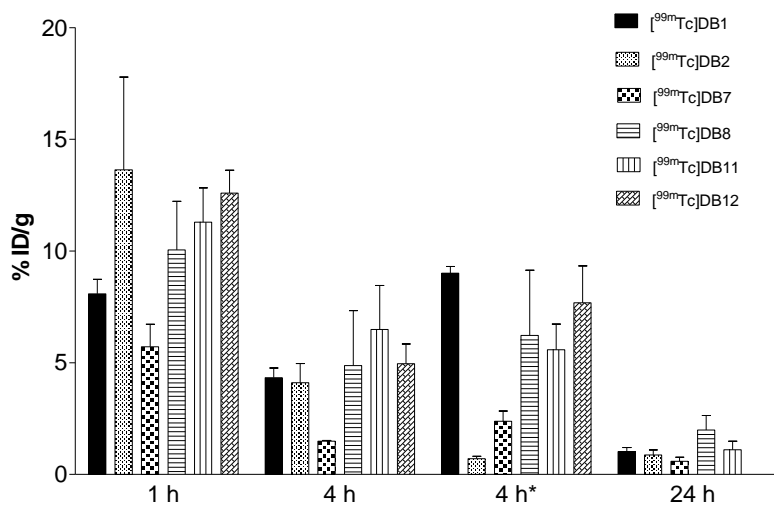
* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

Σχήμα 15.14.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στον όγκο, για τα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με όγκους PC-3



* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

Σχήμα 15.15.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στο πάγκρεας, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με όγκους PC-3



* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)

Σχήμα 15.16.: Συγκριτικά αποτελέσματα των τιμών πρόσληψης στα νεφρά, για τα [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με όγκους PC-3

Η αιματική κάθαρση όλων των επισημασμένων αναλόγων ήταν ταχεία με τις τιμές της ραδιενέργειας στο αίμα να είναι ήδη χαμηλές από την 1 h pi (π.χ. για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 $1.36 \pm 0.47\%$ ID/g). Η ραδιενέργεια για όλα τα επισημασμένα ανάλογα απομακρύνθηκε γρήγορα από τους ιστούς που δεν εκφράζουν τον GRP-R. Για παράδειγμα για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 η πρόσληψη στη καρδιά μειώθηκε από

0.98 ± 0.15% ID/g 1 h pi και μετά από 4 h pi σε 0.16 ± 0.04% ID/g. Η απέκκριση της ραδιενέργειας έγινε κυρίως διαμέσου του ουροποιητικού συστήματος, ενώ η ηπατοχολική απέκκριση είναι γενικά μικρή για όλα τα επισημασμένα ανάλογα ακόμα και από την αντίστοιχη για το [^{99m}Tc]Demobesin 1. Το παραπάνω αποτέλεσμα πιθανό να οφείλεται στη λιποφιλικότητα του [^{99m}Tc]Demobesin 1 σε σχέση με τα υπόλοιπα πιο υδρόφιλα ραδιοπεπτίδια. Τα ραδιοπεπτίδια εντοπίστηκαν γρήγορα και σε υψηλό ποσοστό στους φυσιολογικούς ιστούς έκφρασης των GRP-R, όπως το πάγκρεας και το έντερο. Οι υψηλότερες τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας παρατηρούνται για τα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin 1 (104.6 ± 3.6 % ID/g 1 h pi), [^{99m}Tc]Demobesin 8 (161.1 ± 10.4% ID/g 1 h pi), [^{99m}Tc]Demobesin 11 (181.0 ± 15.8 % ID/g 1 h pi). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υψηλές τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ακόμα και μετά από 24 h (30.3 ± 14.6% ID/g).

Οι υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον πειραματικό όγκο παρατηρήθηκαν για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 (28.8 ± 4.1% ID/g 1 h pi και 21.5 ± 3.2% ID/g 4 h pi) και υπερβαίνουν αυτές του [^{99m}Tc]Demobesin 1 (24.6 ± 2.0% ID/g και 22.7 ± 2.2% ID/g αντίστοιχα). Επίσης ιδιαίτερη σημασία έχει ότι η πρόσληψη αυτή διατηρήθηκε υψηλή ακόμα και μετά από 24 h (16.3 ± 1.8% ID/g) σε αντίθεση με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 (5.4 ± 0.7% ID/g). Υψηλές τιμές πρόσληψης στον πειραματικό όγκο παρατηρήθηκαν και για τα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin 11 (24.4 ± 2.4% ID/g 1 h pi, 18.9 ± 5.0% ID/g 4 h pi) και [^{99m}Tc]Demobesin 12 (12.1 ± 3.3% ID/g 1 h pi, 3.5 ± 1.5% ID/g 4 h pi), τα οποία έχουν δομή ανάλογη με του [^{99m}Tc]Demobesin 8 με μικρές τροποποιήσεις στη πεπτιδική αλυσίδα. Ωστόσο οι τροποποιήσεις αυτές (για το Demobesin 11 αντικατάσταση της της Gly¹¹ από D-Ala¹¹ και για το Demobesin 12 επιπλέον αντικατάσταση της Gln⁷ με D-Gln⁷) δεν επέφεραν καλύτερες τιμές πρόσληψης στον πειραματικό όγκο. Η έλλειψη στο [^{99m}Tc]Demobesin 2 ή η τροποποίηση στο [^{99m}Tc]Demobesin 7 συνδετικού μορίου σε σχέση με το [^{99m}Tc]Demobesin 1 επίσης δεν οδήγησε σε υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον όγκο (9.9 ± 3.2% ID/g 1 h pi και 15.5 ± 2.11% ID/g h pi αντίστοιχα). Η πρόσληψη στον όγκο για όλα τα ραδιοπεπτίδια είναι ειδική και διαμεσολαβείται από τον GRP-R όπως αποδείχθηκε μετά από τον *in vivo* αποκλεισμό των GRP-R με συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN.

Συμπερασματικά τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται για το [^{99m}Tc]Demobesin 8. Η υψηλή και παρατεταμένη πρόσληψη του στον όγκο, ακόμα και 24 h μετά την χορήγηση, σε συνδυασμό με την ταχεία απομάκρυνση της

ραδιενέργειας από τους φυσιολογικούς ιστούς (υπόστρωμα), οδήγησε σε υψηλούς λόγους όγκου/υπόστρώματος όπως φαίνεται στον Πίνακα 15.14. Ο λόγος όγκος/υπόστρωμα είναι ενδεικτικός της ποιότητας μιας απεικόνισης με SPECT ή γ-κάμερα μετά την χορήγηση του ραδιοφαρμάκου στον ασθενή. Όσο μεγαλύτερη η τιμή του λόγου αυτού τόσο περισσότερο ευκρινής είναι η απεικόνιση και άρα μεγαλύτερη η διαγνωστική ευαισθησία του ραδιοφαρμάκου.

Πίνακας 15.14.: Λόγος όγκου/υπόστρώματος σε 1 h, 4 h και 24 h μετά την χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με όγκους PC-3

Λόγος	1 h	4 h	24 h
Όγκος/αίμα	21.2	43.0	221.5
Όγκος/ήπαρ	9.0	10.4	27.4
Όγκος/νεφρά	2.4	5.9	14.5
Όγκος/μυς	90.0	192.0	576.0

Παρατηρείται στον παραπάνω πίνακα ότι οι λόγοι όγκος/υπόστρωμα αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Διαπιστώνεται η γρήγορη απομάκρυνση του ραδιοπεπτιδίου από την κυκλοφορία του αίματος και τους παρακείμενους ιστούς.

Γενικά το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρουσιάζει ευνοϊκή βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα να θεωρείται πολύ κατάλληλο για τη στοχευμένη απεικόνιση GRP-R θετικών όγκων στον άνθρωπο.

15.3. Βιοκατανομή σε ποντίκια με πειραματικούς όγκους HEK293-GRPR

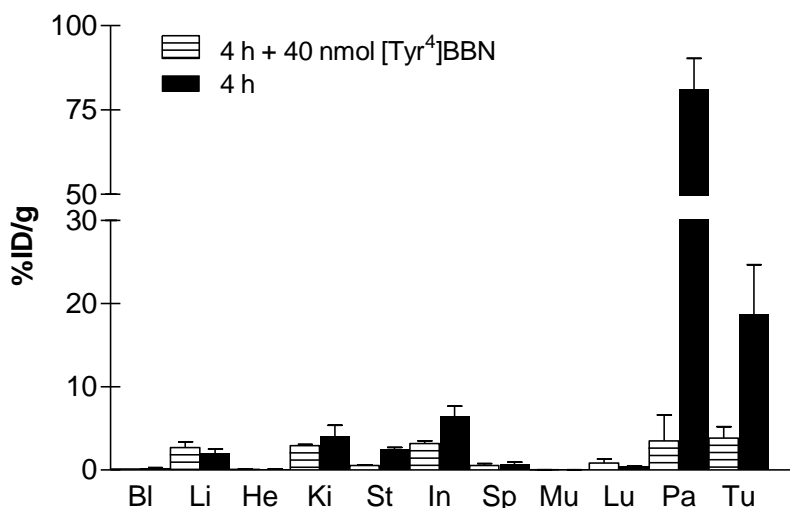
Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής του [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε πειραματικούς όγκους PC-3 ήταν ευνοϊκά και για το λόγο αυτό μελετήθηκε η συμπεριφορά τους και σε πειραματόζωα με πειραματικούς όγκους HEK293-GRPR. Οι μελέτες βιοκατανομής πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID μετά από υποδόρια εμφύτευση καρκινικών κυττάρων HEK293-GRPR στον μηρό των πειραματόζωων. Τα ανθρώπινα εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα (HEK293) [293,294] ήταν επιμολυσμένα ώστε να εκφράζουν σταθερά GRP-Rs.

Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.15. και στο Σχήμα 15.17.:

Πίνακας 15.15: Αποτελέσματα βιοκατανομής [^{99m}Tc]Demobesin 8 σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με πειραματικούς όγκους HEK-GRPR ως % ID/g, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Όργανα	4 h	4 h*
Αίμα	0.25 ± 0.05	0.12 ± 0.01
Ήπαρ	2.04 ± 0.47	2.70 ± 0.70
Καρδιά	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.03
Νεφρά	4.03 ± 1.37	2.93 ± 0.15
Στομάχι	2.47 ± 0.26	0.55 ± 0.10
Έντερο	6.48 ± 1.20	3.20 ± 0.29
Σπλήνας	0.69 ± 0.28	0.53 ± 0.24
Μυς	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Πνεύμονες	0.40 ± 0.10	0.85 ± 0.50
Πάγκρεας	80.98 ± 9.32	3.51 ± 3.13
Όγκος	18.74 ± 5.94	3.86 ± 1.36

* (+ 40 nmol [Tyr⁴]BBN)



Σχήμα 15.17.: Βιοκατανομή [^{99m}Tc]Demobesin 8, 4 h ρι σε θηλυκά ποντίκια τύπου SCID με καρκινικούς όγκους HEK-GRPR, (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης), Bl=αίμα, Li=ήπαρ, He=καρδιά, Ki=νεφρά, St=στομάχι, In=έντερο, Sp=σπλήνας, Mu=μυς, Lu=πνεύμονες, Pa=πάγκρεας, Tu=όγκος

Παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας (80.98 ± 9.32% ID/g 4 h ρι) και στον όγκο (18.74 ± 5.94% ID/g 4 h ρι). Η πρόσληψη στο πάγκρεας και

στον όγκο είναι ειδική και διαμεσολαβείται από τον GRP-R όπως αποδείχθηκε μετά από *in vivo* αποκλεισμό των GRP-R, με συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο σε μία ομάδα ζώων. Οι τιμές που παρατηρήθηκαν είναι ενθαρρυντικές για περαιτέρω μελέτη ραδιοπεπτιδίων σε πειραματόζωα με όγκους οφειλόμενους σε HEK-GRPR καρκινικά κύτταρα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, καθώς και η *in vitro* και η *in vivo* αξιολόγηση των ραδιοεπισημασμένων πεπτιδικών αναλόγων [^{99m}Tc]Demobesin 2, [^{99m}Tc]Demobesin 7, [^{99m}Tc]Demobesin 8, [^{99m}Tc]Demobesin 9, [^{99m}Tc]Demobesin 10, [^{99m}Tc]Demobesin 11 και [^{99m}Tc]Demobesin 12, για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση όγκων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα του γαστρινεκλυτικού πεπτιδίου (GRP-R).

Για τα πεπτίδια που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκε σαν οδηγός-ένωση ο ανταγωνιστής μπομπεσίνης [D-Phe⁶,Leu-NHEt¹³]BBN(6-13) και προέκυψαν από τροποποιήσεις στο N-τελικό άκρο, στο C-τελικό άκρο και/ή στη πεπτιδική αλυσίδα. Η στρατηγική σχεδιασμού των αναλόγων αυτών έχει αναλυθεί δεξιοδικά στον κεφάλαιο 6 (σελ. 65). Όλα τα ανάλογα παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα και ικανοποιητική απόδοση ενώ με φασματοσκοπία μάζας επιβεβαιώθηκε η αναμενόμενη δομή.

Ενδιαφέρον έχει η επιτυχία της επισήμανσης των αναλόγων με ^{99m}Tc, η οποία ήταν σχεδόν ποσοτική για όλα τα ανάλογα (εκτός των Demobesin 9 και Demobesin 10 των οποίων η επισήμανση οδήγησε σε παραπροϊόντα) και το εκάστοτε προϊόν παραλήφθηκε σε υψηλή καθαρότητα. Το σύμπλοκο τετραμίνης με το ^{99m}Tc ήταν σταθερό για τουλάχιστον 24 h μετά την επισήμανση όπως επιβεβαιώθηκε με κατάλληλες αναλύσεις HPLC και ITLC. Η ειδική ραδιενέργεια του κάθε ραδιοπεπτιδίου ήταν ~ 1 Ci/μmol, η οποία θεωρείται κατάλληλη για εφαρμογές *in vivo* στόχευσης υποδοχέων (συστήματα υψηλής συγγένειας - χαμηλής χωρητικότητας).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τετραμίνες σχηματίζουν σύμπλοκα όμοιας δομής με τεχνήτιο και ρήνιο. Μία επιπλέον επιβεβαίωση έγινε επιλεκτικά για το ανάλογο [^{99m}Tc]Demobesin 8 με τη σύνθεση και ταυτοποίηση του [^{185/187}Re]Demobesin 8 (§ 12.4., σελ. 127). Η σύγκριση των χρόνων έκλουσης του [^{99m}Tc]Demobesin 8 και του [^{185/187}Re]Demobesin 8 αποτέλεσε επιπλέον ένδειξη σχηματισμού ισοδομικών ενώσεων.

Η ικανότητα δέσμησης του κάθε αναλόγου στον GRP-R μελετήθηκε με πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης σε παρασκεύασμα κυτταρικών μεμβρανών PC-3, με ραδιοπροσδέτη το [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN. Στον Πίνακα Σ.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα:

Πίνακας Σ.1.: Εκτόπιση [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN από τους hGRP-Rs σε μεμβράνες κυττάρων PC-3 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των Demobesin 1, Demobesin 2, Demobesin 7-12 και [Tyr⁴]BBN ως ένωσης αναφοράς

Ανάλογο	IC ₅₀
[Tyr ⁴]BBN	1.22 ± 0.18 nM
Demobesin 1	0.7 ± 0.08 nM
Demobesin 2	0.7 ± 0.03 nM
Demobesin 7	0.93 ± 0.01 nM
Demobesin 8	0.26 ± 0.03 nM
Demobesin 9	0.30 ± 0.03 nM
Demobesin 10	0.17 ± 0.01 nM
Demobesin 11	0.56 ± 0.09 nM
Demobesin 12	0.71 ± 0.08 nM

Παρατηρήθηκε ότι τα Demobesin έχουν την ικανότητα να εκτοπίζουν την [¹²⁵I-Tyr⁴]BBN από μία τάξη θέσεων δέσμευσης BBN με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και με υψηλή συγγένεια δέσμευσης όπως αυτή εκφράζεται από την τιμή IC₅₀. Η συγγένεια δέσμευσης του κάθε αναλόγου βρέθηκε μεγαλύτερη από αυτή της ένωσης αναφοράς [Tyr⁴]BBN. Επομένως φαίνεται ότι η πρόσδεση του χηλικού υποκαταστάτη N₄ δεν επηρέασε αρνητικά την ικανότητα δέσμευσης αλλά αντίθετα αύξησε τη συγγένεια των Demobesin για τον GRP-R. Τα ανάλογα Demobesin 9 και Demobesin 10 φέρουν στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου πυρηνόφιλη ομάδα (π.χ. Leu-NHNH₂¹³ αντί Leu-NHEt¹³). Η αύξηση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της ομάδας στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου έχει αναφερθεί ότι αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης στον GRP-R [242,243]. Υψηλή συγγένεια δέσμευσης παρατηρήθηκε για το Demobesin 8 ενώ οι τιμές για τα Demobesin 11 και Demobesin 12 έδειξαν ότι οι τροποποιήσεις μέσα στη πεπτιδική αλυσίδα είχαν μικρή αρνητική επίδραση.

Για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρατηρήθηκε πολύ υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R (K_d = 0.24 ± 0.03 nM) με πειράματα δέσμευσης κορεσμού υποδοχέων σε κύτταρα PC-3. Δηλαδή η εισαγωγή του ραδιομετάλλου και η δημιουργία του συμπλόκου [^{99m}Tc(O)₂(N₄)⁺ δεν έχει αρνητική επίπτωση στην συγγένεια δέσμευσης του ραδιοπεπτιδίου με τον GRP-R. Η τιμή αυτή είναι ανώτερη από τις τιμές που έχουν αναφερθεί από πειράματα δέσμευσης σε κύτταρα PC-3 για άλλα ραδιοεπισημασμένα ανάλογα μπομπεσίνης [273-278,161].

Με επώαση των επισημασμένων πεπτιδίων με καρκινικά κύτταρα PC-3 στους 37 °C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα παρατηρήθηκε ότι η ολική δέσμευση στα κύτταρα είναι ανάλογη με τη σειρά κατάταξης της συγγένειας δέσμευσης. Στον

Πίνακα Σ.2. παρατίθενται τα ποσοστά δέσμευσης στη κυτταρική μεμβράνη μετά από 2 h:

Πίνακας Σ.2.: Ποσοστά ειδικής δέσμευσης σε καρκινικά κύτταρα PC-3 μετά από 2 h επώαση των επισημασμένων πεπτιδίων στους 37°C

Ανάλογο	% Ειδική δέσμευση
[^{99m} Tc]Demobesin 1	36.3
[^{99m} Tc]Demobesin 8	58.5
[^{99m} Tc]Demobesin 11	17.1
[^{99m} Tc]Demobesin 12	9.3

Όλα τα ανάλογα παρουσιάζουν συμπεριφορά ανταγωνιστή και δεν εσωτερικεύονται. Για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρατηρήθηκε ότι ένα πολύ υψηλό ποσοστό (58.5%) παρέμεινε δεσμευμένο στη κυτταρική μεμβράνη ακόμα και μετά από 2 h σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ανάλογα που εμφανίζουν χαμηλότερα ποσοστά δέσμευσης.

Για να μελετηθεί η ανταγωνιστική δράση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν λειτουργικές μελέτες όπως:

- α) Επαγωγή της εσωτερίκευσης του GRP-R.
- β) Παρεμπόδιση της επαγωγής της εσωτερίκευσης αγωνιστή παρουσία ανταγωνιστή.

Η ανταγωνιστική δράση επιβεβαιώθηκε επιλεκτικά για τα Demobesin 8 και Demobesin 10 σε κύτταρα HEK-GRPR. Η διαδικασία έγινε με χρήση μικροσκοπίου συνεστίασης και φθορίζοντος αντισώματος. Τα Demobesin 8 και Demobesin 10 προσδέθηκαν στους υποδοχείς χωρίς να προκαλέσουν την ενεργοποίησή τους καθώς δεν παρατηρήθηκε εσωτερίκευση των GRP-Rs ακόμα και σε πολύ υψηλή συγκέντρωση των δύο πεπτιδίων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι η επαγωγή εσωτερίκευσης των GRP-Rs από την BBN (πεπτιδίο-αγωνιστής) παρεμποδίστηκε παρουσία Demobesin 8 ή Demobesin 10 δηλαδή και τα δύο πεπτιδία παρουσίασαν καθαρά ανταγωνιστική δράση.

Η μεταβολική σταθερότητα του [^{99m}Tc]Demobesin 8, που από τις προηγούμενες *in vitro* μελέτες διαπιστώθηκε ότι ήταν το πεπτιδικό ανάλογο με τα πιο επιθυμητά αποτελέσματα, μελετήθηκε σε πλάσμα αίματος, ομογενοποίηση νεφρών ποντικού αλλά και *in vivo* σε ούρα ποντικού. Το [^{99m}Tc]Demobesin 8 αποικοδομείται αργά στο πλάσμα ενώ στο ομογενοποίηση νεφρών αποικοδομείται ταχέως σε

υδρόφιλους μεταβολίτες. Επίσης η ανάλυση HPLC ούρων που συλλέχθηκαν 30 min μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του ραδιοπεπτιδίου έδειξε πλήρη αποικοδόμησή του.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες βιοκατανομής σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino στα οποία έγινε χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin X (όπου X: 1, 2, 7, 8, 11, 12) από τη φλέβα της ουράς. Σκοπός ήταν η φαρμακοκινητική μελέτη, δηλαδή η ικανότητα ταχείας κάθαρσης υποστρώματος αλλά και η ικανότητα στόχευσης στα όργανα που εκφράζουν φυσιολογικά τον GRP-R (π.χ. πάγκρεας). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα Σ.3.:

Πίνακας Σ.3.: Αποτελέσματα βιοκατανομής με χορήγηση του [^{99m}Tc]Demobesin X σε υγιή αρσενικά ποντίκια τύπου Swiss albino, (για τον in vivo αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Ανάλογο		%ID/g	
		Πάγκρεας	Νεφρά
[^{99m} Tc]Demobesin 1	1 h	33.13 ± 3.63	6.51 ± 0.86
	4 h	0.52 ± 0.15	1.02 ± 0.15
			-
[^{99m} Tc]Demobesin 2	1 h	0.34 ± 0.11	2.62 ± 1.24
	4 h	0.14 ± 0.02	1.46 ± 0.29
[^{99m} Tc]Demobesin 7	1 h	1.61 ± 0.09	2.92 ± 0.27
	4 h	0.30 ± 0.05	1.75 ± 0.51
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	0.12 ± 0.02	-
[^{99m} Tc]Demobesin 8	1 h	73.22 ± 9.36	7.71 ± 2.13
	4 h	30.21 ± 8.82	3.45 ± 1.14
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	2.00 ± 0.42	-
[^{99m} Tc]Demobesin 11	1 h	48.51 ± 7.67	6.48 ± 0.48
	4 h	13.42 ± 2.92	4.91 ± 1.08
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	2.56 ± 0.89	-
[^{99m} Tc]Demobesin 12	1 h	12.63 ± 0.76	6.12 ± 1.40
	4 h	0.92 ± 0.20	2.96 ± 0.67
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	0.12 ± 0.01	-

Για το πάγκρεας, παρατηρήθηκε υψηλή τιμή πρόσληψης για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 (73.22 ± 9.36% ID/g σε 1 h pi), που παραμένει υψηλή (αν και

μειωμένη ~ 50%) στις 4 h pi ($30.21 \pm 8.82\%$ ID/g). Υψηλές τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας παρατηρήθηκαν και για το [^{99m}Tc]Demobesin 11 ($48.51 \pm 7.67\%$ ID/g 1 h pi), ενώ χαμηλότερες για το [^{99m}Tc]Demobesin 12 ($12.63 \pm 0.76\%$ ID/g 1 h pi). Επομένως οι τροποποιήσεις στη πεπτιδική αλυσίδα δεν έδωσαν υψηλότερες τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας σε σχέση με το [^{99m}Tc]Demobesin 8. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών *in vitro*. Η υψηλή τιμή πρόσληψης στο πάγκρεας μειώθηκε δραστικά σε ομάδα πειραματοζώων στα οποία συγχορηγήθηκε υψηλή δόση [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο, καταδεικνύοντας ότι η πρόσληψη διαμεσολαβείται από τον GRP-R. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα επισημασμένα πεπτίδια απομακρύνθηκαν γρήγορα από την κυκλοφορία του αίματος. Τέλος από τις τιμές πρόσληψης στα νεφρά φαίνεται ότι τα ραδιοεπισημασμένα ανάλογα απεκκρίνονται γρήγορα κυρίως διαμέσου των νεφρών στα ούρα.

Κατά την τελευταία φάση της διατριβής η αξιολόγηση των [^{99m}Tc]Demobesin X ολοκληρώθηκε σε ποντίκια τύπου SCID που έφεραν ανθρώπινα ετερομοσχεύματα PC-3. Τα ραδιοεπισημασμένα ανάλογα έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με αυτή στα υγιή ζώα. Πιο συγκεκριμένα η αιματική κάθαρση όλων των επισημασμένων αναλόγων ήταν ταχεία ενώ η ραδιενέργεια απομακρύνθηκε γρήγορα από τους ιστούς που δεν εμφανίζουν GRP-R. Η απέκκριση της ραδιενέργειας έγινε κυρίως διαμέσου του ουροποιητικού συστήματος, ενώ η ηπατοχολική απέκκριση είναι γενικά μικρή για όλα τα επισημασμένα ανάλογα. Οι υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον πειραματικό όγκο σε σχέση με τα υπόλοιπα ανάλογα παρατηρήθηκαν για το [^{99m}Tc]Demobesin 8 ($28.8 \pm 4.1\%$ ID/g 1 h pi και $21.5 \pm 3.2\%$ ID/g 4 h pi) και η πρόσληψη αυτή διατηρήθηκε υψηλή ακόμα και μετά από 24 h ($16.3 \pm 1.8\%$ ID/g). Η πρόσληψη για όλα τα ραδιοεπισημασμένα ανάλογα είναι ειδική και διαμεσολαβείται από τον GRP-R όπως προέκυψε μετά από *in vivo* αποκλεισμό των GRP-R με συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN.

Στον Πίνακα Σ.4. παρατίθενται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης αυτής:

Πίνακας Σ.4.: Αποτελέσματα βιοκατανομής με χορήγηση του κάθε ραδιοπεπτιδίου σε ποντίκια τύπου SCID που έφεραν ανθρωπίνα ετερομοσχεύματα PC-3 (για τον *in vivo* αποκλεισμό των υποδοχέων έγινε συγχορήγηση 40 nmol [Tyr⁴]BBN με το ραδιοπεπτίδιο ώστε να γίνει προσδιορισμός της ειδικής πρόσληψης)

Ανάλογο	%ID/g			
	Όγκος	Πάγκρεας	Νεφρά	
[^{99m}Tc]Demobesin 1	1 h	24.6 ± 2.0	104.4 ± 3.6	8.1 ± 0.6
	4 h	22.7 ± 2.2	49.8 ± 6.7	4.4 ± 0.4
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	2.9 ± 1.9	6.5 ± 0.2	-
	24 h	5.4 ± 0.7	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.2
[^{99m}Tc]Demobesin 2	1 h	9.9 ± 3.2	3.0 ± 1.8	13.6 ± 4.8
	4 h	4.7 ± 1.0	0.3 ± 0.1	4.1 ± 0.9
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	0.8 ± 0.1	0.02 ± 0.01	-
	24 h	1.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	0.9 ± 0.2
[^{99m}Tc]Demobesin 7	1 h	15.5 ± 2.1	5.7 ± 0.3	5.7 ± 1.0
	4 h	4.9 ± 1.3	0.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	-
	24 h	1.1 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2
[^{99m}Tc]Demobesin 8	1 h	28.8 ± 4.1	161.0 ± 10.4	11.7 ± 1.4
	4 h	21.5 ± 3.2	119.0 ± 44.9	4.9 ± 1.4
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	5.7 ± 1.9	9.9 ± 1.1	-
	24 h	16.3 ± 1.8	30.3 ± 14.6	2.0 ± 0.6
[^{99m}Tc]Demobesin 11	1 h	24.4 ± 2.4	181.0 ± 15.8	11.3 ± 1.5
	4 h	18.9 ± 5.0	88.4 ± 6.2	6.5 ± 2.0
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	4.8 ± 1.1	19.4 ± 6.1	-
	24 h	4.5 ± 1.3	4.4 ± 1.9	1.1 ± 0.4
[^{99m}Tc]Demobesin 12	1 h	12.1 ± 3.3	61.0 ± 11.7	12.6 ± 1.0
	4 h	3.5 ± 1.5	6.8 ± 2.5	5.0 ± 0.9
	4 h + 40 nmol [Tyr ⁴]BBN	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.1	-

Σε σύγκριση με το [^{99m}Tc]Demobesin 1, το οποίο είχε τις υψηλότερες τιμές πρόσληψης στον όγκο (24.6 ± 2.0% ID/g 1 h *pi* και 5.4 ± 0.7% ID/g 24 h *pi*) το [^{99m}Tc]Demobesin 8 παρουσίασε ακόμα υψηλότερες τιμές και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (28.8 ± 4.1% ID/g 1 h *pi* και 16.3 ± 1.8 % ID/g 24 h *pi*).

Επίσης, σύγκριση του [^{99m}Tc]Demobesin 8 με τα ανάλογα [^{99m}Tc]Demobesin 3-6 τα οποία δρουν ως αγωνιστές [181] επιβεβαίωσε ότι τα ραδιοπεπτίδια-ανταγωνιστές έχουν υψηλότερη ικανότητα στόχευσης των GRP-R - θετικών καρκινωμάτων. Πράγματι, τα [^{99m}Tc]Demobesin 3-6 αν και εσωτερικεύονται γρήγορα και σε υψηλό ποσοστό σε PC-3 κύτταρα έχουν χαμηλότερες τιμές πρόσληψης σε όγκο PC-3, καθώς για τα [^{99m}Tc]Demobesin 3-4 βρέθηκε να είναι 9-11 % ID/g σε 1 h *pi* και 7-9 % ID/g σε 4 h *pi*, ενώ για τα [^{99m}Tc]Demobesin 5-6 να είναι 2-4 % ID/g σε 1 h *pi* και 1.5-3.5 % ID/g σε 4 h *pi*.

Τα αποτελέσματα σύγκρισης με άλλα πεπτίδια ανταγωνιστές μπομπεσίνης καταγράφονται στον Πίνακα Σ.5.:

Πίνακας Σ.5.: Βιβλιογραφική σύγκριση του ανταγωνιστή Demobesin 8 με άλλα πεπτίδια ανταγωνιστές μπομπεσίνης

	IC ₅₀ (nM)	%ID/g		
			Όγκος	Πάγκρεας
DB 8	0.26 ± 0.03			
[^{99m}Tc]DB 8	0.24 ± 0.03*	1 h 4 h	28.8 ± 4.1 21.5 ± 3.2	161.0 ± 10.4 119.0 ± 44.9
RM1	35 ± 13			
[¹¹¹In]RM1	14 ± 3.4	1 h 4 h	14.2 ± 1.7 13.5 ± 0.8	-
RM2	7.7 ± 3.3			
[¹¹¹In]RM2	9.9 ± 3.3	1 h 4 h	15.2 ± 4.8 11.7 ± 2.4	22.6 ± 4.7 1.5 ± 0.5
Bomproamide	1.2 ± 0.2			
[¹¹¹In]Bomproamide	1.4 ± 0.1	1 h 4 h	3.9 ± 0.5 2.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2 0.4 ± 0.1

* Η τιμή αντιστοιχεί στη σταθερά Kd

Το πεπτίδιο RM1 [295] στο οποίο έχει προστεθεί διλειτουργικός χηλικός υποκαταστάτης DOTA δεν παρουσίασε υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R (IC₅₀ = 35 ± 13 nM) ενώ το ¹¹¹InRM1 είχε υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης (IC₅₀ = 14 ± 3.4 nM) αλλά συγκριτικά χαμηλότερη του [^{99m}Tc] Demobesin 8. Οι τιμές πρόσληψης του στον όγκο (14.24 ± 1.75 % ID/g 1 h pi, 13.46 ± 0.80 % ID/g 4 h pi και 6.58 ± 1.1.14 % ID/g 42 h pi) ήταν επίσης συγκριτικά χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες του [^{99m}Tc]Demobesin 8. Όμοια το πεπτίδιο RM2 [296] στο οποίο έχει προστεθεί διλειτουργικός χηλικός υποκαταστάτης DOTA και διαφορετικό συνδετικό μόριο σε σχέση με το RM1 παρουσίασε σχετικά υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R (IC₅₀ = 7.7 ± 3.3 nM) όπως και το ¹¹¹InRM2, αλλά οι τιμές πρόσληψης στον όγκο (15.2 ± 4.8 % ID/g 1 h pi, 11.7 ± 2.4% ID/g 4 h pi και 6.8 ± 1.0 % ID/g 42 h pi) είναι επίσης συγκριτικά χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες του [^{99m}Tc]Demobesin 8. Σύγκριση πραγματοποιήθηκε και με τον ανταγωνιστή μπομπεσίνης Bomproamide [297] το οποίο έχει ως διλειτουργικό χηλικό υποκαταστάτη DOTA και το οποίο επισημάνθηκε με ¹¹¹In. Και αυτό παρουσιάζει υψηλή συγγένεια δέσμευσης για τον GRP-R (IC₅₀ = 1.22 ± 0.18 nM) αλλά μικρότερη σε σχέση με το Demobesin 8, ενώ και οι τιμές πρόσληψης στον όγκο PC-3 είναι σημαντικά χαμηλότερες (3.91 ± 0.46 % ID/g 1 h pi, 2.02 ± 0.34% ID/g 4 h pi).

Συμπερασματικά το [^{99m}Tc]Demobesin 8 συνδυάζει σημαντικά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλή και παρατεταμένη πρόσληψη του στον όγκο, ακόμα και 24 h μετά την χορήγηση, σε συνδυασμό με την ταχεία απομάκρυνση της ραδιενέργειας από τους φυσιολογικούς ιστούς (υπόστρωμα), οδήγησε σε υψηλούς λόγους όγκου/υπόστρώματος.

Επιπλέον, το [^{99m}Tc]Demobesin 8 μελετήθηκε και σε πειραματόζωα με όγκους HEK293-GRPR. Παρατηρήθηκαν υψηλές τιμές πρόσληψης στο πάγκρεας ($80.98 \pm 9.32\%$ ID/g 4 h pi) και στον όγκο ($18.74 \pm 5.94\%$ ID/g 4 h pi). Η πρόσληψη στο πάγκρεας και στον όγκο είναι ειδική και διαμεσολαβείται από τον GRP-R όπως αποδείχθηκε μετά από *in vivo* αποκλεισμό των GRP-R με συγχορήγηση περίσσειας [Tyr⁴]BBN.

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η παρούσα διατριβή οδήγησε με επιτυχία στην ανάπτυξη νέων ^{99m}Tc-ραδιοπεπτιδίων (ανταγωνιστών μπομπεσίνης) για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση GRP-R θετικών όγκων στον άνθρωπο. Οι ενώσεις αυτές ικανοποίησαν σημαντικά κριτήρια *in vivo* στόχευση όγκων.

Ιδιαίτερα συμπεραίνεται, ότι το [^{99m}Tc]Demobesin 8 αποτελεί την ένωση επιλογής για εφαρμογή στη στοχευμένη απεικόνιση GRP-R θετικών όγκων στον άνθρωπο λόγω του συνδυασμού πολλών επιθυμητών βιολογικών ιδιοτήτων

Συντμήσεις

Οι συντμήσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί στη παρούσα διατριβή έχουν προταθεί από τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) και τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας (IUB). Τα αμινοξέα που αναφέρονται είναι L- στερεοχημικής διαμόρφωσης, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

AcOH	Οξικό οξύ
BATO (Boronic acid adducts of technetium dioximes)	Παράγωγα βορονικού οξέος διοξιμών του τεχνητίου
BBN (Bombesin)	Μπομπεσίνη
BFCA (Bifunctional chelating agent)	Χηλικός διλειτουργικός υποκαταστάτης
BLI (Bioluminescence imaging)	Απεικόνιση βιοφωταύγειας
Boc (t-butyloxycarbonyl)	Τριτοταγής βουτοξυκαρβονυλομάδα
BSA (bovine serum albumin)	Αλβουμίνη βόειου ορού
CA (Cancer antigen)	Καρκινικό αντιγόνο
cAMP (cyclic adenosine monophosphate)	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CAT (Computer Axial Tomography)	Υπολογιστική Αξονική Τομογραφία
CCD (charged coupled device)	Συσκευή συζευγμένου φορτίου
CEA (Carcinoembryonic antigen)	Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο
cpm (counts per minute)	Κρούσεις ανά λεπτό
CT (computed tomography)	Υπολογιστική τομογραφία
DADS	Διαμιδοδιθειόλες
DADT	Διαμινοδιθειόλες
DIEA (N,N-diisopropylethylamine)	N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMF (Dimethylformamide)	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''- tetraacetic acid)	1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκαν-N,N',N'',N'''-τετραοξικό οξύ
DTPA (Diethylenetriamine pentaacetic acid)	Διαιθυλενοτριαμινο πενταοξικό οξύ

EC (Electron capture)	Σύλληψη ηλεκτρονίου
ECD (Ethylenecysteinester dimer)	Διαιθυλεστέρας της αιθυλενοκυστεΐνης
EDDA (Ethylenediamine-N, N'-diacetic acid)	Αιθυλενοδιαμινο-N,N'-διοξικό οξύ
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ES/MS (Electrospray mass spectrometry)	Φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό
EUS (Endoscopic Ultrasonography)	Ενδοσκοπική υπερηχογραφία
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	Αιθανόλη
Fab (Antibody fragment)	Θραύσμα αντισώματος
FBS (Foetal bovine serum)	Ορός εμβρύου βοός
FDA (Food & Drug Administration)	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FDG (¹⁸F]fluorodeoxyglucose)	[¹⁸ F]φθορο-2-δεοξυ-D-γλυκόζη
FLI (Fluorence imaging)	Απεικόνιση φθορισμού
Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)	9-φθορενυλομεθοξυκαβονυλομάδα
GDP (Guanosine diphosphate)	Διφωσφορική γουανοσίνη
GMP (Guanosine monophosphate)	Μονοφωσφορική γουανοσίνη
GMP (Good Manufacturing Practice)	Καλή πρακτική παρασκευής Φαρμάκων
GPCR (G-protein coupled receptor)	Υποδοχέας που συζεύγνυται με τις G- πρωτεΐνες
GRP (Gastrin releasing peptide)	Γαστρινεκλυτικό πεπτιδίο
GRP-R (Gastrin releasing peptide receptor)	Υποδοχέας γαστρινεκλυτικού πεπτιδίου
GTP (Guanosine 5-triphosphate)	5-Τριφωσφορική γουανοσίνη
HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)	Εξαφθοροφωσφορικό άλας της O-(7-αζαβενζοτρίαζολ-1-υλ)-1,1,3,3,-τετραμεθυλουρίας
HCG (human chorionic gonadotrophin)	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
HEPES (N-[2-hydroxyethyl]-1-	N-[2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινο-N'-

piperazine-N´-[2-ethanesulfonic acid)	[2-αιθανοσουλφονικό οξύ]
HM-PAO (Hexamethyl-1-propylene-amine oxime)	Εξαμεθυλο-1-προπυλεναμινοξίμη
HPLC (High Perfomance Liquid Chromatography)	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ID (Injected dose)	Χορηγούμενη δόση
IR (Infra red)	Υπέρυθρο
ITLC (instant thin layer chromatography)	Ταχεία χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
iv (intravenously)	Ενδοφλέβια
LHRH (Luteinizing hormone releasing hormone)	Εκλυτική ορμόνη της ωχρινοτρόπου ορμόνης
Mabs (Monoclonal antibodies)	Μονοκλωνικά αντισώματα
MAMA (Monoamidomonoaminodithiols)	Μονοαμιδομονοαμινοδιθειόλες
mCi (millicurie)	
MeCN (Acetonitrile)	Ακετονιτρίλιο
MeOH (Methanol)	Μεθανόλη
MIBI (2-methoxy-2-methylpropyl-isonitrile)	2-μεθοξυ-2-μεθυλοπροπυλοϊσονιτρίλιο
mm (milimetre)	χιλιοστόγραμμο
Mob (4-methoxybenzyl)	π-μεθοξυβενζυλομάδα
MRI (Magnetic resonance imaging)	Μαγνητική τομογραφία
MS (Mass Spectometry)	Φασματομετρία μάζας
MTC (Medullary thyroid cancer)	Μυελλοειδές καρκίνωμα θυροειδούς
MW (Molecular weight)	Μοριακό βάρος
n-BuOH (n-butanol)	n-βουτανόλη
NMB (neuromedin B)	Νευρομεντίνη Β
NMC (neuromedin C)	Νευρομεντίνη C
NMP (N-methylpyrrolidine)	N-μεθυλοπυρρολιδίνη
NMR (Nuclear magnetic resonance)	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NPY (Neuropeptide Y)	Νευροπεπτίδιο Υ
NSE (Neuron specific enolase)	Ειδική ενολάση των νευρώνων
NT (Neurotensin)	Νευροτενσίνη

PAP (Prostatic acid phosphatate)	Προστατική όξινη φωσφατάση
PBS (Phosphate buffered saline)	Φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR (Polymerase chain reaction)	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PDA (Photodiode Array Detector)	Ανιχνευτής διάταξης φωτοδιόδων
PEG (Polyethylene glycol)	Πολυαιθυλενογλυκόλη
Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin)	Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη
PET (Positron emission tomography)	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
p.i. (post injection)	Μετά την χορήγηση
PIN (Prostatic intraepithelial neoplasia)	Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του προστάτη
PLC (Phospholipase C)	Φωσφολιπάση C
PnAO (Propylenediamine dioxime)	Προπυλενεδιαμινοδιοξίμη
PNP (Aminodiphosphine)	Αμινοδιφωσφίνη
PSA (Prostate specific antigen)	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
RP-HPLC (Reversed phase high performance liquid chromatography)	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης
Rpm (rounds per minute)	Στροφές ανά λεπτό
RT (room temperature)	Θερμοκρασία δωματίου
SCC (Squamous cell carcinoma)	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
SCID mice (Severely compromised immunodefficient)	Ποντίκια με βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
SCLC (Small cell lung cancer)	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
SD (Standard deviation)	Σταθερή απόκλιση
SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)	Υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής
SS (Somatostatin)	Σωματοστατίνη
sst (Somatostatin receptor)	Υποδοχέας σωματοστατίνης
TFA (Trifluoroacetic acid)	Τριφθοροξικό οξύ
Thr (Threonine)	Θρειονίνη
TLC (Thin layer chromatography)	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Τρις(υδροξυλομεθυλο)αμινομεθάνιο

US (Ultra Sonography)	Υπερηχογραφία
UV/Vis (Ultraviolet-Visible)	Υπεριώδες - Ορατό
VIP/PACAP (Vasoactive intestinal peptide/Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)	Αγγειοενεργό εντερικό πεπτίδιο / Ενεργοποιητικό πολυπεπτίδιο της υποφυσιακής αδενυλικής κυκλάσης
WHO (World Health Organization)	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας

Πίνακας Αμινοξέων

Αμινοξύ	Σύμβολο
Alanine (αλανίνη)	Ala
Cysteine (κυστεΐνη)	Cys
Aspartic acid (ασπαρτικό οξύ)	Asp
Glutamic acid (γλουταμικό οξύ)	Glu
Phenylalanine (φαινυλαλανίνη)	Phe
Glycine (γλυκίνη)	Gly
Histidine (ιστιδίνη)	His
Isoleucine (ισολευκίνη)	Ile
Lycine (λυσίνη)	Lys
Leucine (λευκίνη)	Leu
Methionine (μεθειονίνη)	Met
Asparagine (ασπαραγίνη)	Asn
Proline (προλίνη)	Pro
Glutamine (γλουταμίνη)	Gln
Arginine (αργινίνη)	Arg
Serine (σερίνη)	Ser
Threonine (θρεονίνη)	Thr
Valine (βαλίνη)	Val
Tryptophan (θρυπτοφάνη)	Trp
Tyrosine (τυροσίνη)	Tyr

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χρησιμοποιούμενα χρωματογραφικά συστήματα:

1: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 10% B σε 50% B (A=0.1% (v/v) TFA B=MeCN) σε 30 min με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Waters Symmetry Shield RP-18.5 μm , 3.9 mm \times 150 mm.

2: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 10% B σε 90% B (A=0.1%(v/v) TFA B=MeCN) σε 15 min, με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Nucleosil-100 RP-18.5 μm , 4 mm \times 150 mm.

3: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 20% B (A=0.1% (v/v)TFA, B=MeCN) σε 30 min, με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης XBridge Shield RP-18.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm.

4: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 10% B σε 30% B (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) σε 30 min, με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Symmetry Shield RP-18.5 μm , 3.9 mm \times 150 mm.

5: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 40% B (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN), σε 30 min με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης XBridge Shield RP-18.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm.

6: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 40% B (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) σε 30 min με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Waters Symmetry Shield RP-18.5 μm , 3.9 mm \times 20 mm.

7: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 60% B σε 20 min (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Waters Symmetry Shield RP-18.5 μm , 3.9 mm \times 20 mm.

8: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 40% B σε 30 min (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη ανάστροφης φάσης Waters XBridge Shield RP 18.5 μm , 4.6 mm \times 20 mm

9: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 15% B σε 55% B σε 60 min (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) με ταχύτητα ροής 1 mL/min σε στήλη SymmetryShield RP-18.5 μm , 3.9 mm \times 150 mm.

10: σύστημα διαλυτών γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης από 0% B σε 100% B σε 60 min (A=0.1% (v/v) TFA, B=MeCN) με ταχύτητα ροής 2 mL/min σε στήλη XTerra RP-18.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Edited by Stewart B.W., Kleihues P., "World Cancer Report 2003", IARC publications
2. Polkowski M., "Endoscopic ultrasonography", *Endoscopy*, 2008, **40**(1), 45-9
3. Oh Ys., Early DS, Azar RR, "Clinical applications of endoscopic ultrasound to oncology", *Oncology*, 2005, **68**, 526-37
4. Reddy NK., Markowitz AB., Abbruzzese JL., Bhutani MS., "Knowledge of indications and utilization of EUS: a survey of oncologists in the United States", *J. Clin. Gastroenterol.*, 2008, **42**, 892-6
5. Anadasabapalthy S., "Endoscopic ultrasound: indications and applications", *Mt. Sinai. J. Med.*, 2006, **73**, 702-7
6. Sacher-Huvelin S., Bourreille A., Le Rhum M., Galmiche JP., "Future prospects in digestive endoscopy: wireless capsule endoscopy", *Clin. Biol.*, 2009, **33**, 747-57
7. Li A., "Capsule endoscopy. Technique has limitations", *BMJ*, 2009
8. Moglia A., Pietrabissa A., Cuschieri A., "Capsule Endoscopy", *BMJ*, 2009
9. De Franchis R., Rondonotti E., Villa F., "Capsule endoscopy – state of the art", *Dig. Dis*, 2007, **25**, 249-51
10. Damadian R., Goldsmith M., Minkoff L., "NMR in cancer: XVI. Fonar image of the live human body", *Physiological Chemistry and Physics*, 1977, **9**, 97–100
11. Schall M., and Rosen M., "Primer on imaging technologies for cancer", 2006, *J. Clin. Oncol.*, **24**, 3225-33
12. Sorensen A.G., "Magnetic resonance as a cancer imaging biomaker", *J. Clin.Oncol.*, **24**, 3299-308
13. Weinmann H.J., Brasch R.C., Press W.R., Wesbey G.E. "Characteristics of gadolinium-DTPA complex: A potential NMR contrast agent", *AJR AM. J. Roentgenology*, 1984, **142**, 619–24
14. Laniado M., Weinmann H.J., Schörner W., Felix R., Speck U., "First use of GdDTPA/dimeglumine in man". *Physiological Chemistry & Physics & Medical NMR*, 1984, **16**, 157–65
15. Widder D.J., Greif W.L., Widder K.J., Edelman R.R., Brady T.J. (1987). "Magnetite albumin microspheres: A new MR contrast material", *AJR AM. J. Roentgenology*, 1987, **148**(2): 399–404
16. Weissleder R., Elizondo G., Wittenberg J., Rabito C.A., Bengele H.H., Josephson L., "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterization of a new class of contrast agents for MR imaging", 1990, *Radiology* **175**(2), 489–93

17. Barentsz J., Takahashi S., Oyen W., Mus R., De Mulder P., Reznik R., Oulderk M., Mail W., "Commonly used imaging technologies for diagnosis and staging", *J. Clin. Oncol.*, 2006, **24**, 3234-44
18. Atri M., "New technologies and directed agents for applications of cancer imaging", *J. Clin. Oncol.*, 2006, **24**, 3274-81
19. Blackwell R., "Clinical Diagnostic Ultrasound: Apparatus and General Scanning Technique", *Blackwell Scientific Publications*, 1985
20. Blomley M.J., Cooke C.J., Unger E.C., Monaghan M.J., Cosgrove D.O., "Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound", *BMJ*, 2001, **19**, 1222-5
21. Furlow B., "Contrast-enhanced ultrasound", *Radiol. Technol.*, 2009, **80**, 547-61
22. Gheysens O., Mottaghy F.M., "Method of bioluminescence imaging of molecular imaging of physiological and pathological processes", *Methods*, 2009, **48**, 139-45
23. Kevles, Bettyann, Holtzmann "Naked to the Bone Medical Imaging in the Twentieth Century", 1996, Camden, NJ: Rutgers University Press. pp. 19–22.
24. Sample, Sharron, "X-Rays: *The Electromagnetic Spectrum*", NASA., <http://science.hq.nasa.gov/kids/imagers/ems/xrays.html>. Retrieved 2007-12-03.
25. Webb S., "The Physics of Medical Imaging", *School Series*, Adam Hilger Bristol & Philadelphia, 1988
26. Filler AG, "The history, development, and impact of computed imaging in neurological diagnosis and neurosurgery: CT, MRI, DTI:
27. Herzog H., "In vivo functional imaging with SPECT and PET", *Radiochim. Acta*, 2001, **89**, 203-14
28. Cook G.J., "Oncological molecular imaging: nuclear medicine techniques", *Br. J. Radiol*, 2003, **76**, S152-58
29. Wagner H.N. Jr. "Highlights 2000 Lecture: The Internet, the road to smart nuclear medicine", *J. Nucl. Med.* **36**, 2S-3S
30. Wagner H.N.Jr., "Highlights 2001 Lecture: against all odds, nuclear medicine has thrived", *J. Nucl. Med.*, 2001, **41**, 12N-30N
31. Schwartz R.S., "Paul Ehrlich's magic bullets", *N. Engl. J. Med.*, 2004, **350**, 1079-80
32. Levin C.S., "Primer on molecular imaging technology", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2005, **32**, Suppl 2, S325-45
33. Badawi R, "Nuclear Medicine", *Physics education*, 2001, **36**, 452-9
34. Gambhir S.S., "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography", *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 683-93
35. Ter-Pogossian .M., Phelps M.E., Hoffman E.J., "A positron emission transaxial tomography for nuclear imaging (PET)", *Radiology*, **114**, 89-98

36. Phelps M.E., Hoffman E.J., Mullani N.A., Ter-Pogossian M, "Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography", *J. Nucl. Med.*, **16**, 210-24
37. Vansteenkiste J.F., Stroobants S.G., "The role of positron emission tomography with ¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose in respiratory oncology", *Eur. Resp. J.*, 2001, **17**, 802-20
38. Rohren E.M., Turkington T.G., Coleman R.E., "Clinical applications of PET in Oncology", *Radiol.*, 2004, **231**, 305-32
39. Van den Bossche B., Van de Wiele C., "Receptor imaging in oncology by means of nuclear medicine: current status", *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 3593-607
40. Bailey D., Parker J., "Single photon emission computed tomography in nuclear medicine in clinical diagnosis and treatment", pp 1589-1601, *Churchill, Livingstone, Edinburg*
41. Jansen F.P., Vanderheyden J.L., "The future of SPECT in a time of PET", *Nucl. Med. Biol.*, 2007, **34(7)**, 733-5
42. Pomper M.G., "Molecular imaging: an overview", *Acad. Radiol.*, 2001, **8**, 1141-7
43. Rahmim A., Zaidi H., "PET versus SPECT: Strengths, limitations and challenges", *Nucl. Med. Commun.*, 2008, **29(3)**, 193-207
44. Gholamrezanejhad A., Mirpour S., Mariani G., "Future of nuclear medicine: Spect versus PET", *J. Nucl. Med.*, 2009, **50(7)**, 16-18
45. Schoder H., Erdi Y.E., Larson S.M., and Yeung H.W., "PET/CT: a new imaging technology in nuclear medicine", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003, **30**, 1419-37
46. MacManus M., Nestle U., Rosenzweig K.E., Carrio I., Messa C., Jeremic B., "Use of PET and PET/CT for radiation therapy planning: IAEA expert report 2006-2007", *Radiother. Oncol.*, 2009, **91(1)**, 85-94
47. Blodgett T.M., Meltzer C.C., Townsend D.W., "PET/CT: form and function", *Radiology*, 2007, **242**, 260-85
48. Keidar Z., Israel O. and Krausz Y., "SPECT/CT in tumor imaging: technical aspects and clinical applications", *Semin. Nucl. Med*, **33**, 205-18
49. Burger C., Townsend D.W. "Basics of PET scanning at Clinical Molecular Anatomic Imaging, PET, PET/CT and SPECT/CT", editor GK von Schulthess *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia*, 2003, 14-28.
50. Ell P.J., "The contribution of PET/CT to improved patient management", *Br. J. Radiol.*, 2006, **79**, 32-6.
51. De Wever W., Stroobants S., Verschakelen J.A., "Integrated PET/CT in lung cancer imaging: history and technical aspects", *JBR-BTR.*, .2007, **90**, 112-9
52. Bruzzi J.F., Munden R.F., Truong M.T. et al., "PET/CT of esophageal cancer: it's role in clinical management", *Radiographics*, 2007, **27**, 1635-52

53. Chen L.B., Tong J.L., Song H.Z. et al., "¹⁸F-DG PET/CT in detection of recurrence and metastasis of colorectal cancer", *World J. Gastroenterol.*, 2007, **13**, 5025-9
54. Shin S.S., Jeong Y.Y., Min J.J. et al., "Preoperative staging of colorectal cancer: CT vs. Integrated FDG PET/CT", *Abdon. Imaging.*, 2007, **33**, 235-38
55. Goshen E., Davidson T., Aderka D et al., "PET/CT detects abdominal wall and port site metastases of colorectal carcinoma", *Br. J. Radiol.*, 2006, **79**, 572-7
56. Lim H.S., Yoon W., Chung T.W. et al., "FDG PET/CT for the detection and evaluation of breast diseases: usefulness and limitations", *Radiographics*, 2007, **27**, 197-213
57. Pakzad F., Groves A.M., Ell P.J., "The role of positron emission tomography in the management of pancreatic cancer", *Semin. Nucl. Med.*, 2006, **36**, 248-56
58. Constantinidou A., Hofman M., O'doherty M. et al., "Routine positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography in melanoma staging with positive sentinel node biopsy is of limited benefit", *Melanoma Res.*, 2008, **18**, 56-60
59. Macapinlac H.A., "Clinical applications of positron emission tomography/computed tomography treatment planning", *Semin. Nucl. Med.*, 2008, **38**, 137-40
60. De Jonge F.A., Pauwels E.K., "Technetium the missing element", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1996, **23**, 336-4
61. Perrier C., Segre E., "Technetium: the element of atomic number 43", *Nature*, 1947, **159**: 24-8
62. Emsley J., "Nature's Building Blocks: An A-Z guide to the elements", *New York: Oxford University Press*, 2001: 422-425
63. Holden E., Norman E., "History of the origin of the chemical elements and their discoverers", *Brookhaven National Laboratory*, 2009
64. Van der Krogt P., "Elementymology and elements multidict, Technetium" 2009
65. Kenna B.T., Kuroda P.K., "Isolation of naturally occurring technetium", *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1961, **23**, 142-44
66. Ilse Zolle, "Technetium ^{99m}Pharmaceuticals – Preparation and Quality control in Nuclear Medicine", 2007, Springer
67. Schwochau K., "Technetium radiopharmaceuticals – Fundamentals, synthesis, structure and development", *Angewandte Chemie*, 1994, **33**, 2258-67
68. Schwochau K., "Generation of ^{99m}Tc", *Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications*, 2000, 374-6
69. Schwochau K., "Kits of ^{99m}Tc", *Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications*, 2000, 379-380
70. Knapp F., Mirzadeh S., "The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine", *Eur. J. Nucl. Med.*, **21**, 1151-65
71. <http://www.bnl.gov/bnlweb/history/Tc-99m.asp>

72. Richards P., Tucker W.D., Srivastava S.C., "Technetium-99m: An historical perspective", *Int. J. Appl. Rad. Isotop.*, **33**, 793-99
73. Monograph of the European Pharmacopoeia Commission P.A., P.H., Exp 14 T(76), Com. 9.1.1977 Ballinger J.R., "The influence of carrier on ^{99m}Tc radiopharmaceuticals", *Q. J. Nucl. Med.*, 2002, **64**, 224-32
74. Dilworth J., Parrot S., "The biochemical chemistry of technetium and rhenium", *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 1998, 43-55
75. Noddack W., Tacke I., Berg O., "Die Ekamangane. Naturwissenschaften", **13**, 567-574
76. Habashi F., "Ida Noddack (1896-1978). Personal recollections on the occasion of the 80th Anniversary of the Discovery of Rhenium", Laval University, Quebec City, Canada, 2005
77. Lambert B., de Klerk J.M., "Clinical applications of ¹⁸⁸Re-labelled radiopharmaceuticals for radionuclide therapy", *Nucl. Med. Commun.*, 2006, **27**, 223-9
78. Vucina J., Han R., "Production and therapeutic use of Rhenium 186, 188 – the features of radionuclides", *Med. Pregl.*, 2003, **56**, 362-5
79. Knapp F.F. Jr., "Rhenium -188, a generator – derived isotope for cancer therapy", *Cancer Biother. Radiopharm.*, 1998, **13**, 337-49
80. Κατάκης Δ., «Μαθήματα Ανόργανης Χημείας», Αθήνα 1999
81. Seitz M., Oliver A.G., Raymond K.N., "The lanthanide contraction revisited", *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 11553-60
82. Housecroft C.E., Sharpe A.G., "Inorganic Chemistry", 2nd Edition, Pearson 2005, 649-743
83. Dilworth J., Parrot S., "The biomedical chemistry of technetium and rhenium", *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 43-55
84. Deutch E., Lisbon K., and Vanderheyden J., "The inorganic chemistry of technetium and rhenium as relevant to nuclear medicine", *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine (Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U., Eds.)*, pp 13-22, Raven Press, New York
85. Dewanjee M.K., "The chemistry of ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals", *Semin. Nucl. Med.*, 1990, **20**, 5-27
86. Ilse Zolle, "Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine", pp 95-97, Springer
87. Schwochau K., "Kits, in Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications", 2000, pp 379-80, Wiley – VCH, Weinheim
88. "Quality assurance of pharmaceuticals, Good Manufacturing Practices, Vol.2", 2nd updated edition, World Health Organization
89. Liu S., Edwards S., "^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals", *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2235-68

90. Deutsch E., Vanderhedyden J., Gerundini D., Lisbon K., Hirth W., Colombo F., Savi A., Fazio F., "Development of nonreducible technetium-99m(III) cations as myocardial perfusion imaging agents: initial experience in humans.", *J. Nucl. Med.*, 1987, **28**, 1870-80
91. Mendez-Rojas M.A., Kharisov B.I., Tsivazde A.Y., "Recent advances on technetium complexes: Coordination chemistry and medical applications", *Journal of Coordination Chemistry*, **59**, 1-63
92. Tisato F., Refosco F., Bandoli G., "Structural survey of technetium complexes", *Coordination chemistry reviews*, 1993, **135**, 325-397
93. Blauenstein P., *New J. Chem.*, 1990, **14**, 405
94. Dilworth J.R., Parrott S.J., "Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development", Mather S.J., Ed: Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 1996, pp 1-29
95. Davison A., AG. J., "The Chemistry of Technetium (V)", *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **33**, 875-81
96. Bandoli G., Dolmella A., Porchia M., Refosco F., Tisato F., Moresco A. Duatti A., "Technetium coordination chemistry: development of new backbones for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals, in Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine, (Nicolini M, Bandoli G., and Mazzi U. Eds.), pp 39-50
97. Sahlmann C.O., Siefker U., Lehmann K., Harms E., Conrad M., Meller J., "Quantitative thyroid scintigraphy for the differentiation of Grave's disease and hyperthyroid autoimmune thyroiditis", *Nuklearmedizin*, 2003, **43**, 124-8
98. Kauffmann G.B., "Ilya Ilyh Chernyaev and the trans effect", *J. Chem. Educ.*, 1977, **54**, 86-9
99. Quagliano J. V., Schubert L., "The trans effect in Complex Inorganic Compounds", *Chem. Rev.*, 1952, **50**, 201-60
100. Kung H.F., Kim H.J., Kung M.P., Meegalla S., Ploss K., Lee H.K., "Imaging of dopamine transporters in humans with technetium-99m TRODAT-1", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1996, **23**, 1527-30
101. Troutner D.E., Volkert W.A. Hoffmann T.J., Holmes R.A., "A neutral lipophilic complex of ^{99m}Tc with a multidentate amine oxime", *Int. J. Radiat. Isot.*, 1984, **35**, 467-70
102. Leonard J.P., Nowotnik D.P., Neirinckx R.D., "Technetium-99m-d, 1-HM-PAO: a new radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT – a comparison with iodine-123 HIPDM", *J. Nucl. Med.*, 1986, **27**, 1819-23
103. Kung H., Meegalla S., Kung M.P., Plossl K., "Development of ^{99m}Tc –labelled complexes for imaging dopamine transporters in the brain", *Transition Med. Chem.*, 1998, **23**, 531-6
104. Liu S., Edwards D.S., Looby R.J., Poirier M.J., Rajopadhye M., Bourque J.P., Carroll T.R., "Labelling cyclic glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists with ^{99m}Tc by the performed chelate approach: effects of chelators on properties of [^{99m}Tc] chelator peptide conjugates", *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 196-202
105. Kung H.F., Bradshaw J.E., Chumpradit S., Zhang Z.P., Kung M.P., Mu M., Frederick D., "Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine", *Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U., Eds., SGEditorali, Padova*, 1995, **Vol. 4**, pp 293-98

106. Francesconi L.C., Graczyk G., Wehrli S., Shaikh S.N., McClinton D., Liu S., Zubieta J., Kung H.F., "Synthesis and characterization of neutral $M^V O$ ($M=Tc, Re$), amine-thiol complexes containing a pendant phenylpiperidine", *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3114-9
107. Eshima D., Taylor A. Jr., Fritzberg A. R., Kasina S., Hansen L., Sorenson J.F., "Animal evaluation of technetium – 99m triamide mercaptide complexes as potential renal imaging agents", *J. Nucl. Med.*, 1987, **28**, 1180-6
108. Sunbani M., Cleynhens B., Hoogmartens M., De Roo M., Verbuggen A.M., "Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine", Nicolini M., Banoli G., Mazzi U., Eds., *Cortina International, Verona*, 1989, **Vol.3**, pp 661-6
109. Walovitch R.C., Hill T.C., Garitty S.T., Cheesman E.H., Burgess B.A., O' Leary D.H., Watson A.D., Ganey M.V., Morgan R.A., Williams S.J., "Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part I: Pharmacology of technetium-99m ECD in nonhuman primates", *J. Nucl. Med.*, 1989, **30**, 1892-901
110. Leveille J., Demonceau G., De Roo M., Rigo P., Taillefer R., Morgan R.A., Kupranick D., Walovitch R.C., "Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging. Part 2: biodistribution and brain imaging in humans", *J. Nucl. Med.*, 1989, **30**, 1902-9
111. Deutch E., Lisbon K., Jurisson S., Lindoy L.F., "Technetium chemistry and technetium radiopharmaceuticals", *Progr. Inorg. Chem.*, 1983, **30**, 75-139
112. Smith C.J., Katti K.V., Volkert W.A., Barbour L.J., "Synthesis and Coordination Chemistry of the First Water-Soluble Dithio-Bis(phosphine) Ligands [(HOH(2)C)(2)P(CH(2)(2)S-X-S(CH(2)(2))2)P(CH(2)OH)(2)] (X = (CH(2)(2))(3) or C(6)H(4))", *J. Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 3928-35
113. Reddy V.S., Berning D.E., Katti K.V., Barnes C.L., Volkert W.A., Ketring A.R., "Chemistry in environmentally benign media: Part 3. Synthesis and characterization of Re(V) complexes derived from novel water-soluble hydroxymethylphosphines. Crystal structures of $[Re(O)_2\{(HOH_2P-C_6H_4P(CH_2OH)_2\}_2]$ and $[Re(O)_2\{(HOH_2C)_2 PCH_2CH_2P(CH_2OH)_2\}_2]Cl$ ", *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, pp. 1753–57.
114. Berning D.E., Katti K.V., Singh P.R., Higginbotham C., Reddy S., Volkert W.A., "In vitro and in vivo characterization of a ^{99m}Tc complex with tris(hydroxymethyl)phosphine (THP)", *Nucl. Med. Biol.*, 1996, **23**, 617-22
115. Baidoo K.E., Zhan Y.G., Lin K.S., Finley P. S., Scheffel U., Wagner H.N.Jr., *J. Nucl. Med.*, 1998, **39**, 7P, (abstract 16)
116. Smith C.J., Li N., Katti K.V., Higginbotham C., Volkert W., "In vitro and in vivo characterization of novel water-soluble dithio-bisphosphine ^{99m}Tc complexes", *Nucl. Med. Biol.*, 1997, **24**, 685-91
117. Duncan K.J., Forster A.M., Higley B, Archer C.M., Booker F.S., Canning K., Chiu W., Edwards B., Harjit K.G, McPartlin M., Nagle K.R., Latham I.A., Pickett R.D., Storey A.E., Webbon P.M., "Technetium-99m-Tetrofosmin as a New Radiopharmaceutical for Myocardial Perfusion Imaging". *J. Nucl. Med.*, 1993, **34**, 222–7
118. Marchi A., Marvelli L., Rossi R., Roncara P., Ucelli L., Giganti M., "Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine", Nicolini M., Banoli G., Mazzi U., Eds, *SGEditoriali, Padova*, 1995, **Vol 4.**, pp113-116

119. Coulais Y., Cros G., Darbieu M.H., Tafani J.A.M., Belgadj-Tahar H., Bellande E., Pasqualini R., Guiraud R., "Synthesis, characterization and biodistribution of new ^{99m}Tc oxo and nitrido complexes with Bi- and tetradentate unsaturated NS and N_2S_2 Schiff bases derived from 2-aminocyclopentene-1-dithiocarboxylic acid as potential heart imaging agents", *Nucl. Med. Biol.*, 1994, **21**, 263-8
120. Belgadj-Tahar H., Coulais Y., Cros G., Darbieu M.H., Tafani J.A.M., Fabre J., Esquerre J.P., Guiraud R., "Technetium labeling of bi, tri and tetradentate ligands derived from 2-aminocyclopentene-1-dithiocarboxylic acid: Characterization and biodistribution of their oxo and nitrido ^{99m}Tc complexes", *Nucl. Med. Biol.*, 1994, **23**, 353-57
121. Cros G., Belgadj-Tahar H., deMontauzon D., Gleizes A., Coulais Y., Guiraud R., Bellande E., Pasqualini R., "Synthesis and characterization of neutral oxorhenium(V) and nitridotechnetium(V) complexes with a tetradentate N_2S_2 unsaturated ligand derived from dithiocarboxylic acid", *Inorg. Chim. Acta*, 1994, **227**, 25-31
122. Tisato F., Mazzi U., Bandoli G., Cros G., Darbieu M.-H., Coulais Y., Guiraud R., "Neutral oxo and nitrido complexes of technetium(V) and rhenium(V) with an unsaturated tetradentate (N_2S_2) ligand. Crystal structure of $[\text{N},\text{N}'\text{-ethylenebis}(\text{thioacetylacetylideneiminato})](2-)\text{S},\text{S}'$, N,N' nitridotechnetium(V)", *J. Chem. Soc.*, 1991, **45**, 1301-7
123. Archer C.M., Dilworth J.R., Griffiths D.V., McPartlin M., Kelly J.D., "Synthesis of technetium ^{99m}Tc nitrido complexes with chelating diphosphine and diamine ligands" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1990, **36**, 183-9
124. Pasqualini R., Duatti A., "Synthesis and characterization of the new neutral myocardial imaging agent $[\text{N},\text{N}'\text{-ethyl-N-ethoxydithiocarbamate}]_2$ (noet = *N*-ethyl-*N*-ethoxydithiocarbamate)", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, **23**, 1354-55.
125. Bolzati C., Caporale A., Agostini S., Carta D., Cavazza-Ceccato M., Refosco F., Tisato F., Bandoli G., "Avidin –biotin system: a small library of cysteine biotinylated derivatives designed for the $[\text{N},\text{N}'\text{-ethyl-N-ethoxydithiocarbamate}]_2$ metal fragment", *Nucl. Med. Biol.*, 2006, **34**, 511-22
126. Tisato F., Bolzati C., Duatti A., Bandoli G., Refosco F., "Synthesis of sulfido and oxo complexes for technetium (V) and rhenium (V) containing dithiolato and hydrotris(1-pyrazolyl)borate ligands. Crystal structures of dimeric bis(μ -ethane-1,2-dithiolato and hydrotris(1-pyrazolyl)borato)(ethane-1,2-dithiolato)oxorhenium(V)", *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2042-8
127. Bangard M., Behe M., Bender H., Guhlke S., Risse J., Grunwald F., Macke H., Biersack H.J., "Technetium- ^{99m}Tc octreotide for the detection of somatostatin receptor positive (SSTR+) tumors: preliminary results", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1998, **25**, 838-42
128. Laverman P., Dams E.T., Oyen W.J.G., Storm G., Koenders E.B., Prevost R., van der Meer J.W.M., Corstens F.H.M., Boerman O.C., "A Novel Method to Label Liposomes with ^{99m}Tc by the Hydrazino Nicotinylic Derivative", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1998, **25**, 192-7
129. Abram U. and Alberto R., "Technetium and Rhenium – Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications", *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**, 1486-1500
130. Blakenberg F.G., Vanderheyden J.L., Strauss H.W., Tait J.F., "Radiolabeling of HYNIC-annexin V with technetium- ^{99m}Tc for *in vivo* imaging of apoptosis", *Nat. Protoc.*, **1**, 2006, 108-10

131. Rottey S., Loose D., Vakaet L., Lahorte C., Vermeersch H., Van Belle S., Van de Wiele C., “ ^{99m}Tc -HYNIC Annexin-V imaging of tumors and its relationship to response to radiotherapy and/or chemotherapy”, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **51**, 182-8
132. Linder K.E., Malley M.P., Gongoulas J.Z., Unger S.E., Num A.D., “Neutral, seven-coordinatedioxime complexes of technetium(III): synthesis and characterization”, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 2428-34
133. Rossetti C., Vanoli G., Paganelli G., Kwiatkowsky M., Zito F., Colimbo F., Bonino C., Carpinelli A., Casati R., Deutsch K., Marmion M., Woulfe S.R., Lunghi F., Deutsch E., Fazio F., “Human biodistribution, dosimetry and clinical use of technetium(III)- ^{99m}Tc -Q12”, *J. Nucl. Med.*, 1994, **35**, 1571-80
134. Abrams M.J., Davison A., Jones A.G., Costello C.E., Pang H., “Synthesis and characterization of hexakis (alkyl isocyanide) and hexakis (aryl isocyanide) complexes of technetium (I)”, *Inorg. Chem.*, 1983, **22**, 2798-2880
135. Holman B.L., Jones A.G., Lister-James J., Davison A., Abrams M.J., Kirshenbaum J.M., Tumeh S.S., English R.J., “A new Tc - ^{99m}Tc -labeled myocardial imaging agent, hexakis (*t*-butylisonitrile) technetium(I) Tc - ^{99m}Tc TBI: initial experience in the human”, *J. Nucl. Med.*, 1984, **25**, 1350-5
136. Del Vecchio S., Salvatore M., “ ^{99m}Tc -MIBI in the evaluation of breast cancer biology”, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, **31**, Suppl. 1, S88-96
137. Alberto R., Schibli R., Egli A., Schubiger A.P., Abram U., Kaden T.A., “A novel organometallic aqua complex of technetium for the labelling of biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with bifunctional ligand”, *Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7987-8
138. Subramanian G., McAfee J.G., Blair R.J., Kalfelz F.A., Thomas F.P., “Technetium - ^{99m}Tc – methylene diphosphonate – a superior agent for skeletal imaging: comparison with other technetium complexes”, *J. Nucl. Med.*, 1975, **16**, 744-55
139. Kawaguchi S., Iio M., Chiba K., Yamada H., Murata H., Noguchi M., Ohtake E., Toyama H., “Clinical evaluation of two hepatobiliary scanning agents, ^{99m}Tc -diethyl IDA (EHIDA) and ^{99m}Tc -paraisopropyl acetanilido IDA (PIPIDA)”, *Kaku Igaku*, 1980, **17**, 863-9
140. Abram U., Alberto R., “Technetium and Rhenium – Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2006, **17**, 1486-1500
141. Χιωτέλλης Ε., “Ραδιοφαρμακευτική Χημεία”, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 2004
142. Liu S., “The role of coordination chemistry in the development of target – specific radiopharmaceuticals”, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 445-61
143. Fichna J., Janecka A., “Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging”, *Bioconjug. Chem.*, 2003, **14**, 3-17
144. Liberatore M., Neri D., Neri G., Pini A., Iurilli A.P., Ponzio F., Spampinato G., Padula F., Pala A., Colella A.C., “Efficient one-step direct labeling of recombinant antibodies with technetium- ^{99m}Tc ”, *Eur. J. Nucl. Med.*, 1995, **22**, 1326-9

145. Thakur M.L., Kolan H., Li J., Wiaderkiewicz R., Palella V.R., Duggaraju R., Schally A.V., "Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer", *Nucl. Med. Biol.*, 1997, **24**, 105-13
146. Edwards D.S., Liu S., Barrett J.A., Harris A.R., Looby R.J., Ziegler M.C., Heminway S.J., Carroll T.R., "New and versatile ternary ligand systems for technetium radiopharmaceuticals: water-soluble phosphines and tricine as coligands in labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic glycoprotein IIb/IIa receptor antagonist with ^{99m}Tc", *Bioconj. Chem.*, 1997, **8**, 146-54
147. Eberle A.N., Mild G., Froidevaux S., "Receptor-mediated tumor targeting with radiopeptides. Part 1. General concepts and methods: applications to somatostatin receptor-expressing tumors", *J. Recept. Signal Transduct Res.*, 2004, **24**, 319-455
148. Okavri S.M., "Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancer and other diseases", *Med. Res. Rev.*, 2004, **24**, 357-97
149. Goldenberg D.M., Juweid M., Dunn R.M., Sharkey R.M., "Cancer imaging with radiolabeled antibodies: new advances with technetium-99m-labeled monoclonal antibody Fab fragments, especially CEA-Scan and prospects for therapy", *J. Nucl. Med. Technol.*, 1997, **25**, 18-23
150. Sharkey R.M., Goldenberg D.M., "Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies", 2005, *J. Nucl. Med.*, **46**, 115-27
151. Weiner R.E., Thakur M.L., "Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy", *Semin. Nucl. Med.*, 2001, **31**, 296-9
152. Fischman A.J., Babich J.W., Strauss H.W., "A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals", *J. Nucl. Med.*, 1993, **34**, 2253-63
153. Heppeler A., Froidevaux S., Eberle A.N., Maecke H.R., "Receptor targeting for tumor localization and therapy with radiopeptides", *Curr. Med Chem.*, 2000, **7**, 971-94. Review.
154. Pierce K.L., Premont R.T., Lefkowitz R.J., "Seven-transmembrane receptors", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, **3**, 639-50
155. Dorsam R.T., Gutkind J.S., "G-protein-coupled receptors and cancer", *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 79-94
156. Lefkowitz R.J., "Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors", *Trends Pharm. Science*, 2004, **25**, 413-22
157. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Trong I.L., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M., "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.", *Science*, 2000, **289** 739-45.
158. Marinissen M.J., Gukind J.S., "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms", *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, **22**, 368-76
159. Gutkind J.S., "Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration", *Oncogene*, 1998, **17**, 1331-42
160. Reubi J.C., "Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy", *Endocr. Rev.*, 2003, **24**, 389-427

161. Schally A.V., Nagy A., "Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors", *Eur. J. Endocrinol.*, 1999, **141**, 1-14
162. Koenig J., Edwardson J., "Endocytosis and recycling of G-protein coupled receptors", *TIPS*, 1979, **18**, 276-87
163. Zastow M., "Role of endocytosis in signalling and regulation of G-protein coupled receptors", *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, **29**, 500-4
164. Ginj M., Zhang H., Waser B., Cescato R., Wild D., Wang X., Erchegyi J., Rivier J., Mäcke H.R., Reubi J.C., "Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for *in vivo* peptide receptor targeting of tumors", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, **103**, 16436-41
165. Cescato R., Maina T., Nock B., Nikolopoulou A., Charalambidis D., Piccard V., Reubi J.C., "Bombesin receptors may be preferable to agonists for tumor targeting", *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 318-26
166. Decristoforo C., Mather S.J., Cholewinski W., Donnemiller E., Riccabona G., Moncayo R., "^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC: A new ^{99m}Tc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours: First clinical results and intra-patient comparison with ¹¹¹In-labelled octreotide derivatives". *Eur. J. Nucl. Med.* 2000, **27**, 1318–25.
167. Krenning E.P., Kwekkeboom D.J., Bakker W.H., Breeman W.A., Kooij P.P., Oei H.Y., van Hagen M., Postema P.T., de Jong M., Reubi J.C., and et al., "Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D[Phe¹]] and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1993, **20**, 716-31
168. Zhernosekov K., Aschoff P., Filodofov D., Jahn M., Jennewein M., Adrian H.J., Bihl H., Rosch F., "Visualisation of a somatostatin receptor-expressing tumour with ⁶⁷Ga-DOTATOC SPECT", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2005, **32**, 1129
169. Kowalski J., Henze M., Schuhmacher J., Macke H.R., Hofmann M., Haberkorn U., "Evaluation of positron emission tomography using [⁶⁸Ga]-DOTA-D Phe¹-Tyr³-Octreotide in comparison to [¹¹¹In]DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors", *Mol. Imaging Biol.*, 2003, **5**, 42-8
170. Anderson C.J., Dehdashti F., Cutler P.D., Schwarz S.W., Laforest R., Bass L.A., Lewis J.S., McCarthy D.W., "⁶⁴Cu-TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors", *J. Nucl. Med.*, 2001, **42**, 213-21
171. Rösch F., Herzog H., Stolz B., Brockmann J., Köhle M., Mühlensiepen H., Marbach P., Müller-Gärtner H.W., " Uptake kinetics of the somatostatin receptor ligand [⁸⁶Y]DOTA-DPhe¹-Tyr³-octreotide ([⁸⁶Y]SMT487) using positron emission tomography in non-human primates and calculation of radiation doses of the ⁹⁰Y-labelled analogue", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1999, **26**, 358-66.
172. Otte A., Jermann E., Behe M., Goetze M., Bucher H.C., Rose H.W., Heppeler A., Mueller-Brand J., Maecke H.R., "DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy", *Eur. J. Nucl. Med.*, 1997, **24**, 792-5
173. Anthony L.B., Woltering E.A., Espenan G.D., Cronin M.D., Maloney T.J., McCarthy K.E., "Indium-111-pentetreotide prolongs survival in gastroenteropancreatic malignancies", *Semin. Nucl. Med.*, 2002, **32**, 123-32

174. de Jong M., Breeman W.A., Bernard B.F., Bakker W.H., Schaar M., van Gameren A., Bugaj J.E., Erion J., Schmidt M., Srinivasan A., Krenning E.P., “[¹⁷⁷Lu-DOTA⁰,Tyr³]octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy”, *Int. J. Cancer.*, 2001, **92**, 628-33.
175. Blauenstein P., Pfeiffer G., Schubiger P.A., Anderegg G., Zollinger K., May K., Proso Z., Ianovici E., Lerch P., “Chemical and biological properties of a cationic Tc-tetraamine complex”, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 1985, **36**, 315-7
176. Kastner M.E., Lindsay M.J., Clarke M.J., “Synthesis and structure of trans-[O₂(en)₂Tc^V]⁺”, *Inorg. Chem.*, 1982, **27**, 4127-30
177. Volkert W.A., Troutner D.E., Holmes R.A., “Labeling of amine ligands with ^{99m}Tc in aqueous solutions by ligand exchange”, *Int. J. Rad. Isotop.*, 1982, **33**, 891-6
178. Τσίπρα Κ., “MSc: Σύνθεση, συμπλοκοποίηση, επισήμανση και βιολογική μελέτη τετρααμινικών υποκαταστατών διπλής λειτουργίας”, Τμήμα Χημείας, Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2001
179. Anderson C.J., Pajeau T.S., Edwards W.B., Sherman E.L., Rogers B.E., Welch M.J., “*In vitro* and *in vivo* evaluation of copper-64-octreotide conjugates”, *J. Nucl. Med.*, 1995, **131**, 2315-25
180. Rens-Domiano S., Reisine T., “Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors”, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 20094-102
181. Nock B.A., Nikolopoulou A., Galanis A., Cordopatis P., Waser B., Reubi J.C., Maina T., “Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with ^{99m}Tc: a preclinical study”, *J. Med. Chem.* 2005, **48**,100-10.
182. Nikolopoulou A., Maina T., Sotiriou P., Cordopatis P., Nock BA., “ Tetraamine-modified octreotide and octreotate: labeling with ^{99m}Tc and preclinical comparison in AR4-2J cells and AR4-2J tumor-bearing mice.”, *J. Pept. Sci.*, 2006, **12**, 124-31.
183. Nock B.A., Maina T., Béhé M., Nikolopoulou A., Gotthardt M., Schmitt J.S., Behr T.M., Mäcke H.R., “CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled minigastrin analogs”, *J. Nucl. Med.*, 2005, **46**, 1727-36
184. Krenning E.P., Bakker W.H., Kooij P.M., Breeman W.A.P., Oei H.Y., de Jong M., Reubi J.C., Visser T.J., Bruns C., Kwekkeboom D.J., Reijs A.E.M., van Hagen P.M., Koper J.W., Lamberts S.W.J., “Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide”, *J. Nucl. Med.*, 1992, **33**, 652-8
185. Anastasi A., Erspamer V., Bucci M., “Isolation and structure of bombesin and alytensin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*”, *Experimental*, 1971, **34**, 166-7
186. Tokita K., Katsumo T., Hocart S.J., Coy D.H., Linares M., Martinez J., Jensen R.T., “Molecular basis for selectivity of high activity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor”, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 36652-63
187. Jensen R.T., Coy D.H., Saeed Z.A., Heinz-Erian P., Mantey S. Gardner J.D., “Interaction of bombesin and related peptides with receptors on pancreatic acini”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1998, **547**, 138-42

188. Jensen R.T., Moody T., Pert C., Rivier J.E., Gardner J.D., "Interaction of bombesin and litorin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells", *Cell Biology*, 1998, **75**, 6139-43
189. Xiao D., Wang J., Hampton L.L., Weber H.C., "The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter", *Gene*, 2001, **264**, 95-103
190. Cuttitta F., Carney D.N., Mulshine J., Moody T.W., Fedorko J., Fischler A., Minna J.D., "Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer", *Nature*, 1985, **316**, 823-6
191. Rozengurt E., "Bombesin stimulation of mitogenesis. Specific receptors signal transduction and early events", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, **142**, S11-5
192. Levine L., Lucci J., Pazdark B., Cheng J.Z., Guo Y.S., Townsend C.M., Hellmich M.R., "Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors, in prostate cancer cells", *Cancer Res.*, 2003, **63**, 3495-502
193. Sano H., Feighner S.D., Hreniuk D.L., Iwaasa H., Sailer A.W., Pan J., Reitman M.L., Kanatani A., Howard A.D., Tan C.P., "Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates", *Genomics*, 2004, **84**, 139-46
194. Kroog G.S., Jensen R.T., Battey J.F., "Mammalian bombesin receptors", *Med. Res. Rev.*, 1995, **15**, 389-417
195. Markwalder R., Reubi J.C., "Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation", *Cancer Res.*, 1999, **59**, 1152-9
196. Feldman R.I., Bartholdi M.F., Wu J.M., "Bombesin-like receptor subtypes promote mitogenesis which requires persistent receptor signaling", *Mol. Pharmacol.*, 1996, **50**, 1346-54
197. Reubi J.C., Waser B., "Concomitant expression of several peptide receptors in the human prostate: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003, **30**, 781-93
198. Sun B.D., Halmos G., Schally A.V., "Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers", *Prostate*, 2000, **42**, 295-303
199. Halmos G., Wittliff J.L., Schally A.V., "Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression", *Cancer Res.*, 1995, **55**, 280-7
200. Gugger M., Reubi J.C., "Gastrin releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast", *Am. J. Pathol.*, 1999, **155**, 2067-76
201. Reubi J.C., Gugger M., Waser B., "Coexpressed peptide receptors in breast cancers as molecular basis for in vivo multireceptor tumor targeting", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002, **29**, 855-62
202. Reubi J.C., Korner M., Waser B., Mazzucchelli L., Guillou L., "High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, **31**, 803-10

203. Zhou J., Chen J., Mokotoff M., Zhong R., Schultz R.T., Ball E.D., "Bombesin/gastrin releasing peptide receptor: a potential target for antibody-mediated therapy of small cell lung cancer", *Clin. Cancer. Res.*, 2003, **9**, 4953-60
204. Nagy A., Armatis P., Cai R., Szepeshazi K., Halmos G., Schally A.V., "Design , synthesis, and *in vitro* evaluation of cytotoxic analogs of bombesin-like peptides containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, **94**, 652-9
205. Schally A.V., Nagy A., "New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin", *Life Sci.*, 2003, **72**, 2305-20
206. National Cancer Institute, "What you need to know about Prostate Cancer", *US Department of Health And Human Services*, 2008, NIH Publ.
207. Hoffmann T.I., Sieckman G.L., Volkert W.A., "Targeting small cell lung cancer using iodinated peptide analogs", *J. Label. Comp. Radioph.*, 1995, **37**, 321-3
208. Hoffmann T.J., Sieckman L., Volkert W.A., "Iodinated bombesin analogs: effect of N-terminal versus side chain iodine attachment on BBN/GRP receptor binding", *J. Nucl. Med.*, 1996, **37**, 321-3
209. Zhang X., Cai W., Cao F et al., "18F-Labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer", *J. Nucl. Med.* 2006, **47**, 492-501
210. Liu S., "The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 445-61
211. Breeman W.A., Hofland L.J., de Jong M. *et al.*, "Evaluation of radiolabeled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy", *Int. J. Cancer*, 1999, **81**, 658-65
212. Breeman W.A., de Jong M., Erion J.L. *et al.*, "Preclinical comparison of ¹¹¹In-labeled DTPA – or- DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy", *J. Nucl. Med.*, 2002, **43**, 1650-6
213. Hoffman T.J., Gali H., Smith C.J. *et al.*, "Novel series of ¹¹¹In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells", *J. Nucl. Med.*, 2002, **43**, 1650-6
214. Zhang H., Chen J., Waldherr C. et al., "Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177 and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors", *Cancer Res.*, 2004, **64**, 6707-15
215. Smith C.J., Gali H., Sieckman G.L. et al., "Radiochemical investigations of ¹⁷⁷Lu-DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂: an *in vitro/in vivo* assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells", *Nucl. Med. Biol.*, 2003, **30**, 101-9
216. Lantry L.E., Cappelletti E., Maddalena M.E. *et al.*, "¹⁷⁷Lu-AMBA: synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer", *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 1144-52
217. Scheffel U., Pomper M.G., "PET imaging of GRP receptor expression in prostate cancer", *J. Nucl. Med.*, 2004, **47**, 1144-52

218. Meyer G.J., Macke H., Schuhmacher J., Knapp W.H., Hofmann M., “⁶⁸Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands”, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, **31**, 1097-104
219. Maecke H.R., Hoffman M., Haberkorn U., “⁶⁸Ga-labeled peptides in tumor imaging”, *J. Nucl. Med.*, 2005, **46**, 172-8
220. Varvarigou A., Bouzioti P., Zikos C., Scopinaro F., De Viscetis G., “Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues”, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2004, **19**, 219-29
221. Smith C.J., Volkert W.A., Hoffman T.J., “Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes”, *Nucl. Med. Biol.*, 2005, **32**, 733-40
222. Baidoo K.E., Lin K.S., Zhan Y., Finley P., Scheffel U., Wagner Jr H.N., “Design, synthesis and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues”, *Bioconjugate Chem.*, 1998, **9**, 218-25
223. Lin K.S., Luu A., Baidoo K.E. *et al.*, “A new high affinity technetium analogue of bombesin containing DTPA as a pharmacokinetic modifier”, *Bioconjugate Chem.*, 2004, **15**, 1416-23
224. Lin K.S., Luu A., Baidoo K.E. *et al.*, “A new high affinity technetium-99m-bombesin analogue with low abdominal accumulation”, *Bioconjugate Chem.*, 2004, **16**, 43-50
225. Smith C.J., Gali H., Sieckman G.L., Higginbotham C., Volkert W.A., Hoffman T.J., “Radiochemical investigations of ^{99m}Tc-N₃S-X-BBN(7-14)NH₂ : An *in vitro* / *in vivo* structure-activity relation- whip study where X=0, 3, 5, 8, and 11-carbon tethering moieties”, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 93-102
226. Blok D., Feitsma H.I., Kooy Y.M., *et al.*, “New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc-labeling of synthetic peptides”, *Nucl. Med. Biol.*, 2004, **31**, 815-20
227. Hoffman T.J., Simpson S.D., Smith C.J. *et al.*, “Accumulation and retention of Tc-99m RP527 by GRP receptor expressing tumors in SCID mice”, *J. Nucl. Med.*, 1999, **40**, 104P
228. Karra S.R., Schibli R., Gali H. *et al.*, “^{99m}Tc-labeling and *in vivo* studies of a bombesin analogue with a novel water-soluble dithiadiphosphine-based bifunctional chelating agent”, *Bioconjugate Chem.*, 1999, **10**, 254-60
229. Nock B.A., Nikolopoulou A., Chiotellis E. *et al.*, “[^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor targeted tumour imaging”, *Eur. J. Nuc. Med. Mol. Imaging*, 2003, **30**, 247-58
230. Smith C.J., Sieckman G.L., Owen N.K. *et al.*, “Radiochemical investigations of gastrin-releasing peptide receptor-specific [^{99m}Tc(X)(CO)₃-Dpr-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Lu-Met-(NH₂)] in PC-3, tumor-bearing, rodent models: syntheses, radiolabeling, and *in vitro/in vivo* studies where Dpr = 2,3-diaminopropionic acid and X = H₂O or P(CH₂OH)₃”, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 4082-8
231. Smith C.J., Sieckman G.L., Owen N.K. *et al.*, “Radiochemical investigations of [¹⁸⁸Re(H₂O)(CO)₃-diaminopropionic acid-SSS-bombesin(7-14)NH₂]: syntheses, radiolabeling and *in vitro/in vivo* GRP receptor targeting studies”, *Anticancer Res.*, 2003, **23**, 63-70
232. Garcia Garayoa E., Schweinsberg C., Maes V., Ruegg D., Blanc A., Blauenstein P., Tourwe D.A., Beck-Sickinger A.G., Schubiger P.A., “New [^{99m}Tc]bombesin analogues with improved

- biodistribution for targeting gastrin releasing-peptide receptor-positive tumors”, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **51**, 42-50
- 233.** Ginj M., Zhang H., Waser B., Cescato R., Wild D., Wang X., Erceggi J., Rivier J., Macke H.R., Reubi J.C., “Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors”, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2006, **103**, 16436-42
- 234.** Erspamer V., Falcioni, Erspamer G and Soprani N., “Some pharmacological actions of alytesin and bombesin”, *J. Pharm., Pharmacol*, 1970, **22**, 275-6
- 235.** Erspamer V., Improta G., Melchiorri P., Soprani N., “Evidence of cholecystokinin release by bombesin in the dog”, *Br. J. Pharmacol.*, 1974, **52**, 227-32
- 236.** Erspamer V., Melchiorri P., Soprani N., “The action of bombesin on the kidney and anaesthetized dog”, *Br. J. Pharmacol.*, 1973, **48**, 438-55
- 237.** Caprilli R., Melchiorri P., Importa G., Verina P., Frieri G., “Effects of bombesin and bombesin like peptides on gastrointestinal activity in the dog”, *Gastroenterology*, 1975, **68**, 1228-35
- 238.** Brown M., Rivier J., Vale W., “Bombesin affects the central nervous system to produce hyperglycaemia in rats”, *Life Sci.*, 1977, **21**, 1729-34
- 239.** Morley J.F., and Levine A.S., “Bombesin inhibits stress-induced eating”, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1981, **14**, 149-51
- 240.** Bloom S.R., Edwards A.V., Ghater M.A., “Endocrine responses to exogenous bombesin and gastrin releasing peptide in conscious calves”, *J. Physiol.*, 1983, **344**, 37-48
- 241.** Jungwirth A., Pinski J., Galvan G., Halmos G., Szepeshazi K., Cai R.Z., Groot K., Vadillo Buenfil M., “Inhibition of growth of androgen-independent DU-145 prostate cancer *in vivo* by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetrorelix and bombesin antagonists RC 3940-II and RC-3950-II, A.V.”, *Eur. J. Cancer*, 1997, **33**, 1141-8
- 242.** Wang L.H., Coy D.H., Taylor J.E., Jiang N.Y., Kim S.H., Moreau J.P., Huang S.C., Mantey S.A., Frucht H., Jensen R.T., “desmethionine alkylamide bombesin analogues: a new class of bombesin receptor antagonists with potent antisecretory activity in pancreatic acini and antimetabolic activity in swiss 3T3 cells”, 1989, *Biochemistry* **29**, 616-22
- 243.** Wang L.H., Coy D.H., Taylor J.E., Jiang N.Y., Moreau J.P., Huang S.C., Frucht H., Haffar M.B., Jensen R.T., “des-Met-carboxyl-terminally modified analogues of bombesin function as potent bombesin receptor antagonists, partial agonists or agonists”, *J. Biol. Chem.*, 1990, **26**, 15695-703
- 244.** Bauer W., Briner U., Doepfner W., Haller R., Huguenin R., Marbach P., Petcher T.J., Pless, “SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action”, *Life Sci.*, **31**, 1982, 1133-40
- 245.** Carpino L.A., “1-hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4397-98
- 246.** Han S.Y., Kim Y.A., “Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis”, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 2447-52

247. Vollhardt K.P.C., Schore N.E., "Organic chemistry structure and function", 3rd ed., Freeman, New York, 1998
248. Caprino L.A., Imazumi H., El-Faham A., Ferrer F.J., Zhang C., Lee Y., Foxman B.M., Henklein P., Hanay C., Mugge C., Wenschuh H., Klose J., Beyermann M., Bienert M., "The uranium / guanidinium peptide coupling reagents: finally the true uranium salts", *Angew Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 441-5
249. Imre J., "Quality control methods of ^{99m}Tc pharmaceuticals", Springer, 2007
250. Liu S. and Edwards, D.S., "^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals", *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2235-68.
251. Steigman J., Meinken G., Richards P., "Reduction of pertechnetate-99m by stannous chloride. I. Stoichiometry of the reaction in hydrochloric acid, in a citrate buffer and in a DTPA buffer", *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 1975, **26**, 601-6
252. Yu Yan Q., Anderegg G., "The Stability of Palladium(II) Complexes with Linear Tetraamines", *Inorg. Chim. Acta*, 1985, **105**, 121-8
253. Muenze R., "Formation of citrate complexes of technetium", *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 1977, **30**, 117-121
254. Jones A.G., Davison A., "The chemistry of Tc(V)", *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 1982, **33**, 875-79
255. Breeman W.A., de Jong M., Kwekkeboom D.J., Valkema R., Bakker W. H., Kooij P.P., Visser T.J., Krenning E.P., "Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives", *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001, **28**, 1421-9
256. Decristoforo C., and Zolle, I., Quality control methods of ^{99m}Tc pharmaceuticals
257. Alberto R., Schibli R., Egli A., Schubiger P.A., Hermann W., Artus G., Abram U., Kaden T., "Metal carbonyl syntheses XXII. Low pressure carbonylation of [MoCl₄] and [MoO₄]. The technetium(I) and rhenium(I) complexes [NEt₄]₂[MCl₃(CO)₃]", *J. Org. Chem.*, **492**, 217-24
258. Niessen W.M.A., Tinke A.P., "Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation", *J. Chromatogr.*, 1995, **37**, 703-5
259. Yergey A.L., Edmonds C.G., Lewis A.S., Vestal M.I., "Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Techniques and applications", 1989, Plenum Press, N.Y.
260. Tomer K.B., M.A. Moseley, Deteding C.J., Parker C.E., "Mass Spectrometry review", **13**, 1994, 431
261. Dilworth J., Parrot S., "The biomedical chemistry of technetium and rhenium", *Chem. Soc. Rev.*, **27**, 43-55
262. Parker D., Roy P.S., "Synthesis and characterization of stable Re(V) dioxo complexes with acyclic tetraamine ligands [LReO₂]⁺", *Am. Chem. Soc.*, 1998, **27**, 4127-30
263. Zuckman S.A., Freeman G.M., Troutner D.E., Volkert W.A., Holmes R.A., Van Derveer D.G., Barefield K., "Preparation and x-ray structure of trans-dioxo(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)technetium(V) perchlorate hydrate", *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 2386-9

264. Blake A.J., Greig J.A. Schroder M., "Rhenium complexes of tetra-aza macrocycles: the synthesis and single-crystal x-ray structure of *trans*-[Re(O)₂(cyclam)]Cl·2(BPhe₃·H₂O)", *J.Chem. Soc.*, 1988, 2645-7
265. Breeman W.A., Hofland L.J., de Jong M., Bernard B.F., Srinivasan A., Kwekkeboom D.J., Visser T.J., Krenning E.P., "Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy", *Int. J. Cancer*, 1999, **81**, 658-65
266. Dorsam R.T., Gutkind J., "G-Protein-coupled receptors and cancer", *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 79-94
267. GraphPad Software Prism 4, Graphpad Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression
268. Introduction to Radioligand Binding, Curvefit.com, GraphPad Software Inc.
269. Davenport A.P., Russell F.D., "Radioligand binding assays: theory and practice", S.J., Kluwer Academic Publishers, 1996, pp. 169-179
270. Hulme E.C., Birdsall, N.J.M., "Strategy and tactics in receptor binding studies. In: Receptor-ligand Interactions ed Hulme, E.C., IRL Press, Oxford, 1992, pp. 63-176
271. Jensen R.T., Battey J.F., Spindel E.R., Benya, R.V., "International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states", *Pharmacol. Rev.*, 2008, **60**, 1-42
272. García Garayoa, E., Schweinsberg, C., Maes, V., Rüegg, D., Blanc, A., Bläuenstein, P., Tourwé, D.A., Beck-Sickinger, A.G., and Schubiger P.A., "New ^{99m}Tc bombesin analogues with improved distribution for targeting gastrin releasing – peptide receptor-positive tumors", *Q.J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **51**, 42-50
273. Van de Wiele C., Dumont F., Broecke R.V., Oosterlinck W., Cocquyt V., Serreyn, R., Peers S., Thornback J., Slegers G., and Dierckx R.A., "Technetium-99m RP527, a GRP receptor-expressing malignancies, a feasibility study", *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000, **27**, 1694-9.
274. Reile, H., Armatis, P.E., Schally, A.V., "Characterization of high affinity receptors for bombesin/gastrin releasing peptide on the human prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145", *Prostate*, 1994, **25**, 29-38
275. La Bella R., García Garayoa, E., Bähler M., Bläuenstein P., Schibli R., Conrath P., Tourwé D.A., Schubiger P.A., "A ^{99m}Tc-(I)-post labeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent", *Bioconjugate Chem.*, 2002, **13**, 599-604
276. Abd-Elgaliel W.R., Gallazzi F., Garrison J.C., Rold T.L., Sieckman G.L., Figueroa S.D., Hoffman T.J., Lever S.Z., "Design, synthesis and biological evaluation of an antagonist bombesin analogue as targeting vector", *Bioconjug. Chem*, 2008, **19**, 2040-8
277. Ananias H.J., de Jong I.J., Dierckx R.A., van de Wiele C., Helfrich W., Elsinga P.H., "Nuclear imaging of prostate cancer with gastrin-releasing peptide-receptor targeted radiopharmaceuticals", *Curr. Pharm. Des*, 2008, **14**, 3033-47
278. Lantry L.E., Cappelletti E., Maddalena M.E., Fox J.S., Feng W., Chen J., Thomas R., Eaton S.M., Bogdan N.J., Arunachalam T., Reubi J.C., Raju N., Metcalfe E.C., Lattuada L., Linder

- K.E., Swenson R.E., Tweedle M.F., Nunn A.D., “¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer”, *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 1144-52
- 279** Koenig J., Edwardson J., “Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors”, *TIPS*, **18**, 276-87
- 280** von Zastrow M., “Role of endocytosis in signalling and regulation of G-protein coupled receptors”, *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, **29**, 500-4
- 281** van Koppen C.J., Jakobs Karl H., “Arrestin-independent internalization of G protein coupled receptors”, *Mol. Pharmacol.*, 2004, **66**, 365-7.
- 282** Grady E.F., Slice L.W., Brant W.O., Walsh J.H., Payan D.G., Bunnett N.W., “Direct observation of endocytosis of gastrin-releasing peptide and its receptors”, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 4603-11
- 283** Ginj M., Zhang H., Waser B., Cescato R., Wild D., Wang X., Ercegyi J., Rivier J., Macke H.R., Reubi J.C., “Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors”, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2006, **103**, 16436-41
- 284** Lister-James J., Moyer B.R., Dean T.O., “Small peptides radiolabeled with ^{99m}Tc”, *J. Nucl. Med.*, 1996, **40**, 221-6
- 285** Okavri S.M., “Recent developments in ^{99m}Tc-labelled peptide-based radiopharmaceuticals: an overview”, *Nucl. Med. Commun.*, 1999, **20**, 1093-112
- 286** Decristoforo C., Mather S.J., “The influence of chelator on the pharmacokinetics of ^{99m}Tc-labelled peptides”, *Q. J. Nucl. Med.*, 2002, **46**, 195-205
- 287** Trejtnar F., Laznicek M., Laznickova A., Mather C.J., “Pharmacokinetics and renal handling of ^{99m}Tc-labeled peptides”, *J. Nucl. Med.*, 2000, **41**, 177-82
- 288** Blauenstein P., Pfeiffer G., Schubiger P.A., Anderegg G., Zollinger K., May K., Proso Z., Ivanovici E., Lerch P., “Chemical and biological properties of a cationic Tc-tetraamine complex”, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **36**, 315-7
- 289** Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., *et al*, “NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells”, *Blood*, 2002, **100**, 3175-82
- 290** Giladi E., Nagalla S.R., Spindel ER, “Molecular cloning and characterization of receptors for the mammalian bombesin-like peptides”, *J. Mol. Neurosci.*, 1993, **4**, 41-54
- 291** Spindel E.R., Giladi E., Segerson T.P., Nagalla S., “Bombesin-like peptides: of ligands and receptors”, *Recent Prog. Horm. Res.*, 1993, **48**, 365-91
- 292** Sano H., Feighner S.D., Hreniuk D.L., Iwaasa H., Sailer A.W., Pan J., Reitman M.L., Kanatani A., Howard A.D., Tan C.P., “Characterization of the bombesin-like receptor family in primates”, *Genomics*, 2004, **84**, 139-46
- 293** Louis N., Eveleigh C, Graham F.L “Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line”, *Virology*, **233**, 423-9

- 294** Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK293 cells", *Faseb. J.*, **16**, 869-71
- 295** Mansi R., Wang X., Forrer F., Kneifel S., Tamma M-L., Waser B., Cescato R., Reubi J.C., Maecke H., "Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetid acid - conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography and therapeutic radionuclides", *Clin. Cancer Res.*, 2009, **15**, 5240-9
- 296** Mansi R., Wang X., Forrer F., Waser B., Cescato R., Graham K., Borkowski S., Reubi J.C., Maecke H., "Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2011, **38**, 97-107
- 297.** Abd-Elgaliel W., Gallazzi F., Garrison J., Rold T., Sieckman G., Figueroa S.D., Hoffman T., Zever S., "Design synthesis and biological evaluation of an antagonist-bombesin analogue as targeting vector", *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 2040-8

Σημείωση:

Οι φωτογραφίες των μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται στις απεικονιστικές διαγνωστικές μεθόδους που αναφέρονται στη παρούσα διατριβή έχουν παρθεί από ιστοσελίδες στο διαδίκτυο