

VLERËSIMI IN VITRO I DY DERIVATËVE PEPTIDIKE TË BOMBEZINËS IN VITRO EVALUATION OF TWO PEPTIDE BOMBESIN DERIVATIVES

ELIDA BYLYKU, BRUNILDA DACI, SKENDER MALJA
Qendra e Fizikës Bërthamore të Zbatuar, Universiteti i Tiranës, Shqipëri
Email: elidabylyku@yahoo.co.uk

AKTET IV, 1: 30 - 34, 2011

PËRMBLEDHJE

Peptidet e shënuara me radioizotope jetëshkurtër si ^{99m}Tc , zotërojnë një potencial të madh për t'u përdorur si radiofarmaceutikatë. Përmes këtyre peptideve, bombesina dhe GastrinReleasing Peptide kryejnë funksionin e faktorit rritës autokrin në disa qeliza neoplastike [3]. Ky studim është përqendruar në vetitë in vitro të komplekseve të formuara midis dy derivatëve peptidike të bombesinës dhe radionuklidit ^{99m}Tc . Studiuam metabolizmin e tyre në mëlçi dhe veshka të homogjenizuara, stabilitetin in vitro, në plazmën njërëzore dhe qeliza kanceroze PC3. Nga kombinimi i rezultatëve u arrit në përfundimin se dy derivatët e bombesinës në studim kanë stabilitet të ulët në veshka dhe mëlçi dhe stabilitet të lartë në plazmën njërëzore dhe qeliza kanceroze. Studimet krahasuese midis derivatëve BN11, BN11p treguan për përmirësim të vetive in vitro të derivatit BN11p, gjë që i jep atij mundësinë për t'u përdorur me sukses si radiofarmaceutikati më i përshtatshëm në diagnostikimin e kancerit të hershëm në pankreas.

Fjalë kyçe: bombesinë, tumor, plazëm njërëzore, metabolizëm.

SUMMARY

Labeled peptides with short lived radioisotopes like ^{99m}Tc have great potential as radiopharmaceuticals. Among these peptides are Bombesin and GastrinReleasingPeptide which both can function as autocrine growth factors in several neoplastic cells [3]. In this study, our interest has been focused on the in vitro properties of the complexes formed between two peptide Bombesin derivatives and the radionuclide ^{99m}Tc . We have studied their metabolism in homogenized liver and kidneys, stability *in vitro* (protolytic degradation of the radiolabeled micro peptides) in human plasma and cancer cells PC3 and also releasing time of radioactivity from cancer cells. It is concluded that two Bombesin derivatës appeared low stability in homogenized liver and kidneys and in the same time high stability in human plasma and cancer cells PC3. The comparative studies between two derivatës (BN11, BN11p) showed that BN11p appears promising for the in-vitro properties, so it may be a useful tool for early tumor detection.

HYRJE

Hapi i parë në zhvillimin e radiofarmaceutikatëve me bazë peptidet është përgatitja e komponimeve të cilat kanë afinitet dhe selektivitet për organin që na intereson dhe gjithashtu kanë aftësi për të lidhur radioizotopin që gjithashtu na intereson [7]. Në botimet shkencore janë paraqitur përpjekje të mëdha të bëra për të sintetizuar derivatë të peptideve të afta për t'u lidhur me ^{99m}Tc nëpërmjet ligandëve

[2]. Strategjia më e zakonshme është të fiksohet një ligand në një nga aminoacidet fundore, shpesh nëpërmjet një grupi hapësinor.

Bombesina (BN) është një neuropeptid i 14 aminoacideve. Ajo është izoluar në mënyrë origjinale nga lëkura e amfibit *Bombina orientalis* dhe është një analog i "gastrin releasing peptide" njërëzore (GRP), që lidhet në receptorët GRP (GRP-R) me afinitet dhe specificitet të lartë [1]. Receptoret GRP janë të pranishëm në disa lloje

tumoresh njërëzore, duke përfshirë kancerin e prostatit, të gjoksit, qeliza të vogla kanceri të mushkërive etj. Ky ndikim i receptoreve të peptideve mbi tumoret njërëzore ka ngjallur intëresin klinik në ditët e sotme. Kështu, është studiuar bombezina e radioshënuar dhe është arritur në përfundimin se ajo mund të përdoret me sukses për shintigrafinë e receptorëve GRP. Akumulimi i lartë i gjurmuesve diagnostikë në tumoret e paoperueshme është kriteri më i rëndësishëm për tërapinë radioizotopike të mëtëjshme.

Mirëpo është vërejtur se bombezina ka një metabolizëm shumë të shpejtë in-vivo dhe si rezultat akumulimi (uptake) në tumore ksenograft në minj është i ulët [5]. Kjo ka rrezikuar përdorimin e saj si radiofarmaceutikat. Por problemi i stabilitetit të ulët in vivo është zgjidhur duke ndërhyrë dhe modifikuar molekulën e bombezinës. Një përmirësim i dukshëm është realizuar nga futja në molekulën e bombezinës të aminoacideve jonatyrale me grupe elektrondhënës, të afta për të kompleksuar ^{99m}Tc e reduktuar [4]. Nga këto ndërhyrje në molekulën e bombezinës janë përfutur disa derivatë, dy prej të cilave i analizuar në këtë studim. Këto derivatë dallohen ndërmjet tyre vetëm nga gjatësia e vargut (pesha molekulare). Struktura e plotë e dy derivatëve është:

(BN1.1): Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂): Gly-Gly-Cys-Aca-BN[2-14]

(BN1.1p): Gly-Gly-Cys-Aca-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met(CONH₂): Gly-Gly-Cys-Aca-BN[7-14]

MATERIALI DHE METODA

I. Studimet e metabolizmit në veshka dhe mëlçia të homogjenizuara

Ky kontroll është bazuar në përcaktimin e stabilitetit në kohë të kompleksit radioaktiv të krijuar midis derivatëve të bombezinës dhe ^{99m}Tc , të depozituar në veshka dhe mëlçia. Duhet përcaktuar se për sa kohë enzimat e mëlçisë dhe veshkave shkatërrojnë kompleksin e akumuluar në to. Si pasojë e këtij shkatërrimi krijohen specie (pjesë molekulash të peptidit) të reja që lidhen me ^{99m}Tc . Kontrolli kryhet me sistemin e

kromatografisë së lëngët në presion të lartë (HPLC). Bëhet krahasimi i piveve kromatografike, të peptidit të radioshënuar, para dhe pas kryerjes së procedurës dhe në intervale kohe në rritje.

Për të realizuar këtë studim ndiqet kjo procedurë: Sakrifikohen minj normalë me peshë ~20g. Ndahen veç dy veshkat dhe mëlçia dhe homogjenizohen fort me 1ml solucion puferik (TRIS-sukroze, pH=7.4). 100 µl nga solucioni i veshkave dhe 150 µl nga solucioni i mëlçisë të homogjenizuara trajtohen me 150 µl solucion të derivatëve të bombezinës të shënuara me ^{99m}Tc (sipas procedurës së përshkruar më lart) dhe të kontrolluar për pastërti radiokimike me sistemin e kromatografisë së lëngët në presion të lartë HPLC (të përshkruar si më lart). Pas 5 minutash, 15 minutash dhe 30 minutash shtohet në secilin solucion 0.9ml etanol për të ndaluar veprimin e enzimave (ndërpritët reaksioni i shkatërrimit të peptidit) dhe precipitojnë proteinat. Tubat centrifugohen dhe supernatanti i nënshtrohet kontrollit me sistemin e kromatografisë së lëngët në presion të lartë HPLC, pasi është filtruar në një filtër milipor 0.22µm. Për çdo rast përcaktohet përmbajtja (%) e peptidit të pashënuar.

II. Stabiliteti i peptidit të shënuar në plazëm njërëzore

Degradimi (shkatërrimi) i konjugatëve të radioshënuara është studiuar in-vitro si në plazma ashtu dhe në qeliza PC-3. Derivati i bombezinës së shënuar me ^{99m}Tc , është inkubuar në plazmën e dhuruesve të shëndetshëm, në përqendrim 3-4MBq/ml (1.5-2 pmol/ml), në intervale kohe të ndryshme (deri në 24 orë), në 37°C. Pas inkubimit, proteinat janë precipituar me ACN/Etanol 1:1 dhe TFA (0.01%) dhe janë centrifuguar (10 minuta, 20000 rrot/min), në 4°C. Supernatanti është filtruar dhe është analizuar me të njëjtin sistem RP-HPLC si për rendimentin e shënimit të peptidit të shënuar. Për çdo rast është përcaktuar përmbajtja (%) e peptidit të pashënuar.

III. Stabiliteti në qeliza kanceroze PC-3

Stabiliteti në kultura qelizore është vlerësuar me 2×10^6 qeliza kanceroze njërëzore (prostat

adenocarcinoma) PC-3, të siguruara nga European Collection of Cell Culture (Salisbury, England). Qelizat janë ruajtur në ushqyes të tipit DMEM GLUTAMAX-1 me 1-10% FCS, 100 IU/ml penicilin, 100µg/ml streptomycin sulfatë dhe 0.25µg/ml amfotëricin B. Kulturat qelizore janë inkubuar në 37°C në atmosferë që përmban 7.5% CO₂. Këto qeliza i janë nënshtruar rritjes çdo javë, pas shkëputjes së tyre me trypsin/EDTA (0.25%). Derivatët e bombezinës të shënuara me ^{99m}Tc janë shtuar në suspensionin e qelizave, në fosfat bufer saline (PBS), me përqendrim 3-4MBq/ml dhe janë inkubuar në 37°C. Në intervale kohe të ndryshme, deri në 1 orë, qelizat janë bllokuar me anë të precipitimit (siç e përshkruam më lart) dhe janë filtruar. Filtratët janë analizuar me të njëjtin sistem RP-HPLC si më lart. Shumë piqe që u korrespondojnë peptideve të pashkatërruara dhe produktëve të ndryshme të degradimit janë marrë në kromatogramat radioaktive. Përqindja e peptideve të pashkatërruara përcaktohet për çdo kohë inkubimi.

IV. Ritmi i daljes së radioaktivitetit nga qelizat kanceroze

Gjithashtu është studiuar ritmi i lëshimit të radioaktivitetit nga qelizat kanceroze PC-3. Sipas po të njëjtës mënyrë si tek stabilitëti në qeliza kanceroze, është përcaktuar radioaktiviteti i lëshuar nga qelizat kanceroze në funksion të kohës.

REZULTATET DHE DISKUTIMI

I. Studimet e metabolizmit në veshka dhe mëlçi të homogjenizuara

Rezultatët e marra nga studimet metabolike të stabilitëtit për dy derivatët e bombezinës në veshka dhe mëlçi të homogjenizuar, jepen në grafikun më poshtë.

Shihet qartë nga ky grafik se komplekset e shënuara janë stabël vetëm 5 minuta pas akumulimit në këto organe. Stabilitëti në veshka është pak më i ulët se ai në mëlçi për të dy derivatët. Derivati BN 1.1p jep stabilitet pak më të lartë në të dy organet krahasuar me derivatin BN 1.1.

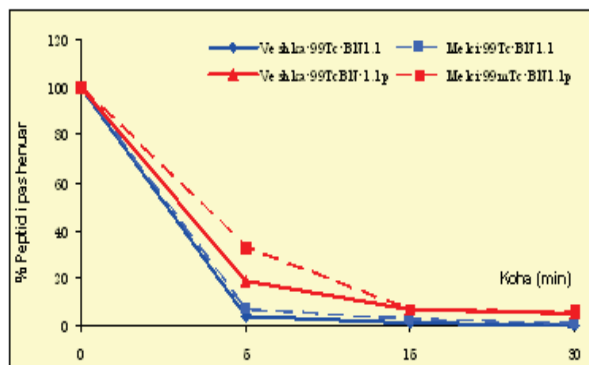


Figura 1. Metabolizmi në veshka dhe mëlçi të homogjenizuara

II. Stabilitëti i peptideve të shënuara në plazmën njërzore

Studimi i stabilitëtit të dy derivatëve BN1.1 dhe BN1.1p në plazmën njërzore dhe rezultatët e paraqitura grafikisht në Fig. 2.

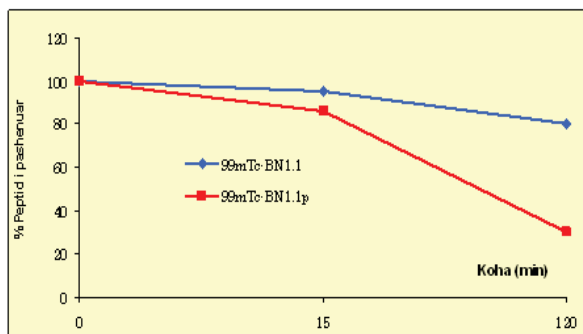


Figura 2. Stabilitëti në plazmën njërzore

Shihet qartë nga ky grafik, se të dy derivatët kanë stabilitet të lartë në plazmën njërzore, por derivati BN1.1 paraqet stabilitet më të lartë se BN1.1p. Për 120 minuta vetëm 20% e tij është shkatërruar ndërkohë që BN1.1p është shkatërruar në masën 70%.

III. Stabilitëti në qeliza kanceroze PC-3

Me rezultatët e marra lidhur me stabilitëtin e dy derivatëve të shënuara BN 1.1 dhe BN 1.1p, në qeliza kanceroze PC-3 janë ndërtuar grafikët në Fig. 3.

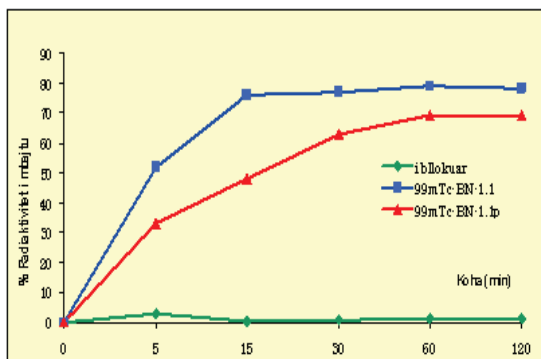


Figura 3. Stabiliteti në qeliza kanceroze PC-3

Grafikët tregojnë qartë se dy derivatët shfaqin stabilitet në qeliza kanceroze. Radioaktiviteti i mbajtur (akumuluar) në to është 75% për BN1.1 dhe 65% për BN1.1p, për 30 minuta.

IV. Ritmi i daljes së radioaktivitetit nga qelizat kanceroze

Studimet e kryera lidhur me ritmin e daljes së radioaktivitetit nga qelizat kanceroze, duke matur radioaktivitetin e qelizave kanceroze në funksion të kohës, çuan në ndërtimin e dy kurbave (për dy derivatët në studim veçmas) të paraqitura në Fig. 4.

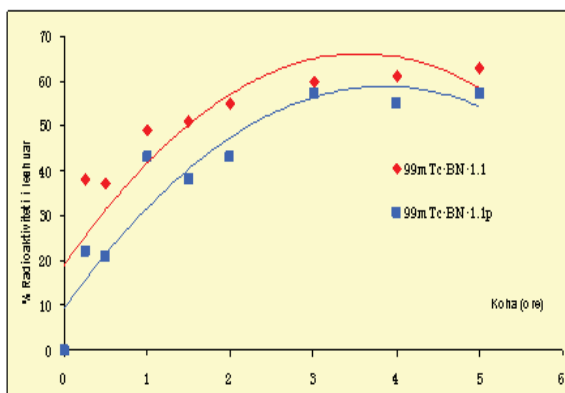


Figura 4. Ritmi i daljes së radioaktivitetit nga qelizat kanceroze

Duke analizuar dy kurbat e këtij grafiku, nuk vihet re mbajtje për një kohë të gjatë e radioaktivitetit nga qelizat kanceroze (afërsisht 4 ore), për të dy derivatët e studiuar, ndërkohë që 4 orë është një kohe e mjaftueshme për të kryer të gjitha

procedurat e marrjes së imazheve shintigrafike [6].

PËRFUNDIME

Rezultatët e këtij studimi tregojnë se të dy derivatët e bombezinës shfaqin veti biologjike të ngjashme me ato të bombezinës natyrore dhe kanë këto veti premtuese për t'u përdorur si një radiofarmaceutikat specifik i ri për zbulimin e tumoreve:

1. Studimet metabolike tregojnë stabilitet të ulët në veshka dhe mëlçi, të homogjenizuar për të dy derivatët në studim
2. Studimet in vitro të degradimit të dy koniugatëve të radioshënuara tregojnë stabilitet të lartë në plazmën njërëzore dhe qeliza kanceroze.
3. Studimi i ritmit të daljes së radioaktivitetit nga qelizat kanceroze tregon për mbajtje 4 orë të lëndës radioaktive në këto qeliza, kohë kjo optimale për të kryer studimet shintigrafike.
4. Krahasimet midis derivatëve BN1.1 dhe BN1.1p tregojnë për përmirësim të sjelljes radiofarmakologjike të derivatit BN1.1p, gjë që i jep atij mundësinë për t'u përdorur me sukses si radiofarmaceutikati më i përshtatshëm në diagnostikimin e kancerit në pankreas.

BIBLIOGRAFIA

1. Costopoulos B., Varvarigou A.D., Sivolapenko G., Potamianos S., Scopinaro F. and Archimandritis S.C. Radiochemical and radiobiological evaluation of a synthetic peptide labelled with ^{99m}Tc . *Nucl. Med. Commun.* 18, 474-481. (1997).
2. Karra S.R., Schibli R., Gali H., Katti K.V. and Hoffman T.J., Higginbotham Sieckman GL, and Volkert WA. ^{99m}Tc -labeling and in vivo studies of a bombesin analogue with novel water-soluble dithiadiphosphine-based bifunctional chelating agent. *Bioconjug Chem*, 10, 254-260, (1999).
3. La Bella R., Garcia-Garayoa E., Langer M., Blauenstein P., Beck-Sickinger A.G. and Schubiger PA. In vitro and in vivo evaluation of a ^{99m}Tc (I)-labeled bombesin analogue for imaging gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nucl Med Biol*, 29, 553-560, (2002).

4. Mantÿ S., Frucht H., Coy D.H., and Jensen R.T. Characterization of Bombesin Receptors Using a Novel, Potÿnt, Radiolabeled Antagonist That Distinguishes Bombesin Receptor Subtypes. *Molecular Pharmacology*. 43, 762-774, (1993).
5. Nock B., Nikolopoulou A., Chiotÿllis E., Loudos G., Maitas D., Reubi J.C. and Maina T. [99mTc]Demobesin 1, a novel potÿnt bombesin analogue for GRP receptor-targetÿd tumor imaging. *Eur J Nucl Med*. 30, 247-258, (2003).
6. Van de Wiele C., Dumont F., Vanden Broecke R., Oostÿrlinck W., Cocquyt V., Serreyn R., A GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur J Nucl Med*, 27, 1694-1699, (2000).
7. Ulderico Mazzi, Tÿchnetium, Rhenium and other metals in Chemistry and Nuclear Medicine, 7, septÿmber 2006.