



PL0201683

BADANIA NAD OTRZYMANIEM ZNACZNIKÓW ^{125}I – GASTRYNA I I ^{125}I – MINIGASTRYNA DO ZASTOSOWAŃ W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

Ewa Byszewska-Szpocińska, Alina Markiewicz

Ośrodek Badawczo-Rozwojowy Izotopów POLATOM, Otwock-Świerk

Abstract

THE PREPARATION OF ^{125}I – GASTRIN I AND ^{125}I – MINIGASTRIN FOR MEDICAL DIAGNOSTICS

Gastrin I G-17 and minigastrin G-13 were iodinated using direct methods with chloramin T and iodogen procedures and by indirect method with Bolton-Hunter reagent. ^{125}I – gastrin I and ^{125}I – minigastrin were isolated from the iodination mixtures by gel filtration on Sephadex G-10 and Sephadex G-25 (PD-10 column) and by HPLC system (Lichrospher WP-300-RP-18 column). Radiochemical purity was shown by HPLC also. It was confirmed that iodogen procedure is the best for iodination of these peptides. ^{125}I – gastrin I obtained by this method with specific activity $80 \mu\text{Ci/nmol}$ was homogeneous but iodination to higher specific activity ($440 \mu\text{Ci/nmol}$) caused appearance of two subfractions. ^{125}I – minigastrin with high and low specific activity were isolated by HPLC as the two forms (subfractions).

It was shown that high performance liquid chromatography (HPLC) was the best method for isolation and purification of ^{125}I – gastrin I and ^{125}I – minigastrin.

1. WSTĘP

Gastryna jest jednym z trzech, obok cholecystokininy i sekretyny, głównych hormonów przewodu pokarmowego. Jest ona najsilniejszym (poza mechanizmami nerwowymi) aktywatorem wydzielania kwasu żołądkowego i enzymu proteolitycznego pepsyny.

Gastryna jest wydzielana przez gruczoły żołądkowe w śluzówce części obwodowej i odźwierniku żołądka. U ludzi zidentyfikowano dwie gastryny: I i II składające się z 17 aminokwasów [1]. Syntetycznie otrzymano już wiele pochodnych gastryny: gastryny będące różnymi fragmentami łańcucha peptydowego (tetra-, pentagastryny) czy też ze zmienionymi niektórymi aminokwasami (15-leucynowa, 15-metioninowa) [2].

Poziom gastryny wzrasta wraz z wiekiem i w schorzeniach, w których wydzielanie kwasu żołądkowego jest małe, np. w niedokrwistości złośliwej, owrzodzeniach żołądka i jelit.

Ostatnio pojawiają się liczne doniesienia sugerujące istotny udział pewnych hormonów jelitowych, a zwłaszcza gastryny, w powstawaniu nowotworów złośliwych przewodu pokarmowego. Gastrynę uznano za jeden z głównych czynników wywołujących niekontrolowane namnażanie

komórek nowotworowych żołądka i przerzuty nowotworów. Już w 1964 roku wyodrębniono gastrynę z tkanki nowotworowej żołądka i dokonano jej pierwszej syntezy.

W latach dziewięćdziesiątych zainteresowano się gastryną i jej pochodnymi, a szczególnie minigastryną, zarówno jako potencjalnymi diagnostykami, jak również lekami w badaniach onkologicznych [2, 3]. Stwierdzono mianowicie wyraźną ekspresję receptorów gastrynowych w niektórych schorzeniach nowotworowych (rak tarczycy, rak płuc). W badaniach stosowano znakowane jodem-125 i 131 oraz indem-111 pochodne gastryny (G-17, minigastryna). Prowadzono badania powinowactwa tak otrzymanych preparatów znakowanych *in vitro* na komórkach, jak również badano ich aktywność biologiczną *in vivo* na zwierzętach (biodystrybucja) i sporadycznie na ludziach.

Celem podjętej pracy było znalezienie optymalnej metody znakowania gastryny I i minigastryny jodem-125, a także metody oczyszczania tak otrzymanej mieszaniny po jodowaniu oraz wyodrębnienia czystej radiochemicznie ^{125}I – gastryny I i ^{125}I – minigastryny, które można by stosować w diagnostyce nowotworowej *in vitro* czy też *in vivo*.

2. MATERIAŁ I METODY

Do znakowania używano ludzkiej gastryny I G-1-17 (m. cz. 2098 Da) oraz minigastryny I izolowanej z tkanki nowotworowej, składającej się z 13 aminokwasów i odpowiadającej fragmentowi 5-17 gastryny I. Oba substraty pochodziły z firmy ICN (USA). Jodek sodowy Na^{125}I pochodził z węgierskiej firmy IZOTOP. Używana chloramina T była produkcji BDH-Laboratory (Anglia), jodogen – firmy Pierce Chemicals (Rockford, USA), a odczynnik Boltona-Huntera – firmy Sigma Chemicals Company (USA).

Gastrynę i jej pochodne znakowano jodem 125 metodami bezpośrednimi stosując N-chloroutleniacze: chloraminę T i jodogen oraz metodą pośrednią z zastosowaniem odczynnika acylującego Boltona-Huntera [3-(p-hydroxyphenyl) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester] [4].

Stosunek chloraminy do gastryny wynosił 3:1, zaś jodu 125 do gastryny 1:3 i 1:15 (jodowanie do wysokiej – 440 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ i niskiej – 80 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ aktywności właściwej). Reakcję jodowania prowadzono przez 30 s w temperaturze pokojowej.

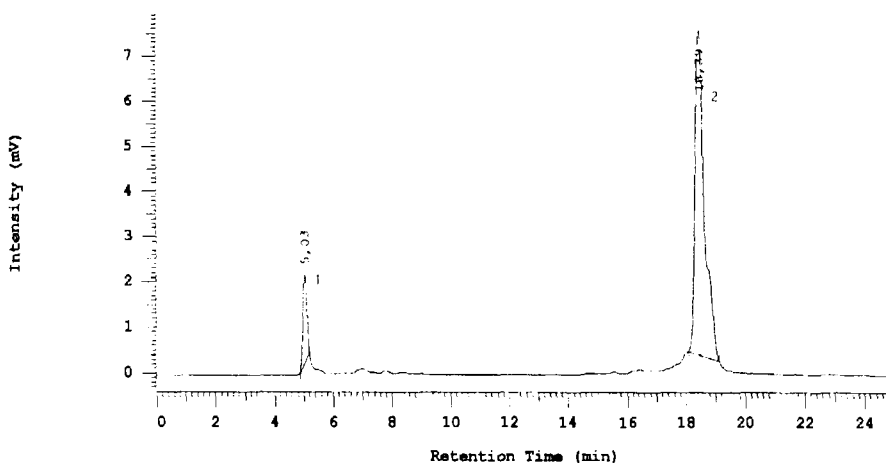
Do znakowania gastryny I i minigastryny używano 2 μg jodogenu osadzonego na probówce. Reakcję prowadzono przez 7 min w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ oraz pokojowej używając różnych ilości jodu-125 (0,2 i 1 mCi).

Jodowanie gastryny I i minigastryny z użyciem odczynnika Boltona-Huntera prowadzono według procedury opisanej w literaturze [2].

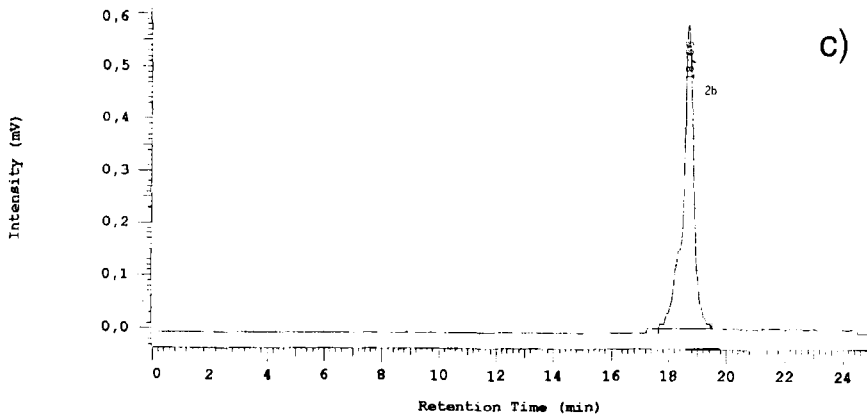
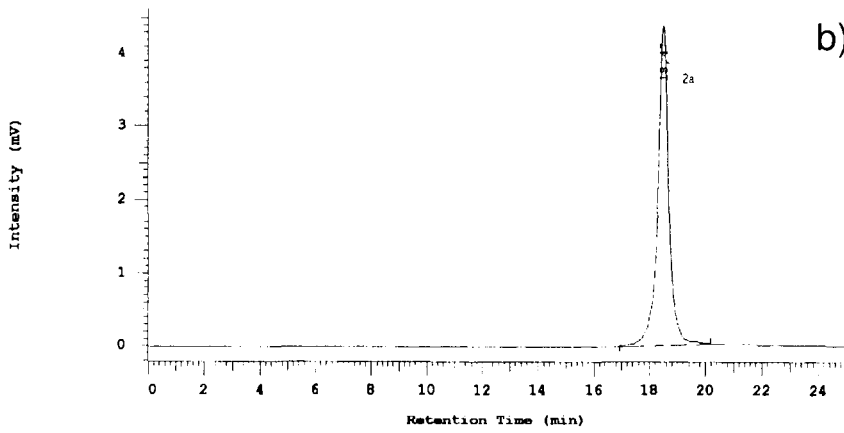
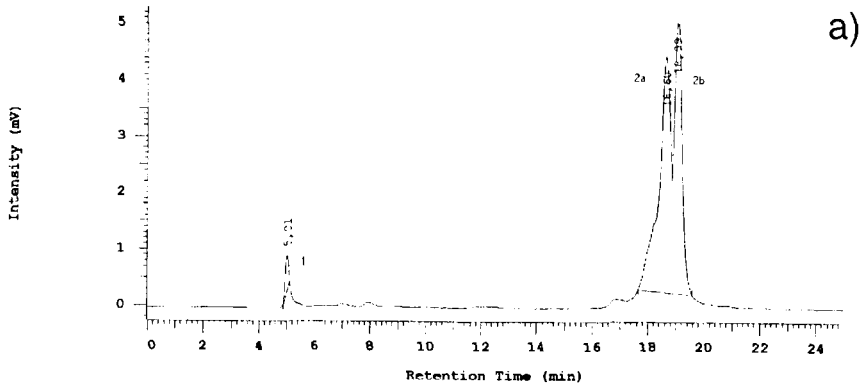
Otrzymane mieszaniny po jodowaniu rozdzielano stosując filtrację żelową na Sephadexie G-10 i Sephadexie G-25 (kolumna PD-10) oraz system HPLC-kolumna Lichrospher WP 300 RP-18. Wykorzystując chromatografię HPLC określano skład mieszanin po wyjodowaniu, jednorodność oraz czystość preparatów ^{125}I – gastryny I i ^{125}I – minigastryny otrzymanych po chromatografii na Sephadexach.

3. WYNIKI

^{125}I – gastryna I otrzymana w reakcji jodowania z zastosowaniem chloraminy jako utleniacza zarówno o wyższej aktywności właściwej (440 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$), jak i niskiej (80 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$), analizowana z użyciem systemu HPLC okazała się bardzo niejednorodna i mało stabilna. Przeprowadzenie jodowania gastryny I z wykorzystaniem jodogenu w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ okazało się bardzo mało wydajne, natomiast reakcja prowadzona w temperaturze pokojowej zachodziła z dużo lepszą wydajnością (do 98%). Używając do jodowania mniejszej ilości jodu (0,2 mCi) możliwe było z zastosowaniem HPLC wyodrębnienie z mieszaniny po jodowaniu czystej i jednorodnej ^{125}I – gastryny I (szczyt 2 na rys. 1). Również ^{125}I – gastryna I wyodrębniona z tej mieszaniny w wyniku chromatografii na Sephadexie G-10 okazała się dość jednorodna, co stwierdzono rechromatografując ją z zastosowaniem HPLC. ^{125}I – gastryna I wyjodowana do aktywności właściwej 440 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ widoczna jest na radiochromatogramie z HPLC w postaci

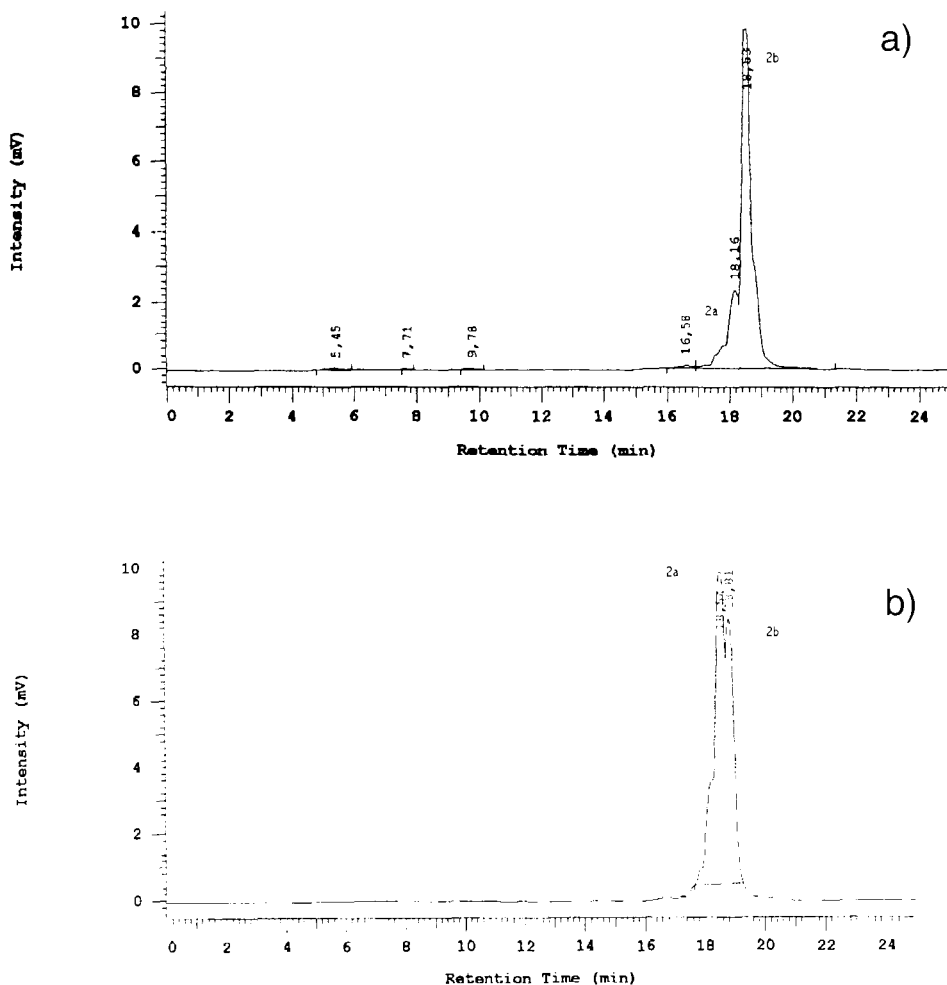


Rys. 1. Radiochromatogram eluatu z kolumny HPLC mieszaniny po jodowaniu gastryny I z użyciem jodogenu, 0,2 mCi ^{125}I ; szczyt 1 – ^{125}I , szczyt 2 – ^{125}I – gastryna.



Rys. 2. Radiochromatogram eluatu z kolumny HPLC: a) mieszaniny po jodowaniu gastryny I z użyciem jodogenu, 1 mCi ^{125}I ; szczyt 1 – ^{125}I , szczyt 2a i 2b – ^{125}I – gastryna I; b) rechromatografowanego szczytu 2a; c) rechromatografowanego szczytu 2b.

dwóch podfrakcji (2a – 55% i 2b – 43% na rys. 2a), które okazały się jednorodne po ponownej chromatografii w systemie HPLC (szczyt 2a – rys. 2b, szczyt 2b – rys. 2c).



Rys. 3. Radiochromatogram eluatu z kolumny HPLC mieszniny po jodowaniu minigastryny z użyciem jodogenu: a) 0,2 mCi ^{125}I , b) 1 mCi ^{125}I , szczyty 2a i 2b – ^{125}I – minigastryna.

W wyniku jodowania minigastryny z użyciem większej i mniejszej ilości jodu-125 otrzymano ^{125}I – minigastrynę w postaci dwóch frakcji uwidocznionych na radiochromatogramach z zastosowaniem HPLC jako frakcje 2a i 2b w rejonie czasu retencji 18,5 min. Proporcje tych frakcji w zależności od aktywności właściwej preparatu były różne (rys. 3a – ^{125}I – minigastryna o aktywności właściwej 80 $\mu\text{Ci/nmol}$ i rys. 3b – ^{125}I – minigastryna o ak-

tywności właściwej 440 $\mu\text{Ci/nmol}$). ^{125}I – minigastryna otrzymana w wyniku rozdziału mieszaniny po jodowaniu na kolumnie PD-10 składała się również z dwóch podfrakcji (2a i 2b).

^{125}I – gastryna I i ^{125}I – minigastryna otrzymane w wyniku jodowania z zastosowaniem odczynnika Boltona-Huntera, a oczyszczone z zastosowaniem chromatografii HPLC okazały się bardzo niejednorodne. W rejonie czasu retencji 18 min stwierdzono obecność wielu frakcji, trudnych do zidentyfikowania, między innymi z powodu lokowania się w tym samym rejonie pewnych wyjodowanych składników odczynnika Boltona-Huntera.

4. DYSKUSJA

Wybierając metodę znakowania gastryny I (i minigastryny) jodem-125 opierano się na doniesieniach literaturowych z lat siedemdziesiątych i początku osiemdziesiątych, kiedy stosowano jodowanie z użyciem chloraminy T jako utleniacza [5-8], doniesieniach późniejszych opisujących jodowania z użyciem jodogenu [2, 3], jak również ostatnich pracach, w których obok jodowania bezpośredniego stosowano jodowanie pośrednie używając odczynnika Boltona-Huntera [2].

Jak wiadomo użycie chloraminy, jako silnego utleniacza w reakcji jodowania, może prowadzić do uszkodzenia struktury łańcucha peptydowego. Istotne było więc utrzymanie określonego stosunku molowego chloraminy do gastryny, nie większego niż 3:1 [5, 7]. We wszystkich opisanych eksperymentach ten stosunek starano się zachować. Również bardzo istotne było zachowanie odpowiedniego stosunku molowego użytego jodu-125 do gastryny. Jak stwierdzono w literaturze nie powinien on być większy niż 1:4 [7].

Jodując gastrynę I do niskiej i wysokiej aktywności właściwej z użyciem chloraminy stwierdzono istnienie podwójnego szczytu gastryny. Taki obraz może świadczyć o pewnej degradacji cząsteczki podczas procesu jodowania, istnieniu form monojodowanej i dijodowanej gastryny lub o obecności jej izomerów [5, 7].

Jodowanie gastryny I z zastosowaniem chloraminy jako utleniacza i późniejszy rozdział tej mieszaniny na Sephadexie G-10 uznano za niezadawalający i nie prowadzący do otrzymania czystej radiochemicznie ^{125}I – gastryny I. Zastosowano zatem inny, łagodniejszy sposób jodowania z użyciem jodogenu jako utleniacza. W ostatnich latach w literaturze właśnie ta metoda była opisywana jako polecana do jodowania gastryny [2, 3, 5, 6]. Wzorowano się również na opisanej metodzie oryginalnej [9]. Jodowanie tą metodą do niskiej aktywności właściwej (80 $\mu\text{Ci/nmol}$) doprowa-

dziło do otrzymania czystej radiochemicznie ^{125}I – gastryny I w postaci pojedynczego szczytu, którą można prosto wyizolować stosując HPLC. Izolacja z zastosowaniem chromatografii żelowej prowadziła do częściowej lecz niewielkiej degradacji peptydu. Jodując gastrynę I do wyższej aktywności właściwej ($440 \mu\text{Ci/nmol}$) otrzymano preparat niejednorodny, składający się z dwóch izomerów czy też monojodo- i diiodogastryny I, które można rozdzielić stosując HPLC. Uzyskuje się czyste radiochemicznie frakcje ^{125}I – gastryny I.

Publikacje z ostatnich lat wskazywały na możliwość otrzymania jodowanych pochodnych gastryny (big-gastryny i minigastryny) pośrednią metodą znakowania jodem z użyciem odczynnika Boltona-Huntera [2]. Metoda ta jest jednak dość skomplikowana (konieczność szybkiej ekstrakcji), a półprodukty reakcji jodowania odczynnika Boltona-Huntera są bardzo nietrwałe. Zastosowanie tej metody jodowania nie doprowadziło do wyizolowania ^{125}I – gastryny I i ^{125}I – minigastryny o dobrej czystości radiochemicznej. W porównaniu z jodowaniem bezpośrednim z użyciem jodogenem okazała się ona skomplikowana i trudna do interpretacji.

Stwierdzono, że optymalną metodą znakowania jodem-125 gastryny I i minigastryny jest metoda z zastosowaniem jodogenu jako utleniacza, a proces jodowania należy prowadzić w temperaturze pokojowej. Uznano także, że do oczyszczania mieszanin po jodowaniu gastryny I i minigastryny najlepiej nadaje się metoda z zastosowaniem chromatografii HPLC.

LITERATURA

- [1]. Rehfeld J.F., Johnsen A.H.: Structure of bioactive gastrins. W: Gastrin. J.H. Walsh, Raven Press Ltd., New York 1993, s. 1-14.
- [2]. Behr T.M., Behe M.: Cholecystokinin – B/Gastrin receptor binding peptides: preclinical development and evaluation of diagnostic and therapeutic potential. Clin. Canc. Res., 5, 3124-3138 (1999).
- [3]. Behr T.M., Jenner N.: Targeting of cholecystokinin – B/gastrin receptors *in vivo*: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. Eur. J. Nucl. Med., 25, 424-430 (1998).
- [4]. Bolton A.E., Hunter W.M.: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I – containing acylating agent. Biochem. J., 133, 529-539 (1973).
- [5]. Gołda W., Silberring J., Szybiński Z.: Problemy metodyczne towarzyszące oznaczaniu gastryny metodą RIA. Endokrynologia Polska, 4, 345-352 (1976).

- [6]. Klevenland P.M., Haugen S.E., Waldum H.L.: The preparation of bioactive ^{125}I – gastrin, using iodo-gen as oxidizing agent, and the use of this tracer in receptor studies. *Scand. J. Gastroenterol.*, 20, 569-576 (1985).
- [7]. Dockray G.J., Walsh J.H., Grossman M.J.: Biological activity of iodinated gastrins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 69, 339-345 (1976).
- [8]. Greenwood F.C., Hunter W.M.: The preparation of ^{131}I – labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89, 114-123 (1962).
- [9]. Salacinski P.R.P., Mc Lean C., Sykes J.E.C., Clement-Jones V.V., Lowry P.J.: Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using jodogen. *Anal. Biochem.*, 117, 136-146 (1981).

**III. ZASTOSOWANIE TECHNIK JĄDROWYCH
W OCHRONIE ŚRODOWISKA I NAUKACH
O ZIEMI**
