

ID = 9647631

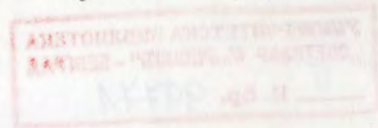


PD 15057



003099771

COBISS •



UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Siniša S. Radulović

PRETKLINIČKA FARMAKOLOGIJA ANTAGONISTA BOMBESINA

Doktorska teza



Dragoj Sveđani,

Za ljubav, razmišljanje i pomoć.

Beograd, 1993

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
„СВЕТОСАР М. РАКОВИЋ“ - БЕОГРАД
Ч. и. Бр. 99771



1993

PREDGOVOR

Ekperimentalni deo ove teze urađen je u periodu od oktobra 1990. do decembra 1992. godine na Institutu za polipeptide, endokrinologiju i rak, Tulane Univerziteta u Nju Orleansu, SAO (Polypeptide, Endocrine and Cancer Institute, Tulane University, New Orleans, U.S.A.). Izuzetno srećno, u kojoj se odvijao moj rad, dopirali su istraživači koji su bili različitog čvrstoćinje, govornih različitih jezicima, bili različitih vera i sa različitim tradicijama, ali nam je od bitno bitno možemo i skromnim doprinosom pomoci rešavanju druge najveće bolesti od koje ljudi umiru, raku.

Sledeće kolege su mi mnogo pomogli i iskreno im se zahvaljujem: Dr K. Szepeshazy, profesor patologije iz Budimpešte, Dr T. Yano, docent, ginekolog iz Tokija, Dr Sci B. Szoka, biolog iz Beogradina, Dr Sci R-Z. Cai, hemičar iz Kine, Dr J. Pivacki i Dr Sci H. Rala, kolege iz Nemačke kao i moj prijatelj Prof. Dr S. Mitovanović iz Beograda.

Zahvalan sam Prof. Dr Ana-Maria Commary-Schelly, endokrinologu Tulane Hospitala, sa kojom smo dogovarali planove za klinička ispitivanja.

Najviše sam zahvalan Prof. dr Andrew Victor Schally-u, izuzetnom istraživaču Nobelovcu, šefu Instituta za polipeptide, endokrinologiju i rak u Nju Orleansu, za mogućnost da budem priznan, ali i skromno doprinesem, njegovim izvišenim ciljevima.

Svoim prvim učiteljima iz istraživačkog rada i mentoru Prof. Dr Tomislavu Kaliterna zahvalan sam za stalni interes i podršku za moj rad kao i za pomoć.

Prof. dr Miro Prostran imao je veliku podršku i pomoć koju mi je pružio u razumavanju receptorskih studija.

Zahvaljujem se Prof. dr Ivani Spuzicu, Prof. dr Jovani Vuković i Prim. Dr Svetoslavu Jekiću, sa Instituta za onkologiju i radiologiju u Beogradu, koji su mi svojim stručnim znanjima pomogli da rad uspešno privučem kraju.

Zahvaljujem za pomoć Z. Ruzić i B. Ruzić, studentima za rad sa kompjuterima.

Dragoj Svetlani,

Za ljubav, razumevanje i pomoć.

Beograd, april 1993.

Srđan Radović

PREDGOVOR

Eksperimentalni deo ove teze urađen je u periodu od oktobra 1990. do decembra 1992. godine na Institutu za polipeptide, endokrinologiju i rak, Tulejn Univerziteta u Nju Orleansu, SAD (Polypeptide, Endocrine and Cancer Institute, Tulane University, New Orleans, U.S.A.) . Izuzetnoj sredini, u kojoj se odvijao moj rad, doprineli su istraživači koji su bili različitog obrazovanja, govorili različitim jezicima, bili različitih vera i sa različitim tradicijama, ali nam je cilj bio isti: možemo li skromnim doprinosom pomoći rešavanju druge najčešće bolesti od koje ljudi umiru, raku.

Sledeće kolege su mi mnogo pomogle i iskreno im se zahvaljujem: Dr K. Szepeshazy, profesor patologije iz Budimpešte, Dr T. Yano, docent, ginekolog iz Tokija, Dr Sci B. Szoke, biolog iz Segedina, Dr Sci R-Z. Cai, hemičar iz Kine, Dr J. Pinski i Dr Sci. H. Reile, kolege iz Nemačke kao i moj prijatelj Prof. Dr S. Milovanoviću iz Beograda.

Zahvalan sam Prof. Dr Ana-Maria Commary-Schally, endokrinologu Tulane Hospital-a, sa kojom smo dogovarali planove za klinička ispitivanja.

Najviše sam zahvalan Prof. dr Andrew Victor Schally-u, izuzetnom istraživaču Nobelovcu, šefu Instituta za polipeptide, endokrinologiju i rak u Nju Orleansu, za mogućnost da budem prisutan, ali i skromno doprinesem, njegovim uzvišenim ciljevima.

Svom prvom učitelju iz oblasti istraživačkog rada i mentoru Prof. Dr Tomislavu Kažiću zahvalan sam za stalni interes koji pokazuje za moj rad kao i za pomoć.

Prof. dr Milici Prostran hvala za prijateljsku podršku i pomoć koju mi je pružila u razumevanju receptorskih studija.

Zahvaljujem se Prof.dr Ivanu Spužiću, Prim.dr Labudi Vuletić i Prim.Dr Svetislavu Jeliću, sa Instituta za onkologiju i radiologiju u Beogradu, koji su mi svojim stručnim savetima pomogli da rad uspešno priveden kraju.

Zahvaljujem na pomoći Z. Ristović i B. Ribariću, ekspertima za rad sa kompjuterima.

Beograd, april 1993.

Siniša Radulović

Teza koja sledi zasnovana je na sledećim publikacijama:

1. Schally A.V., Srkalovic G., Szende B., Reding T.W., Janaky T., Juhasz A., Korkut E., Cai R-Z., Szepeshazi K., *Radulovic S.*, Bokser L., Groot K., Serfozo P., Comaru-Schally A.M. (1990). Antitumor effects of analogs of LH-RH and somatostatin; experimental and clinical studies. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 37(6). 1061-1067.
2. *Radulovic S.*, Cai R.Z., Milovanovic S., Schally A.V. (1992). The binding of bombesin and somatostatin and their analogs to human colon cancers. *Proc.Soc.Exper.Biol.*, 200, 394-600.
3. *Radulovic S.*, Cai R.Z., Serfozo P., Groot K., Redding T.W., Pinski J., Schally A.V. (1991). Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi. *Int. J Peptide Protein Res.*, 38, 593-600.
4. Pinski J., Milovanovic S., Yano T., Hamaoui A., *Radulovic S.*, Cai R.Z., Schally A.V. (1992). Biological activity and receptor binding characteristic to various human tumors of acetylated somatostatin analogs. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 200, 49-56.
5. Szepeshazi K., Schally A.V., Cai R.Z., *Radulovic S.*, Milovanovic S., Szoke B. (1991). Inhibitor effect of bombesin/GRP antagonist RC-3095 and high dose of somatostatin analog RC-160 on nitrosamine-induced pancreatic cancers in hamsters. *Cancer Res.*, 51, 5980-5986.
6. *Radulovic S.*, Schally A.V., Reile H., Halmos G., Szepeshazi K., Groot K., Milovanovic S., Miller G., Yano T. (1993). Inhibitory effect of antagonist of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancer in nude mice. *Acta Oncologica*, in press.
7. *Radulovic S.*, Miller G., Schally A.V. (1991). Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/GRP antagonist (RC-3095). *Cancer Res.*, 51, 6006-6009.
8. Cai R-Z., *Radulovic S.*, Pinski J., Nagay A., Redding T.W., Olsen D.B., Schally A.V. (1992). Pseudononapeptide bombesin antagonists containing C-terminal Trp or Tpi. *Peptides*, 13(2), 267-271.
9. Redding T.W., Schally A.V., *Radulovic S.*, Milovanovic S., Szepeshazi K., Isaacs J.T. (1992). Sustained release formulations of LH-RH antagonists SB-75 inhibit proliferation and enhance the apoptotic cell death of human prostate carcinoma (PC-82) in male nude mice. *Cancer Res.*, 52, 2538-2544.
10. Milovanovic S., *Radulovic S.*, Groot K., Schally A.V. (1992). Inhibition of growth of PC-82 human prostate cancer line xenografts in nude mice by bombesin antagonist RC-3095 or combination of agonist (D-Trp⁶) LH-RH and somatostatin analog RC-160. *The Prostate*, 20, 269-280.
11. *Radulovic S.*, Milovanovic S., Cai R-Z., Schally A.V. (1993). Bombesin antagonists with different modification at the seven position of the pseudononapeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
12. *Radulovic S.*, Cai R-Z., Szoke B., Groot K., Milovanovic S., Schally A.V. (1993). Binding of bombesin and bombesin antagonists to rat glioma cell line (RT-2). *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, in press.
13. Szepeshazi K., Shally A.V., Halmos G., Groot K., *Radulovic S.* (1992). Antagonist of bombesin/gastrin releasing peptide inhibits growth of estrogen dependent and independent MXT mammary cancer in mice. *Journal of National Cancer Institute*, 84 (24), 1915-1922.
14. Schally A.V., *Radulovic S.*, Szepeshazi K., Lebow C. (1991). Down-regulation of EGF receptors by bombesin receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press).

15. *Radulovic S., Commary-Schally A.M., Milovanovic S., Schally A.V. (1992). Somatostatin analog RC-160 and LH-RH antagonist SB-75 inhibit growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. Pancreas, 8(1), 88-97.*
16. *Pinski J., Yano T., Groot K., Radulovic S., Schally A.V. (1992). Endocrine effects of new pseudo nonapeptide bombesin/gastrin releasing peptide antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi in rats. Am. J. Physiol., 263, E712-E717.*
17. *Pinski J., Yano T., Rekasi Z., Cai R-Z., Radulovic S., Schally A.V. (1992). High potency of a new bombesin antagonist (RC-3095) in inhibiting serum gastrin levels; comparison of different routes of administration. Regulatory Peptides, 41, 185-193.*
18. *Radulovic S., Nagy A., Szoke B., Schally A.V. (1992). Cytotoxic analog of somatostatin containing methotrexate inhibits growth of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer xenografts in nude mice. Cancer Letters , 62, 263-271.*
19. *Yano T., Pinski J., Szepeshazi K., Halmos G., Radulovic S., Groot K., Schally A.V. (1992). Inhibitory effect of bombesin/gastrin releasing peptide (GRP) antagonist and LH-RH antagonist SB-75 on growth of MCF-7 MIII human mammary cancer xenografts in nude mice. Cancer, (in press).*
20. *Radulovic S., Szepeshazi K., Milovanovic S., Cai R-Z., Schally A.V. (1992). Antitumor activities of new antagonistic analogs of bombesin is linked to down-regulation of EGF receptors. Annals of Oncology, Suppl 1 (3), P100.*

Delovi iz uvoda ove teze su objavljeni u knjizi:

ENDOCRINE TUMORS

Experimental and Clinical studies in Hormone Dependent Cancer

Autori: Andrew V. Schally, *Sinisa Radulovic*, Ana Maria Commary-Schally

Ed(s). E. Mazzaferri, N. Samaan

Blackwell Scientific Publications Inc. (in press).

S A D R Ž A J

Predgovor.....	2
UVOD.....	8
Biološka uloga bombenzina.....	9
Receptori za bombezina/GRP.....	13
Antagonisti bombenzina.....	15
CILJ RADA.....	18
MATERIJAL I METODE.....	19
<i>In vitro</i> eksperimenti.....	19
Sinteza i izolacija analoga bombenzina/GRP-a.....	19
Receptorske studije.....	21
Mitogene analize.....	24
1. Inhibicija inkorporacije obeleženog timidina u DNK ćelija.....	24
2. Inhibicija proliferacije ćelija.....	25
3. Formiranje kolonija.....	26
Superfuziona analiza.....	26
<i>In vivo</i> eksperimenti.....	28
Ispitivanje endokrinih efekata antagonista bombenzina kod pacova.....	28
Ispitivanje antitumorske aktivnosti antagonista bombenzina.....	28
1. Transplantati humanih tumora na golim miševima.....	29
2. Eksperimenti sa MXT karcinomom miša.....	30
3. Eksperimenti sa hemijski indukovanim karcinomom pankreasa kod hrčaka.....	30
Histološke procedure.....	31
REZULTATI.....	31
Struktura sintetisanih antagonista bombenzina.....	31
Analiza aktivnosti ("screening") novosintetisanih analoga bombenzina <i>In vitro</i>	34
Tetradekapeptidni analozi bombenzina.....	37
Analozi sa strukturnim izmenama na poziciji 7.....	37
Pseudononapeptidni analozi sa Trp i Tpi na N-terminalu molekule.....	39
Rezultati sa perfundovanim acinusima pankreasa pacova.....	41
Pseudononapeptidni analozi sa Trp i Tpi NA C-terminalu molekule.....	44
Analozi bez metionina na poziciji 14 (OMe analozi) i ciklični analozi bombenzina... ..	47
Efekt antagoniste bombenzina RC-3095 na rast ćelijskih linija humanog karcinoma pluća i dojke.....	49

Završni pregled eksperimenata <i>in vitro</i>	52
Aktivnost antagonista bombezina u eksperimentima <i>in vivo</i>	53
Endokrini efekti antagonista bombezina kod pacova.....	53
Efekt GRP(14-27) na koncentracije gastrina, hormona rasta, insulina i glukagona u serumu.....	53
Efekt D-Trp ⁶ i D-Tpi ⁶ pseudononapeptidnih antagonista bombezina RC-3095, RC-3420, RC-3125 i RC-3105 na endokrine efekte GRP(14-27)-a.....	54
Efekti GRP(14-27) i RC-3095 na oslobađanje hromona rasta kod pacova.....	57
Efekt RC-3440, Tpi ¹⁴ pseudononapeptidnog antagoniste bombezina, na porast koncentracije gastrina u serumu pacova uzrokovan GRP(14-27).....	57
Uticaj RC-3095 na koncentraciju gastrina u serumu pacova posle različitih načina aplikacije (davanja)	58
Inhibitorski efekt antagonista bombezina/GRP-a RC-3095 na rast MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke transplan-tiranog golim miševima.....	62
Inhibitorski efekt antagoniste bombezina/GRP-a RC-3095 na rast estrogen zavisnog i estrogen nezavisnog MXT karcinoma dojke miša	66
Inhibitorski efekt RC-3095, antagoniste bombezina/GRP-a, na rast karcinoma pankreasa hrčka indukovano nitrozaminom	71
Efekt antagoniste bombezina/GRP-a, na rast PC-82 humanog karcinoma prostate u golim miševima.....	73
Efekt RC-3095 i RC-3440, antagonista bombezina/GRP-a, na rast HT-29 humanog karcinoma kolona transplantiranog golim miševima	76
Intrasplenična injekcija HT-29 ćelija u golim miševima.....	82
DISKUSIJA.....	83
Tipovi sintetisanih antagonista bombezinskih receptora	83
Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na N-terminalu.....	84
Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na C-terminalu.....	85
Dezmetionin (OMe) analozi bombezina	86
Metodološki aspekti ispitivanja antagonista bombezina.....	87
Endokrini efekti antagonista bombezina kod pacova.....	90
Antitumorsko dejstvo antagonista bombezinskih receptora	92
Eksperimentalni karcinomi dojke.....	92
Inhibitorsko dejstvo antagoniste bombezina RC-3095 na rasta MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke transplantiranog golim miševima	92
Inhibitorsko dejstvo RC-3095 na rast estrogen-zavisnog i estrogen-nezavisnog MXT karcinoma dojke miša	93
Inhibitorsko dejstvo antagoniste bombezina RC-3095 na rast karcinoma pankreasa hrčka uzrokovanog hemijskim karcinogenom.....	94
Inhibitorsko dejstvo antagoniste bombezina RC-3095 na rast PC-82 humanog karcinoma prostate transplantiranog golim miševima	95
Inhibitorsko dejstvo antagoniste bombezina RC-3095 na rast HT-29 humanog karcinoma kolona transplantiranog golim miševima	96
Mogući mehanizmi antitumorskog delovanja antagonista bombezina	99
ZAKLJUČCI	99
Literatura.....	101

SKRAĆENICE

AgNOR	- region agirofilne organizacije nukleusa;
BN	- bombezin;
BSA	- goveđi albumin
BOP	- N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine;
CFBS	- "colostrum-free bovine serum"-goveđi serum bez kolostruma;
CNS	- centralni nervni sistem;
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina;
DMSO	- dimetilsulfoksid;
DME	- Dulbecco Modified Eagle hranljiva podloga;
EDTA	- etilendiamintetrasirćetna kiselina;
FBS	- "fetal bovine serum"-goveđi serum;
GI	- gastrointestinalni;
GRP	- "gastrin-releasing peptide"-gastrin oslobađajući peptid;
GH	- "growth hormon"-hormon rasta;
IGF-I	- "insulin growth factor I-insulinski faktor rasta I;
HITES	- hranljiva podloga RPMI 1640 sa dodatkom hidrokortizona, insulina, transferina, estradiola i selena;
HPLC	- tečna hromatografija visokim pritiskom;
EGF	- "epidermal growth factor-epidermalni faktor rasta;
LH	- luteinizirajući hormon;
LH-RH	- luteinizirajući hormon oslobađajući hormon;
PBS	- fosfatni puferski rastvor;
PDGF	- "platelet derived growth factor"-trombocitni faktor rasta;
PSA	- prostatični specifični antigen;
RPMI 1640	- hranljiva podloga za kulturu ćelija, od: Roswel Park Memorial Institute;
RIA	- radioimunoesej;
SCLC	- "small cell lung cancer"-mikrocelularni karcinom pluća;
TGF- α	- "transforming growth factor alfa-transformirajući faktor rasta alfa;
TFA	- trifluorosirćetna kiselina;
Tpi	- 2,3,4,9-tetrahidro-1H-pirido(3,4-b)indol-3-karboksilna kiselina;

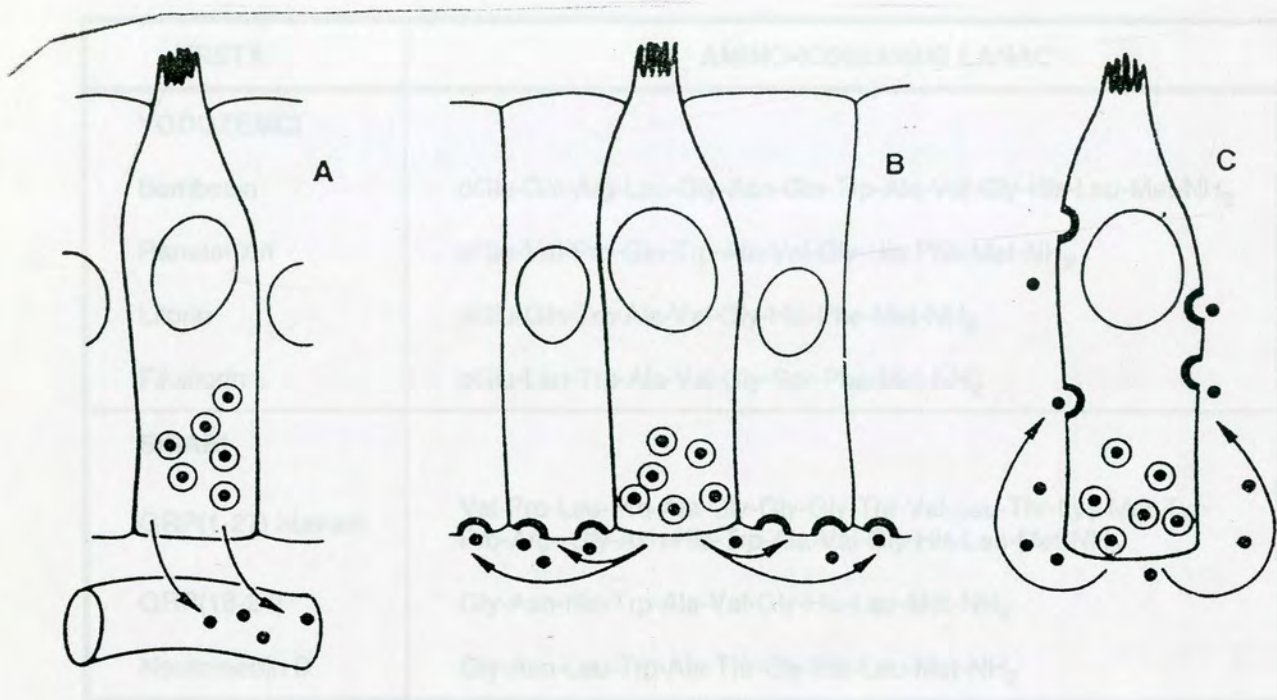


UVOD

U poslednjih 40 godina, od otkrića antimetabolita i alkilirajućih agenasa, farmakoterapija je donela zaista revolucionarni progres u terapiji malignih bolesti. Zahvaljući tome, danas su mnoge bolesti izlečive, uključujući akutnu limfocitnu leukemiju, Hodgkin-ovu bolest, karcinom testisa i dr. Ovakvi rezultati dalje su stimulisali istraživanja iz oblasti antineoplastičke farmakologije. To podrazumeva izolaciju novih lekova, njihovu hemijsku i biološku karakterizaciju i eksperimentalnu i kliničku upotrebu.

Posebno veliki izazov za istraživače širom sveta predstavlja identifikacija novih aktivnih lekova, sa jedinstvenim mehanizmom antitumorskog delovanja. Bazična istraživanja u biologiji tumora, pokazala su da maligne ćelije mogu biti stimulisane na nekontrolisano deljenje mnogim faktorima, tzv. faktorima rasta, koji potiču kako iz spoljašnje sredine tako i iz organizma obolele osobe. Mehanizam delovanja faktora rasta je jedan od osnovnih problema u biologiji, a njegovo razumevanje može biti ključni faktor za objašnjenje razloga za nekontrolisanu proliferaciju ćelija raka.

Neuropeptidi su peptidi kratkog lanca amino kiselina koji imaju regulatornu ulogu u homeostazi, a nalaze se u centralnom i perifernom nervnom sistemu kao i u pojedinim endokrinim ćelijama. Oni mogu delovati na postganglijske receptore (kao neurotransmiteri), na okolne ćelije (kao parakrini hormoni) ili na udaljene organe i tkiva (kao endokrini hormoni). Ustaljeno mišljenje o neuropeptidima, kao brzo-delujućim neurohumoralnim transmiterima, nedavno je dopunjeno otkrićem da su mnogi neuropeptidi istovremeno i faktori rasta za mnoge normalne ili maligne ćelije. U poslednjih nekoliko godina svedoci smo velikog interesa za ulogu bombezinu-sličnih peptida u onkologiji, kao i za razvoj snažnih, kompetitivnih antagonista bombezinskih receptora, zbog otkrića da bombezin predstavlja autokrini faktor rasta za mikrocelularni karcinom pluća (1). Na Slici 1. shematski su prikazani autokrini, parakrini i endokrini sekrecija.



Slika.1. Endokrina (A), parakrina (B) i autokrina (C) sekrecija. Regulatorni neuropeptid prikazan je crnim tačkama a zadebljana, polukružna mesta na ćelijskoj membrani označavaju receptore.

BIOLOŠKA ULOGA BOMBEZINA

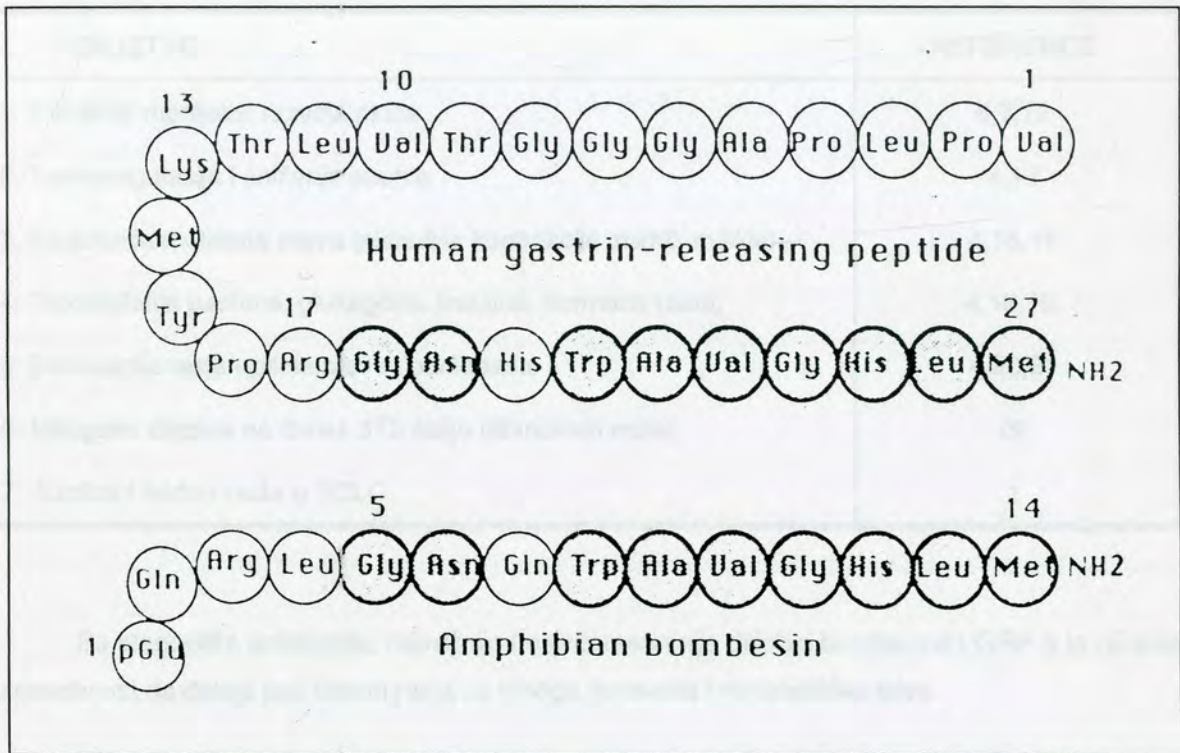
Bombezina je tetradekapeptid, izolovan iz kože žabe *Bombina bombina* od strane Erspamer-a i saradnika 1970. godine (2). U isto vreme, Nakajima i saradnici (3), opisali su strukturu sličnog peptida, kojeg su nazvali ranatenzin. Od tada, različiti peptidi sa strukturom karboksilnog dela (C-terminal) polipeptidne molekule slične bombezinu, pronađeni su i kod drugih vodozemaca, ptica, riba i sisara (Tabela 1).

Tabela 1. Peptidi iz familije bombezina.

VRSTA	AMINO-KISELINSKI LANAC
VODOZEMCI	
Bombezin	pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
Ranatenzin	pGlu-Val-Pro-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
Litorin	pGlu-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂
Filolitorin	pGlu-Leu-Trp-Ala-Val-Gly-Ser-Phe-Met-NH ₂
SISARI	
GRP(1-27) humani	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
GRP(18-27)	Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
Neuromedin B	Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Leu-Met-NH ₂

Tri podfamilije peptida sličnih bombezinu pronađeni su kod vodozemaca: bombezini, ranatenzini i filolitorini. Ovi peptidi karakterišu se prema zajedničkim amino kiselinama u blizini C-terminala molekule: Leu¹⁴, Phe¹⁴ i Ser¹³.

Jedno od prvih opisanih dejstava bombezina bila je njegova sposobnost da oslobađa gastrin (za revijski prikaz vidi referencu 4). Imunohistohemijske studije pokazale su široku rasprostranjenost bombezina u mozgu, plućima i gastrointestinalnom traktu sisara (5,6,7). McDonald i sar. (8,9) su 1979. god. izolovali su polipeptid od 27 amino kiselina sa sposobnošću da oslobađa gastrin iz želuca svinja, što je bio razlog da peptid nazovu "**peptid koji oslobađa gastrin**" (GRP, od "**gastrin releasing peptide**"). Danas je struktura GRP-a ustanovljena aminokiselinskim analizatorima (10) kao i kloniranjem molekula (11). Kako je dekaeptidni deo karboksilnog kraja molekule GRP-a identičan molekuli bombezina, smatra se da je GRP, ustvari, bombezin sisara. Jedina razlika između polipeptidnih lanaca GRP-a i bombezina je u tome što se kod GRP-a na poziciji 20 nalazi histidin za razliku od glutamina na poziciji 7 bombezina. Slika 2 ukazuje na sličnost molekula GRP-a i bombezina.



Slika. 2. Aminokiselinski niz humanog GRP i bombezina vodozemaca. Zajedničke aminokiseline su osenčene.

GRP je široko rasprostranjen u tkivima sisara, sa najvišom koncentracijom u neuroendokrinim ćelijama pluća, gastrointestinalnog trakta i mozgu, posebno hipotalamusu (12,13,14,15,16). Nekoliko studija ukazuju da je GRP parakrini medijator u razvoju pluća (6,7,12). Povišena GRP imunoreaktivnost pokazana je u različitim plućnim oboljenjima kao i kod pušača (za revijski pregled vidi referencu 16). U CNS-u, GRP reguliše telesnu temperaturu i apetit (4,17). Osnovne funkcije GRP-a u digestivnom traktu su regulacija motiliteta creva, oslobađanje različitih hormona, stimulacija enzimske sekrecije pankreasa kao i stimulacija rasta epitela creva i pankreasa (4,16,18,19,20,21). Na Tabeli 2 sumirana su biološka dejstva bombezina/GRP-a. Važno je napomenuti da su, bar za sada, biološke aktivnosti bombezina i GRP-a identične.

Tabela. 2. Najvažnija biološka dejstva bombezina i GRP-a.

DEJSTVO	REFERENCE
1. Parakrini medijator razvoja pluća	6,7,12
2. Termoregulacija i sniženje apetita	4,17
3. Regulacija motiliteta creva (stimuliše kontrakcije glatkih mišića)	4,15,16
4. Oslobođanje gastrina, glukagona, insulina, hormona rasta,	4,18,19,
5. Stimulacija rasta epitela creva i pankreasa	4,20,21
6. Mitogeno dejstvo na Swiss 3T3 ćelije (fibroblasti miša)	22
7. Autokrini faktori rasta u SCLC	1

Sa stanovišta onkologije, najvažnije i najinteresantnije dejstvo bombezina i GRP-a je njihova sposobnost da deluju kao faktori rasta za mnoga normalna i neoplastička tkiva.

Injekcije bombezina tek rođenim pacovima uzrokuje hiperplaziju mukoze antruma želuca, kao i hiperplaziju i hipertrofiju acinusa pankreasa (21). Nedavno je pokazano da bombezin snažno stimuliše *in vitro* rast MC-26 ćelija karcinoma kolona miša (23) i da ubrzava sintezu DNK Swiss 3T3 mišjih fibroblasta (22). U hranljivoj podlozi bez seruma u kojem rastu Swiss 3T3 ćelije, dodatak bombezina povećava sintezu DNK, ćelije se ubrzano dele, pa čak i u odsustvu nekih drugih agenasa koji stimulišu rast (22). Prema tome, bombezin deluje kao isključivi mitogen za Swiss 3T3 ćelije, što nije slučaj sa ostalim faktorima rasta koji su aktivni samo u sinergističkim kombinacijama (24). Sličan mitogeni efekt prema Swiss 3T3 ćelijama pokazan je i za GRP (25).

Bombezin i GRP stimulišu rast normalnih ćelija epitela bronha u kulturi (26), a već je spomenuto da imaju ulogu u razvoju pluća kod sisara (12).

Tumor jetre pacova, prouzrokovan hemijskim karcinogenom, odlikuje se povećanom sekrecijom bombezina (27).

Bombezin stimuliše *in vitro* rast PC3 i PMU23 humanih karcinoma prostate (28).

Isto tako, i neke ćelijske linije karcinoma dojke luče GRP (29), a moguća je i značajna uloga bombezina u razvoju karcinoma pankreasa (30).

Vežu između bombezina/GRP-a i mikrocelularnog karcinoma pluća (SCLC) prvi su otkrili Minna, Moody, Gazdar, Cuttita i njihovi saradnici 1985. god. Pokazali su da mnoge ćelijske linije SCLC izlučuju bombezinu slične peptide. Ovi peptidi, preko specifičnih receptora stimulišu rast istih ćelija koje su ih izlučile (1,31,32,33). Mitogenost GRP-a potvrđena je esejom formiranja kolonija korišćenjem nekoliko tipova ćelijskih linija SCLC (34). Inkorporacijom tricijumom obeleženog timidina u DNK ćelije, Weber i saradnici (35) pružili su jasan dokaz da je GRP selektivni mitogen za SCLC. Monoklonalna antitela usmerena protiv GRP-a inhibirala su rast kolonija ćelija SCLC *in vitro* kao i rast istih ćelija transplantiranih (ksenograftiranih) golim miševima (1). Šta više, prvi antagonist bombezina, (D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9}, Leu¹¹)supstancija P, sprečio je rast nekoliko SCLC ćelijskih linija *in vitro* (36).

Svi ovi nalazi bili su dovoljni za tvrdnju da je bombezina/GRP autokrini faktor rasta za SCLC. Karcinom pluća je, inače, i dalje najčešća maligna bolest u razvijenom svetu. Mikrocelularni tip karcinoma pluća čini 20-25% od ukupnog broja obolelih i odlikuje se agresivnim kliničkim tokom, uprkos početne hemosenzitivnosti. Poznavanje faktora rasta za SCLC, kao i sistema drugih glasnika u sprovođenju signala do intracelularnih struktura, može dovesti do sinteze novih lekova koji bi se koristili u prevenciji ili lečenju ove bolesti.

RECEPTORI ZA BOMBEZIN/GRP

Specifični receptori za bombezina i GRP izučavani su autoradiografskim i radioreceptorskim studijama (16,25). Vezivanje komercijalno dostupnog radioliganda (¹²⁵I)Tyr⁴-bombezina i (¹²⁵I)GRP-a (Amersham i New England Nuclear), može se inhibirati drugim bombezinu-sličnim peptidima ili različitim bombezinskim antagonistima, ali ne i strukturno različitim faktorima rasta kao što su EGF ili trombocitni faktor rasta (PDGF)(25). Experimenti umrežavanjem ("cross-linking"), korišćenjem (¹²⁵I)GRP-a, isto tako idu u prilog nalazu da se bombezina/GRP vezuje za specifične receptore velikog afiniteta na površini ćelija.

Mesta za vezivanje bombezina sa velikim afinitetom, jasno su pokazana receptorskim studijama na ćelijama hipofize (37), acinusima pankreasa glodara (38), membranama humanog pankreasa (39), karcinoma kolona miša (23), Swiss 3T3 ćelijama, kako intaktnim tako i membranama (25), ćelijskim linijama SCLC (40), ćelijskim linijama humanog karcinoma prostate (28) kao i ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke, ali ne i u normalnom tkivu dojke (29).

Fizičke osobine bombezinskih/GRP receptora najviše su izučavane na Swiss 3T3 ćelijama od strane Rozengurt-a i saradnika (41,42).

Receptor za bombezina je glikoprotein, molekulske mase 75 000-85 000, sa jednim bočnim karbohidratnim lancem vezanim za atom azota i ukupnom masom polipeptidnog dela molekule od oko 43 000. Relativno mala masa peptidnog dela bombezinskog receptora, razlikuje ga od specifičnih receptora za većinu drugih faktora rasta (na pr. EGF, PDGF), ali ga ipak svrstava u familiju receptora koji šalju svoje signale u unutrašnjost ćelije preko G proteina.

Vezivanje faktora rasta za specifične receptore započinje stvaranje ranih signala u ćelijskoj membrani, citosolu i nukleusu koji, posle perioda od 10 do 15 časova, vode proliferaciji ćelija. Sistem drugih glasnika koji sprovode aktivaciju ćelije bombezinom detaljno je izučavan na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama (za revijski prikaz vidi referencu 43). Bombezina, posle vezivanja za receptor i internalizacije kompleksa bombezina-receptor, stimuliše fosforilaciju kiselog ćelijskog proteina mase 80K, koji je glavni supstrat proteinske kinaze C (PKC). PKC, koju aktiviraju diacilglicerol i forbol estri, učestvuje u prenošenju signala kod različitih funkcija ćelije, kao što su kontrakcija ili sekrecija (44). Smatra se da je aktivacija PKC osnovni put sprovođenja signala koji vode mitogenezi (24). Isto tako, pokazano je da je jedan od najranijih događaja koji su opisani posle vezivanja bombezina za receptor brza mobilizacija jona kalcijuma iz intracelularnih depoa, što vodi porastu koncentracije slobodnog jona kalcijuma u ćeliji (45). Mobilizacija intracelularnog kalcijuma verovatno nastaje posredovanjem inozitol 1,4,5-trifosfata, koji nastaje hidrolizom fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata u ćelijskoj membrani, procesom kojim nastaje i 1,2-diacilglicerol. Diacilglicerol se, sa druge strane, pojavljuje i kao "drugi glasnik" posle aktivacije PKC bombezinom. Od ostalih intracelularnih događaja koji nastaju kao posledica dejstva bombezina vredi spomenuti i akumulaciju cAMP-a, oslobađanje arahidonske kiseline i sintezu prostaglandina, transmodulaciju EGF receptora, influks jona natrijuma, stimulacija natrijum/kalijum jonske pumpe, povećanje nivoa mRNA za c-fos i c-myc tj. indukcija protoonkogeni i dr. (43).

Nedavno je receptor za bombezina kloniran (46), što će verovatno doprineti rasvetljenju ranijih sumnji o heterogenosti bombezinskih receptora. Prvi put su dve vrste receptora za bombezina opisane na membranama karcinoma kolona miša (23). Von Shrenk i saradnici su 1990.god. pokazali razliku između receptora za neuromedin B (jedan iz familije bombezinu-sličnih peptida) i receptora za bombezina/GRP (47). Naime, neuromedin B receptori nalaze se prvenstveno u centralnom nervnom sistemu i različitim glatkim mišićima gastrointestinalnog trakta, a receptori za bombezina/GRP prisutni su u tkivu pankreasa kao i na maligno promenjenim ćelijama. Napori

istraživača su usmereni ka sintezi specifičnih antagonista ne samo za bombezinski receptor već i za receptor za neuromedin B.

ANTAGONISTI BOMBEZINA

Otkriće da je bombezin/GRP autokrini faktor rasta za mikrocelularni karcinom pluća, stimulisalo je istraživanja hormonskog pristupa terapiji ove bolesti upotrebom specifičnih bombezinskih antagonista.

Sinteza antagonista bombezina bazira na modulaciji tetradekapeptidne strukture bombezina vodozemaca, COOH-terminala aminokiselinskog niza GRP-a sisara ili na nekim peptidima kratkog lanca.

Mnogi tipovi antagonista bombezina su već sintetisani, ali se nastavljaju naponi za dobijanje što snažnijih i terapijski što efikasnijih jedinjenja. Noviji antagonisti bi trebalo da budu specifični za ćelije SCLC sa što je moguće manje neželjenih dejstava. Od ovih jedinjenja se očekuje primena i u terapiji karcinoma kolona, želuca i pankreasa.

Antagonisti bombezina se dele u četiri grupe: 1. Analoz supstancije P, 2. Antagonisti sa aminokiselinom D-Phe na poziciji 12 bombezina, 3. Antagonisti sa redukovanom peptidnom vezom i 4. Des-Met¹⁴ antagonisti bombezina.

Najraniji antagonisti bombezina bili su analoz supstancije P (26,36,47,48,49). Ovi antagonisti (Tabela 3), specifično i kompetitivno inhibišu vezivanje bombezina za ćelije mozga pacova i ćelije SCLC i suprimiraju sekreciju amilaze uzrokovanu bombezinom iz acinusa pankreasa, inhibišu mitogenezu Swiss 3T3 ćelija stimulisanu bombezinom i formiranje kolonija SCLC *in vitro* (26,36,47,48,49). Međutim, analoz supstancije P delovali su i kao antagonisti receptora za Supstancu P tj. nisu bili specifični antagonisti bombezinskih receptora, bili su aktivni tek u mikromolarnim koncentracijama, a nisu bili u stanju da inhibiraju pojedina dejstva bombezina, na primer stimulisanu sekrecije želuca (49, 50).

Druga klasa antagonista bombezina nastala je zamenom histidina na poziciji 12 u molekuli bombezina D-oblikom fenilalanina. Iako su tako nastali specifični antagonisti za bombezinske

receptore, oni su ipak bili oko 2 000 puta manjeg afiniteta od samog bombezina i bili su teško rastvorljivi u dostupnim rastvaračima (51, 52).

Prvi specifični, kompetitivni i snažni antagonisti bombezina nastali su kada se odustalo od jednostavnih izmena amino kiselina u lancu polipeptida, već se pokušalo sa izmenom tipa peptidnih veza u molekuli. Tako je nastao (Leu¹⁴,ψ¹³⁻¹⁴)bombezina gde je Met¹⁴, koji je veoma podložan oksidaciji, zamenjen sa Leu, a CONH peptidna veza između pozicija 13 i 14 zamenjena vezom CH₂NH, koja se naziva i redukovana peptidna veza ili pseudopeptidna veza (53,54). Analog [Leu¹³,ψ(CH₂NH)Leu¹⁴]-bombezina bio je prvi antagonist bombezina aktivan u nanomolarnim koncentracijama (53). Ubrzo su sintetisani antagonisti sa pseudopeptidnom vezom ali kraćeg lanca, bombezina (6-14) analozi (Tabela 3). Prednost bombezinskih antagonista kraćeg lanca bila je u tome što imaju manje mesta za proteolizu u slučaju da se daju intravenski (54). Slične izmene u molekuli GRP-a dale su, isto tako, analoge sa snažnom antagonističkom aktivnošću. Naime, zamenom CONH grupe na mestu 26-27 u molekuli GRP-a etarskom vezom CH₂O, dobijen je snažan antagonist Ac-GRP(20-27) (55).

Najnovija grupa antagonista jeste grupa des-Met¹⁴-bombezinskih antagonista tj. bombezina(6-13) oktapeptidi ili GRP(20-26) heptapeptidi (56,57,58,59). Ovi analozi su jednostavni za sintezu, a pripadaju grupi snažnih antagonista aktivnih u nanomolarnim koncentracijama. Pretpostavlja se da su des-Met¹⁴-bombezinski antagonisti rezistentniji na enzimsku degradaciju pa, samim tim, i dužeg polživota u cirkulaciji. Osnovne četiri klase antagonista bombezina prikazuje Tabela 3.

Redni broj	Struktura	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (pM)
1	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₁₂ -NH ₂	100	100	100	100
2	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₁₁ -NH ₂	100	100	100	100
3	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₁₀ -NH ₂	100	100	100	100
4	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₉ -NH ₂	100	100	100	100
5	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₈ -NH ₂	100	100	100	100
6	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₇ -NH ₂	100	100	100	100
7	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₆ -NH ₂	100	100	100	100
8	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₅ -NH ₂	100	100	100	100
9	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₄ -NH ₂	100	100	100	100
10	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₃ -NH ₂	100	100	100	100
11	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₂ -NH ₂	100	100	100	100
12	Leu ¹⁴ ,ψ ¹³⁻¹⁴ -(Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴) ₁₋₁ -NH ₂	100	100	100	100

Tabela. 3. Različiti tipovi antagonista bombezina/GRP-a.

Tip	Struktura tipičnog predstavnika	Aktivnost ¹ ≈ IC ₅₀	Karakteristike
Analozi supstancije P	(D-Arg ¹ ,D-Pro ² ,D-Trp ^{7,9} ,Leu ¹¹)Sup.P (D-Arg ¹ ,D-Phe ⁵ ,D-Trp ^{7,9} ,Leu ¹¹)Sup.P	0.5-7 μM	Istovremeno i antagonisti supstancije P
D-Phe ¹² - bombezin	(D-Phe ¹²)BN (Tyr ⁴ ,D-Phe ¹²)BN (D-Phe ¹² ,Leu ¹⁴)BN	4 μM	Specifični, slabo rastvorljivi, ne uvek aktivni, afinitet 2000 puta niži od BN
Antagonisti sa redukovanom peptidnom vezom	[Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴]BN [Leu ¹³ ,ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴]BN(6-14) [D-Phe ⁶ ,ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴]BN(6-14) [D-Trp ⁶ ,ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴]BN(6-14) [D-Trp ⁶ ,ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴]BN(6-14) [D-Trp ⁶ ,ψ(CH ₂ NH)Tpi ¹⁴]BN(6-14) Ac-GRP(20-27)	0.6-50 nM	Snažni, specifični, komplikovani za sintezu, manje mesta za proteolitičku degradaciju
des-Met ¹⁴ - bombezinski antagonisti	(N-acetyl)GRP(20-26) etilester (D-Phe ⁶)BN(6-13) etilester (D-Phe ⁶)BN(6-13) propilamid (4-piridil-CO-D-Ala ²³ ,Lys ²⁴) GRP(19-26)	4 nM 5 nM 1 nM 0.2 nM	Najaktivniji, specifični.

¹Analozi su testirani kompetitivnim receptorskim studijama na Swiss 3T3, SCLC ćelijama i na acinusima pankreasa, ili na inhibiciju inkorporacije tricijumom obeleženog timidina u DNK Swiss 3T3 ćelija stimulisane bombezinom (BN) ili inhibiciju oslobađanja amilaze iz acinusa pankreasa. IC₅₀ označava koncentraciju peptida koja za 50% inhibiše efekt bombezina.

CILJ RADA

Različitim promenama u strukturi aminokiselinskog lanca bombezina ili GRP-a, sintetisano je preko 50 analoga. Ovaj rad sastojao se od procene biološke aktivnosti nastalih jedinjenja i imao nekoliko ciljeva:

1. Da se pronađu i uspostave jednostavne, reproducibilne metode za ocenu biološke aktivnosti bombezinskih analoga ("screening").
2. Da se utvrdi koji su tipovi bombezinskih analoga najaktivniji u smislu njihovog antagonističkog delovanja prema efektima bombezina ili GRP-a. Imajući u vidu originalnost hemijske strukture, mogućnost buduće sinteze u industrijskim uslovima, kao i mogućnost patentne zaštite, izabrati analog koji će biti ispitan na rast tumorskih ćelija *in vitro* kao i na različitim *in vivo* tumorskim modelima.
3.
 - a) Ispitati antitumorski efekt bombezinskih antagonista na rast kancerskih ćelija *in vitro*,
 - b) Utvrditi da li izabrani antagonisti bombezina imaju antitumorsku aktivnost *in vivo*, i u kojim eksperimentalnim modelima. Terapijski efekt antagonista bombezina proveriti, pre svega, na eksperimentalnim modelima onih karcinoma kod kojih bi se moglo očekivati delovanje s obzirom na moguću ulogu bombezina/GRP-a u njihovom nastanku.
4. Ispitati moguć mehanizam antitumorskog delovanja antagonista bombezina. Ispitati direktne efekte na tumorske ćelije kao i efekte na druge faktore rasta važne za rast pojedinih tumora.

Svi postavljene ciljevi vodili su, u stvari, ka jedinstvenom, krajnjem cilju, a to je da se na osnovu svih rezultata izabere lek-kandidat za dalja toksikološka ispitivanja, razvoj industrijskog sintetskog postupka i prvu fazu kliničkog ispitivanja.

MATERIJAL I METODE

U ovom radu korišćene su brojne *in vitro* i *in vivo* studije. Vrstu metode, na čemu je ona izvođena kao i cilj ispitivanja koji se želeo postići prikazuje Tabela 4.

IN VITRO EKSPERIMENTI

SINTEZA I IZOLACIJA ANALOGA BOMBEZINA/GRP-A

Analozi bombezina sintetisani su u našoj laboratoriji (sve analoge sintetisao je Dr R.-Z Cai) standardnom metodom za sintezu polipeptida, u čvrstoj fazi na benzhidrilaminskoj osnovi (BHA)(Advanced Chem. Tech.). Novosintetisana jedinjenja dobijala su određeni identifikacioni laboratorijski broj (šifru). Redukcija peptidne veze ostvarena je reduktivnom alkilacijom (Sasaki and Coy, 1987) (60). Odvajanje sintetisane supstancije od BHA osnove rađena je sa 50% trifluorosirćetnom kiselinom u CH_2Cl_2 u prisustvu 2-merkaptoetanolu i anizola. Posle formiranja redukovane peptidne veze, sve reakcije vezivanja amino kiselina obavljane su metodom aktivnih estara korišćenjem 1,3-diizopropilkarbodiimida i N-hidroksibenzotriazola.

Analozi koji sadrže Tpi (2,3,4,9 tetrahydro-1H-pirido (3,4-b) indol-3-karboksilna kiselina), sintetisani su standardnom metodom u čvrstoj fazi posle formiranja Boc-Leu ψ (CH_2N)Tpi-BHA iz Leu ψ (CH_2N)Trp-BHA reakcijom sa formaldehidom. Većina N^α -Boc- amino kiselina nabavljane su od Bachem-a, osim Boc-Leu i Boc-D-Tpi koji su sintetisani u našoj laboratoriji. Sirovi sintetisani materijal je ekstrahovan od nosača uz pomoć 80% sirćetne kiseline i pročišćen HPLC-om. U kasnijim, *in vivo* studijama analog RC-3095 sintetisan je u Asta-Pharma Frankfurt (Nemačka). GRP(41-27) sintetisan je na sličan način kao i analozi.

HPLC prečišćavanje vršeno je na Beckman HPLC sistemu korišćenjem Dynamax makrokolone (21.2 x 250 mm) punjene sa sfernim C18 silikagelom (veličina pora 300 Å, 12 μm veličine čestica) ili na Vydac protein ili peptid C18 koloni (10 x 250 mm) veličine pora 300 Å, 5 μm veličine čestica. Ispiranje je obavljano rastvaračima koji su se sastojali od komponente A i B sledećeg sastava:

Tabela 4. Metode korišćene za ispitivanje biološke aktivnosti sintetisanih antagonista bombezina.

Metoda	Na čemu je izvođena	Cilj ispitivanja
<i>In vitro</i>		
-Sinteza i izolacija antagonista	Standardna metoda na BHA osnovi	Dobijanje specifičnih antagonista BN
-Receptorske studije	Swiss 3T3 fibroblasti miša H-345 ćelijska linija SCLC Membrane humanih i eksperimentalnih tumora	Utvrđiti postojanje receptora za BN i odrediti afinitet vezivanja za te receptore (odrediti IC ₅₀)
-Analize mitogeneze a) obeleženim tricijumom b) proliferacija ćelija c) formiranje kolonija	Swiss 3T3, MCF-7, MDA-MB-231 H-345 H-345	Pokazati mitogeni efekt BN. Odrediti veličinu inhibitorynog dejstva antagonista na proliferaciju ispitivanih ćelija
-Superfuzija	Izolovani acinusi pankreasa pacova	Ispitati efekt BN i GRP na oslobađanje amilaze iz acinusa, kao i ispitati efekte antagonista
<i>In vivo</i>		
-Endokrini efekti antagonista	Pacovi	Ispitati endokrine efekte BN, GRP i njihovih antagonista na nivoe različitih hormona u serumu pacova
-Antitumorska aktivnost a) humani tumori kolona, dojke i prostate b) MXT karcinom miša c) karcinom pankreasa hrčka	Goli miševi (HT-29, MCF-7MIII, PC-82 tumori) Karcinom dojke miša Hemijski indukovani karcinom pankreasa hrčka	Ispitati antitumorsku aktivnost antagonista BN prema različitim humanim i eksperimentalnim tumorima

- sistem A, 0.1% trifluorosirćetna kiselina;
- sistem B, 0.1% trifluorosirćetna kiselina u 70% tečnom acetonitrilu.

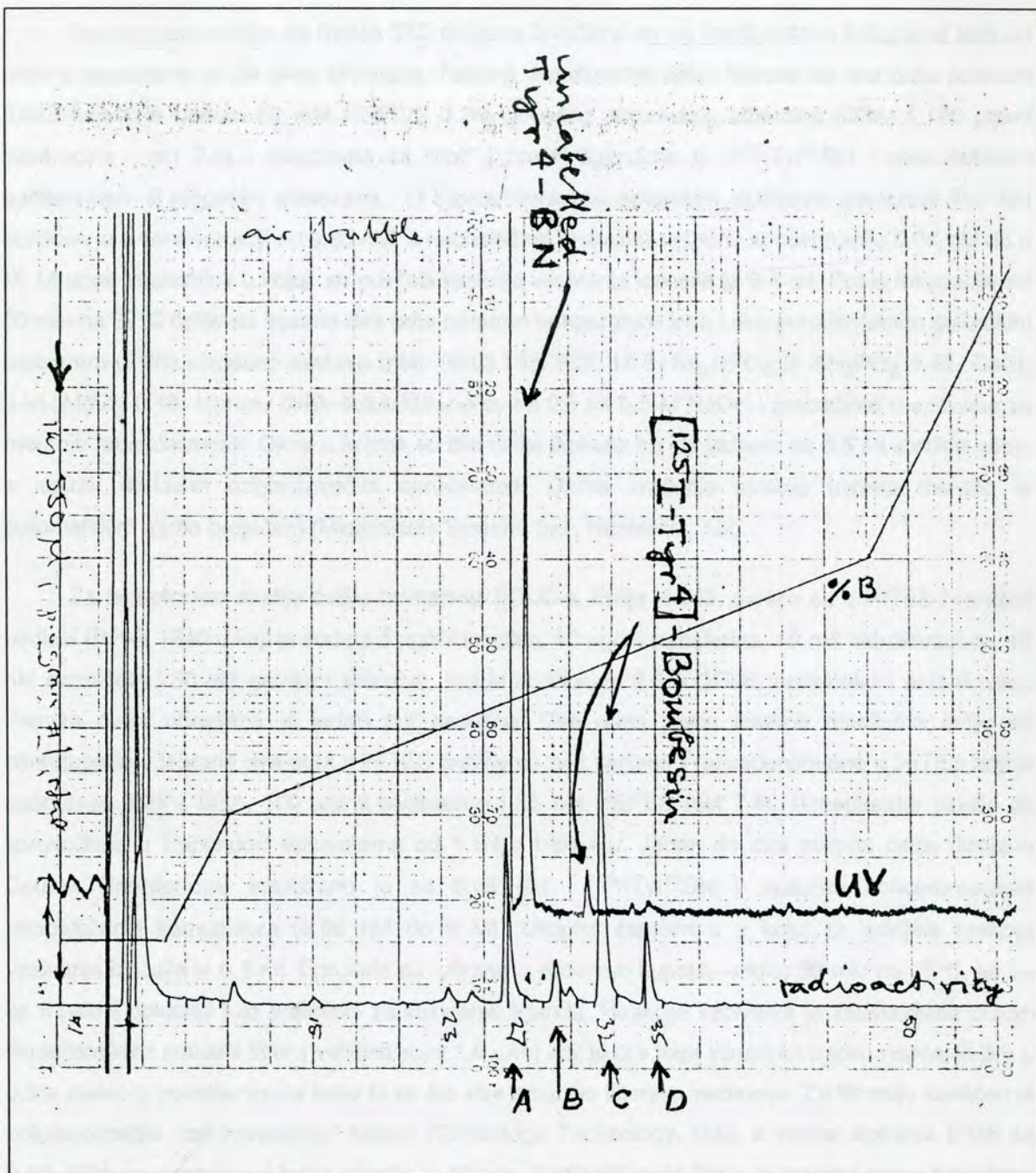
Analitička HPLC separacija je sprovedena na tečnom hromatografu (Hewlett-Packard, model HP-1090) korišćenjem 4.6 x 250 mm W-porex 5 μ M C18 kolone (Phenomenex, Rancho Palos Verdes, CA). Ispiranje sa ovakvim rastvaračima obavljano je uz protok od 1.2 ml/min.

Za analizu aminokiselina uzorci su hidrolizovani na 110°C u toku 20 h u zatvorenim epruvetama koje su sadržavale 4 M metansulfonske kiseline i 0.2% 3-(2-amnoetil)indola. Analiza je obavljana na aminokiselinskom analizatoru (Beckman 6300).

RECEPTORSKE STUDIJE

Receptorske studije rađene su najčešće na ćelijskim linijama u kulturi: Swiss 3T3 fibroblasti (ćelije rastu pričvršćene za dno suda) i humana SCLC ćelijska linija H-345 (raste u suspenziji), zatim na membranama uzoraka tumora, kako sveže dobijenih posle hirurške intervencije, tako i na tumorima uzetih sa eksperimentalnih životinja.

Kao obeleženi ligand korišćen je (Tyr⁴)bombezin, sintetisan u našoj laboratoriji. Jodinacija je sprovedena na sledeći način: 2 μ g Tyr⁴-BN u 40 μ l 0.5 M fosfatnog pufera pomešano je sa 1 mCi Na(susp/125/I) (Amersham, Arlington Heights, IL) i sa 1 μ g hloramin-T-a. Posle 60 sec inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je zaustavljena dodavanjem 2.1 μ g natrijum metabisulfitu i smeša je razblažena dva puta sa 500 μ l 0.05 M fosfatnog pufera koji je sadržao 10% acetonitrila. Obeleženi hormon je pročišćen HPLC-om. Mešavina sastavljena od 0.2% trifluorosirćetne kiseline (TFA) u vodi (rastvarač A) i 0.1% TFA u 70% vodenom acetonitrilu (rastvarač B) korišćena je uz protok od 1.2 ml/min i linearni gradijent (20-100% B). Frakcije (0.6 ml) su sakupljane svakih pola minuta. Radioaktivnost efluenta praćena je detektorom (OCDM CDV-700) i zapisivana na dvokanalnom štampaču (LKB). Ovakav metod je uspešno razdvajao mono- od dijodiranog peptida (Slika 3). Za receptorske studije korišćen je monodjodirani peptid koji je eluirao na 64% rastvarača B. Posle isparavanja acetonitrila iz frakcija koje su sadržavale obeleženi ligand, u njih je dodavan ditiotretol i uzorci su neutralisani fosfatnim puferom 0.5 M. Specifična aktivnost obeleženog Tyr⁴-BN iznosila je 1400-1700 Ci/mmol. Obeleženi ligand čuvan je na -70°C i iskorištavan u roku od 30 dana.



Slika 3. HPLC separacija monojodiranog i diiodiranog Tyr⁴-bombezina.

Ćelije mišjih fibroblasta, Swiss 3T3, gajene su u Dulbecco modified Eagle hranljivoj podlozi (DME) uz dodatak 10% goveđeg seruma bez kolostruma (CFBS) i uz dodatak antibiotika i antimikotika. Pasaža kultura obavljena je jednom nedeljno, a ćelije su održavane u atmosferi 5% CO₂ u vazduhu na 37°C.

Receptorske studije sa **Swiss 3T3** ćelijama izvođene su na konfluentnim kulturama koje su rasle u posudama sa 24 okna (Primaria, Falcon). Konfluentne ćelije isprane su dva puta puferom (DME kojem je dodato 20 mM HEPES, 0.2% goveđeg serumskog albumina (BSA) i 100 µg/ml bacitracina - pH 7.4) i inkubirane sa "hot" i "cold" ligandima tj. ^{125}I -Tyr⁴-BN i neobebeženim bombezinom ili njegovim analogima. U kompetitivnim receptorskim studijama obeleženi Tyr⁴-BN korišćen je u koncentraciji od 0.05 nM, a neobebeženi analozi u rasponu koncentracija 0.06 nM do 6 M. Ukupna zapremina u kojoj se odvijala reakcija vezivanja iznosila je 0.4 ml. Posle inkubacije od 30 min na 37°C ćelije su isprane dva puta puferom temperature leda i dva puta fosfatnim puferskim rastvorom (PBS) sledećeg sastava (mM): NaCl 138, KCl 12.8, Na₂HPO₄ 8, KH₂PO₄ 1.45, CaCl₂ 0.91, MgCl₂ 0.49. Isprane ćelije solubilizirane su sa 0.5 ml 0.5 M NaOH i prebačene u epruvete za merenje radioaktivnosti. Okna u kojima su bile ćelije ispirana su još jednom sa 0.5 ml sterilne vode, a ispirak dodavan odgovarajućim epruvetama. Gama zračenje svakog uzorka mereno je automatskim gama brojačem (Micromedic System, Inc., Huntsville, Ala).

Za receptorske studije **ćelije humanog SCLC-a, linija H-345**, gajene su u HITES hranljivoj podlozi (RPMI 1640 u koji je dodato 5 µg/ml insulina, 10 µg/ml transferina, 10 nM hidrokortizona, 10 nM estradiola i 30 nM natrijum selenita), koji je sadržavao 2.5% CFBS, antibiotike i antimikotike. Pasaža ćelija obavljena je jedan put nedeljno. Dva dana posle izmene medijuma ćeliju su centrifugirane, isprane dva puta u HITES medijumu bez seruma i resuspendovane u HITES koji je sadržavao 0.25% BSA, 100 µg/ml bacitracina i 25 mM HEPES (pH 7.4). Receptorske studije su sprovedene u Eppendorf epruvetama od 1 ml u triplikatu. Jedan do dva miliona ćelija (brojano Coulter Counter-om) inkubirano je sa 0.08 nM ^{125}I (Tyr⁴)BN i rastućim koncentracijama neobebeženih kompetitora (0.06 nM do 6 M). Ukupna zapremina u kojoj se odvijala reakcija vezivanja iznosila je 0.8 ml. Epruvete su rotirane u vodenom kupatilu u toku 30 min na 25°C, jer su se ti uslovi pokazali kao optimalni za vezivanje liganda. Reakcija vezivanja je zaustavljena brзом filtracijom kroz stakleni filter (veličina pora 1.0 µm) koji je pre toga inkubiran u toku najmanje 3 h u 0.5% rastvoru polietilenimina kako bi se što više smanjilo filtersko vezivanje. Za filtraciju korišćen je poluautomatski "cell-harvesting" sistem (Cambridge Technology, MA), a vreme ispiranja (PBS sa 0.1% BSA na temperaturi leda) iznosilo je 10 sec. Radioaktivnost filtera je merena gama brojačem. Sve hemikalije za pufere kupovane su od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Receptorske studije na **membranama uzoraka humanih ili eksperimentalnih tumora** rađene su u ukupnom volumenu od 150 µl u rastvoru čiji je sastav bio sledeći: PBS sa 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, bacitracin 1 µg/ml i 0.1% BSA, pH 7.4. Membrane (50 µl) su inkubirane sa obebeženim i neobebeženim peptidima 60 min na 21°C a separacija vezanog od nevezanog liganda vršena filtracijom kroz staklene filtere kao što je ranije opisano. Uzorci tumora dobijani su na suvom

ledu (posle hirurške intervencije) ili su čuvani na -70°C do trenutka kada su izdvajane ćelijske membrane. Uzorci su čišćeni od masti i vezivnog tkiva, isecani na manje delove, i homogenizovani u 5 volumena saharoznog pufera (0.3 M saharoze, 25 mM tris baze, 0.25 mM fenilmetilsulfonil fluorida, 1 mM EGTA, 10 mM monotioglicerola i aprotinina (Trasyol) u koncentraciji od 10 000 kalikreinskih jedinica na litar, pH 7.5) korišćenjem Ultra-Turrax homogenizatora (Tissumizer, Tekmar, Cincinnati, OH) sa maksimalnom brzinom 5x5 sec na 0°C . Homogenat je centrifugiran na 500 x g, 10 min na 4°C . Supernatant, koji sadrži membrane, je ultracentrifugiran na 70 000 x g, 45 min na 4°C (Beckman Preparative Ultracentrifuge, Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA). Nastali talog je resuspendovan u rastvor identičnog sastava rastvoru u kojem se odvijalo vezivanje, ali bez BSA-a.

Ligand-PC kompjuterski program Munson-a i Rodbard-a (61) korišćen je za određivanje tipa vezivanja, konstante disocijacije (K_D), kao i maksimalnog kapaciteta vezivanja tj. broja receptora (B_{max}).

MITOGENE ANALIZE

1. Inhibicija inkorporacije obeleženog timidina u DNK ćelija

Fibroblasti miša, Swiss 3T3 ćelije, zasejavane su u posudama sa 96 polja (Costar) u količini od 5×10^3 ćelija/polje. Ćelije su ostavljene da rastu 5 dana kako bi postale konfluentne. Na kraju perioda od 5 dana ćelije su ispirane dva puta, peptidi su dodavani u zapremini od 25 μl pomešani sa 100 μl DME medijuma koji je sadržavao 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA i 1 $\mu\text{Ci/polje}$ (metil- ^3H)-timidina, specifične aktivnosti 5 Ci/mmol (Amersham). Posle 48 h ćelije su izlagane tripsinom i prikupljane poluautomatskim ćelijskim harvesterom (Cambridge Technologies, Watertown, MA). Svaki eksperiment je rađen u triplikatu.

Serijski eksperimenti su urađeni sa tri ćelijske linije humanog karcinoma dojke: MCF-7, MCF-7 MIII i MDA-MB-231. Oko 5 000 ćelija posejano je u svako od 96 okana Falcon posuda. Posle 48 h, medijum je zamenjen medijumom koji je sadržavao 0.5% FBS i različite koncentracije bombesinskih antagonista. Posle sledećih 48 h, medijum je ponovo promenjen i dodato je 0.5 $\mu\text{Ci/polje}$ (metil- ^3H)-timidina. Posle inkubacije od 4 h, ćelije su dva puta isprane fiziološkim rastvorom i tri puta sa 10% trihlorosirćetnom kiselinom na 4°C . Precipitat je rastvaran u 1 N NaOH i neutralisan sa 10% sirćetne kiselinom. Radioaktivnost je merena u scintilacionom beta brojaču.

Cilj ovih eksperimenata bio je da se utvrdi da li bombesin ili GRP stimulišu rast ispitivanih ćelija *in vitro*, kao i se utvrdi da li naši antagonisti mogu blokirati efekt bombesina ili GRP-a.

2. Inhibicija proliferacije ćelija

U jednoj grupi eksperimenata korišćena je SCLC ćelijska linija H-345. Dve stotine hiljada ćelija na ml zasađivano je u 5 ml posudama i inkubirano u HITES hranljivoj podlozi uz 2.5% CFBS u toku 8 dana u prisustvu ili odsustvu peptida. Posle 8 dana inkubacije grupe ćelija razbijane su pasažom kroz sterilne igle od 18-22 G a broj ćelija je određivan Coulter brojačem.

Posebna serija eksperimenata urađena je sa ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke: MCF-7, MCF-7 MIII i MDA-MB-231. MCF-7 i MCF-7 MIII linije dobijene su od Dr. R. Clarke-a (Georgetown University Medical Center, Washington, DC). MDA-MB-231 kupljena je od American Type Culture Collection (Rockville, MD). MCF-7 su održavane u DME hranljivoj podlozi sa fenolskim crvenom i 5% FBS. MCF-7 MIII i MDA-MB-231 su rasle u istom medijumu bez fenol-crvenog ili u medijumu sa prethodno posebno tretiranim FBS. Naime, FBS je pomešan sa 0.5% (težina/volumen) Norit A aktivnim ugljem uz dodatak 0.05% dekstrana. Smeša je stajala na 4°C tokom 12 h, a zatim centrifugirana 20 min na 20 000 x g. Supernatant je inkubiran na 56°C 30 min, a zatim je filtriran kroz 0.22 µm najlonski filter.

Ćelije iz 70-80% konfluentnih kultura posejane su u sudove sa 24 okna u gustini od 104 ćelija po oknu. Posle 48 h hranljiva podloga je zamenjena svežom, ali koja je sadržavala bombesin ili analoge bombesina. Posle dva dana podloga je opet promenjena, a 4. dana ćelije su odvajane od podloge tripsinizacijom i brojane u Coulter Counter-u.

Cilj ovih eksperimenata bio je da se utvrdi da li dodatak bombesina ili GRP-a u hranljivoj podlozi stimuliše rast ispitivanih ćelija, kao i kakav je efekt dodavanja naših antagonista bombesina u hranljivu podlogu na rast ispitivanih malignih ćelija.

3. Formiranje kolonija

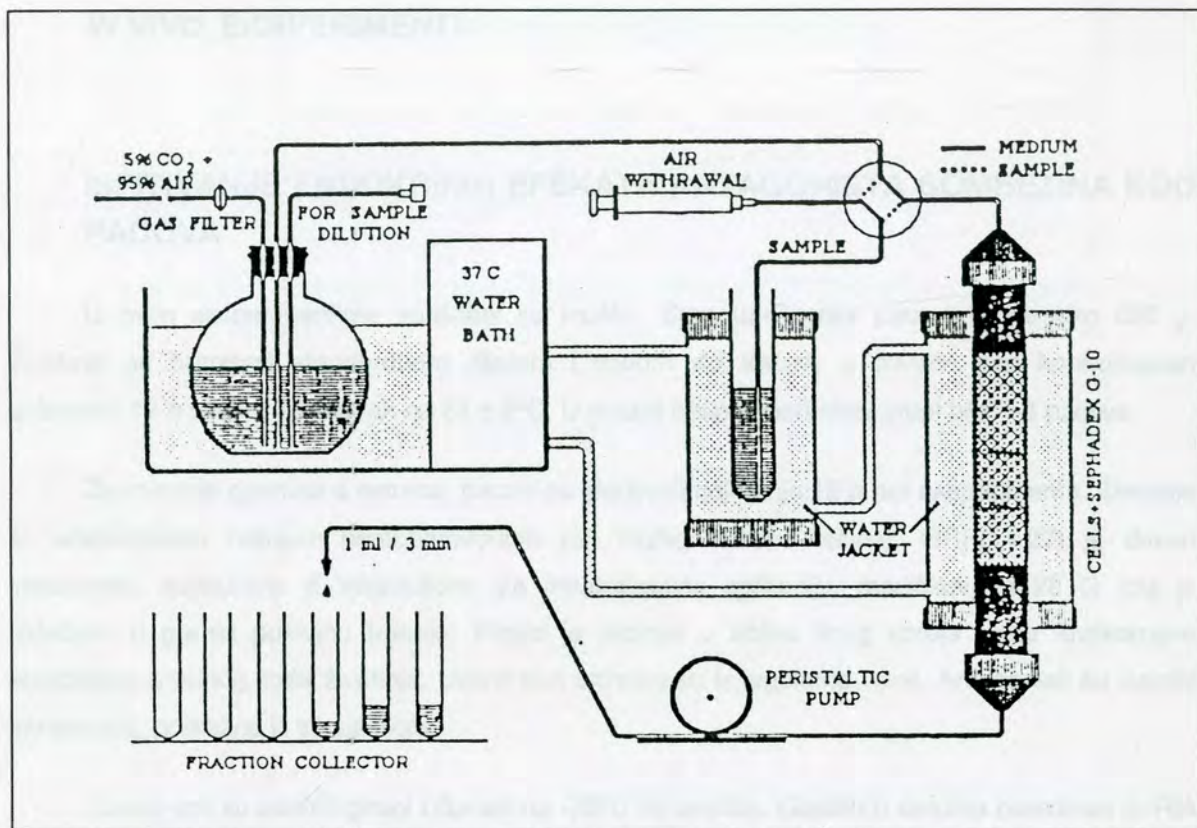
Ćelije H-345 isprane su dva puta, resuspendovane u HITES pomešan sa 0.3% agaroze i zasađene preko osnove od 0.6% agaroze u Petrijevim šoljama prečnika 35 mm. Mikroskopski je proveravano da li su zasađene samo pojedinačne ćelije. Ćelije su inkubirane uz prisustvo ili

odsustvo (kontrola) peptida u toku 3 nedelje, kada su kolonije obeležene bojom radi lakšeg brojanja. Brojane su samo kolonije veće od ili jednake 0.2 mm .

SUPERFUZIONA ANALIZA

Mladim (200-300 g) pacovima oba pola vrste Sprague-Dawley, koji su gladovali preko noći, odsecana je glava i pankreas brzo izvađen. Tkivo je inicirano nekoliko puta sa 5 ml "enzimskog rastvora" (Medium 199, 1% kolagenaza tip I 162 jedinice/mg, 0.25% BSA RIA stepena čistoće, antibiotici) korišćenjem 26 G igle. Tkivo pankreasa je zatim inkubirano 45 min u Dubnoff inkubatoru u zapremini od 5 ml enzimskog rastvora kojem je dodat 0.03% (w/v) bacitracin, 0.01% (w/v) inhibitor tripsina i 15 nM HEPES-a. U toku inkubacije tkivo je perfundovano sa 95% O₂ i 5% CO₂ i rotirano sa 120 oscilacija u minuti na 37°C. Inkubacija je još jednom ponavljana, u istom rastvoru ali uz dodatak 50 µM fenilmetansulfonilfluorid. Posle druge inkubacije tkivo se lako dispergovalo pasažom (10-20 puta) kroz 5 ml pipetu i filtriralo kroz 200 µm Nitex gazu. Deo acinusa je izvađen za brojanje na hemocitometru a viabilnost određivana tripanskim plavilom.

Aparat za superfuziju konstruisan je u laboratoriji i shematski prikazan na Slici 4. Acinusi pankreasa smeštani su u sefadeks G-10 pa u 2 ml komoru superfuzionog aparata perfundovanu oksigenisanom hranljivom podlogom. Protok rastvora iznosio je 1.5 ml na 3 min, kontrolisan peristaltičkom pumpom (Gilson Minipulse HP-8). Frakcije su sakupljane u trominutnim intervalima. Preliminarni eksperimenti ukazali su da je dvočasovna preinkubacija acinusa bila neophodna, kako bi se osigurao stalan nivo oslobađanja amilaze iz preparata. Acinusi su bili u kontaktu sa agonistima 3 min a antagonistima 9 min pa zajedno sa agonistom još 3 min. Na kraju eksperimenta, acinusima je dodavana 0.01 M HCl u toku 9 min kako bi se odredio ukupni sadržaj amilaze u njima.



Slika 4. Shema aparata za superfuziju acinusa pankreasa pacova.

Koncentracija amilaze određivana je modifikovanom metodom po Bernfeld-u korišćenjem maltoze rastvorene u hranljivoj podlozi Medijum 199 kao standarda (62). Aktivnost amilaze oslobođene u vremenu od 3 minuta, izražavana je kroz broj μg maltoznog ekvivalenta/ml/10 min koju stvara amilaza iz skroba na 30°C. Kolagenaza je kupovana od Worthington Bipchemical Corp. (Freehold, NJ) a sve ostale hemikalije od Sigma Chemical Co.

Poseban kompjuterski program korišćen je za obradu podataka iz superfuzione analize. Iz podataka moguće je dobiti veličinu maksimalnog odgovora ("peak"), ukupni odgovor (preko površine ispod krive), samo površinu ispod krive za odgovor iznad bazalnog nivoa oslobađanja amilaze. Lin-log regresionom analizom nishodne strane pika dobija se podatak o biološkom polu-životu (t_{50}) odgovora.

IN VIVO EKSPERIMENTI

ISPITIVANJE ENDOKRINIH EFEKATA ANTAGONISTA BOMBEZINA KOD PACOVA

U ovim eksperimentima korišćeni su muški Sprague-Dawley pacovi težine oko 250 g. Životinje su hranjene standardnom dijetom i vodom *ad libitum*, a čuvane pod kontrolisanim uslovima: 12 h svetlo, 12 h mrak na $24 \pm 2^\circ\text{C}$. U svakoj eksperimentalnoj grupi bilo 7-8 pacova.

Za merenje gastrina u serumu, pacovi su gladovali najmanje 18 h pre eksperimenta. Životinje su anestetizirane natrijum pentobarbitonom (30 mg/kg telesne težine). GRP(14-27) je davan intravenski, subkutano ili inhalacijom. Za intratrahealnu aplikaciju, modifikovana 26 G igla je uvlačena u gornju polovinu traheje. Peptid je iniciran u obliku finog spreja posle kratkotrajne kompresije grudnog koša životinje. Uzorci krvi uzimani su iz jugularne vene. Antagonisti su davani intravenski, potkožno ili inhalacijom.

Uzorci krvi su centrifugirani i čuvani na -70°C do analize. Gastrin u serumu određivan je RIA metodom sa dvostrukim antitelima kitom Becton Dickenson Comp. (Orangeburg, New York). Koncentracija hormona rasta (GH) merena je RIA metodom materijalom iz National Hormone and Pituitary Program. Insulin i glukagon u serumu mereni su specifičnim RIA metodom. Koncentracija glukoze određivana je komercijalnim kitom (Stanbio, San Antonio, TX). Koncentracije luteinizirajućeg hormona (LH) u plazmi određivane su RIA metodom dvostrukim antitelima, a kao referentni preparat koristio se LH-RP-3 pacova. Insulinski faktor rasta I (IGF-I) u serumu određivan je RIA metodom uz prethodnu ekstrakciju uzoraka seruma modifikovanim načinom koji uključuje proces krioprecipitacije. IGF-I (Genentech) jodiniran je standardnom hloramin-T metodom.

ISPITIVANJE ANTITUMORSKE AKTIVNOSTI ANTAGONISTA BOMBEZINA

Antitumorska aktivnost pojedinih antagonista bombezina ispitivana je na:

- a) humanim tumorima transplantiranim golim miševima (karcinom kolona, prostate i dojke),
- b) eksperimentalnom karcinomu dojke miša i
- c) karcinomu pankreasa hrčaka uzrokovanog hemijskim agansom.

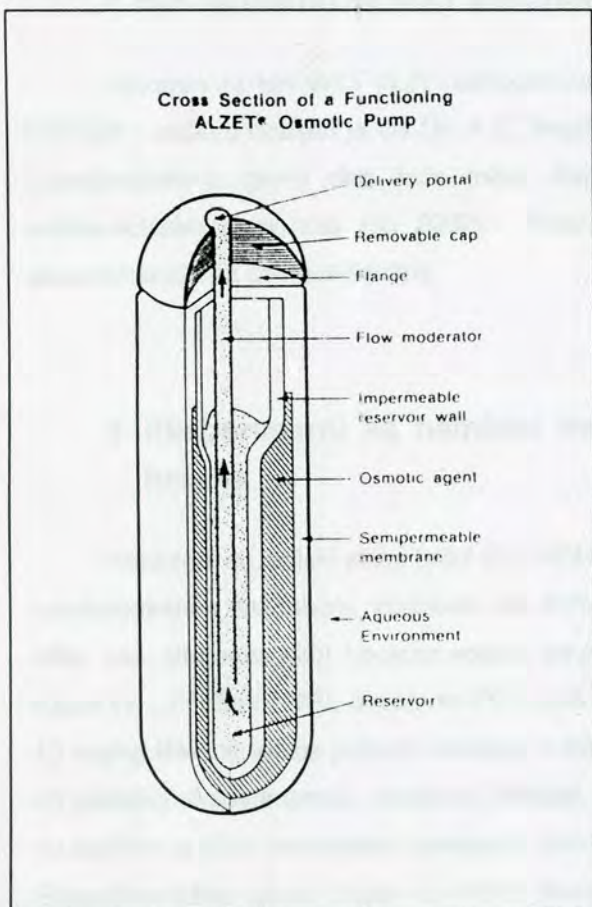
1. Transplantati humanih tumora na golim miševima

Atimični, "goli" miševi (nu/nu), prosečne starosti oko 6 nedelja i težine oko 20 g, dobijeni su od National Cancer Institute (Bethesda, MD). Životinje su čuvane u odgovarajućim uslovima u kavezima zaštićenim laminarnom komorom.

Transplantati (ksenografti) humanog karcinoma kolona HT-29 inicirani su inokulacijom oko 10 miliona ćelija u podkožni sloj na leđima miševa. PC-82, humani karcinom prostate, dobijen je od Dr. John Isaacs-a (Department of Urology, Jonh Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD). MCF-7 MIII ćelije humanog karcinoma dojke dobijene su od Dr. Robert Clarke (Georgetown University Medical Center, Washington, DC). MCF-7 MIII tumori prošli su kroz pet pasaža pre eksperimenta.

Ksenografti tumora inicirani su inokulacijom delova tumora veličine 1-2 mm³ pod kožu donjeg dela leđa miša. Terapija je započinjana najčešće u vreme kada su tumori narasli do 15-20 mm³. Eksperimentalne grupe brojale su po 7-10 životinja. Antagonisti bombezina su rastvarani u rastvoru

0.1% DMSO-a u fiziološkom rastvoru. Lekovi su davani subkutano ili uz pomoć osmotskih pumpi (Alzet Corporation, Palo Alto, CA). Najčešće je korišćen model 2002, koji oslobađa 0.5 µl/h i koji je osiguravao terapiju tokom 2 nedelje. Kada su se koristile minipumpe, miševi su anestetizirani sa 2,2-dihloro-1,1-difluoroetilmetil etrom (Metofane^R, Pitman-Moore, Washington Crossing, NJ), a pumpe hirurški implantirane pod kožu leđa miša. Za punjenje osmotskih minipumpi, peptidi su rastvarani u 50% (v/v) propilen glikola u vodi. Shematski prikaz unutrašnje strukture osmotske minipumpe dat je na Slici 5.



Slika 5. Unutrašnji presek građe Alzet osmotske pumpe. Difuzija tečnosti iz okolnog tkiva u unutrašnjost pumpe uslovljava postepeno oslobađanje leka iz skladišta pumpe.

Veličina tumora je merena 1-2 puta nedeljno uz pomoć lenjira. Zapremina tumora izračunavana je na sledeći način:

$$\text{Zapremina tumora} = \frac{\text{dužina} \times \text{širina} \times \pi}{6}$$

Vreme udvostručavanja zapremine tumora izračunavano je u toku logaritamske faze rasta tumora. Vreme odlaganja rasta tumora predstavlja razliku u vremenu za koje u određenoj grupi životinja tumor dostigne određenu veličinu. Tumorsko opterećenje izračunavano je kao odnos težine tumora (u mg) i telesne težine životinje (u g). Na kraju eksperimenta, životinje su anestetizirane, dekapitirane, a krv je sačuvana za dalju analizu. Pre iskrvavljenja, merena je telesna težina životinja kao i težina određenih organa. Tumori su ekstirpirani, očišćeni od okolnog tkiva, deo tumora je sačuvan za histopatološku analizu, dok je drugi deo korišćen za receptorske studije.

2. Eksperimenti sa MXT karcinomom miša

Estrogen-zavisni MXT (3.2) i estrogen-nezavisni MXT (3.2)/Ovex karcinom dojke (C57BL X DBA/2)F₁ miševa dobijen je od Dr. A.E. Bogden (Biomeasure Inc., Hopkinton, Mass.). Tumor je transplantiran u gornji deo leđa miša. Peptidi su davani subkutanom injekcijama ili Alzet miniosmotskim pumpama (tip 2002). Postupak inokulacije tumora je bio sličan kao i kod eksperimenata sa golim miševima.

3. Eksperimenti sa hemijski indukovanim karcinomom pankreasa kod hrčaka

Korišćeni su sirijski zlatni hrčci (CH:RGH), težine 98 ± 5 g. Životinje su čuvane u sobama sa kondicioniranim vazduhom, vlažnosti oko 55%, hranjene Rodent Laboratory Chow 50001 (Purina Mills, Ins., St.Louis, MO) i pojene vodom *ad libitum*. Hemijski karcinogen, BOP (American Tokyo Kasei Inc., Portland, OR), čuvan na 4°C i uvek sveže rastvaran u 0.9% NaCl davan je s.c. u dozi od 10 mg/kg telesne težine jednom nedeljno u toku 6 nedelja. Osamnaest nedelja kasnije (24 nedelje od početka eksperimenta), preživele životinje su randomizirane i uključene u eksperiment. Lekovi su aplikovani Alzet osmotskim pumpama (model 2ML4), koje oslobađaju 2.5 µl/h u toku 4 nedelje. Eksperimentalne grupe brojale su 10-12 životinja. Terapija je trajala 8 nedelja. Na kraju lečenja, životinje su iskrvavljivane pod anestezijom Metofanom^R. Merena je telesna težina, trbušna duplja je

otvarana i registrovano je eventualno prisustvo ascita. Osim toga, merena je težina pankreasa, kao i težina tumorskih promena u abdomenu.

HISTOLOŠKE PROCEDURE

Svi uzorci tumora histopatološki pregledani su u našoj laboratoriji na jednom mestu (histološke procedure obavljao je Dr. K. Szepeshazi). Tumor je fiksiran u neutralnom formalinu, potopljen u Paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO), a preparati veličine 6 μm su isecani. Preparati su bojeni hematoksilin-eozinom i Van Gieson-ovom bojom. Za merenje apoptotičkog indeksa (programirana ćelijska smrt) meren je broj apoptotskih ćelija na 1000 ćelija. Na sličan način određivan je i stepen mitoze ćelija u tumoru. Količina strome u tumoru predstavljena je odnosom površine vezivnog tkiva u odnosu na površinu tumora u preparatu. Broj agirofilnih organizacija nukleusa (AgNOR), u odnosu na broj tumorskih ćelija, određivan je bojenjem srebrom. Sva histopatološka istraživanja vršena su bez uvida u prethodnu terapiju.

Sve vrednosti predstavljene su kao srednje vrednosti \pm standardna greška (SE), a za statističku analizu korišćeni su Duncan-ov test ili Student-ov parni *t*-test.

REZULTATI

STRUKTURA SINTETISANIH ANTAGONISTA BOMBEZINA

U našoj laboratoriji najpre su sintetisana (Dr R.-Z Cai) dva agonistička analoga bombezina/GRP-a: Tyr⁴-BN (1-14) i GRP (14-27). Tyr⁴-BN (1-14), molekulske težine 1652, je zbog prisustva tirozina pogodan za jodiranje. Tako obeležen koristio se u receptorskim studijama. GRP(14-27), molekulske težine 1647, zadržava sva biološka dejstva, kako bombezina, tako i celokupne molekule GRP-a. GRP(14-27) je korišćen kao agonist, jer je zbog kraćeg aminokiselinskog lanca daleko jeftiniji za sintezu od GRP-a.

Sintetisano je preko 50 analoga bombezina i svako jedinjenje označeno je posebnom šifrom. Tabela 5 prikazuje strukturu sintetisanih analoga bombezina/GRP-a i njihove molekulske težine. Struktura analoga bombezina prikazuje se tako što se navode samo ime i pozicija aminokiseline koja se razlikuje od aminokiseline u strukturi bombezina.

Tabela 5. Struktura i molekulske težine bombezina i sintetisanih analoga.

Broj	Šifra	Strukturalna formula														Molekulska težina
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	Bombezina	pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂														1652
1.	RC-3003	DTrp ¹⁰ ,DPhe ¹² ,Leu ¹⁴ -BN (1-14)														1697
2.	RC-3005	His(Bz) ²⁰ ,DTrp ²³ ,DPhe ²⁵ ,Leu ²⁷ -GRP(14-27)														1858
3.	RC-3009	DTrp ²³ ,Dphe ²⁵ ,Leu ²⁷ -GRP(14-27)														1972
4.	RC-3030	Ac-His ⁷ -BN (7-13)														1087
5.	RC-3040	Ac-His ⁷ ,Leu ¹⁴ -BN (7-14)														1244
8.	RC-3080	DTpi ⁶ ,His ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1471
9.	RC-3324	DPhe ⁶ ,Dpa(Ac) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1700
10.	RC-4160	AcGlu ⁷ ,Trp ¹² -BN (7-12)														900
11.	RC-4170	D-Trp ⁶ ,Glu(OMe) ⁷ -BN (6-12)														1000
12.	RC-3430	Phe ⁶ ,Glu ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1580
13.	RC-3495	DTpi ⁶ ,His(Bz) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1650
14.	RC-3310	DPhe ⁶ ,His(Bz) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1580
15.	RC-3320	DPhe ⁶ ,Dpa(NH ₂ CO) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1600
16.	RC-3350	DPhe ⁶ ,Glu(CH ₃ NH) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1580
17.	RC-3360	DPhe ⁶ ,Glu(OMe) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1580
18.	RC-3095	DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1348
19.	RC-3100*	DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1310
20.	RC-3105	DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1610
21.	RC-3110*	DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1572
22.	RC-3125	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1577
23.	RC-3130	AcTrp(For) ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1536
24.	RC-3135	AcTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1506
25.	RC-3400	NH ₂ CO-DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1610
26.	RC-3420	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)														1382
27.	RC-3165	Paa ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)														1700

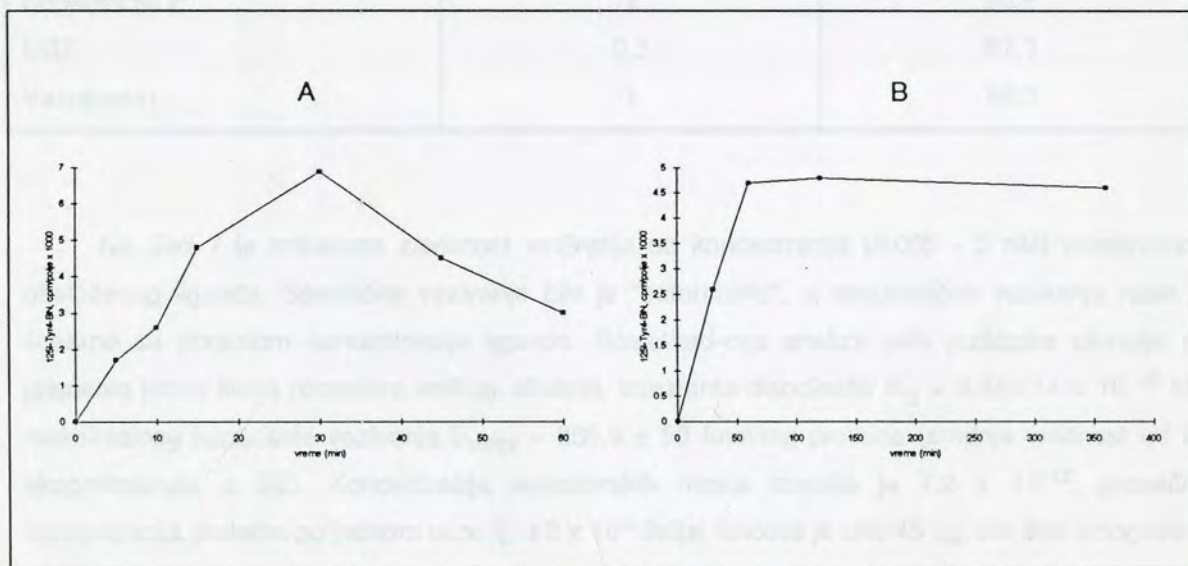
28.	RC-3115	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	1648
29.	RC-3120	DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	1610
30.	RC-3415	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ , ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	1649
31.	RC-3440	Tpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi-BN (6-14)	1648
32.	RC-3160	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp(For) ¹⁴ -BN (6-14)	1678
33.	RC-3385	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	1650
34.	RC-3410	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp(For) ¹⁴ -BN (6-14)	1677
35.	RC-3375	Mpp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	1700
36.	RC-3390	DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	1630
37.	RC-3380	DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH-Trp) ¹⁴ -BN (6-14)	1650
38.	RC-3388	Tpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH-Trp) ¹⁴ -BN (6-14)	1630
39.	RC-4040	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹¹ -BN (6-11)	900
40.	RC-3800	D-Phe ⁶ -BN (6-13)PA	1100
41.	RC-3810	D-Phe ⁶ -BN (6-13)OEt	1000
42.	RC-4090	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	1000
43.	RC-3530	Tpi ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	1000
44.	RC-4020	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)PA	1000
45.	RC-4010	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)OH	1000
46.	RC-4030	Tpi ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	1000
47.	RC-3715	D-Trp ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	1000
48.	RC-4125	D-Trp ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)PA	1000
49.	RC-3710	D-Tpi ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	1000
50.	RC-4140	D-Pal ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	1000
51.	RC-4150	D-Cpa ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	1000
		CH ₂	
52.	RC-3950	D-Phe ⁶ ,CH ₂ -Cys ¹⁴ -BN (6-14)	1200
53.	RC-3950II	D-Phe ⁶ ,CH ₂ NH-Cys ¹⁴ -BN (6-14)	1200
		CH ₂	
54.	RC-3955	D-Trp ⁶ ,CH ₂ N-Cys ¹⁴ -BN (6-14)	1200
		CH ₂	
55.	RC-3985II	D-Phe ⁶ ,CH ₂ N-Pen ¹⁴ -BN (6-14)	1200
56.	RC-3985I	D-Phe ⁶ ,CH ₂ N-Pen ¹⁴ -BN (6-14)	1200

*Analozi identične strukture kao analozi RC-3110 i RC-3100 opisani su od strane Coy-a i saradnika, 1989 (54); BN, bombezin; PA, propilamid; OEt, etilestar.

ANALIZA AKTIVNOSTI ("SCREENING") NOVOSINTETISANIH ANALOGA BOMBEZINA *IN VITRO*

"Screening" novosintetisanih analoga bombezina u uslovima *in vitro* vršen je kompetitivnim receptorskim analizama, tj. određivanjem njihove sposobnosti da inhibiraju specifično vezivanje ^{125}I -Tyr⁴-BN za bombezinske receptore na intaktnim Swiss 3T3 mišjim fibroblastima. Najpre su u nekoliko eksperimanata provereni uslovi za optimalno vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN, koji su inače već ranije opisani u radu Zahary-a i Rozengurta, 1986 (25).

Vezivanje ^{125}I -Tyr⁴-BN za konfluentne Swiss 3T3 ćelije je visoko specifično (60-80%), a ukupno vezivanje iznosilo je oko 7% dodate radioaktivnosti. Specifično vezivanje je bilo zavisno od temperature i vremena inkubacije. Optimalno vezivanje je bilo na temperaturi od 37°C i pri dužini inkubacije od 30 min (Slika 6). Na temperaturi od 4°C, vezivanje je sporo, dostiže stanje ravnoteže posle 60 minuta i ostaje konstantno sledeća 2 h (Slika 6).



Slika 6. Specifično vezivanje ^{125}I -Tyr⁴-bombezina za receptore na Swiss 3T3 ćelijama u zavisnosti od temperature i dužine inkubacije. A - vezivanje se odvijalo na 37° C, B - vezivanje se odvijalo na temperaturi leda.

Eksperimenti sa Swiss 3T3 ćelijama koje su rasle u posudama sa 96-polja, pokazali su da u takvim uslovima broj ćelija nije dovoljan za značajnije specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN. Minimalan broj ćelija koji je dozvoljavao ovakve eksperimente je oko 2×10^5 , što je zahtevalo da se za rast ćelija koriste plastične posude sa 24 polja.

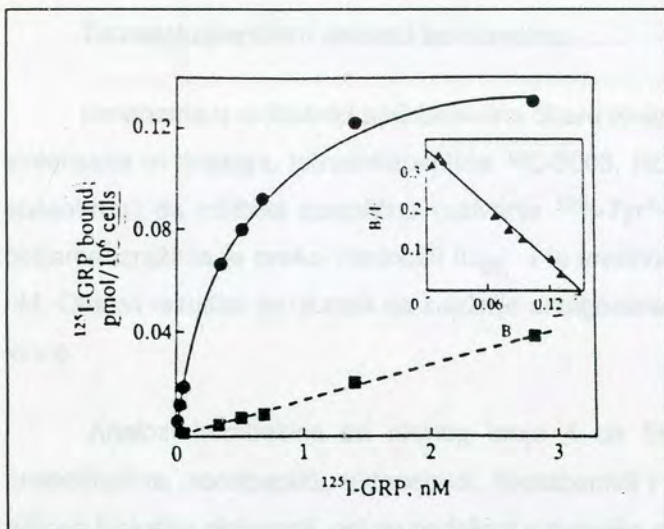
Vezivanje ¹²⁵I-Tyr⁴-BN je specifično. Bombezin i GRP(14-27), u koncentraciji od 1 μmol, skoro u potpunosti inhibišu specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN. Specifično vezivanje obeleženog liganda (¹²⁵I-Tyr⁴-BN) nije inhibisano mikromolarnim koncentracijama somatostatina, insulina, supstancije P, EGF-a i vazopresina (Tabela 6).

Tabela 6. Specifičnost vezivanja ¹²⁵I-Tyr⁴-BN za intaktne Swiss 3T3 ćelije.

Neobeležena supstancija	Koncentracija (μmol)	Specifično vezivanje (%)
Bombezin	1	28.8
GRP(14-27)	1	29
Somatostatin	5	97.7
Insulin	4	95.2
Supstancija P	1	90.8
EGF	0.3	97.7
Vazopresin	1	98.3

Na Slici 7 je prikazana zavisnost vezivanja od koncentracije (0.005 - 3 nM) primenjenog obeleženog liganda. Specifično vezivanje bilo je "saturabilno", a nespecifično vezivanje raslo je linearno sa porastom koncentracije liganda. Scatchard-ova analiza ovih podataka ukazuje na prisustvo jedne klase receptora velikog afiniteta, konstante disocijacije $K_D = 0.6 \pm 0.14 \times 10^{-9}$ M i maksimalnog kapaciteta vezivanja $B_{max} = 265,9 \pm 50$ fmol/mg proteina (srednja vrednost od 20 eksperimenata \pm SE). Koncentracija receptorskih mesta iznosila je 7.2×10^{12} , prosečna koncentracija proteina po jednom oknu tj. u 2×10^5 ćelija, iznosila je oko 45 μg, što sve omogućava izračunavanje broja receptorskih mesta po jednoj ćeliji: on iznosi $36\ 600 \pm 6\ 500$ receptora/ćeliji (srednja vrednost \pm SE).

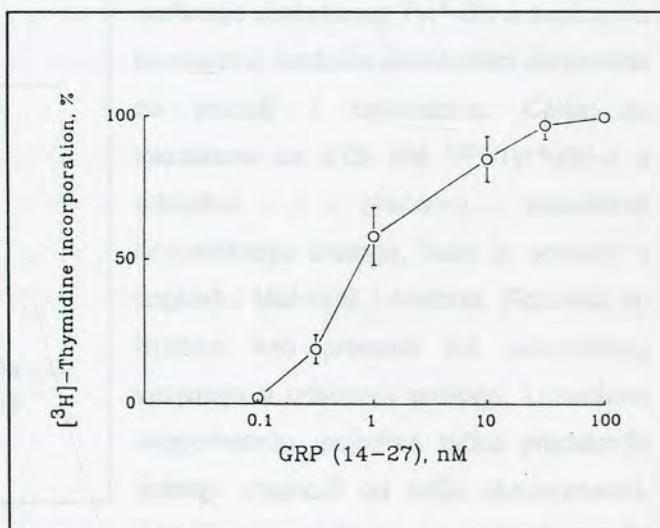
Biološka aktivnost sintetisanih analoga bombezina u receptorskim analizama, izražavana je preko vrednosti IC_{50} , koja označava koncentraciju analoga koja inhibira 50% specifičnog vezivanja radioliganda.



Slika 7. Vezivanje $^{125}\text{I-Tyr}^4$ -bombezina za receptorska mesta na Swiss 3T3 ćelijama u zavisnosti od koncentracije liganda. Eksperimenti su izvođeni na 37°C . ●, specifično vezivanje, ■, nespecifično vezivanje. Na ordinati se nalaze vrednosti vezanog liganda (B, "bound"), a na apscisi koncentracija obeleženog bombezina (F, "free") u pmol/ml (nM). Unutar slike prikazana je i Scatchard-ova analiza podataka.

Drugi test za analizu aktivnosti sintetisanih bombezinskih analoga bio je inhibicija inkorporacije obeleženog timidina u DNK Swiss 3T3 ćelija stimulisana GRP (14-27)-om. Naime, GRP(14-27) u doznom rasponu od 0.1 do 100 nM stimuliše preuzimanje (^3H)timidina od strane Swiss 3T3 ćelija, ukazujući na mitogeni efekat GRP-a. Polovina maksimalnog efekta GRP(14-27)-a viđa se pri koncentraciji od 1 nM. Na Slici 8 prikazana je dozno-zavisna kriva mitogenog efekta GRP(14-27)-a. Ovo dejstvo GRP(14-27)-a bilo je slično delovanju bombezina, opisanom u radu Sinnett-Smith-a i saradnika (42).

Slika 8. GRP(14-27) dozno-zavisno stimuliše inkorporaciju tricijumom obeleženog timidina u DNK Swiss 3T3 ćelije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost (\pm SE) od tri odvojena eksperimenta rađena u kvadriplikatu.



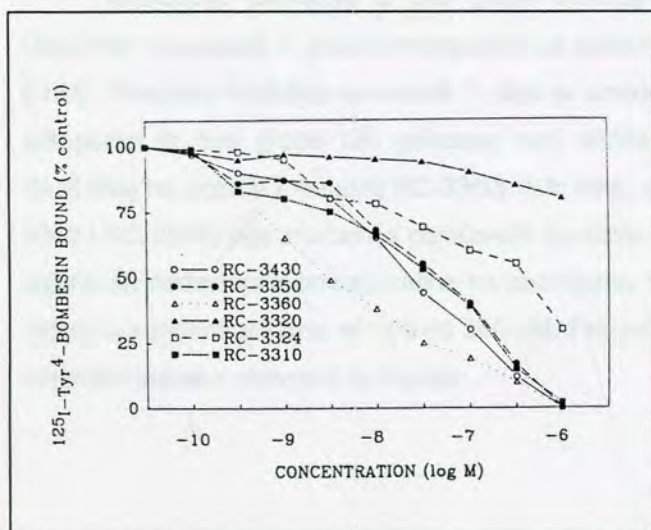
Tetradekapeptidni analozi bombezina

Izmenama u redosledu aminokiselina čitave molekule bombezina ili GRP (14-27)-a, najpre su sintetisana tri analoga, tetradekapeptida: RC-3003, RC-3005 i RC-3009 (videti Tabelu 5). Njihova sposobnost da inhibišu specifično vezivanje $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ -a za receptorska mesta na Swiss 3T3 ćelijama izražena je preko vrednosti IC_{50} , i te vrednosti, za ove analoge bile su 105, 50 i >1000 nM. Ovakvi rezultati su ukazali da snažnije antagoniste bombezina treba tražiti u peptidima kraćeg lanca.

Analozi bombezina od rednog broja 4 do 56 sa Tabele 5, su analozi kratkog lanca aminokiselina, nonapeptidi, oktapeptidi, heptapeptidi i septapeptidi. Radi jasnijeg i lakšeg prikaza njihove biološke aktivnosti, oni su podeljeni u nekoliko grupa.

Analozi sa strukturnim izmenama na poziciji 7

Odvojenu grupu jedinjenja predstavljaju analozi nastali strukturnim izmenama na poziciji 7 u bombezinu (6-13), bombezinu (6-14), bombezinu (7-13) i bombezinu (7-14) kao i bombezinu (6-12) i bombezinu (7-12). Ovi analozi sintetisani su sa ili bez redukovane peptidne veze na terminalnom C-atomu molekule. Njihovu strukturu, kao i aktivnost u inhibiciji specifičnog vezivanja obeleženog $\text{Tyr}^4\text{-BN}$ -a prikazuje Tabela 7. Na Slici 9 prikazane su dozno-zavisne inhibitorne krive za neke od analoga sa strukturnim izmenama na poziciji 7, na osnovu kojih je i izračunavana vrednost IC_{50} .



Slika 9. Inhibicija specifičnog vezivanja obeleženog $\text{Tyr}^4\text{-BN}$ -a analogima bombezina nastalim strukturnim izmenama na poziciji 7 bombezina. Ćelije su inkubirane sa 0.05 nM $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ -a u odsustvu i prisustvu navedenih koncentracija analoga, kako je opisano u poglavlju Materijali i Metode. Rezultati su izraženi kao procenti od saturabilnog vezivanja u odsustvu analoga. U svakom eksperimentu, pojedina tačka predstavlja srednju vrednost od četiri eksperimenta, određivane u triplikatu.

Tabela 7 Aktivnost bombezinskih analoga nastalih izmenama lanca bombezina na poziciji 7

Bombezinski analog		Inhibicija vezivanja obeleženog Tyr ⁴ -BN za Swiss 3T3 ćelije IC ₅₀ (nM)
RC-3030	Ac-His ⁷ -BN (7-13)	165
RC-3040	Ac-His ⁷ ,Leu ¹⁴ -BN (7-14)	65
RC-3045	Ac-His ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (7-14)	230
RC-3075	DTpi ⁶ ,His ⁷ -BN (6-13)	50
RC-3080	DTpi ⁶ ,His ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	NE
RC-3495	DTpi ⁶ ,His(Bz) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	82
RC-3310	DPhe ⁶ ,His(Bz) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN(6-14)	39
RC-4160	AcGlu ⁷ ,Trp ¹² -BN (7-12)	180
RC-4170	D-Trp ⁶ ,Glu(OMe) ⁷ -BN (6-12)	300
RC-3430	Phe ⁶ ,Glu ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	22
RC-3350	DPhe ⁶ ,Glu(CH ₃ NH) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN(6-14)	57.5
RC-3360	DPhe ⁶ ,Glu(OMe) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	5.7
RC-3324	DPhe ⁶ ,Dpa(Ac) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	>1000
RC-3320	DPhe ⁶ ,Dpa(NH ₂ CO) ⁷ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	NE

NE, nema efekta

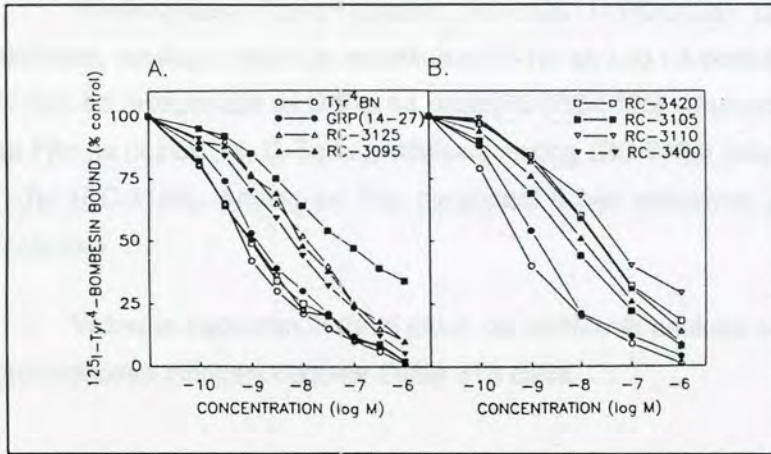
Najaktivnije jedinjenje iz ove grupe analoga bombezina predstavlja RC-3360, analog sa Glu(OMe) na poziciji 7, pseudononapeptid sa aminokiselinom DPhe na pozicijama 6 i 14 (IC₅₀ oko 6 nM). Prisustvo histidina na poziciji 7 dalo je analoge sa različitom aktivnošću. Međutim, ni jedan antagonist iz ove grupe nije pokazao veći afinitet za bombezinske receptore od analoga sa Glu(OMe) na poziciji 7 (analog RC-3360). Isto tako, acetilovanje histidina⁷ (jedinjenja RC-3030, RC-3040 i RC-3045) nije značajnije pojačavalo biološku aktivnost. Analози sa glutaminom na poziciji 7, kojima su nedostajale aminokiseline na pozicijama 13 i 14, tj. analози RC-4160 i RC-4170, bili su aktivni u koncentracijama od 100 do 300 nM. Prisustvo Dpa i derivata Dpa na poziciji 7 drastično je smanjilo biološku aktivnost jedinjenja.

Pseudononapeptidni analozi sa Trp i Tpi na N-terminalu molekule

Sledeća grupa bombezinskih analoga predstavljena je jedinjenjima sa redukovanom peptidnom vezom (pseudononapeptidi) između pozicija 13 i 14 polipeptidnog lanca. Svi ovi analozi imaju D oblike Trp i njegovog analoga Tpi na N-terminalu (Tabela 8). Tpi je strukturno izmenjen analog Trp i više hidrofoban od Trp-a. Pretpostavilo se da će prisustvo hidrofobnih aminokiselina, kao što su Trp i Tpi, pojačati antagonističku aktivnost jedinjenja DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-BN (6-14) (RC-3100) i DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (6-14) (RC-3105) za koje su Coy i saradnici (53) pokazali da imaju veoma veliki afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 ćelijama i acinusima pankreasa pacova. Antagonisti, opisani od strane Coy-a i saradnika, su sintetisani u našoj laboratoriji i služe kao kontrola.

Sintetisano je deset analoga sa D-Trp i D-Tpi na N-terminalu. Njihovu strukturu, kao i biološka aktivnost prikazuje Tabela 8. Testirana je njihova sposobnost da inhibiraju specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN-a za bombezinske receptore na intaktnim Swiss 3T3 i NCI H-345 ćelijama, kao i da inhibiraju stimulaciju rasta Swiss 3T3 ćelija uzrokovanu GRP(14-27). Krive inhibicije specifičnog vezivanja ¹²⁵I-Tyr⁴-BN-a za bombezinske receptorske u prisustvu različitih koncentracija pojedinih bombezinskih analoga sa Trp i Tpi na N-terminalu prikazuje Slika 10. Konstante disocijacije za vezivanje obeleženog Tyr⁴-bombezina Swiss 3T3 ćelije bila je 0.6±0.14 nM a za H-345 ćelije 0.51±0.21 nM (srednja vrednost ± SE). Konstante disocijacije za GRP(14-27) iznosile su 1.3±0.43 nM za Swiss 3T3 ćelije i 1.6±0.6 nM za H-345 ćelije.

Većina antagonista bombezina sa pseudo-peptidnom vezom između 13-og i 14-og C atoma i aminokiselinama Tpi i Trp na poziciji 6, pokazivali su snažan afinitet vezivanja za receptorska mesta na ispitivanim ćelijskim linijama (Slika 10 i Tabela 8). Među antagonistima sa najvećima afinitetom za receptorska mesta na Swiss 3T3 i H-345 ćelijama bili su DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (6-14) (RC-3110) i DTrp⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (6-14) (RC-3420) (Tabela 8). Naši eksperimenti su samo potvrdili nalaze Coy-a i saradnika (53), da jedinjenja DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-BN (6-14) (RC-3100) i DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (6-14) (RC-3110) pokazuju snažan afinitet za bombezinske receptore sa vrednostima IC₅₀ ispod 10 nM. Analog N^α-karbamoil-DPhe⁶,Leu¹³ ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (6-14) (RC-3400) pokazuje afinitet koji je pet puta manji od jedinjenja iz kojeg je nastao, RC-3110.



Slika 10. Sposobnost Tyr⁴-bombezina, GRP(14-27) i različitih pseudonapeptidnih antagonista bombezina sa Trp i Tpi na N-terminalu da inhibiraju specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN-a za receptorska mesta na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama (A) i NCI H-345 ćelijama humanog

mikrocelularnog karcinoma pluća (B). Ćelije su inkubirane sa 0.05 nM ¹²⁵I-Tyr⁴-BN-a u odsustvu i prisustvu navedenih koncentracija analoga, kako je opisano u poglavlju Materijali i Metode. Rezultati su izraženi kao procenti od saturabilnog vezivanja u odsustvu analoga. U svakom eksperimentu, pojedina tačka predstavlja srednju vrednost od četiri eksperimenta, određivane u triplikatu.

Tabela 8. Biološka aktivnost pseudonapeptidnih analoga bombezina sa D oblicima aminokiselina Trp i D-Tpi na N-terminalu.

Analog bombezina	Inhibicija vezivanja ¹²⁵ I-Tyr ⁴ -BN (IC ₅₀ , nM)	Inhibicija rasta (IC ₅₀ , nM)	
	Swiss 3T3	NCI H-345	Swiss 3T3
RC-3095 DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	8	10	10
RC-3100 DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	3.45	-	-
RC-3105 DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	71	22	80
RC-3110 DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	1	5	-
RC-3125 Trp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	10.6	21	18
RC-3130 AcTrp(For) ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	>3000	>3000	-
RC-3135 AcTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	>3000	>3000	-
RC-3400 NH ₂ CO-RC-3110	5.5	30	-
RC-3420 DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Phe ¹⁴ -BN (6-14)	1	4.16	0.8
RC-3165 Paa ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Leu ¹⁴ -BN (6-14)	1768.7	-	-

IC₅₀ označava koncentraciju peptida koja inhibira specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN za 50% ili koja za 50% inhibira stimulaciju rasta Swiss 3T3 ćelija uzrokovano dodavanjem 3 nM GRP(14-27). Kompetitivni tip receptorske analize rađen je u triplikatu u eseju sa 10-12 tačaka za Swiss 3T3 ćelije, a 6 tačaka za NCI H-345 ćelije. Koeficijent varijacije iznosio je 10-30%.

Acetilovanjem Trp-a, (analози RC-3130 i RC-3135) drastično se smanjivala biološka aktivnost. Analog u kojem je supstituisan D-Tpi sa Leu na poziciji 14 (RC-3095), pokazivao je veći afinitet od antagonista sa D-Trp na poziciji 6 (RC-3125). Nasuprot tome, kada se uporede analози sa Phe na poziciji 14, D-Trp supstituisani analog (RC-3420) imao je snažniji afinitet od analoga sa D-Tpi (RC-3105). Analog sa Paa na poziciji 6 nije pokazivao značajniji afinitet za bombazinske receptore.

Važno je napomenuti da ni jedan od ispitivanih analoga sa Trp ili Tpi na poziciji 6 nije sam prouzrokovao mitogeni odgovor Swiss 3T3 ćelija.

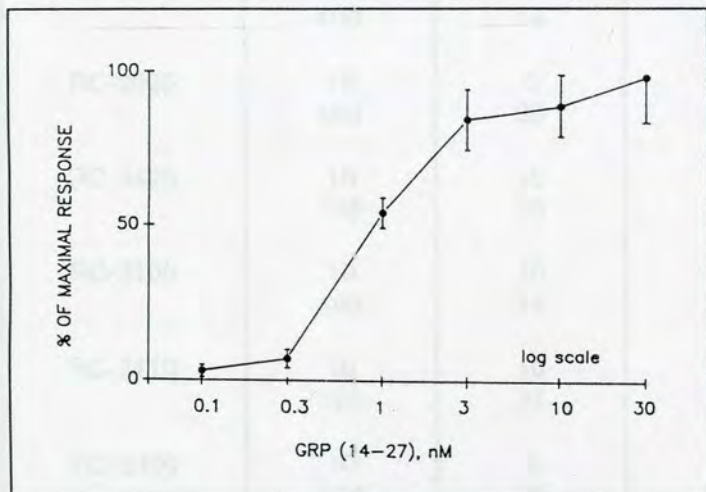
Rezultati sa perfundovanim acinusima pankreasa pacova

Bombazinski antagonisti kratkog lanca sa pseudo-peptidnom vezom i Trp i Tpi na poziciji 6 (antagonisti predstavljeni na Tabeli 8) ispitivani su na perfundovanim dispergovanim acinusima pankreasa pacova (videti Materijal i Metode). Dispergovani acinusi pankreasa pacova sadržavali su prosečno $440\ 000 \pm 100\ 000$ živih (neoštećenih, pokazano metilenskim plavilom) acinusa na mililitar. Srednja vrednost bazalnog oslobađanja amilaze iz acinusa iznosila je 47.7 ± 5.2 $\mu\text{g/ml}$, što je predstavljalo 2.23 ± 0.2 % (srednja vrednost \pm SE, $n=15$) ukupnog sadržaja amilaze u preparatu. Izmereno je da je prosečna ukupna aktivnost amilaze u preparatu $34\ 541 \pm 4\ 600$ μg . U odnosu na ukupni sadržaj enzima, nestimulisani acinusi oslobađaju 12.44% od ukupnog sadržaja amilaze u toku 60 min. U zavisnosti od protokola, u čitavom eksperimentu korišćeno je 10-40% (prosečno 27%) ukupnog sadržaja amilaze u preparatu.

GRP(14-27), u koncentracijama od 0.1 do 30 nM, uzrokuje dozno-zavisnu stimulaciju oslobađanja amilaze iz acinusa pankreasa pacova (Slika 11).

Polovina maksimalnog odgovora acinusa postiže se sa 1 nM GRP(14-27). Odgovor acinusa na niske koncentracije GRP(14-27) (0.1 i 0.3 nM) bio je kratkog trajanja, oko 3 minuta. Više koncentracije GRP(14-27) uzrokovale su dugotrajniju stimulaciju oslobađanja amilaze; npr. posle 10 i 30 nM GRP(14-27) bilo je potrebno 9 odnosno 12 minuta da bi se nivo oslobađanja amilaze vratio na bazalni. Ponavljano izlaganje acinusa koncentraciji od 10 nM GRP(14-27) u toku 3 minuta, uzrokovalo je sniženje ukupnog odgovora preparata za oko 20% za svaku sledeću stimulaciju. Zbog toga je bilo neophodno da se, između pojedinačnih stimulacija, preparat najmanje 30 minuta ispira kao bi se izbegao fenomen desenzitizacije. Maksimalna stimulacija oslobađanja amilaze, uzrokovana dodavanjem 10 nM GRP (14-27), bila je 3.3 ± 0.3 puta (srednja vrednost \pm SE) veća od

vrednosti bazalnog oslobađanja. Ukupni odgovor ("net-integral") acinusa na 10 nM GRP(14-27) bio je 7.5 ± 1.2 puta veći od nivoa bazalne sekrecije amilaze iz preparata. Biološki polu-život ($t_{1/2}$) odgovora acinusa na GRP(14-27) zavisio je od koncentracije GRP-a. Izračunato je da $t_{1/2}$ odgovora acinusa na 0.1 nM GRP(14-27) iznosi manje od 1 minuta. Za koncentracije 0.3, 1, 3, 10 i 30 nM GRP(14-27) biološki polu-život odgovora preparata acinusa iznosio je 1.84, 2, 2.1 2.99 i 3.1 minut, (sa vrednostima SE \pm 10%).



Slika 11. Dozno-zavisna stimulacija oslobađanja amilaze GRP(14-27)-om iz dispergovanih acinusa pankreasa pacova. Prikazane su vrednosti ukupnog odgovora ("net-integral"). Tačke predstavljaju srednje vrednosti \pm SE od četiri različita eksperimenta.

Preparati acinusa pankreasa pacova izlagani su tokom 9 minuta različitim koncentracijama antagonista bombezina. Praćen je njihov efekat na bazalnu sekreciju amilaze. Rezultate ovih eksperimenata prikazuje Tabela 9.

Ni jedan od šest ispitivanih peptida nije stimulisao bazalnu sekreciju enzima acinusa, što ukazuje da oni ne pokazuju agonističku aktivnost. Nasuprot tome, u koncentraciji od 10 nM, samo analozi sa Phe na poziciji 14 (RC-3105, RC-3110, RC-3420 i RC-3400) smanjivali su nivo bazalne sekrecije amilaze. U višim koncentracijama (100 nM) svi analozi su smanjivali bazalnu sekreciju amilaze od 14% do 35% (Slika 12).

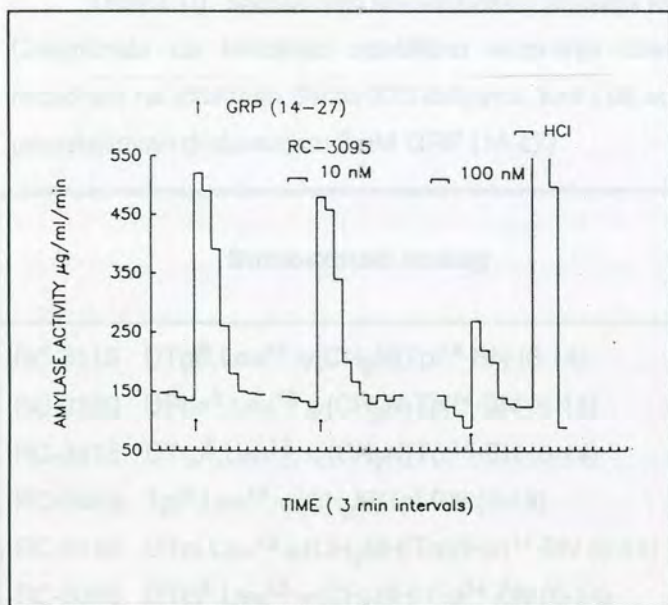
Tabela 9. Inhibitorni efekt pseudononapeptidnih analoga bombezina kratkog lanca sa Trp i Tpi na N-terminalu na bazalnu sekreciju i sekreciju amilaze iz dispergovanih acinusa pankreasa pacova stimulisanu GRP(14-27). Svaka vrednost je prosek iz dva odvojena eksperimenta.

Analog	Doza (nM)	Bazalna sekrecija (%)	Maksimalni odgovor (%)	Ukupni odgovor (%)	$t_{1/2}$ (%)
RC-3125	10	0	6	19	10
	100	14	50	63	20
RC-3095	10	0	5	20	8
	100	35	55	75	12
RC-3420	10	15	18	19	10
	100	33	60	80	20
RC-3105	10	10	15	10	3
	100	14	52	76	7
RC-3110	10	10	20	20	7
	100	34	60	82	10
RC-3400	10	0	6	0	10
	100	35	40	60	19

U drugoj seriji eksperimenata ispitivan je efekt bombezinskih antagonista, primenjenih u dozi od 10 nM i 100 nM, na stimulaciju sekrecije amilaze uzrokovanu dodavanjem 10 nM GRP(14-27).

Grafički prikaz tipičnog eksperimenta dat je na Slici 12. Preparat acinusa pankreasa perfundovan je u toku 9 minuta samo antagonistima, a zatim još 3 minuta zajedno sa GRP(14-27). Ispitivan je maksimalni ("peak"), ukupni odgovor (površina ispod krive), kao i biološko polu-vreme odgovora na GRP(14-27). Rezultate predstavlja Tabela 9.

Svi ispitivani analozi inhibisali su efekt GRP(14-27). Maksimalni odgovor acinusa ("peak") manje je bio inhibisan bombezinskim antagonistima u poređenju sa ukupnim odgovorom. Antagonisti sa najsnažnijom inhibitornom aktivnošću bili su RC-3420 i RC-3110. Ovi analozi su u koncentraciji od 100 nM inhibirali maksimalni odgovor acinusa na GRP(14-27) za oko 60% a ukupni odgovor acinusa za oko 80%. Ni jedan od ispitivanih bombezinskih analoga nije značajnije menjao (inhibisao) biološki polu-život odgovora acinusa na GRP(14-27).



Slika 12. Grafički prikaz podataka dobijenih iz eksperimenata sa perfundovanim dispergovanim acinusima pankreasa pacova. Kod vertikalnih strelica dodavan je GRP(14-27). Bombezijski antagonist (ovde RC-3095) bio je u kontaktu sa acinusima tokom 9 minuta, a zatim još 3 minuta zajedno sa 10 nM GRP(14-27). Uočava se da 100 nM RC-3095 snižava bazalnu sekreciju amilaze. Na kraju eksperimenata acinusima je dodata 0.1 M HCl u toku 3 minuta kako bi se odredila ukupna aktivnost amilaze u preparatu.

Pseudononapeptidni analozi sa Trp i Tpi NA C-terminalu molekule

Strukturu nonapeptida sa pseudo-peptidnom vezom između pozicija 13 i 14, kao i aminokiselinama Trp i Tpi na C-terminalu polipeptidnog lanca prikazuje Tabela 10.

Jedinjenja kod kojih se aminokiselina Tpi nalazi na poziciji 14 predstavljaju polipeptide sa novim tipom pseudopeptidne veze, vezom $\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi-NH}_2$. Zbog toga je bilo značajno da se njihova struktura potvrdi dodatnim analizama.

Struktura analoga sa $\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi-NH}_2$ peptidnom vezom, kao što je to u analozima RC-3120, RC-3415 i RC-3440, dokazana je i NMR analizom. Isto tako, sastav ovih peptida proveren je i analitičkom HPLC. Rezultati analize aminokiselinskog sastava, kao i retenciona vremena prilikom HPLC-a predstavljeni su na Tabeli 11. Rezultati ukazuju da je sastav ispitivanih peptida odgovarao je željenom sastavu prilikom postupka sinteze.

Tabela 10. Sposobnost bombezinskih analoga kratkog lanca sa aminokiselinama Trp i Tpi na C-terminalu da inhibiraju specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-bombezina za bombezinske receptore na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama, kao i da suprimiraju mitogeni odgovor Swiss 3T3 ćelija prouzrokovan dodavanjem 3 nM GRP (14-27).

Bombezinski analog	Inhibicija vezivanja ¹²⁵ I-Tyr ⁴ -BN (IC ₅₀ , nM)	Inhibicija rasta (IC ₅₀ , nM)
RC-3115 DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	25.3	105
RC-3120 DPhe ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	4.3	10
RC-3415 DTrp ⁶ ,Leu ¹³ , ψ(CH ₂ N)Tpi ¹⁴ -BN (6-14)	2.07	0.9
RC-3440 Tpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ N)Tpi-BN (6-14)	1.14	0.8
RC-3160 DTpi,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp(For) ¹⁴ -BN (6-14)	1917	>3000
RC-3385 DTpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	5.15	-
RC-3410 DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp(For) ¹⁴ -BN (6-14)	639.4	1280
RC-3375 Mpp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	85.7	145
RC-3390 DPhe ⁶ Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH)Trp ¹⁴ -BN (6-14)	9.16	7
RC-3380 DTrp ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH-Trp ¹⁴ -BN (6-14)	10.6	62
RC-3388 Tpi ⁶ ,Leu ¹³ ψ(CH ₂ NH-Trp ¹⁴ -BN (6-14)	5.17	14

IC₅₀ označava koncentraciju peptida koja inhibira specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN za 50% ili koja za 50% inhibira stimulaciju rasta Swiss 3T3 ćelija uzrokovan dodavanjem 3 nM GRP(14-27). Kompetitivni tip receptorske analize rađen je u triplikatu u eseju sa 10-12 tačaka.

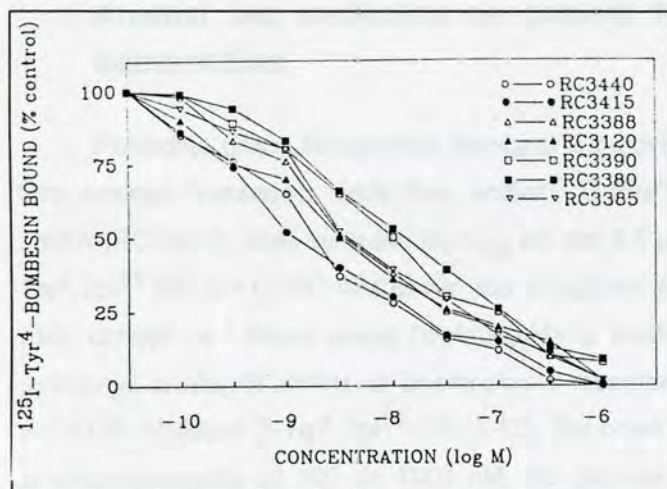
Tabela 11. Analiza amino-kiselina i retenciona vremena prilikom analize HPLC-om pojedinih bombezinskih antagonista sa Trp i Tpi na C-terminalu molekule.

Analog	Analiza amino-kiselina								Retenciono vreme sa 25-65%B (min)
	Tpi	Phe	Glu	Trp	Ala	Val	Gly	His	
RC-3390		0.99	1.04	1.11	0.94	1.05	1.00	1.00	17.3
RC-3380			1.05	2.16	0.83	0.96	0.97	1.00	18.2
RC-3388	*		1.10	1.03	1.00	1.03	1.00	0.96	19.0
RC-3385	*		1.02	0.98	1.00	0.96	1.00	0.97	18.9
RC-3120**		1.00	1.12	0.95	0.93	0.98	0.97	1.00	17.4
RC-3415**			1.00	1.91	0.91	1.00	1.03	0.96	19.1
RC-3440**	*		1.04	1.06	0.96	1.00	0.99	0.99	22.5

* Tpi, Leu ψ(CH₂NH) Trp i Leu ψ(CH₂N) Tpi nisu se mogle naći analizom aminokiseline. Tpi pokazuje "peak" na 14 minuta u analitičkoj HPLC sa 0-40%B. **Strukture ψ(CH₂N) Tpi-NH₂ potvrđene su NMR analizom.

Pseudononapeptidnim analogima bombezina sa Trp i Tpi na C-terminalu molekule testirana je njihova sposobnost da inhibiraju specifično vezivanje $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ za receptorska mesta na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama. Inhibitorne krive za pojedine analoge iz ove grupe predstavljene su na Slici 13.

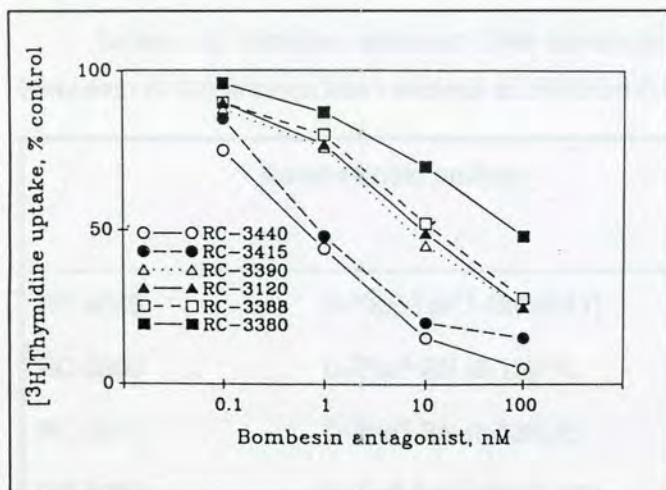
$\text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Trp}^{14}\text{-BN}$ (6-14) analogi sa Tpi (RC-3388) i D-Tpi (RC-3385) na N-terminalu pokazali su veći afinitet vezivanja za bombezinske receptore od analoga sa D-Phe (RC-3390) i D-Trp (RC-3380) na istom kraju molekule. Među analogima sa $\text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14) na C-terminalu, analog RC-3415 sa D-Trp na N-terminalu pokazao se snažniji antagonist od analoga koji sadrže D-Phe (RC-3120) ili Tpi (RC-3440). $\text{DTrp}^6, \text{Leu}^{13}, \psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14) (RC-3415) pokazao se 5 puta aktivnijim od analoga $\text{DTrp}^6, \text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{NH-Trp}^{14}\text{-BN}$ (6-14) (RC-3380), i 2 puta aktivniji od analoga $\text{DPhe}^6, \text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14) (RC-3120).



Slika 13. Sposobnost različitih pseudononapeptidnih antagonista bombezina sa Trp i Tpi na C-terminalu molekule da inhibišu specifično vezivanje $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ za bombezinske receptore na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama. Konfluentne ćelije inkubirane su sa 0.05 nM $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ u odsustvu (ukupno vezivanje) i prisustvu naznačenih koncentracija analoga. Rezultati su izraženi kao procenat saturabilnog vezivanja u

odsustvu analoga. U svakom eksperimentu, pojedina vrednost je određivana u triplicatu. Koeficijent varijacije iznosio je 10-20%.

Dodavanje 3 nM GRP(14-27) Swiss 3T3 ćelijama uzrokuje povećanje nivoa inkorporacije tricijumom obeleženog timidina za oko 300%. Na Slici 14 prikazan je dozno-zavisni inhibicioni efekat različitih antagonista sa Trp i Tpi na C-terminalu molekule. Ni jedan od testiranih analoga nije sam prouzrokovao stimulaciju rasta Swiss 3T3 ćelija. Većina bombezinskih antagonista iz ove grupe inhibisala je stimulantni efekat GRP(14-27)-a (Slika 14, Tabela 10). $\text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14) antagonisti pokazali su se aktivnijim od $\text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{NH})\text{Trp}^{14}\text{-BN}$ (6-14) analoga. Dva jedinjenja sa najsnažnijom aktivnošću bila su RC-3415 - $\text{DTrp}^6, \text{Leu}^{13}, \psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14) i RC-3440 - $\text{Tpi}^6, \text{Leu}^{13}\psi(\text{CH}_2\text{N})\text{Tpi}^{14}\text{-BN}$ (6-14).



Slika 14. Sposobnost različitih pseudonapeptidnih analoga bombezina sa Trp i Tpi na C-terminalu molekule da inhibiraju stimulaciju rasta Swiss 3T3 ćelija uzrokovanu GRP(14-27). Rezultati su predstavljeni kao procenat od odgovora Swiss 3T3 ćelija u prisustvu 3 nM GRP(14-27). U svakom eksperimentu, pojedine vrednosti su određivane u kvadriplikatu. Koeficijent varijacije iznosio je 10-20%.

Analozi bez metionina na poziciji 14 (OMe analozi) i ciklični analozi bombezina

Poslednja grupa antagonista bombezina predstavljena je sa više različitih tipova jedinjenja. Dva analoga bombezina OMe tipa, analozi D-Phe⁶-BN (6-13)PA (RC-3800) i D-Phe⁶-BN (6-13)PA (RC-3810), imali su vrednosti IC₅₀ od oko 0.5 μM. Pokušaj sa septapeptidnim analogom, D-Trp⁶,Tpi¹¹-BN (6-11) (RC-4040), nije dao antagonist značajnije aktivnosti (IC₅₀ iznosio je samo 6.5 μM). Izdvaja se i čitava grupa heptapeptida tj. analoga bombezina (6-12). Među ovom grupom jedinjenja, značajniji afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 ćelijama pokazao je analog RC-4125 strukture D-Trp⁶,Tpi¹¹-BN (6-12). Svi ostali heptapeptidni analozi imali su vrednosti IC₅₀ u koncentracijama od 100 do 1000 nM, što ukazuje da je prisustvo aminokiseline na poziciji 13 značajno radi očuvanja biološke aktivnosti antagonista kratkog peptidnog lanca.

Posebno treba izdvojiti grupu sa cikličnom strukturom C-terminala: RC-3950, RC-3955 i RC-3985II. Ova grupa jedinjenja pokazala je najveći afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 ćelijama sa IC₅₀ vrednostima i ispod 1 nM. Analozi sa sličnom strukturom ali bez cikličnog C-terminala pokazivali su daleko slabiju aktivnost (analozi RC-3950I i RC-3985I). Na Tabeli 12 prikazana je aminokiselinski sastav OMe analoga (RC-3800 i RC-3810), septapeptidnih (RC-4040), heptapeptidnih (analozi 6-12) i cikličnih bombezinskih antagonista (RC-3950, RC-3955 i RC-3985II) kao i njihova sposobnost da inhibišu specifično vezivanje obeleženog Tyr⁴-BN za receptora mesta na intaktnim Swiss 3T3 ćelijama u kulturi.

Tabela 12. Biološka aktivnost OMe bombezinskih analoga (analози RC-3800 i RC-3810), bombezina (6-12) analoga kao i analoga sa cikličnim C-terminalom.

Bombezinski analog		Inhibicija vezivanja $^{125}\text{I-Tyr}^4\text{-BN}$ za Swiss 3T3 ćelije ($\text{IC}_{50}, \text{nM}$)
RC-4040	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹¹ -BN (6-11)	6500
RC-3800	D-Phe ⁶ -BN (6-13)PA	500
RC-3810	D-Phe ⁶ -BN (6-13)OEt	410
RC-4090	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	700
RC-3530	Tpi ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	110
RC-4020	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)PA	1500
RC-4010	D-Trp ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)OH	930
RC-4030	Tpi ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	240
RC-3715	D-Trp ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	170
RC-4125	D-Trp ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)PA	18
RC-3710	D-Tpi ⁶ ,Trp ¹² -BN (6-12)	4200
RC-4140	D-Pal ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	110
RC-4150	D-Cpa ⁶ ,Tpi ¹² -BN (6-12)	950
	CH ₂	
RC-3950	D-Phe ⁶ ,CH ₂ -Cys ¹⁴ -BN (6-14)	0.11
RC-3950II	D-Phe ⁶ ,CH ₂ NH-Cys ¹⁴ -BN (6-14)	73
	CH ₂	
RC-3955	D-Trp ⁶ ,CH ₂ N-Cys ¹⁴ -BN (6-14)	0.18
	CH ₂	
RC-3985II	D-Phe ⁶ ,CH ₂ N-Pen ¹⁴ -BN (6-14)	1.8
RC-3985I	D-Phe ⁶ ,CH ₂ N-Pen ¹⁴ -BN (6-14)	5.4

EFEKT ANTAGONISTE BOMBEZINA RC-3095 NA RAST ĆELIJSKIH LINIJA HUMANIH KARCINOMA PLUĆA I DOJKE

U nekoliko eksperimenata ispitivan je efekt D-Tpi⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-bombezina(6-14) (RC-3095), na brzinu rasta ćelijske linije humanog SCLC NCI H-345 i dve ćelijske linije humanih karcinoma dojke: MDA-MB-231 i MCF-7 MIII.

Eksperimenti sa ćelijskom linijom H-345 rađeni su na dva načina.

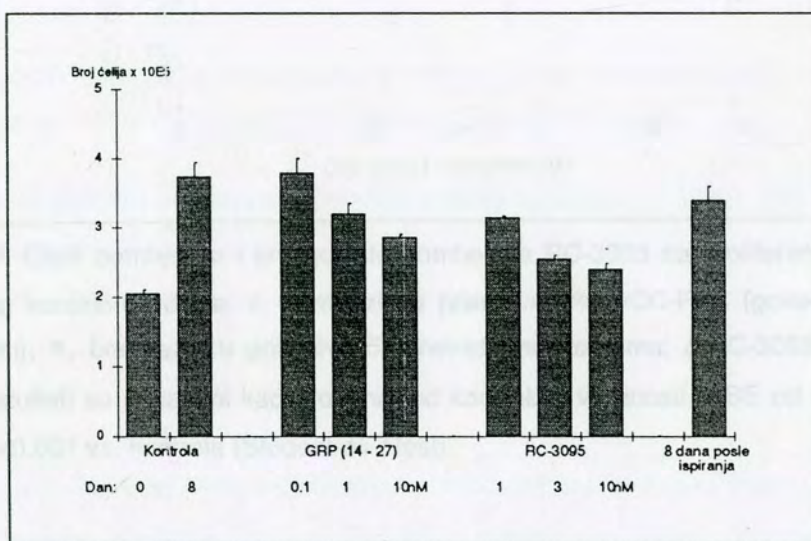
Prvo, ispitivan je efekt različitih koncentracija RC-3095 na broj kolonija H-345 ćelija koje su rasle u polu-čvrstoj podlozi, u agarozu. U kontrolnim posudama, kojima nije dodat RC-3095, broj kolonija ≥ 0.2 mm, formiranih posle 21-og dana inkubacije na 37°C, iznosio je 71 ± 6.5 (srednja vrednost \pm SE). U koncentraciji od 50 nM, RC-3095 je smanjio broj poraslih kolonija H-345 ćelija za 48%. Naime, broj kolonija u posudama sa RC-3095 iznosio je 36 ± 5.4 ($p < 0.01$).

U drugom eksperimentu ispitivan je efekt GRP(14-27) i RC-3095 na rast H-345 ćelija koje su rasle u suspenziji. Rezultate ovih eksperimenata prikazuje Slika 15.

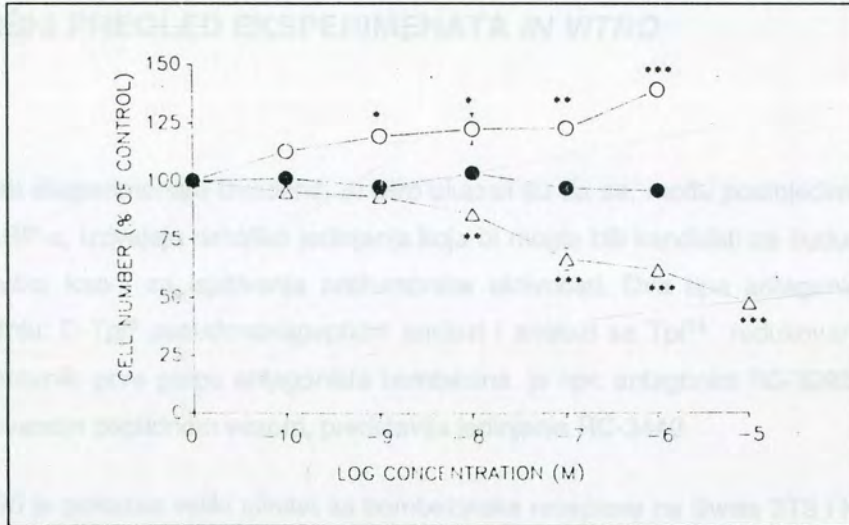
RC-3095, u koncentracijama 1, 3 i 10 nM inhibisao je rast ćelija u suspenziji. Efekt je bio dozno-zavisan i reverzibilan, jer su ćelije nastavile da rastu kada je iz hranljive podloge uklonjen RC-3095. Interesantno je da je GRP(14-27), slično antagonisti bombezina RC-3095, inhibisao rast H-345 ćelija u suspenziji, mada je njegov efekt bio slabiji od RC-3095 (Slika 15).

Slike 16 i 17 predstavljaju rezultate eksperimenata sa ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke, MDA-MB-231 i MCF-7 MIII.

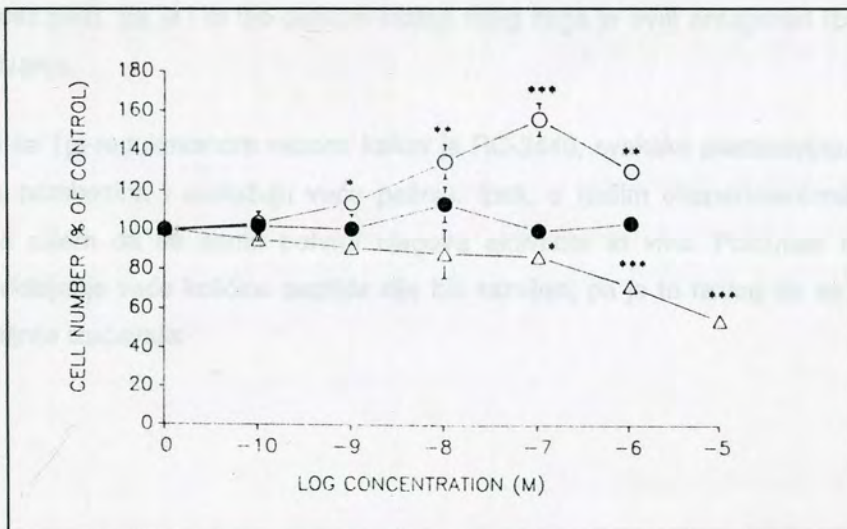
Može se videti da bombezina, u koncentraciji između 10^{-9} i 10^{-6} M, stimuliše rast MDA-MB-231 i MCF-7 MIII ćelija, ali samo u prisustvu goveđeg seruma tretiranog aktivnim ugljem (koji uklanja većinu faktora rasta iz goveđeg seruma) na način opisan u poglavlju Materijal i Metode. Maksimalni efekt bombezina, od oko 40% porasta broja ćelija u odnosu na kontrolu, uočen je pri koncentraciji od 10^{-6} M za MDA-MB-231 i 10^{-7} M za MCF-7 MIII ćelije. U prisustvu netretiranog goveđeg seruma, bombezina nije stimulisao rast ćelija. U prisustvu seruma obrađenog aktivnim ugljem, RC-3095 je dozno-zavisno inhibisao rast kako MDA-MB-231 tako i MCF-7 MIII ćelija (Slike 16 i 17). U koncentraciji od 10^{-5} M, RC-3095 je smanjio broj ćelija za 50%.



Slika 15. Peptid D-Tpi⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-bombezina(6-14) reverzibilno inhibiše rast H-345 ćelijske linije humanog SCLC u suspenziji. Ćelije su održavane u modifikovanoj RPMI 1640 hranljivoj podlozi, tzv. HITES podloga (sadrži sledeće dodatke: 10 nM hidrokortizona, 5 µg/ml insulina, 100 µg/ml transferina, 10 nM 17β-estradiola i 30 nM natrijum selenita), obogaćenoj sa 2.5% CFBS, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂/95% vazduha na 37° C. Ćelije su ispirane 2 puta i resuspendovane u gustini od 2 x 10⁵ ćelija na ml u posude bez peptida (kontrola) ili u prisustvu naznačenih koncentracija GRP(14-27) i RC-3095. Broj ćelija je određivan posle 8 dana Coulter Counter-om (Model ZF). Ćelije koje su rasle u prisustvu RC-3095, ispirane su 2 puta, resuspendovane u svežu hranljivu podlogu, i njihov broj je ponovo određen posle dodatnih 8 dana inkubacije. Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti (± SE) od tri eksperimenta.



Slika 16. Efekt bombezina i antagoniste bombezina RC-3095 na proliferaciju MDA-MB-231 ćelija humanog karcinoma dojke. 0, bombesin u prisustvu 5% DCC-FBS (goveđi serum tretiran aktivnim ugljem); ●, bombesin u prisustvu 5% netretiranog seruma; Δ, RC-3095 u prisustvu 5% DCC-FBS. Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolnih vrednosti ± SE od 8 polja. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. kontrola (Student-ov t -test).



Slika 17. Efekt bombezina i antagoniste bombezina RC-3095 na proliferaciju MCF-7 MIII ćelija humanog karcinoma dojke. 0, bombesin u prisustvu 5% DCC-FBS (goveđi serum tretiran aktivnim ugljem); ●, bombesin u prisustvu 5% netretiranog seruma; Δ, RC-3095 u prisustvu 5% DCC-FBS. Rezultati su prikazani kao procenat od kontrolnih vrednosti ± SE od 8 polja. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. kontrola (Student-ov t -test).

ZAVRŠNI PREGLED EKSPERIMENTATA *IN VITRO*

Rezultati eksperimenata izvedenih *in vitro* ukazali su da se, među postojećim antagonistima bombezina/GRP-a, izdvajaju nekoliko jedinjenja koja bi mogla biti kandidati za buduća ispitivanja u uslovima *in vivo*, kao i za ispitivanja antitumorske aktivnosti. Dva tipa antagonista bombezina zaslužuju pažnju: D-Tpi⁶ pseudonapeptidni analozi i analozi sa Tpi¹⁴ redukovanom peptidnom vezom. Predstavnik prve grupe antagonista bombezina je npr. antagonist RC-3095. Drugu grupu, sa Tpi redukovanom peptidnom vezom, predstavlja jedinjenje RC-3440.

RC-3095 je pokazao veliki afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 i H-345 ćelijama: 8 i 10 nM. Ovaj analog je za 50% inhibisao stimulantni efekt GRP-a prema Swiss 3T3 ćelijama u koncentraciji od 10 nM (mereno inhibicijom inkorporacije obeleženog timidina u DNK ćelija). Inhibisao je za oko 50% rast kolonija H-345 ćelija u koncentraciji od 50 nM. U istoj koncentraciji inhibisao je za 50% stimulantni efekt GRP-a na acinuse pankreasa pacova. Zbog prisustva hidrofobne aminokiselin na N-terminalu aminokiselinskog lanca, kakva je D-Tpi, RC-3095 može da bude otporniji na proteolitički efekt enzima seruma i da tako ima duži polu-život u plazmi od drugih analoga bombezina. Postupak sinteze RC-3095 mogao se zaštititi patentom (priznata je originalnost postupka), pa je i to bio dodatni razlog zbog čega je ovaj antagonist izabran za dalja, detaljnija ispitivanja.

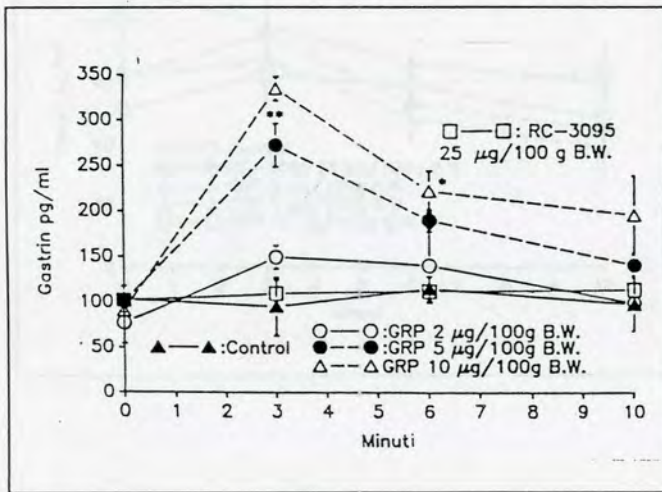
Analozi sa Tpi-redukovanom vezom, kakav je RC-3440, svakako predstavljaju novinu među antagonistima bombezina i zaslužuju veću pažnju. Ipak, u našim eksperimentima, ovaj analog ispitivan je sa ciljem da se samo potvrdi njegova aktivnost *in vivo*. Postupak sinteze koji bi omogućavao dobijanje veće količine peptida nije bio razvijen, pa je to razlog da se aktivnost RC-3440 nije detaljnije izučavala.

AKTIVNOST ANTAGONISTA BOMBEZINA U EKSPERIMENTIMA *IN VIVO*

ENDOKRINI EFEKTI ANTAGONISTA BOMBEZINA KOD PACOVA

Efekt GRP(14-27) na koncentracije gastrina, hormona rasta, insulina i glukagona u serumu

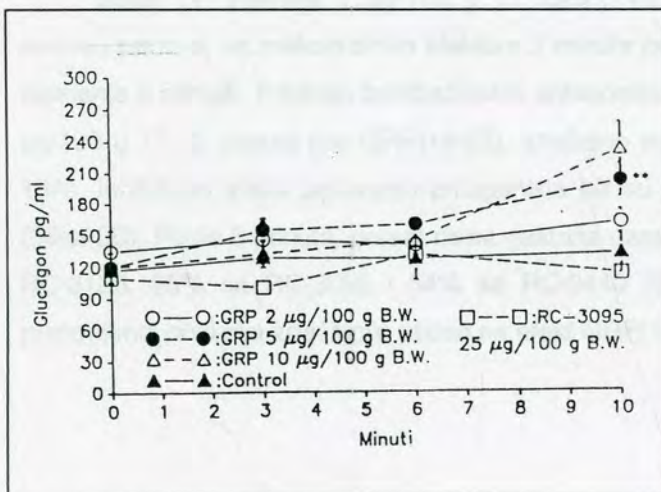
Intravenska injekcija GRP(14-27), u dozi 5 i 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ telesne težine (TT), uzrokovala je dozno-zavisni porast koncentracije gastrina u serumu muških pacova anesteziranih pentobarbitonom (Slika 18A). Maksimalni porast koncentracije gastrina registrovan je oko 3 minuta



posle injekcije GRP(14-27). Niža doza (2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT), kao i injekcija fiziološkog rastvora (kontrola), nije značajnije menjala koncentraciju gastrina u serumu pacova.

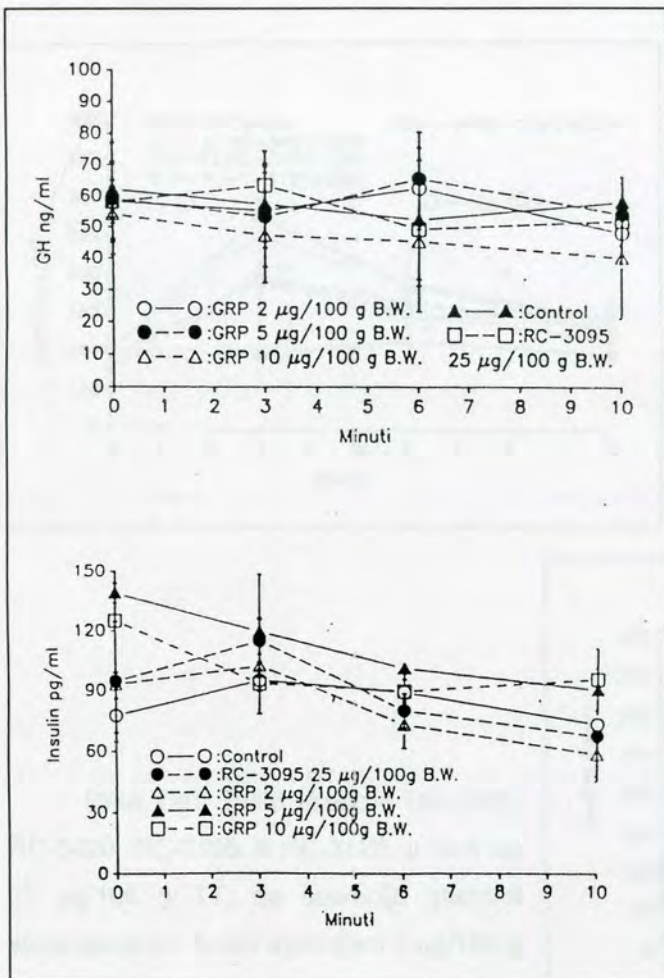
Slika 18A. (Objašnjenje u legendi slike 18D).

Koncentracija glukagona u plazmi pacova nije se značajnije promenila 3 i 6 minuta posle injekcije 2, 5 ili 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT, ali je zapažen odloženi porast u koncentraciji glukagona 10 minuta posle injekcije GRP(14-27) (Slika 18B).



Slika 18B. (Objašnjenje u legendi slike 18D)

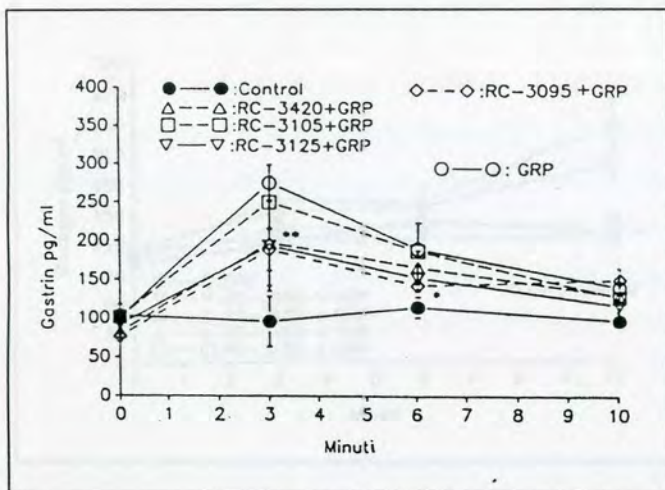
Ni jedna od tri primenjene doze GRP(14-27) nije uticala na koncentracije hormona rasta ili insulina u serumu anesteziranih pacova (Slika 18C i 18D).



Slika 18 A-D. Promene u koncentracijama gastrina (A), glukagona (B), hormona rasta (C) i insulina (D) posle i.v. bolus injekcije GRP(14-27) u dozama 2, 5 i 10 µg/100 g TT ili RC-3095 u dozi od 25 µg/100 g TT pacovima anestetsanim pentobarbitonom.

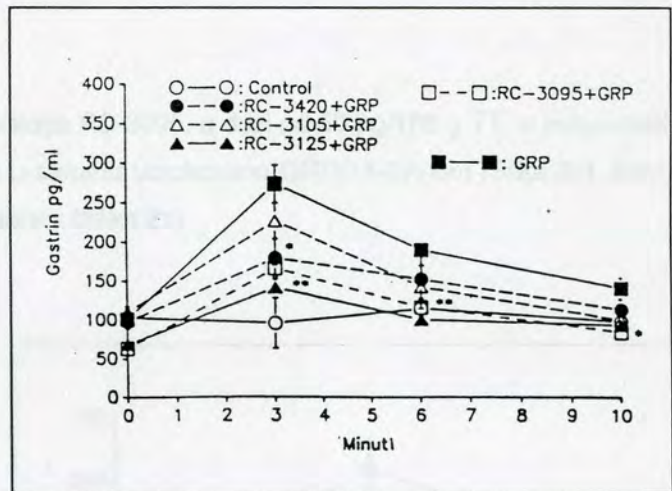
Efekt D-Trp⁶ i D-Tpi⁶ pseudonapeptidnih antagonista bombezina RC-3095, RC-3420, RC-3125 i RC-3105 na endokrine efekte GRP(14-27)-a

Bolus i.v. injekcija 5 µg/100 g TT GRP(14-27) uzrokuje porast koncentracije gastrina u serumu pacova, sa maksimalnim efektom 3 minuta posle injekcije i trajanjem efekta u vremenu od najmanje 6 minuta. Injekcije bombezinskih antagonista RC-3095, RC-3420 i RC-3125, u dozi od 5 µg/100 g TT, 2 minuta pre GRP(14-27), značajno su ($p < 0.01$) inhibisale efekt GRP(14-27) (Slika 19A). Inhibitorni efekti ispitivanih antagonista bili su još izraženiji posle doze od 25 µg/100 g TT (Slika 2B). Posle 3 minuta, porast nivoa gastrina uzrokovan GRP(14-27) bio je inhibiran za 75% sa RC-3125, 65% sa RC-3095 i 54% sa RC-3440 (Slika 19A). Antagonist RC-3105 ni u jednoj primenjenoj dozi nije značajnije uticao na efekt GRP(14-27).



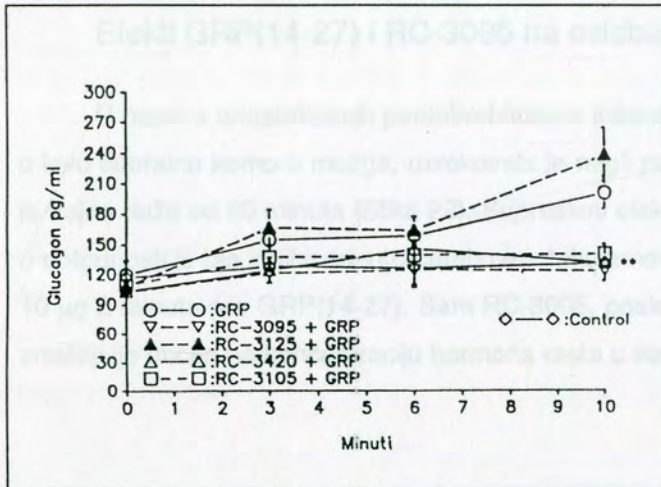
Slika 19 A. Efekt injekcije RC-3095, RC-3420, RC-3105 ili RC-3125, u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT, na sekreciju gastrina stimulisanu i.v. bolus injekcijom 5 $\mu\text{g}/100$ g TT GRP(14-27)-a pacovima anestetsanim pentobarbitonom.

Slika 19B. Efekt injekcije RC-3095, RC-3420, RC-3105 ili RC-3125, u dozi od 25 $\mu\text{g}/100$ g TT, na sekreciju gastrina stimulisanu i.v. bolus injekcijom 5 $\mu\text{g}/100$ g TT GRP(14-27)-a pacovima anestetsanim pentobarbitonom.



Maksimalni porast koncentracije glukagona u plazmi, posle injekcije GRP(14-27) u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT, bio je posle 10 minuta od injekcije (Slika 18B).

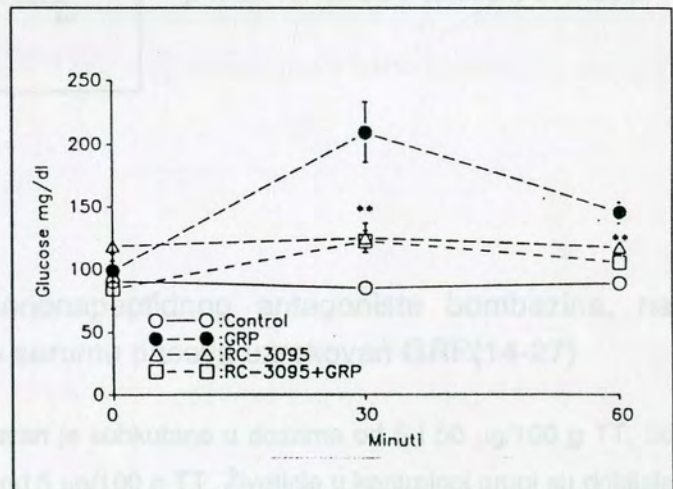
Bombezinski antagonisti RC-3095, RC-3105 i RC-3420, u dozama od 5 i 15 $\mu\text{g}/100$ g TT, skoro su u potpunosti suprimirali porast glukagona uzrokovan GRP(14-27)-om. Slika 20 prikazuje efekte bombezinskih analoga u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT. Antagonist RC-3125 nije značajnije uticao na efekt GRP(14-27). Šta više, RC-3125 je pokazao određeni agonistički efekt u smislu povećanja koncentracije glukagona u plazmi.



Slika 20. Efekt i.v. injekcije RC-3095, RC-3420, RC-3105 ili RC-3125, u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT, na sekreciju gastrina stimulisanu i.v. bolus injekcijom 5 $\mu\text{g}/100$ g TT GRP(14-27) kod pacova anestetisanih pentobarbitonom.

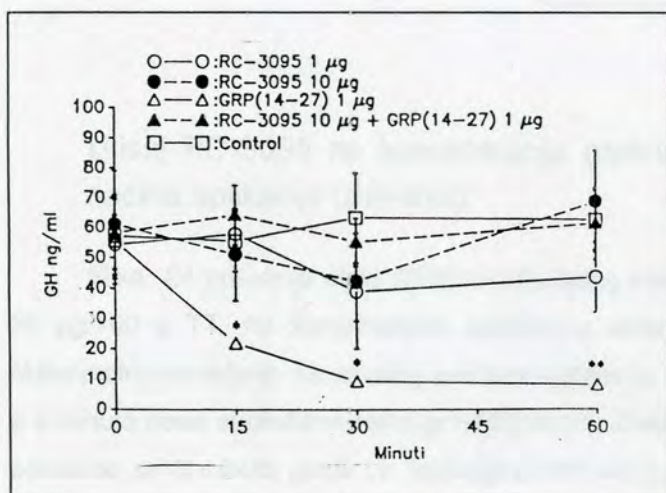
Subkutana injekcija bombezinskog analoga RC-3095, u dozi od 50 $\mu\text{g}/100$ g TT, u potpunosti je sprečila povećanje koncentracije glukoze u serumu uzrokovano GRP(14-27)-om (Slika 21). Sam RC-3095 nije značajnije menjao glikemiju pacova (Slika 21).

Slika 21. Glikemija kod pacova posle s.c. injekcije GRP(14-27), RC-3095 ili njihove kombinacije u dozi od 50 $\mu\text{g}/100$ g TT.



Efeki GRP(14-27) i RC-3095 na oslobađanje hormona rasta kod pacova

U pacova anestetisanih pentobarbitonom intracerebroventrikularna injekcija 1 μg GRP(14-27) u levu lateralnu komoru mozga, uzrokovala je nagli pad koncentracije hormona rasta u serumu koji je trajao duže od 60 minuta (Slika 22). Supresivni efekt GRP(14-27) na oslobađanje hormona rasta, u potpunosti je bio inhibisan intracerebroventrikularnom injekcijom RC-3095, primenjenog u dozi od 10 μg 2 minuta pre GRP(14-27). Sam RC-3095, posle intracerebroventrikularnog ubrizgavanja, nije značajnije uticao na koncentraciju hormona rasta u serumu.

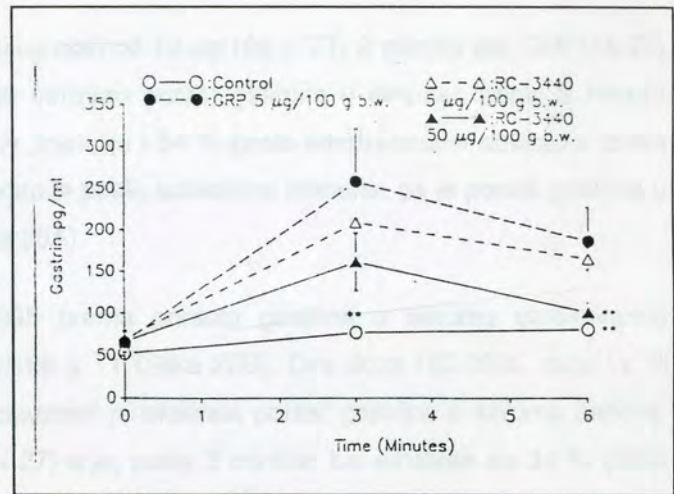


Slika 22. Efekt intracerebroventrikularne injekcije GRP(14-27) u dozi od 1 μg , RC-3095 u dozi od 1 i 10 μg ili kombinacije RC-3095 i GRP(14-27) na oslobađanje hormona rasta kod pacova anestetisanih pentobarbitonom. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontrola (Student-ov t -test).

Efekt RC-3440, Tpi¹⁴ pseudononapeptidnog antagoniste bombezina, na porast koncentracije gastrina u serumu pacova uzrokovan GRP(14-27)

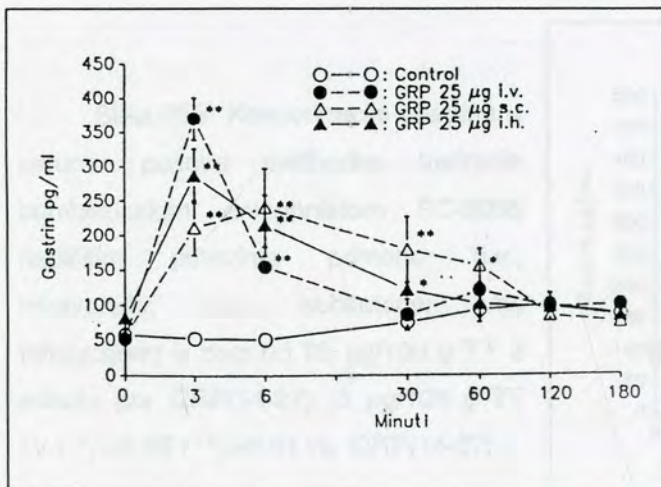
Bombezinski antagonist RC-3440 davan je subkutano u dozama od 5 i 50 $\mu\text{g}/100$ g TT, 30 minuta pre i.v. injekcije GRP(14-27) u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT. Životinje u kontrolnoj grupi su dobijale fiziološki rastvor. Uzorci krvi uzimani su iz jugularne vene 3 i 6 minuta posle injekcije GRP(14-27). Kako se sa Slike 23 može videti, RC-3440 je suprimirao efekt GRP(14-27). RC-3440 u dozi od 5 $\mu\text{g}/100$ g TT inhisirao je efekt GRP(14-27) za 36%, a u dozi od 50 $\mu\text{g}/100$ g TT za 57%.

Slika 23. Serumske koncentracije gastrina kod pacova prethodno tretiranih s.c. injekcijom bombezinskog antagonista RC-3440 u dozi od 5 i 50 $\mu\text{g}/100\text{ g TT}$ 30 min pre i.v. injekcije GRP(14-27) u dozi od 5 $\mu\text{g}/100\text{ g TT}$. ** $p < 0.01$ vs. GRP (Student-ov t -test).



Uticaj RC-3095 na koncentraciju gastrina u serumu pacova posle različitih načina aplikacije (davanja)

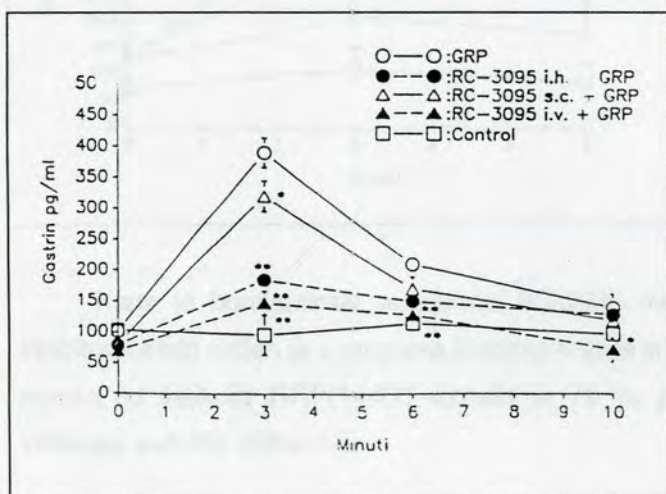
Slika 24 prikazuje efekt GRP(14-27), datog intravenski, subkutano ili inhalacijom u dozi od 25 $\mu\text{g}/100\text{ g TT}$, na koncentraciju gastrina u serumu pacova anestetisanih pentobarbitonom. Maksimalno povećanje serumskog gastrina uočeno je 3 minuta posle i.v. i intratrahealnog davanja, a 6 minuta posle subkutane injekcije GRP(14-27). Značajan porast koncentracije gastrina u serumu održavao se 6 minuta posle i.v. injekcije GRP(14-27), 30 minuta posle intratrahealno i 60 minuta posle subkutano datog GRP(14-27) (Slika 24).



Slika 24. Efekt GRP(14-27), datog intravenski (i.v.), subkutano (s.c.) i inhalacijom (i.h.) u dozi od 25 $\mu\text{g}/100\text{ g TT}$, na koncentraciju gastrina u serumu pacova. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. kontrola.

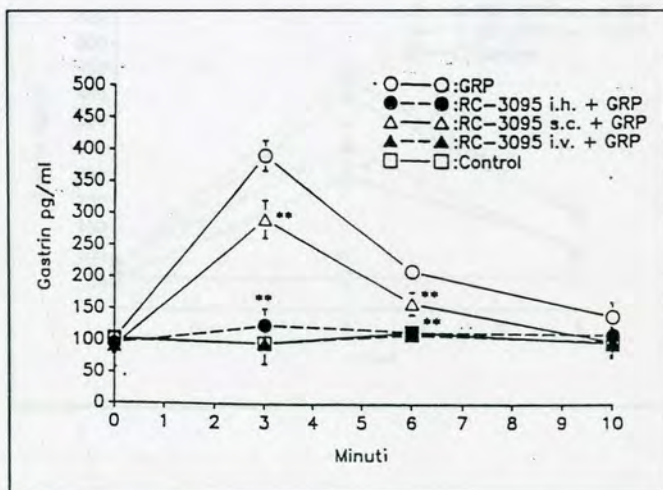
RC-3095, dat inhalacijom ili intravenski u dozi od 10 µg/100 g TT, 2 minuta pre GRP(14-27) (5 µg/100 g TT), singnifikantno ($p < 0.01$) je inhisirao porast gastrina u serumu; posle 3 minuta porast gastrina je inhisiran za 70 % posle i.v. injekcije i 54 % posle intratrahealne aplikacije (Slika 25A). Najslabiji inihbitorni efekt RC-3095 uočen je posle subkutane primene, pa je porast gastrina u 3-oj minuti bio inhibisan samo za 30 % (Slika 25A).

Još snažniji inhibitorni efekt RC-3095 prema porastu gastrina u serumu uzrokovanog GRP(14-27) uočen je posle doze od 25 µg/100 g TT (Slika 25B). Ova doza RC-3095, data i.v. ili inhalacijom 2 minuta pre GRP(14-27) u potpunosti je blokirala porast gastrina u serumu pacova. Posle s.c. primene RC-3095, efekt GRP(14-27)-a je, posle 3 minuta, bio inhibiran za 34 % (Slika 25B).

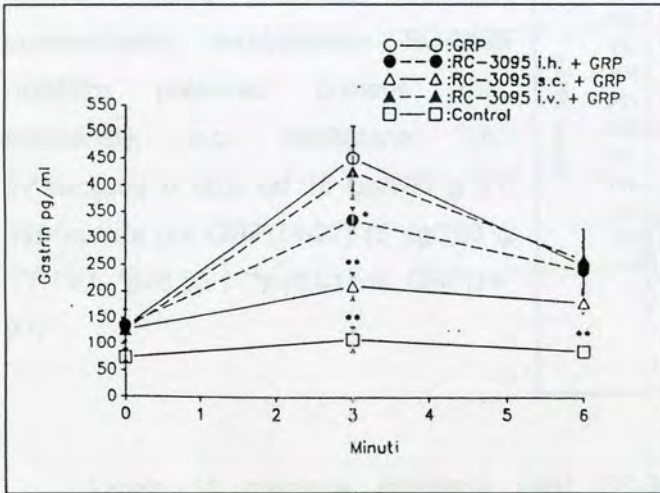


Slika 25A. Koncentracije gastrina u serumu pacova prethodno tretiranih bombezinskim antagonistom RC-3095 različitim putevima primene (i.v., intravenski; s.c., subkutano; i.h., inhalacijom) u dozi od 10 µg/100 g TT 2 minuta pre GRP(14-27) (5 µg/100 g TT i.v.). * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs. GRP(14-27).

Slika 25B. Koncentracije gastrina u serumu pacova prethodno tretiranih bombezinskim antagonistom RC-3095 različitim putevima primene (i.v., intravenski; s.c., subkutano; i.h., inhalacijom) u dozi od 25 µg/100 g TT 2 minuta pre GRP(14-27) (5 µg/100 g TT i.v.). * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs. GRP(14-27).



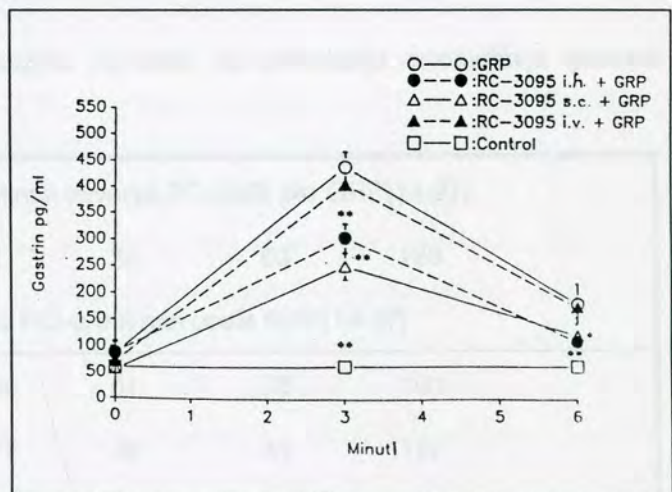
RC-3095 dat inhalacijom ili subkutano, u dozi od 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT 30 minuta pre GRP(14-27), je značajno ($p < 0.01$), inhibisao porast oslobađanja gastrina uzrokovan GRP(14-27) (Slika 26). Za razliku od s.c. i intratrahealne primene, RC-3095 dat intravenskom injekcijom 30 minuta pre GRP(14-27) nije značajnije menjao efekt GRP(14-27) (Slika 26).



Slika 26. Koncentracije gastrina u serumu pacova prethodno tretiranih bombazinskim antagonistom RC-3095 različitim putevima primene (i.v., intravenski; s.c., subkutano; i.h., inhalacijom) u dozi od 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT 30 minuta pre GRP(14-27) (5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT i.v.). * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs. GRP(14-27).

Kada je bombazinski antagonist RC-3095 davan 60 minuta pre GRP(14-27), značajniji inhibicioni efekt uočen je u grupama životinja kojima je RC-3095 davan subkutano (inhibicija posle 3 minuta od injekcije GRP(14-27) iznosila je 72 %, $p < 0.01$) ili intratrahealnim aerosolom (46 % inhibicija, $p < 0.05$) (Slika 27).

Slika 27. Koncentracije gastrina u serumu pacova prethodno tretiranih bombazinskim antagonistom RC-3095 različitim putevima primene (i.v., intravenski; s.c., subkutano; i.h., inhalacijom) u dozi od 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT 60 minuta pre GRP(14-27) (5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ TT i.v.). * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ vs. GRP(14-27).



U eksperimentima u kojima je RC-3095 davan ili i.v. ili s.c. ili inhalacijom 120 minuta pre i.v. injekcije GRP(14-27), nije zapažen značajniji inhibični efekt na stimulaciju oslobađanja gastrina (Slika 28).

Slika 28. Koncentracije gastrina u serumu pacova prethodno tretiranih bombazinskim antagonistom RC-3095 različitim putevima primene (i.v., intravenski; s.c., subkutano; i.h., inhalacijom) u dozi od 10 µg/100 g TT 120 minuta pre GRP(14-27) (5 µg/100 g TT i.v.). *p<0.05 i **p<0.01 vs. GRP(14-27).

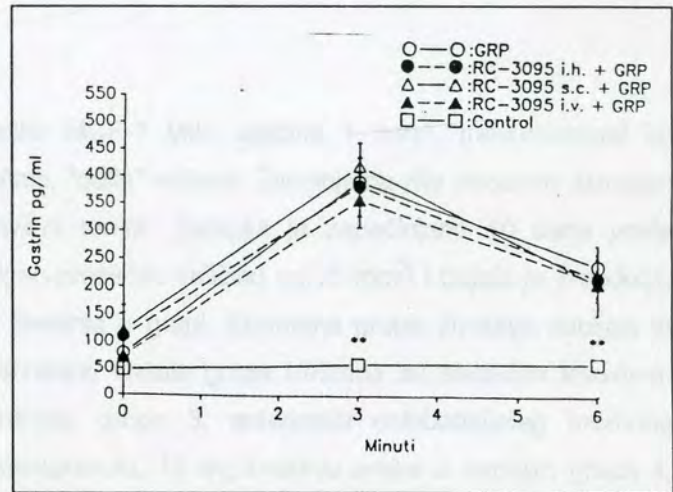


Tabela 13 prikazuje inhibični efekt RC-3095 na stimulaciju oslobađanja gastrina uzrokovanog GRP(14-27) izražen kao površine ispod krive (PIC) za period 0-6 minuta posle injekcije GRP(14-27). Analiza inhibicije PIC-ova gastrinskih odgovora, za različita vremena davanja RC-3095 (2, 30, 60 i 120 min pre GRP(14-27)), pokazala je da prosečna biološka iskoristljivost RC-3095 posle intratrahealne inhalacije iznosi 69% od iskoristljivosti posle s.c. injekcije.

Tabela 13. Efekt antagoniste bombazina RC-3095 na stimulaciju oslobađanja gastrina uzrokovanu GRP(14-27).

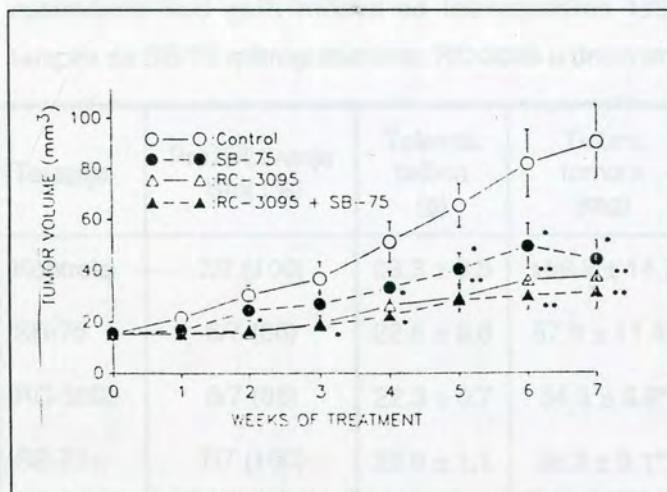
NAČIN APLIKACIJE	Minuti davanja RC-3095 pre GRP(14-27)			
	2	30	60	120
	% PIC-a 0-6 min posle GRP(14-27)			
Inhalacija	36	61	78	100
Subkutano	77	48	44	107
Intravenski	19	89	96	88

Efeti RC-3095 (10 µg/100 g TT), davanog različitim putevima 2, 30, 60 i 120 minuta pre GRP(14-27) (5 µg/100 g TT), zraženi su preko površina ispod krive (PIC) odgovora gastrina na GRP(14-27). Vrednost celokupnog odgovora gastrina na GRP(14-27) označena je kao 100%.

INHIBITORNI EFEKT ANTAGONISTA BOMBEZIN/GRP-A RC-3095 NA RAST MCF-7 MIII HUMANOG KARCINOMA DOJKE TRANSPLANTIRANOG GOLIM MIŠEVIMA

Ksenografti humanog karcinoma dojke MCF-7 MIII, veličine 1 mm^3 , transplantirani su subkutano u bočni predeo leđa ženki atimičnih, "golih" miševa. Životinjama nije dodavan estrogen jer je MCF-7 MIII ćelijska estrogen-nezavisni tumor. Terapija je započinjana 40 dana posle transplantacije tumora, kada je tumor dostigao prosečnu veličinu od 15 mm^3 i trajala je 7 nedelja. Miševi su podeljeni u 4 grupe od po 6-7 životinja u grupi. Kontrolna grupa životinja dobijala je injekcije rastvarača u kojima su lekovi rastvarani. Ostale grupe tretirane su sledećim lekovima: grupa 2, antagonist RC-3095, $20 \mu\text{g/dnevno}$; grupa 3, antagonist oslobađajućeg hormona gonadotropina (LH_RH) SB-75 u obliku mikrogranula, 15 mg/životinju svake 2 nedelje; grupa 4, kombinaciju RC-3095 i SB-75. RC-3095 je rastvaran u 0.1% rastvoru DMSO u fiziološkom rastvoru i iniciran s.c. SB-75 mikrogranule su suspendovane u rastvaraču koji se sastojao od 2% karboksimetilceluloze i 1% Tween 80 u destilovanoj vodi. Suspenzija je inicirana iglom br. 18. Sve tri dimenzije tumora (dužina, širina i debljina) su merene jednom nedeljno. Zbog veoma sporog rasta ovog tumora, vreme udvostručavanja veličine tumora ("doubling time") izračunavano je koristeći čitav period rasta tumora.

Rast ksenografta MCF-7 MIII bio je spor ali kontinuiran. Rast tumora bio je inhibisan RC-3095, SB-75, kao i njihovom kombinacijom (Slika 29, Tabela 14). Značajnija inhibicija rasta tumora uočena je posle 2 nedelje terapije u grupi sa RC-3095 i grupi lečenoj kombinacijom RC-3095 i SB-75, dok je značajnija inhibicija rasta u grupi lečenoj monoterapijom SB-75 uočena tek posle 5 nedelja. Zapremina tumora na kraju eksperimenta i procenat promene u volumenu tumora bili su značajno smanjeni u svim lečenim grupama životinja, dok je vreme udvostručavanja tumora bilo prolongirano. Na kraju eksperimenta, nije bilo značajnije razlike među grupama u preživljavanju životinja, niti u njihovoj telesnoj težini, ali je zato težina tumora kao i tumorsko opterećenje (težina tumora u odnosu na telesnu težinu životinje) signifikantno sniženo terapijom u poređenju sa kontrolom (Tabela 15). Kombinovana terapija bila je po svim parametrima efikasnija u odnosu na terapiju pojedinim peptidnim analogima, iako razlika u efektima nije statistički značajna. Prosečne težine uterusu i ovarijuma bile su snižene u grupama koje su primale SB-75, sam ili u kombinaciji, ali ne i u grupi lečenoj sa RC-3095. Kako pokazuje Tabela 16, nivo serumskog luteinizirajućeg hormona (LH) bio je niži u grupama koje su dobijale SB-75. Slično tome, nivo IGF-I u serumu je značajno bio snižen u grupama koje su dobijale SB-75.



Slika 29. Zapremina tumora golih miševa sa MCF-7 MIII humanim karcinomom dojke u toku terapije antagonistom LH-RH u obliku mikrogranula, SB-75, bombesin/GRP antagonistom RC-3095 ili njihovom kombinacijom. Vertikalne linije predstavljaju SE srednjih vrednosti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontrola (Duncan-ovim novim testom multiplih rangova).

Tabela 14. Efekt terapije sa SB-75, RC-3095 i njihove kombinacije na volumen tumora, procenat povećanja volumena tumora, vreme udvostručavanja volumena tumora MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke kod golih miševa.

Terapija	Volumen tumora (mm ³)		% povećanja volumena od dan 0	Vreme udvostručavanja (dani)
	Početni	Finalni		
Kontrola	15.5 ± 2.2	89.5 ± 14.5	582 ± 49	20.0 ± 0.9
SB-75	15.3 ± 1.7	43.6 ± 7.6*	289 ± 53**	44.2 ± 8.8**
RC-3095	15.2 ± 1.8	37.6 ± 3.1**	255 ± 58**	46.8 ± 7.5*
SB-75 + RC-3095	15.1 ± 2.1	31.1 ± 6.8**	242 ± 57**	61.9 ± 14.4*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontrola (Duncan-ov test multiplih rangova).

Tabela 15. Preživljavanje, telesna težina, težina tumora i pojedinih organa, kao i tumorsko opterećenje kod golih miševa sa ksenograftima MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke posle terapije sa SB-75 mikrogranulama, RC-3095 u dnevnim injekcijama kao i njihovom kombinacijom.

Terapija	Preživljavanje Broj (%)	Telesna težina (g)	Težina tumora (mg)	Tumorsko opterećenje (mg/kg TT)	Težina uterusu (mg)	Težina ovarijuma (mg)
Kontrola	7/7 (100)	23.3 ± 0.5	106.2 ± 14.7	4.5 ± 0.6	65.0 ± 10	7.4 ± 0.6
SB-75	6/7 (86)	22.6 ± 0.8	57.0 ± 11.4*	2.7 ± 0.5*	37.4 ± 3.3*	4.7 ± 0.3**
RC-3095	6/7 (86)	22.3 ± 0.7	54.3 ± 6.2*	2.4 ± 0.3*	45.5 ± 7.0	5.8 ± 0.5
SB-75+	7/7 (100)	22.9 ± 1.1	38.3 ± 9.1**	1.8 ± 0.5**	36.6 ± 7.5*	4.0 ± 0.6**
RC-3095						

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SE. *p<0.05,**p<0.01 vs. kontrola (Duncan-ov test multiplih rangova)

Tabela 16. Koncentracije LH i IGF-I u serumu golih miševa sa ksenograftima MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke posle terapije mikrogranulama SB-75 , RC-3095 i njihovom kombinacijom.

Terapija	LH (ng/ml)	IGF-I (µg/ml)
Kontrola	0.26 ± 0.04	0.46 ± 0.02
SB-75	0.15 ± 0.01**	0.44 ± 0.04
RC-3095	0.25 ± 0.04	0.33 ± 0.04*
SB-75 + RC-3095	0.12 ± 0.02**	0.36 ± 0.04*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SE. *p<0.05,**p<0.01 vs. kontrola (Duncan-ov test multiplih rangova)

Histološki, tumori u kontrolnoj grupi su bili slabo diferencirani adenokarcinomi, sastavljeni od višeučelijskih ćelija aranžiranih u gnezda. Velika jedra često su sadržavala prominentna jedra. Tumori u tretiranim grupama pokazivali su sličnu strukturu. U središnjim delovima svih tumora pronađena je koagulaciona nekroza. Broj mitozu kao i ćelija u apoptozi nije bio značajnije promenjen ni u jednoj grupi životinja. Jedina histološka značajnija razlika među tumorima bilo je sniženje broja AgNOR u nukleolusima tumorskih ćelija (Tabela 17). Taj nalaz ukazuje na nižu proliferativnu sposobnost lečenih tumora u poređenju sa kontrolnim tumorima.

Tabela 17. Efekti terapije sa SB-75, RC-3095 i njihove kombinacije na histološke karakteristike MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke ksenografiranog u golim miševima.

Terapija	% površine nekroze	Broj mitozâ/1000 ćelija	Broj apoptotičkih ćelija/1000 ćelija	Broj AgNOR-a po nukleusu
Kontrola	40.1 ± 4.1	9.1 ± 1.0	8.4 ± 0.8	12.6 ± 0.3
SB-75	44.8 ± 7.0	6.6 ± 1.0	9.9 ± 1.7	11.2 ± 0.4*
RC-3095	44.1 ± 8.6	7.3 ± 0.5	10.0 ± 1.2	10.3 ± 0.3*
SB-75 + RC-3095	36.7 ± 9.7	9.2 ± 0.9	7.1 ± 1.0	11.0 ± 0.2*

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SE. * $p < 0.05$, vs. kontrola (Duncan-ov test multiplih rangova). AgNOR, agirolna organizacija nukleusa.

Preparacija membrana tumora za receptorske studije obavljena je prema postupku opisanom u poglavlju Materijal i Metode. Bombezinski receptori određivani su na intaktnim MCF-7 MIII ćelijama u kulturi, na sličan način kako je to opisano za Swiss 3T3 ćelije. MCF-7 MIII ćelije gajene su u Minimal Essential Medium (IMEM), bez fenol-crvenog, obogaćenog sa 5% DCC-FBS, tj. toplotom inaktivisanog seruma tretiranog aktivnim ugljem (DCC-FBS). Ovakvi uslovi podloge sprečavali su faktore rasta iz seruma da uzrokuju nishodnu regulaciju bombezinskih receptora.

Rezultate receptorskih studija prikazuje Tabela 17. Kod MCF-7 MIII ćelija u kulturi, rastuće doze neobebeženog bombezina inhibisale su specifično vezivanje obebeženog bombezina sa srednjom efektivnom dozom (ED_{50}) od oko 10^{-10} M. Scatchard-ova analiza ukazuje da se obebeženi bombezin vezivao za jednu vrstu receptorskih mesta velikog afiniteta ($K_D = 0.49$ nM). B_{max} iznosio je 8.41 pM, što odgovara nalazu od oko 2980 receptora/ćeliji odnosno, 113 fmol/mg proteina.

Tabela 17 pokazuje da su na ćelijskim membranama kontrolnih tumora prisutni receptori velikog afiniteta za EGF i IGF-I. Posle terapije bombezinskim antagonistom RC-3095 uočava se značajna redukcija maksimalnog kapaciteta specifičnog vezivanja EGF-a. Što se tiče receptorskih mesta za IGF-I, posle terapije sa RC-3095 uočava se porast vrednosti K_D , što ukazuje na sniženje afiniteta, s tim da je B_{max} povećana. U ćelijskim membranama tumora lečenih kombinacijom RC-3095 i SB-75, došlo je, isto tako, do sniženja maksimalnog kapaciteta vezivanja EGF, ali razlika nije značajna u poređenju sa kontrolnim tumorima. Značajan porast u vrednosti B_{max} za vezivanje IGF-I nastao je u tumorima posle kombinovane terapije RC-3095 i SB-75.

INHIBITORNI EFEKT ANTAGONISTE BOMBEZINA/GRP-a RC-3095 NA RAST ESTROGEN ZAVISNOG I ESTROGEN NEZAVISNOG MXT KARCINOMA DOJKE MIŠA

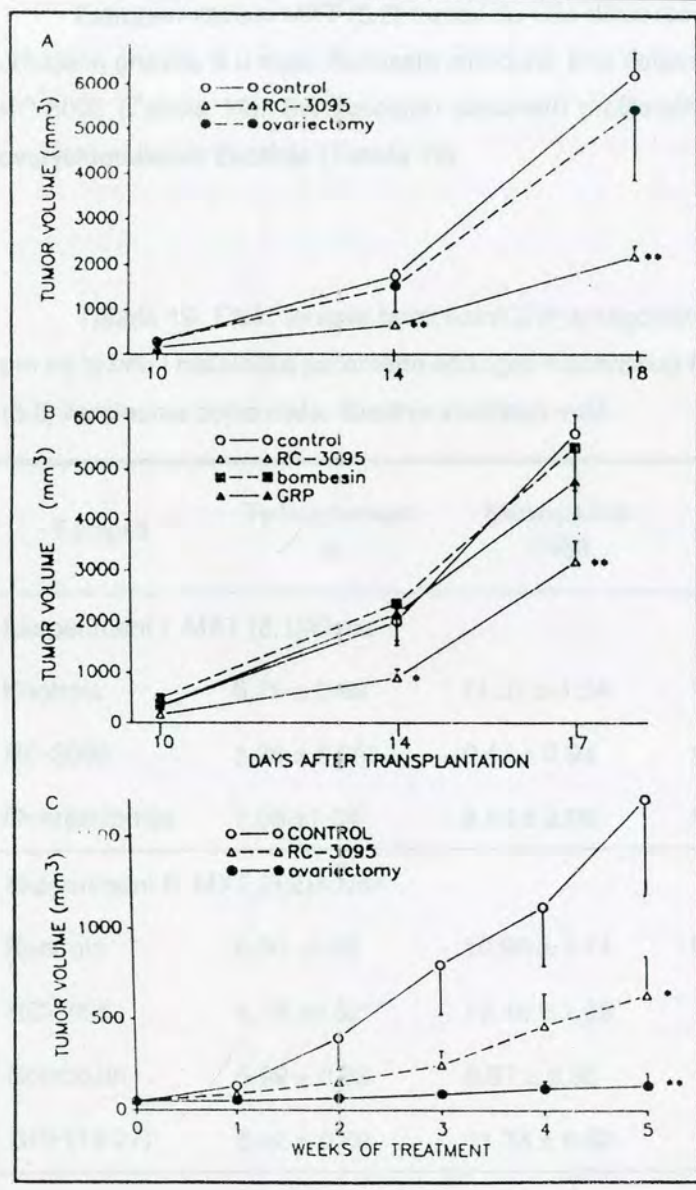
Izvedena su dva eksperimenta sa estrogen-nezavisnim modelom MXT karcinoma i jedan eksperiment sa estrogen-zavisnim MXT tumorima. Životinje u kontrolnim grupama primale su injekcije rastvarača (0.1% DMSO u fiziološkom rastvoru). Tabela 18 prikazuje eksperimentalne grupe u pojedinom eksperimentu kao i terapije koje su primenjivane. U estrogen-nezavisnom modelu MXT tumora, životinje su randomizovane u grupe 2 dana posle inokulacije tumora i terapija je započeta kako pokazuje Tabela 18. U eksperimentu II, miševi sa estrogen-nezavisnim tumorima primali su u jednoj grupi bombezina, a drugoj GRP(14-27) sa ciljem da se ispita mogući stimulantni efekt bombezinu-sličnih peptida na rast ovog tumora. U svim grupama bilo je po 10 miševa izuzev u grupi 3 u eksperimentu I, koju su činile 5 životinja. U estrogen-zavisnom modelu MXT tumora, tumori su bili merljivi oko 4 nedelje posle transplantacije kada je započinjana terapija. Svi peptidi davani su mini-osmotskim pumpama, model 2002 (videti Materijal i Metode).

Tabela 18. Eksperimenti sa estrogen-zavisnim i estrogen-nezavisnim MXT tumorima.

Tumorski model	Eksperiment br.	Grupa br.	Terapija
Estrogen-nezavisni MXT (3.2)/Ovex	I	1	Kontrola, rastvarač
		2	RC-3095, 20 µg/d
		3	Ovarijska tomija
	II	1	Kontrola, rastvarač
		2	RC-3095 20 µg/d
		3	Bombezina, 20 µg/d
		4	GRP(14-27), 20 µg/d
Estrogen-zavisni MXT (3.2)	III	1	Kontrola, rastvarač
		2	RC-3095, 20 µg/d
		3	Ovarijska tomija

Prosečna zapremina tumora u grupama životinja lečenih bombezina/GRP antagonistom D-Tp⁶, Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-bombezina(6-14) (RC-3095), u odnosu na zapreminu tumora kod netretiranih životinja, bila je značajno niža u sva tri eksperimenta (Slika 31, A, B i C). Terapija bombezinom ili peptidom koji oslobađa gastrin nije značajnije uticala na rast tumora (Slika 31B i

Tabela 19). Terapija sa RC-3095 uzrokovala je i značajno sniženje težine tumora u poređenju sa kontrolom. Hirurška ovarijektomija nije uticala na rast estrogen-nezavisnog MXT tumora, ali je skoro u potpunosti zaustavila rast estrogen-zavisnog tumorskog modela. Nije uočena razlika u telesnoj težini, težini jetre, bubrega ili ovarijuma između lečenih i nelečenih životinja (podaci nisu prikazani).



Slika 31. Zapremine MXT estrogen-nezavisnog (A i B) i MXT estrogen-zavisnog tumora dojke miša u toku terapije bombesinom, GRP-om, bombezinskim antagonistom RC-3095 i posle ovarijektomije. Vertikalne linije predstavljaju SE srednjih vrednosti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontrola (Duncan-ov test).

Histološki, estrogen-nezavisni MXT (3.2)/Ovex karcinom dojke miša bio je nediferentovan, invazivni tumor. Nije uočena razlika u histologiji tumora kod životinja koje su primale neku od terapija u odnosu na kontrolne životinje. Mitotički i apoptički indeksi bili su slični u svim grupama

(Tabela 19). Posle terapije sa RC-3095, u eksperimentu I, uočava se redukcija argirofilnih organizovanih regiona nukleolusa ($p < 0.01$ u odnosu na kontrolu), kao i njihovo povećanje u tumorima tretiranih bombezinom u ekperimentu II ($p < 0.05$ u odnosu na kontrolu). Broj spomenutih argirofilnih organizovanih regiona nukleolusa je indikator proliferativne sposobnosti tumorske ćelije.

Estrogen-zavisni MXT (3.2) tumori su više diferentovani i čine ga čvrste ćelije raspoređene u odvojena gnezda ili u male žlezdaste strukture. Broj ćelija u mitozu bio je nešto niži posle terapije sa RC-3095 (Tabela 19). Svi histološki parametri proliferativnosti tumora bli su sniženi u tumorima ovarijsktomisanih životinja (Tabela 19).

Tabela 19. Efekt terapije bombezin/GRP antagonistom RC-3095, bombezinom, GRP(14-27)-om na težinu i histološke parametre estrogen-nezavisnog MXT (3.2)/Ovex i estrogen-zavisnog MXT (3.2) karcinoma dojke miša. Srednje vrednosti \pm SE.

Terapija	Težina tumora g	Mitose/1000 ćelija	Apoptotičke ćelije/1000 ćel.	Broj argirofilnih regiona nukleolusa po nukleolusu
Eksperiment I: MXT (3.1)/Ovex				
Kontrola	6.75 \pm 0.49	11.27 \pm 1.54	11.41 \pm 2.22	7.26 \pm 0.14
RC-3095	3.38 \pm 0.35*	9.47 \pm 0.94	10.50 \pm 1.28	6.26 \pm 0.13*
Ovarijsktomija	7.06 \pm 1.04	8.43 \pm 2.09	12.39 \pm 2.03	7.28 \pm 0.18
Eksperiment II: MXT (3.2)/Ovex				
Kontrola	6.30 \pm 0.32	10.96 \pm 1.14	9.46 \pm 1.27	8.90 \pm 0.39
RC-3095	4.12 \pm 0.52**	12.18 \pm 1.33	17.40 \pm 4.79	8.62 \pm 0.27
Bombezin	5.99 \pm 0.89	8.67 \pm 0.95	10.09 \pm 1.90	10.08 \pm 0.53**
GRP(14-27)	5.42 \pm 0.89	11.33 \pm 0.62	12.32 \pm 2.73	9.60 \pm 0.19
Eksperiment III: MXT (3.2)				
Kontrola	2.12 \pm 0.47	5.54 \pm 0.71	5.45 \pm 1.13	12.04 \pm 0.22
RC-3095	0.89 \pm 0.20*	4.18 \pm 1.07	8.96 \pm 1.74	10.56 \pm 0.47*
Ovarijsktomija	0.16 \pm 0.08*	2.88 \pm 0.63**	8.41 \pm 0.95**	9.20 \pm 0.28*

* $p < 0.01$; ** $p < 0.05$, vs. kontrola (Duncan-ov test).

Koncentracije serumskog luteinizirajućeg hormona, hormona rasta, IGF-I, EGF i gastrina kod miševa na kraju eksperimenta prikazuje Tabela 20.

U eksperimentu I, miševi sa tumorima imali su više koncentracije hormona rasta u serumu u poređenju sa životinjama koje nisu imale tumor. Isto tako, snižene vrednosti hormona rasta imale su životinje tretirane RC-3095 ($p < 0.01$ vs. miševi bez tumora). Nivo gastrina u životinjama sa tumorima bio je takođe povišen u odnosu na životinje bez tumora, ali je terapija sa RC-3095 značajno snizila nivo gastrina u odnosu na kontrolne životinje sa tumorima ($p < 0.05$). U eksperimentu II, koncentracije gastrina i EGF-a u serumu bile su povišene kod životinja koje su dobijale bombezina ($p < 0.05$) ili GRP(14-27) ($p < 0.01$). U eksperimentima II i III, značajnije promene u koncentraciji IGF-I nisu uočene.

Tabela 20. Efekt bombezina/GRP antagoniste RC-3095, bombezina, GRP(14-27) i ovarijektomije na koncentracije luteinizirajućeg hormona, hormona rasta, IGF-I, EGF i gastrina u serumu miševa sa estrogen-nezavisnim (eksperiment I i II) i estrogen-zavisnim (eksperiment III) MXT tumorima dojke.

Terapija	LH, ng/ml	GH, ng/ml	IGF-I, ng/ml	EGF, pg/ml	Gastrin, pg/ml
Eksperiment I: MXT (3.1)/Ovex					
Kontrola	0.13 ± 0.01	11.02 ± 1.87			311.6 ± 25.8
RC-3095	0.12 ± 0.01	3.91 ± 0.46**			215.9 ± 37.1*
Ovarijektomija	0.25 ± 0.10*	14.60 ± 11.20			301.6 ± 57.3
Miševi bez MXT	0.19 ± 0.03	3.96 ± 0.26**			98.3 ± 6.8**
Eksperiment II: MXT (3.2)/Ovex					
Kontrola			222.3 ± 26.3	1549 ± 1191	114.8 ± 31.6
RC-3095			192.5 ± 16.4	4467 ± 481	104.9 ± 13.4
Bombezina			207.7 ± 16.5	4920 ± 1019*	175.1 ± 15.5*
GRP(14-27)			207.7 ± 10.9	6324 ± 791**	196.3 ± 17.0**
Eksperiment III: MXT (3.2)					
Kontrola	0.51 ± 0.10	5.05 ± 0.56	452.3 ± 37.1	2304 ± 167	
RC-3095	0.47 ± 0.11	5.99 ± 0.83	331.3 ± 58.9	3693 ± 95*	
Ovarijektomija	1.76 ± 0.23**	4.69 ± 0.84	438.2 ± 31.7	5433 ± 742**	

Srednje vrednosti ± SE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. kontrola (Duncan-ov test).

Receptori za EGF pokazani su na frakcijama membrana ćelija estrogen-nezavisnog MXT karcinoma dojke. U kontrolnim tumorima, obeleženi EGF vezivao se za jednu klasu receptorskih mesta velikog afiniteta ($K_D = 0.81 \pm 0.06 \times 10^{-9}$ M) (Tabela 21). Kapacitet vezivanja (B_{max}) EGF receptora iznosio je $0.21 \pm 0.016 \times 10^{-12}$ mol/mg membranskih proteina. Terapija sa RC-3095 značajno je ($p < 0.01$) redukovala maksimalni kapacitet vezivanja receptora za EGF na membranama tumora ($B_{max} = 0.03 \pm 0.003 \times 10^{-12}$ mol/mg proteina). Specifično vezivanje obeleženog EGF-a nije se moglo detektovati na membranama estrogen-zavisnih MXT tumora, što ukazuje na nepostojanje receptora za EGF.

Specifino vezivanje $^{125}\text{I-Tyr}^4$ -bombezina, velikog afiniteta, a malog kapaciteta pokazano je na membranama hormon-nezavisnog MXT tumora (Tabela 21). Na membranama tumora iz kontrolne grupe, RC-3095 je pokazao vrednost IC_{50} od 14 nM (IC_{50} je koncentracija RC-3095 koja uzrokuje 50% inhibicije specifičnog vezivanja obeleženog bombezina). Posle terapije sa RC-3095, došlo je do sniženja vrednosti B_{max} za bombezinske receptore (Tabela 21).

Tabela 21. Efekt RC-3095 na karakteristike receptora za EGF i bombezina na membranama estrogen-nezavisnih MXT (3.2)/Ovex karcinoma dojke miša.

Terapija	EGF		Bombezina	
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg prot.)	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg prot.)
Kontrola	0.81 ± 0.06	0.21 ± 0.016	0.8 ± 0.2	613 ± 70
RC-3095	1.53 ± 0.31	$0.03 \pm 0.003^{**}$	1.2 ± 0.3	$160 \pm 95^*$
Ovarijektomija	1.05 ± 0.09	0.23 ± 0.02		

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs. kontrola (Duncan-ov test). Karakteristike receptora dobijene su u eksperimentima sa 10 tačaka u triplikatima. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SE.

INHIBITORNI EFEKT RC-3095, ANTAGONISTE BOMBEZINA/GRP-a, NA RAST KARCINOMA PANKREASA HRČAKA INDUKOVANOG NITROZAMINOM

Prosečna telesna težina hrčaka na početku primene nitrozamina (BOP) bila je 97.7 g, a 153.5 g u vreme kada je započinjana terapija. U eksperiment uključeno je ukupno 22 životinja koje su podeljene u dve grupe. Kontrolnu grupu sačinjavalo je 12 hrčaka, a grupa koja je primala RC-3095 sastojala se od 10 životinja. RC-3095 je primenjivan tokom 8 nedelja mikro-osmotskim pumpama (Model 2ML4 koji oslobađa 2.5 μ l/h tokom 4 nedelje). Kontrolnoj grupi životinja implantirane su osmotske pumpe napunjene rastvaračem: 50% propilenglikola u vodi.

Na kraju eksperimenta, nije bilo značajnije razlike u prosečnim telesnim težinama životinja između grupa. U odnosu na kontrolnu grupu, terapija sa RC-3095 nije značajnije promenila težine jetre, bubrega, ovarijuma ili uterusa eksperimentalnih životinja (podaci nisu prikazani). Tabela 22 prikazuje broj životinja umrlih tokom terapije, broj životinja sa histološki verifikovanim tumorom kao i težinu pankreasa ili težinu tumoroznih pankreasa u dve grupe životinja. U kontrolnoj grupi tokom terapije umrlo je 2 od 12 životinja, a u grupi koja je dobijala RC-3095 nije bilo umrlih životinja. U grupi tretiranoj sa RC-3095, u 6 od 10 životinja histološki se mogao dokazati tumor pankreasa, dok je u kontrolnoj grupi svih 12 životinja imalo tumore (Tabela 22). U kontrolnoj grupi dve životinje, a u RC-3095 grupi jedna životinja su razvile invazivni karcinom pankreasa sa infiltracijom okolnih organa i tkiva: želudac, jetra, creva ili retroperitoneum. Prosečna težina pankreasa bila je značajno niža ($p < 0.05$) u grupi koja je primala RC-3095 u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Tabela 22). Veličina pojedinačnih tumora u pankreasu bila je različita, od 2 do 30 mm. Zbog multinodalnosti i ponekad konfluentnosti tumorskih masa, registrovana je težina tumorozno izmenjenih pankreasa, ali tek na osnovu histološke potvrde da se radi o tumorskom tkivu. Terapija bombезinskim antagonistom RC-3095 značajno je, za 87%, redukovala težinu tumoroznih pankreasa u poređenju sa kontrolom.

Tabela 22. Efekt terapije sa RC-3095 na preživljavanje životinja, učestalost karcinoma, težinu pankreasa i tumoroznih pankreasa hrčaka sa karcinomom pankreasa indukovano nitrozaminom.

Grupa	Broj umrlih /ukupan br životinja	Br. život.sa histološki dokazanim/ukupan br.	Težina pankreasa (g)	Težina tumoroznih pankreasa (g)	% inhibicije težine tumoroznih pankreasa
Kontrola	2/12	12/12	4.32 ± 2.75	4.32 ± 2.75	0
RC-3095	0/10	6/10	0.52 ± 0.08*	0.56 ± 0.08*	86.9

Srednje vrednosti ± SE, *p<0.05 Student-ov t test.

Histološki, BOP tumori su adenokarcinomi koji infiltrišu veće ili manje duktuse. Sastoje se od grupa ćelija sa cističnim i papilarnim strukturama u pojedinim regionima. Preblastozne lezije pronađene su u svim uzorcima pankreasa. Histološke parametre tumora u kontrolnoj grupi kao i u grupi koja je primala RC-3095 prikazuje Tabela 23. RC-3095 je značajno redukovao prosečan broj tumorskih nodula. Broj tumorskih nodusa određivan je sa histoloških preparata koji su sadržavali najviše tumorskog tkiva. Kod miševa tretiranih sa RC-3095 količina strome u tumorima je povećana, dok je broj mitozna na 100 žlezda bio prosečno 7.2 u grupi na RC-3095, a 12.8 u kontrolnoj grupi (ipak oba ova parametra se statistički značajnije ne razlikuju u pojedinim grupama). Broj AgNOR-a po ćeliji bio je značajno niži u grupi tumora lečenih RC-3095 (7.54 AgNOR/ćeliji vs. 10.23 u kontrolnoj grupi, p<0.01).

Tabela 23. Efekt terapije sa RC-3095 na histološke parametre BOP-indukovanih karcinoma pankreasa hrčaka.

Grupa	Broj tumorskih nodusa/životi-nji	Površina strome (%)	Broj mitozna/100 žlezda	Apoptotički indeks	Broj AgNOR/ćeliji
Kontrola	2.40 ± 0.7	20.20 ± 2.8	12.8 ± 2.1	18.0 ± 2.4	10.23 ± 0.5
RC-3095	0.78 ± 0.3*	30.17 ± 5.4	7.2 ± 3.2	28.0 ± 9.9	7.54 ± 0.4**

Srednje vrednosti ± SE; *p<0.05, **p<0.01.

Koncentracije gastrina u serumu hrčaka nisu bile značajnije promenjene u ispitivanim grupama životinja (podaci nisu prikazani).

Rezultate receptorskih analiza prikazuje Tabela 24.

Specifično vezivanje ^{125}I -Tyr⁴-bombezina pokazano je na preparatima membrana karcinoma pankreasa hrčaka indukovanoj injekcijama BOP-a. RC-3095 je inhibisao 50% specifičnog vezivanja obeleženog bombezina u koncentraciji od 0.7 nM. Karakteristike bombezinskih receptora nisu bile značajnije promenjene posle terapije životinja sa bombezinskim antagonistom RC-3095, izuzev što je vezivanje bilo nešto manjeg afiniteta (Tabela 24). EGF receptori takođe su dokazani na membranama BOP tumora. Visoko značajna redukcija maksimalnog kapaciteta vezivanja EGF-a uočena je u tumorima prethodno lečenim sa RC-3095 (Tabela 24).

Tabela 24. Karakteristike EGF i bombezinskih receptora na membranama karcinoma pankreasa hrčaka indukovanoj nitrozaminom posle terapije sa bombezinskim antagonistom RC-3095.

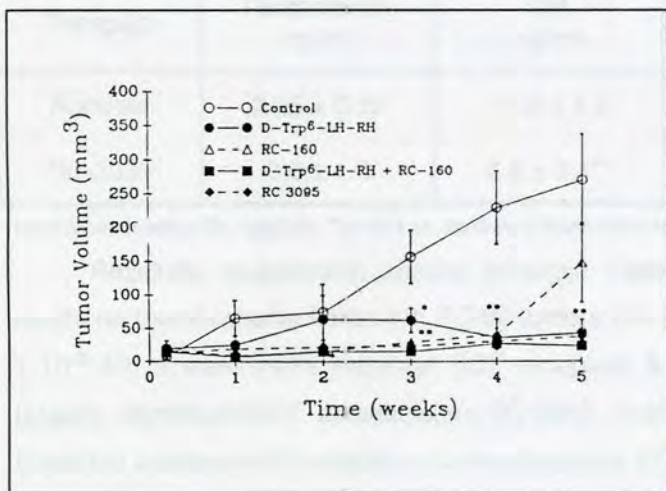
Terapija	Bombezinske karakteristike		EGF karakteristike	
	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg proteina)	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg proteina)
Kontrola	1.39 ± 0.81	305 ± 35	0.9 ± 0.23	77.16 ± 14.9
RC-3095	3.27 ± 0.66	283 ± 48	0.13 ± 0.012	4.89 ± 0.53*

Srednje vrednosti ± SE; *p<0.001, Duncan-ov test.

EFEKT ANTAGONISTE BOMBEZINA/GRP-a RC-3095 NA RAST PC-82 HUMANOG KARCINOMA PROSTATE U GOLIH MIŠEVA

PC-82 humani karcinom prostate dobijen je od Dr. John Isaacs-a, sa Odeljenja za urologiju, John Hopkins Univerziteta u Baltimoru. Životinja-donor žrtvovana je pod anestezijom Metofan-om, a tumor izvađen pod sterilnim uslovima. Tkivo tumora je isecano na sitne delove makazama, a zatim pasirano kroz sterilne žičane mreže veličina pora 1.5 i 0.5 mm. Tkivo je resuspendovano u RPMI 1640 hranljivoj podlozi i centrifugirano 5 minuta na 100 x g. Procedura je ponovljena i talogu je dodata jednaka zapremina Matrigel-a (Collaborative Research, Bedford, MA). Dve stotine mikrolitara ove suspenzije ćelija inicirano je s.c. u bočni deo leđa miševa. Ovakva procedura dovela je do 97% "primanja" tumora.

Mesec i po dana posle implantacije u potkožni sloj leđa golih miševa tumori su postali vidljivi, životinje su randomizovane u dve grupe od po 8. Kontrolna grupa je dobijala injekcije rastvarača a druga grupa subkutane injekcije RC-3095 u dozi od 20 µg dnevno. Terapija je trajala 5 nedelja. U toku tih 5 nedelja, tumori su u kontrolnoj grupi porasli od $7.7 \pm 3.9 \text{ mm}^3$ do $270 \pm 67.6 \text{ mm}^3$, što iznosi $1606 \pm 320 \%$ (srednja vrednost \pm SE) povećanja tumorskog volumena. Vreme udvostručavanja zapremine tumora iznosilo je 11 dana (Tabela 25). Terapija sa RC-3095 značajno je inhibirala rast PC-82 tumora (Tabela 25, Slika 32). Inhibicija rasta postala je značajna posle 2 nedelje od započinjanja terapije. Izraženo i kao procent promene volumena tumora, RC-3095 je značajno inhibisao rast ksenografa (Tabela 25). Na kraju terapije, prosečna težina tumora (\pm SE) u kontrolnoj grupi iznosila je $223 \pm 69.6 \text{ mg}$ dok je u grupi životinja koje su dobijale RC-3095 težina tumora iznosila $46.3 \pm 12.4 \text{ mg}$ u proseku (statistički značajno sniženje, $p < 0.05$, Student-ov t test). Terapija injekcijama RC-3095 nije značajnije uticala na telesne težine eksperimentalnih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i na težine testisa, ventralne prostate i seminalnih kesica (podaci nisu prikazani). Vreme udvostručavanja zapremine tumora bilo je značajno ($p < 0.05$) produženo u grupi koja je dobijala RC-3095 (35 dana vs. 11 dana u kontrolnoj grupi, Tabela 25).



Slika 32. Zapremina PC-82 humanog karcinoma prostate transplantiranog golim miševima tokom terapije sa bombezinskim antagonistom RC-3095. Vertikalne linije predstavljaju SE. * $p < 0.01$ vs. kontrola (Student-ov t-test).

Efekt primene RC-3095 na koncentracije hormona i prostata-specifičnog antigena (PSA) u serumu životinja pokazuje Tabela 26. Nivo testosterona nije bio promenjen posle primene RC-3095, ali su zato nivoi hormona rasta i IGF-I značajno bili sniženi. Koncentracija PSA u serumu kontrolne grupe životinja iznosila je $71.5 \pm 46.5 \text{ ng/ml}$. Terapija bombezinskim antagonistom dovela je do značajnog sniženja nivoa serumskog PSA.

Tabela 25. Efekt terapije sa RC-3095 na volumen tumora, procent povećanja zapremine tumora u odnosu na početak lečenja i na vreme udvostručavanja volumena tumora kod golih miševa kojima je transplantiran PC-82 humani karcinom prostate.

Grupa	Zapremina tumora, mm ³		% povećanja zapremine od dana 0	Vreme udvostručavanja tumora, dani
	Početna	Završna		
Kontrola	7.7 ± 3.9	270 ± 67.7	1606 ± 320	11.0 ± 1.2
RC-3095	13.4 ± 3.0	37.0 ± 8.5**	366 ± 108.9**	35.38 ± 12.4*

Srednje vrednosti ± SE; *p<0.05, **p<0.01 vs. kontrola (Student-ov t-test).

Tabela 26. Efekt terapije bombezina/GRP antagonistom RC-3095 na koncentracije testosterona, hormona rasta, IGF-I i prostata-specifičnog antigena u serumu golih miševa sa transplantiranim humanim karcinomom prostate PC-82.

Terapija	Testosteron ng/ml	GH ng/ml	IGF-I ng/ml	PSA ng/ml
Kontrola	2.95 ± 0.32	19.6 ± 4.9	414.7 ± 34.6	71.5 ± 46.5
RC-3095	3.0 ± 1.6	2.8 ± 0.4**	297.0 ± 25.4*	3.44 ± 1.5**

Srednje vrednosti ± SE; *p<0.05, **p<0.01 vs. kontrola (Student-ov t-test).

Rezultate receptorskih analiza prikazuje Tabela 27. Vezivanje ¹²⁵I-EGF za receptorska mesta na membranama kontrolnih PC-82 tumora bilo je u nanomolarim koncentracijama ($K_d = 7.2 \times 10^{-9}$ M), a maskimalni kapacitet EGF receptora $4.2 \pm 1.6 \times 10^{12}$ mol/mg proteina. Hronična terapija bombezina/GRP antagonistom RC-3095, značajno je snizila koncentraciju EGF receptora. Prisustvo bombezinskih receptora na membranama PC-82 tumora nije ispitivano.

Tabela 27. Efekt terapije RC-3095 na karakteristike specifičnog vezivanja EGF za receptore na membranama PC-82 humanog karcinoma prostate kod golih miševa.

Terapija	EGF	
	K_d (nM)	B_{max} (pM/mg proteina)
Kontrola	7.2 ± 3.2	4.2 ± 1.6
RC-3095	15.2 ± 5.9	0.57 ± 0.03*

Srednje vrednosti ± SE; *p<0.05, Student-ov t test.

EFEKT RC-3095 I RC-3440, ANTAGONISTA BOMBEZIN/GRP-a, NA RAST HT-29 HUMANOG KARCINOMA KOLONA TRANSPLANTIRANOG GOLIM MIŠEVIMA

Atimični, goli miševi (nu/nu), stari oko 6 nedelja po dospeću u laboratoriju, održavani su na način detaljnije opisan u poglavlju Metode. Čelijska linija humanog adenokarcinoma HT-29 gajena je kao adherentna kultura u RPMI 1640 hranljivoj podlozi uz dodatak 10% CFBS, antibiotike i antimikotike. Tumorske ćelije u fazi eksponencijalnog rasta odvajane su od podloge 0.25% rastvorom tripsina-EDTA. Transplantati (ksenografti) su formirani subkutanom injekcijom 10 miliona ćelija u desni bočni deo leđa miša. Tumori koji su se razvili, mehanički su podeljeni u delove prosečne veličine 2 mm³, i implantirani s.c. troakrom. Dve nedelje od transplantacije tumori su porasli do prosečnog volumena od 20 mm³, životinje randomizovane po grupama i terapija započeta.

Urađeno je ukupno 4 eksperimenta sa transplantiranim HT-29 tumorima:

U **eksperimentu 1**, životinje su podeljene u 5 grupa od po 10-13 životinja. Grupa 1, kontrola, dobijala je injekcije rastvarača (0.1% DMSO u fiziološkom rastvoru). Grupa 2, mikrokapsule (D-Trp⁶)LH-RH analoga oslobađajućeg hormona gonadotropina. Grupa 3, mikrogranule somatostatinskog analoga RC-160 a dve grupe životinja tretirane su bombezinskim antagonistom RC-3095. Grupa 4 dobijala je RC-3095 rastvoren u 0.1% DMSO u fiziološkom rastvoru s.c. u dozi od 10 µg dva puta dnevno. Grupa 5, sadržana od 13 životinja, primala je kontinuiranu infuziju RC-3095 putem osmotskih minipumpi tipa Alzet, model 2002 koja oslobađa 0.5 µl/h, što odgovara 20 µg peptida na dan. Za minipumpe, RC-3095 je rastvaran u 50% (v/v) propilen glikola u vodi.

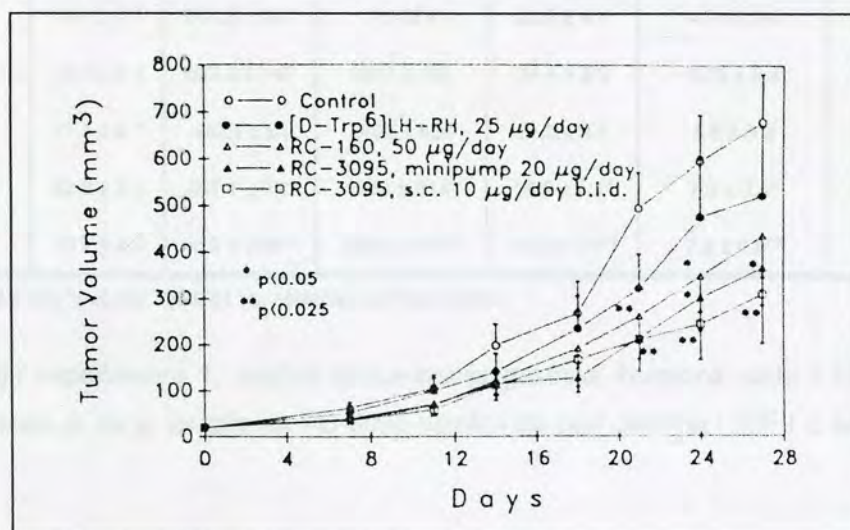
U **eksperimentu 2** bilo je 3 grupe životinja. Grupa 1, kontrola (injekcije rastvarača), grupa 2 dobijala je bombezinski antagonist RC-3440 s.c. u dozi od 10 µg dva puta dnevno i grupa 3, dobijale bombezina, 5 µg dva puta dnevno s.c.

U **eksperimentu 3** životinje su podeljene u 3 grupe od po 10. Grupa 1, kontrola, grupa 2 dobila je mikrogranule somatostatinskog analoga RC-160 u dozi od 50 µg/dan, i treća grupa primala je dva puta dnevno s.c. injekcije RC-3095 u dozi od 10 µg.

U **eksperimentu 4** upotrebljen je isti protokol kao u eksperimentu 3, s tim da je RC-3095 davan jednom dnevno u dozi od 20 µg na dan.

Terapija je trajala 4 nedelje.

Efekti različitih terapija na volumene tumora u eksperimentu 1 prikazani su na Slici 33. Efekte različitih terapija na početni i završni volumen tumora, procenat povećanja zapremine tumora od početka terapije, tumorsko opterećenje (težina tumora u odnosu na telesnu težinu životinje), vreme udvostručavanja zapremine tumora kao i vreme odlaganja rasta tumora prikazuje Tabela 28. Terapija sa agonističkim analogom LH-RH usporila je rast tumora, ali efekt nije bio statistički značajan. Slično se može reći i za somatostatinski analog RC-160. Terapija sa bombezinskim antagonistom, primenjivanog kao s.c. injekcije ili osmotskim minipumpama, bila je najefikasnija u inhibiciji rasta tumora. Na kraju eksperimnta težina tumora u kontrolnoj grupi iznosila je 813 ± 118 mg (srednja vrednost \pm SE) dok je u grupi koja je dobijala RC-3095 s.c. injekcijama težina tumora bila 418 ± 109 mg ($p < 0.01$ vs. kontrola), a u grupi u kojoj je RC-3095 kontinuirano oslobađan iz mini-osmotskih pumpi težina tumora iznosila je 521 ± 107 mg ($p < 0.05$ vs. kontrola).



Slika 33. Zapremine HT-29 humanog karcinoma kolona transplantiranog golim miševima tokom terapije sa analogom LH-RH, analogom somatostatina RC-160 i bombezinskim antagonistom RC-3095 primenjivanog s.c. injekcijama ili kontinuiranom infuzijom pomoću mini-osmotskih pumpi. Vertikalne linije predstavljaju SEM.

Rast tumora bio je inhibisan već u toku prvih 3 nedelje terapije u obe grupe životinja koje su primale RC-3095 (Slika 33, Tabela 28). Posle 27 dana, zapremina tumora značajno je bila niža u grupi koja je primala RC-3095 iz minipumpi (367 ± 72 mm³; $p = 0.03$), kao i u grupi koja je primala s.c. injekcije RC-3095 (310 ± 108 mm³; $p < 0.01$) u poređenju sa kontrolnog grupom (682 ± 101 mm³). Procent promene zapremine tumora bio je, isto tako, značajno inhibisan od 18-og dana u grupi lečenoj sa RC-3095 iz minipumpi, a u grupi koja je dobijala s.c. RC-3095 već od 14-og dana terapije. Vreme udvostručavanja zapremine tumora značajno je bilo produženo u obe grupe životinja koje su dobijale RC-3095 (od oko 4 dana u kontrolnoj grupi na 7 odnosno 7.2 dana u

grupama koje su dobijale RC-3095 minipumpama odnosno s.c. injekcijama). Vreme odloženog rasta tumora bilo je 6.5 dana u grupi lečenoj kontinuiranom infuzijom RC-3095, a 8.5 u grupi koja je dobijala dva puta dnevno s.c. injekcije RC-3095 (Tabela 28).

Tabela 28. Efekt terapije sa D-Trp⁶-LH-RH, RC-160 ili RC-3095 na zapreminu tumora, procent povećanja zapremine od početka terapije, tumorsko opterećenje, vreme udvostručavanja zapremine tumora i odloženo vreme rasta tumora golih miševa sa ksenograftima ćelijske linije humanog karcinoma kolona.

Terapija	Zapremina tumora (mm ³)		% povećanja od dana 0	Tumorsko opterećenje (mg/g TT)	Vreme udvostručavanja (dani)	Vreme odloženog rasta (dani)
	Početna	Završna				
Kontrola	19.7 ± 3.7	681.8 ± 101	? ± 674	28.2 ± 4.1	4.13 ± 0.6	
D-Trp ⁶ -LH-RH	19.7 ± 4.1	522.6 ± 147	2631 ± 484	24.4 ± 5.9	5.05 ± 0.4	2.5
RC-160	17.5 ± 2.7	463.1 ± 91	2695 ± 426	21.2 ± 4.1	5.6 ± 0.5	4
RC-3095 pumpe	20.2 ± 3.6	367.1 ± 72*	1964 ± 314*	18.2 ± 4.1*	7.0 ± 0.4*	6.5
RC-3095 s.c.	19.7 ± 4.0	310 ± 108**	1338 ± 190**	14.9 ± 3.5**	7.2 ± 0.6**	8.5

Srednje vrednosti ± SE. *p<0.05; **p<0.01 vs. kontrola, Duncan-ov test.

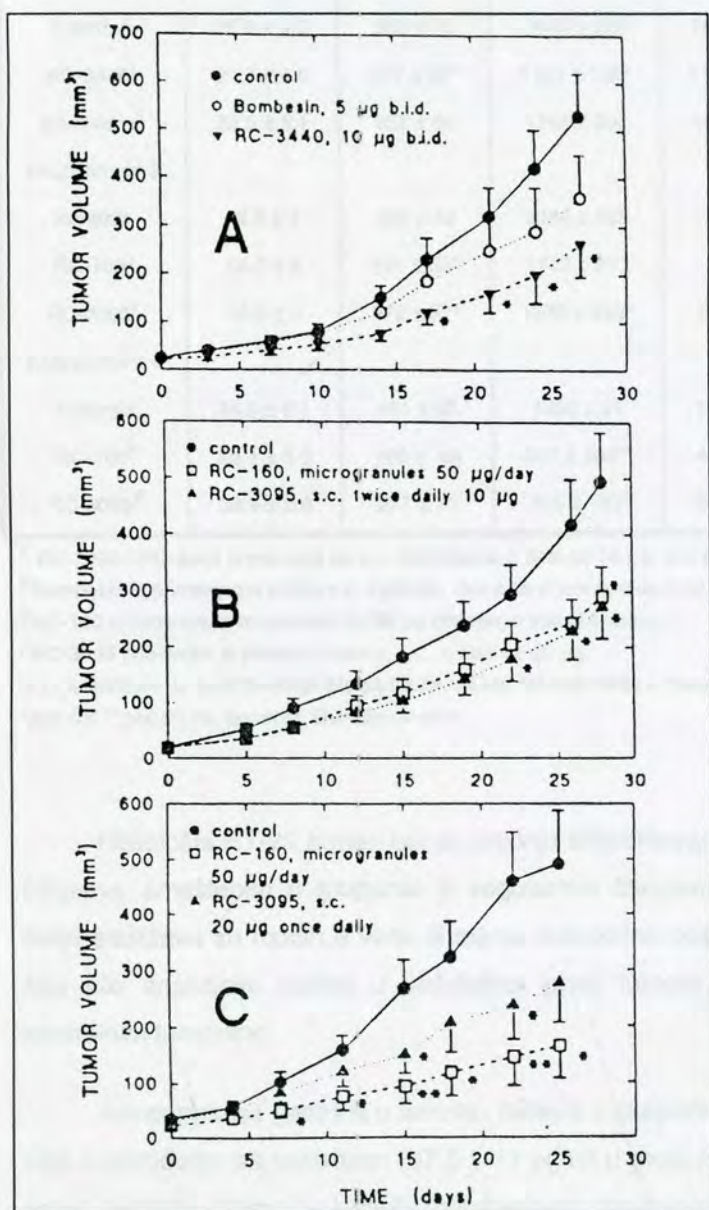
Na kraju ekperimenta 1, analiza koncentracija gastrina, hormona rasta i IGF-I u serumu životinja pokazala je da je terapija sa RC-3095 uzrokovala pad gastrina i IGF-I u serumu životinja (Tabela 29).

Tabela 29. Koncentracije gastrina, hormona rasta i IGF-I u serumu golih miševa sa transplantiranim HT-29 humanim karcinomom kolona posle terapije sa D-Trp⁶-LH-RH, RC-160 i RC-3095.

Terapija	Gastrin (pg/ml)	Hormon rasta (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)
Kontrola	218.9 ± 59	3.78 ± 0.27	370 ± 78
D-Trp ⁶ -LH-RH	148.1 ± 23*	4.22 ± 0.5	291 ± 30
RC-160	334.1 ± 65	4.18 ± 0.5	297 ± 47
RC-3095 pumpe	148.9 ± 17*	3.73 ± 0.28	225 ± 50*
RC-3095 s.c.	158.0 ± 20*	3.97 ± 0.24	179 ± 52*

*p<0.05 vs. kontrola, Duncan-ov test multiplih rangova.

Slika 34 pokazuje zapremine tumora, merenih u intervalima od 3-4 dana, u eksperimentima 2, 3 i 4. Efekte različitih terapija na zapreminu tumora na kraju eksperimenta, na procent povećanja od početka terapije, opterećenje tumorom, vreme udvostručavanja zapremine tumora i odloženo vreme rasta tumora pokazuje Tabela 30. Terapija bombezinskim antagonistom RC-3440, u eksperimentu 2, značajno je inhibisala rast tumora (oko 45% inhibicije u poređenju sa kontrolom), prolongirala vreme udvostručavanja zapremine tumora na 9.5 dana, dok je odloženo vreme rasta tumora iznosilo 7.5 dana. Zanimljivo je da je bombezin, u dozi od 5 µg dva puta dnevno s.c., takođe inhibisao rast tumora za oko 30% u odnosu na kontrolu (Slika 34A i Tabela 30).



U trećem eksperimentu, RC-160 i RC-3095 ponovo su inhibisali rast HT-29 tumora (Slika 34B i C i Tabela 30).

U eksperimentu 4, terapija jednodnevnom injekcijom 20 µg RC-3095 bila je nešto manje efikasna od injekcija RC-3095 dva puta na dan u eksperimentima 1 i 3.

Slika 34. Zapremine ksenografta humanog karcinoma kolona HT-29 transplantiranog golim miševima u toku terapije bombezinskim antagonistom RC-3440 u vidu s.c. injekcija (A) i mikrogranula RC-160 i RC-3095 s.c. injekcijama (B i C). Vertikalne linije pokazuju SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, značajnost u odnosu na kontrolu određivana Student-ovim t-testom (A,B) i Duncan-ovim testom multiplih rangova (C).

Tabela 30. Efekt terapije različitim peptidima na zapreminu tumora, procent povećanja zapremine tumora od početka terapije, opterećenje tumorom, vreme udvostručavanja zapremine tumora i vreme odloženog rasta ksenografta humanog karcinoma kolona HT-29 u golih miševa.

Terapija	Zapremina tumora (mm ³)		% povećanja od dana 0	Tumorsko opterećenje (mg/g TT)	Vreme udvostručavanja (dani)	Vreme odloženog rasta (dani)
	Početna	Završna				
Eksperiment 2						
Kontrola	25.6 ± 4.5	523 ± 70	2043 ± 228	19.8 ± 3.5	6.5 ± 0.4	-
RC-3440 ¹	24.7 ± 4.5	277 ± 87*	1121 ± 126*	11.9 ± 3.2*	9.5 ± 0.5*	7.5
Bombezin ²	22.5 ± 5.1	357 ± 85	1764 ± 300	16.9 ± 5.8	8.1 ± 0.6	3.0
Eksperiment 3						
Kontrola	19.8 ± 4	494 ± 88	2386 ± 408	17.2 ± 3.1	7.0 ± 0.5	-
RC-160 ³	18.7 ± 3	291 ± 53*	1717 ± 213	9.9 ± 3	9.0 ± 0.5	6.5
RC-3095 ¹	18.3 ± 3	272 ± 57*	1276 ± 243*	8.9 ± 3.2	11.0 ± 0.6*	7.5
Eksperiment 4						
Kontrola	34.9 ± 6.1	491 ± 97	1296 ± 91	19.4 ± 3.3	7.7 ± 0.6	-
RC-160 ³	23.1 ± 5.0	165 ± 58	557 ± 168**	4.9 ± 1.6*	N.D.	12.2
RC-3095 ⁴	30.9 ± 5.8	277 ± 71	765 ± 151*	20.3 ± 6.9	13.8 ± 2.0	4.2

¹ RC-3095 i RC-3440 primenjeni su s.c. injekcijama u dozi od 10 µg, dva puta dnevno.

² Bombezin je primenjen u obliku s.c. injekcija, dva puta dnevno, u dozi od 5 µg.

³ RC-160 mikrogramule oslobađale su 50 µg dnevno, u toku 14 dana.

⁴ RC-3095 primenjen je jednom dnevno, s.c., u dozi od 20 µg.

N.D. s obzirom da su 3 životinje bile sa tumorima koji su regredirali u rastu, vreme udvostručavanja nije bilo moguće odrediti.

*p<0.05; **p<0.01 vs. kontrola, Duncan-ov test.

Histološki HT-29 tumori bili su srednje diferentovani adenokarcinomi, sa velikim, cilindričnim ćelijama, smeštenim u grupama ili iregularnim žlezdama sa višeslojnim epitelom. Mnogobrojne ćelije sadržave su mucin a veća ili manja nekrotična polja viđala su se u sredini tumorskog tkiva. Nije bilo značajnije razlike u histološkoj građi tumora posle različitih terapija u poređenju sa kontrolnim tumorima.

Koncentracija gastrina u serumu miševa u eksperimentu 2, posle terapije sa RC-3440, bila je niža u poređenju sa kontrolom (67.8 ± 11 pg/ml u grupi na RC-3440 vs. 97 ± 15 pg/ml u kontrolnoj grupi; p<0.05). Samo je terapija bombezinom značajno povećala koncentraciju hormona rasta u serumu miševa.

Vrlo nisko (manje od 1% ukupno vezanog liganda) vezivanje obeleženog bombezina pokazano je samo na membranama tumora iz kontrolne grupe životinja (ne i na membranama tumora tretiranih bombezinskim antagonistom). Ipak, ovo vezivanje je bilo 78% specifično pa je analiza podataka ukazala na jednu vrstu receptora velikog afiniteta ($K_D = 0.07$ nM) i vrlo niskog kapaciteta (B_{max} oko 2 fmol/mg proteina). Rezultati EGF receptorskih analiza na membranama HT-29 tumorskih ćelija posle različitih terapija prikazani su na Tabeli 31. U ranijim, preliminarnim eksperimentima pokazano je prisustvo EGF receptora na intaktnim HT-29 ćelijama u kulturi. Posle ksenograftiranja ćelija u golim miševima, broj receptora za EGF povećao se skoro 20 puta (od 15 na 320 fmol/mg proteina). Terapija sa bombezinskim antagonistom RC-3095, u eksperimentu 1,3 i 4, visoko značajno je redukovala maksimalni kapacitet receptora za EGF na membranama HT-29 tumora. Isto tako, drugi bombezinski antagonist RC-3440, primenjen u eksperimentu 2, značajno je snizio B_{max} EGF receptora. Slično tome, i terapija bombezinom imala je za posledicu smanjenje broja receptora za EGF na membranama ćelija HT-29 tumora.

Tabela 31. Karakteristike EGF receptora na membranama ćelija HT-29 humanog karcinoma kolona transplantiranog golim miševima posle terapije sa različitim peptidnim analogima. Srednje vrednosti \pm SE.

Terapija	EGF	
	K_D (nM)	B_{max} (fmol/mg proteina)
Eksperiment 1		
Kontrola	2.1 ± 1.2	320 ± 69
D-Trp6-LH-RH	4.2 ± 2	120 ± 64
RC-160	3.3 ± 1.4	94 ± 20
RC-3095	1.3 ± 0.7	$26 \pm 10^*$
Eksperiment 2		
Kontrola	1.7 ± 0.4	660 ± 176
RC-3440	0.3 ± 0.2	$55 \pm 19^*$
Bombezin	0.4 ± 0.2	$87 \pm 25^*$
Eksperiment 3		
Kontrola	0.7 ± 0.2	195 ± 14
RC-160	1.4 ± 0.2	$52 \pm 5^*$
RC-3095	1.4 ± 0.4	$35 \pm 3^*$
Eksperiment 4		
Kontrola	1.2 ± 0.3	260 ± 40
RC-160	2.2 ± 0.02	$97 \pm 2^{**}$
RC-3095	4.4 ± 0.4	$101 \pm 28^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs.kontrola, Duncan-ov test.

INTRASPLENIČNA INJEKCIJA HT-29 ĆELIJA U GOLIH MIŠEVA

Posebna serija eksperimenata je urađena tako što su ćelije HT-29 tumora implantirane u slezinu golih miševa a zatim su životinje lečene bombezinskim antagonistom RC-3095. Naime, anestetisanim golim miševima, posle subkostalne incizije levo i otvaranja abdomena, jedan milion živih HT-29 ćelija, u zapremini od 50 μ l, iniciran je u slezinu životinja. Posle zatvaranja peritoneuma i kože, životinje su randomizovane u dve grupe od po 6. Jedna grupa miševa, kontrolna, primala je samo rastvarač (0.1% DMSO u fiziološkom rastvoru), dok je druga grupa dobijala bombezinski antagonist RC-3095, s.c. u dozi od 10 μ g, dva puta dnevno. Terapija je započeta 3 dana posle hirurgije i trajala je 45 dana. Na kraju perioda terapije životinje su žrtvovane, a slezina i jetra izvađene i izmerene.

Tumor koji lokalno raste u slezini, nađen je u svih životinja posle perioda od 45 dana. Metastatski rast tumora u jetri identifikovan je kod svih životinja izuzev u jednoj koja je dobijala RC-3095. Broj metastatskih čvorića u jetri u kontrolnoj grupi životinja bio je 9.1 ± 1.1 , dok je u grupi životinja koja je lečena sa RC-3095 taj broj iznosio 3.6 ± 0.8 ($p < 0.01$). Isto tako, terapija bombezinskim antagonistom RC-3095 značajno je redukovala težine jetre i slezine životinja u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 32).

Tabela 32. Efekt terapije bombezinskim antagonistom RC-3095 (10 μ g, dva puta dnevno, s.c.) na težine jetre i slezine, kao i broj metastaza u jetri golih miševa posle intrasplenične injekcije HT-29 ćelija.

	Kontrola	RC-3095	p ¹
Jetra (mg)	1948 ± 207	1475 ± 69	0.05
Slezina (mg)	456.8 ± 74	273.7 ± 93	0.05
Br. meta. u jetri	9.1 ± 1.1	3.6 ± 0.8	0.01

¹Značajnost testirana Duncan-ovim testom multiplih rangova. Terapija je započeta 3 dana posle hirurgije i trajala je 45 dana.

DISKUSIJA

TIPOVI SINTETISANIH ANTAGONISTA BOMBEZINSKIH RECEPTORA

U ovoj studiji prikazana je struktura i biološka aktivnost preko 50 različitih peptida, antagonista bombezina ili GRP-a. Među ovim antagonistima, mogu se razlikovati nekoliko različitih tipova jedinjenja:

1. Peptidi sa 14 aminokiselina (Tabela 5)
2. Antagonisti sa izmenom strukture na poziciji 7 bombezina (Tabela 7)
3. Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na N-terminalu molekule (Tabela 8)
4. Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na C-terminalu molekule (Tabela 10)
5. Antagonisti bez metionina na poziciji 14 i antagonisti ciklične strukture (Tabela 11).

Prvu grupu antagonista predstavljaju **jedinjenja sa 14 aminokiselina u lancu**, tj. peptidi sa manjim izmenama strukture molekule bombezina ili dela molekule GRP-a (GRP 14-27), koji je u stvari odgovoran za biološka dejstva GRP-a.

Ovu grupu čine analozi označeni kao RC-3003, RC-3005 i RC-3009. Osnovna novina u njihovoj strukturi je prisustvo Leu na poziciji 14 molekule bombezina, odnosno poziciji 27 molekule GRP-a. Ipak, ova promena, kao i neke dodatne izmene u strukturi, bile su nedovoljne da proizvedu antagoniste značajnije biološke aktivnosti. Oni su nešto aktivniji od prvih antagonista bombezina, analoga supstancije P (26, 36, 47, 48, 49). Po aktivnosti, ovi analozi su slični ranije opisanim antagonistima sa strukturnim izmenama na poziciji 12 u molekuli bombezina (51, 52). Bombezinski antagonisti dugih polipeptidnih lanaca imaju dodatni nedostatak. Sa sigurnošću se može predvideti njihov veoma kratak poluživot posle primene *in vivo*, zbog toga što ovakva jedinjenja imaju veliki broj mesta pogodnih za cepanje lanca. Naši rezultati su samo potvrdili rezultate drugih autora, da snažnije antagoniste bombezina treba tražiti u peptidima kraćih lanaca (Tabela 5).

Napori za sintezu aktivnijih antagonista proizveli su posebnu seriju analoga bombezina kod koji je osnovna promena u strukturi učinjena na **poziciji 7 aminokiselinskog lanca**. Pozicija broj 7 u strukturi bombezina, kao potencijalno mesto za izmene strukture u cilju dobijanja što aktivnijih antagonista, ranije nije bila detaljnije istraživana. U literaturi je opisano samo jedno jedinjenje u kojem je Phe bio na pozicijama 6 i 7 i to kod Leu¹⁴ pseudononapeptida (54). Ovaj antagonist

pokazivao je afinitet od oko 150 nM, pa su autori zaključili da promene amino kiselina na poziciji 7 ne dovode do sinteze snažnijih antagonista. U našim jedinjenjima pokušano je sa umetanjem His, Glu i Dpa, kako u molekuli bombezina (7-13 i 7-12), tako i bombezina (6-14, 6-13 i 6-12)(Tabela 7). Aktivnost nastalih analoga je, ipak, samo potvrdila da pozicija 7 predstavlja "siromašno" mesto na kojem bi strukturne izmene molekule bombezina proizvele antagoniste značajnije aktivnosti (Tabela 7 i Slika 9).

Ranije je spomenuto, da je uvođenje redukovane, "pseudo", peptidne veze, posebno između pozicija 13 i 14, prvi put dalo analoge koji su bili aktivni u nanomolarnim koncentracijama (53). Analog (Leu¹⁴ψ₁₃₋₁₄)-bombezina pokazao je, u različitim ispitivanjima *in vitro*, vrednosti IC₅₀ od 30-60 nM (53). Isto tako, Coy i saradnici su 1988. god. pokazali da je moguće ukloniti 5 aminokiselina na N-terminalu molekule tetradekapeptida, a da se aktivnost analoga drastično ne izgubi, tj. da se zadrži na IC₅₀ od oko 300 nM (54). Međutim, veoma značajnom se pokazala pozicija 6 u ovako nastalim nonapeptidnim analogima. Naime, prisutvo aromatičnih aminokiselina na poziciji 6, kao na primer Phe i to posebno u D formi, proizvelo je antagoniste afiniteta manjeg od 10 nM (54, 63). Ova saznanja iskorišćena su u našim pokušajima da se daljim promenama strukture pseudonapeptida pojača antagonistička aktivnost. U te svrhe sintetisane su dve velike grupe bombezinskih antagonista. Jednu grupu čine analozi kod kojih su dve hidrofobne aminokiseline, Trp i njegov analog Tpi, uvedene na poziciju 6 N-terminala molekule pseudonapeptida. Drugu grupu analoga predstavljaju analozi kod kojih se Trp i Tpi nalaze na poziciji 14 tj. na C-terminalu pseudonapeptidnog lanca.

Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na N-terminalu

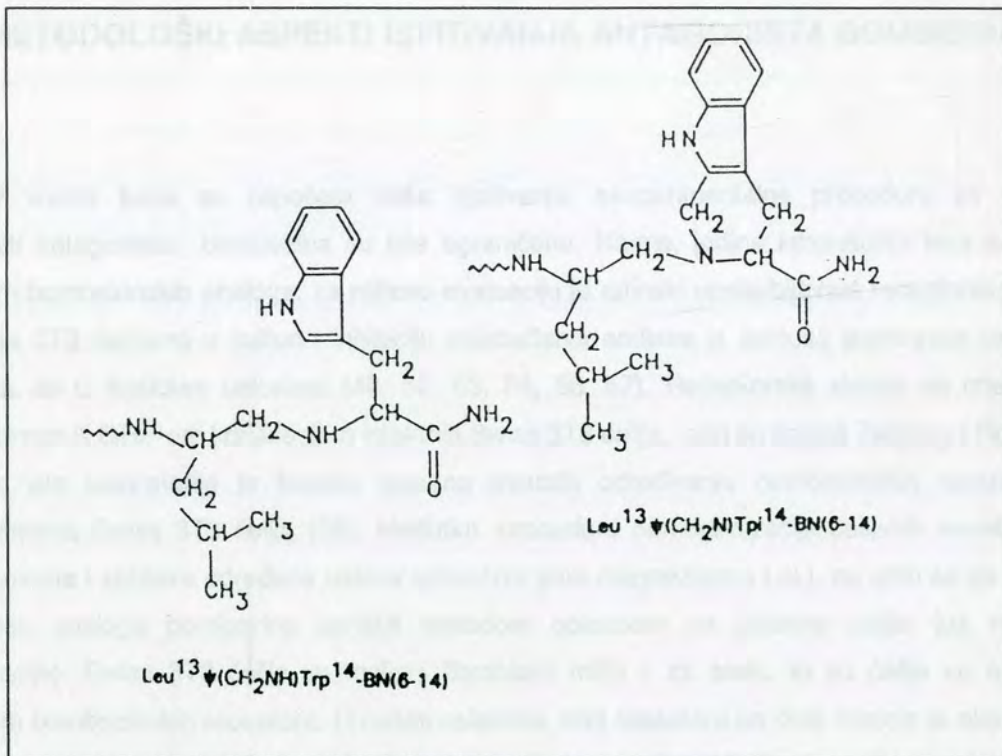
U antagonistima D-Trp⁶ ili D-Tpi⁶ tipa, Met na poziciji 14, koji veoma lako podleže oksidaciji, zamenjen je ili sa Leu ili sa Phe, dok su na poziciji 6 N-terminala uvedene spomenute hidrofobne aminokiseline, Trp i njegov derivat Tpi. Naravno, između 13 i 14-te pozicije nalazila se redukovana, pseudo peptidna veza. Ranije je opisano (54) da analozi D-Phe⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-BN i D-Phe⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN pokazuju snažnu antagonističku aktivnost i vrednosti IC₅₀ u receptorskim studijama od 5 i 3 nM. U našim ispitivanjima, ovi analozi, D-Phe⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Phe¹⁴-BN (RC-3110) i D-Phe⁶,Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-BN (RC-3100), ponovo su pokazali veliki afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 fibroblastima i H-345 ćelijama SCLC.

Ako se na poziciju 6 uvedu D-forme Trp i Tpi, nastali antagonisti su uglavnom zadržavali snažan afinitet za bombezinske receptore. Uvođenje D-Tpi na poziciju 6 u Leu¹³ψ(CH₂NH)Leu¹⁴-

BN-a, kao što je to učinjeno kod RC-3095, dalo je snažniji antagonist od substitucije sa D-Trp na istoj poziciji (RC-3125). Analog RC-3095 pokazao je konstantnu antagonističku aktivnost na nivou IC_{50} oko 10 nM u svim ispitivanim sistemima. Uvođenje D-Tpi na poziciju 6 kod analoga sa Phe na poziciji 14 (RC-3105), dovelo je do značajnijeg gubitka afiniteta. Veoma snažnu aktivnost pokazivao je i analog RC-3420 u kojem je D-Trp bio na poziciji 6 u $Leu^{13}\psi(CH_2NH)Phe^{14}$ -BN-a. I pored svega, analog RC-3095 je izabran kao antagonist za eventualna dalja ispitivanja, ne samo zbog svoje aktivnosti, već i zbog jednostavnosti sintetskog postupka kao i visokog stepena čistoće supstancije posle analitičke tečne hromatografije. Prisustvo D-Tpi u analogu RC-3095, doprinosi većoj hidrofobnosti jedinjenja, što verovatno ima za posledicu bolju penetraciju kroz biološke barijere kao i povišenu otpornost na proteolitičke enzime.

Antagonisti sa D-Trp i D-Tpi na C-terminalu

Ispitivanja sa prethodnom grupom bombezinskih antagonista, ukazivala su da je prisustvo aromatičnog bočnog lanca na poziciji 6 psudonapeptida od izuzetnog značaja za biološku aktivnost. Prisustvo D-Phe na poziciji 6 (kod analoga opisanih od strane Coy-a i saradnika, 54), kao i prisustvo D-Trp i D-Tpi (kod naših antagonista), dalo je veoma aktivne antagoniste bombezinskih receptora. Na bazi ovih saznanja, pokušano je da se hidrofobne aminokiseline Trp i Tpi uvedu na C-terminal psudonapeptida. Nastala jedinjenja (Tabela 10) zadržala su snažan afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 ćelijama i snažno su inhibirala stimulantni efekt GRP(14-27) na rast istih ćelija. Antagonisti sa Tpi na C-terminalu, pokazali su se aktivniji od analoga sa Trp. Kako je Tpi sekundarni amin, redukovana peptidna veza se nije mogla formirati jednostavnom reakcijom alkilacije. Prema tome, za razliku od "klasične" redukovane peptidne veze (CH_2NH), Tpi analozi sadžavali su novi tip redukovane peptidne veze, CH_2N . Modifikacija peptidnih veza dovodi do konformacijskih promena polipeptidnih lanaca i, kako je već nekoliko puta pokazano, do interesantnih promena u biološkim osobinama nastalih jedinjenja (64). Na Slici 35 prikazana je razlika u strukturi pseudo peptidne veze sa Trp i Tpi na poziciji 14. Kod Tpi^{14} analoga, azot sa α amino grupe Tpi postaje deo šestočlanog prstena utopljenog u indolski prsten (Slika 35). Sve ovo uslovljava mnogo rigidniju strukturu C-terminala polipeptida, još veću hidrofobnost jedinjenja, a samim tim bolju penetraciju kroz biološke membrane i verovatno duži polu-život u plazmi. U grupi analoga sa Tpi redukovanom peptidnom vezom, kao kandidat za buduća *in vivo* ispitivanja, izabran je D-Tpi⁶, $Leu^{13}\psi(CH_2N)Tpi^{14}$ -BN (RC-3440).



Slika 35. Struktura C-terminala Trp^{14} i Tpi^{14} pseudononapeptida. "Klasični" tip redukovane peptidne veze prikazan je na levoj polovini slike, a novi tip CH_2N peptidne veze na desnoj.

Dezmetionin (OMe) analozi bombezina

Uklanjanje metionina u karboksilnom delu molekule bombezina ne utiče značajnije na biološku aktivnost. Šta više, uz dodatne strukturne izmene, sintetisani su i antagonisti sa veoma snažnim afinitetom za bombezinske receptore (56, 57). U našoj seriji OMe bombezinskih analoga (Tabela 11), samo je jedno jedinjenje RC-4125, strukture $\text{D-Trp}^6, \text{Trp}^{12}\text{-BN}(6-12)$ propil amid, pokazalo značajniji afinitet za bombezinske receptore na Swiss 3T3 ćelijama ($\text{IC}_{50} = 18 \text{ nM}$).

Podgupu sasvim novih bombezinskih antagonista, predstavljaju tri analoga sa cikličnom strukturom C-terminala: analozi RC-3950, RC-3955 i RC-3985II (Tabela 11). Ovi analozi su inhibisali 50% specifičnog vezivanja obeleženog Tyr^4 -bombezina za receptore na Swiss 3T3 ćelijama u koncentracijama nižim od 1 nM. Ovo su, verovatno, predstavnici budućih, najsnažnijih antagonista bombezina. U ovom radu oni nisu dalje razmatrani niti ispitivani, kao ni OMe antagonisti, prvenstveno zbog toga što proces njihove patentne zaštite nije bio završen.

METODOLOŠKI ASPEKTI ISPITIVANJA ANTAGONISTA BOMBEZINA

U vreme kada su započeta naša ispitivanja, eksperimentalne procedure za procenu aktivnosti antagonista bombezina su bile ograničene. Naime, jedina laboratorija koja se bavila sintezom bombezinskih analoga, za njihovu evaluaciju je rutinski upotrebljavala receptorske studije sa Swiss 3T3 ćelijama u kulturi i inhibiciju oslobađanja amilaze iz acinusa pankreasa pacova ili zamorca, ali u statičkim uslovima (48, 52, 53, 54, 56, 57). Receptorske studije sa obeleženim bombezinom ili GRP-om korišćenjem intaktnih Swiss 3T3 ćelija, prvi su opisali Zachary i Rozengurt (25). Iz iste laboratorije je kasnije opisana metoda određivanja bombezinskih receptora na membranama Swiss 3T3 ćelija (65). Međutim, procedura homogenizacije ćelijskih membrana je komplikovana i zahteva određene uslove (prisustvo jona magnezijuma i sl.), pa smo se za rutinsku evaluaciju analoga bombezina koristili metodom opisanom za intaktne ćelije (uz neznatne modifikacije). Swiss 3T3 ćelije su maligni fibroblasti miša i, za sada, to su ćelije sa najvećom gustinom bombezinskih receptora. U našim uslovima, broj receptora po ćeliji iznosio je oko 50 000, s tim da su u literaturi podaci različiti (i do 100 000 receptora po ćeliji). Ovako veliki broj receptora je svakako i razlog zašto se Swiss 3T3 ćelije koriste za "screening" bombezinskih analoga a ne, kako bi se očekivalo, ćelije mikrocelularnog karcinoma pluća i sl. U našim eksperimentima ispitivali smo nekoliko bombezinskih antagonista u receptorskim analizama sa H-345 ćelijskom linijom humanog SCLC-a. Eksperimenti su pokazali da je broj receptora po svakoj ćeliji oko 2 000 (nešto preko 35 fmol/mg proteina što je u skladu sa nalazom Moody-a i saradnika, 66). Tako mala gustina bombezinskih receptora na H-345 ćelijama zahtevala je veliki broj ćelija, oko 2 miliona, za svaku tačku saturacione ili inhibitorne krive u eksperimentu, što je povećavalo ukupnu zapreminu u kojoj se odvijala reakcija vezivanja i povećavalo troškove. H-345 ćelije rastu relativno sporo, u suspenziji i stvaraju grupe (grudvice) koje se moraju raspršiti pre eksperimenta, što smanjuje broj živih ćelija. Za svoj rast ćelije zahtevaju posebne uslove hranljive podloge, prisustvo različitih faktora rasta: insulina, selena, estrogena i dr., tzv. HITES hranljiva podloga (32, 34). Prisustvo svih ovih faktora rasta uslovljava nishodnu regulaciju receptora za bombezin/GRP, što nameće potrebu da se dan ili dva pre eksperimenta, kojim se traži prisustvo receptora za bombezin, ćelije prebace u rastvor bez faktora rasta i bez seruma. Navedene činjenice dovoljne su da se shvati zbog čega je izuzetno komplikovano i skupo ispitivati antagoniste bombezina korišćenjem ćelijskih linija humanog SCLC, iako bi podaci dobijeni na taj način bili vredniji od onih koji se dobiju korišćenjem Swiss 3T3 fibroblasta.

Procena aktivnosti antagonista bombezina receptorskim analizama vrši se na osnovu rezultata eksperimenata po tipu kompeticije, tj. izračunavanjem vrednosti IC_{50} . IC_{50} predstavlja koncentraciju antagoniste koja za 50% inhibiše specifično vezivanje obeleženog bombezina za bombezinske receptore. Što je antagonist aktivniji on u nižoj koncentraciji uzrokuje 50%-nu inhibiciju vezivanja obeleženog bombezina.

Antagoniste bombezina i GRP-a moguće je ispitati i u eksperimentima u kojima se meri inhibicija nekog stimulantnog efekta bombezina. U našim eksperimentima koristili smo sposobnost GRP(14-27) da stimuliše rast Swiss 3T3 ćelija *in vitro*, merenu inkorporacijom obeleženog timidina u DNK ovih ćelija. I u ovom slučaju pokazalo se da eksperimenti sa ćelijskim linijama humanih mikrocelularnog karcinoma pluća nisu pogodni za ispitivanje većeg broja antagonista bombezina. Naime, pokazalo se da bombezin ne stimuliše rast H-345 ćelija u standardnim uslovima u kojima ove ćelije rastu. Naši eksperimenti su, šta više, pokazali da dodavanje GRP(14-27) H-345 ćelijama u HITES medijumu inhibiše njihov rast (mereno brojem ćelija)! Efekt GRP(14-27) bio je sličan efektu RC-3095 antagoniste bombezinskih receptora. Moguće je da u osnovi ovog dejstva leži nishodna regulacija receptora za bombezin/GRP, koju podjednako mogu uzrokovati i agonisti i antagonisti. Stimulaciju rasta H-345 ćelija bombezinom/GRP-om uspeli smo da ostvarimo tek kada su ćelije rasle u polu-čvrstim medijima. Naime, analiza formiranja kolonija ("colony forming assay"), u kojem su ćelije rasle u pločama sa agarozom, pokazala je da je moguće stimulisati rast H-345 ćelija bombezinom. U istoj analizi, pokazali smo da antagonist bombezina RC-3095, u koncentraciji od 50 nM, inhibiše rast kolonija za 50%. Eksperiment sa formiranjem kolonija je, pre svega, dugotrajan postupak, i nepogodan za rutinsko ispitivanje većeg broja antagonista bombezina.

Da nije jednostavno stimulisati rast *in vitro* bilo kojih ćelija bombezinom ili GRP-om, pokazali su naši eksperimenti sa MDA-MB-231 i MCF-7 MIII ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke. Stimulantni efekt bombezina nije bio moguć u prisustvu 5% seruma (FBS). Ovaj nalaz je podudaran sa podacima dobijenim na T47D i ZR-75-1 ćelijskim linijama humanog karcinoma dojke (68). Razlozi za nemogućnost bombezina da stimuliše rast ćelija u prisustvu seruma mogu biti višestruki.

Prvo, moguće je da različite peptidaze veoma brzo razlažu molekule bombezina (34, 68, 69). Faktori rasta iz seruma mogu interferirati sa receptorima za bombezin (34). Isto tako je moguće, da su ćelije već maksimalno stimulisane faktorima rasta (uključujući i bombezin) prisutnim u serumu (67). Međutim, ako se iz FBS-a prethodno uklone ili inaktivišu faktori rasta (aktivnim ugljem ili pasterizacijom), moguće je dobiti stimulantni efekt bombezina prema MDA-MB-231 i MCF-7 MIII ćelijama u kulturi (Slike ?). Giacchetti i saradnici (29) nisu mogli da pokažu stimulantni efekt GRP-a prema MDA-MB-231 ćelijama čak ni u rastvoru bez seruma. Razlike među podacima u literaturi

(29, 34, 68, 69) se možda mogu objasniti činjenicom da su korišćeni različiti klonovi ćelijskih linija kao i da su ćelije održavane u različitim hranljivim podlogama.

Već je ranije spomenuto da je jedan od standardnih metoda za izučavanje antagonista bombezina eksperiment sa dispergovanim acinusima pankreasa pacova ili zamorca u statičkim uslovima (38, 48, 53, 56). Kod ovakvih eksperimenata, acinusi pankreasa se nalaze u sudovima tipa Petrijevih šolja, njima se dodaje bombezin, sam ili sa antagonistom, i pipetom se uzima deo rastvora u kojem se određuje aktivnost amilaze.

U našim eksperimentima opisali smo novi metod sa perfundovanim acinusima pankreasa pacova (metod superfuzije). Metod superfuzije tkiva ili ćelija je originalno opisan za hipofizu (70, 71). U našim uslovima, pokazalo se da su perfundovani acinusi pankreasa pogodni da se na njima ispituju antagonisti bombezina. Kratak period inkubacije (60-120 minuta) je potreban da se bazalni nivo oslobađanja amilaze iz acinusa ustali. U odnosu na statički metod, za metod superfuzije nisu neophodni skupi materijali koje zahteva rad sa kulturom tkiva ili ćelija. Velika prednost superfuzije jeste i to što se, u uslovima stalnog protoka medijuma u kojem se acinusi nalaze, ne akumuliraju produkti metabolizma ćelija, što može biti veoma važno za tkiva sa visokom aktivnošću enzima kakav je egzokrini pankreas. Acinusi se mogu stimulisati bombezinom nekoliko puta i različiti antagonisti testirati na istom preparatu, dovodeći do mnogo konzistentnijih rezultata. Za razliku od hipofize, nivo bazalnog oslobađanja enzima iz acinusa je relativno visok, što omogućava testiranje efekta antagonista bombezina na samo bazalno oslobađanje amilaze. To je još jedna prednost u odnosu na eksperimente sa statičkim uslovima. Antagonisti bombezina koje smo ispitivali, nisu stimulisali oslobađanje amilaze iz preparata, što ukazuje da nisu imali agonističku aktivnost. Isto tako, ovi analozi su, u koncentraciji od 100 nM, svi inhibisali bazalnu sekreciju amilaze. Efekt je bio brz i reverzibilan, sugerirajući da on nije posledica inhibicije sinteze enzima, jer za to je neophodno da prođe bar nekoliko sati.

Eksperimenti sa perfundovanim acinusima pankreasa ukazali su na fenomen desenzitizacije odgovora acinusa na ponavljajuću stimulaciju GRP(14-27)-om. Ovaj fenomen uočen je i ranije korišćenjem acinusa pankreasa zamorca (72). Pandol i saradnici (72), koji su detaljnije ispitivali fenomen desenzitizacije, zaključili su da je on rezultat kruženja receptora za bombezin između aktivnog i neaktivnog stanja, tj. verovatne posledice internalizacije kompleksa bombezin-receptor. U našim eksperimentima, desenzitizacija nije bila posledica ispražnjenosti ćelija enzimom, bila je vremenski zavisna i reverzibilna, što je u skladu sa nalazima Pandola i saradnika na acinusima zamorca.

Naši eksperimenti, u kojima smo ispitivali endokrine efekte antagonista bombezina kod pacova, pokazali su da je moguće testirati analoge bombezina *in vivo* eksperimentima, ali ovi eksperimenti imaju ograničenja (skupi su) za rutinsko testiranje većeg broja analoga. Ipak, podaci koje smo dobili ispitujući endokrine efekte antagonista bombezina zaslužuju komentar.

ENDOKRINI EFEKTI ANTAGONISTA BOMBEZINA KOD PACOVA

Pokazali smo da antagonisti bombezina, RC-3095, RC-3420 i RC-3125 značajno i dozno-zavisno, inhibišu stimulaciju sekrecije gastrina uzrokovanu GRP(14-27). Antagonist RC-3105 pokazao se mnogo manje aktivan, što je u korelaciji sa njegovim nižim afinitetom u receptorskim studijama. Autoradiografskim i radioreceptorskim studijama, receptori za GRP pokazani su na gastrinskim ćelijama mukoze antruma želuca (16). Pokazano je da su efekti bombezina i GRP-a posledica direktnog dejstva na gastrinske ćelije (15, 73). Prema tome, razlike u inhibitornim efektima naših antagonista prema GRP-u, mogu se pripisati razlikama u afinitetu prema receptorima za bombezin na gastrinskim ćelijama antruma želuca pacova.

Naši eksperimenti su pokazali da GRP i antagonisti bombezina ne menjaju nivo insulina u serumu gladnih pacova. Podaci iz literature o tome su kontradiktorni. Intravenska injekcija GRP-a ili bombezina stimulisala je sekreciju insulina kod čoveka, psa i miša (74, 75, 76). U nekim drugim studijama na čoveku, GRP nije značajnije promenio nivo insulina u serumu (77, 78). Isto tako, izgleda da efekt GRP-a na sekreciju insulina kod pacova zavisi od toga da li je životinja pre eksperimenta gladovala ili ne (79).

Posle i.v. injekcije GRP(14-27) pacovima, došlo je do značajnijeg porasta serumskog glukagona tek posle 10 min. Sličan tip odgovora na bombezin opisan je kod psa (80). Antagonist bombezina RC-3095 je u potpunosti blokirao stimulaciju sekrecije glukagona GRP-om. Analog RC-3125 nije uticao na efekt GRP-a, iako je u potpunosti (kao i RC-3095) sprečio porast gastrina u serumu uzrokovan GRP-om. Ovi rezultati ukazuju na moguće razlike između receptora za bombezin koji se nalaze na G-ćelijama želuca u odnosu na receptore na ćelijama koje učestvuju u regulaciji sekrecije glukagona.

GRP(14-27) je, posle i.v. primene kod pacova, povećao koncentraciju glukoze u serumu. Ovo dejstvo GRP(14-27) je verovatno posledica stimulacije oslobađanja glukagona. Efekt GRP-a na nivo glukoze u serumu je različit kod različitih životinjskih vrsta. Naime, GRP dozno-zavisno

povećava koncentraciju glukoze u krvi ovce, ali ima suprotan efekt kod psa (75). Ova razlika se tumači razlikom u odgovoru jetre na povećanje sekrecije insulina i glukagona uzrokovanih GRP-om. Potrebne su dodatne studije da se rasvetli tačna uloga bombezina/GRP-a u regulaciji glikemije. Efekt GRP(14-27) na nivo glukoze u krvi pacova, u potpunosti je bio inhibisan antagonistom bombezina RC-3095.

Podaci koje smo dobili iz naših eksperimenata govore da GRP(14-27), posle i.v. primene, ne menja koncentraciju hormona rasta u serumu pacova. Međutim, posle primene u lateralnu komoru mozga pacova, GRP(14-27) je uzrokovao dugi (oko 60 min) pad nivoa GH u serumu. Ovaj centralni efekt GRP(14-27) mogao je u potpunosti da se blokira prethodnom i.c.v. primenom antagonista bombezina RC-3095, što govori u prilog da se centralni efekt GRP(14-27) odvija posredstvom specifičnih bombezinskih receptora. Panula i saradnici su pokazali prisustvo receptora za GRP na magnocelularnim neuronima hipotalamusa (81). Nekoliko drugih studija pokazuju da GRP može, bar delom, da inhibiše oslobađanje GH stimulacijom sekrecije somatostatina iz hipotalamusa (82, 83).

Efekti antagoniste bombezinskih receptora RC-3095 prema stimulativnom delovanju GRP(14-27) na sekreciju gastrina kod pacova, detaljnije je analizirana u našim eksperimentima. RC-3095 je posle s.c. ili intratrahealne primene, značajno inhibisao efekt GRP(14-27) i kada se davao 60 minuta pre GRP(14-27). Međutim, i.v. primena RC-3095, 30 min pre GRP(14-27), nije imala inhibitornog efekta. Prolongirano delovanje RC-3095 posle intrapulmonarne primene, u poređenju sa i.v. primenom, može da se objasni uskladištenjem, i kasnije sporim oslobađanjem RC-3095 iz makrofaga pluća ili ćelija bronhijalnog stabla. Antagonist RC-3095 se pokazao efikasnim posle primene različitim putevima, s.c., i.v., intratrahealno, što ukazuje da je relativno rezistentan prema proteolitičkim enzimima, posebno u bronhijalnom stablu i u potkožnom tkivu. Posebno može biti interesantna mogućnost za primenu RC-3095 u obliku spreja za inhalaciju. Ovaj put primene bio bi jednostavan za hroničnu primenu, a istovremeno bi omogućio bliži kontakt leka sa tumorom kod bolesnika sa SCLC.

EKSPERIMENTALNI KARCINOMI DOJKE

Inhibitorno dejstvo antagoniste bombezina RC-3095 na rasta MCF-7 MIII humanog karcinoma dojke transplantiranog golim miševima

Ekperimenti u uslovima *in vitro* su pokazali da bombezini stimuliše proliferaciju MCF-7 MIII ćelija, kao i da RC-3095 inhibiše njihov rast. Pokazali smo da se GRP može naći u ekstraktima ovih ćelija (rezultati nisu prikazani). Ovi podaci ukazuju da bombezini može delovati kao faktor rasta za neke estrogen-nezavisne ćelijske linije humanog karcinoma dojke, kakva je na primer MCF-7 MIII linija.

Hronična terapija tumora razvijenih od MCF-7 MIII ćelija u miševa sa RC-3095, uzrokovala je inhibiciju rasta tumora za 58%. Mehanizam inhibitornog dejstva antagoniste bombezina ostaje nejasan, mada se mogu postaviti sledeće hipoteze.

RC-3095 može da blokira trofičke stimuluse endogenih bombezinu-sličnih peptida, dejstvom na specifične bombezinske receptore. Inhibitorni efekat RC-3095 bio je praćen sniženjem nivoa IGF-I u serumu životinja. Poznato je da IGF-I ima važnu ulogu u proliferaciji karcinoma dojke (84, 85, 86, 87). Afinitet vezivanja IGF-I receptora bio je snižen posle terapije sa RC-3095. Inhibicija dejstva ili sekrecije IGF-I ili blokada receptora za IGF-I mogu biti mogući mehanizmi inhibitornog dejstva antagonista bombezina na rast karcinoma dojke. Isto tako, sniženje nivoa IGF-I u serumu može biti posledica supresije oslobađanja hormona rasta.

Izuzetna važnost koncentracije EGF receptora za progresiju karcinoma dojke nedvosmisleno je dokumentovana (84, 88). U našem eksperimentu, terapija sa RC-3095 je značajno smanjila broj receptora za EGF na ćelijama tumora. Da je smanjenje broja receptora za EGF povezano sa inhibicijom rasta pokazali su i drugi istraživači (89, 90). Mehanizam kojim RC-3095 dovodi do nishodne regulacije EGF receptora nije jasan i biće kasnije detaljnije razmatran.

Inhibitorno dejstvo RC-3095 na rast estrogen-zavisnog i estrogen-nezavisnog MXT karcinoma dojke miša

Rast estrogen-zavisnog i estrogen-nezavisnog MXT karcinoma dojke miša bio je značano inhibisan terapijom sa bombezinskim antagonistom RC-3095. Bombezin i GRP nisu značajnije uticali na rast ovih tumora. Inhibicija rasta tumorskih ćelija u prisustvu RC-3095, dovela je do 45-65% redukcije zapremine tumora, do 35-58% smanjenja težine tumora, kao i statistički značajnog smanjenje broja AgNOR-a, kao indikatora proliferativne sposobnosti tumora. Kod estrogen-nezavisnog tumora, inhibicija rasta bila je povezana sa smanjenjem maksimalnog kapaciteta vezivanja receptora za EGF od 0.21 ± 0.016 pmol/mg proteina u kontrolnim tumorima, na 0.03 ± 0.003 pmol/mg proteina kod tumora lečenih RC-3095-om. Naši rezultati su bili, inače, **prvi dokaz** da bombezinski antagonisti mogu inhibisati rast karcinoma dojke *in vivo*.

Ovarijektomija (ablacija estrogena) ili primena antiestrogena može biti korisna terapija za mnoge bolesnice sa estrogen-zavisnim karcinomom dojke, ali samo 30% tumora dojke regresira posle primene hormonske terapije (86, 87, 91). Regresija tumora je najčešće privremena, i većina hormonski-zavisnih tumora postaje posle primene hormona rezistentna na ovu vrstu terapije (86, 87, 91). Za rast ćelija karcinoma dojke odgovorni su mnogi hormoni i faktori rasta (91). Tumorske ćelije mogu same stvarati pojedine faktore rasta, kao što su IGF-I ili TGF- α (84-88). Poznato je postoji inverzan odnos između prisustva receptora za estrogen i receptora za EGF kod humanih karcinoma dojke (88, 92). Ekspresija EGF receptora povezana je sa lošom prognozom i rezistencijom tumora na endokrinu terapiju (88, 93). Tek od nedavno, sve je više podataka da bombezin, GRP i njima slični peptidi mogu biti faktori rasta normalnog ili tumorskog tkiva dojke (29, 94-97). Inhibicija delovanja ili sekrecije svih ovih faktora rasta, kao i blokada njihovih receptora mogući su novi pristupi u terapiji karcinoma dojke. Ovakve terapijske mogućnosti se uveliko ispituju. Hirurško uklanjanje pljuvačnih žlezda, kao najvećeg izvora EGF-a, zaustavilo je rast tumora dojke miša (98). Antitela prema receptorima za EGF (99) i IGF-I inhibisala su rast ćelija humanog karcinoma dojke. U našim eksperimentima bombezin i GRP(14-27) nisu stimulisali rast MXT tumora *in vivo*. Stimulaciju rasta ćelija karcinoma dojke nije bilo jednostavno pokazati čak ni u uslovima *in vitro*, pa stoga ne čudi nemogućnost da se to pokaže *in vivo* eksperimentom. Može se ipak zaključiti da je inhibitorni efekt antagoniste bombezinskih receptora RC-3095 prema rastu MXT tumora dojke miša, najverovatnije posledica transmodulacije receptora za EGF tj. njihove nishodne regulacije.

INHIBITORNO DEJSTVO ANTAGONISTE BOMBEZINA RC-3095 NA RAST KARCINOMA PANKREASA HRČAKA UZROKOVANOG HEMIJSKIM KARCINOGENOM

Poznato je da zračenje i hemioterapija imaju veoma ograničenu efikasnost u terapiji karcinoma pankreasa. Različita istraživanja pokazala su da različiti hormoni, posebno gastrointestinalnog porekla (kao što su gastrin, holecistokinin, sekretin, neurotenzin, bombezini), kao i faktori rasta mogu stimulisati rast karcinoma pankreasa (za revijski prikaz vidi referencu 101).

Bombezini stimuliše sekreciju enzima pankreasa tako što oslobađa holecistokinin, ali i direktnim dejstvom na acinuse (102). Bombezini ubrzava razvoj karcinoma pankreasa pacova indukovanog azaserinom (103). GRP je stimulisao rast CAPAN ćelijske linije humanog karcinoma pankreasa dejstvom na specifične receptore (104). Bombezinski receptori pokazani su i na AR 42J ćelijama karcinoma pankreasa pacova (105). Međutim, Alexander i saradnici pokazuju da bombezini inhibiše rast humanog karcinoma pankreasa transplantiranog golim miševima (106).

U našim eksperimentima sa karcinomom pankreasa hrčaka prouzrokovanom nitrozaminom, RC-3095 je, posle 2 meseca terapije, inhibirao težinu tumorskih pankreasa za oko 88%. Pokazali smo i prisustvo receptora za bombezini velikog afiniteta na tumorskim ćelijama. Inhibitorni efekt RC-3095 može, prema tome, biti posledica direktnog delovanja preko specifičnih receptora. Značaj bombezinskih receptora za rast karcinoma pankreasa može biti veliki. Na to ukazuje i nalaz Alexander-a (106), da bombezini sam inhibira rast ksenografta humanog karcinoma pankreasa u golim miševima, koji se verovatno može objasniti nishodnom ("down") regulacijom receptora za bombezini (koju može proizvesti i agonist i antagonist).

Sličan efekt inhibicije opisali smo i mi, kada je GRP inhibisao rast H-345 ćelija humanog SCLC-a *in vitro*.

Antitumorski efekt RC-3095 na BOP tumor, može biti posledica inhibitornog delovanja na sekreciju različitih gastrointestinalnih hormona ili endokrinih, parakrinih i autokrinih faktora rasta. Slično nalazu kod eksperimenata sa karcinomom dojke, primena RC-3095 prouzrokovala je snažnu nishodnu regulaciju receptora za EGF na membranama BOP tumora hrčaka. Uloga EGF-a u nastanku karcinoma pankreasa nije u potpunosti jasna.

INHIBITORNO DEJSTVO ANTAGONISTE BOMBEZINA RC-3095 NA RAST PC-82 HUMANOG KARCINOMA PROSTATE TRANSPLANTIRANOG GOLIM MIŠEVIMA

Karcinom prostate je jedan od najčešćih karcinoma kod muškaraca. Iako je karcinom prostate hormon-zavisni tumor, sa povoljnim delovanjem različitih vidova hormonske terapije, ipak su neophodni novi modaliteti u terapiji ove bolesti. PC-82 tumor ima poreklo od bolesnika sa srednje diferentovanim karcinomom prostate i sastoji se uglavnom od androgen-zavisnih ćelija (107, 108, 109). PC-82 se smatra veoma korisnim modelom tumora za ispitivanje različitih terapijskih modaliteta. Opšte je poznato da se karcinom prostate izuzetno teško može transplantirati golim miševima. Prema literaturi, uspeh transplantacije uzoraka humanog karcinoma prostate golim miševima iznosi manje od 1%. U našem radu smo pokazali da upotreba Matrigel-a, ekstrakta bazalne mebrane ćelija, može biti veoma korisna u svrhe "primanja" transplantata (ksenografta) karcinoma prostate kod golog miša.

Uloga bombezina u rastu karcinoma prostate veoma je malo ispitivana. Bologna i saradnici (28) pokazali su da bombezin stimuliše rast ćelija karcinoma prostate *in vitro*. Ovi autori su, šta više, pretpostavili autokrinu ili parakrinu ulogu bombezina u karcinomu prostate.

Naši eksperimenti su bili prvi dokaz za inhibitorni efekat antagoniste bombezina na rast humanog karcinoma prostate. RC-3095 je snizio koncentracije GH i IGF-I u serumu životinja, što može imati za posledicu inhibiciju rasta tumora. Već ranije opisani efekat RC-3095 na broj receptora za EGF, ponovo je viđen i u eksperimentu sa PC-82 tumorom. Da EGF ima važnu ulogu u razvoju karcinoma prostate postoje mnogobrojni dokazi (110, 111, 112). O direktnom efektu RC-3095 na specifične receptore ne može se govoriti, jer prisustvo bombezinskih receptor na membranama PC-82 tumora nismo ispitivali.

INHIBITORNO DEJSTVO ANTAGONISTE BOMBEZINA RC-3095 NA RAST HT-29 HUMANOG KARCINOMA KOLONA TRANSPLANTIRANOG GOLIM MIŠEVIMA

Mada je mortalitet od karcinoma kolona u padu, ukupno 5-godišnje preživljavanje ostaje oko 50% (113). Hiruška ekscizija je efikasna samo kod bolesnika kod kojih je bolest rano dijagnostikovana, pa su potrebni dalji naponi za razvoj uspješnije terapije, posebno uznapredovalih, metastatskih oblika karcinoma kolona.

Višestruki su dokazi koji potvrđuju verovanje da je rast karcinoma kolona pod hormonskom kontrolom. Poznato je da muški pol utiče na incidencu kolorektalnog karcinoma (114, 115). Androgeni receptori se nalaze na ćelijama karcinoma kolona (116), a kastracija pacova smanjuje rizik za razvoj karcinoma kolona pod uticajem karcinogena (117). Mnogobrojni hormoni gastrointestinalnog trakta stimulišu rast kolorektalnog karcinoma: gastrin, holecistokinin, sekretin, insulin, glukagon (4, 118, 119), a poznato je da i faktori rasta, kao što su IGF-I, EGF i TGF- α , mogu da stimulišu rast ćelija karcinoma kolona (118, 119).

HT-29, ćelijska linija adenokarcinoma kolona, zadržala je određene karakteristike tumorskih ćelija od kojih je nastala. Ćelije imaju receptore za gastrin i gastrin stimuliše njihov rast (118, 120). Gastrin stimuliše i rast HT-29 ćelija posle njihove transplantacije golom mišu (120). Ćelije ove linije takođe luče faktore rasta IGF-I i EGF (121). Prema tome, HT-29 ksenografti predstavljaju zahvalan model za ispitivanje uticaja različitih vidova hormonske terapije na rast kolorektalnih tumora.

U našim studijama našli smo da je posle terapije sa dva antagonista bombezina/GRP-a, RC-3095 i RC-3440, došlo je do 45-60% inhibicije rasta HT-29 tumora. Bombezinski antagonisti snizili su nivo gastrina u krvi miševa, što delom može objasniti njihov antitumorski efekt. Isto tako, sniženje koncentracije IGF-I u cirkulaciji, koju je uzrokovao RC-3095, može doprineti njegovom efektu. Antagonisti bombezina mogu delovati i direktno preko specifičnih receptora na membranama ćelija. Skorašnje studije pokazale su prisustvo receptora za bombezin/GRP na ćelijama humanog karcinoma kolona NCI-H716 i na MC-26 ćelijama karcinoma kolona miša (23, 122). Bombezin je stimulisao rast MC-26 ćelija, dok je bombezinski antagonist inhibirao taj efekt (23). Mi smo opisali veoma mali broj specifičnih receptorskih mesta za bombezin/GRP na HT-29 ćelijama. U posebnoj studiji, čiji rezultati nisu prezentirani u ovom radu, pokazali smo da se specifični receptori za bombezin nalaze kod 40% uzoraka humanog karcinoma kolona (123). U istoj studiji 80% uzoraka humanog karcinoma kolona pokazivalo je prisustvo receptora za EGF (123).

Terapija miševa sa ksenograftima HT-29 tumora, kako sa RC-3095 tako i sa RC-3440, dovela je do značajnog sniženja broja receptorskih mesta za EGF. Dejstvo antagonista bombezina na ekspresiju receptora za EGF može biti osnova mehanizma antitumorskog delovanja ovih jedinjenja, a ne dejstvo na bombezinske receptore.

Antagonist bombezina RC-3095 inhibirao je rast HT-29 tumora i posle intrasplenične injekcije tumorskih ćelija. Posle aplikacije HT-29 ćelija, one dospevaju portalnom cirkulacijom do jetre. Jetra je poznata kao organ sa najpovoljnijim uslovima za rast metastaza ćelija kolorektalnih tumora, verovatno zbog visokog sadržaja EGF-a (124). Inhibitorni efekt RC-3095 prema metastatskom rastu HT-29 ćelija, isto tako, ukazuje na interakciju između bombezina i EGF-a.

Slično našim eksperimentima sa BOP karcinomom pankreasa hrčaka i već spomenute studije Alexander-a sa humanim karcinomom pankreasa (106), primena bombezina inhibirala je rast HT-29 tumora za oko 30%. Bombezin je, slično efektu RC-3095, smanjio broj receptora za EGF na membranama HT-29 tumora.

MOGUĆI MEHANIZMI ANTITUMORSKOG DELOVANJA ANTAGONISTA BOMBEZINA

Inhibiciju rasta različitih tumora terapijom antagonisima bombezina/GRP-a, mogu objasniti različite hipoteze.

Pre svega, antagonisti bombezina mogu delovati **direktno** preko specifičnih receptora na membranama ćelija. Bombezin i GRP aktivacijom receptora prouzrokuju seriju intracelularnih signala (41, 42, 43). Povećanje inozitol 1,4,5-trifosfata mobilise kalcijum iz intracelularnih depoa. Stvaranje diacilglicerola aktivira protein-kinazu C. Bombezin takođe stimuliše izmenu jona Na, H i K kroz ćelijsku membranu. Aktivacijom fosfolipaze A2, bombezin uzrokuje produženo oslobađanje arahidonske kiseline. Antagonisti bombezina mogu inhibisati sve ove procese.

Antitumorsko delovanje antagonista bombezina/GRP-a može biti i **indirektno**. Najpre, ova jedinjenja mogu da inhibišu sintezu, oslobađanje i dejstvo različitih hormona ili faktora rasta za određene tumore. Misli se, pre svega, na različite gastrointestinalne hormone, gastrin, holecistokinin, sekretin, glukagon i dr., ali i na hormon rasta, somatostatin i dr. Isto tako, ovi lekovi

mogu da interferiraju sa stvaranjem i delovanjem drugih faktora rasta, kao što su IGF-I, TGF- α i EGF.

Postoji mogućnost da antagonisti bombezina mogu da **moduliraju druge receptore** na membranama ćelija tumora. Opisano je da pojedini faktori rasta, među njima i bombezin, mogu preko delovanja na svoje receptore, transmodulirati druge receptore, posebno receptore za EGF (125-130).

Postoje najmanje tri mehanizma kojim različiti agensi mogu uticati na EGF receptore: 1) modulacijom vezivanja za receptor ili modulacijom aktivnosti kinaza preko fosforilacije, 2) nishodna regulacija receptora kao posledica internalizacije i 3) povećanje ili sniženje sinteze receptora. Steroidni hormoni povećavaju sintezu EGF receptora povećanjem nivoa mRNK (126). Faktori rasta kao što su bombezin ili PDGF aktiviraju proteinsku kinazu C kao i druge kinaze (127-130). Aktivacija proteinske kinaze C uzrokuje fosforilaciju EGF receptora na mestima gde se nalazi aminokiselina treonin (131, 132). Ova reakcija inhibiše aktivnost tirozin kinaze EGF receptora i, šta više, redukuje vezivanje EGF-a za površinu ćelije (133). Alteracija u fosforilaciji receptora za EGF može uticati i na proces internalizacije i razgradnje receptora. Proteinska kinaza C može uticati i na sintezu EGF receptora, i njena prekomerna ekspresija snižava nivo mRNK kodirane za EGF receptore i tako snižava biosintezu receptora (134).

Tačan mehanizam delovanja bombezina na molekularnom nivou još nije u potpunosti objašnjen. Čini se, ipak, da je inhibitorno dejstvo receptorskih antagonista preko specifičnih receptora na površini membrane ćelije, mnogo kompleksnije od jednostavne blokade stimulantnog delovanja bombezina. Nishodna regulacija receptora za EGF, uočena je kao konzistentan fenomen posle terapije sa RC-3095 kod tumora dojke, pankreasa, prostate i kolona. Sličan efekat je opisan je posle stimulacije Swiss 3T3 ćelija bombezinom (133, 135).

ZAKLJUČCI

1. Biološku aktivnost antagonista bombezina moguće je ispitati na različitim eksperimentalnim modelima. Ovde su primenjena tri osnovna metodološka pristupa.

Klasična receptorska analiza (biohemijском metodom) pokazala se jednostavna i reproducibilna metoda, posebno ako se koriste Swiss 3T3 maligni fibroblasti miša. Ove ćelije sadrže najveći broj receptora za bombezina (od 50 000 do 100 000 receptorskih mesta po ćeliji), brzo rastu pričvršćene za podlogu, ne zahtevaju posebne uslove hranljive podloge i, što je najvažnije, kod ovih ćelija ne dolazi do spontane nishodne regulacije receptora za bombezina zbog toga što on za njih nije autokrini faktor rasta. Za razliku od Swiss 3T3 ćelija, ćelije humanog SCLC, ka npr. H-345 linija, sporije rastu, nalaze se u suspenziji, zahtevaju specijalnu hranljivu podlogu (HITES), bombezina kojeg ove ćelije stvaraju uzrokuje nishodnu regulaciju receptora preko kojih sam deluje, i, pod najpovoljnijim uslovima H-345 ćelije sadrže daleko manju gustinu ili broj receptorskih mesta za bombezina na svojoj površini (oko 2 000 po ćeliji).

Inhibicija nekog stimulativnog efekta bombezina je druga korisna eksperimentalna metoda za ispitivanje antagonista bombezina. Na primer, bombezina stimuliše rast Swiss 3T3, H-345 ćelija kao i ćelija humanog karcinoma dojke MDA MB 231. Mitogeni efekti bombezina i njegovih antagonista mogu se meriti praćenjem inkorporacije obeleženog timidina u DNK ćelija ili jednostavno brojanjem ćelija.

Od novih metoda za ispitivanje biološke aktivnosti bombezina i njegovih antagonista u ovom projektu prvi put je uspešno primenjena metoda superfuzije sa dispergovanim acinusima pankreasa. Ona je jednostavna, ne zahteva skupu opremu, na jednom preparatu pankreasa mogu se testirati različiti antagonisti, može se pratiti efekt lekova na bazalnu sekreciju acinusa i na taj način razdvojiti čisti antagonisti od parcijalnih agonista bombezina. Naši rezultati predstavljaju i afirmaciju ove nove metode.

2. Farmakodinamska aktivnost antagonista bombezina zavisi od dužine strukture peptidnog lanca. Analizi bombezina sa 14 aminokiselina u lancu (tetradekapeptidi) ne predstavljaju dovoljno snažne antagoniste jer su bili aktivni u mikromolarnim koncentracijama i njima nije posvećena posebna pažnja.

Mnogo snažniji antagonisti bili su polipeptidi kraćeg lanca aminokiselina, npr. sa 10, 9 ili 8 aminokiselina (7-14-, 6-14- i 6-13-bombezina). Strukturne izmene na poziciji 7 polipeptida kraćeg lanca, nisu se pokazale odlučujuće za značajnije povećanje antagonističke aktivnosti.

Uvođenje "pseudo-peptidne" veze između pozicija 13 i 14 u pojedine nonapeptidne analoge bombezina, prvi put je dalo antagoniste aktivne u nanomolarnim koncentracijama. Ako se pored "pseudo-peptidne" veze, na pozicije 6 i 14 (tj. na N ili C kraju molekule) nalaze aromatične aminokiseline, ako što su Trp i Tpi, nastaju jedinjenja sa aktivnošću u koncentraciji od 1 do 10 nM. Dva takva jedinjenja, RC-3095 i RC-3440, pokazala su aktivnost i u uslovima in vivo.

3. Antagonist bombezina RC-3095 inhibirao je rast tri tipa eksperimentalnog karcinoma dojke: humanog karcinoma dojke MCF-7 MIII transplantiranog golim miševima, estrogen-zavisnog kao i estrigen-nezavisnog MXT karcinoma dojke miša. Bombezinski antagonisti inhibirali su i rast BOP karcinoma pankreasa hrčaka uzrokovanog hemijskim karcinogenom, kao i rast humanih karcinoma kolona (HT-29) i prostate (PC-82) transplantiranih golim miševima.

4. Mehanizam antitumorskog delovanja antagonista bombezina je verovatno složen. Vezivanje ovih lekova za receptore za bombezina na tumorskim ćelijama, i sledstvena nishodna regulacija receptora, je svakako osnovno delovanje ovih lekova. U našim eksperimentima zapažena je izražena i konzistentna pojava nishodne regulacije receptora za EGF na membranama tumora lečenih antagonistima bombezina. Ta pojava tzv. transmodulacije EGF receptora može imati veliki značaj za antitumorsku aktivnost antagonista bombezina, s obzirom da je EGF snažan faktor rasta za različite maligne tumore.

Uticaj antagonista bombezina na koncentraciju pojedinih hormona u serumu, kao npr. snižavanje koncentracije gastrina ili hormona rasta, isto tako može doprinositi njihovom antitumorskom delovanju.

5. Rezultati opravdavaju dalja istraživanja antagonista bombezina kao mogućih lekova za terapiju onih malignih oboljenja kod kojih se pokaže da je bombezina značajan faktor za njihov nastanak i razvoj.

LITERATURA

1. Cutitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fishler, A. and Minna J.D. Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, 1985, 316:823-826.
2. Erspamer VG, Falconieri E, Inselvini M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol* 1970; 22:275-276.
3. Broccard, M., Erspamer, G.F., Melchiorri, P., Negri, L. and De Castiglione, R. Relative potency of bombesin-like peptides. *Br. J. Pharmacol.* 1975, 55: 221-227.
4. Thompson JC, Marx M. Gastrointestinal Hormones. In Ravitch MM, Steichen FM, Austen WG, Scott HW Jr, Fonkalsrud EW, Polk HC Jr. (eds). *Current Problems in Surgery*, vol XXI, No. 6, pp. 1-80. (Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc.).
5. Walsh JH, Reeve JR Jr, Vigna SR. Distribution and molecular forms of mammalian bombesin, in Bloom SR, in Bloom SR, Polak JM (eds). *Gut Hormones*, eds. 2. New York, Churchill Livingstone, 1981, pp.413-418.
6. Walsh JH, Wong HC, Dockery GJ. Bombesin-like peptides in mammals. *Fed Proc* 1979; 38:2315-2319.
7. Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatei MA, Solcia E, Brown MR, Pearse AGE. Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature* 1978; 273:769-770.
8. McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V. A gastrin releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut* 1978; 19:767-774.
9. McDonald TH, Jorvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V... Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90:227-233.
10. Reeve JR Jr, Walsh JH, Chew P, Clark B, Hawke D, Shively JE. Amino acid sequences of three bombesin-like peptides from canine intestine extracts. *J Biol Chem* 1983; 258: 5582-5588.
11. Spindel ER, Chin WW, Price J, Rees LH, Besser GM, Habener JH. Cloning and characterization of cDNAs encoding gastrin-releasing peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5699-5703.
12. Spindel ER, Sunday ME, Hoffer H, Wolfe HJ, Habener JF, Chin WW. Transient elevation of mRNAs encoding gastrin-releasing peptide (GRP), a putative pulmonary growth factor, in human fetal lung. *J Clin Invest* 1987; 80: 1172-1179.
13. Moody TW, Pert CD. Bombesin-like peptides in rat brain: quantitation and biochemical characterization. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90: 7-14.
14. Price J, Penman E, Wass JAH, Rees LH: Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Regul Pept* 1984; 9: 1-6.
15. Dockray GJ, Vaillant C, Walsh JH. The neuronal origin of bombesin-like immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Neuroendocrinol* 1976; 4: 1561-1568.
16. Sunday ME, Kalpan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER., *Biology of Disease, Gastrin-Releasing peptide (Mammalian Bombesin) Gene Expression in Health and Disease. Lab Invest.* 1988; 59: 5-24.
17. Tache Y, Brown M. On the role of bombesin in homeostasis. *Trends Neurosci* 1982; 5: 431-433.
18. Ghatei MA, Jung RT, Stevenson CJ, Hillyard T, Adrian C, Lee YC, Christofides ND, Sarson DL, Mashiter K, MacIntyre I, Bloom SR. Bombesin action on gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 980-985.
19. Bertaccini G, Erspamer V, Melchiorri P, Soprani N: Gastrin-release by bombesin in the dog. *Br J Pharmacol* 1974; 52: 219-225.
20. Deschodt-Lanckman M, Robberecht P, De Neef P, Lammens Christophe J: In vitro action of bombesin-like peptides on amylase secretion, calcium efflux, and adenylate cyclase activity in rat pancreas. *J Clin Invest* 1976; 58: 891-898.
21. Lehy T, Puccio F, Chariot J, Labeille D. Stimulating effect of bombesin on the growth of gastrointestinal tract and pancreas in suckling rats. *Gastroenterology* 1986; 90:1942-1949.
22. Rozengurt E, Sinnott-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:2936-2940.
23. Narayan S, Guo J-S, Townsend CM, Singh P. Specific binding and growth effects of bombesin-related peptides on mouse colon cancer cells in vitro. *Cancer Res* 1990; 50: 6772-6778.
24. Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science* 1986; 234: 161-166.
25. Zachary, I. and Rozengurt E. Autocrine growth factors and cancer. High-affinity receptors for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7616-7620; 1985.
26. Willey JC, Lechner JR, Harris CC. Bombesin and the C-terminal tetradecapeptide of gastrin-releasing peptide are growth factors for normal human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1984; 153: 245-248.

27. Seglen PO, Skomedal H, Saeter G, et al: neuroendocrine dysdifferentiation and bombesin production in carcinogen-induced hepatocellular rat tumors. *Carcinogenesis*, 1989; 10: 21-25.
28. Bologna M, Festiccia C, Muzi P, Biordi L, Ciomei M: Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 1989; 63: 1714-1720.
29. Giacchetti S, Gauville C, De Cremoux P, Bertin L, Berhon P, Abita J-P, Cuttitta F, Calvo F: Characterization, in some breast cancer cell lines, of gastrin-releasing peptide-like receptors which are absent in normal breast epithelial cells. *Int. J. Cancer* 1990; 46: 293-298.
30. Avis FP, Maneckjee R, Cuttitta F, Nakanishi Y, Mulshine J, Avis I: The role of gastrin releasing peptide in a pancreatic tumor cell line (CAPAN). *Proc. AACR*, 1988; 29: 54.
31. Moody TW, Russell EK, O'Donohue TL, Linden CD, Gazdar AF. Bombesin-like peptides in small cell lung cancer: Biochemical characterization and secretion from a cell line. *Life Sci* 1983; 32: 487-493.
32. Carney DN, Bunn PA, Gazdar AF, Pagan JA, Minna JD. Selective growth in serum-free hormone supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3185-3189.
33. Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN, Minna JD: High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science* 1981; 214: 1246-1248.
34. Carney DN, Cuttitta F, Moody TW, Minna JD. Selective stimulation of small cell lung clonal cancer growth by bombesin and gastrin releasing peptide. *Cancer Res* 1987; 47: 821-825.
35. Weber S, Zuckerman JE, Bostwisch DG, Bensch KG, Sikic BI, and Raffin TA. Gastrin-releasing peptide is a selective mitogen for small cell lung carcinoma in vitro. *J. Clin. Invest.* 1985; 75: 306-309.
36. Woll PJ, Rozengurt E. (D-Arg¹, D-Phe^{7,9}, Leu¹¹)-substance P: a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells inhibits the growth of human small-cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1859-1863.
37. Westendorf JM, Schonbrunn A: Characterization of bombesin receptors in a rat pituitary cell line. *J Biol Chem* 1983; 258:7527-7535.
38. Jensen RT, Moody T, Pert CP, Rivier JE, Gardner JD. Interaction of bombesin and litorin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 6139-6143.
39. Scemama JL, Zahidi A, Fourmy D, Fagot-Revurat P, Vaysse N, Pradayrol L, Ribet A: Interaction of (¹²⁵I)-Try-4-bombesin with specific receptors on normal human pancreatic membranes. *Regul Peptide* 1986; 13: 125-132.
40. Moody TW, Carney DN, Cuttitta F, Quattrocchi K, Minna JD: High affinity receptors for bombesin/GRP-like peptides on human small cell lung cancer. *Life Sci* 1985; 37: 105-113.
41. Zachary I, Rozengurt E. Identification of a receptor for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells by affinity cross-linking. *J Biol Chem* 1987; 262: 3947-3950.
42. Sinnett-Smith J, Zachary I, Rozengurt E. Characterisation of a bombesin receptor on Swiss mouse 3T3 cells by affinity cross-linking. *J Cell Biochem* 1988; 38: 237-249.
43. Rozengurt, E., Bombesin stimulation of mitogenesis; Specific receptors, signal transduction, and early events. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, 14:S11-S15.
44. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661-665.
45. Rozengurt E, Murray M, Zachary I, Collins M. Protein kinase C activation enhances cAMP accumulation in Swiss 3T3 cells: inhibition by pertussis toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2282-2286.
46. Battey JF, Way JM, Corjay MH, Shapira H, Kusano K, Harkins R, Wu JM, Slattery T, Mann E, Feldman RI. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 359-399.
47. von Schrenck T, Wang LH, Coy DH, Villanueva ML, Mantey S, Jensen RT. Potent bombesin receptor antagonist distinguish receptor subtypes. *Am J Physiol* 1990; 259:G468-G473.
48. Jensen RT, Jones SW, Folkers K, Gardner JD. A synthetic peptide that is a bombesin receptor antagonist. *Nature* 1984; 309: 61-63.
49. Bepler G, Zeymer U, Mahmoud S, Fiskum G, Palaszynski E, Rotsch M, Willey J, Koros A, Cuttitta F, Moody TW. Substance P analogues function as bombesin receptor antagonists and inhibit small cell lung cancer clonal growth. *Peptides* 1989; 9:1367-1372.
50. Pappas JN, Hamel D, Dabas H, Walsh J, Tashe Y. Spantide: Failure to antagonize bombesin-induced stimulation of gastrin secretion in dogs. *Peptides* 1985; 6:1001-1003.
51. Saeed ZA, Huang SC, Coy DH, Jiang NY, Heinz-Erian P, Mantey S, Gardner JD, Jensen RT. Effect of substitutions in position 12 of bombesin on antagonist activity. *Peptides* 1989; 10:597-603.

52. Heinz-Erian P, Coy DH, Tamura M, Jones SW, Gardner JD, Jensen RT. (D-Phe¹²) bombesin analogues: a new class bombesin receptor antagonist. *Am J Physiol* 1987; 252:G439-G442.
53. Coy DH, Heinz-Erian P, Jiang J, Sasaki Y, Taylor J, Moreau JP, Wolfrey WT, Gardner JD, Jensen RT. Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity. *J Biol Chem*, 1988;263:5056-5060.
54. Coy DH, Taylor JE, Jiang N-Y, Kim SH, Wang L-H, Huang S, Moreau JP, Gardner JD, Jensen RT. Short-chain pseudopeptide bombesin receptor antagonists with enhanced binding affinities for pancreatic acinar and Swiss 3T3 cells display strong antimitotic activity. *J Biol Chem* 1989; 264:14691-14697.
55. Saari WS, Heimbrook DC, Friedman A, Fisher TW, Oliff A. A gastrin-releasing peptide antagonist containing a (CH₂O) amine bond surrogate. *Biochem Biophys Res Com* 1989; 165: 114-117.
56. 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. and Jensen, R.T. Desmethionine alkylamide bombesin analogues: a new class of bombesin receptor antagonists with potent antisecretory in pancreatic acini and antimitotic activity in Swiss 3T3 cells *Biochemistry*, 29, 616-622; 1990.
57. Wang L-H, Coy DH, Taylor JE, Jiang N-Y, Moreau JP, Huang S-C, Frucht H, Haffiar BM, Jensen RT, Des-met carboxyl-terminally modified analogues of bombesin function as potent bombesin receptor antagonists, partial agonists or agonists. *J Biol Chem* 1990; 265: 15695-15703.
58. Heimbrook DC, Saari WS, Balishin NL, Friedman A, Moore KS, Reimen MW, Kiefer DM, Rotberg NS, Wallen JW, Oliff A. Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. *J Biol Chem* 1989; 264:11258-11262.
59. Camble R, Cotton R, Dutta AS, Garner A, Hayward CP, Moore VE, Scholes PB. N-isobutyryl-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-NHMe (ICI 216140) a potent *in vivo* antagonist analogue of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) derived from the C-terminal sequence lacking the final methionine residue. *Life Sci* 1989; 45:1521-1527.
60. Sasaki Y. and Coy, D.H. Solid phase synthesis of peptides containing the CH₂NH peptide bond isostere. *Peptides*, 8:119-121; 1987.
61. Munson, P.J. and Rodbard, D. Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Annal. Biochem.* 107:220-239, 1987
62. Bernfeld P. Amylases α and β (1955) In: Colowich SP, Kaplan NO. eds., *Methods of Enzymology*, Vol. I, Academic Press, New York, pp. 149-156.
63. Coy HD, Jensen RT, Jiang NY, Lin JT, Bogden AE, Moreau JP. Systematic Development of Bombesin/Gastrin-Releasing Peptide Antagonists. *Journal of the National Cancer Institute, Monographs No. 13*, 1992.
64. Spatola, A.F. Peptide backbone modifications: A structure-activity analysis of peptides containing amide bond surrogates. In: *Chemistry and Biochemistry of amino acids, Peptides and Proteins*, edited by B. Weinstein. Basel: Marcel Dekker, Inc., 1983, pp. 267-357.
65. Sinnott-Smith J, Lehmann W, Rozengurt E. Bombesin receptor in membranes from Swiss 3T3 cells: binding characteristics, affinity labelling and modulation by guanine nucleotides. *Biochem J* 1990; 265: 485-493.
66. Moody TW, Bertness V, Carney DN. Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines. *Peptides*, 1983; Vol. 4. 683-686.
67. Nelson J, Donnelly M, Walker B, Gray J, Shaw C, and Murphy R.F. Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br. J.Cancer*, 1991; 63:933-936.
68. Vangsted A.J, Andersen E.V, Nedergaard L., and Zeuthen J. Gastrin realising peptide GRP (14-27) in human breast cancer cells and in small cell lung cancer. *Breast Cancer Res. Treat*, 1991; 19:119-128.
69. Vangsted, A.J., and Schwartz, T.W. Production of gastrin-realising peptide- (18-27) and a stable fragment of its precursor in small cell lung carcinoma cells. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 1990; 70: 1586-1593.
70. Csemus V, Schally AV. The dispersed cell superfusion system. In: *Neuroendocrine Research Methods*, ed. B.D. Greenstein, Harwood Academic Publishers GMBH, London (in press).
71. Mulder G.H., Smelik O.G. *Endocrinology*, 1977, 199:1143-1152.
72. Pandol SJ, Jensen RT, Gardner JD. *J. Biol. Chem*, 1982; 257: 12024-12029.
73. McDonald TJ. and Fox JET. Effects of porcine gastrin releasing peptide (GRP) on canine antral motility and gastrin release *in vivo*. *Life Sci.* 1984; 35: 1415-1422.
74. McDonald TJ, Ghatei MA, Bloom SR, Adrian TE, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara N. Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide. *Regul Peptide* 1983; 5: 125-137.
75. McDonald TJ, Houghton P, Challis JRG, Hramiak IM. Bombesin-like peptides in health and disease. In: *The effect of gastrin-releasing peptide on the endocrine pancreas*. Ed. Tache Y, Melchiorri P, negri L. *Annals of the New York Academy of Science* 1988; 547: 242-254.

76. Pettersson M. and Ahren B. Gastrin-releasing peptide (GRP): Effects on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in the mouse. *Peptides* 1987; 8: 55-60.
77. Scarpignato C, Gioffre M, Gulin FM, and Micali B. Different effects of bombesin on glucose and tolbutamide-induced insuline release in man. *Br. J. Pharmacol* 1988; 94: 1023-1028.
78. Wood, S.M., Jung, R.T., Webster, J.D., Ghatei, M.A., Adrian, T.E., Yanaihara, N., Yanaihara, C. and Bloom, S.R. The effect of the mammalian neuropeptides, gastrin-releasing peptide (GRP), on gastrointestinal and pancreatic hormone secretion in man. *Clin. Sci. (Lond)* 65:365-371; 1983.
79. Greeley GH. and Thompson JC. Insulinotropic and gastrin-releasing action of gastrin-releasing peptide (GRP). *Regul. Pept.* 8:97-103, 1984.
80. Mukai H, Kaqwai K, Suzuki S, Ohmori H, Yamashita K. and Munekata E. [Ala⁶]gastrin-releasing peptide-10: an analogue with dissociated biological activities. *Am. J. Physiology* 258: (Endocrinol. Metabol.) 1989; 20: E235-E240.
81. Panula PA, D. Cosenza-Murphy, HYT Yang and E. Costa. Binding of GRP(14-27) but not bombesin or GRP (1-27) to hypothalamic magnocellular elements: an immunohistochemical study. *J. Histochem. Cytochem.* 1984; 32: 202-208.
82. Kabayama Y. Kato Y, Shimatsu A, Ohta H, yanaihara N. and Imura H. Inhibition by gastrin-releasing peptide on growth hormone (GH) secretion induced by human pancreatic GH-releasing factor in rats. *Endocrinology* 1984; 115: 649-653.
83. Wakabayashi I, Tonegawa Y, Shibasaki T, Ihara T, Hattori M. and Ling n. Effect of dopamine, bombesin and cysteamine hydrochloride on plasma growth hormone response to synthetic growth hormone-releasing factor in rats. *Life Sci.* 1985; 36: 1437-1443.
84. Dickson RB. and Lippman ME: Estrogenic Regulation of Growth and Polypeptide Growth Factor Secretion in Human Breast Carcinoma. *Endocrine Rev* 1987; 8: 29-43.
85. Osborne CK, Clemmons DR, Arteaga CL. Regulation of breast cancer growth by insuline-like growth factors. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1990; 37: 805-809.
86. Lippman ME, Dickson RB, Gelmann EP, Rosen N, Knabbe C, Bates S, Bronzert D, Huff K, Kasid A. Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *J Cell Biochem* 1987; 35: 1-16.
87. Thompson EW, Martin MB, Saceda M, Clarke R, Brunner N, Lippman ME, Dickson RB. Regulation of breast cancer cells by hormones and growth factors: Effects on proliferation and basement membrane invasiveness. *Horm Res* 1989; 32: Suppl 1, 242-249.
88. Sainsbury JR, Needham GK, Farndon JR, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; I: 1398-1401.
89. Koga M, Eisman JA, Sutherland RL. Regulation of epidermal growth factor receptor levels by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1988; 48: 2734-2739.
90. Kosano H, Takatani O. Reduction of epidermal growth factor binding in human breast cancer cell lines by an alkyl-lysophospholipid. *Cancer Res* 1988; 48: 6033-6036.
91. Santen RJ, Manni A, Harvey H, et al: Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr. Rev.* 1990; 11:221-265.
92. Fekete M, Witliff JL, Schally AV: Characteristics and distribution of receptors for (D-Trp⁶) - luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal.* 1989; 3:137-147.
93. Nicholson S, Sainsbury JR Halcrow P, et al: Expression of epidermal growth factor receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet*, 1989; 1:182-185.
94. Jahnke GD, Lazarus LH: A bombesin immunoreactive peptide in milk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984; 81: 578-582.
95. Ekman R, Ivarsson S, Jansson L: Bombesin, neurotensin, and pro-gamma-melanotropin immunoreactants in human milk. *Regul Pept*, 1985; 10 : 99 - 105.
96. Gaudino G, De Bortoli M, Lazarus LH: A bombesin-related peptide in extramammary tumors in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1986; 464:450-453.
97. Patel KV, Schrey MP: Activation of inositol phospholipid signaling and Ca²⁺ efflux in human breast cancer cells by bombesin. *Cancer Res*, 1990; 50:235-239.
98. Kurachi H, Okamoto SH, Oka T: Evidence for the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82:5940-5943.
99. Ennis BW, Valverius EM, Bates SE, et al: Anti-epidermal growth factor receptor antibodies inhibit the autocrine-stimulated growth of MDA-468 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 1989; 3:1830-1838.
100. Arteaga CL, Osborne CK: Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedin receptor. *Cancer Res*, 1989; 49:6237-6214.
101. Poston GJ, Gillespie J. and Guillou PJ. The biology of pancreatic cancer. *Gut*, 1991; 32: 800-812.

102. Deschodt-Lanckman M., Robberecht P., DeNeef P., Lammens M. and Christophe J.: In vitro action of bombesin and bombesin-like peptides on amylase secretion, calcium efflux, and adenylate cyclase activity in the rat pancreas. A comparison with other secretagogues. *J. Clin. Invest.* 1976; 58: 891-898.
103. Douglas BRK, Wouterson RA, Jansen JBM, de Jong AJL, Rovati LC and Lamers CBHW. Influence of cholecystokinin antagonist on the effects of cholecystokinin and bombesin on azaserine induced lesions on rat pancreas. *Gastroenterology*, 1989; 96: 462-469.
104. Avis FP, Maneckjee R, Cuttitta F, Nakanishi Y, Mulshine J. and Avis I: The role of gastrin releasing peptide in a pancreatic tumor cell line (CAPAN). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1988; 29: 54.
105. Singh P., Draviam E., Guo Y-S., and Kurosky A.: Molecular characterization of bombesin receptors on rat pancreatic acinar AR42J cells. *Am. J. Physiol.*, 1990; G803-G809.
106. Alexander, R. W., Upp, J. R. Jr., Poston, G. J., Townsend, C. M. Jr., Singh, P., and Thompson, J. C., Bombesin inhibits growth of human pancreatic adenocarcinoma in nude mice. *Pancreas*, 1988, 3:297-302.
107. Hoehn W, Schroeder FH, Riemann JF, Joebsis AC, hermanek P: Human prostatic adenocarcinoma: Some characteristics of a serially transplantable line in nude mice (PC-82). *The Prostate* 1980; 1: 95-104.
108. Van Steenbrugge GJ, Groen M, Romijn JC and Schroeder F. Biological effects of hormonal treatment regimens on a transplantable human prostate tumor line (PC-82). *J. Urol* 1984; 131: 812-817.
109. Wright GL, haley CL, Caspo Z, Van Steenbrugge GJ: Immunohistochemical evaluation of the expression of prostate tumor-association markers in nude mouse human prostate carcinoma heterotransplanted lines PC-82, PC-EW, and PC-EG. *Prostate* 1991; 17: 301-316.
110. Cannolly JM, Rose DP. Secretion of epidermal growth factor and related polypeptides by the DU 145 human prostate cancer cell line. *The Prostate* 1989; 15: 177-186.
111. Cannolly JM, Rose DP. Autocrine regulation of DU145 human prostate cancer cell growth by epidermal growth factor-related polypeptides. *The Prostate*, 1991; 19: 173-180.
112. Stoscheck CM, King LE Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res*, 1986; 46: 1030-1037.
113. Beart, Jr., R.W., Colon, Rectum, and Anus. *Cancer*, 1990, 333:684-688.
114. Fraumeni, J.F., Lloyd, J.W., Smith, E.M., and Wagoner, J.K., Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1969, 42:451-456.
115. Weiss, N.S., Dalling, J.R., and Chow, W.H., Incidence of cancer of the large bowel in women in relation to reproductive and hormonal factors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 67:57-60.
116. Alford, T.C., Do, H.-M., Geelhoed, G.W., Tsangaris, N.T., and Lippman, M.E., Steroid hormone receptors in human colon cancers. *Cancer*, 1979, 43:980-984.
117. Moon, R.C., and Fricks, C.M., Influence of gonadal hormones and age on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Cancer*, 1977, 40:2502-2508.
118. Smith, J.L., and Solomon, T.E., Effects of gastrin, proglumide, and somatostatin on growth of human colon cancer. *Gastroenterology*, 1988, 95:1541-1548.
119. Tahara, E., Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, 116:121-131.
120. Watson, S.A., Durrant, L.G., and Morris, D.L., Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumour cells. *Br. J. Cancer*, 1989, 59:554-558.
121. Culouscou, J.-M., Remacle-Bonnet, M., Garroste, F., Marvaldi, J., and Pommier, G., Simultaneous production of IGF-I and EGF competing growth factor by HT-29 human colon cancer cell line. *Int. J. Cancer*, 1987, 40:646-652.
122. Frucht, H., Gazdar, A., and Jensen, R.T., Human colon cancer cell line NCI-H716 expresses functional bombesin receptors. *Abstr. No. 281, Proc. Am. Assoc. for Cancer Res.*, 1991, 32:47.
123. Radulovic S, Cai RZ, Milovanovic S, Schally AV. The binding of bombesin and Somatostatin and their analogs to human colon cancers. *Proc Soc Exper Biol Med.* in Press, 1991.
124. Fidler, A., The biology of human colon carcinoma metastasis. *ASCO, 27th Annual Meeting, Houston, TX, 1991*, pp. 57-61.
125. Rosner MR: Regulation of the epidermal growth factor receptor by growth-modulating agent. *Biotechnol Appl Biochem*, 1990; 12:473-477.
126. Ewing TM, Murphy LJ, Ng M-L, Pang GYN, Lee ChSL, Watts CKW, Sutherland RL: Regulation of epidermal growth factor receptor by progestins and glucocorticoids in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 1989; 44: 744-752.
127. Bertics PJ, Weber W, Cochet C, et al: Regulation of the epidermal growth factor receptor by phosphorylation. *J Cell Biochem*, 1985; 29:195-208.

128. Gill GN, Bartics PJ, Santon JB: Epidermal growth factor and its receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 1987; 51:169-186.
129. Friedman BA, Rosner MR: Growth factors modify the epidermal growth factor receptor through multiple pathways. *J Cell Biochem*, 1987; 34:1-11.
130. Waterfield MD: Epidermal growth factor and related molecules. *Lancet*, 1989; 1:1243-1246.
131. Lund KA, Lazar CS, Chen WS et al: Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *J Biol Chem*, 1990; 265:20517-20523.
132. Welch JB, Gill GN, Rosenfield MG, et al: A negative feedback loop attenuates EGF-induced morphological changes. *J. Cell Biol*, 1992; 114:533-543.
133. Zachary I, Sinnett-Smith JW, Rozengurt E: Early events elicited by bombesin and structurally related peptides in quiescent Swiss 3T3 cells. I. Activation of protein kinase C and inhibition of epidermal growth factor binding. *J Cell Biol*, 1986; 102:2211-2222.
134. Eldar H, Zisman Y, Ullrich A, et al: Overexpression of protein kinase C alpha-subtype in Swiss/3T3 fibroblasts causes loss of both high and low affinity receptor numbers for epidermal growth factor. *J. Biol Chem*, 1990; 265:13290-13296.
135. Zachary I, Rozengurt E: Modulation of the epidermal growth factor receptor by mitogenic ligands. Effects of bombesin and role of protein kinase C. *Cancer Surv*, 1985; 4:729-765.



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Синиша С. Радуловић

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Pretklinička farmakologija antagonista bombezina

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, _____ 10.12.2013. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под

Pretklinička farmakologija antagonista bombezina

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис


У Београду, ___10.12.2013._____