

**^{99m}Tc-HYNIC-rh-ανεξίνη V
Η απεικόνιση του αποπτωτικού θανάτου**

**A. Ζαγκλής,
E. Χουσιανάκου**

*Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής,
ΠΓΝΝ «Ο Ευαγγελισμός», Αθήνα*

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Φωσφατιδυλοσερίνη
^{99m}Tc-HYNIC-ανεξίνη V

**^{99m}Tc-HYNIC-rh-annexin V.
The imaging of apoptotic death**

Abstract at the end of the article

Το 1972, ο Kerr εισήγαγε για πρώτη φορά τον όρο «απόπτωση», περιγράφοντας τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων, που παρατήρησε σε δείγματα ιστών από επινεφρίδια.¹ Τα αποπτωτικά κύτταρα εμφάνιζαν συρρίκνωση, συμπύκνωση της χρωματίνης του πυρήνα και κατακερματισμό της. Αντίθετα, τα μιτοχόνδρια δεν παρουσίαζαν, οπτικά τουλάχιστον, αλλοιώσεις και η κυτταρική μεμβράνη τους παρέμενε ανέπαφη, αν και με φυσαλίδες εντός αυτής. Ακόμα, η ηλεκτροφόρηση του DNA αποπτωτικών κυττάρων παρουσίαζε χαρακτηριστική εικόνα σκάλας (ladder bands).²

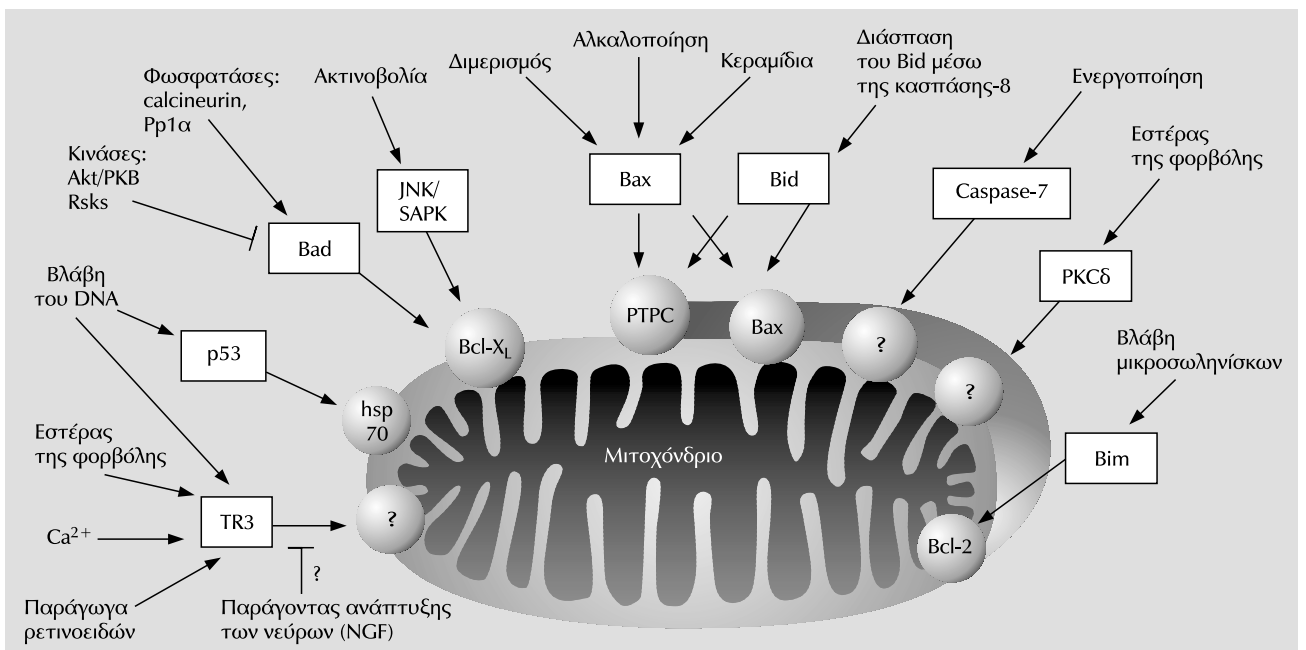
Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέλθει με δύο διαφορετικούς τρόπους.³⁻⁵ Είτε με ανοργάνωτο, παθητικό και απότομο τρόπο (νέκρωση), είτε με ενεργητικό (απόπτωση), που ελέγχεται με εξίσου περίπλοκους μηχανισμούς, όπως αυτοί με τους οποίους ελέγχεται και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Η νέκρωση επιφέρει μη αντιστρεπτή καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, διόγκωση του κυττάρου και ανεξέλεγκτη έκλυση ενζύμων (λιπασών, πρωτεασών κ.λπ.), τα οποία προκαλούν καταστροφή και των παρακειμένων κυττάρων καθώς και τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Η νέκρωση επέρχεται συνήθως από ακραίες αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος και αφορά σε ομάδες κυττάρων. Αντίθετα, η απόπτωση, μια φυσιολογική και ενεργητική διαδικασία, με τον προγραμματισμένο τρόπο που επιτελείται και με διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, δεν επιφέρει την καταστροφή των γειτονικών κυττάρων και συνεπώς τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Η απόπτωση είναι φαινόμενο που αφορά μεμονωμένα κύτταρα.

Η έναρξη της απόπτωσης είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών εξωγενών ή ενδογενών σημάτων (πίν. 1), αλλά με κοινό καταληκτικό μηχανισμό θανάτου.³⁻¹² Τα σήματα έναρξης της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να προέρχονται είτε από την επιφάνεια του κυττάρου,⁶ όπως η αλληλεπίδραση του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) με τον υποδοχέα του ή του Fas (Apo-1 ή CD95) με τον Fas-L,⁷ είτε από το κυτταρόπλασμα, με την επίδραση ακτινοβολίας, χημικών παραγόντων, υποξίας ή άλλων ερεθισμάτων. Πρόσφατες διαπιστώσεις απέδειξαν τον εν γένει ενεργητικό ρόλο των μιτοχονδρίων στη διαδικασία της απόπτωσης (εικ. 1).^{8,9}

Η διατήρηση της ανατομικής ακεραιότητας της μεμβράνης των κυττάρων σε διαδικασία απόπτωσης είναι χαρακτηριστική, πλην όμως επέρχεται αρχικά αναστροφή στην κατανομή των φωσφολιπιδίων που τη συγκροτούν, καθώς και μια σειρά άλλων μεταβολών, σε τρόπο ώστε το κύτταρο να αναγνωριστεί από τα φαγοκύτταρα και να εναγκαλιστεί από αυτά.¹³ Η φωσφατιδυλοσερίνη συγκεντρώνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια δύο ATP-εξαρτώμενων ενζύμων, της φλοπάσης και της τρανσλοκάσης.^{14,15} Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης της απόπτωσης επέρχεται αναστολή των δύο αυτών ενζύμων, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση ενός άλλου ενζύμου, της σκραμπλάσης,¹⁴ γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η εξωτερίκευση αυτή της φωσφατιδυλοσερίνης είναι ένα γενικό και πρώιμο χαρακτηριστικό της αποπτωτικής

Πίνακας 1. Μερικοί από τους παράγοντες που επάγουν ή καταστέλλουν την απόπτωση.

Αναστολείς της απόπτωσης			
Φυσιολογικοί αναστολείς	Γονίδια ιών	Φαρμακολογικοί παράγοντες	
Παράγοντες ανάπτυξης	Αδενοϊός (E1B)	Αναστολείς καλπαΐνης	
Εξωκυττάρια ουσία	Μπακουλοϊός (p53, IAP)	Αναστολείς κυστεΐνοπρωτεασών	
CD40	Ιός Epstein-Barr (BHRF1, LMP-1)	Προαγωγοί όγκων	
Ουδέτερα αμινοξέα	Ιός έρπητα (γ1 34,5)	Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	
Ψευδάργυρος		Φαινοβαρβιτάλη	
Οιστρογόνα		α-εξακλωρο-κυκλοεξάνιο	
Ανδρογόνα			
Επαγωγείς της απόπτωσης			
Φυσιολογικοί επαγωγείς	Επαγωγείς σχετιζόμενοι με τη βλάβη	Θεραπευτικοί παράγοντες	Τοξίνες
Οικογένεια TNF	Θερμικό shock	Χημειοθεραπευτικά	Αιθανόλη
TNF	Ιογενής λοίμωξη	Σισπλατίνη	β-πεπτιδιο αμυλοειδούς
Fas-L (Fas Ligand)	Τοξίνες βακτηριδίων	Μεθοτρεξάτη	
Transforming Growth Factor β	Ογκογονίδια (myc, rel, E1A)	Βλεομυκίνη	
Νευροδιαβηαστές	p53 (ογκοκατασταλτής)	Δοξορουβικίνη	
Γλουταμικό	Κυταρολυτικά Τ-κύτταρα	Βινκριστίνη	
Ντοπαμίνη	Οξειδωτικά	Ακτινοβολία γ	
N-μεθυλ-D-ασπαρτικό οξύ	Ελεύθερες ρίζες	Υπεριώδεις ακτίνες	
Απουσία παραγόντων ανάπτυξης	Έλλειψη τροφικών παραγόντων, αντιμεταβολίτες		
Ασβέστιο			
Γλυκοκορτικοειδή			



Εικόνα 1. Πρωτεΐνες παραγόμενες κατά τη διαδικασία της απόπτωσης κινούνται προς το μιτοχόνδριο, τις μεμβράνες του οποίου και επηρεάζουν. Οι τελικοί επαγωγείς, που φαίνονται στα ορθογώνια περιγράμματα, ενεργοποιούνται από διάφορες προαποπτωτικές οδούς, κινούνται από το κυτταρόπλασμα προς τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους υποδοχείς (κύκλοι). Τελικά, επισυμβαίνει ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών και έκλυση προκασπασών και ενεργοποιητών των κασπασών (κυτόχρωμα C) από το μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να λάβουν χώρα τα γεγονότα που οδηγούν στον αποπτωτικό θάνατο του κυτάρου, με τελική κατάληξη τη φαγοκυττάρωσή του.⁹

διαδικασίας, πολύ πριν εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στον πυρήνα του κυττάρου, και η διαπίστωσή του στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια αποτέλεσε έναν εύλογο στόχο για την ανάπτυξη τεχνικών καθορισμού των κυττάρων που έχουν ήδη εισέλθει στην αποπτωτική διαδικασία (εικ. 2).

Ανεξίνη V και απόπτωση

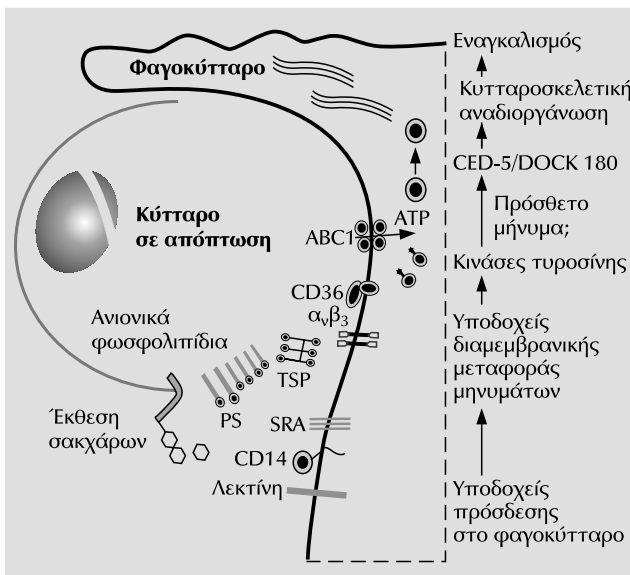
Μια πρωτεΐνη με μεγάλη τάση σύνδεσης με τη φωσφατιδυλοσερίνη, είναι η ανεξίνη V.¹⁶⁻¹⁸ Η επισήμανση αυτής της πρωτεΐνης με ^{99m}Tc ή ¹²³I αποτέλεσε και τη βάση της ανάπτυξης του ραδιοφαρμάκου με την εμπορική ονομασία Aromate® (Theseus Imaging Co), το οποίο ευρίσκεται στο στάδιο των κλινικών ερευνών, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την *in vivo* ραδιοϊσοτοπική ανίχνευση και απεικόνιση κυττάρων σε απόπτωση.¹⁹ Άλλες τεχνικές για την απεικόνιση της αποπτωτικής διαδικασίας στηρίζονται στο φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance, MR) και στη δυνατότητα που έχει να ανιχνεύει τις λεπτές διαφορές που παρατηρούνται στα υπό απόπτωση κύτταρα. Σε αυτές τις τεχνικές συμπεριλαμβάνονται η φασματοσκοπική μελέτη των λιπιδίων των κυττάρων (lipid proton magnetic resonance) και ο μαγνητικός συντονισμός που ανιχνεύει

και απεικονίζει τις διαφορές στην ταχύτητα διάχυσης (MR diffusion-weighted) διαφόρων κυτταρικών συστατικών στα αποπτωτικά κύτταρα.

Η ανεξίνη V ανήκει στις πρωτεΐνες με μεγάλη τάση σύνδεσης με ασβέστιο και φωσφολιπίδια. Είναι γνωστή με διάφορα ονόματα, όπως πρωτεΐνη 4 του πλακούντα (PP4), αντιπηκτική πλακουντιακή πρωτεΐνη I (PAP I), ασβεστιο-φωσφολιπιδιο-συνδετήρη I (CPB-I), ασβεστιοεξαρτώμενη δεσμεύουσα τα φωσφολιπίδια πρωτεΐνη 33 (CaBP 33), αγγειακή αντιπηκτική πρωτεΐνη άλφα (VACα), ανκορίνη CII, λιποκορίνη-V και αναστολέας της θρομβοπλαστίνης. Η ανεξίνη V απαντάται κυρίως στην κυτταροπλασματική πλευρά των κυτταρικών μεμβρανών, προφανώς συνδεδεμένη με φωσφατιδυλοσερίνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Η ανεξίνη V έχει την τάση να σχηματίζει τριμερή και η στοιχειομετρία σύνδεσής της με τη φωσφατιδυλοσερίνη είναι 4–8 μόρια ανεξίνης V ανά μόριο φωσφατιδυλοσερίνης. Η συγγένεια σύνδεσής της με τη φωσφατιδυλοσερίνη είναι πολύ μεγάλη (σταθερά διαστάσεως $K_d=7$ nmol) και η κινητική της σύνδεσής της πολύ ταχεία. Η σύνδεση είναι ασβεστιοεξαρτώμενη, αλλά παρουσία EDTA (που δεσμεύει το ασβέστιο) η σύνδεση είναι αντιστρεπτή.¹⁵

Το γονίδιο της ανεξίνης V ευρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 4q26-q28 και εκτείνεται σε μια περιοχή του DNA μήκους 28 kb, που περιέχει 13 εξόνια και 12 ιντρόνια. Το τελικό μόριο της ανεξίνης V, που προέρχεται από τη μετάφραση αυτού του γονιδίου, περιέχει 320 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 35–36 kDa. Η ανεξίνη V είναι μια πρωτεΐνη επίπεδης και κυκλοτερούς διαμόρφωσης (τριτοταγής δομή), στην οποία παρατηρούνται 4 επαναλαμβανόμενες περιοχές, που καθεμιά της αποτελείται από 5 τμήματα με δομή α-έλικας (δευτεροταγής δομή). Η ανεξίνη V έχει ανιχνευθεί σε διάφορους ιστούς και κύτταρα, όπως μυοκάρδιο, ενδοθήλιο αγγείων, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, γλοιοκύτταρα, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, κύτταρα Schwann, σκελετικά μυϊκά κύτταρα, οπτικό νεύρο, ηπατοκύτταρα και βρόγχους.

Αρχικά, η ανεξίνη V, συνδεδεμένη με τη φθορίζουσα χρωστική φθορισεΐνη ή με βιοτίνη, χρησιμοποιήθηκε στην κυτταρολογία και την ιστοχημεία για τη μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης. Το 1994, ερευνητές στην εταιρεία NeoRx δημοσίευσαν την πρώτη επιτυχή προσπάθεια *in vivo* απεικόνισης θρόμβων (κολπικών και εν τω βάθει) σε χοίρους, χρησιμοποιώντας επισήμασμένη με ^{99m}Tc ανεξίνη V.^{20,21} Έκτοτε, η ^{99m}Tc-ανεξίνη V έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απεικόνιση της απόρριψης καρδιακών, ηπατικών και πνευμονικών μοσχευμάτων σε πειραματόζωα.²²⁻²⁴ Από τις μελέτες^{19,25} βιοκα-



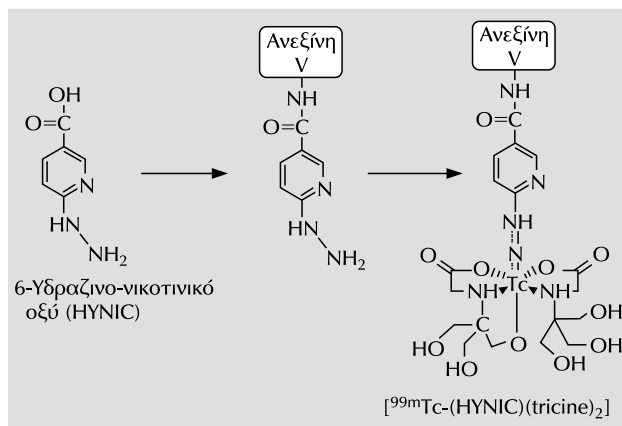
Εικόνα 2. Απεικόνιση των βημάτων που προηγούνται της φαγοκυττάρωσης ενός κυττάρου σε διαδικασία απόπτωσης. Η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών, που επέρχεται, όπως φαίνεται στην εικόνα 1, μέσω διαφόρων προαποπτωτικών οδών, προκαλεί σειρά αλλαγών στην κυτταρική μεμβράνη, με προεξάρχουσα την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS). Τα φαγοκύτταρα χρησιμοποιούν πολλαπλούς μηχανισμούς για την αναγνώριση των υπό απόπτωση κυττάρων, όπως αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα α,β₃ της βιτρονεκτίνης (ιντεγκρίνης) και αναγνώριση της θρομβοσπονδίνης (TSP).¹³

τανομής του ραδιοφαρμάκου σε πειραματόζωα, διαπιστώθηκε ότι το ραδιοφάρμακο μέσα σε λίγα λεπτά ουσιαστικά απομακρύνεται από την κυκλοφορία ($t_{1/2} = 3-7$ min) και το μεγαλύτερο ποσό της χορηγούμενης ραδιενέργειας εντοπίζεται στους νεφρούς (17% μετά από 3 ώρες) και στο σπλήνα (5,3% μετά από 3 ώρες). Η ραδιενέργεια στην ουροδόχο κύστη βαίνει επίσης αυξανόμενη (3% μετά από 3 ώρες). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός, όπως έδειξαν αυτοραδιογραφικές μελέτες, ότι η ^{99m}Tc -ανεξίνη V εντοπίζεται αποκλειστικά στο νεφρικό φλοιό, χωρίς να απεικονίζονται η μυελώδης μοίρα ή οι νεφρικές θηλές. Μια εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι η μη ειδική καθήλωση του ραδιοφαρμάκου στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια, όπως έχει παρατηρηθεί και με άλλες χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Τέλος, ο εγκέφαλος παρουσιάζει ασήμαντη καθήλωση του ραδιοφαρμάκου (0,009% μετά από 3 ώρες).

Η χρησιμοποιούμενη ανεξίνη V σε κλινικές μελέτες είναι ανασυνδυασμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη (rh-anpexin V, rh: recombinant human), η οποία παράγεται σε *E. coli*. Η συμπλοκοποίηση του ^{99m}Tc γίνεται χρησιμοποιώντας την υδραζινομάδα του 6-υδραζινονικοτινικού οξέος (HYNIC), που έχει ήδη συνδεθεί με το μόριο της ανεξίνης V, με το σχηματισμό διαζενιδικού δεσμού.²⁶⁻²⁸ Η καρβοξυλομάδα του HYNIC συνδέεται με την ε-αμινομάδα μιας από τις λυσίνες της ανεξίνης V με πεπτιδικό (αμιδικό) δεσμό, μετά από ενεργοποίησή της (της καρβοξυλομάδας) με ηλεκτριμίδιο. Η σύνδεση του HYNIC στην ανεξίνη V προκαλεί αλλαγή στη σταθερά σύνδεσής της με τη φωσφατιδυλοσερίνη, αν και η αλλαγή αυτή δεν είναι σημαντική ($k_d = 16,8$ nmol). Ως συνυποκαταστάτες, στη δημιουργία του οκταεδρικού συμπλόκου του ^{99m}Tc , με σθένος του ^{99m}Tc στο σύμπλοκο (IV) ή (V), χρησιμοποιούνται γλυκοεπτονικό οξύ, τρισίνη ή ο συνδυασμός τρισίνης/μονοφωσφίνης. Η αναγωγή του υπερτεχνητικού νατρίου, που λαμβάνεται από την έκλυση της γεννήτριας $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, γίνεται με δισθενή κασσίτερο και η δομή του παραγομένου συμπλόκου με τρισίνη φαίνεται στην εικόνα 3. Η ραδιοεπισήμανση είναι ταχεία και επιτελείται σε ήπιες συνθήκες, η δε ραδιοχημική καθαρότητα του λαμβανομένου ραδιοφαρμάκου ξεπερνά το 92%.

Εφαρμογή της ^{99m}Tc -rh-ανεξίνης V στην απεικόνιση της απόπτωσης

Το δίδυμο πολλαπλασιασμός-απόπτωση των κυττάρων είναι απαραίτητο στην ομοιοστασία των οργανισμών και έχει διατηρηθεί εξελικτικά. Στην 20ετία που διέρρευσε, διαπιστώθηκε ότι η διατάραξη αυτής της ισορροπίας χαρακτηρίζει διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, την απόρριψη των μοσχευμάτων και τις μεταίσχαιμικές βλάβες που συνοδεύουν τα



Εικόνα 3. Η προτεινόμενη δομή του συμπλόκου του ^{99m}Tc με το HYNIC (6-υδραζινο-νικοτινικό οξύ) παράγωγο της ανεξίνης V. Το σθένος του ^{99m}Tc δεν είναι γνωστό, αλλά πιθανολογείται ότι είναι (V), η δε σύνδεση του ^{99m}Tc με το HYNIC γίνεται με διαζενιδικό δεσμό.

εγκεφαλικά επεισόδια ή το έμφραγμα του μυοκαρδίου.²⁸⁻³⁰ Είναι επίσης παραδεκτό ότι η αντινεοπλασματική αγωγή (ανοσοθεραπεία, φάρμακα ή ακτινοβολία) ασκεί τη δράση της προκαλώντας τον αποπτωτικό θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων (πίν. 2). Η επιτυχής χρησιμοποίηση της ^{99m}Tc -rh-ανεξίνης V για την απεικόνιση της αποπτωτικής διαδικασίας ανοίγει πλέον έναν καινούργιο τομέα εφαρμογών αυτού του ραδιοφαρμάκου στην Πυρηνική Ιατρική.

Ένας σημαντικός τομέας εφαρμογής είναι η παρακολούθηση μοσχευμάτων για τυχόν απόρριψη, τόσο οξεία, όσο και χρονία.²²⁻²⁴ Τα μοσχεύματα που μπορεί να μελετηθούν είναι: καρδιά, πνεύμονες, μυελός οστών, ήπαρ. Μέχρι τώρα, τουλάχιστον, δεν έχει γίνει προσπάθεια μελέτης νεφρικών μοσχευμάτων, προφανώς λόγω της απέκκρισης του ραδιοφαρμάκου από τους νεφρούς και της καθήλωσής του σε αυτούς. Στην οξεία απόρριψη επισυμβαίνει προσβολή του μοσχεύματος από κυτταρολυτικά T-λεμφοκύτταρα, με ενεργοποίησή τους μέσω της οδού Fas-Fas-L. Στη χρονία απόρριψη, η ενεργοποίηση της ίδιας οδού (Fas-Fas-L) προσβάλλει το ενδοθήλιο των αγγείων που αιματώνουν τα εν λόγω όργανα. Ένας άλλος τομέας με ενδιαφέρον είναι η πρώιμη αξιολόγηση της έκτασης της καταστροφής του μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα ή φλεγμονώδη εξεργασία (μυοκαρδίτιδα), με ανάλογη τροποποίηση της φαρμακευτικής αγωγής.^{4,17} Είναι γνωστό ότι τα μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενα ραδιοφάρμακα για τον εντοπισμό νεκρωθεισών περιοχών στο μυοκάρδιο από οποιαδήποτε αιτία, όπως τα ^{99m}Tc -PYP, ^{99m}Tc -glucaric acid ή το Myoscint® επισημασμένο με ^{111}In , απαιτούν την πάροδο ικανού χρονικού διαστήματος (αρκετές ώρες ή και ημέρες) από το γεγονός για την απεικόνισή του.

Πίνακας 2. Νοσήματα σχετιζόμενα με επαγωγή ή αναστολή του αποπτωτικού θανάτου.

Νοσήματα με αναστολή της απόπτωσης	Νοσήματα με ενεργοποίηση της απόπτωσης
<p>Νεοπλάσματα</p> <p>Θυλακίωδη λεμφώματα</p> <p>Όγκοι με μετάλλαξη στο γονίδιο p53</p> <p>Ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι</p> <p>Μαστού</p> <p>Προστάτη</p> <p>Ωοθηκών</p> <p>Αυτοάνοσα νοσήματα</p> <p>Συστηματικός ερυθματώδης λύκος</p> <p>Σπειραματονεφρίτιδα ανοσολογικής αρχής</p> <p>Ιογενείς λοιμώξεις (από έρπητα, αδενοϊό κ.λπ.)</p>	<p>AIDS</p> <p>Νευροεκφυλιστικά νοσήματα</p> <p>Νόσος Alzheimer</p> <p>Νόσος Parkinson</p> <p>Αμυοτροφική πλαγία σκλήρυνση</p> <p>Retinitis pigmentosa</p> <p>Παρεγκεφαλιδική εκφύλιση</p> <p>Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα</p> <p>Απλαστική αναιμία</p> <p>Ισχαιμική βλάβη</p> <p>Έμφραγμα μυοκαρδίου</p> <p>Έμφρακτο εγκεφάλου</p> <p>Βλάβη από επαναϊμάτωση</p> <p>Τοξική βλάβη του ήπατος (αλκοόλη)</p> <p>Απόρριψη μοσχευμάτων</p>

Τέλος, η σημαντικότερη ίσως εφαρμογή της μεθόδου αναμένεται στην πολύ πρώιμη αξιολόγηση της ανταπόκρισης ασθενών που υποβάλλονται σε αντινεοπλασματική αγωγή. Για παράδειγμα, μόνο το 25% των ασθενών με καρκίνο του μαστού που υποβάλλονται σε αγωγή (π.χ. με Taxol) ανταποκρίνονται σ' αυτήν, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειές της εκδηλώνονται στο 100% των ασθενών και με το αντίστοιχο υψηλό οικονομικό κόστος. Με τις συμβατικές ανατομικές απεικονιστικές τεχνικές, πρέπει να παρέλθει ικανό χρονικό διάστημα για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα μιας αγωγής με το ανατομικό κριτήριο της συρρίκνωσης του όγκου. Αντίθετα, σε μια επιτυχή αγωγή, η αποπτωτική διαδικασία αρχίζει ταχύτατα (εντός 2 ωρών!) και συνεπώς η αποτελεσματι-

κότητα της αγωγής μπορεί πλέον να διαπιστωθεί πολύ νωρίς και να τροποποιηθεί ανάλογα.

Συμπερασματικά, ο γιατρός, σήμερα, για πρώτη φορά διαθέτει μια ελάχιστη παρεμβατική μέθοδο, όχι μόνο διάγνωσης αλλά και αξιολόγησης των θεραπευτικών παρεμβάσεών του σε διάφορα νοσήματα με μεγάλη επίπτωση, νοσηρότητα και θνητότητα. Με τη μέθοδο αυτή είναι ακόμα δυνατή η εξατομίκευση των χορηγούμενων δόσεων στους ασθενείς, μια και η ανταπόκρισή τους μπορεί να διαπιστωθεί ταχύτατα. Αυτό θα έχει σημαντική επίπτωση τόσο στην αποτελεσματικότητα των θεραπευτικών παρεμβάσεων, όσο και στην εξοικονόμηση πόρων.³¹⁻³³

ABSTRACT

^{99m}Tc-HYNIC-rh-annexin V. The imaging of apoptotic death

A. ZANGLIS, E. HOUSSIANAKOU

Laboratory of Nuclear Medicine, "Evangelismos" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(4):371-376

In multicellular organisms cell homeostasis is maintained by a balance between cell proliferation and cell death. Physiologic cell death occurs primarily through an evolutionarily conserved form of cell suicide named apoptosis. The decision of a cell to undergo apoptosis is influenced by a wide variety of regulatory stimuli, with the central role being reserved for the mitochondria. The externalization of phosphatidylserine which occurs early in the apoptotic process can be used as a target for the detection of cells committed to die via an apoptotic death. Annexin V, a putative human protein, binds strongly to the externalized phosphatidylserine. The HYNIC derivative of annexin V, labeled with ^{99m}Tc, is the basis of a radiopharmaceutical

(Apomate®) which is capable of *in vivo* imaging of various pathogenetic processes characterized by increased induction of apoptotic death. A range of disease processes including cancer, autoimmune disease, transplant rejection, viral disease and neurodegenerative disorders can now be imaged for apoptosis and their treatment response amenable to an early assessment can be accordingly adjusted or modified, with a view to a better patient outcome.

Key words: Apoptosis, HYNIC-annexin, Phosphatidylserine

Βιβλιογραφία

- KERR JFR. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cell death. *J Pathol* 1971, 105:13–20
- WYLLIE AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 284:555–556
- STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995, 267:1445–1449
- SARASTE M, PUKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000, 45:528–537
- EVAN G, LITTLEWOOD T. A matter of life and cell death. *Science* 1998, 281:1317–1322
- ASKHENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998, 281:1305–1308
- NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995, 267:1449–1456
- GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281:1309–1312
- BRENNER C, KROEMER G. Mitochondria—the death signal integrator. *Science* 2000, 289:1150–1151
- THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998, 281:1312–1316
- ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein-family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281:1322–1326
- SCHENDEL CM, XIE Z, MONTAL MO, MATSUYAMA S, MONTAL M, REED JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:5113–5118
- SAVILL J. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998, 392:442–443
- ZWAAL RFA, SCROIT AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997, 89:1121–1132
- VAN HEERDE WL, DEGROOT PG, REUTELINGSPERGER CPM. The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. *Thromb Hemost* 1995, 92:3113–3121
- KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CPM, KUIJTEN GAM, KEEHNEN RMJ, PALS ST, NAN OERS MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, 84:1415–1420
- VAN HEERDE WL, ROBERT-OFFERMAN S, DUMONT E, HOFSTRA L, DOEVENDANS PA, SMITS JFM ET AL. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on annexin V. *Cardiovasc Res* 2000, 45:549–559
- BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAIT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K ET AL. *In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:6349–6354
- BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAIT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K ET AL. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc-Annexin V. *J Nucl Med* 1999, 40:184–191
- STRATTON JR, DEWURST TA, KASINA S, RENO JM, CERQUEIRA MD, BASKIN DG ET AL. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left atrial thrombi. *Circulation* 1995, 92:3113–3121
- TAIT JF, CERQUEIRA MD, DEWURST TA. Evaluation of annexin V as a platelet thrombus-targeting agent. *Thromb Res* 1994, 75:491–501
- VRIENS PW, BLANKENBERG FG, STOOT JH, OHTSUKI K, BERRY GJ, TAIT JF ET AL. The use of Tc-99m-annexin V for the *in vivo* imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998, 116:844–853
- BLANKENBERG FG, ROBBINS RC, STOOT JH, VRIENS PW, BERRY GJ, TAIT JF ET AL. Radionuclide imaging of acute lung transplant rejection with annexin V. *Chest* 2000, 117:834–840
- OGURA Y, KRAMS SM, MARTINEZ OM, KOPIWODA S, HIGGINS JP, ESQUIVEL CO ET AL. Radiolabeled annexin V imaging: diagnosis of allograft rejection in an experimental rodent model of liver transplantation. *Radiology* 2000, 214:795–800
- THOMPSON CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267:1456–1462
- VOSS M, COTTON MF. Mechanisms and clinical implications of apoptosis. *Hosp Med* 1998, 59:924–930
- RUDIN CM, RHOMPSON CB. Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997, 48:267–281
- OHTSUKI K, AKASHI K, AOKA Y, BLANKENBERG FG, KOPIWODA S, TAIT JF ET AL. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the *in vivo* detection of apoptosis. *Eur J Nucl Med* 1999, 26:1251–1258
- ABRAMS MJ, JUWEID M, TENKATE JF. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazinonicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med* 1990, 31:2022–2028
- LIU S, EDWARDS DS. ^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem Rev* 1999, 99:2235–2268
- BLANKENBERG FG, TAIT JF, STRAUSS HW. Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millenium. *Eur J Nucl Med* 2000, 27:359–367
- BLANKENBERG FG, TAIT JF, OHTSUKI K, STRAUSS HW. Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun* 2000, 21:241–250
- BLANKENBERG FG, OHTSUKI K, STRAUSS HW. Dying a thousand deaths. Radionuclide imaging of apoptosis. *Q J Nucl Med* 1999, 43:170–176

Corresponding author:

A. Zanglis, 9 Mavrocordatou street, GR-124 61 Haidari, Greece