

کمپلکس های نشاندار سازی شده پورفیرینی با رادیو نوکلئید های گالیوم و گادولینیوم جهت ادغام تصویربرداری هسته ای، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی و فتودینامیک تراپی

علی ارجمند پور^۲، سید یوسف فضائلی^{۱*}، سید محمد مهدی ابطحی^۲، پرویز اشتری^۱، سعید کرم پور^۱ و غلامرضا شاه حسینی^۳

۱. پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، صندوق پستی ۳۱۴۸۶۴۳۱۱۱، کرج - تهران.
۲. دانشکده علوم پایه، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین-تهران.
۳. پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، صندوق پستی ۳۱۴۸۶۴۳۱۱۱، کرج - تهران.

چکیده:

تمایل فزاینده به استفاده از رادیونوکلئیدهای گالیوم ۶۷ و ۶۸ به عنوان رادیونوکلئیدهای SPECT و PET در داروسازی هسته‌ای فرصت های جدیدی را پیش روی محققان قرار داده تا بر تولید رادیوداروهای جدید این خانواده تمرکز نمایند. در این تحقیق سعی بر آن شد تا با ترکیب خاصیت عالی کمپلکس پذیری رادیونوکلئید های گالیوم-۶۸ و ۶۷ سه ظرفیتی با کمپلکس های مسطح چربی دوست با بار خنثی (پروتو پورفیرین IX)، توانایی گسیل پوزیترون ها برای تصویربرداری PET و قابلیت استفاده از پورفیرین در PDT برای مقاصد درمانی و حضور عامل فلزی گادولینیوم بر روی پورفیرین به عنوان عامل تصویربرداری MRI، یک عامل PET/PDT/MRI جدید معرفی گردد. ترکیب نشاندار شده نهایی با جذب بالا در تومور های سرطان پستان قابلیت بالایی در شناسایی و درمان سرطان از خود نشان داد.

کلیدواژه‌ها: رادیونوکلئیدهای گالیوم ۶۷ و ۶۸، پروتو پورفیرین IX، عامل PET/PDT/MRI.

Labeled Porphyrin complexes with gallium radionuclides and gadolinium to integrate nuclear imaging, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy

Ali Arjmandpour², Yousef Fazaeli^{1*}, Sayed Mohammad Mahdi Abtahi², Parviz Ashtari¹, Saeed Karampour¹, Gholamreza Shahhosseini³

1. Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, P.O.BOX: 3148643111, Karaj, Iran.
2. Faculty of Basic Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran
3. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, P.O.BOX: 3148643111, Karaj, Iran.

Abstract:

The growing desire to use gallium 67 and 68 radionuclides as SPECT and PET radionuclides in nuclear medicine has opened up new opportunities for researchers to focus on producing new radiopharmaceuticals of this family. In this study, we tried to combine the excellent complexation property of trivalent gallium-68 and 67 radionuclides with neutrally charged lipophilic complexes (proto porphyrin IX), the ability to emit a positrons for PET imaging and the ability to use porphyrin in PDT for therapeutic purposes, and the presence of gadolinium metallic agent on porphyrin as MRI imaging agent, a PET / PDT / MRI agent was introduced. The final labeled compound with high uptake in breast cancer tumors showed a high ability for diagnosis and therapy of cancer.

Keywords: gallium 67 and 68 radionuclides, proto porphyrin IX, PET / PDT / MRI agent.

Email: youseffazaeli@gmail.com

۱. مقدمه

پورفیرین‌ها، مولکول‌های زیستی مهمی هستند که حداقل در دو فرآیند بسیار مهم حیاتی یعنی فتوسنتز و تنفس نقش کلیدی دارند. پورفیرین‌ها ترکیباتی محلول در آب غیر سمی و آشنا در سامانه‌های بیولوژیکی هستند که با مکانیسم‌های گوناگونی از جمله نفوذ از طریق گیرنده‌های اختصاصی لیپوپروتئینی سطح برخی سلول‌های سرطانی و همچنین نفوذ مستقیم از طریق حفرات و بدام افتادن بر اساس تغییرات اسیدیته سلول‌های سرطانی در تصویربرداری از تومورها به صورت نشان‌دار با اتم‌های کنتراست MRI و همچنین رادیو ایزوتوپ‌ها بکار رفته‌اند. با این تفاسیر اخیراً تصویربرداری موفق از تومورهای فیبروسار کوما‌ی موشی توسط ترکیب نشان‌دار گالیوم-۶۸ و سایر رادیو نوکلئیدها با مشتقات پورفیرینی با موفقیت گزارش شده است [۶-۱]. نام پورفیرین از واژه یونانی «پورفیرا» گرفته شده است. یونانیان قدیم از این واژه برای بیان رنگ ارغوانی (purple) استفاده می‌کردند. بلورهای این ترکیبات ذرات فلورسانس کننده و به شدت رنگی بارنگ‌های قرمز و بنفش تند می‌باشند. همچنین پورفیرین‌ها از طریق تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و ایجاد متالوپورفیرین در ترکیبات زیستی از قبیل کلروفیل، هموگلوبین، میوگلوبین، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها وجود دارند. فتو دینامیک تراپی به‌عنوان روش جدیدی در درمان بسیاری از بیماری‌های پوستی و سرطان مطرح است. فتو دینامیک تراپی ترکیب دارو و نور است، به این ترتیب که ابتدا دارو به بیمار تزریق می‌شود سپس آن دارو به کمک یک نور در محیط غنی از اکسیژن فعال می‌شود. داروی فعال شده از طریق تشکیل گونه اکسیژن فعال سمی (رادیکالی) سلول‌های غیر عادی بدن (تومور) را تخریب می‌کند. در درمان PDT از لیزر یا سایر منابع نور برای فعال سازی دارو استفاده می‌شود. داروهای حساس به نور دارویی است که در اثر برخورد نور به آن واکنش نشان داده و سلول را به نور حساس می‌کند. دارو یکبار جذب بدن می‌شود این دارو اثری ندارد تا اینکه در معرض یک نوع نور ویژه با طول موج مشخص قرار گیرد وقتی که نور بر روی ناحیه سرطانی تابانده می‌شود دارو فعال می‌شود و سلول‌های سرطانی تخریب می‌شوند [۷ و ۸].

یکی از راه‌کارهایی که در حال حاضر جهت رفع محدودیت‌های موجود در تصویربرداری‌ها بکار گرفته شده است، استفاده از تصویربرداری هم‌زمان از دو یا چند سیستم تصویربرداری در قالب یک فرآیند تصویربرداری می‌باشد. این روش در علوم جدید به نام تصویربرداری هیبریدی شناخته می‌شود، که در این روش تصاویر به‌دست‌آمده دارای وضوح بالا و نیز قدرت تفکیک خوبی می‌باشند. نمونه‌ای از این تصویربرداری هیبریدی PET/MRI می‌باشد. از یک ماده رادیواکتیو که به داخل رگ تزریق و یا از راه خوراکی و یا استنشاق وارد بدن بیمار می‌شود، به دلیل متابولیسم خاص این مواد رادیواکتیو، آنها در بدن در محل‌های خاصی تجمع می‌یابند. سپس یک دوربین بنام دوربین گاما تعداد تشعشعات گامای گسیل شده از بدن بیمار را شمارش می‌کند، که نشان‌دهنده مقدار جذب مواد رادیواکتیو در عضو مورد بررسی می‌باشد. در نتیجه می‌توان تومور‌ها یا عملکردهای غیر معمول را در بدن اشخاص تشخیص داد. تصویربرداری تشدید مغناطیسی (MRI) بهترین تکنیک برای یافتن تومورها اعم از خوش‌خیم و بدخیم در بسیاری از اندام‌ها و علی‌الخصوص مغز می‌باشد. همچنین تشخیص این‌که آیا بافت مغز پس از سکتة مغزی دچار کمبود اکسیژن شده است یا نه را میسر می‌سازد. با تلفیق این دو تکنیک تمامی اطلاعات مربوط به عملکرد بدن را می‌توان با تزریق و تصویربرداری با دستگاه تصویربرداری هیبریدی PET/MRI بدست آورد.

گالیوم-۶۸ یکی از رادیو نوکلئیدهای مهم گسیلنده پوزیترون است که در تصویربرداری PET برای تشخیص تومور و بافت سرطان در پزشکی هسته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سال‌های دهه ۱۹۷۰ که رادیو گالیوم به‌عنوان عاملی جهت تصویربرداری از تومورها به کار گرفته شد، این نظریه ارائه گردید که گیرنده ترانسفرین در سطح سلول‌های بدخیم وجود دارد که مسئول تجمع اختصاصی رادیو گالیوم در سلول‌های توموری است. امروزه این نظریه تایید شده است.

در این تحقیق سعی بر آن است تا با ادغام روش‌های تصویربرداری هسته‌ای (PET و SPECT) با تصویربرداری MRI و استفاده از خواص درمانی پورفیرین‌ها ذیل روش فتودینامیک تراپی یک عامل ترانوستیک (تشخیصی-درمانی جدید) معرفی شود.

۲. روش کار

تهیه کمپلکس پروتوپورفیرین IX - گادولینیم:

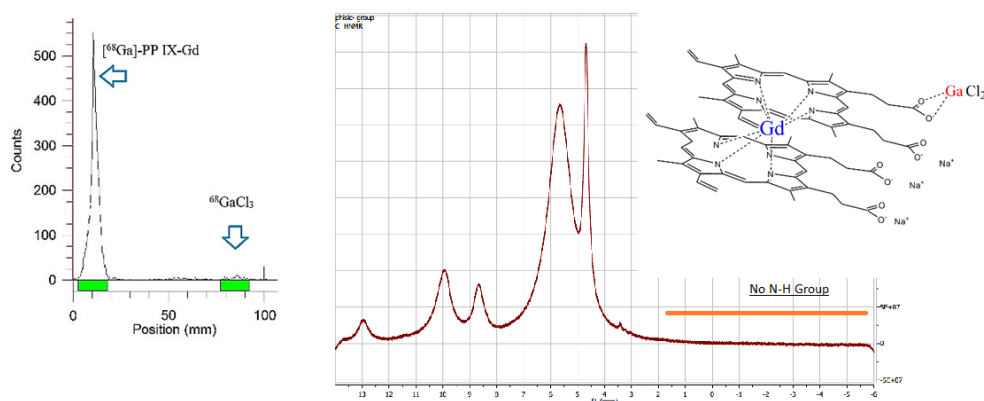
جهت تشکیل کمپلکس پروتوپورفیرین IX - گادولینیم یک نسبت یک به یک از لیگاند (Protoporphyrin IX disodium) $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ را انتخاب می‌نماییم. به مقدار یک میلی مول (۰/۶۰۶ گرم) از ترکیب پورفیرینی در حلال آب یک میلی مول از فلز (۰/۳۷۱ گرم) را اضافه می‌نماییم. برای ردیابی تشکیل کمپلکس، در این تحقیق از حلال‌های مختلف دوتره ($DMSO-d_6$ و D_2O) نیز به جای حلال‌های عادی استفاده نموده و یک بار واکنش را مشابه سازی می‌نماییم. بعد از تهیه محلول متناظر یک به یک، اجازه می‌دهیم ترکیب به مدت دوازده ساعت در محیط بدون نور رفلکس گردد. از نمونه واکنش با حلال دوتره جهت اطمینان از تشکیل کمپلکس و تعیین محل فلز گادولینیم در کمپلکس نمونه برداری شده و آزمایش NMR را انجام می‌دهیم.

نشاندن سازی کمپلکس پروتوپورفیرین IX - گادولینیم با رادیونوکلیدهای گالیم-۶۷ و گالیم-۶۸:

به منظور نشاندن سازی کمپلکس پروتوپورفیرین IX - گادولینیم، با گالیم-۶۸، مقدار ۳۰ میلی کوری از این رادیونوکلید را به فرم $^{68}GaCl_3$ که از ژنراتور ژرمانیوم-۶۸/گالیم-۶۸ توسط اسید ۰/۵ مولار دوشیده شده است، را جهت حذف محتوی HCl با استفاده از حرارت و عبور گاز ازت (N_2) خشک می‌نماییم. ۵۰ میکرولیتر از کمپلکس پروتوپورفیرین IX با گادولینیم (از محلول با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به همراه محلول خشک شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت می‌دهیم. سپس ۱/۵ میلی لیتر از بافر سدیم استات با اسیدیته بین ۵/۵ تا ۶ به آرامی به محلول فوق اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه رفلکس شد. در ادامه محصول نهایی از میان یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد و pH آن با استفاده از بافر سدیم استات ۱ در ناحیه ۶-۵/۵ مجدداً تنظیم شد. از رادیو کروماتوگرافی لایه نازک (RTLC) برای تعیین خلوص رادیو شیمیایی کمپلکس پورفیرینی نشاندن استفاده شد. یک نمونه ۵ میکرولیتری از محصول نهایی، روی یک کاغذ واتمن شماره ۲ تثبیت شد و به منظور جداسازی در ظرف حاوی فاز متحرک دی تی پی ای ۰/۱ میلی مولار (DTPA) قرار داده شد. پس از مهاجرت کامل (۱۰ سانتی متر) فاز متحرک، کاغذ واتمن از ظرف محلول خارج و خشک شد. در ادامه توسط یک دستگاه اسکرن RTLC مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت نشاندن سازی این کمپلکس با رادیونوکلید گالیم-۶۷ عیناً مراحل فوق تکرار گردید. پس از تایید نشاندن سازی، ۱۵۰ میکروکوری از ترکیب نشاندن از طریق ورید دم به هر موش با سرنگ انسولین تزریق شد. تصویربرداری SPECT و PET (Co-Incidence) بعد از تزریق با استفاده از یک سیستم اسپکت دوسر (dual-head SPECT)، با میدان دید مفید (UFOV) ۵۴۰ میلی متر در ۴۰۰ میلی متر و از فاصله ۲۵ سانتی متری برای گالیم-۶۷ و حالت تصویربرداری همزمان برای گالیم-۶۸ ثبت شد. بعد از تصویربرداری ارگان‌های مختلف جدا شده و با نرمال سالین شسته و با حوله کاغذی خشک شد. بعد از توزین نمونه‌ها، شمارش اکتیویته انجام دادیم. با آشکارساز HPGe انجام شد. درصد جذب به ازای هر گرم از ارگان‌ها در حیوانات سالم و توموری (سرطان پستان که از طریق پیوند زنی بافت سرطانی در موش‌های نرمال تهیه شده بودند) اندازه‌گیری شد.

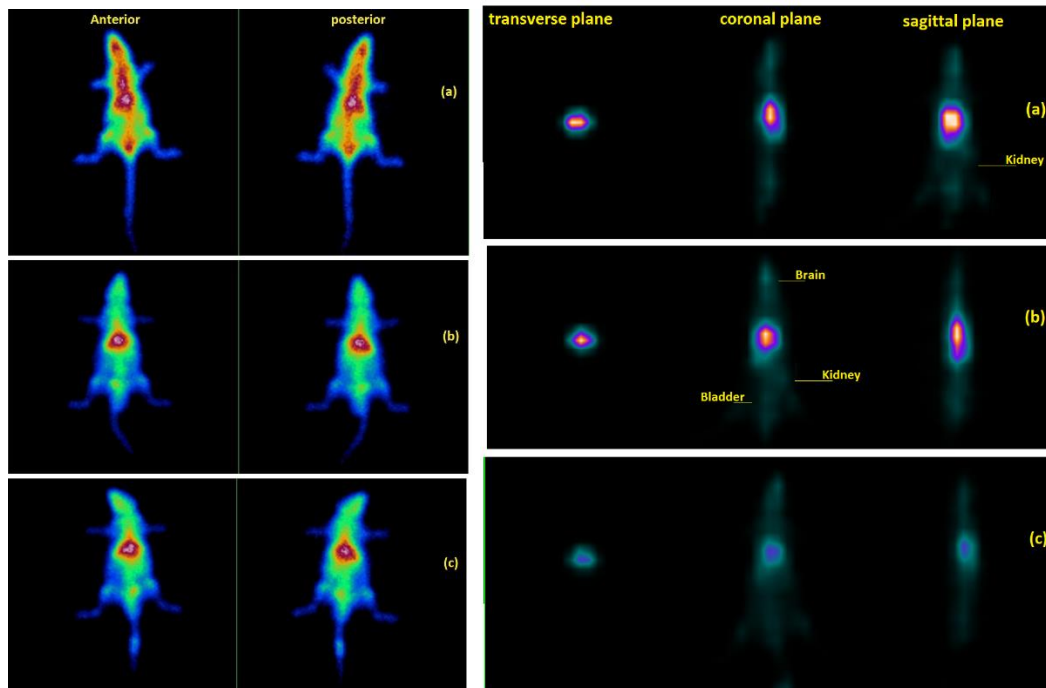
۳. نتایج و بحث

دو مکانیسم تشکیل کمپلکس نشاندن پورفیرینی می‌تواند محتمل باشد. نخست تشکیل کمپلکس پروتوپورفیرین IX - گادولینیم به نحوی که نیتروژن‌های درون حلقه با این فلز پیوند تشکیل دهند که این مورد با حذف هیدروژن‌های درون حلقه ممکن است و صورت دوم اتصال خارجی به گروه‌های کربوکسیلاتی است. با توجه به عدم حضور این پیک‌ها در آنالیز NMR و منابع موجود اتصال درون حلقه ای برای این کمپلکس متصور است و رادیو نوکلئیدهای گالیم در مرحله بعد با گروه‌های کربوکسیلاتی پیوند شیمیایی برقرار نموده‌اند. البته ایجاد پیوند خارجی نیز برای گادولینیم متصور است ولی با توجه به میزان برابر از این فلز با مولکول‌های پورفیرین و مقدار بسیار کم اتم‌های رادیونوکلید گالیم در مقایسه با میزان کلی کمپلکس گالیم‌ها در لیگاند‌های خارجی درگیر خواهند بود (شکل ۱).

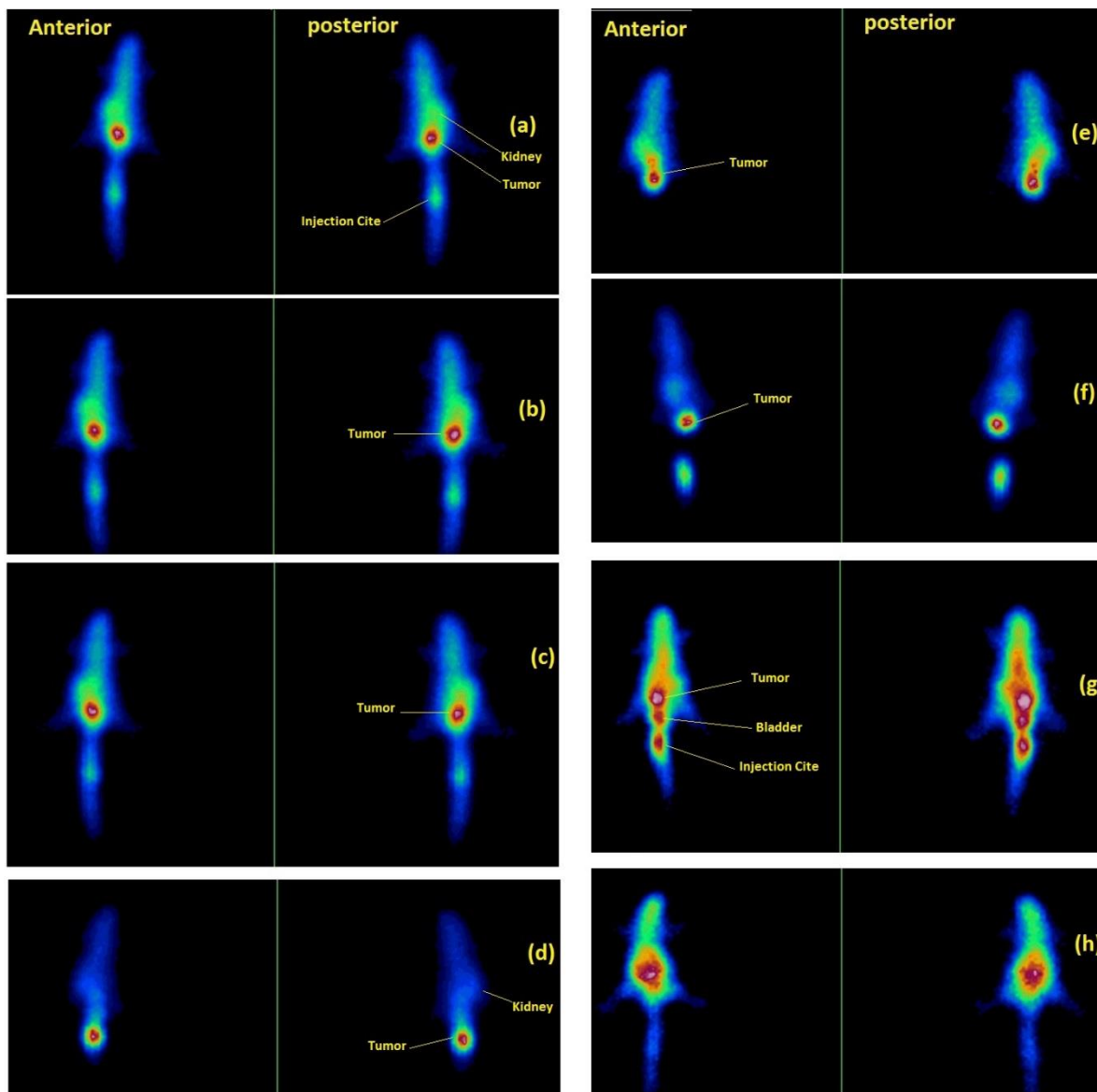


شکل ۱. تصویر ترکیب نشاندار سازی کمپلکس احتمالی پروتوپورفیرین IX-گادولینیم با رادیونوکلئیدهای گالیوم- 67 و گالیوم- 68 (داخل طیف NMR) و رادیوگرام RTLC ترکیب $[^{68}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ (چپ)، طیف NMR کمپلکس پروتوپورفیرین IX-گادولینیم (راست)

با توجه به رادیو کروماتوگرام حاصل از ترکیب $[^{68}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ در فاز متحرک DTPA 0.1 میلی مولار، که دارای R_f حدوداً صفر (عدم مهاجرت بر روی کاغذ) می‌باشد (همچنین کاتیون گالیوم آزاد با R_f تقریباً 0.75 به مکان‌های بالاتر مهاجرت کرد (شکل ۱). خلوص رادیو شیمیایی حدود 98% تایید شد. کمپلکس نشاندار شده پایداری بسیار خوبی را در سرم آلبومین انسان، انکوبه شده در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت نشان داد و هیچ مقدار قابل اندازه گیری از گالیوم آزاد مشاهده نشد. طبق نتایج به دست آمده، توزیع زیستی کمپلکس نشاندار در تمام زمان‌ها در جریان خون، پراکنش قابل توجهی را به خود اختصاص داده است و در تمامی اندام‌های بررسی شده توزیع مناسب داشته است و با قابلیت جذب شدن به شیوه اندوسیتوز، تشخیص تومور را در هر اندامی میسر می‌گرداند. با توجه به شکل ۲ و شکل ۳ و نمودار شکل ۴، این ترکیبات نشاندار حتی از غشای سلول‌های مغز و استخوان هم عبور کرده و برای مقاصد تشخیصی در این اندام‌ها نیز می‌تواند مناسب باشد. پس از 4 ساعت با افزایش متابولیت گالیوم آزاد در کبد، توزیع زیستی آن در طحال و مسیر گوارشی رو به افزایش است. با توجه به دفع رادیونوکلئید گالیوم از مسیر گوارشی و کلیوی همچنین قطبیت بسیار بالای پروتوپورفیرین دی سدیم که به دلیل دارا بودن فقط گروه کربوکسیلیک اسید به فرم نمکی و حضور یون گادولینیم روی آن القا می‌شود، این ترکیب عمدتاً از مسیر کلیوی دفع می‌شوند و پراکنش رادیو دارو در روده و مدفوع کم است. کلیه‌ها نیز در تمام زمان‌های پس از تزریق فعالیت معناداری دارند که از انحلال بالای ترکیب نشاندار در آب ناشی می‌شود. جذب ترکیب نشاندار به تومور با وجود کوچک بودن اندازه تومور، در تمام زمان‌ها سیر صعودی داشته و بیشترین و سریع‌ترین جذب راددر تومور سرطانی مشاهده نمودیم. به دلیل فاصله کمتر هد دستگاه در حالت SPECT کیفیت تصاویر گالیوم- 67 بهتر شده است.



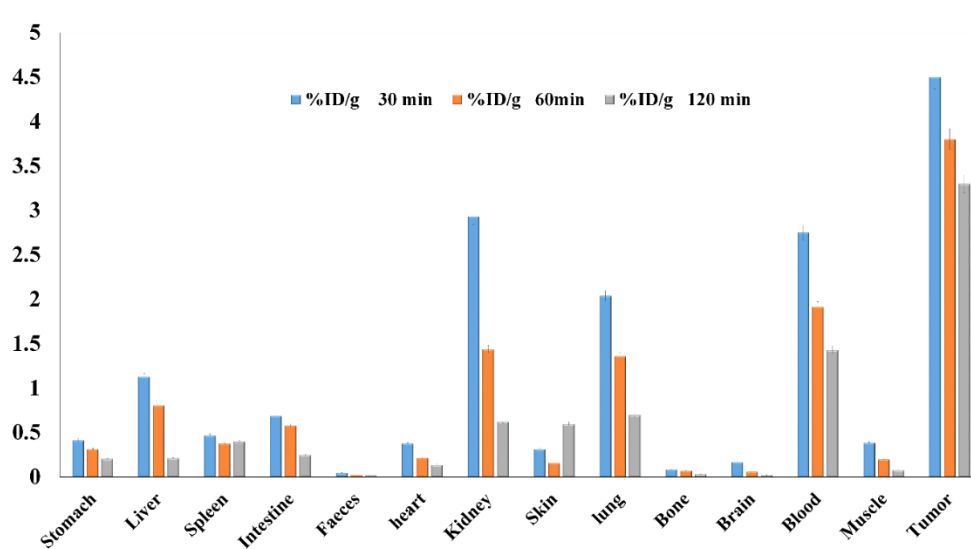
شکل ۲. سمت راست: نتایج تصویربرداری PET از موش‌های نرمال با ترکیب $[^{68}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ (a) 30 ، (b) 60 و (c) 120 دقیقه پس از تزریق. سمت چپ: نتایج تصویربرداری SPECT از موش‌های نرمال با ترکیب $[^{67}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ (a) 30 ، (b) 60 و (c) 120 دقیقه پس از تزریق



شکل ۳. سمت: نتایج تصویربرداری SPECT از موش‌های توموری (mice) با ترکیب $[^{67}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ (a) 30، (b) 45، (c) 60، (d) 90، (e) 120، (f) 150، (g) 180 دقیقه و (h) 240 ساعت پس از تزریق.

۴. نتیجه‌گیری

در این تحقیق سعی بر آن شد تا با ترکیب خاصیت عالی کمپلکس پذیری رادیونوکلئید های گالیوم-۶۸ و ۶۷ سه ظرفیتی با کمپلکس مسطح چربی دوست با بار خنثای پروتو پورفیرین IX، توانایی گسیل پوزیترون ها برای تصویربرداری PET (یا پرتوهای گاما برای SPECT) و قابلیت استفاده از پورفیرین در PDT برای مقاصد درمانی و حضور عامل فلزی گادولونیم بر روی پورفیرین به عنوان عامل تصویربرداری MRI، یک عامل PET/PDT/MRI جدید معرفی گردد. ترکیب نشاندار شده نهایی با جذب بالا در تومور های سرطان پستان قابلیت بالایی در شناسایی و درمان سرطان از خود نشان داد، با توجه به بررسی‌های انجام شده نتیجه گرفتیم که ترکیب نشاندار $[^{68/67}\text{Ga}]\text{-PP IX-Gd}$ می‌تواند به‌عنوان عامل تشخیصی درمانی سرطان (عامل PET/PDT/MRI) استفاده شود.



شکل ۴. نتایج توزیع زیستی در موش‌های توموری (mice) با ترکیب $[^{68}\text{Ga}]$ -PP IX-Gd در 30، 60 و 120 دقیقه پس از تزریق.

۵. مراجع

- 1- Yousef Fazaeli, Mohammad Amin Hosseini, Fatemeh Shahabinia, Shahzad Feizi, 68Ga-5, 10, 15, 20-Tetrakis (2, 4, 6-trimethoxy phenyl) porphyrin: a novel radio-labeled porphyrin complex for positron emission tomography, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2019, 320, 201-207.
- 2- Yousef Fazaeli, Amir R. Jalilian, Fatemeh Rezaee, Tahereh Firouzyar, Sedigheh Moradkhani, Azar Bagheri, Abbas Majdabadi: Development of radiolabeled radachlorin complex as a possible tumor targeting agent. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 01/2014; 303(3). DOI:10.1007/s10967-014-3645-5
- 3- Yousef Fazaeli, AR Jalilian, S Feizi, N Shadanpour: Development of a radiothallium (III) labeled porphyrin complex as a potential imaging agent. *Radiochimica Acta* 11/2013; 101(12). DOI:10.1524/ract.2013.2092
- 4- Azadeh Paknafas, Yousef Fazaeli, Amir Reza Jalilian, Abbas Ahmadi, Shahzad Feizi, Mohsen Kamalidehghan, Ali Rahiminejad, Ali Khalaj: Radiosynthesis and Quality Control of $[^{67}\text{Ga}]$ -3,4-dimethoxylated Porphyrin Complex as a Possible Imaging agent. *Iranian journal of pharmaceutical research (IJPR)* 03/2013; 12(4).
- 5- Nassim Vahidfar, Amir R Jalilian, Yousef Fazaeli, Ali Bahrami-Samani, Davood Beiki, Ali Khalaj: Development and evaluation of a 166 holmium labelled porphyrin complex as a possible therapeutic agent. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 10/2012; 295(2-on line first). DOI:10.1007/s10967-012-2034-1
- 6- Yousef Fazaeli, Amir R Jalilian, Mostafa M Amini, Mohammadreza Aboudzadeh, Shahzad Feizi, Ali Rahiminezhad, Kamran Yousefi: Preparation, nano purification, quality control and labeling optimization of $[^{64}\text{Cu}]$ -5, 10, 15, 20-tetrakis (penta fluoro phenyl) porphyrin complex as a possible imaging agent. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 06/2012; 295(1). DOI:10.1007/s10967-012-1885-9
- 7- J. c. Kennedy, R. H. Pottier, D. C. pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology*, 6 (1990) 143-148.
- 8- J. c. Kennedy, R. H. Pottier, New trends in photobiology: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14, 1992, 275-292.