بررسی توزیع بیولوژیکی کمپلکس نشاندار شده پورفیرینی با رادیونوکلید گالیوم–۶۷ بر روی نانو سیلیکای MCM-41 عاملدار شده به عنوان یک عامل تصویربرداری هسته ای

فضائلی، سید یوسف *(۱)– اسدی ، فاطمه (۱و۳)– نامور آغداش، سیمین (۳)– جانی تباردرزی، سیمین(۲)– اشتری، پرویز (۱)

۱ پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها ، تهران

۲ پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده چرخه سوخت هسته ای ، تهران- ایران

۳ دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، تبریز، ایران

چکیده:

در این تحقیق به منظور تولید یک سیستم تحویل داروی هدفمند مبتنی بر تصویر برداری در کاربردهای تشخیصی، پروتو پورفیرین با رادیو نوکلئید گالیوم–۶۷ نشاندار و سپس این کمپلکس بر روی NH_2-Propyl@MCM-41 تثبیت شد.ارزیابی فارماکوکینتیکی نانو سیلیکای نشاندار رادیواکتیو ($[^{67}Ga]$-PP IX…NH2-Propyl@MCM-41) در موش‌های صحرایی نرمال و دارای تومور فیبروسارکوما انجام شد. این نانو کامپوزیت دارای خواصی نظیر گردش مناسب در بدن از طریق خون، پایداری ساختاری بالا، درصد جذب (ID ٪) مناسب در تومور، نسبت بالای جذب تومور به ماهیچه و دفع سریع از بدن بوده و به عنوان یک ترکیب مهندسی شده موثر برای کاربردهای آتی رسانش هدفمند و تصویر برداری از تومور مبتنی بر نانو تکنولوژی در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: *کمپلکس نشاندار سازی شده پورفیرینی، نانو سیلیلیکا، تصویربرداری هسته‌ای.*

مقدمه :

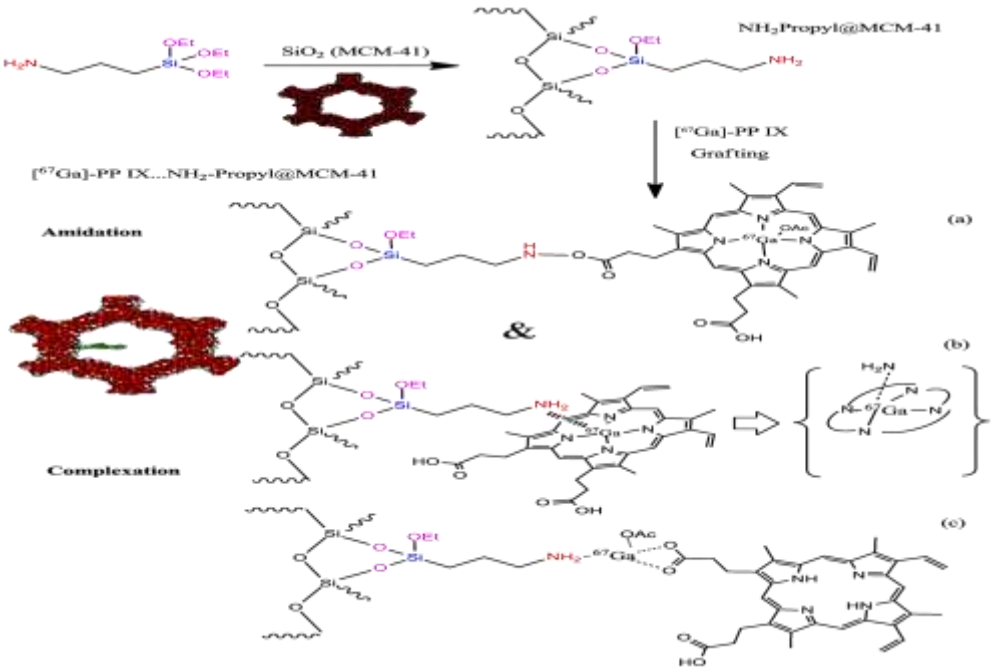
نانو ذرات MCM-41 از نظر بیولوژیکی دارای ارزش زیاد بوده و خاصیت جذبی بالایی در تومور های سرطانی بدن انسان از خود نشان می‌دهند. بنابراین جایگاه ویژه‌ای در تهیه رادیو داروهای جدید کسب نموده اند. مشتقات مختلف این نانو مواد حاوی خواص متنوعی بوده و با خاصیت نفوذ به بافتهای بدن، گزینش پذیری بالایی نسبت به هدف مورد نظر برای تأثیر رادیو دارو داشته و محقق را در این مهم یاری می‌دهد[۱, ۲]. پورفیرین‌ها توانایی تجمع در انواع بسیاری از سلولهای سرطانی را داشته و بدلیل دارا بودن خواص مغناطیسی و نوری منحصر به فرد از اهمیت بسزایی در سیستم های حیاتی برخوردار می باشند. از این رو در داروهای ضد سرطان و فوتودینامیک تراپی نقش بسیار مفیدی را ایفا می‌نمایند[۳–۵]. رادیوایزوتوپ گالیوم–۶۷ یکی از مهمترین رادیوایزوتوپ های تشخیصی پزشکی می باشد. به سبب خواص تشخیصی برجسته این رادیوایزوتوپ، نشاندارسازی یکی از مهمترین اعضای خانواده پورفیرین‌های حاوی

گروههای عاملی کربوک سیلیک ا سید با رادیو ایزوتوپ گالیوم-٦٧ با نیمه عمر ۷۸/۳ ساعت می‌تواند موجب پدید آمدن کمپلکسی شود که دارای جمیع این مزایا باشد. تثبیت کمپلکس پورفیرینی نشاندار سنتز شده، بر روی میزبان MCM-41 عاملدار با گروه‌های آمینی موجب بهبود رسانش هدفمند می شود. پس از تهیه کمپلکس دارویی سنتز شده،کنترل کیفی، تعیین ضـــریب تقســـیم و بررســـی پراکنش بافتی به منظور تعیین دز جذبی در ۱۳ ارگان مهم موش صـــحرایی نرمال و توموری Sprauge dawley انجام شـــد. با توجه به نحوه تجمع ترکیب نشـــاندار رادیواکتیو در اندام های حیوان آزمایشـــگاهی، نحوه دفع و میزان دزهای جذبی، این نانوکامپوزیت می تواند به عنوان یک کاندیدا برای کاربردهای تصویربرداری تومور و مطالعات آینده PDT وSPECT مورد استفاده قرارگیرد.

روش کار :

در این تحقیق همانند روش ارائه شده در مطالعه پیشین این گروه تحقیقاتی [٦] محلول سدیم سیلیکات به عنوان منبع سیلیسی و سورفاکتانت تترا دسیل تری متیل آمونیوم برماید به عنوان قالب (عامل شکل دهنده ساختار) در سنتز MCM-41 مورد استفاده قرار گرفت. پس از سنتز MCM-41 به منظور عاملدار کردن آن مقدار ۳/۰ml از ترکیب (۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان) به محلول تولوئنی (۱۰ml) حاوی ۱ گرم از ماده MCM-41 که اضافه شد و محلول به مدت یک شبانه روز رفلاکس شد. پس از آن به ترتیب مراحل سرد کردن، شستن با محلول CH_2Cl_2/Et_2O (۱:۱، سه مرتبه) و خشکاندن در فشار کاهش یافته انجام شد. برای تایید میزان تثبیت گروه‌های عاملی ازآنالیزهای FT--XRD-TGA/DSC IR وBET استفاده شد. در مرحله بعد به منظور نشاندار سازی پروتوپورفیرین با گالیوم-٦٧، مقدار ۳۰ میلی‌کوری از $^{67}GaCl_3$ را جهت حذف محتوی HCl با استفاده از حرارت و عبور گاز ازت (N_2) خشک شد. ۵۰ میکرولیتر از پروتوپورفیرین IX (محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به محلول خشک شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مخلوط شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر سدیم استات ۰/۱ مولار به آرامی به محلول فوق اضافه و به مدت ٦۰ دقیقه رفلاکس شد. در ادامه محصول نهایی از میان یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد و pH آن با استفاده از بافر سدیم استات ۰/۱ مولار در ٦-۵/۵ تنظیم شد. از رادیو کروماتوگرافی لایه نازک (RTLC) برای تعیین خلوص رادیو شیمیایی کمپلکس پورفرینی نشاندار 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 (۱۰سانتی متر) فاز متحرک، کاغذ واتمن از ظرف محلول خارج و خشک شد. در ادامه توسط یک دستگاه اسکنر RTLC مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ۳۰ میلی‌گرم از ترکیب NH_2-Propyl@MCM-41 به ۳۰ میلی‌کوری (۱۱۱۰ مگا بکرل) از کمپلکس $[^{67}Ga]$-PPIX تهیه شده در مرحله قبل در محیط حاوی ۱۰ میلی‌لیتر اتانول بدون آب اضافه شد. سوسپانسیون حاصله به مدت ۱ ساعت رفلاکس شد. محصول نهایی توسط آب دیونیزه شسته شد. مخلوط نهایی با

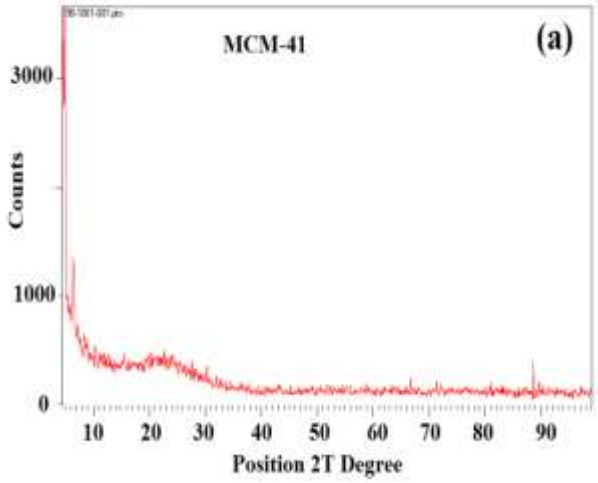
گذراندن سوسپانسیون از صافی، در شرایط فشار کاهش یافته در دمای اتاق خشک شد تا $[^{67}Ga]$-PP IX-...NH_2-Propyl@MCM-41 حاصل شود. در این مرحله نیز آنالیزهای رادیو کروماتوگرافی لایه نازک برای تعیین ترکیب نهایی در مقایسه با کاتیون گالیوم-٦٧ آزاد بررسی شد. ضریب تقسیم (log p) ترکیب نشاندار نهایی با تعیین p (نسبت اکتیویته ویژه در فاز آلی ۱- اکتانول به فاز آبی نرمال سالین) به دست آمد. حجم ۱۵۰ µL از ترکیب نشاندار از طریق ورید دم به هر موش تزریق شد. تصویربرداری۱،۲،۳ و ٤ ساعت بعد از تزریق با استفاده از یک سیستم اسپکت دوسر (dual-head SPECT)، با میدان دید مفید (UFOV) ٥٤٠ میلی متر در ٤٠٠ میلی متر و از فاصله ۲۵ سانتی متری، ثبت شد. بعد از تصویربرداری ارگان‌های مختلف جدا شده و با نرمال سالین شسته و با حوله کاغذی خشک شد. بعد از توزین نمونه ها، شمارش اکتیویته اندام ها با آشکارساز HPGe انجام شد. درصد دز جذبی به ازای هر گرم از ارگان ها اندازه‌گیری شد. به منظوربررسی پایداری کمپلکس نشاندار تثبیت شده بر روی نانو سیلیکا در سرم انسانی، ۹۷٦ میکروکوری از کمپلکس نشاندار شده به ٥٠٠ میکرولیتر از سرم تازه انسانی اضافه شد و مخلوط حاصل در دمای اتاق به مدت ٤ ساعت انکوبه شد. سپس خلوص رادیوشیمیایی توسط رادیو کروماتوگرافی لایه نازک رادیواکتیو مورد بررسی قرار گرفت. القاء تومور در موش های صحرایی با استفاده از محلول ۳-متیل کلانترن مطابق با رفرنس۷ انجام شد[۷].

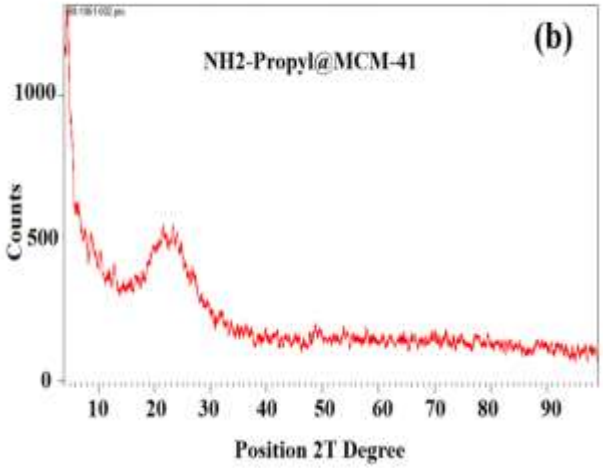


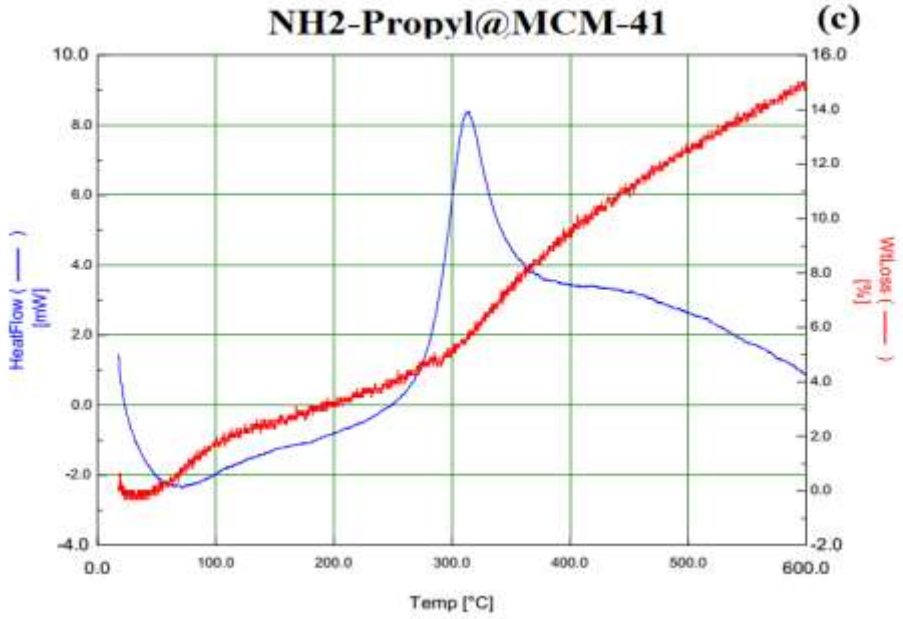
شکل ۱. فورمولاسیون پیشنهادی تثبیت کمپکس نشاندار پورفیرینی بر روی نانو سیلیکای عاملدار شده

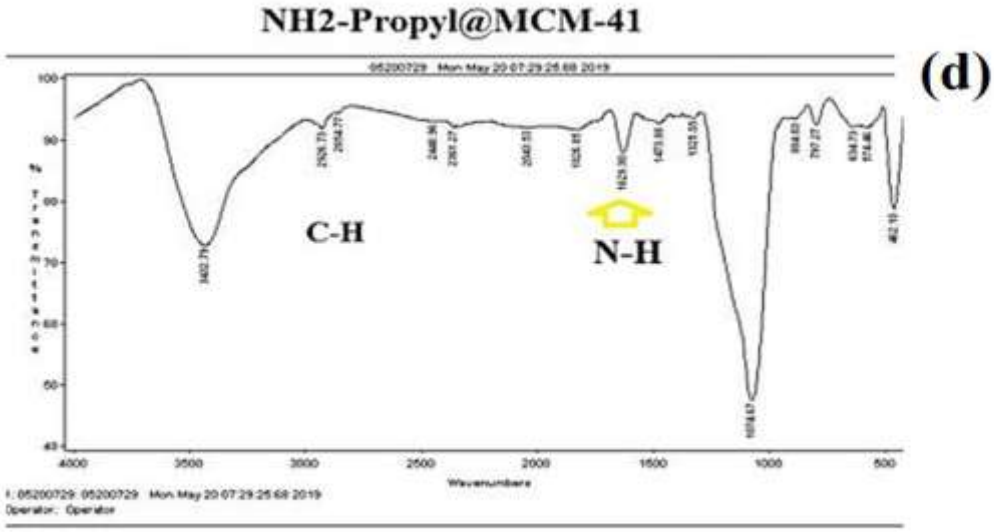
نتایج :

همانطور که در شکل یک نشان داده شده است، مکانیسم تثبیت کمپلکس نشاندار پورفیرنی می تواند از سه مسیر شیمیایی محتمل انجام گردد. شکل ۲. الگوی پراش اشعه ایکس برای سیلیکای مزوپور MCM-41 عاملدار شده با گروه‌های آمین و سیلیکای مزوپور MCM-41 را نشان می‌دهد. شدت پراش تمام مواد تثبیت شده روی ساختار متخلخل در مقایسه با الگوی MCM-41 به تنهایی به طور قابل توجهی کاهش یافت و قسمت آمورف (بی شکل) طیف‌ها در زوایای ۱۵ تا ^{o}C ۳۰ شدت یافت که حاکی از آن است که کانال‌های سیلیکای متخلخل MCM-41 در عمق حفرات توسط گروه‌های عاملی آمینی، اشغال شده است. نتایج حاصل از آنالیز حرارتی نمونه، نمایانگر پایداری حرارتی بسیار بالای ترکیب عاملدار در دماهای بالاتر از ۲۸۰^{o}C و غلظت بالای گروهای آلی ۳- آمینو پروپیل تثبیت شده بر روی MCM-41 است. درصد وزن از دست رفته (w/w) ٪ ۱۵ است که ٪ ۲ آن مربوط به خروج آب سطحی و ٪ ۱۳ آن مربوط به سوختن گروه‌های آلی می‌باشد که حاکی از میزان مناسب تثبیت گروه‌های آلی بر روی MCM-41 می‌باشد. با توجه به طیف‌های حاصل از آنالیز FT-IR حضور پیک در محدوده ۱۶۲۹/۳۰ cm^{-1} ترکیب NH_2-Propyl@MCM-41 تأیید کننده حضور گروه‌های آلی NH_2 بر روی MCM-41 است. همچنین حضور پیک در محدوده ۲۹۲۶/۷۳ cm^{-1} و ۲۸۵٤/۷۷ نشان‌دهنده باندهای ممتد CH است. طبق نتایج حاصل از BET به دلیل آمین‌دار شدن خوب MCM-41 مساحت سطح کاهش یافت. کاهش قطر حفرات نیز نشان‌دهنده حضور آمین در آنها است (شکل ٤ و ۳). اطلاعات پارامترهای BET ترکیب MCM-41 به تنهایی و به فرم عاملدار در جدول ۱ نشان داده است.


MCM-41
(a)
Counts
3000
1000
0
10 20 30 40 50 60 70 80 90
Position 2T Degree

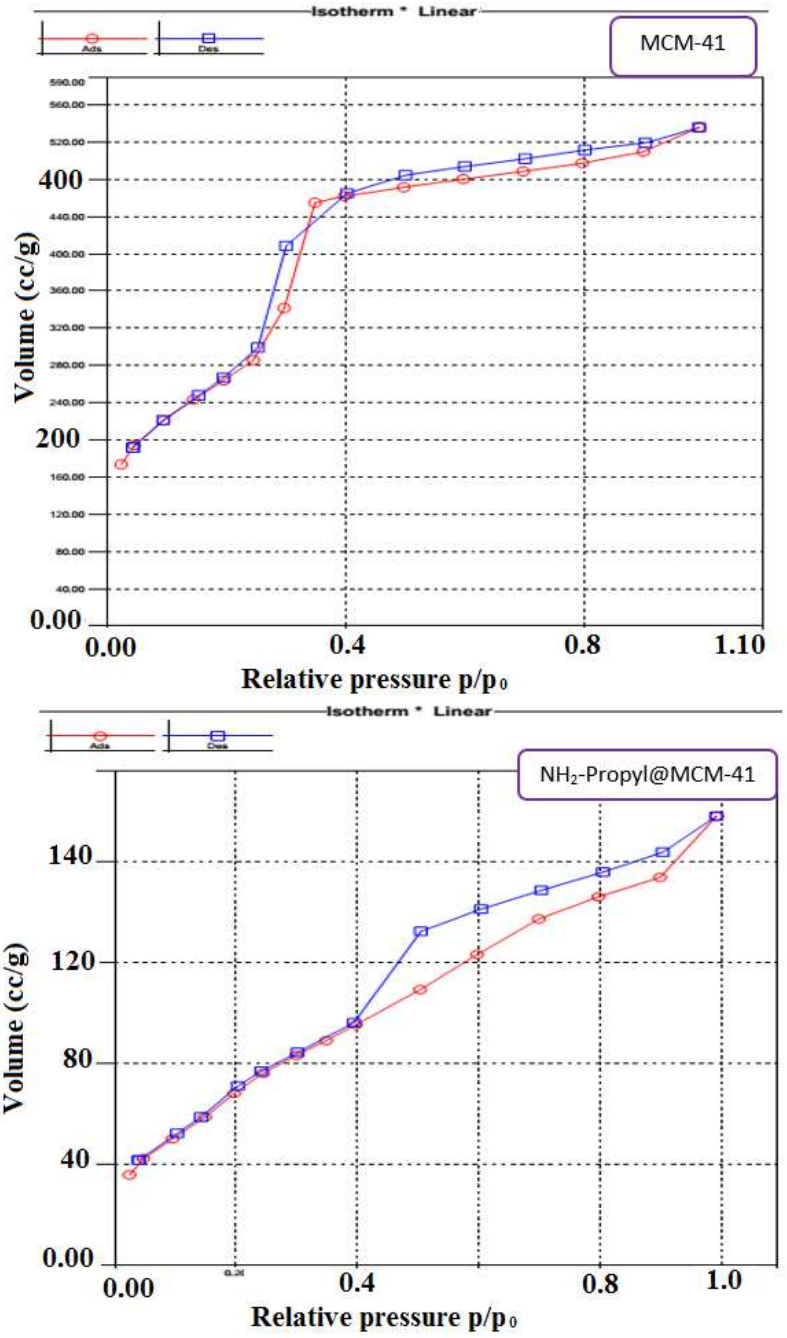

NH2-Propyl@MCM-41
(b)
Counts
1000
500
0
10 20 30 40 50 60 70 80 90
Position 2T Degree



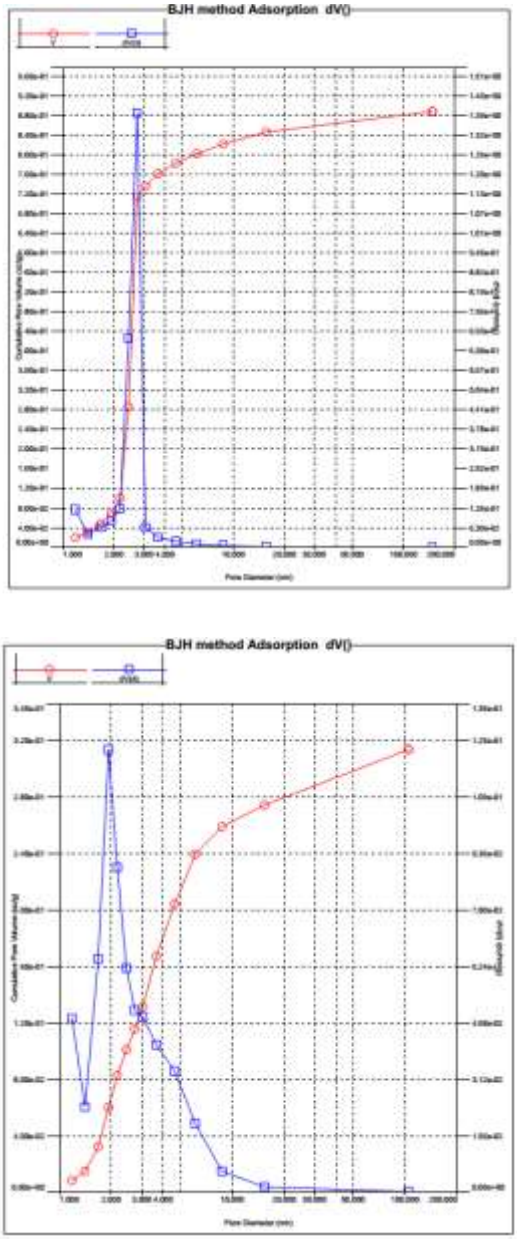


شکل ۲. نتایج

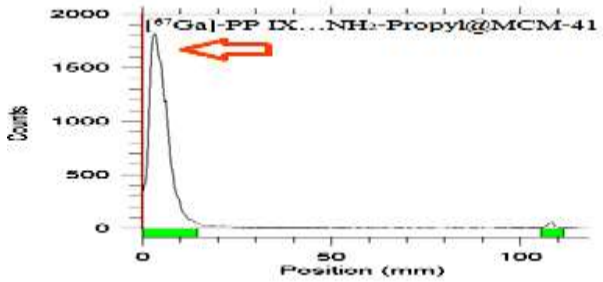
آنالیزهای XRD (a&b) ، TGA/DSC (c)، FT-IR (d) ترکیب $[^{67}Ga]$-PP IX…NH_2-Propyl@MCM-41 و پراش اشعه ایکس MCM-41.



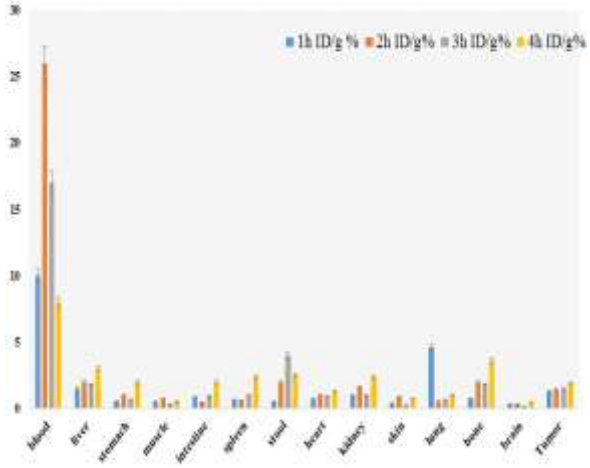
شکل ۳. نمودار ایزوترم جذب – واجذب نیتروژن برای MCM-41 (بالا) و NH_2-Propyl@MCM-41 (پایین)



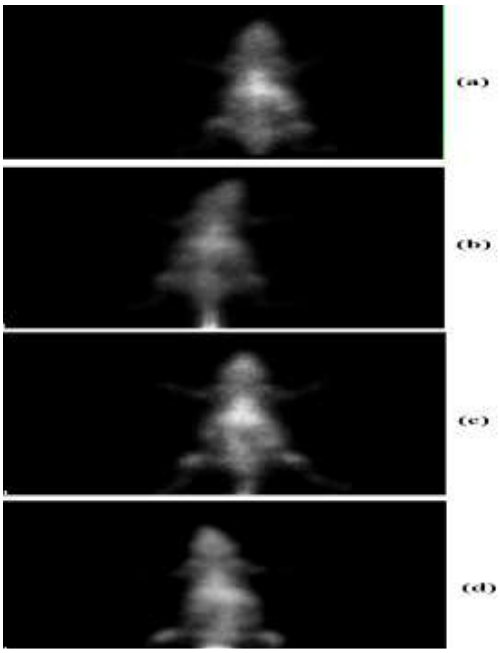
شکل ٤. نمودار توزیع قطر حفرات برای MCM-41 (بالا) و NH_2-Propyl@MCM-41 (پایین)



شکل ۵ رادیوگرام RTLC ترکیب [^{67}Ga]-PP IX…NH_2-Propyl@MCM-41



شکل٦ دیاگرام توزیع بیولوژیکی ترکیب-[^{67}Ga]-PP IX…NH_2-Propyl@MCM-41



شکل ۷. تصاویر SPECT (a) ۱ ساعت (b) ۲ ساعت (c) ۳ ساعت (d) ٤ ساعت پس از تزریق

جدول ۱- پارامترهای ساختاری ترکیب MCM-41 و سیلیکای عاملدار شده NH_2-Propyl@MCM41

نمونه	مساحت سطح (m^2 g^{-1})	حجم حفرات cc/g	اندازه حفرات (nm)
MCM-41	۱۲۸۳/۹	۰/۸۸	۲/٤٦۳
@MCM41 NH_2-Propyl	۳٦۹/٥۲	۰/۳۱٤	۱/۹۲٥

بحث ونتیجه گیری :

با توجه به رادیو کروماتوگرام حاصل ترکیب $[^{67}Ga]$-PP IX در فاز متحرک DTPA ۰/۱ میلی مولار دارای R_f حدودا صفر می‌باشد. همچنین کاتیون گالیوم آزاد با R_f تقریبا ۰/۷۵ به مکان‌های بالاتر مهاجرت کرد در حالیکه ترکیب $[^{67}Ga]$-PP IX…NH_2-Propyl@MCM-41 با R_f صفر در ابتدای کاغذ واتمن شماره ۲ به صورت پیک تک باقی ماند که این نتایج بر خلوص رادیو شیمیایی حدود ٪ ۹۸ دلالت دارد (شکل ۵). همانطور که پیش‌بینی شده بود چربی دوستی ترکیب $[^{67}Ga]$-PP IX…NH_2-Propyl@MCM-41 بالا است. کمپلکس نشاندار شده پایداری بسیار خوبی را در سرم آلبومین انسان ، انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤ ساعت نشان داد و هیچ مقدار قابل اندازه گیری از گالیم-٦٧ آزاد مشاهده نشد. طبق نتایج به دست آمده، توزیع زیستی نانو سیلیکای نشاندار سنتز شده در تمام زمان‌ها در جریان خون، پراکنش قابل توجهی را به خود اختصاص داده است و در تمامی اندام‌های بررسی شده توزیع مناسبی داشته است و با قابلیت جذب شدن به شیوه اندوسیتوز، تشخیص تومور را در هر اندامی میسر می‌گرداند[۸]. با توجه به نمودار شکل ٦ و تصویر شکل ۷ این نانو دارو حتی از غشای سلول‌های مغز و استخوان هم عبور کرده و برای مقاصد تشخیصی در این اندام‌ها نیز می‌تواند مناسب باشد. پس از ٤ ساعت با افزایش متابولیت گالیوم آزاد در کبد، توزیع زیستی آن در طحال و مسیر گوارشی رو به افزایش است. با توجه به دفع گالیوم-٦٧ از مسیر گوارشی و همچنین قطبیت بسیار پایین پروتو پورفیرین که به دلیل دارا بودن فقط دو گروه کربوکسیلیک اسید روی آن القا می‌شود، این ترکیب عمدتا از مسیر گوارشی و از راه مدفوع دفع می‌شود و پراکنش رادیو دارو در روده و مدفوع بسیار معنی‌دار است. هرچند کلیه‌ها نیز در تمام زمان‌های پس از تزریق مقداری فعالیت دارند که از وجود گروه‌های آمین بر روی MCM-41 ناشی می‌شود. همچنین طبق بررسی‌های انجام شده MCM-41 بیشتر از مسیر ادراری دفع می‌شود. جذب رادیو دارو به تومور با وجود کوچک بودن اندازه تومور، در تمام زمان‌ها سیر صعودی داشته و تثبیت کمپلکس پورفیرینی بر روی نانو ذرات MCM-41، دارو رسانی هدفمند را به تومور موجب شده است.

تمامی آزمایش ها در پژوهشگاه علوم وفنون هسته ای و دانشگاه شهید مدنی آذربایجان انجام شد.

مرجع‌ها

. Akhavan,. and E. Ghaderi, Small, 2013. 9(21): p. 3593-3601.[1]. O
[2]. Yousef Fazaeli, Shahzad Feizi, Amir R Jalilian, Ali Hejrani,. Applied Radiation and Isotopes, .2016. 112: p. 13-19
[3]. Y. Fazaeli, A. Jalilian, M. Amini, A. Rahiminejad, S.Rajabifar, F. Bolourinovin, S. .Moradkhani, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2011. 288(1): p. 17-24

[4]. Y. Fazaeli, A. Jalilian, M. Amini, K. Ardaneh, A. Rahiminejad, F. Bolourinovin, S. .Moradkhani, A. Majdabadi, 2012. 46(1): p. 20-26
[5]. Y. Fazaeli, S. Shanehsazzadeh, A.Lahooti, S. Feizi, A.Jalilian,. Radiochimica Acta, 2016. .104(5): p. 327-336
[6]. Y. Fazaeli, MA. Hosseini, M. Afrasyabi, P. Ashtari, Radiochimica Acta. 2019 ,107, Pages 157–164.
[7]. Y. Fazaeli, A.R. Jalilian, A. Khalaj, Development of A New Radiogallium Porphyrin Complex as A Possible Tumor Imaging Agent, International Journal of Nuclear Medicine Research. 2 (2015)7-15.
[8]. Y. Fazaeli, M.A. Hosseini, F. Shahabinia, S. Feizi, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 320 (2019), 201-20