بررسی بیولوژیکی تکنسیوم پاکلیتاکسل در موش توموری

زهرا شعبانی[۱]- مصطفی عرفانی[۲]- مجتبی شمسایی ظفرقندی[۱]- سید پژمان شیرمردی[۲]

۱. دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی انرژی و فیزیک، گروه پرتوپزشکی.

۲. سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها.

چکیده:

یکی از مهم‌ترین علل عدم پاسخ تومور به مقاومت دارویی چندگانه (MDR[۱]) عرضه بیش از اندازه پی‌گلیکوپروتئین (P-gp[۲]) است. برای درمان یک تومور با اینگونه داروها، پیش‌بینی پاسخ تومور به آن بسیار مهم است. برای رسیدن به این هدف می‌توان این داروها را با رادیونوکلیدهای تشخیصی نشاندار کرد و توسط میزان جذب رادیودارو در تومور به حساس یا مقاوم‌بودن تومور به آنها پی برد. در این مطالعه پاکلیتاکسل با ^{99m}Tc نشاندار شد. و پتانسیل درمانی آن برای تومورهای ملانوما با اندازه‌گیری مقدار جذب رادیودارو در تومور ارزیابی شد. نتایج حاصل از بررسی توزیع بیولوژیکی نشان‌دهنده بالاترین جذب در تومور، ۲ ساعت پس از تزریق (۴/۵۱٪ID/g) بود که این مقدار نشان‌دهنده حساس‌بودن تومورهای ملانوما و امکان درمان این تومورها با آن است.

کلمات کلیدی: *پاکلیتاکسل، تومور، نشاندارسازی، ^{99m}Tc*

مقدمه:

پاکلیتاکسل یک آلکالوئید گیاهی است که از درخت سرخدار تهیه می‌شود و به عنوان یک عامل ضدمیتوز توسط اتصال به میکروتوبول و افزایش پلیمریزاسیون آن فعالیت می‌کند[۱]. پاکلیتاکسل یک جزء تاثیرپذیر توسط P-gp است که MDR را به تومورها و سلول‌های سرطانی، از طریق افزایش انتشار داروهای شیمی‌درمانی و در نتیجه کاهش غلظت داخل سلولی تومورها، القا می‌کند. MDR یک مانع اصلی مدیریت داروهای شیمی‌درمانی است. تصویربرداری مولکولی عملکرد MDR با استفاده از توموگرافی کامپیوتری گسیل تک فوتونی (SPECT[۳]) و توموگرافی گسیل پوزیترون (PET[۴]) می‌تواند به تعیین تومورهای MDR و بنابراین تصمیم‌گیری رژیم‌های درمانی جایگزین برای بیمارانی که به این داروها مقاوم هستند، کمک کند. در این راه، استفاده از PET به‌دلیل به‌کارگیری سیکلوترون برای تولید رادیوایزوتوپ‌های مورد استفاده در آن موجب بالا رفتن هزینه رادیوداروهای تولیدی می شود. به این دلیل و همچنین محدودیت استفاده از سیکلوترون، استفاده از ژنراتور و رادیونوکلیدهای تولیدی به این روش، رایج‌تر است. در میان این رادیونوکلیدها، استفاده از ^{99m}Tc و به طور ویژه مشتقات آن بسیار زیاد است[۲]. یکی از مشتقات ^{99m}Tc که بسیار در نشاندارسازی‌ها استفاده

---

[۱] Multidrug resistance
[۲] P-glycoprotein
[۳] Single Photon Emission Computed Tomography
[۴] Positron Emission Tomography

می‌شود شامل تکنسیم در حالت اکسایش +۱ است. از مزیت‌های این روش نشاندارسازی ایجاد کمپلکس‌هایی با پایداری کینتیکی بالا، ایجاد اکتیویته ویژه بالا، عدم نیاز به خالص‌سازی بیشتر و پایین بودن جرم مولکولی ترکیب است[۳]. در این گزارش پاکلیتاکسل به عنوان یک داروی MDR با ^{99m}Tc، به عنوان یک رادیونوکلید گسیلنده گاما نشاندار شد. بازده نشاندار سازی، پایداری آزمایشگاهی و پایداری در سرم انسانی توسط HPLC[۵] مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت توزیع بیولوژیکی رادیودارو در موش‌هایی که تومورهای ملانوما را حمل می‌کردند، بررسی شد.

روش کار: مواد و روش‌ها

^{99m}Tc به صورت سدیم پرتکنتات ($Na^{99m}TcO_4$) از ژنراتور $^{99}Mo/^{99m}Tc$ تهیه شد. پاکلیتاکسل و دیگر مواد شیمیایی از شرکت سیگما/ آلدریچ خریداری شد. بازده نشاندار سازی ترکیب توسط HPLC که دارای سیستم گرادیانی شامل تری‌فلوئورواستیک اسید/ آب ۰/۱٪ (حلال A) و تری‌فلوئورواستیک اسید/ استونیتریل ۰/۱٪ (حلال B) بود، انجام شد. اندازه‌گیری رادیواکتیویته برای بررسی توزیع بیولوژیکی ترکیب، توسط شمارنده سوسوزن NaI(Tl)(ORTEC – Model 4001M Mini bin and Power Supply) انجام شد. یک دوربین گاما تک دهانه (ساخته شده در شرکت زیمنس) که به یک کولیماتور حساس به پرتوهای ۱۴۰keV مجهز بود هم به منظور مطالعات تصویربرداری استفاده شد.

تهیه، بررسی پایداری آزمایشگاهی، پایداری در سرم انسانی و توزیع بیولوژیکی ترکیب

برای نشان دارسازی ۴ میلی‌گرم سدیم‌کربنات، وزن و درون یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد. به آن ۵ میلی‌گرم سدیم‌بوروهایدراید و ۲۰ میلی‌گرم سدیم‌پتاسیم‌تارتارات اضافه و درب ویال با رابر و درب آلومینیمی محکم بسته شد. سپس این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه تحت گاز مونوکسیدکربن قرار گرفت. پس از آن ۴۰mCi اکتیویته به حجم ۲ میلی‌لیتر به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه تحت حرارت ۹۵ °C قرار گرفت. بعد از اینکه مقداری خنک شد، با HCl ۰/۱ نرمال به pH=۷ تغییر پیدا کرد و به ویالی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر الکل (اتانول)، ۵۰۰ میکرولیتر بافر سدیم‌استات با pH=۷، ۴۰۰ میکروگرم (۶۶ میکرولیتر) پاکلیتکسل و ۲۰۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه تحت حرارت ۹۵ °C قرار گرفت. بعد از اتمام کار، خلوص رادیوشیمیایی ترکیب توسط کروماتوگرافی HPLC مورد

[۵] High Performance Liquid Chromatography

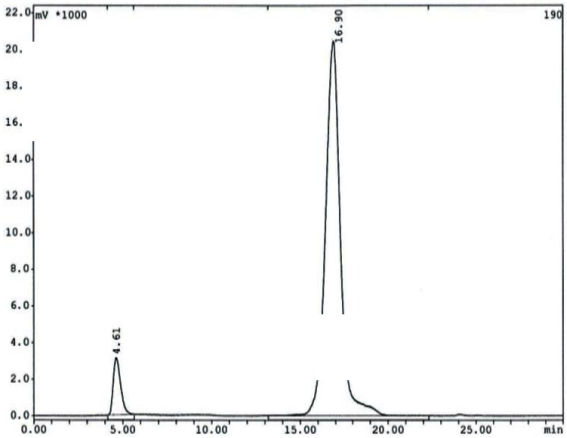
ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است، که در این پروژه از روش نشاندار سازی واردکردن یک نشان رادیواکتیو خارجی استفاده شده‌است. پایداری آزمایشگاهی این ترکیب، با نگهداری آن در دمای اتاق و در pH=۷، به مدت ۴۸ ساعت پس از تهیه توسط HPLC مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی پایداری ترکیب در سرم انسانی به ۲۰۰ میکرولیتر از سرم خون انسانی، ۱۰۰ میکرولیتر ماده نشاندار شده اضافه شد. این ترکیب به یک میکروتیوپ منتقل و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس به اندازه‌ی ۱۰۰ میکرولیتر الکل به آن اضافه گردید. الکل پروتئین‌های خون را لخته کرده و برای جدانمودن آن، ترکیب مورد نظر به سانتریفیوژ منتقل شد. پس از سانتریفیوژکردن، مواد روی آن برداشته و به سیستم HPLC تزریق شد. پس از ۱ و ۲ ساعت، پایداری در خون بررسی گردید. برای یررسی توزیع بیولوژیکی ترکیب، ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب نهایی (با اکتیویته ۷۸ میکروکوری) به ۳ موش با وزنی حدودا بین ۴۴-۳۲ گرم که تومورهای ملانوما را حمل می‌کردند تزریق شده و سپس حیوانات به ترتیب ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از تزریق، کشته شدند و پس از اینکه با استفاده از دوربین گاما تصویری از آنها گرفته شد، تشریح شدند. اکتیویته اندام‌های مختلف موش‌ها با استفاده از گاماکانتر تعیین و توزیع اکتیویته در اندام‌های مختلف به صورت درصد اکتیویته تزریقی بر هر گرم اندام (٪ID/g[۶]) تعیین شد.

نتایج:

مقادیر خلوص رادیوشیمیایی پاکلیتاکسل نشاندار شده توسط HPLC ۹۳/۰۱٪ گزارش شد (شکل ۱).

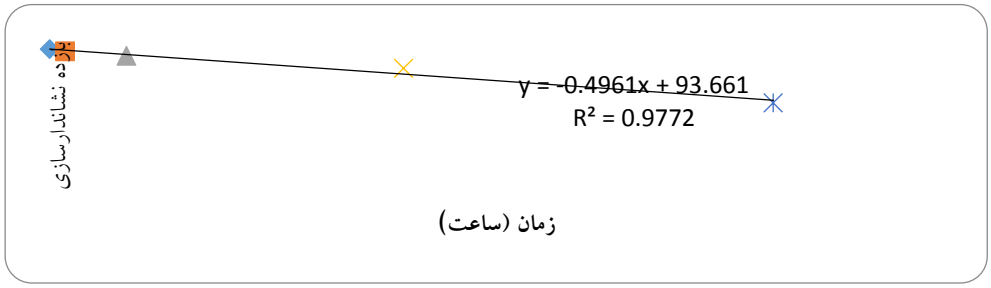
a) b)

[۶] Injection Dose per Gram



شکل (۱): کروماتوگرام HPLC برای ترکیب نشاندار

میزان پایداری کمپلکس نشاندارشده در زمان‌های مختلف، ۱، ۲، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نشاندارسازی توسط روش کروماتوگرافی مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که در شکل (۲) ملاحظه می شود کمپلکس نشاندارشده پایداری قابل ملاحظه‌ای (۶۸/۶۴٪) را حتی تا ۴۸ ساعت بعد از نشاندارسازی نشان می‌دهد.

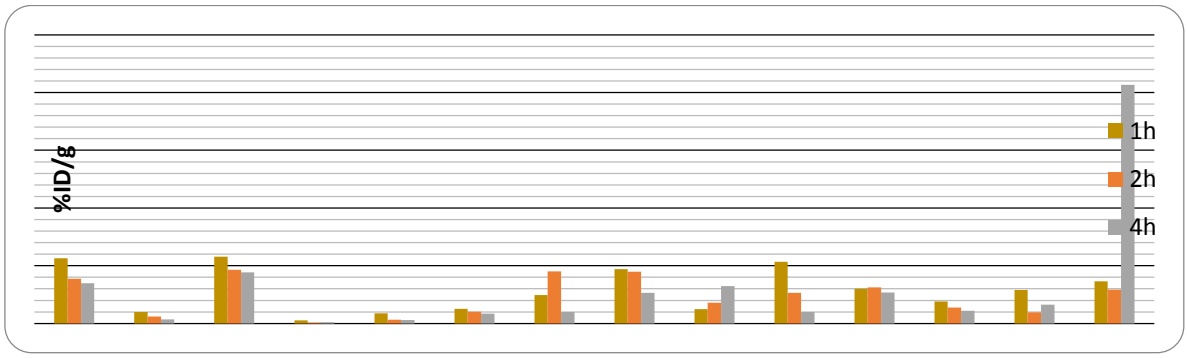


شکل(۲): میزان پایداری کمپلکس در زمان‌های مختلف پس از نشاندارسازی.

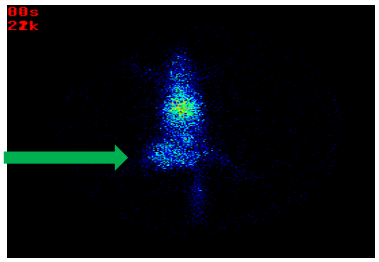
کمپلکس نشاندار پایداری قابل ملاحظه‌ای را در سرم انسانی در ۱ و ۲ ساعت پس از نشاندارسازی (۸٤/۱۷٪ در ۱ ساعت و ۷۹/۲٪ در ۲ساعت پس از نشاندارسازی) از خود نشان داد.

نتایج حاصل از جذب ترکیب نشان دار در اندام‌های مختلف مدل موش (ID/g٪) در ساعت‌های مختلف پس از تزریق (شکل ۳) نشان‌دهنده بالاترین جذب توموری، ۲ ساعت پس از تزریق و برابر با ۴/۵۱٪ID/g می‌باشد. که این مقدار

نشان‌دهنده حساسیت و میل ترکیبی تومور به واکنش با تاکسول است. در نتیجه این تومور را می‌توان با داروی تاکسول تحت درمان قرار داد. همچنین با توجه به جذب توموری بالا، پایداری قابل‌ملاحظه و جذب پایین در سایر اندام‌ها، کمپلکس می‌تواند برای هدف‌های بعدی مانند تعیین محلی تومور (شکل ۴) و بررسی روند درمانی با تاکسول مورد استفاده قرار گیرد. روند کاهشی جذب رادیودارو در کبد، کلیه و معده و روند افزایشی جذب رادیودارو در روده کوچک نشان‌دهنده دفع کبدی و کلیوی رادیودارو است. میزان حضور رادیودارو در مثانه هم در ۴ ساعت پس از تزریق به بالاترین مقدار خود، ۲۰/۶۶ ٪ID/g رسید که این نشان‌دهنده ترخیص خوب رادیودارو است.



شکل(۳): درصد اکتیویته تزریقی بر هر گرم اندام (٪ID/g) ترکیب نشان دار در اندام‌های مختلف موش در ۱، ۲ و ٤ ساعت پس از تزریق.



شکل (٤): تصویر دوربین گاما از ترکیب در موش توموری و ۲ ساعت پس از تزریق.

بحث و نتیجه‌گیری:

ترکیب پاکلیتاکسل با بازده نشاندارسازی بالا (٪۹۳/۰۱) با استفاده از رادیونوکلید ^{99m}Tc ساخته شد. این ترکیب پایداری آزمایشگاهی بالایی (٪۶۸/۶۴ در ۴۸ ساعت پس از نشاندار سازی) در دمای اتاق و در pH=۷ داشت. همچنین پایداری خوبی هم در سرم انسانی از خود نشان داد. بررسی توزیع بیولوژیکی این ترکیب بر روی موش ، نشان‌دهنده بالاترین

جذب توموری (۴/۵۱٪ID/g) در ۲ ساعت پس از تزریق و ترخیص کبدی و کلیوی رادیودارو است. این پروژه موید این مطلب است که با توجه به جذب توموری بالا، تومور به این دارو حساس است و می‌تواند تحت درمان با این دارو قرار بگیرد. همچنین با توجه به جذب توموری بالا، پایداری قابل‌ملاحظه و جذب پایین در سایر اندام‌ها، کمپلکس می‌تواند برای هدف‌های بعدی مانند تعیین محلی تومور و برر سی روند درمانی با پاکلیتاکسل مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به دلیل وجود اتم‌های دهنده‌ی الکترون در ترکیب واکنش با ^{99m}Tc می‌تواند با اشتراک الکترونی به آسانی و سریع با بازده نشاندارسازی بالا تولید شود.

مراجع:

[1] A. Ritschel, W.; Pharmaceutical aspects of paclitaxel, *international journal of pharmaceutics*, 172, p. p. 1-15, 1998.

[2] Satpati, D. Korde, A. Deb Sarma, H. Banerjee, S.; Radiosynthesis and Biological Evaluation of ^{68}Ga- Labeled Colchicine Conjugates, *CANCER BIOTHERAPY AND RADIOPHARMACEUTICALS*, 29, p. p. 1-6, 2014.

[3] Korde, A and et al.; ^{99m}Tc-labeling of 6olchicines using $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ and $[^{99m}Tc{\equiv}N]^{2+}$ core for the preparation of potential tumor-targeting agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, p. p. 793–799, 2006.