

۱۶ و ۱۷ شهریورماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد

بررسی پراکنش زیستی رادیو داروی ^{177}Lu -DOTATOC در موش های مبتلا به تومورهای ادنوکارسینومای سینه

موسوی دارامرودی، معصومه سادات*^(۱) - یوسف نیا، حسن^(۲) - عباسی دوانی، فریدون^(۱)
ذوالقدری، سمانه^(۲)

^(۱) دانشگاه شهید بهشتی تهران، دانشکده مهندسی هسته ای، گروه کاربرد پرتوها
^(۲) سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده چرخه سوخت

چکیده:

در این تحقیق، ^{177}Lu با پرتو دهی Lu_2O_3 غنی شده در راکتور تحقیقاتی تهران با خلوص رادیونوکلئیدی و رادیوشیمیایی بالاتر از ۹۹ درصد تولید شد. پس از آن ترکیب نشاندار ^{177}Lu -DOTATOC در شرایط بهینه با خلوص رادیوشیمیایی بالاتر از ۹۹ درصد تهیه گردید. به منظور بررسی میزان جذب ترکیب نشاندار در تومور ادنوکارسینومای سینه، ترکیب به موش های مبتلا به این نوع تومور تزریق گردید. نتایج توزیع زیستی بیشترین مقدار جذب را در بافت های کلیه و تومور نشان داد. به طور کلی نتایج نشان داد که ترکیب نشاندار ^{177}Lu -DOTATOC پتانسیل استفاده در درمان تومور ادنوکارسینومای سینه را داراست هر چند مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: لوتسیوم-۱۷۷، DOTATOC، تومور ادنوکارسینومای سینه

مقدمه:

امروزه یکی از بخش های مهم در پزشکی هسته‌ای استفاده از رادیوداروها برای کاربردهای درمانی و تشخیصی می باشد. رادیوداروها می توانند از طریق اتصال به گیرنده های خاص موجود در بافت های مختلف مانند پروتئین ها، آنتی بادی های مونوکلونال و پپتیدها در داخل بدن تجمع پیدا کنند. [۱]

یکی از مهمترین گیرنده های پپتید سوماتواستاتین است که توسط طیف وسیعی از بافت ها در بدن ایجاد می شود. طی دهه اخیر آنالوگ های صنعتی سوماتواستاتین کاربرد گسترده ای در توسعه رادیوداروها دارند که دارای پایداری زیستی

۱۶ و ۱۷ شهریور ماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد

مناسب و قدرت اتصال بالا به گیرنده های سوماتواستاتین نوع دوم (SSTR2) هستند. در تومورهای نرواندوکراین و متاستازهای آن، نوروبلاستوماها، ادنوکارسینوما سینه، بعضی از سرطان‌های مدولار تیروئید (MTC) و... بیان افزایش یافته‌ای از گیرنده های سوماتواستاتین وجود دارد که استفاده از آنالوگ‌های مذکور منجر به افزایش دانسیته گیرنده های سوماتواستاتین در سطح سلول های توموری نسبت به بافت‌های نرمال می شود و شرایط را برای درمان اختصاصی با استفاده از تابش ناشی از رادیونوکلئید به تومور فراهم می‌کند. [۲] آکروتاید و لانروتاید دو نوع از آنالوگ های صناعی سوماتواستاتین هستند که بیشتر مورد استفاده قرار میگیرند. آکروتاید پپتید ۸ اسیدآمینوای است که علی‌رغم حفظ اثرات بیولوژیکی پپتید اصلی، در برابر تغییرات آنزیماتیک نیز مقاوم است. [۳]

امروزه ترکیبات نشاندار درمانی مختلفی با به کارگیری پپتید Tyr3-octreotide و شلاتور DOTA انجام شده است و DOTATOC به عنوان یک گزینه درمانی مؤثر برای درمان برخی تومورها استفاده می‌شود. [۴] در این بین، ترکیب نشاندار $^{90}\text{Y-DOTATOC}$ اثرات چشمگیری را در کاهش علام بیماری و کاهش رشد تومورهای بدخیم نرواندوکراین از خود نشان داده است. [۵]

یکی دیگر از رادیونوکلئیدهای β زای مناسب برای درمان سرطان با روش فوق ^{177}Lu است که دارای نیمه عمر بیولوژیکی ۶,۷۳ روز و ماکزیم انرژی ذرات بتای آن ۴۹۸ keV و ماکزیم عمق نفوذ در بافت نرم آن ۱,۷ mm می‌باشد. همچنین دارای تابش های γ با انرژی‌های ۱۱۳ keV (۶٪) و ۲۰۸ keV (۱۱٪) است که در کنار کاربرد درمان، امکان تصویر برداری را نیز فراهم می‌آورد. [۶]

در این تحقیق ترکیب نشاندار $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ برای اولین بار در کشور تولید گردیده و به پراکنش زیستی آن در موش‌های مبتلا به سرطان ادنوکارسینوما سینه پرداخته شده است.

روش کار :

تولید رادیوایزوتوپ ^{177}Lu توسط تابش هدف Lu_2O_3 غنی شده در راکتور تحقیقاتی تهران (TRR) و از طریق اندرکنش (n, γ) تولیدی با ^{176}Lu غنی شده انجام شد. تست خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از دستگاه TLC اسکندر و کروماتوگرافی لایه نازک انجام گرفت. آشکار ساز ژرمانیوم فوق خالص (HPGe) جفت شده با آنالیزگر چندکاناله (MCA) و

۱۶ و ۱۷ شهریور ماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد

یک دوز کالیبراتور برای شمارش اکتیویته تجمع یافته در ارگان‌های موش مورد نیاز بود. محاسبات شمارش اکتیویته بر اساس پیک ۱۱۳ keV عنصر ^{177}Lu انجام شد. موش‌های مورد استفاده دارای وزن ۱۷-۲۰ گرم بودند.

تهیه و کنترل کیفی محلول $^{177}\text{LuCl}_3$

^{177}Lu توسط تابش نوترون به ۱mg از Lu_2O_3 غنی شده با خلوص ۹۹,۹۹٪ در راکتور تحقیقاتی تهران تولید می‌شود. با ترکیب $200\ \mu\text{L}$ از 0.1M HCl محلول $^{177}\text{LuCl}_3$ آماده و توسط آب فوق خالص به حجم مناسب رسانده شد. خلوص رادیو نوکلئیدی از محلول فوق توسط اسپکترومتری HPGe انجام شد. خلوص رادیوشیمیایی با روش کروماتوگرافی لایه نازک (ITLC) انجام شد. به این منظور $5\ \mu\text{L}$ از محلول $^{177}\text{LuCl}_3$ را روی کاغذ واتمن ریخته و در دو سیستم حلال متفاوت قرار داده شد. { $\text{A: } 10\ \text{mmol DTPA}; \text{pH}=5$ و $\text{B: } 10\% \text{ آمونیوم استات: متانول (1:1)}$ }

نشانداری DOTATOC با $^{177}\text{LuCl}_3$

$55\ \mu\text{g}$ از لیگاند DOTATOC در ویال حاوی $5\ \text{mCi}$ از $^{177}\text{LuCl}_3$ ریخته شد. pH ترکیب توسط بافر HEPES تا ۴ رسانده شد، سپس ترکیب فوق به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای 90°C سانتریفاد توسط همزن با سرعت یکنواخت هم زده شد تا اینکه خلوص رادیوشیمیایی ترکیب در بازه‌های زمانی مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰ دقیقه) توسط ITLC بررسی شد. پس از گذراندن از SEP-PAK که از قبل آماده سازی شده بود، ستون با $0.5\ \text{mL}$ اتانول و $1\ \text{mL}$ از $9\% \text{ NaCl}$ شست و شو داده شد.

کنترل کیفی ترکیب نشانداری $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$

خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشانداری با روش ITLC مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از کاغذ کروماتوگرافی واتمن و $9\% \text{ NaCl}$ به عنوان فاز متحرک استفاده شد.

مطالعات پایداری

طبق نتایج حاصل از روش ITLC پایداری ترکیب در دمای اتاق و در سرم انسانی بررسی شد.

۱۶ و ۱۷ شهریور ماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد

۳،۷ مگابکرل از $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ به سرم انسانی $500 \mu\text{L}$ اضافه شد و ترکیب در دمای 37°C درجه سانتی گراد برای ۴۸ ساعت با روش ITLC مورد آنالیز قرار گرفت.

پراکنش زیستی $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ در موش‌های توموری

محلول نهایی $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ با اکتیویته $3,7\text{MBq}$ به موش‌های توموری از دم تزریق شد. مقدار کل اکتیویته‌ی داده شده به هر کدام از موش‌ها توسط سرنگ 1mL قبل و بعد از تزریق توسط یک دوزکالیبراتور اندازه گیری شد. پراکنش زیستی محلول در بافت‌ها پس از کشتار در بازه‌های زمانی مختلف (۲،۴،۲۴،۴۸،۷۲،۱۸۶ ساعت) تعیین شد. نمونه خونی بلافاصله پس از کشتار گرفته شد و وزن بافت‌های مختلف از جمله قلب، کلیه‌ها، طحال و... اندازه گیری شد و میزان اکتیویته‌ی تجمع یافته در هر بافت توسط آشکار ساز HPGe اندازه گرفته شد.

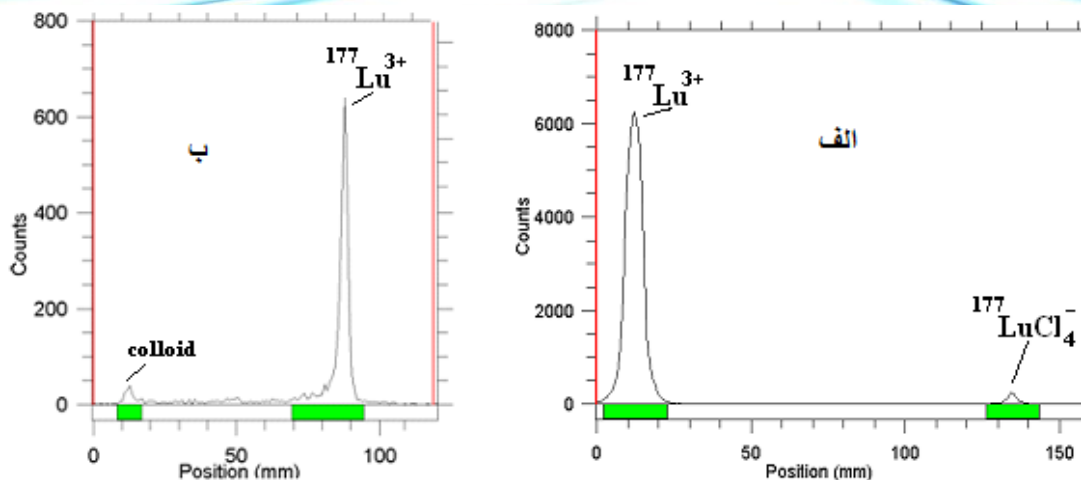
نتایج :

تهیه و کنترل کیفی محلول $^{177}\text{LuCl}_3$

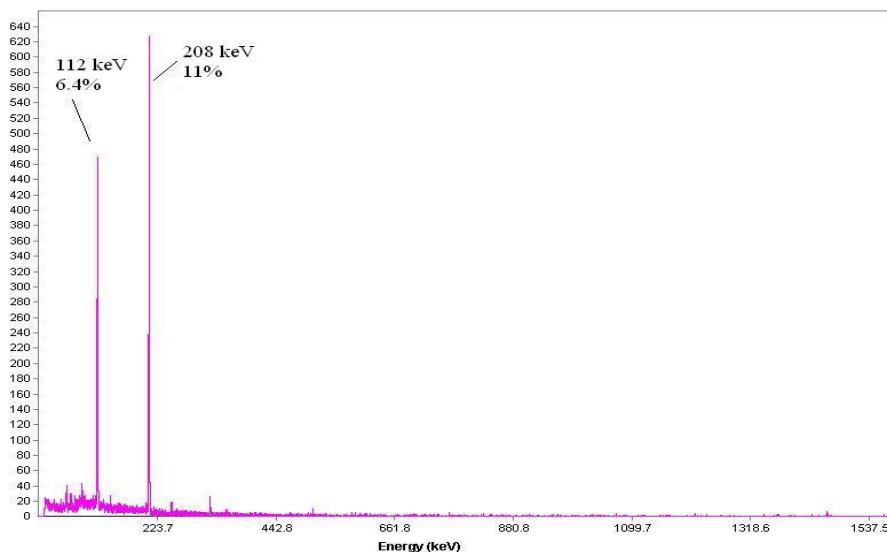
^{177}Lu با اکتیویته ویژه 95GBq/g تهیه شد. خلوص رادیوشیمیایی محلول ^{177}Lu در دو سیستم حلال بررسی شد و خلوص بالاتر از ۹۹٪ را نشان داد. (شکل ۱)

خلوص رادیونوکلئیدی لوتسیوم ^{177}Lu برابر با ۹۹،۹۸٪ به دست آمد. (شکل ۲)

۵ و ۶ اسفندماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد



شکل ۱: خلوص رادیوشیمیایی محلول $^{177}\text{LuCl}_3$ در دو سیستم حلال ۱۰٪ آمونیوم استات:متانول (الف) و ۱۰ mmol و DTPA (ب)



شکل ۲: اسپکترومتری محلول $^{177}\text{LuCl}_3$ با استفاده از دستگاه HPGe

تهیه و کنترل کیفی ^{177}Lu -DOTATOC

۱۶۰۵ شماره ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ شماره ۱

جهت تعیین شرایط بهینه نشاندارسازی، آزمایشات مختلفی با تغییر مقدار لیگاند، دما، pH و زمان انجام شد و هر بار خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشاندار با روش ITLC تعیین شد. در شرایط بهینه ۱۱۵ μg از لیگاند به ویال حاوی ۵ mCi از محلول $^{177}\text{LuCl}_3$ اضافه شد و pH=4 تنظیم شد. سپس ویال در دمای ۹۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و محلول از ستون C₁₈ Sep-Pak گذرانده شد. در نهایت توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک خلوص رادیوشیمیایی بالاتر از ۹۹٪ حاصل شد.

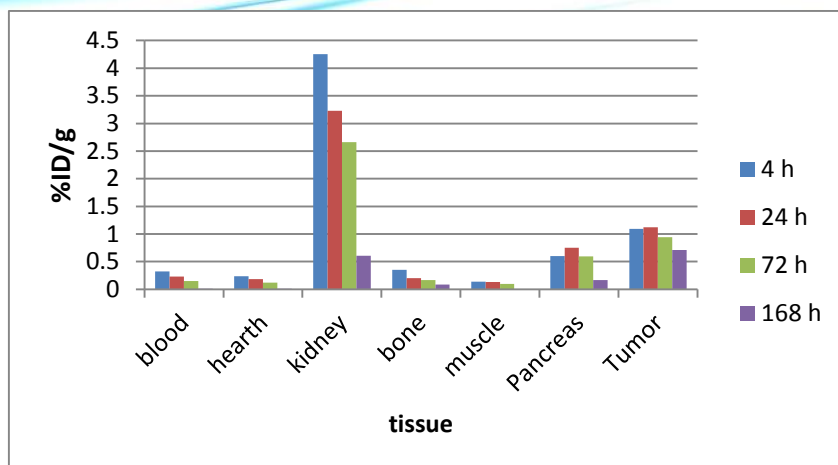
مطالعات پایداری

پایداری ترکیب نشاندار در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی بعد از گذشت ۴۸ ساعت از زمان آماده‌سازی ترکیب، همچنان بالاتر از ۹۸٪ باقی ماند. همچنین پایداری ترکیب در سرم انسانی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حتی پس از گذشت ۴۸ ساعت، هیچ گونه کاهش خلوص رادیوشیمیایی را نشان نداد.

پراکنش زیستی $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ در موش‌های توموری

درصد دوز تزریقی برحسب گرم بافت (%ID/g) برای ارگان‌های مختلف بعد از تزریق $^{177}\text{Lu-DOTATOC}$ محاسبه شد، که این کار از طریق تقسیم مقدار اکتیویته در هر بافت (A) به مقدار اکتیویته تزریقی و جرم هر ارگان انجام می‌شود (شکل ۳).

۱۶ و ۵ اسفندماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد



شکل ۳: درصد دز تزریقی بر جرم بافت (%ID/g) برای ارگان‌های مختلف پس از تزریق ^{177}Lu -DOTATOC

نتایج توزیع زیستی در موش‌های توموری حاکی از تجمع بالای ترکیب در بافت توموری بود، که شامل دانسیته بالایی از گیرنده‌های سوماتوستاتین است. همچنین حجم بالایی از ترکیب از طریق کلیه دفع می‌شود. ارگان‌هایی مانند پانکراس که از جمله ارگان‌های با گیرنده بالایی سوماتوستاتین هستند نیز جذب قابل توجهی دارند.

بحث و نتیجه گیری :

گیرنده‌های سوماتوستاتین بیان بالایی در سرطان‌های کارسینومای سینه، روده و تومورهای پانکراتیک دارند که با سوماتوستاتین طبیعی بدن اتصال بالایی پیدا می‌کنند. اما به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر سوماتوستاتین طبیعی در بدن (۲،۳ دقیقه)، آنالوگ‌های سوماتوستاتین مانند آکتروتاید تولید شدند. از جمله‌ی آن‌ها می‌توان پپتید (Tyr3, Octreotide) با لینکر DOTA را نام برد که می‌تواند ترکیبات پایداری با فلزات اکتینو مانند ^{177}Lu ، ^{68}Ga ، ^{90}Y ایجاد کند. [۳]

در این تحقیق ترکیب نشاندار ^{177}Lu -DOTATOC با خلوص رادیو شیمیایی بالاتر از ۹۹ درصد تولید شد. نتایج توزیع زیستی در موش‌های توموری حاکی از جذب بالای ترکیب در ارگان‌های با گیرنده سوماتوستاتین است. بیشترین مقدار جذب در بافت تومور ادنوکارسینومای سینه مشاهده شد. همچنین کلیه به عنوان مسیر اصلی دفع، جذب بالایی را نشان داد. با توجه به نتایج مشاهده شده در جذب ترکیب نشاندار در بافت توموری، می‌توان به گیرنده‌های سوماتوستاتین در سرطان ادنوکارسینومای سینه پی برد و از آن به عنوان یک عامل درمانی یاد کرد که مستلزم تحقیقات بیشتری است.

۵ و ۶ اسفندماه ۱۳۹۴ دانشگاه یزد

مراجع :

1. Jyothi Thundimadathil/Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects/ Journal of Amino Acids /Article ID 967347/13 pages/ Volume 2012
2. S.M. Okarvi/Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potential tools against cancer/ELSEVIER/Cancer Treatment Reviews /34/ 13– 26/2008
3. C. Dong, Z. Liu and F. Wang/Peptide-based Radiopharmaceuticals for Targeted Tumor Therapy/ Current Medicinal Chemistry/21/139-152/2014
4. B. L. R. Kam & J. J. M. Teunissen & E. P. Krenning & W. W. de Herder & S. Khan & E. I. van Vliet & D. J. Kwekkeboom/Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours/springer/s00259-011-2039-y/39/S103–S112/2012
5. Linda Villard, Anna Romer, Nicolas Marincek, Philippe Brunner, Michael T. Koller, Christian Schindler, Quinn K.T. Ng, Helmut R. Ma'cke, Jan Mu'ller-Brand, Christoph Rochlitz, Matthias Briel and Martin A. Walter/Cohort Study of Somatostatin-Based Radiopeptide Therapy With [90Y-DOTA]-TOC Versus [90Y-DOTA]-TOC Plus [177Lu-DOTA]-TOC in Neuroendocrine Cancers/ JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY/volume30/number10/ page1100-1106/2012
6. John J. Zaknun & L. Bodei & J. Mueller-Brand & M. E. Pavel & R. P. Baum & D. Hörsch & M. S. O'Dorisio & T. M. O'Dorisiol & J. R. Howe & M. Cremonesi & D. J. Kwekkeboom/The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT) in neuroendocrine tumours/ Springer/ s00259-012-2330-6/2013