

تهیه و ارزیابی خلوص تاکسول نشان دار و بررسی میزان جذب آن در موش توموری

زهرا شعبانی^۱، مصطفی عرفانی^{۲*}، مجتبی شمسایی ظفرقندی^۱، سید پژمان شیرمردی^۲

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

۲. پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: تاکسول یک جزء شناخته شده برای پی‌گلیکوپروتئین است که مقاومت دارویی را به سلول‌های سرطانی القاء می‌کند. از این رو نشان‌داری آن به عنوان یک ابزار برای تصویربرداری فعالیت انتقال‌دهنده پی‌گلیکوپروتئین و تشخیص مقاومت دارویی اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این مطالعه تهیه تاکسول نشان‌دار و بررسی میزان جذب آن در تومور به منظور ارزیابی محل تومور و میزان مقاومت تومور به دارو است.

مواد و روش‌ها: تاکسول با تکنسیوم به روش مستقیم نشان‌دار گردید و سپس خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه پایداری و توزیع بیولوژیکی در موش‌های دارای تومور ملانوما بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس بیش از ۹۰٪ است. پایداری قابل ملاحظه‌ای (۶۴/۶۸٪) تا ۴۸ ساعت مشاهده گردید. نتایج توزیع بیولوژیکی تجمع بالایی از کمپلکس نشان‌دار (۴/۵۱٪)، در تومور را نشان داد.

نتیجه‌گیری: جذب بالای کمپلکس در کبد به عنوان ارگان متابولیزه کننده و دفع کننده و تومور مربوطه دیده شد. تجمع اکتیویته در تومور نشان‌دهنده حساس بودن سلول‌های موجود در تومورهای ملانوما به جذب تاکسول بوده و امکان تشخیص محل‌های درگیر با تومور با استفاده از این ترکیب است. به طور کلی بر اساس یافته‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترکیب دارای قدرت اتصال به تومور بوده و با وجود دفع کبدی صفراوی قابلیت استفاده به عنوان رادیو داروی تشخیصی را دارا است.

واژه‌های کلیدی: تاکسول، ملانوما، تشخیص تومور.

مقدمه

که مقاومت دارویی را در تومورها و سلول‌های سرطانی، از طریق افزایش انتشار داروهای شیمی‌درمانی و در نتیجه کاهش غلظت داخل سلولی تومورها، القا کرده و به عنوان مانعی جهت استفاده از داروهای شیمی‌درمانی است. تصویربرداری مولکولی با استفاده از دوربین گاما و یا دوربین پوزیترون می‌تواند به تعیین عملکرد این مقاومت‌ها در تومور کمک کند. استفاده از تصویربرداری پوزیترون به دلیل هزینه بالای تولید رادیونوکلیدهای پوزیترون‌دهنده با محدودیت روبرو است ولیکن استفاده از رادیونوکلیدهای گامادهنده مانند ژنراتور رادیوایزوتوپی مولیبدن ۹۹- تکنسیوم ۹۹م و یا ایندیوم ۱۱۱ اقتصادی تر و هم‌چنین رایج‌تر است (۵۰،۱۳). در میان این رادیونوکلیدها، تکنسیوم ۹۹م به دلیل مشخصه‌های ویژه‌اش

تاکسول یک آکالوئید گیاهی است که از درخت سرخ‌دار تهیه می‌شود و به عنوان یک عامل ضد میتوز توسط اتصال به میکروتوبول و افزایش پلی‌مریزاسیون آن فعالیت می‌کند (۲). تاکسول توسط پی‌گلیکوپروتئین تأثیرپذیر است. پی‌گلیکوپروتئین یک پروتئین با وزن ۱۷۰ کیلو دالتون است

نویسنده مسئول:

پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای

پست الکترونیکی: mgandomkar@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از خنک شدن ویال خلوص رادیوشیمیایی ترکیب تاکسول نشان دار شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی شد.

پایداری

پایداری آزمایشگاهی ترکیب نشان دار شده در سالیین و سرم انسانی به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین پایداری در سرم انسانی ۲۰ میکرولیتر ترکیب نشان دار به ۲۰۰ میکرولیتر از سرم انسانی در یک میکروتیوب منتقل شده و در زمان های مختلف مورد بررسی نگهداری شد. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر الکل پروتئین های سرم لخته شده و مخلوط حاصل سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ کردن محلول رویی از رسوب جدا شده و میزان پایداری در کروماتوگرافی بررسی شد.

توزیع بیولوژیکی

جهت بررسی توزیع بیولوژیکی ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب نشان-دار (۷۸ میکروکوری) به گروه های سه تایی موش (انستیتو پاستور ایران) با وزن ۳۲-۴۴ گرم دارای تومور ملانوما تزریق شد. حیوانات به ترتیب ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از تزریق کشته شده و سپس اندام های مختلف جدا شده و وزن گردیدند. میزان اکتیویته در بافت های مختلف اندازه گیری شده و به صورت درصد اکتیویته تزریقی بر هر گرم اندام ($^1\text{ID/g}$) محاسبه گردیدند. هم چنین تصویربرداری برای موش با استفاده از دوربین گاما در زمان های مختلف انجام شد.

یافته ها

نتایج نشان دارسازی و پایداری

اگرچه تعیین ساختار دقیق ایجاد شده نیاز به انجام مطالعه ها ساختاری کامل دارد ولیکن ساختار پیشنهادی برای ترکیب نشان دار در شکل ۱ آورده شده است.

(نیمه عمر مناسب، انرژی مناسب، تولید راحت تر) بالغ بر ۸۵ درصد از کاربردهای تشخیصی در حوزه پزشکی هسته ای را به خود اختصاص داده است. این رادیونوکلید در فرم های مختلف برای نشان دارسازی ترکیب ها و داروهای مختلف استفاده می-گردد. یکی از روش هایی که دارای کاربرد زیادی است روش نشان دارسازی مستقیم است. پیش ساز این روش احیاء تکنسیوم به اکسایش های پایین تر شامل تکنسیوم در حالت اکسایش چهار و پنج است. از مزیت های این روش نشان دارسازی ایجاد کمپلکس هایی با پایداری کینتیکی بالا، ایجاد اکتیویته ویژه بالا، عدم نیاز به خالص سازی بیش تر و پایین بودن جرم مولکولی ترکیب است (۱۴، ۸، ۴، ۱).

هدف از انجام این تحقیق تهیه تاکسول نشاندار شده با تکنسیوم و بررسی آن به عنوان یک رادیودارویی که مقاومت دارویی را نشان می دهد، است. بازده نشان دارسازی، پایداری در سرم انسانی و توزیع بیولوژیکی این ترکیب نشان دار در موش های حامل تومورهای ملانوما بررسی گردید.

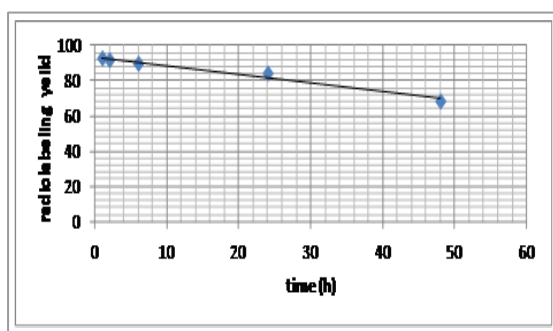
مواد و روش ها

تکنسیوم ۱۹۹م به صورت سدیم پرتکتات از ژنراتور مولبدن ۹۹- تکنسیوم ۱۹۹م، از بخش رادیوایزوتوپ سازمان انرژی اتمی ایران تهیه شد. تاکسول و دیگر مواد شیمیایی از شرکت سیگما/ آلدیج (آلمان) خریداری شد. بازده نشان دارسازی ترکیب توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و سیستم حلال گرادینانی شامل تری فلئورو استیک اسید/ آب ۱/۰۰۱٪ (حلال ۱) و استونیتریل (حلال ۲) انجام شد. اندازه گیری رادیواکتیویته توسط شمارنده سوسون انجام شد. تصویربرداری توسط یک دوربین گاما تک دهانه (ساخته شده در شرکت زیمنس آلمان) که به کولیماتور حساس به پرتوهای ۱۴۰ کیلو الکترون ولت مجهز بود انجام شد.

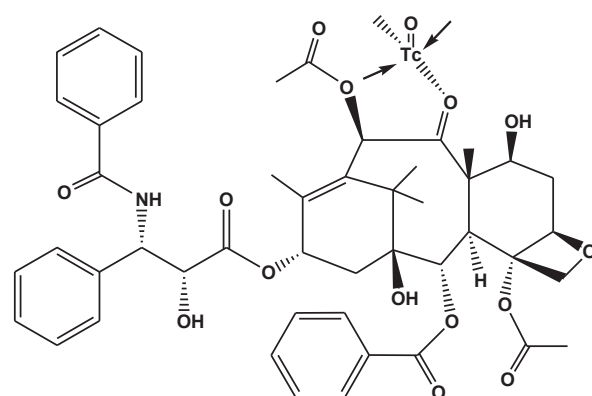
نشان دارسازی

برای نشان دارسازی ۲۰۰ میکرولیتر الکل (اتانول)، ۵۰۰ میکرولیتر بافر سدیم استات با $\text{pH}=7$ ، ۴۰۰ میکروگرم (۶۶ میکرولیتر) تاکسول، ۱۰۰ میکروگرم کلرور قلع دو آبه و ۲۰۰ میکرولیتر تکنسیوم ۱۹۹م با اکتیویته ۲/۶ میلی کوری درون یک ویال ۱۰ میلی لیتری اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵

¹Injection Dose per gram



شکل (۳): میزان پایداری تاکسول نشان‌دار در زمان‌های مختلف پس از نشان‌دارسازی.



شکل (۱): ساختار پیشنهادی تاکسول نشان‌دار

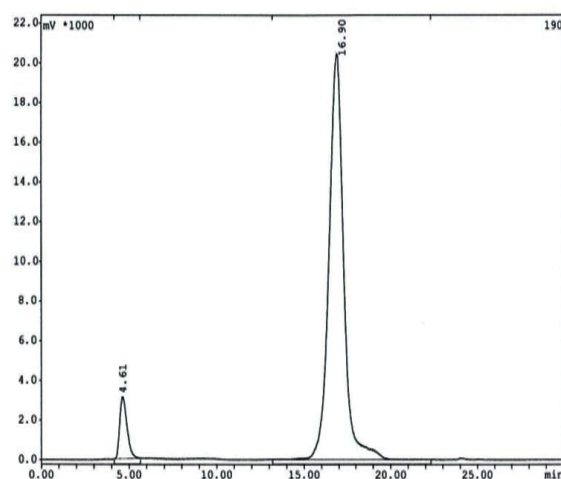
نتایج توزیع بیولوژیکی

میزان جذب ترکیب نشان‌دار در اندام و بافت‌های مختلف موش در جدول (۱) دیده می‌شود. میزان درصد اکتیویته جذب شده در واحد گرم برای کبد در ۱، ۲ و ۴ ساعت بعد از تزریق به ترتیب به ۵/۳۴، ۵/۶۶ و ۱ به دست آمد. این میزان جذب بالای کبدی می‌تواند نشان‌دهنده خاصیت چربی‌دوستی ترکیب نشان‌دار علاوه بر مسیر متابولیکی ترکیب باشد.

جدول (۱) درصد اکتیویته تزریقی بر هر گرم اندام (ID/g) ترکیب تاکسول نشان‌دار در بافت‌های مختلف موش، ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از تزریق

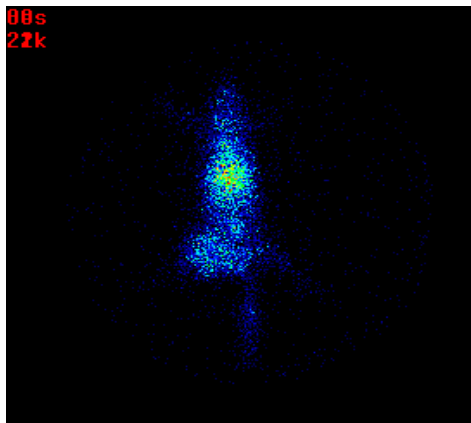
اندام	۱ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت
خون	۵/۶۴	۳/۸۷	۲/۴۸
استخوان	۰/۹۹	۰/۵۹	۰/۳۶
کلیه‌ها	۵/۷۸	۴/۶۶	۴/۴۳
مغز	۰/۲۷	۰/۰۸۷	۰/۰۹۴
ماهیچه	۰/۸۷	۰/۳۲	۰/۳۱
طحال	۱/۲۸	۱/۰۲	۰/۸۶
تومور	۲/۴۶	۴/۵۱	۱
معهده	۴/۶۹	۴/۴۸	۲/۶۴
روده کوچک	۱/۲۳	۱/۷۸	۳/۲۴
کبد	۵/۳۴	۲/۶۶	۱
ریه	۳	۳/۱۲	۲/۶۹
قلب	۱/۸۹	۱/۳۷	۱/۰۹
تیروئید	۲/۹۰	۰/۹۷	۱/۶۴
مثانه	۳/۶۶	۲/۹۳	۲۰/۶۶

مقادیر خلوص رادیوشیمیایی تاکسول نشان‌دار شده توسط HPLC ۹۳/۰۱٪ مشاهده شد (شکل ۲). برای به دست آوردن شرایط نشان‌دارسازی بهینه، مقادیر لیگاند و pH واکنش بسیار مهم هستند. کاهش مقدار لیگاند مورد استفاده به دلیل حلالیت کم بسیار اهمیت داشت. مقدار ۴۰۰ میکروگرم برای رسیدن به بهره نشان‌دارسازی بالای ۹۸ درصد لازم شد. هم‌چنین با تغییرهای pH بیش‌ترین درصد نشان‌دارسازی در pH خنثی حاصل شد.



شکل (۲): کروماتوگرام خلوص رادیوشیمیایی تاکسول نشان‌دار

همان‌طور که در شکل (۳) ملاحظه می‌شود، ترکیب نشان‌دار پایداری قابل ملاحظه‌ای (۶۸/۶۴٪) را تا ۴۸ ساعت از خود نشان داد.



شکل (۵): تصویر دوربین گاما از توزیع تاکسول نشان دار در موش دارای تومور

جهت طراحی یک رادیوداروی تشخیصی مناسب جذب کبدی پایین و دفع سریع از خون اهمیت ویژه ای را دارا است. با توجه به نتایج توزیع بیولوژیکی، در این ترکیب کاهش سریع جذب در کبد با گذشت زمان می تواند مشکل جذب بالا را تحت تأثیر خود قرار دهد. جذب در ناحیه شکمی نیز می تواند به عنوان فاکتور مؤثری در طراحی های بعدی در ادامه تحقیقات در این زمینه تلقی گردد. مطالعه تکمیلی در این زمینه جهت طراحی ترکیب هایی با جذب کبدی کم تر و دفع سریع تر می تواند مفید واقع گردد.

برای یک ترکیب نشان دار رادیواکتیو اگر میزان دفع از بدن سریع باشد آسیب های احتمالی ناشی از پرتوگیری بافت های سالم و هم چنین اطرافیان کاهش می یابد. از نظر دزیمتری مقدار دفع مشاهده شده در نتایج مربوط به اکتیویته مثانه برای یک ترکیب نشان دار مناسب است. علیرغم این، انجام محاسبات دزیمتری جهت تعیین میزان دقیق دز دریافتی اندام های مختلف در مطالعه های آینده ضروری به نظر می رسد.

جذب تومور می تواند دلیلی بر میل ترکیبی تاکسول با هسته سلول های توموری باشد. با توجه به این که در برخی سلول های توموری مقاوم به دارو به واسطه وجود پی گلیکوپروتئین ها می توانند داروی ضد سرطان را از سلول خارج کنند (۳،۱۱) پی بردن به این مقاومت و در نتیجه برنامه ریزی برای تغییر داروی مورد استفاده در روند درمان تومور می تواند توسط تاکسول نشان دار از قبل مشاهده شده و اصلاحات مورد نظر در برنامه درمانی انجام گردد (۱۰).

جذب در کلیه بعد از یک ساعت ۵/۷۸ بوده که این میزان بعد از ۴ ساعت نیز معادل ۴/۴۳ باقی ماند. عدم افزایش جذب در کلیه دفع آهسته کلیوی و کلیرانس آرام برای ترکیب را نشان داد. در صورتی که بتوان به ترکیبی با دفع سریع تر کلیوی دسترسی پیدا کرد می تواند از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد. با دفع کبدی و تخلیه ترکیب نشان دار داخل روده کوچک جذبی معادل ۳/۲۴ پس از ۴ ساعت در این بافت دیده شد. هرچه جذب اکتیویته در ناحیه شکمی کم تر بوده و این ناحیه از اکتیویته زمینه کم تری برخوردار باشد مشاهده و بررسی تومورهای موجود در این مناطق با سهولت بهتری انجام می گردد. برای ترکیب بررسی شده در این تحقیق میزان دفع اکتیویته و تجمع در مثانه پس از ۴ ساعت مقدار ۲۰/۶۶ را نشان داد.

جذب در تومور برای ۲ ساعت پس از تزریق برابر با ۴/۵۱٪ به دست آمد. با گذشت زمان و پس از ۴ ساعت این مقدار به کم تر از یک چهارم تقلیل یافت (۱٪). در تصویربرداری انجام شده برای ترکیب نشان دار در موش با استفاده از دوربین گاما و ۴ ساعت پس از تزریق جذب در تومور و اندام های دفعی دیده شد (شکل ۵).

بحث

تاکسول با ایجاد حالت غیرطبیعی و خوشه ای در میکروتوبول ها طی چرخه سلولی باعث ایجاد اختلال در طی تقسیم میتوز در سلول شده و با جلوگیری از تکثیر سلول باعث مرگ آن می شود (۷،۹،۱۲). اتم های الکترون دهنده ای مانند نیتروژن، اکسیژن و سولفور با پر کردن اربیتال های خالی در تکنسیوم منجر به ایجاد کمپلکس های نشان دار می شوند (۱۵). نتایج به دست آمده از فرایند نشان دار سازی دلالت بر نقش این اتم های الکترون دهنده موجود در ساختار تاکسول در راحتی واکنش با تکنسیوم و ایجاد کمپلکس نشان دار پایدار دارد.

در مطالعه‌ای که تاکسول با رادیونوکلید ایندیوم ۱۱۱ نشان‌دار شده بود میزان جذب در کبد بعد از ۲ ساعت برابر با ۴/۷۰ گزارش شد. جذب کلیه برابر با ۵/۰۱ و جذب در تومور ۰/۸۲ به‌دست آمد (۳). مقایسه موارد فوق با ترکیب ما نشان می‌دهد که جذب کبدی برای ترکیب تهیه شده با تکنسیوم کاهش یافته و در حالی که جذب کلیوی کمابیش ثابت مانده است میزان جذب در تومور افزایش قابل توجهی یافته است. این افزایش جذب در تومور همراه با کاهش جذب در کبد از نقاط قوت ترکیب تهیه شده در مقایسه با مطالعه قبلی است که می‌تواند به یافتن دقیق‌تر تومور به‌عنوان یک ترکیب تصویربرداری تشخیصی کمک کند.

در مطالعه‌ای دیگر تاکسول با تکنسیوم از طریق احیاء‌کننده سدیم بوروهیدراید نشان‌دار گردیده است (۱۶). در این مطالعه جذب بالای کبدی برای ترکیب نشان‌دار گزارش شده است که با استفاده از تاکسول غیر نشان‌دار این جذب کاهش یافته است. در مقایسه با روش نشان‌دار سازی با استفاده از کلرور قلع که در مطالعه حاضر استفاده شده بهبود جذب کلیوی بدون استفاده از تاکسول غیر نشان‌دار دیده می‌شود که می‌تواند به‌علت شرایط نشان‌دارسازی انجام شده به‌خصوص در pH اسیدی مورد استفاده شده در مقایسه با pH قلیایی مربوط به سدیم بوروهیدراید باشد.

نتیجه‌گیری

ترکیب تاکسول نشان‌دار با بازده نشان‌دارسازی بالا (۹۳/۰۱٪) با استفاده از احیاء تکنسیوم تهیه شد. این ترکیب پایداری آزمایشگاهی بالایی در دمای اتاق داشت. هم‌چنین در سرم انسانی و دمای ۳۷ درجه پایداری ترکیب حفظ شد. در بررسی توزیع بیولوژیکی ترکیب بر روی موش جذب بالا در اندام‌های دفعی و تومور نشان داده شد. با در نظر گرفتن نتایج به‌دست آمده امکان استفاده از این ترکیب نشان‌دار جهت بررسی‌های درمانی در مطالعه‌های آینده وجود دارد.

سپاسگزاری

از همکاران محترم در پژوهشکده کاربرد پرتوها در راستای کمک به انجام هرچه بهتر این تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Alberto R, Schibli R, Egli AP, Schubiger A. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc.* 1998; 120:7987-88.
2. Briskin DP. Medicinal plants and phytomedicines. *Plant Physiol.* 2000; 124:507-14.
3. Chun LiC, Yu Df, Inoue T, Yang DJ, Tansey W, Liu CW, Milas L, Hunter NR, Kim EE, Wallace S. Synthesis, biodistribution and imaging properties of indium-111-DTPA-paclitaxel in mice bearing mammary tumors. *J Nucl Med.* 1997; 38:1042-47.
4. Erfani M, Shamsaei M, Mohammadbaghery F, Shirmardi SP. Synthesis and evaluation of a ^{99m}Tc -labeled tubulin-binding agent for tumor imaging. *J Label Compd Radiopharm.* 2014; 57:419-24.
5. Kurdziel K, Kiesewetter DO, Carson RE, Eckelman WC, Herscovitch P. Biodistribution, Radiation Dose Estimates, and In Vivo Pgp Modulation Studies of ^{18}F -Paclitaxel in Nonhuman Primates, *J Nucl Med.* 2003; 44:1330-39.
6. Levchenko A. Evaluation of ^{11}C -Colchicine for PET Imaging of Multiple Drug Resistance, *J Nucl Med.* 2000; 41:493-501.
7. Melendez-Alafort L, Riondato M, Nadalli A, Banzato A, Camporese D, Boccaccio P. Bioavailability of ^{99m}Tc -Ha-paclitaxel complex $[^{99m}\text{Tc}\text{-ONCOFID-P}]$ in mice using four different administration routes. *J Label Compd Radiopharm.* 2006; 49:939-50.
8. Mease RC, Lambert C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m, *Seminars in Nuclear Medicine.* 2001; 4:278-85.
9. Orr G, Verdier-Pinard P, McDaid H, Band Horwitz S. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene.* 2003; 22:7280-95.
10. Shih CM, Shiau YC, Wang JJ, Kao A. Using technetium-99m tetrofosmin chest imaging to predict taxol-based chemotherapy response in non-small cell lung cancer but not related to lung resistance protein expression. *Lung.* 2003; 181(2):103-11.
11. Saeiki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. P-glycoprotein-mediated transcellular transport of MDR-reversing agents. *FEBS Lett.* 1993; 324:99-102.
12. Sadeghi-aliabadi H, Asghari G, Mostafavi SA, Esmaeili A. Solvent optimization on Taxol extraction from *Taxus baccata* L., using HPLC and LC-MS. *DARU.* 2009; 3(17):192-98.
13. Satpati D, Korde A, Deb Sarma H, Banerjee S. Radiosynthesis and biological evaluation of ^{68}Ga -labeled colchicine conjugates. *Cancer Biother Radiopharm.* 2014; 29(6):251-56.
14. Satpati D, Korde A, Kothari K, Sarma HD, Venkatesh M, Banerjee S. Preparation and *in-vivo* evaluation of $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ -colchicine complex for use as tumor-targeting agent. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008; 23(6):741-48.
15. Spradau TW, Katzenellenbogen JA. Preparation of cyclopentadienyl tricarbonylrhenium complexes using a double ligand transfer reaction. *Organometallics.* 1998; 17:2009-17.
16. Banerjee I, Behera A, De K, Chattopadhyay S, Sachdev SS, Sarkar B, Ganguly S, Misra M. Synthesis, characterization, biodistribution and scintigraphy of ^{99m}Tc -paclitaxel: a potential tracer of paclitaxel. *J Radioanal Nucl Chem.* 2015; 304(2):633-43.