

## بررسی امکان تهیه رادیودارویی جدید برای تشخیص بافت‌های کم‌اکسیژن

نیما رستم‌پور<sup>۱\*</sup>، امیررضا جلیلیان<sup>۲</sup>، محمدباقر توکلی<sup>۳</sup>، کمال الدین شافعی<sup>۲</sup>، محسن کمالی دهقان<sup>۲</sup>، مهدی اخلاقی<sup>۲</sup>، کریم قاضی خانلو ثانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی همدان، همدان، ایران  
<sup>۲</sup> پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی ایران، کرج  
<sup>۳</sup> گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران  
<sup>۴</sup> گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشکده علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

### چکیده

سابقه و هدف: ایجاد بافت کم‌اکسیژن از مهم‌ترین پدیده‌هایی است که هنگام سکت‌های قلبی و مغزی و یا سرطان‌ها اتفاق می‌افتد. سلول‌های کم‌اکسیژن موجود در یک تومور از علل اصلی مقاومت نسبت به رادیوتراپی و شیمی‌درمانی می‌باشند. دی استیل بیس (۴-N - متیل تیوسمی‌کاربازون) یا ATSM یکی از موادی است که در تصویربرداری از بافت‌های کم‌اکسیژن به کار می‌رود. روش بررسی: این تحقیق در دو مرحله انجام پذیرفت. در مرحله اول تحقیق، به روش اکتشافی، مس-۶۱، از برخورد پروتون‌های ۲۲ MeV با روی طبیعی تولید شد. سپس ماده ATSM به فرم قابل نشان‌دارسازی تهیه گردید و نشان‌دارسازی نیز انجام گردید تا ترکیب  $[^1Cu]$  - دی استیل بیس (۴-N - متیل تیوسمی‌کاربازون) ساخته شود. در مرحله دوم تحقیق، به روش تجربی آزمایش‌های کنترل‌کیفی جهت ارزیابی آن به عنوان یک رادیودارو صورت گرفت. هم‌زمان با تصویربرداری، پراکنش زیستی رادیودارو در موش‌های سوری سالم و مبتلا به فیبروسارکوما از طریق کشتار و دزیمتری از بافت‌ها، بررسی گردید. یافته‌ها: آزمایش‌های کنترل‌کیفی RTLC و HPLC، خلوص رادیونوکلئیدی، رادیوشیمیایی و شیمیایی بیش از ۹۹ درصد رادیودارو را نشان دادند. در بررسی پراکنش زیستی رادیوداروی ATSM- $[^1Cu]$ ، علاوه بر تصویربرداری، نسبت هدف به غیرهدف معنی‌داری نیز مشاهده شد. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد روش مورد استفاده در این تحقیق برای تولید و جداسازی شیمیایی  $^1Cu$ ، ساده و مقرون به صرفه باشد و رادیوداروی ATSM- $[^1Cu]$  تهیه شده در این مطالعه، دارای خلوص بالایی بوده و در تومور تجمع مناسبی داشت که می‌تواند برای تصویربرداری از تومورهای کم‌اکسیژن با استفاده از PET به کار رود. واژگان کلیدی: رادیودارو، کم‌اکسیژن، PET،  $^1Cu$ ، فیبروسارکوما.

### مقدمه

مهمی از عملکرد اعضای بدن کسب نمود که در تصمیم‌گیری برای درمان یا ادامه درمان بسیار حائز اهمیت خواهد بود (۱). ابزارهای تصویربرداری بسیار حساس مانند MRI (Magnetic Resonance Imaging) و CT (Computed Tomography)، قادرند ناهنجاری‌های کوچک (در حد ۲-۴ mm یعنی ۵۰۰,۰۰۰ سلول!) را نشان دهند. با این وجود، این روش‌ها قادر به شناسایی بدخیمی‌ها در مراحل اولیه (در ابعاد سلولی) نیستند. از این رو،

استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها در پزشکی هسته‌ای، با توجه به خواص پرتوایی، نوع رادیونوکلئید و پرتو گامای ساطع‌شده از آن‌ها می‌باشد. در تصویربرداری توسط دوربین‌های گاما می‌توان اطلاعات

آدرس نویسنده مسئول: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی،

نیما رستم‌پور (e-mail: rostampour@umsha.ac.ir)

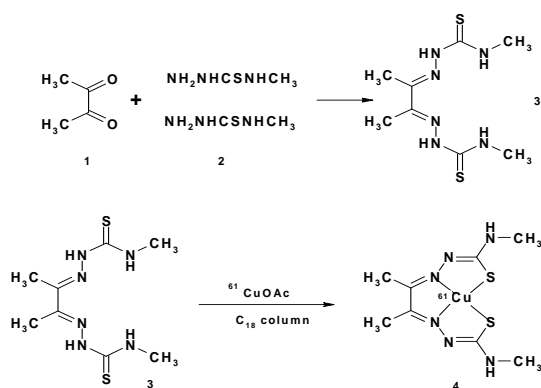
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱/۱۸

## مواد و روشها

تحقیق در دو مرحله انجام پذیرفت. مرحله اول تحقیق به روش اکتشافی به منظور بررسی امکان تهیه رادیودارویی جدید و در مرحله دوم برای تشخیص بافت کم‌اکسیژن به روش تجربی انجام گرفت.

ماده دی‌استیل بیس - (N-۴) - متیل تیوسمی کاربازون) یا به اختصار ATSM مطابق روش کلی تهیه ترکیبات تیوسمی کاربازون که اولین بار توسط Gingras و همکارانش در سال ۱۹۶۲ ابداع گردید، تهیه شد (۲۵). با استفاده از روند نشان داده شده در شکل ۱، پس از تهیه لیگاند ATSM، ساختار مولکولی آن توسط روش‌های طیف‌نگاری جرمی و HNMR به دقت تعیین گردید.



شکل ۱- شمایی از روش تولید ATSM

به منظور تهیه  $[^{61}\text{Cu}]$  - دی استیل بیس - (N-۴) - متیل تیوسمی کاربازون ( $[^{61}\text{Cu}]$ -ATSM)،  $\text{CuCl}_2$  که فرم اسیدی مس است، به وسیله گاز نیتروژن خشک شد تا اسید آن تبخیر شود، زیرا وجود اسید باعث اختلال در کروماتوگرافی می‌گردد. بعد از تبخیر شدن اسید، ۰/۵ میلی لیتر استات سدیم سه مولار به آن اضافه گردید و استات مس حاصل شد. سپس ۱ میلی گرم از ATSM تهیه شده، در ۱ میلی لیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید) حل و ۵۰ میکرولیتر از آن با ۴/۲۴ mCi استات مس ترکیب گردید. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد و هر ۱۰ دقیقه یک بار به مدت ۱ دقیقه روی هم‌زن (Shaker) قرار گرفت و سپس از آن RTLC (Radio Thin Layer Chromatography) به عمل آمد. در RTLC از اتیل استات و سلیکاژل، به ترتیب به عنوان فاز متحرک و فاز ثابت استفاده شد.

توجه به تصویربرداری مولکولی (Molecular Imaging) و پزشکی هسته‌ای، بیشتر مدنظر قرار گرفته است (۲).

درمان سرطان یکی از مهم‌ترین معضلات حاضر در پزشکی است و ارائه و به کارگیری شیوه مناسب درمان، مرهون درک درستی از نحوه کارکرد، وضعیت فیزیوپاتولوژیک تومور و وضعیت خون‌رسانی آن می‌باشد. سلول‌های کم‌اکسیژن موجود در یک تومور از علل اصلی مقاومت نسبت به رادیوتراپی (۳-۶) و شیمی‌درمانی می‌باشند (۷-۱۰). به خاطر اثر مهم کم‌اکسیژنی بر رفتار تومور و نتیجه آن روی بیمار، مطالعه تومورهای کم‌اکسیژن به عنوان روشی برای پیش‌بینی پاسخ تومور، رو به افزایش است. روش‌های تشخیصی غیرتهاجمی و تعیین خاصیت تومورهای کم‌اکسیژن با استفاده از PET، در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۱، ۱۲). با توجه به افزایش تعداد بیماران مبتلا به بدخیمی‌ها، بیماری‌های درگیر با بافت‌های کم‌اکسیژن مانند سرطان‌ها، سکنه قلبی و یا مغزی، لزوم تحقیق و تهیه رادیوداروها جهت تشخیص بافت کم‌اکسیژن به شدت احساس می‌شود (۱۳، ۱۴).

از رادیویزوتوپ‌های مورد توجه در تحقیقات نوین پزشکی هسته‌ای، مس-۶۱ است که به دلیل نیمه عمر مناسب و سهولت تولید، یکی از بهترین گزینه‌ها برای تهیه مولکول‌های نشان‌دار تشخیصی به شمار می‌رود (۱۵-۱۸). در سالیان اخیر با توجه به تولید رادیویزوتوپ مس-۶۱ در کشور (۱۹)، ساخت ترکیبات نشان‌دار آن دارای ارزش فراوانی است (۲۰، ۲۱).

Cu-ATSM یک مارکر مناسب برای PET بوده که نقش مهمی را در تشخیص دارا می‌باشد (۲۲، ۲۳). سنتز Cu-ATSM نسبتاً ساده بوده و شامل یک مرحله واکنش بین مس و سوبسترا است (۲۴). Cu-ATSM وزن مولکولی کمی دارد و نفوذپذیری غشای آن بالاست، بنابراین به راحتی می‌تواند از جریان خون به اطراف سلول‌ها منتشر شود (۲۲).

با توجه به تولید مس-۶۱ در کشور (۱۹) و لزوم انجام تحقیقات بیشتر روی رادیوداروهای مس، بر آن شدیم تا ضمن امکان‌سنجی تولید مس-۶۱ به عنوان رادیونوکلیئید پوزیترون‌دهنده و سنتز ماده اولیه ATSM، به تهیه رادیوداروی  $[^{61}\text{Cu}]$ -ATSM پرداخته و چگونگی توزیع آن در موش سالم و مبتلا به تومور فیبروسارکوما (Fibrosarcoma) را نشان دهیم. به این ترتیب، در این تحقیق برای اولین بار کنترل کیفی رادیوداروی  $[^{61}\text{Cu}]$  - دی استیل بیس - (N-۴) - متیل تیوسمی کاربازون) جهت تشخیص بافت کم‌اکسیژن و تعیین پراکنش زیستی آن در موش‌های سوری سالم و مبتلا به فیبروسارکوما انجام شد.

بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM به موش‌های سالم تزریق گردید. شرایط استریل در زمان تزریق نیز تا حد ممکن رعایت شد. پس از انجام تزریق، در مقاطع زمانی ۱-۳ ساعت و هر نیم ساعت یک‌بار، یک دسته از موش‌ها (یک دسته چهارتایی) قربانی و پراکنش‌زیستی رادیودارو در بافت‌های اصلی بررسی گردید. روش کار بدین صورت بود که از هر یک از بافت‌ها توسط آشکارساز HPGe دزیمتری به عمل آمد. در نهایت، درصد وزنی پراکنش‌زیستی رادیودارو در بافت‌ها، برحسب  $\text{ID/gr} / (\text{Injected Dose per Gram})$  تعیین و نمودارهای مربوط به آن‌ها نیز توسط نرم‌افزار اکسل، نسخه ۲۰۰۷، ترسیم شدند.

در مرحله بعد، برای بررسی پراکنش‌زیستی رادیودارو در موش‌های سوری مبتلا به فیبروسارکوما، برای ایجاد موش‌های توموری بر اساس پروتکل سال ۲۰۰۴ (۲۸)، ماده سرطان‌زای ۳-متیل کلانترن به صورت زیر جلدی در ناحیه زیر پوست پشت موش‌های سوری سالم تزریق گردید (۲۶، ۲۹). پس از آن که قطر تومور به حدود ۲-۱ سانتی‌متر رسید و قابل مشاهده بود، به روش بیوپسی، نمونه تومور برای تست پاتولوژی ارسال و از نوع تومور فیبروسارکوما اطمینان حاصل گردید. سپس همانند مرحله قبل، رادیودارو از طریق تزریق درون وریدی به دم موش‌های توموری نیز تزریق و در همان زمان‌ها موش‌ها قربانی و هر یک از بافت‌های نام برده به اضافه تومور (تومورها) وزن شدند و توسط آشکارساز HPGe، از هر یک از آنها دزیمتری به عمل آمد. در پایان، میانگین درصد وزنی پراکنش‌زیستی رادیودارو در بافت‌ها و تومورها، برحسب  $\text{ID/gr} / (\text{Injected Dose per Gram})$  تعیین و نمودارهای مربوط نیز ترسیم شدند و یافته‌ها مورد قضاوت قرار گرفتند.

### یافته‌ها

پس از ۷۶ دقیقه بمباران روی طبیعی توسط پروتون‌های  $^{61}\text{Cu}$  با اکتیویته  $222 \text{ GBq}$  (۲۲ Ci)  $^{61}\text{Cu}$ ، در پایان  $150 \text{ A}$ ، تولید گردید. سپس آزمایش‌های مربوط به کنترل کیفی نیز روی آن انجام گردید. در کنترل رادیونوکلئیدی محصول تولید شده، پرتوهای گامای  $67/41$  (۴۲۳ درصد)،  $282/96$  (۱۲/۲ درصد)،  $373$  (۲/۱۵ درصد)،  $511$  (۱۲۲/۹ درصد)،  $656$  (۱۰/۷۷ درصد) و  $1186$  (۳/۷۵ درصد) کیلو الکترون - ولت مربوط به  $^{61}\text{Cu}$ ، آشکار شدند و در بررسی خلوص شیمیایی محصول نیز با استفاده از روش رنگ‌سنجی، میزان

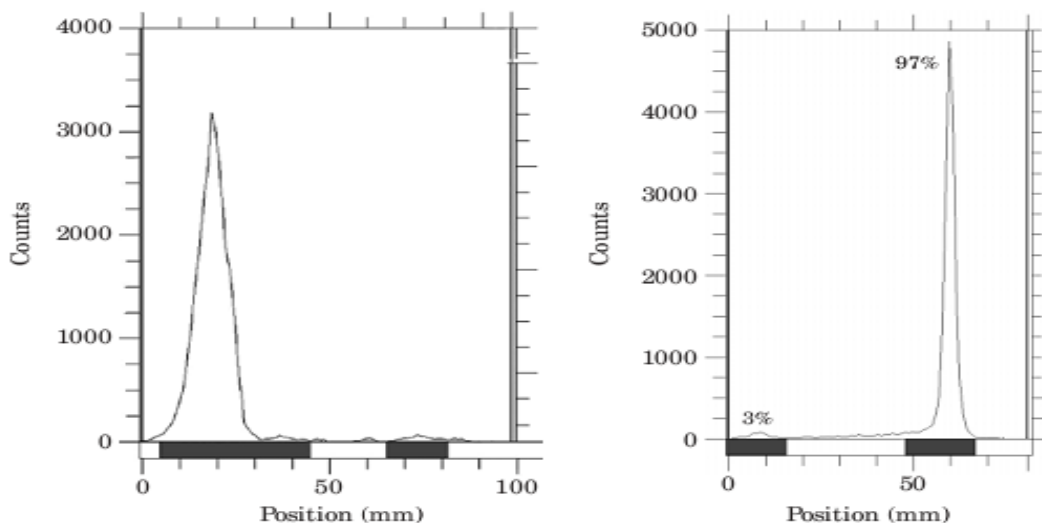
پس از گذشت این مراحل، به سرعت محلول حاصل به داخل ستون یک بار مصرف فاز معکوس (Sep-Pak  $\text{C}_{18}$ ) که از قبل با اتانول و آب مقطر شسته و آماده گردیده بود، تزریق گردید. برای اطمینان از خلوص رادیوشیمیایی آن، آزمایش‌های کنترل کیفی RTLC به همراه HPLC (High Performance Liquid Chromatography) انجام شد (۲۶). این آزمایش‌ها خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشان‌دار  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM حاصل را تایید کردند. پس از عبور ترکیب نشان‌دار از ستون (Sep-Pak  $\text{C}_{18}$ )، ویالی را که حاوی بیشترین اکتیویته بود، با اضافه کردن نرمال سالین رقیق گردید و سپس برای انجام آزمایش‌های بیولوژیک، محلول نهایی از ستون میلکس (Millex) با منافذ  $0/22$  میکرونی عبور و PH آن را با استات سدیم سه مولار به  $5-7$  رسانده شد.

بررسی پایداری رادیودارو در دمای اتاق مطابق مطالعات انجام شده روی کمپلکس‌های مس صورت گرفت (۲۷). در این روش  $5 \text{ mCi}$  از رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق نگه داشته شد و در طول این مدت، هر نیم ساعت یک‌بار با استفاده از حلال اتیل استات به عنوان فاز متحرک، از آن RTLC به عمل آمد.

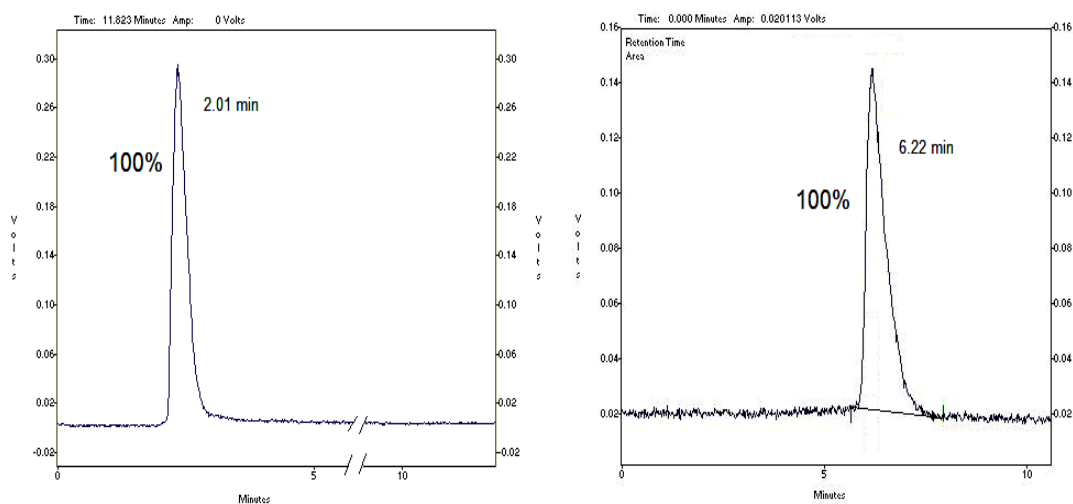
در بررسی پایداری رادیودارو در سرم،  $36/1 \text{ MBq}$  از رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM به  $500$  میکرولیتر سرم خون انسانی تازه تهیه شده اضافه گردید و محلول حاصل به مدت ۵ ساعت در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس در زمان‌های صفر،  $0/5$ ،  $1$ ،  $2$  و  $3$  ساعت، از آن RTLC به عمل آمد.

در بررسی تب‌زایی رادیودارو، قبل از تزریق رادیودارو به موش، از طریق روش LAL (Limulus Ameobocyte Lysate) تب‌زایی نبودن آن اطمینان حاصل شد. در واقع LAL پروتئین نوعی خرچنگ است که اگر در رادیودارو عامل تب‌زایی وجود داشته باشد، در هم‌جواری آن با این پروتئین تبدیل به ژل می‌شود.

جهت بررسی پراکنش‌زیستی رادیودارو در موش‌های سوری سالم، پس از تهیه رادیودارو، انجام آزمایش‌های کنترل کیفی و کسب اطمینان از پایداری آن، بررسی پراکنش‌زیستی رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در موش‌های سوری سالم آغاز شد. چون که قبل از انجام این مرحله، بایستی اطلاعات مربوط به پراکنش‌زیستی کاتیون مس آزاد را داشته باشیم، به همین منظور  $40 \mu\text{Ci}$  از  $^{61}\text{Cu}$  به وسیله سرنگ انسولین و از طریق تزریق درون‌وریدی به موش‌های سالم تزریق شد و پراکنش‌زیستی کاتیون مس آزاد در ارگان‌های حیاتی مورد



نمودار ۱- نمودار RTLC مربوط به  $[^{61}\text{Cu}]\text{CuOAc}$  (چپ) و  $[^{61}\text{Cu}]\text{-ATSM}$  (راست)

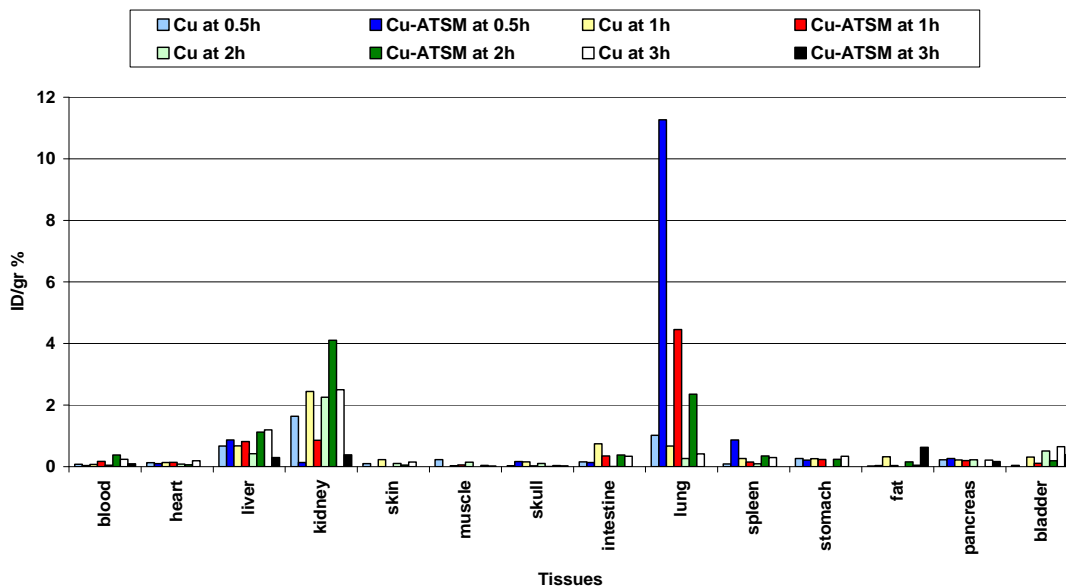


نمودار ۲- نمودار HPLC رادیوداروی  $[^{61}\text{Cu}]\text{-ATSM}$  (راست)، و  $^{61}\text{Cu} \text{ Cu}^{2+}$  (به فرم استات و کلرید، چپ) پس از عبور آن از ستون فاز معکوس به همراه  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  (۱:۱) به عنوان فاز متحرک

در تمام RTLC ها (n = ۹)، نسبت کل پیک‌های  $[\text{Cu}]\text{-ATSM}$  به  $\text{Cu}$  آزاد ثابت بود (۹۸:۲) که نشان دهنده خلوص رادیوشیمیایی بالای ترکیب نشان‌دار شده می‌باشد. بررسی HPLC نشان داد که کاتیون آب‌دوست  $^{61}\text{Cu} \text{ Cu}^{2+}$  پس از ۲/۰۱ دقیقه و ترکیب چربی‌دوست  $[^{61}\text{Cu}]\text{-ATSM}$  پس از ۶/۲۲ دقیقه از ستون کروماتوگرافی شسته شدند. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، نتیجه HPLC بسیار نزدیک به نتیجه RTLC بوده و هر دو موید درصد بالای

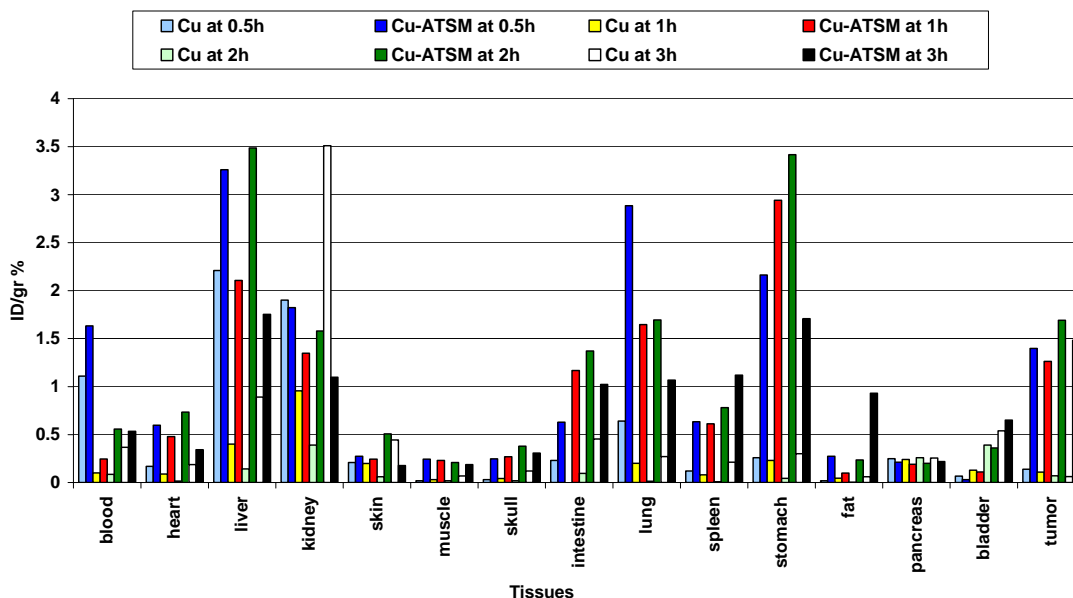
ناخالصی‌های روی و طلا می‌باشد که در محصول به ترتیب کمتر از ۱ ppm و ۰/۹ ppm بودند. در بررسی‌های کروماتوگرافی به روش RTLC، مس آزاد دارای  $R_f$  های کوچک‌تر (۰/۲ - ۰/۱) و ترکیب  $[\text{Cu}]\text{-ATSM}$  دارای  $R_f$  بزرگ‌تر (۰/۹) بودند، طوری که مس آزاد در پایین و ترکیب  $[^{61}\text{Cu}]\text{-ATSM}$  در بالای کاغذ کروماتوگرافی قرار گرفتند.

Biodistribution of <sup>61</sup>Cu & <sup>61</sup>Cu-ATSM in Normal Mice



نمودار ۳- نمودار مقادیر میانگین مربوط به مقایسه پراکنش زیستی <sup>61</sup>Cu آزاد و رادیوداروی <sup>61</sup>Cu-ATSM در موش‌های سوری سالم، در زمان‌های مختلف.

Biodistribution of <sup>61</sup>Cu & <sup>61</sup>Cu-ATSM in Tumoral Mice

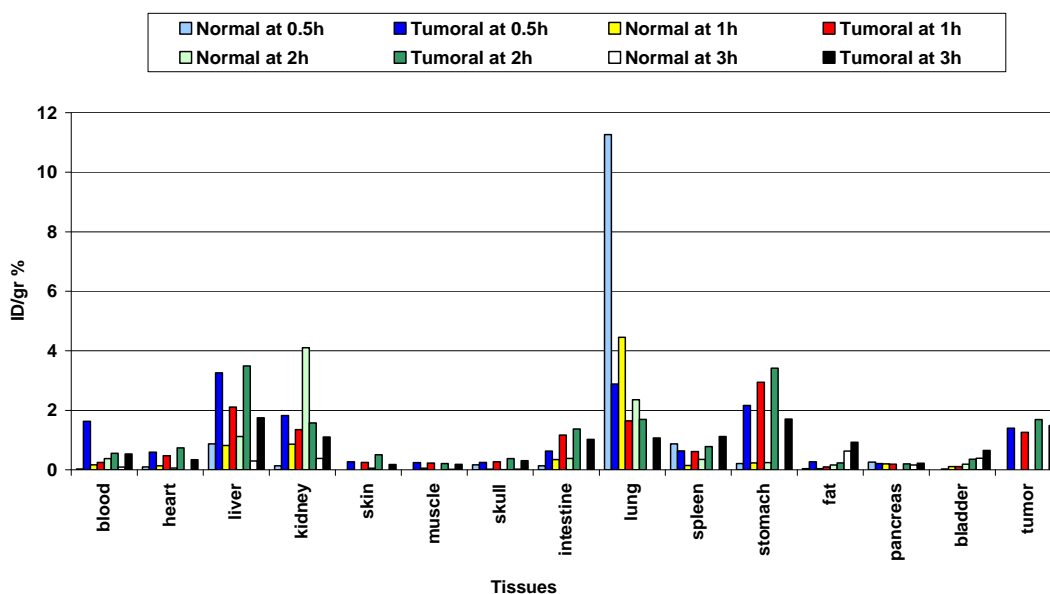


نمودار ۴- مقادیر میانگین مربوط به مقایسه پراکنش زیستی <sup>61</sup>Cu آزاد و رادیوداروی <sup>61</sup>Cu-ATSM در موش‌های سوری توموری، در زمان‌های مختلف.

در بررسی پایداری رادیودارو در دمای اتاق مشاهده گردید که در فاصله زمانی ۱ تا ۵ ساعت، رادیودارو از پایداری مناسبی برخوردار می‌باشد. هم‌چنین پس از هر بار بررسی پایداری رادیوداروی <sup>61</sup>Cu-ATSM در دمای اتاق، ارزیابی پایداری آن در سرم خونی تازه تهیه شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و

نشان‌دارسازی و خلوص رادیوشیمیایی تقریباً ۱۰۰ درصد رادیوداروی <sup>61</sup>Cu-ATSM می‌باشند.

ترکیب نشان‌دار شده نهایی به وسیله نرمال سالین رقیق گردید و سپس به منظور استریلیزاسیون از صافی ۰/۲۲ میکرونی (Millipore, USA) عبور داده شد.

Biodistribution of  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM in Normal & Tumoral Mice

نمودار ۵- مقادیر میانگین مربوط به مقایسه پراکنش زیستی رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در موش‌های سوری سالم و مبتلا به فیبروسارکوما.

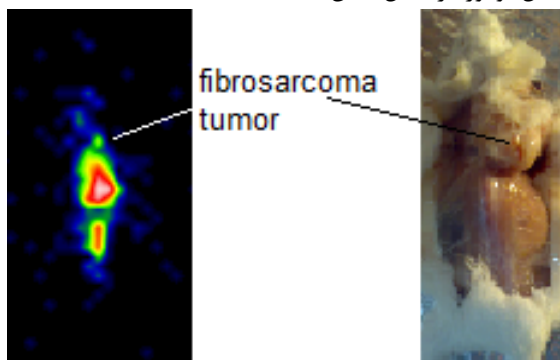
ژرمانیوم فوق خالص و با استفاده از پیک ۲۸۳ keV به دست آمده‌اند.

در جدول ۱، میزان تجمع رادیودارو را یک ساعت پس از تزریق آن در تومور نسبت به عضله و خون ملاحظه می‌کنید. این جدول نشان‌دهنده بهترین نسبت هدف به غیر هدف برای رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM می‌باشد.

جدول ۱- نسبت هدف به غیر هدف، یک ساعت پس از تزریق

زمان (ساعت)	خون / تومور	عضله / تومور
۱	۵/۱۱	۵/۴۸

شکل ۲ نیز مربوط به تجمع رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در تومور فیبروسارکوما، در فاصله ۱ ساعت پس از تزریق می‌باشد. محل تومور در شکل نشان داده شده است.



شکل ۲- تصویر هم‌زمان موش توموری و میزان تجمع رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در تومور، ۱ ساعت پس از تزریق.

در فواصل زمانی مناسب نیز انجام شد و مشاهده گردید که این رادیودارو تا سه ساعت پس از نشان‌داری، از پایداری مناسبی در سرم خون تازه تهیه شده برخوردار می‌باشد. به منظور مقایسه میزان تفاوت پراکنش زیستی  $^{61}\text{Cu}$  آزاد و ترکیب نشان‌دار شده  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM و هم‌چنین بررسی ارگانهای هدف،  $^{61}\text{Cu}$  آزاد محلول در نرمال سالین، با اکتیویته‌ای در حدود ۴۰ میکروکوری، به دو موش سوری سالم تزریق و در بازه‌های زمانی ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ ساعت نحوه پراکنش زیستی آن بررسی شد. میانگین نتایج این بررسی‌ها به صورت نمودار مقایسه‌ای بین  $^{61}\text{Cu}$  آزاد و  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در نمودار ۳ برای ارگان‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت نشان داده شده است. در نمودار ۴ نتایج مربوط به پراکنش زیستی  $^{61}\text{Cu}$  آزاد و رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در موش‌های سوری مبتلا به فیبروسارکوما، در فاصله‌های زمانی ۰/۵ تا ۳ ساعت پس از تزریق درون‌وریدی، مشاهده می‌گردد. این نتایج برحسب متوسط درصد دز تزریق شده در هر گرم بافت می‌باشند.

در نمودار ۵ نیز، میانگین نتایج مربوط به چگونگی پراکنش زیستی رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM، در موش‌های سوری سالم و مبتلا به فیبروسارکوما، در فاصله‌های زمانی ۰/۵ تا ۳ ساعت پس از تزریق درون‌وریدی، نمایش داده شده است. این نتایج نیز برحسب متوسط درصد دز تزریق شده در هر گرم بافت می‌باشند. لازم به ذکر است که کلیه مقادیر، شمارشی است که به وسیله دستگاه

## بحث

تحقیقات نشان داد که پرتوهای گامای  $^{67}\text{Cu}$  (۴/۲۳ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۲۸۲/۹۶ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۱۲/۲ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۳۷۳ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۲/۱۵ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۵۱۱ درصد)،  $^{67}\text{Cu}$  (۳/۷۵ درصد) کیلو الکترون ولت آشکار شده مربوط به  $^{61}\text{Cu}$  می‌باشند (۳۰). این نتایج نشان‌دهنده خلوص رادیونوکلئیدی بیش از ۹۹ درصد است. مابقی اکتیویته نیز ناشی از رادیوایزوتوپ  $^{60}\text{Cu}$  (۰/۲۳ درصد) می‌باشد.

در بررسی خلوص شیمیایی نیز، محصول از نظر وجود عناصر روی و طلا، با استفاده از روش رنگ‌سنجی مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج نشان دادند که میزان طلا و روی موجود در نمونه کمتر از حد استاندارد است.

پس از تهیه ماده اولیه ATSM، ساختار مولکولی آن توسط روش طیف‌نگاری HNMR تایید گردید. در مرحله بعد، عمل نشان‌دارسازی این ترکیب با رادیوایزوتوپ مس-۶۱ صورت گرفت. پس از آماده شدن رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM و عبور آن از ستون فاز معکوس (Sep-Pak C<sub>18</sub>)، آزمایش‌های کنترل کیفی RTLC و HPLC به ترتیب بهره‌نشان‌دارسازی ۹۹ درصد و ۱۰۰ درصد را نشان دادند. بنابراین رادیوداروی حاصل از بهره‌نشان‌دارسازی بسیار بالایی برخوردار است. هم‌چنین، در این مطالعه نشان داده شد که برای انجام TLC می‌توان از سلیکاژل و حلال اتیل استات، به ترتیب به عنوان فاز ثابت و فاز متحرک استفاده کرد که در این صورت ترکیب  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM و  $^{61}\text{Cu}$  آزاد، به ترتیب در بالا و پایین کاغذ کروماتوگرافی (سلیکاژل) قرار می‌گیرند.

این تحقیق همچنان نشان داد که می‌توان پراکنش‌های زیستی  $^{61}\text{Cu}$  آزاد و رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM را در موش‌های سوری سالم و مبتلا به فیبروسارکوما، با هم مقایسه کرد (نمودارهای ۳ و ۴). علت تجمع مس آزاد در کبد این است که، این ارگان از طریق سرولوپلاسمین سرمی، به عنوان منبع ذخیره بسیاری از فلزات، به خصوص مس، عمل می‌کند. تجمع مس آزاد در دستگاه گوارش، در یک ساعت اول نیز مربوط به دفع صفراوی آن از کبد به دستگاه گوارش می‌باشد که میزان آن پس از دو ساعت قابل توجه نمی‌باشد. قسمت زیادی از مس آزاد توسط کلیه‌ها شسته شده و در پی آن به علت قابلیت حل شدن بالای کاتیون‌ها در آب، از طریق سیستم ادراری دفع می‌شود. در بقیه بافت‌ها، میزان تجمع مس آزاد قابل ملاحظه نمی‌باشد.

به علت خاصیت چربی‌دوستی رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM، این ترکیب به سرعت از جریان خون شسته شده و به راحتی

به داخل غشای دو لایه فسفولیپیدی سلول‌ها نفوذ می‌کند. در موش‌های سالم میزان جذب رادیودارو در کبد اندک است که این امر مانند بیشتر ترکیبات "نیوسمی‌کاربازون‌ها-Cu" طبیعی به نظر می‌رسد (۲۵). این رادیودارو به طور قابل ملاحظه‌ای در ریه موش‌های سالم تجمع پیدا کرد، زیرا با توجه به این که ریه به عنوان یک ارگان متابولیک شناخته می‌شود، وجود احیاکننده‌های مختلف، به ویژه شبکه متالوپروتئینازها در بافت ریه، باعث احیای  $\text{Cu}^{2+}$  به  $\text{Cu}^{1+}$  شده و در نتیجه ترکیب رادیودارو به شکل  $\text{Cu(I)ATSM}^-$  باردار در می‌آید که دیگر قادر به عبور از غشای دو لایه فسفولیپیدی سلول‌ها نمی‌باشد (۳۱) و در ریه تجمع پیدا می‌کند.

در موش‌های توموری نیز، جذب بالای رادیودارو در کبد، معده و روده، مطابق مدل دفع صفراوی رادیودارو از کبد به دستگاه گوارش می‌باشد. جذب در ریه نیز مطابق آن چه که در مورد موش‌های سالم ذکر شد، است. جذب تومور در همه زمان‌ها بالا و تقریباً ثابت می‌باشد. به علت این که همه قسمت‌های یک تومور لزوماً کم‌اکسیژن نمی‌باشند و از آن جایی که این رادیودارو باید در این تومور جذب بالایی داشته باشد، تومور به چند لایه تقسیم گردید و در همه نمونه‌ها، بیشترین جذب مربوط به اولین لایه بود که در نمودار ۵ نمایش داده شده است. با گذشت زمان میزان  $^{61}\text{Cu}$  آزاد در بافت چربی تقریباً تغییری نکرده است، ولی بر میزان تجمع  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM افزوده شده است که به علت خاصیت چربی‌دوستی آن می‌باشد. در بافت‌های دیگر مانند قلب، پوست، عضله، استخوان و پانکراس نیز با گذشت زمان تغییری در میزان تجمع مشاهده نمی‌شود. هم‌چنین افزایش تجمع رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM نسبت به  $^{61}\text{Cu}$  آزاد در تومور به وضوح مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده محقق شدن هدف ما می‌باشد. در نمودار ۵، پراکنش‌زیستی رادیوداروی  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM در موش‌های سوری سالم و توموری مشاهده می‌شود.

لین مطالعه نشان داد که بهترین زمان برای تصویرگیری یک تا دو ساعت پس از تزریق می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تجمع رادیودارو در کبد، دستگاه گوارش و تومور، مشاهده می‌شود. بنابراین، بهترین تصاویر را می‌توان در فاصله زمانی ۲-۱ ساعت پس از تزریق درون‌وریدی رادیودارو تهیه نمود.

مناسب‌ترین نسبت هدف به غیر هدف مربوط به زمان یک ساعت پس از تزریق می‌باشد، طوری که در این زمان بیشینه جذب در تومور، با نسبت تومور به خون برابر ۵/۱۱ و تومور به

نتایج این مطالعه نشان داد که  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM یک رادیوداروی اختصاصی، با نیمه‌عمر متوسط، برای تصویربرداری بافت‌های کم‌اکسیژن به وسیله PET می‌باشد و مطالعه ما روی این رادیودارو کیفیت مناسب و رضایت‌بخش آن را به منظور انجام مطالعات انسانی PET در آینده نشان داد.

عضله ۵/۴۸ مشاهده گردید (جدول ۱). بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که این رادیودارو پس از یک ساعت از زمان تزریق درون وریدی، بیشترین جذب را در تومور کم‌اکسیژن خواهد داشت.

## REFERENCES

1. Hasrat A, Vanlier J. A synthesis of radiopharmaceuticals via organotin intermediates. *J Synthesis* 1996; 21: 423-45.
2. Datz FL, Morton KA. New radiopharmaceuticals for detecting infection. *Invest Radiol* 1993; 28: 356-65.
3. Coleman CN. Hypoxia in tumors: a paradigm for the approach to biochemical and physiological heterogeneity. *J Nail Cancer Inst* 1988; 80: 310-17.
4. Peters LJ, Withers HR, Thames HD, Fletcher GH. Tumor radioresistance in clinical radiotherapy. *J Radiol Oncol Biol Phys* 1982; 8: 101-108.
5. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA. Concentration of oxygen dissolved in tissues at time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953; 26: 638-48.
6. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999; 53: 113-17.
7. Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Br J Radiol* 1987; 26: 638-48.
8. Rockwell S. Effect of some proliferative and environmental factors on the toxicity of mitomycin C to tumor cells *in vitro*. *Int J Cancer* 1986; 38: 229-35.
9. Tannock I, Guttman P. Response of Chinese hamster ovary cells to anticancer drugs under aerobic and hypoxic conditions. *Br J Cancer* 1981; 43: 245-48.
10. Hockel M, Knoop C, Schlenger B, Vorndran B, Baussmann E, Mitze M, et al. Intratumoral  $\text{PO}_2$  predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1993; 26: 45-50.
11. Lewis JS, Welch MJ. PET imaging of hypoxia. *J Nucl Med* 2001; 45: 183-88.
12. Rajendran JG, Krohn KA. Imaging hypoxia and angiogenesis in tumors. *Radiol Clin North Am* 2005; 43: 169-87.
13. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349: 1498-504.
14. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
15. McCarthy DW, Bass LA, Cutler PD, Shefer RE, Klinkowstein RE, Herrero P, et al. High purity production and potential applications of  $^{60}\text{Cu}$  and  $^{61}\text{Cu}$ . *Nucl Med Biol* 1999; 26: 351-58.
16. Fukumura T, Okada K, Szelecsényi F, Kovács Z, Suzuki K. Practical production of  $^{61}\text{Cu}$  using natural Co target and its simple purification with a chelating resin for  $^{61}\text{Cu}$ -ATSM. *Radiochim Acta* 2004; 92: 209-14.
17. Szelecsényi F, Suzuki K, Kovács Z, Takei M, Okada K. Production possibility of  $^{60,61,62}\text{Cu}$  radioisotopes by alpha induced reactions on cobalt for PET studies. *Nucl Inst Meth* 2000; 187: 153-63.
18. Muramatsu H, Shirai E, Nakahara H, Murakami Y. Alpha particle bombardment of natural nickel target for the production of  $^{61}\text{Cu}$ . *Int J Appl Radiat Isot* 1978; 29: 611-14.
19. Rowshanfarzad P, Sabet M, Jalilian AR, Kamalidehghan M. An overview of copper radionuclides and production of  $^{61}\text{Cu}$  by proton irradiation of  $^{nat}\text{Zn}$  at a medical cyclotron. *Appl Radi Isot* 2006; 64: 1563-73.
20. Szelecsényi F, Blessing G, Qaim M. Excitation functions of proton induced nuclear reactions on enriched  $^{61}\text{Ni}$  and  $^{64}\text{Ni}$ : possibility of production of no-carrier-added  $^{61}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$  at a small cyclotron. *Int J Appl Radi Isot* 1993; 44: 575-80.
21. Blower PJ, Lewis JS, Zweit J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nucl Med Biol* 1996; 23: 957-80.
22. Dehdashti F, Mintun MA, Lewis JS, Bradley J, Govindan R, Laforest R, et al. *In vivo* assessment of tumor hypoxia in lung cancer with  $^{60}\text{Cu}$ -ATSM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 844-50.



23. Dehdashti F, Grigsby PW, Mintun MA, Lewis JS, Siegel BA, Welch MJ. Assessing tumor hypoxia in cervical cancer by positron emission tomography with  $^{60}\text{Cu}$ -ATSM: relationship to therapeutic response- a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 1233-38.
24. Dearling JL, Lewis JS, Mullen GE, Welch MJ, Blower PJ. Copper bis (thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents: structure-activity relationships. *J Biol Inorg Chem* 2002; 7: 249-59.
25. Gingras BA, Suprunchuk T, Bayley CH. The preparation of some thiosemicarbazones and their copper complexes. *Can J Chem* 1962; 40: 1053-57.
26. Jalilian AR, Rowshanfarzad P, Sabet M, Shafiee A. Preparation of [ $^{61}\text{Cu}$ ]-2-acetylpyridine thiosemicarbazone complex as a possible PET tracer for malignancies. *Appl Radiat Isot* 2006; 64: 337-41.
27. Packard AB, Kronauge JF, Barbarics E, Kiani S, Treves ST. Synthesis and biodistribution of a Lipophilic  $^{64}\text{Cu}$ -labeled monocationic copper(II) complex. *Nucl Med Biol* 2002; 29: 289-94.
28. Pendás AM, Folgueras AR, Llano E, Caterina J, Frerard F, Rodríguez F, et al. Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5304-13.
29. Jalilian AR, Rowshanfarzad P, Yari Kermani Y, Shafaii K. Production and tumour uptake of [ $^{64}\text{Cu}$ ] Pyruvaldehyde-bis ( $\text{N}^4$ -methylthiosemicarbazone) for PET and/or therapeutic purposes. *Nucl Med Rev* 2007; 10: 6-11.
30. Firestone RB, Shirley VS, Baglin CM, Zipkin J. Table of isotopes (CDROM). Version 1.0. 8<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Interscience; 1996.
31. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 2007; 87: 69-98.