

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 پیمان 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 به‌عنوان 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 به‌منظور ارزیابی محل تومور و میزان مقاومت تومور به دارو است.

مواد و روش‌ها: تاکسول با تکنسیوم به‌روش 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 (۶۸/۶۴٪) 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 به‌عنوان ارگان متابولیزه‌کننده و دفع‌کننده 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. به‌طور کلی بر اساس یافته‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که ترکیب دارای قدرت اتصال به تومور بوده و با وجود دفع کبدی صفاوی قابلیت استفاده به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 به‌دلیل 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 اقتصادی‌تر و هم‌چنین رایج‌تر است (۵،۶،۱۳). در میان این رادیونوکلیدها، تکنسیوم ۹۹م به‌دلیل مشخصه‌های ویژه‌اش

تاکسول یک آلكالوئید گیاهی است که از درخت سرخ‌دار تهیه می‌شود و به‌عنوان 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: ۱۳۹۶/۵/۱۰

درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از خنک شدن ویال خلوص رادیوشیمیایی ترکیب تاکسول نشان‌دار شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بررسی شد.

پایداری

پایداری آزمایشگاهی ترکیب نشان‌دار شده در سالین و سرم انسانی به مدت ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین پایداری در سرم انسانی ۲۰ میکرولیتر ترکیب نشان‌دار به ۲۰۰ میکرولیتر از سرم انسانی در یک میکروتیوب منتقل شده و در زمان‌های مختلف مورد بررسی نگهداری شد. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر الکل پروتئین‌های 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 نشان‌دار (۷۸ میکروکوری) به گروه‌های 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 اندام‌های مختلف جدا شده و وزن گردیدند. میزان اکتیویته در بافت‌های مختلف اندازه‌گیری شده و به صورت درصد اکتیویته تزریقی بر هر گرم اندام ($^1\text{ID/g}$) محاسبه گردیدند. همچنین تصویربرداری برای موش با استفاده از دوربین گاما در زمان‌های مختلف انجام شد.

یافته‌ها

نتایج نشان دارسازی و پایداری

اگرچه تعیین ساختار دقیق ایجاد شده نیاز به انجام مطالعه‌ها ساختاری کامل دارد ولیکن ساختار پیشنهادی برای ترکیب نشان‌دار در شکل ۱ آورده شده است.

(نیمه‌عمر مناسب، انرژی مناسب، تولید راحت‌تر) بالغ بر ۸۵ درصد از کاربردهای تشخیصی در حوزه پزشکی هسته‌ای را به خود اختصاص داده است. این رادیونوکلید در فرم‌های مختلف برای نشان‌دارسازی ترکیب‌ها و داروهای مختلف استفاده می‌گردد. یکی از روش‌هایی که دارای کاربرد زیادی است روش نشان‌دارسازی مستقیم است. پیش‌ساز این روش احیاء تکنسیوم به اکسایش‌های پایین‌تر شامل تکنسیوم در حالت اکسایش چهار و پنج 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 (۱،۴،۸،۱۴).

هدف از انجام این تحقیق تهیه تاکسول نشان‌دار شده با تکنسیوم و بررسی آن به‌عنوان یک رادیودارویی که مقاومت دارویی را نشان می‌دهد، است. بازده نشان‌دارسازی، پایداری در سرم انسانی و توزیع بیولوژیکی این ترکیب نشان‌دار در موش‌های حامل تومورهای ملانوما بررسی گردید.

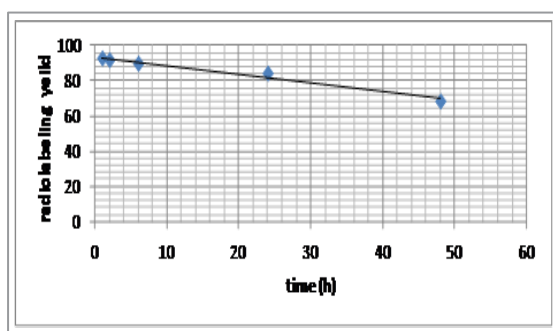
مواد و روش‌ها

تکنسیوم ۱۹۹م به‌صورت سدیم پرتکتات از ژنراتور مولیبدن 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 نشان‌دارسازی ترکیب توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و سیستم حلال‌گردانی شامل تری فلئورو استیک اسید/ آب ۱/۰.۱ (حلال ۱) و استونیتریل (حلال ۲) انجام شد. اندازه‌گیری رادیواکتیویته توسط شمارنده سوسوزن 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.

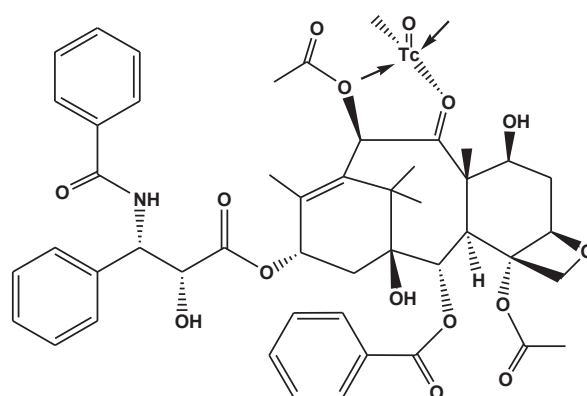
نشان‌دارسازی

برای نشان‌دارسازی ۲۰۰ میکرولیتر الکل (اتانول)، ۵۰۰ میکرولیتر بافر سدیم‌استات با $\text{pH}=7$ ، ۴۰۰ میکروگرم (۶۶ میکرولیتر) تاکسول، ۱۰۰ میکروگرم کلرور قلع دو آب و ۲۰۰ میکرولیتر تاکسول، ۱۹۹م با اکتیویته ۲/۶ میلی‌کوری درون یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵

¹Injection Dose per gram



شکل (۳): میزان پایداری تاکسول نشان دار در زمان های مختلف پس از نشان دارسازی.



شکل (۱): ساختار پیشنهادی تاکسول نشان دار

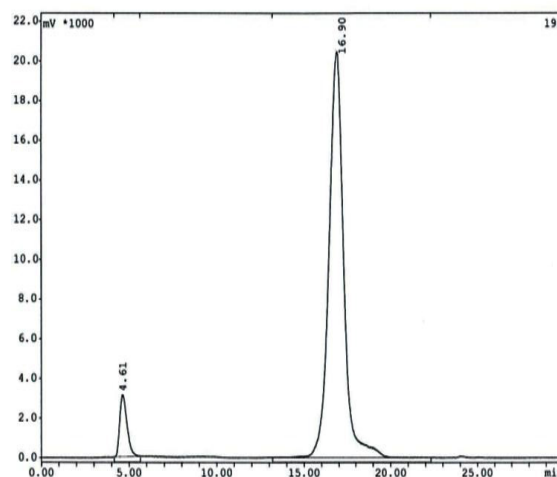
نتایج توزیع بیولوژیکی

میزان جذب ترکیب نشان دار در اندام و بافت های مختلف موش در جدول (۱) دیده می شود. میزان درصد اکتیویته جذب شده در واحد گرم برای کبد در ۱، ۲ و ۴ ساعت بعد از تزریق به ترتیب به ۵/۳۴، ۲/۶۶ و ۱ به دست آمد. این میزان جذب بالای کبدی می تواند نشان دهنده خاصیت چربی دوستی ترکیب نشان دار علاوه بر مسیر متابولیکی ترکیب باشد.

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

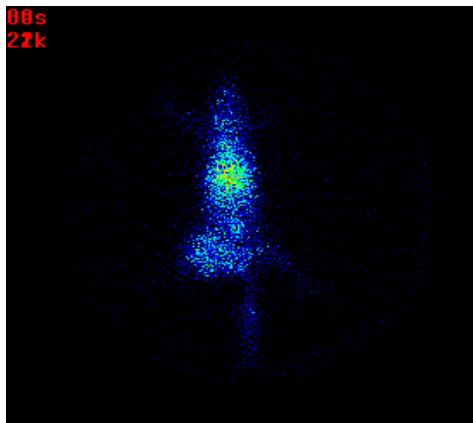
اندام	۱ ساعت	۲ ساعت	۴ ساعت
خون	۵/۶۴	۳/۸۷	۲/۴۸
استخوان	۰/۹۹	۰/۵۹	۰/۳۶
کلیه ها	۵/۷۸	۴/۶۶	۴/۴۳
مغز	۰/۲۷	۰/۰۸۷	۰/۰۹۴
ماهیچه	۰/۸۷	۰/۳۲	۰/۳۱
طحال	۱/۲۸	۱/۰۲	۰/۸۶
تومور	۲/۴۶	۴/۵۱	۱
معدة	۴/۶۹	۴/۴۸	۲/۶۴
روده کوچک	۱/۲۳	۱/۷۸	۳/۲۴
کبد	۵/۳۴	۲/۶۶	۱
ریه	۳	۳/۱۲	۲/۶۹
قلب	۱/۸۹	۱/۳۷	۱/۰۹
تیروئید	۲/۹۰	۰/۹۷	۱/۶۴
مثانه	۳/۶۶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

مقادیر خلوص رادیوشیمیایی تاکسول نشان دار شده توسط HPLC ۹۳/۰۱٪ مشاهده شد (شکل ۲). برای به دست آوردن شرایط نشان دارسازی 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 نشان دارسازی بالای ۹۸ درصد لازم شد. هم چنین با تغییرهای pH بیشترین درصد نشان دارسازی در pH خنثی حاصل شد.



شکل (۲): کروماتوگرام خلوص رادیوشیمیایی تاکسول نشان دار

همان طور که در شکل (۳) ملاحظه می شود، ترکیب نشان دار پایداری قابل ملاحظه ای (۶۸/۶۴٪) را تا ۴۸ ساعت از خود نشان داد.



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

جهت طراحی یک رادیوداروی تشخیصی مناسب جذب کبیدی 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 می‌تواند مشکل جذب بالا را تحت تأثیر خود قرار دهد. جذب در ناحیه شکمی نیز می‌تواند به‌عنوان فاکتور مؤثری در طراحی‌های بعدی در ادامه تحقیقات در این زمینه تلقی گردد. مطالعه تکمیلی در این زمینه جهت طراحی ترکیب‌هایی با جذب کبیدی کم‌تر و دفع سریع‌تر می‌تواند مفید واقع گردد.

برای یک ترکیب نشان‌دار رادیواکتیو اگر میزان دفع از بدن سریع باشد آسیب‌های احتمالی ناشی از پرتوگیری بافت‌های سالم و هم‌چنین اطرافیان کاهش می‌یابد. از نظر دزیمتری مقدار دفع مشاهده شده در نتایج مربوط به اکتیویته مثانه برای یک ترکیب نشان‌دار مناسب است. علیرغم این، انجام محاسبات دزیمتری جهت تعیین میزان دقیق دز دریافتی اندام‌های مختلف در مطالعه‌های آینده ضروری به‌نظر می‌رسد.

جذب تومور می‌تواند دلیلی بر میل ترکیبی تاکسول با هسته سلول‌های توموری باشد. با توجه به این‌که در برخی سلول‌های توموری مقاوم به دارو به‌واسطه وجود پی‌گلیکوپروتئین‌ها می‌توانند داروی ضد سرطان را از سلول خارج کنند (۳،۱۱) پی‌بردن به این مقاومت و در نتیجه برنامه‌ریزی برای تغییر داروی مورد استفاده در روند درمان تومور می‌تواند توسط تاکسول نشان‌دار 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 صورتی‌که بتوان به ترکیبی با دفع سریع‌تر کلیوی دسترسی پیدا کرد می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. با دفع کبیدی و تخلیه ترکیب نشان‌دار داخل روده کوچک جذبی معادل ۳/۲۴ پس از ۴ ساعت در این بافت دیده شد. هرچه جذب اکتیویته در ناحیه شکمی کم‌تر بوده و این ناحیه از اکتیویته زمینه کم‌تری برخوردار باشد مشاهده و بررسی تومورهای موجود در این مناطق با سهولت بهتری انجام می‌گردد. 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 کم‌تر از یک چهارم تقلیل یافت (۱٪). در تصویربرداری انجام شده برای ترکیب نشان‌دار در موش با استفاده از دوربین گاما و ۴ ساعت پس از تزریق جذب در تومور و اندام‌های دفعی دیده شد (شکل ۵).

بحث

تاکسول با ایجاد حالت غیرطبیعی و خوشه‌ای در میکروتوبول‌ها طی چرخه سلولی باعث ایجاد اختلال در طی تقسیم میتوز در سلول شده و با جلوگیری از تکثیر سلول باعث مرگ آن می‌شود (۷،۹،۱۲). اتم‌های الکترون‌دهنده‌ای مانند نیتروژن، اکسیژن و سولفور با پر کردن اربیتال‌های خالی در تکنسیوم منجر به ایجاد کمپلکس‌های نشان‌دار می‌شوند (۱۵). نتایج به دست آمده از فرایند نشان‌دار سازی دلالت بر نقش این اتم‌های الکترون‌دهنده موجود در ساختار تاکسول در راحتی واکنش با تکنسیوم و ایجاد کمپلکس نشان‌دار 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.

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. Saeki 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.