



نشان‌دارسازی و بررسی زیستی کمپلکس‌های نشان‌دار زولدرونیک اسید با ^{153}Sm و ^{175}Yb

ایوب آقائزاد، نسیم وحیدفر، امیررضا جلیلیان*، علی بهرامی سامانی، صدیقه مرادخانی، مصطفی عرفانی
پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۸۳۶-۱۴۳۹۵، تهران - ایران

چکیده: تهیه و تولید عوامل تسکین‌دهنده‌ی درد استخوان برای بیمارانی که در مراحل نهایی سرطان قرار دارند، به طور روز افزونی در حال گسترش است. زولدرونیک اسید [(۱-هیدروکسی-۲-ایمیدازول-۱-یل-فسفونواتیل) فسفونواتیل] فسفریک اسید مونو هیدرات [نشان‌دار شده با ^{153}Sm و ^{175}Yb می‌تواند به عنوان عوامل درمانی بالقوه جهت درمان تسکینی استخوان استفاده شود. در این مطالعه، کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb با استفاده از لیگاند تجاری زولدرونیک اسید، به ترتیب $^{153}\text{SmCl}_3$ و $^{175}\text{YbCl}_3$ در دمای 60°C تهیه شدند. $^{153}\text{SmCl}_3$ و $^{175}\text{YbCl}_3$ از طریق تابش نوترون حرارتی ($4 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) به اکسید فلزی طبیعی به دست آمدند. خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb به روش RTLC و HPLC بررسی گردیدند. مطالعات پایداری در حضور سرم انسانی و تست اتصال به هیدروکسی آپاتیت انجام شدند (بیش از ۹۷٪). مطالعات توزیع بافتی در موش سوری برای کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و $^{153}\text{SmCl}_3$ به مدت ۲ تا ۴۸ ساعت و برای کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb و $^{175}\text{YbCl}_3$ طی ۲ تا ۹۶ ساعت پس از تزریق انجام گردید. بیش‌ترین تجمع در بافت استخوانی برای زولدرونیک اسید- ^{153}Sm حدود ۴٪ بود که ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق به دست آمد. هم‌چنین برای زولدرونیک اسید- ^{175}Yb ، بیش‌ترین مقدار تجمع در بافت استخوانی حدود ۱۰٪ بود که ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق به دست آمد. با بررسی‌های انجام شده برای هر دو کمپلکس، خلوص رادیوشیمیایی بالا و پایداری قابل قبول در حضور سرم انسانی به دست آمد. با این وجود، کمپلکس‌های تهیه شده در این پژوهش به دلیل جذب بیش از حد در کبد که احتمالاً به دلیل شکستن ساختار ترکیبات در بدن و رهاسازی فلز آزاد یا تولید کلوئیدهای ناخواسته برای بررسی‌های انسانی مناسب نمی‌باشند.

کلیدواژه‌ها: زولدرونیک اسید نشان‌دار، ^{153}Sm ، ^{175}Yb ، عامل تسکین‌دهنده‌ی درد استخوان، پراکنش زیستی

Radiolabeling and Biological Evaluation of ^{153}Sm and ^{175}Yb Zoledronic Acid Complexes

A. Aghanejad, N. Vahidfar, A.R. Jalilian*, A. Bahrani-Samani, S. Moradkhani, M. Erfani
Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 14395-836, Tehran - Iran

Abstract: Production of bone pain palliation agents is developing increasingly for handling end-stage cancer patients. ^{153}Sm and ^{175}Yb labelled (1-hydroxy-2-imidazol-1-yl-phosphonoethyl) phosphoric acids can be used in bone pain palliation therapy. In this work, ^{153}Sm and ^{175}Yb labelled zoledronates were prepared using the commercial zoledronate ligand and $^{153}\text{SmCl}_3$ and $^{175}\text{YbCl}_3$ at 60°C , respectively. $^{153}\text{SmCl}_3$ and $^{175}\text{YbCl}_3$ were obtained by thermal neutron irradiation ($4 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) of the natural metal oxide samples. The radiochemical purities were checked by the instant thin layer chromatography (ITLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. The stability studies of the final preparations in the presence of human serum, as well as, hydroxyapatite (HA) binding test were performed (>97%). The biodistribution of ^{153}Sm and ^{153}Sm -zoledronate performed in 2-48 h and for ^{175}Yb and the ^{175}Yb -zoledronate performed in 2-96 h post injection in the Syrian mice. The maximum bone uptake for ^{153}Sm -zoledronate was 4% (48 h), while for ^{175}Yb -zoledronate it was 10% (48 h). The complexes demonstrated satisfactory stability in the presence of human serum and the final formulations. However, the complexes are not appropriate for human studies due to the high liver uptake, possibly due to release of free metal from the complex and/or colloid formation.

Keywords: Radiolabeled zoledronic acid, ^{153}Sm , ^{175}Yb , Bone pain palliation agents, Biodistribution

*email: arjalilian@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۴/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۴/۱۲/۲۲



۱. مقدمه

مناسب است [۷]. بنابراین در تهیه‌ی چندین رادیوداروی استخوانی از قبیل $^{175}\text{Yb-PDTMP}$ ، $^{175}\text{Yb-DTPMP}$ و $^{175}\text{Yb-TTHMP}$ استفاده شده است [۹].

با توجه به مطالب ذکر شده و نیز به دلیل امکان تولید این هسته‌های پرتوزا با استفاده از یک رآکتور، شار متوسط در مقیاس زیاد، پرتوزایی ویژه و خلوص هسته‌ی پرتوزای مناسب، به نظر می‌رسد ^{153}Sm و ^{175}Yb می‌توانند هسته‌های پرتوزای مناسبی برای تشکیل کمپلکس با زولدرونیک اسید به منظور استفاده در رادیوداروهای درمانی باشند. در این پژوهش، کمپلکس‌های زولدرونیک اسید نشان‌دار شده با ^{153}Sm و ^{175}Yb تهیه و مورد ارزیابی‌های پیش بالینی و توزیع زیستی قرار گرفتند.

۲. مواد و روش‌ها

شکل ۱ ساختار شیمیایی لیگاند زولدرونیک اسید را نشان می‌دهد. تولید ^{153}Sm و ^{175}Yb در رآکتور تحقیقاتی تهران از طریق واکنش‌های هسته‌ای $^{153}\text{Sm} (n, \gamma)$ و $^{175}\text{Yb} (n, \gamma)$ انجام شد. در این پژوهش از اکسید ساماریم و اکسید ایتیریم طبیعی بالای تولید شده به وسیله‌ی ISOTEC آمریکا، کاغذ واتمن شماره‌ی ۲ (انگلستان) و زولدرونیک اسید شرکت سیگما آلدریج (انگلستان) استفاده شد. رادیوکروماتوگرافی با کاغذ واتمن وبا استفاده از یک اسکر کروماتوگرافی لایه‌ی نازک، Bioscan AR 2000، ساخت کشور فرانسه انجام شد. شمارش مواد پرتوزا با استفاده از طیف‌سنج گاما و با تنظیم خط پایه در ۳۹۶ keV برای ترکیب‌های حاوی ^{175}Yb و تنظیم خط پایه در ۱۰۳ keV برای ترکیب‌های حاوی ^{153}Sm انجام گرفت. طیف‌سنجی بتا به وسیله‌ی دستگاه سوسوزن مایع Wallac1220 Quantulus انجام شد. تعیین اکتیویته‌ی ویژه با استفاده از دستگاه HPLC^(۱) از نوع SHIMADZU LC-10AT، مجهز به دو سیستم آشکارساز، آنالیزور جریان سوسوزن (Packard-150 TR) و آشکارساز UV/Vis ساخت شرکت SHIMADZ و با استفاده از ستون C-18 با ابعاد ۴/۶mm×۲۵۰mm انجام شد. مطالعات حیوانی مطابق با دستورالعمل انجمن زیستی بریتانیا در استفاده از حیوانات زنده در پژوهش‌های علمی انجام و تمام مقادیر برحسب میانگین و انحراف استاندارد ($\pm SD$ میانگین) بیان شده‌اند.

متاستازهای استخوانی یک پدیده‌ی نسبتاً شایع در مراحل پیشرفته‌ی برخی تومورهای سرطانی از قبیل سرطان‌های سینه، پروستات، ریه، کلیه، تیروئید و ... هستند [۱]. متاستاز به استخوان اغلب در ۷۰٪ بیماران مبتلا به سرطان سینه و نیز در ۴۰٪ از بیماران مبتلا به سرطان پروستات رخ می‌دهد [۲]. زولدرونیک اسید جزء نسل سوم پایه‌ی فسفونات‌های حاوی نیتروژن و یک مهارکننده بازجذب استخوانی استوکلست‌ها به فرمول شیمیایی (۱-هیدروکسی-۲-ایمیدازول-۱-یل-فسفونواتیل) فسفریک اسید مونوهیدرات است که به هیدروکسی آپاتیت متصل می‌شود و در متاستازهای استخوانی انواع مختلفی از سرطان‌ها مطالعه گردیده و نشان داده شده است که این ترکیب در کاهش عوارض اسکلتی [۳] و در درمان هیپرکلسمی [۴] بسیار مؤثر بوده است. هم‌چنین به دلیل تمایل بالا به استخوان، در صورت نشان‌دار شدن با هسته‌های پرتوزای گامادهنده یا بتادهنده می‌تواند به عنوان یک ترکیب بالقوه جهت تشخیص و یا درمان و تسکین درد استخوان به کار رود. زولدرونیک اسید و برخی دیگر از مشتقات پایه‌ی فسفونات‌ها برای تصویربرداری استخوان، با ^{47}Sc [۲] و تکنسیم-۹۹م [۵] نشان‌دار شده‌اند. هم‌چنین در مطالعات انجام شده، از زولدرونیک اسید نشان‌دار شده با ^{177}Lu به عنوان رادیوداروی دارای توان بالقوه به منظور استفاده در درمان تسکینی استخوان یاد شده است [۲، ۶].

با توجه به ویژگی‌های مناسب درمانی ^{153}Sm (نیم-عمر ۴۶ ساعت، گسیل ذرات بتای دارای انرژی‌های بیشینه ۰/۷۱ MeV (۴۹٪)، ۰/۶۴ MeV (۳۰٪) و پرتو گامای ۱۰۳ keV که مناسب برای تصویربرداری توزیع رادیودارو است [۷]) رادیوداروی اتیلن دی آمین تترامتیلن فسفریک اسید نشان‌دار شده با $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ یکی از رادیوداروهای بتادهنده است که از سال ۱۹۹۷ مورد تأیید FDA^(۱) قرار گرفته و وارد بازار شده است [۸]. بنابراین با توجه به خصوصیات ^{153}Sm بر آن شدیم تا رادیوداروی زولدرونیک اسید نشان‌دار شده با ^{153}Sm را تهیه و ویژگی‌های این ترکیب جدید را مطالعه کنیم. از طرف دیگر ^{175}Yb دارای خواص پرتوزایی مناسبی [نیم-عمر ۴/۲ روز، گسیل ذرات بتای دارای انرژی بیشینه ۴۷۰ keV (۸۶/۵٪) است و به دلیل داشتن پرتوهای گاما با انرژی‌های مختلف [۱۱۳ keV (۱/۹٪)، ۲۸۲ keV (۳/۱٪) و ۳۹۶ keV (۶/۵٪)] برای تصویربرداری توزیع رادیودارو نیز



واتمن شماره‌ی ۲ و در محلول ۱۰ میلی مولار DTPA به صورت فاز متحرک بررسی شد.

۳.۳ نشان‌دارسازی زولدرونیک اسید با ^{153}Sm و ^{175}Yb

مقدار ۱۰۰ mg از ترکیب زولدرونیک اسید در یک میلی لیتر از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار حل و با استفاده از اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار pH محلول در pH=۷ تنظیم شد. به دو ویال بوروسیلیکات به طور جداگانه به ترتیب مقدار یک میلی کوری از $^{153}\text{SmCl}_3$ و یک میلی کوری از $^{175}\text{YbCl}_3$ اضافه شد و با استفاده از جریان گاز ازت و در دمای 40°C حلال آن‌ها به طور کامل خارج گردید. سپس به هر یک از ویال‌ها مقدار ۵۰۰ μL از محلول حاوی زولدرونیک اسید با pH=۷ و با غلظت ۵۰ mg/mL اضافه و مخلوط واکنش‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای 60°C به هم زده شد.

۴.۳ کنترل کیفی رادیوداروها

۴.۳.۱ کروماتوگرافی هسته‌ای با لایه‌ی نازک

مقدار ۵ μL نمونه از هر کدام از ویال‌ها را بر روی کاغذ کروماتوگرافی واتمن شماره‌ی ۲، به طور جداگانه لکه گذاری شد و پس از خشک شدن لکه‌ها با استفاده از سیستم حلال آمونیاک (۵۶٪)، متانول (۱۰۰٪) و آب (۱۰۰٪) با نسبت حجمی (۲:۲:۴)، به صورت فاز متحرک جداسازی استفاده شد.

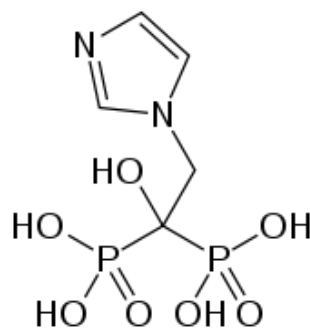
۴.۳.۲ کروماتوگرافی هسته‌ای با کارکرد عالی

مقدار ۵ μL نمونه از هر کدام از ویال‌ها را به سیستم HPLC از نوع SHIMADZU LC-10AT، مجهز به دو سیستم آشکارساز، آنالیزور جریان سوسوزن (Packard-150 TR) و آشکارساز UV/Vis ساخت شرکت SHIMADZU و با استفاده از ستون C-18 با ابعاد ۲۵۰ mm \times ۴/۶ mm جداگانه تزریق و تا ۲۰ دقیقه ثبت گردید.

۵.۳ بررسی پایداری رادیوداروهای زولدرونیک اسید نشان‌دار با

^{153}Sm و ^{175}Yb در حضور سرم انسانی

در ویال‌های جداگانه، مقدار ۱۰۰ μL از رادیوداروهای زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb اضافه



شکل ۱. ساختار شیمیایی لیگاند زولدرونیک اسید.

۳. روش کار

۱.۳ تولید و کنترل کیفی محلول $^{153}\text{SmCl}_3$

^{153}Sm از طریق تابش نوترونی به یک میلی گرم از ترکیب اکسید ساماریم طبیعی به مدت دو روز و در شار نوترونی $5 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [۱۰] تولید شد. سپس هدف تابش دیده در ۱۰۰۰ μL هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار حل و $^{153}\text{SmCl}_3$ حاصل با آب مقطر دوبار تقطیر رقیق و به حجم مناسب رسانده شد. محلول حاصل با استفاده از یک فیلتر زیستی با قطر روزه‌های ۰/۲۲ میکرونی فیلتر شد و در مرحله‌ی نشان‌دارسازی استفاده گردید. خلوص هسته‌ی پرتوزایی برای بررسی حضور سایر عوامل پرتوزا با استفاده از طیف‌سنجی بتا و هم‌چنین طیف‌سنجی گاما با آشکارساز HPGe جهت تشخیص تداخل‌های مختلف بتا و گامای گسیل شده از مواد پرتوزا آزمایش شد. خلوص رادیوشیمیایی $^{153}\text{SmCl}_3$ با استفاده از کاغذ کروماتوگرافی واتمن شماره ۲ و در محلول ۱۰ میلی مولار $^{(3)}\text{DTPA}$ به عنوان فاز متحرک بررسی شد.

۲.۳ تولید و کنترل کیفی محلول $^{175}\text{YbCl}_3$

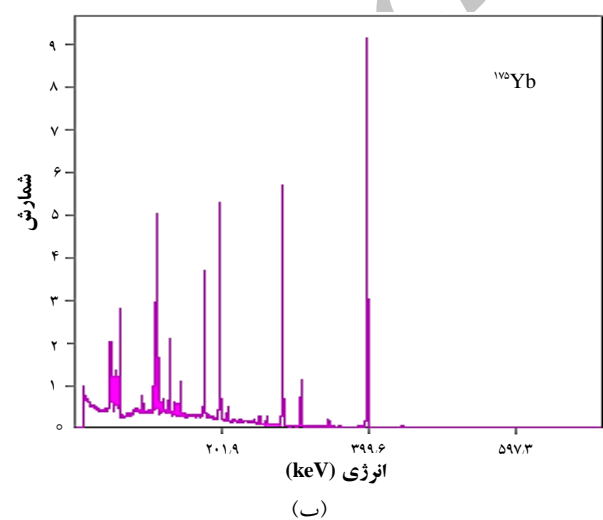
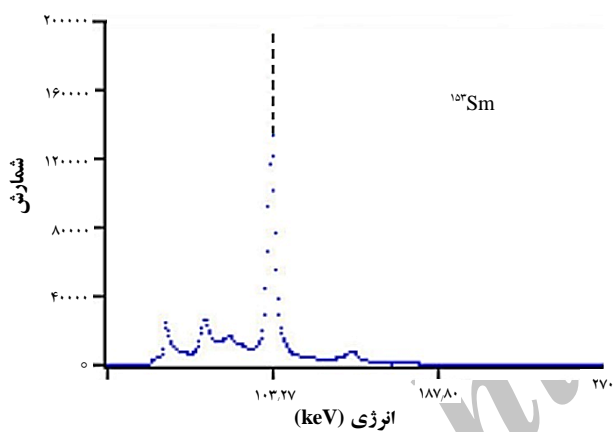
^{175}Y از طریق تابش نوترونی به یک میلی گرم از ترکیب اکسید ایتیریم طبیعی به مدت هفت روز و در شار نوترونی $3 \times 10^{13} \text{ n.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ تولید شد. هدف تابش دیده در ۱۰۰۰ μL هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار حل شد. خلوص هسته‌ی پرتوزایی با استفاده از طیف‌سنجی بتا و هم‌چنین طیف‌سنجی گاما با آشکارساز HPGe^(۴) برای تشخیص تداخل‌های مختلف بتا و گامای ساطع شده از مواد پرتوزا بررسی شدند. خلوص رادیوشیمیایی $^{175}\text{YbCl}_3$ با استفاده از کاغذ کروماتوگرافی

تزریقی در بافت با سوسوزن اشعه‌ی گاما و یا کالیبراتور دژ تعیین شد.

۴. یافته‌ها و بحث

۴.۱ تولید هسته‌های پرتوزا

هسته‌ی پرتوزا ^{153}Sm با پرتوزایی ویژه حدود ۴۵۰ تا ۵۰۰ mCi/mg و هسته‌ی پرتوزایی ^{175}Yb با پرتوزایی ویژه حدود ۳۵ تا ۴۰ mCi/mg برای نشان‌داری استفاده شدند. با شمارش نمونه‌ها توسط آشکارساز HPGe برای ^{153}Sm قله‌ی گامای اصلی (۱۰۳ keV) و برای ^{175}Yb قله‌های گامای (۱۱۳، ۲۸۶، ۲۹۶ keV) مشاهده شد (شکل ۲). طیف ذرات بتای هر کدام از این هسته‌های پرتوزا نشان‌دهنده‌ی خلوص قابل قبول آن‌ها برای انجام نشان‌داری است (شکل ۳).



شکل ۲. طیف گاما با استفاده از آشکارساز HPGe، الف) ^{153}Sm و ب) ^{175}Yb .

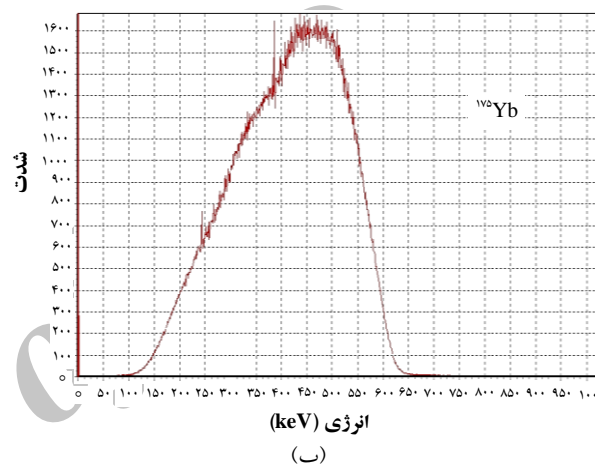
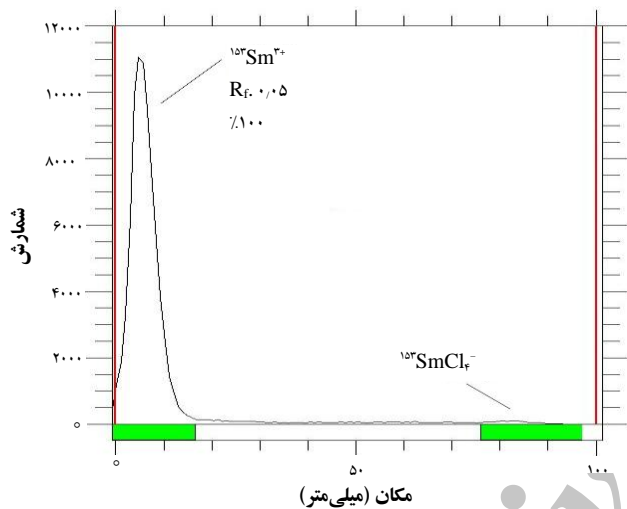
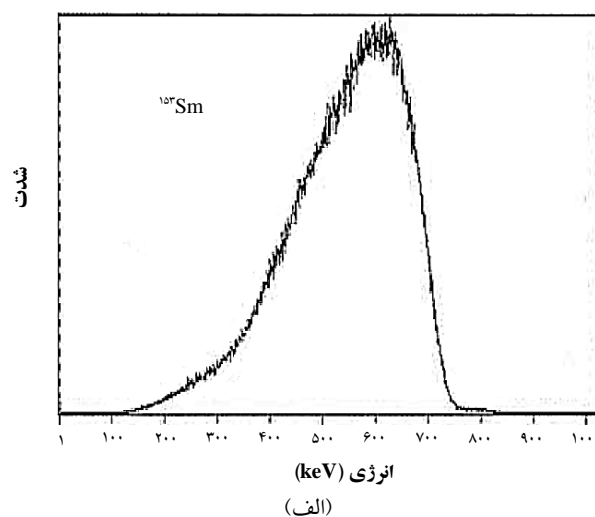
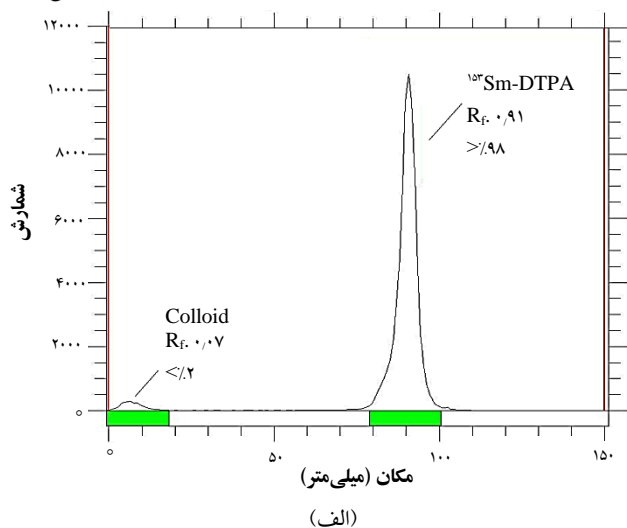
شد. به هر کدام از ویال‌ها مقدار $300\ \mu\text{L}$ سرم انسانی تازه‌ی تهیه شده اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای 37°C به هم زده شد. سپس به هر کدام از ویال‌ها $100\ \mu\text{L}$ محلول ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه و ویال‌ها در $3000\ \text{rpm}$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از جداسازی محلول رویی، بر روی این محلول با سیستم حلال ذکر شده در بالا کروماتوگرافی به عمل آمد.

۶.۳ بررسی اتصال به هیدروکسی آپاتیت

تعیین میزان اتصال هیدروکسی آپاتیت با توجه به روشی که قبلاً شرح داده شده [۱۱] به این صورت انجام شد که به ۵ ویال حاوی مقادیر ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ mg از هیدروکسی آپاتیت جامد، ۲ mL محلول سالین نرمال با $\text{pH}=7.4$ اضافه گردید و مخلوط به مدت یک ساعت به هم زده شد. سپس $50\ \mu\text{L}$ از رادیوداری زولدرونیک اسید- ^{153}Sm به هر کدام از ویال‌ها اضافه و مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق به هم زده شد. پس از این مدت زمان، ویال‌ها سانتریفوژ شده و فاز مایع رویی از فاز جامد جدا شدند و پرتوزایی مقادیر مساوی از مایع رویی از هر کدام از ویال‌ها اندازه‌گیری شد. تمامی این مراحل برای رادیوداری زولدرونیک اسید- ^{175}Yb نیز عیناً انجام شد. درصد اتصال به هیدروکسی آپاتیت (HA) برای هر کدام از رادیوداروها با استفاده از فرمول $\text{HB} = 1 - (A/B) \times 100$ محاسبه شد که در آن A میانگین مقدار پرتوزایی نمونه مایع رویی تحت مطالعه و B میانگین پرتوزایی کل نمونه هستند.

۷.۳ مطالعات توزیع بافتی

توزیع بافتی کاتیون‌های آزاد $^{153}\text{Sm}^{3+}$ و $^{175}\text{Yb}^{3+}$ و هم‌چنین رادیوداروهای زولدرونیک اسید نشان‌دار شده با ^{153}Sm و ^{175}Yb بر روی موش سوری^(۵) انجام شد. مقادیر مساوی ($50\ \mu\text{Ci}$) از هر کدام از ترکیبات پرتوزا از طریق ورید دمی به موش‌ها (تعداد ۴ عدد برای هر ترکیب) تزریق گردید. در مورد ترکیبات تزریقی حاوی ^{153}Sm در فواصل زمانی ۲ تا ۴۸ ساعت و برای ترکیبات تزریقی حاوی ^{175}Yb در فواصل زمانی ۲ تا ۹۶ ساعت، موش‌های مربوط قربانی شده و اندام‌های مشخصی از آن‌ها برداشته شد. هر اندام به صورت جداگانه وزن و درصد دژ



شکل ۳. طیف بتای، الف) ^{153}Sm و ب) ^{175}Yb .

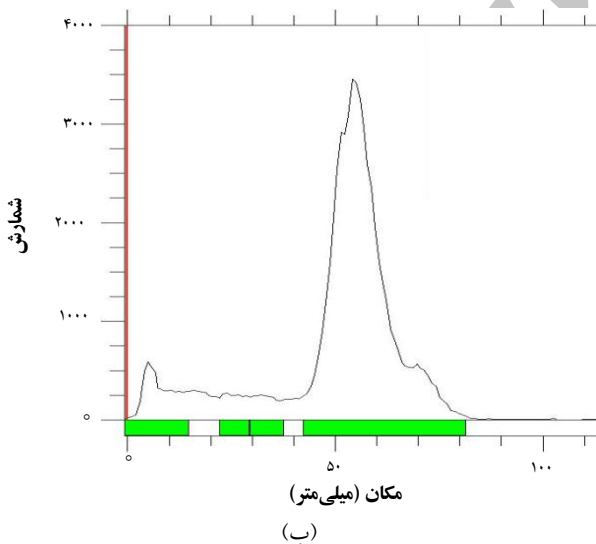
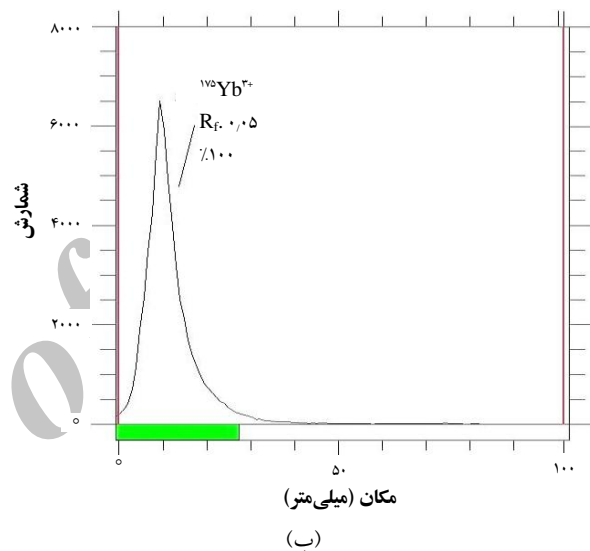
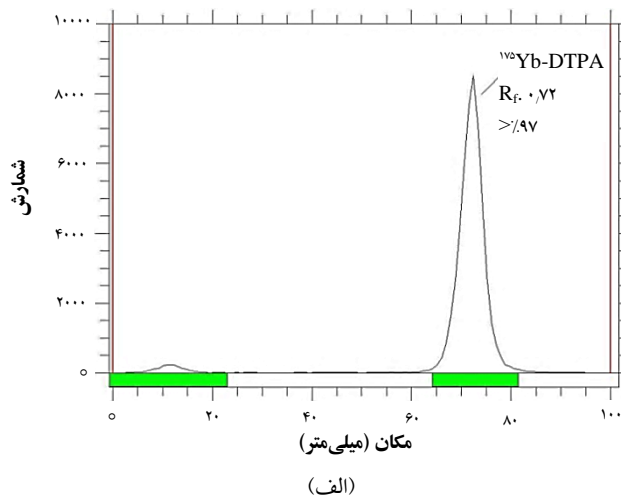
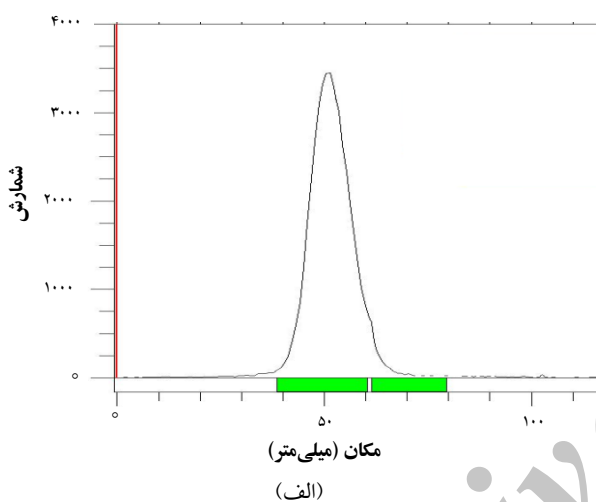
شکل ۴. کروماتوگرام ^{153}Sm آزاد در: الف) سیستم حلال ۱۰ میلی‌مولار DTPA، ب) سیستم حلال آمونیاک: متانول: آب با نسبت (۰٫۲:۲:۴).

^{175}Yb آزاد در سیستم حلال ۱ به صورت کمپلکس چربی دوست $^{175}\text{Yb}(\text{DTPA})^{2-}$ در R_f بالا ظاهر می‌شود (شکل ۵، الف)، در حالی که در سیستم حلال ۲، $^{175}\text{Yb}^{3+}$ در مبدأ و در $R_f=0.05$ ظاهر و در این سیستم حلال، مقدار جزیی ناخالصی به صورت $^{175}\text{YbCl}_4^-$ در R_f بالا مشاهده می‌شود (شکل ۵، ب).

خلوص رادیوشیمیایی هر کدام از هسته‌های پرتوزای ^{153}Sm و ^{175}Yb در دو سیستم حلال مختلف بررسی شدند. در محلول ۱۰ میلی‌مولار DTPA (سیستم حلال ۱)، ^{153}Sm آزاد به صورت ترکیب چربی دوست $^{153}\text{Sm}(\text{DTPA})^{2-}$ درآمده و به R_f بالاتر مهاجرت می‌کند (شکل ۴، الف). بخش پرتوزای کوچک باقی‌مانده در مبدأ را می‌توان به وجود کلویید تشکیل شده نسبت داد.

از سوی دیگر، مخلوط حلال شامل: آمونیاک (۰٫۵۶٪)، متانول (۱۰۰٪) و آب (۱۰۰٪) با نسبت (۰٫۲:۲:۴) (سیستم حلال ۲) نیز برای تعیین درجه‌ی خلوص رادیوشیمیایی گونه‌ی یونی $^{153}\text{Sm}^{3+}$ استفاده و قله‌ی مربوط به آن در مبدأ ($R_f=0.05$) نمایان شد (شکل ۴، ب). مقایسه‌ی قله‌های ناخالصی این رادیوکروماتوگرام‌ها نشان‌دهنده‌ی حضور مقدار جزیی (کم‌تر از ۲٪) ناخالصی کلوییدی می‌باشد.

سرم انسانی در دمای 37°C به مدت ۴۸ ساعت با RTLC و در سیستم حلال ذکر شده بررسی گردید. برای کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm ، درصد اتصال به پروتئین ۴۰٪ بود و در حدود ۶۰٪ از آن به شکل آزاد در سیستم گردش خون حضور داشت، در مورد کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb اتصال به پروتئین در حدود ۵۰٪ بود و بقیه به صورت آزاد در سیستم گردش خون موجود بود. این در حالی است که در منابع مختلف میزان اتصال به پروتئین برای زولدرونیک اسید از ۴۳٪ تا ۷۷٪ گزارش شده است [۱۲] و در بررسی دیگر این میزان اتصال با فلز ^{177}Lu در حدود ۵۷٪ گزارش شده است [۲].



شکل ۵. کروماتوگرام ^{175}Y آزاد در، الف) سیستم حلال ۱۰ میلی مولار DTPA، ب) سیستم حلال شامل آمونیاک، متانول و آب با نسبت (۰٫۲:۲:۴).

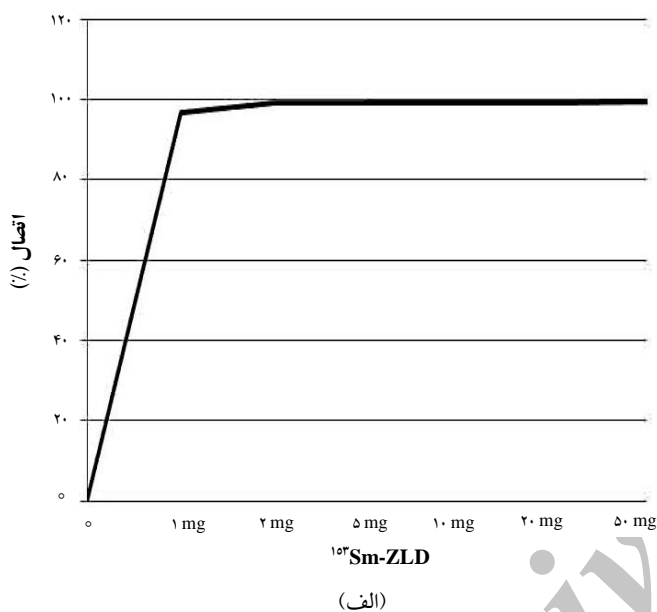
۲.۴ نشان‌داری زولدرونیک اسید

مطالعات RTLC^(۶) با استفاده از سیستم حلال شامل: آمونیاک، متانول و آب با نسبت (۰٫۲:۲:۴)، تولید کمپلکس‌های نشان‌دار را تأیید کردند. قله‌ی مربوط به کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm در $R_f = 0.6-0.7$ و قله‌ی مربوط به کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb در $R_f = 0.7-0.8$ واقع شده بودند (شکل ۶). هم‌چنین خلوص رادیوشیمیایی از طریق روش HPLC خلوص بالاتر از ۹۹٪ ترکیبات را نشان داد که در هر دو مورد کمپلکس در بازه‌ی زمانی ۵ تا ۷ دقیقه از ستون خارج می‌شوند در حالی که فلز آزاد در این سیستم معمولاً در کم‌تر از ۲ دقیقه از ستون خارج می‌گردد (شکل ۷). پایداری کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb تهیه شده، در حضور

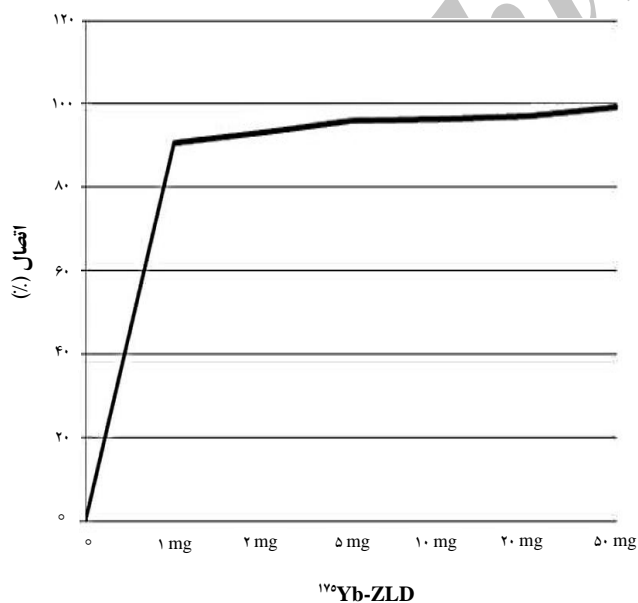
شکل ۶. کروماتوگرام الف) کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm ، ب) کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb در سیستم حلال حاوی آمونیاک، متانول و آب با نسبت (۰٫۲:۲:۴).



مقادیر گزارش شده برای نشان‌دار کردن زولدرونیک اسید با رادیونوکلیدهای ^{177}Lu (۹۸٪) و ^{46}Sc (۸۲٪) است [۲، ۶] و همچنین این مقدار مطابقت خوبی با مقادیر گزارش شده‌ی قبلی برای کمپلکس نشان‌دار هیدروکسی آپاتیت با ^{175}Yb دارد [۱۴]. یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی آن است که کمپلکس‌های زولدرونیک اسید با ^{153}Sm و ^{175}Yb تمایل بالایی به هیدروکسی آپاتیت دارند که جزء اصلی در ساختمان ترکیبات معدنی استخوان می‌باشد (شکل ۸).

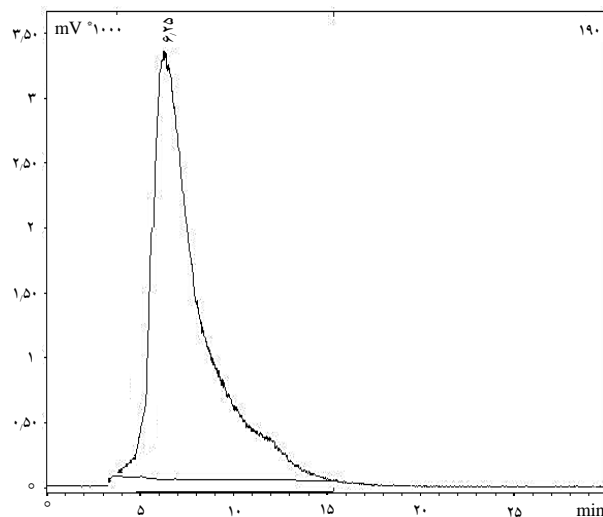


(الف)

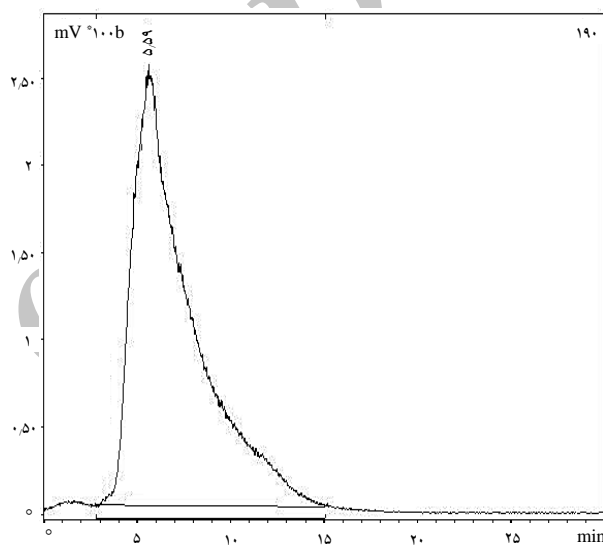


(ب)

شکل ۸. منحنی درصد اتصال به هیدروکسی آپاتیت، الف) کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm ، ب) کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb .



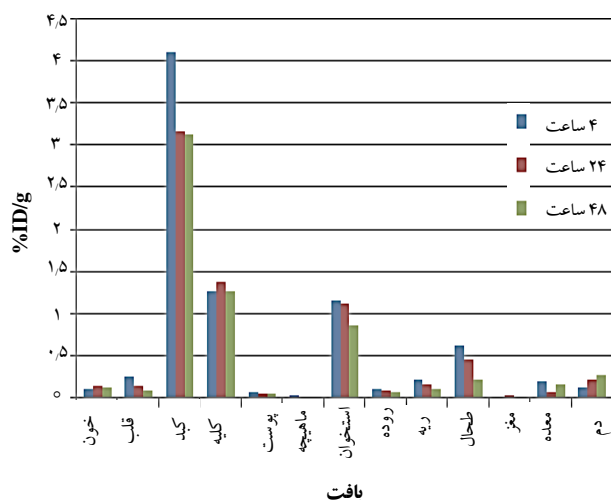
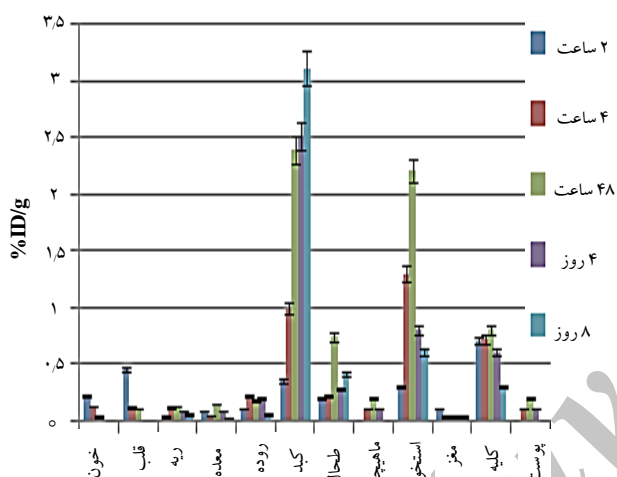
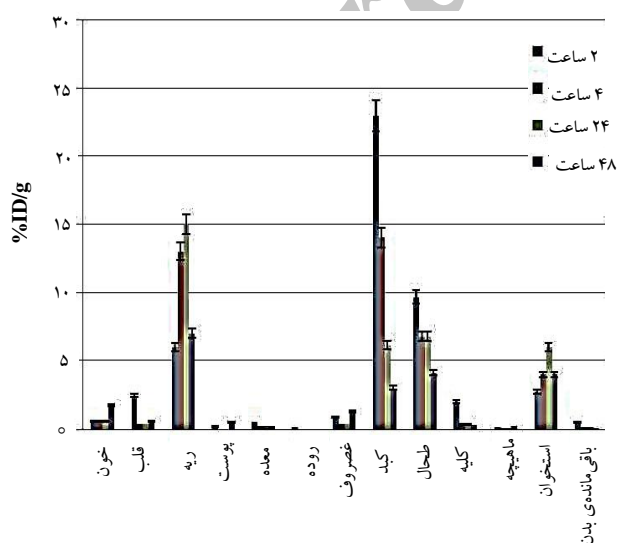
(الف)



(ب)

شکل ۷. کروماتوگرام با کارکرد بالای کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm (الف) و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb (ب) در شرایط حلال شامل آب، استونیتریل و فاز معکوس.

میزان اتصال کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb به هیدروکسی آپاتیت در مقادیر ۱ تا ۲ mg از آن، بیش از ۹۰٪ بود و در مقدار ۵ mg از هیدروکسی آپاتیت این میزان پیوند برای کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm به ۹۹٪ رسید که همگی بیش‌تر از مقادیر گزارش شده برای سایر پایه‌ی فسفونات‌های نشان‌دار شده با ^{153}Sm از جمله پامیدرونات (۶۲٪)، آلدرونات (۴۰٪) و نریدرونات (۴۷٪) است [۱۳]. میزان اتصال به هیدروکسی آپاتیت (۵ mg) برای کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb حدود ۹۷٪ بود که قابل مقایسه با


 شکل ۹. نمودار توزیع بافتی ^{153}Sm آزاد.

 شکل ۱۰. نمودار توزیع بافتی ^{175}Yb آزاد.

 شکل ۱۱. نمودار توزیع بافتی کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{153}Sm .

در مطالعات حیوانی، جذب بافت به صورت درصدی از مساحت زیر قله‌ی طیف مرتبط به ازای هر گرم از بافت (%ID/gr) محاسبه شد (شکل‌های ۹ و ۱۰). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش بر روی ترکیبات نشان‌دار تکنسیم- m^{99} با مشتقات زولدرونیک اسید می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از ترکیب اصلی لیگاند زولدرونیک اسید ممکن است برای نشان‌دارسازی اولیه با رادیولانتانیدها مناسب نباشد. با این حال به دلیل ساختار شیمیایی بسیار متفاوت ترکیبات نشان‌دار تکنسیم (که به دلیل عدم وجود ایزوتوپ پایدار در طبیعت هیچ‌گاه تعیین ساختار آن‌ها ممکن نیست) با کمپلکس‌های فلزات گروه لانتانیدی که دارای ساختار اتمی و آرایش کاملاً متفاوت اربیتال مولکولی هستند، تعمیم نتیجه‌های زیستی سری ترکیبات نشان‌دار تکنسیم با رادیولانتان‌ها به طور کامل مجاز نیست و با توجه به زمینه‌ی مهم رادیوداروهای درمانی درد استخوان، امکان‌سنجی تولید و بررسی زیستی این ترکیبات در نظر گرفته شد.

توزیع بافتی در موش‌های سوری معمولی برای ترکیبات حاوی کاتیون ^{153}Sm به مدت ۲ تا ۴۸ ساعت و برای ترکیبات حاوی کاتیون ^{175}Yb به مدت ۲ تا ۹۶ ساعت پس از تزریق بررسی شد (شکل‌های ۹ و ۱۰). جذب کبدی پرتوزایی در مورد ^{153}Sm تقریباً مشابه مقادیر گزارش شده برای ^{153}Sm و برخی دیگر از رادیولانتانیدها مانند ^{175}Yb [۱۴] و ^{177}Lu [۹] است. جذب کبدی پرتوزایی در مورد کاتیون ^{175}Yb قابل مقایسه با سایر فسفونات‌های نشان‌دار شده با ^{175}Yb است [۹]. محتوای پرتوزایی پایین خون برای هر دو کاتیون ^{153}Sm و ^{175}Yb ، نشان‌دهنده‌ی حذف سریع آن‌ها از گردش خون پس از تزریق است. پوست و عضلات برای هیچ‌کدام از ترکیبات حاوی این دو کاتیون جذب بالایی را نشان ندادند.

در مورد توزیع زیستی ترکیب نشان‌دار زولدرونیک اسید- ^{153}Sm ، همان‌طور که در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود، با آن که جذب استخوان در زمان ۲۴ ساعت به حدود ۵٪ می‌رسد ولی از آن پس کاهش جذب وجود دارد از طرفی جذب بالا در کبد و طحال و ریه نشان‌دهنده‌ی ایجاد موارد ناخواسته‌ای مانند رهاسازی فلز ساماریم و یا تولید کلونیدهای ناخواسته در بدن می‌باشد که جذب سیستم رتیکولاندوتلیال را افزایش داده است.



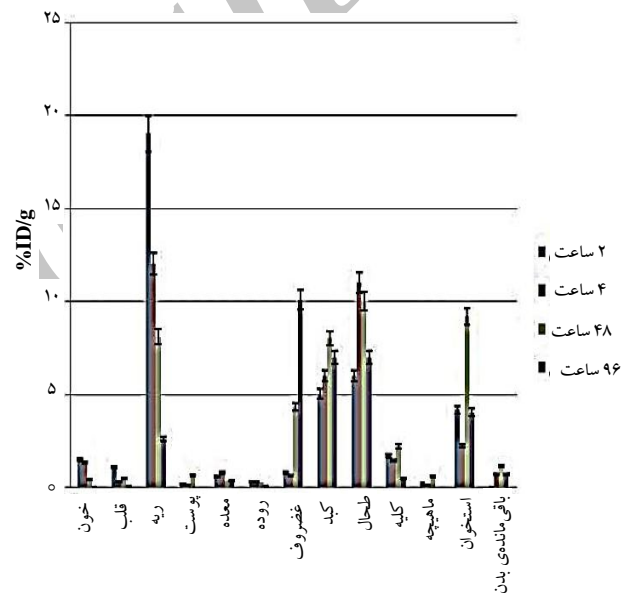
۵. نتیجه‌گیری

کمپلکس‌های زولدرونیک اسید- ^{153}Sm و زولدرونیک اسید- ^{175}Yb با استفاده از روش‌های بهینه‌سازی شده با خلوص رادیوشیمیایی مناسب تهیه شدند. این کمپلکس‌ها به همراه ترکیبات $^{153}\text{SmCl}_3$ و $^{175}\text{YbCl}_3$ از طریق ورید دم به موش‌های سوری تزریق گردیدند. مطالعات توزیع بافتی طی مدت ۲ تا ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق برای ترکیبات حاوی ^{153}Sm نشان‌دهنده‌ی بیش‌ترین تجمع (حدود ۴٪) از زولدرونیک اسید- ^{153}Sm در بافت استخوانی طی ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق بود. هم‌چنین مطالعات توزیع بافتی پس از ۲ تا ۹۶ ساعت از زمان تزریق برای ترکیبات حاوی ^{175}Yb انجام گردید و بیش‌ترین مقدار تجمع زولدرونیک اسید- ^{175}Yb در بافت استخوانی حدود ۱۰٪ بود که ۴۸ ساعت پس از زمان تزریق حاصل شد. با بررسی‌های انجام شده برای هر دو کمپلکس، خلوص رادیوشیمیایی بالا و ثبات قابل قبول در حضور سرم انسانی حاصل شد. بررسی اتصال به هیدروکسی آپاتیت برای هر دو کمپلکس، حدود ۹۷٪ اتصال در حضور مقادیر ۵ تا ۲۰ mg از هیدروکسی آپاتیت طی ۲۴ ساعت در دمای اتاق به دست آمد. نسبت جذب استخوانی در تمام فواصل زمانی با آزمون هیدروکسی آپاتیت مطابقت داشت. به دلیل عدم پایداری مناسب کمپلکس‌ها در محیط زیستی، جذب کبدی این ترکیبات بالاتر از مقادیر مورد انتظار به نظر می‌رسد. بنابراین به دلیل اهمیت میزان جذب در این بافت، احتمالاً استفاده‌ی دارویی از آن‌ها با مشکل روبه‌رو خواهد بود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری صمیمانه آقای محمد مزیدی سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

در مورد مشتق ایتربیمی نیز همین مسئله مشاهده می‌شود و با این که جذب نسبتاً بالای استخوان در ۴۸ ساعت به میزان حدود ۱۰٪ است، ولی سرانجام این میزان کاهش یافته وجود دارد. از طرفی مجدداً جذب بالا در کبد و طحال و ریه نشان‌دهنده‌ی رهاسازی فلز و یا تولید کلویدهای ناخواسته در بدن می‌باشد که جذب سیستم رتیکولاندوتلیال را افزایش داده است (شکل ۱۲). در مقایسه با ترکیب نشان‌دار با ^{177}Lu گزارش شده‌ی اخیر [۶]، به نظر می‌رسد نتایج عملکرد مشتق گزارش شده لوتسیمی به مراتب بهتر از دو مشتق گزارش شده در این مقاله است. جدول ۱ به بررسی مهم‌ترین عوامل عملکردی سه ترکیب نشان‌دار در محیط غیرزنده و زنده می‌پردازد.



شکل ۱۲. نمودار توزیع بافتی کمپلکس زولدرونیک اسید- ^{175}Yb .

جدول ۱. خصوصیات دو ترکیب نشان‌دار در این پژوهش در مقایسه با مشتق نشان‌دار در مرجع ۸

ترکیب نشان‌دار	اتصال به پروتئین	نسبت جذب استخوان به کبد (۴۸ ساعت)	نسبت جذب استخوان به کلیه (۴۸ ساعت)	هیدروکسی آپاتیت (در ۵ mg)
زولدرونیک اسید- ^{153}Sm	۴۰	۰٫۰۸	۹٫۶	۹۹
زولدرونیک اسید- ^{175}Yb	۵۰	۰٫۱۸	۴٫۱۹	۹۶
زولدرونیک اسید- ^{177}Lu	۵۵-۵۸	۳٫۶۲	۲٫۳۹	بیش از ۹۷



1. Food and drug administration
2. High performance liquid chromatography
3. Diethylene triamine penta acetic

4. High-purity germanium purity
5. Syrian mice
6. Radio thin layer chromatography

مرجع‌ها

- [1] R.E. Coleman, Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity, *Clinical Cancer Research.*, 12 (2006) 6243–6249.
- [2] A. Majkowsk, M. Neves, I. Antunes, A. Bilewicz, Complexes of low energy beta emitters ^{47}Sc and ^{177}Lu with zoledronic acid for bone pain therapy, *Applied Radiation and Isotopes.*, 67 (2009) 11–13.
- [3] L.S. Rosen, D. Gordon, B.S. Antonio, Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double blind, comparative trial, *Cancer J.*, 7 (2001) 377–387.
- [4] P. Major, A. Lortholary, J. Hon, Zoledronic acid is superior topamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials, *J. Clin. Oncol.*, 19 (2001) 558–567.
- [5] J. Lin, L. Qiu, W. Cheng, S. Luo, L. Xue, S. Zhang, Development of superior bone scintigraphic agent from a series of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled zoledronic acid derivatives, *Appl. Radiat. Isot.*, 70(5) (2012) 848–855.
- [6] M. Nikzad, A.R. Jalilian, S. Shirvani, A. Samani, H. Golchoubian, Production, quality control and pharmacokinetic studies of ^{177}Lu -zoledronate for bone pain palliation therapy, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, (2013).
- [7] R.B. Firestone, C.M. Baglin, S.Y.F. Chu, *Table of Isotopes*, 8th Edition, 1998 Update with CD-ROM, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, ISBN 0471246999.
- [8] A.N. Serafini, S.J. Houston, I. Resche, Palliation of pain associated with metastatic bone cancer using samarium-153 lexidronam: a double-blind placebo controlled clinical trial, *J. Clin. Oncol.*, 16(4) (1998) 1574–1581.
- [9] Boby Mathew, Sudipta Chakraborty, Tapas Das, H.D. Sarma, Sharmila Banerjee, Grace Samuel, Meera Venkatesh, M.R.A. Pillai, ^{175}Yb labeled polyaminophosphonates as potential agents for bone pain palliation, *Applied Radiation and Isotopes*, 60 (2004) 635–642.
- [10] IAEA, VIENNA, 2003, IAEA-TECDOC-1340, Manual for reactor produced radioisotopes, ISBN 92-0-101103-2, ISSN 1011-4289, ©IAEA (2003).
- [11] M. Neves, L. Gano, N. Pereira, M.C. Costa, M.R. Costa, M. Chandia, M. Rosado, R. Fausto, Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies, *Nucl. Med. Biol.*, 29 (2002) 329–338.
- [12] <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/Zometa.pdf>.
- [13] Sudipta Chakraborty, Tapas Das, Sharmila Banerjee, Suresh Subramanian, Haladhar Dev Sarma, Meera Venkatesh, ^{175}Yb -labeled hydroxyapatite: a potential agent for use in radiation synovectomy of small joints, *Nucl. Med. Bio.*, 33 (2002) 585–591.
- [14] X.L. Du, T.L. Zhang, L. Yuan, Y.Y. Zhao, R.C. Li, K. Wang, S.C. Yan, L. Zhang, H. Sun, Z.M. Qian, Complexation of ytterbium to human transferrin and its uptake by K562 cells, *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 6082–6090.