



تولید کمپلکس ^{61}Cu - بلئومایسین به عنوان یک رادیوداروی احتمالی توموگرافی گسیل پوزیترون (PET) و بررسی زیستی آن در موش‌های سالم و توموری

امیررضا جلیلیان*، حسن زندگی، مهدی اخلاقی، محسن کمالی دهقان، فاطمه بلوری نوین، صدیقه مرادخانی، عباس مجدآبادی پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج-ایران

چکیده: تولید رادیونوکلید مس-۶۱ در سیکلوترون از طریق بمباران روی طبیعی با باریکه‌ای از پروتون‌های به انرژی ۲۲ MeV و جریان ۱۵۰ μA و به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. در پایان پرتودهی مقدار فعالیت به دست آمده برابر ۲۲۲ GBq، معادل ۶ Ci ($\pm 5\text{mCi}$) و بازده محصول برابر ۴۴۰ MBq/ μAh بود. رادیوداروی ^{61}Cu - بلئومایسین (^{61}Cu -BLM) در شرایط بهینه (دمای اتاق، زمان پرتودهی ۴۵ دقیقه، ۰/۱ میلی‌گرم بلئومایسین به ازای ۲ تا ۱۰ میلی‌کوری کلرید مس-۶۱) تهیه شد. جداسازی، به روش کروماتوگرافی یونی صورت گرفت و بازده جداسازی رادیوشیمیایی به روش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک پرتوزا (RTLC) و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) بیش‌تر از ۹۸٪ به دست آمد. رادیوداروی BLM [^{61}Cu] به موش‌های سالم و دارای تومور بافت هم‌بند تزریق و پراکنش بافتی آن در فاصله‌ی زمانی ۲۱۰ دقیقه به بهره‌گیری از اندازه‌گیری‌های همفرودی زمانی دوربین گاما مورد مطالعه قرار گرفت. تجمع قابل قبول رادیودارو در تومور نسبت به سایر اعضا توسط تصاویر PET و مطالعات پراکنش بافتی مشاهده گردید. رادیوداروی BLM [^{61}Cu] می‌تواند برای مشخص نمودن تومور در تصاویر PET مورد استفاده قرار گیرد.

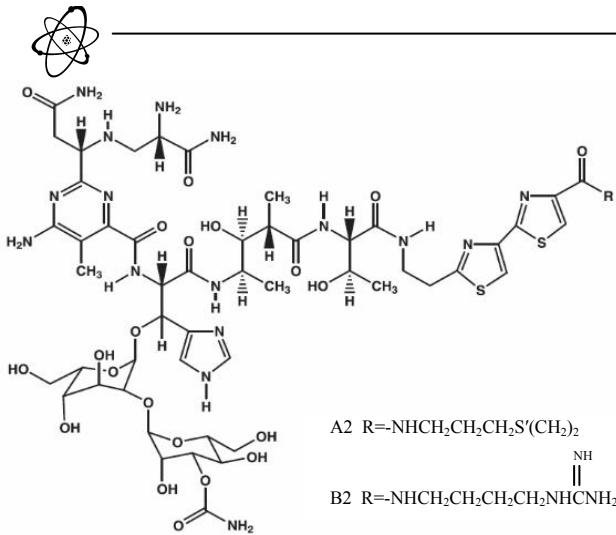
واژه‌های کلیدی: رادیودارو، مس-۶۱، بلئومایسین، توموگرافی گسیل پوزیترون، نشان‌دارسازی پرتوی، کنترل کیفی

Preparation of [^{61}Cu]Bleomycin Complex as a Potential PET Radiopharmaceutical and its Biological Evaluation in Normal and Tumor-Bearing Rodents

A.R. Jalilian*, H. Zandi, M. Akhlaghi, M. Kamali Dehghan, F. Bolourinovin, S. Moradkhani, A. Majdabadi
Agricultural Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, P.O. Box: 31485-498, Karaj-Iran

Abstract: [^{61}Cu]Bleomycin ([^{61}Cu]BLM) was prepared using [^{61}Cu]CuCl₂ produced via $^{nat}\text{Zn}(p,x)^{61}\text{Cu}$ (180 μA proton irradiation, 22 MeV, 3.2h), purified by ion chromatography method. [^{61}Cu]BLM was prepared at optimized conditions (room temperature, 45 min, 0.1 mg bleomycin for 2-10 mCi $^{61}\text{CuCl}_2$) with radiochemical purity over 98% determined by HPLC and RTLC. [^{61}Cu]BLM was administered into the normal and tumor bearing rodents up to 210 minutes followed by biodistribution and co incidence imaging studies. A significant tumor/non tumor accumulation was observed either by animal sacrifice or imaging method. [^{61}Cu]BLM can be a potential PET radiotracer for tumor imaging.

Keywords: Radiopharmaceutical, Copper-61, Bleomycin, Positron Emission Tomography, Radiolabeling, Quality Control



شکل ۱- ساختمان مولکولی مواد موجود در نمونه‌ی دارویی بلئومایسین.

از رادیویازوتوپ‌های متعددی برای نشان‌دار کردن بلئومایسین برای مقاصد تشخیصی و درمانی استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به ایندیم-۱۱۱ [۷]، روتیم- ^{103}Ru [۸]، رودیم-۱۰۵ [۹]، اشاره کرد. نشان‌دار شده است که رادیوداروی ایندیم-۱۱۱- بلئومایسین دارای پایداری بالایی در محیط آزمایشگاهی و بدن انسان است و از آن برای مقاصد تشخیصی و درمانی تومور انسانی با موفقیت استفاده شده است [۷]. در این کار تحقیقاتی، نشان‌داری بلئومایسین با مس-۶۱ که به صورت روتین در سیکلوترون کرج تولید می‌شود [۱۰] به عنوان رادیونوکلید پوزیترون گسیل در تشخیص تومور مورد توجه قرار گرفت. تولید، تست پایداری، بررسی پراکنش بافتی در موش سالم و سرطانی، تصاویر دوربین گاما به دست آمده از اندازه‌گیری‌های هم‌فرونی ترکیب نشان‌دار ^{61}Cu BLM در این جا مورد بررسی قرار گرفته است.

۲- بخش تجربی

۲-۱ مواد

روی کلرید طبیعی با خلوص بالای ۹۸٪ از شرکت مرک تهیه شد. بقیه‌ی مواد شیمیایی از شرکت سیگما-آلدریچ و نمونه‌دارویی سولفات بلئومایسین از آزمایشگاه‌های نیون کایاکوی کشور ژاپن خریداری شد. موش‌های صحرایی و موش‌های سوری از انستیتو رازی حصارک خریداری و در شرایط بهینه نگه‌داری و تغذیه شدند. روش کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس استاندارد کار با حیوانات انگلستان طبق آیین‌نامه مصوب ۲ انجام شد.

۱- مقدمه

توموگرافی گسیل پوزیترون^(۱) یکی از آخرین ابزارهای تشخیصی در پزشکی هسته‌ای می‌باشد که با بهره‌گیری از مشخصات فیزیکی جالب رادیونوکلیدهای پوزیترون گسیل و دوربین‌های گامای حرفه‌ای و پیشرفته به یک ابزار پیشرفته‌ی پزشکی در تشخیص بیماری‌ها بدل شده است. با توجه به بررسی‌های انجام شده، تولید و به کارگیری ^{61}Cu برای تهیه‌ی رادیوداروهای ردیاب تومور مورد توجه قرار گرفت. رادیویازوتوپ‌های مس ^{61}Cu ، ^{62}Cu ، ^{63}Cu ، ^{64}Cu و ^{67}Cu با نیم-عمر ۹٫۸ دقیقه تا ۶۱٫۹ ساعت به عنوان رادیونوکلیدهای مناسب در پزشکی هسته‌ای برای تشخیص و درمان استفاده می‌شوند. استفاده از رادیویازوتوپ‌های ^{67}Cu و ^{64}Cu برای مقاصد درمان به خاطر مشخصات مناسب فیزیکی، و تابش β^- گزارش شده است.

روش‌های فنی تولید مس-۶۱ به عنوان یک رادیودارو و یا برای دیگر کاربردهای آن در مقالات به ندرت داده شده است [۱]. مشاهده شده است که تصاویر توموگرافی به دست آمده از ^{61}Cu از کیفیت بالاتری نسبت به ^{64}Cu برخوردار است علت این امر آن است که مقدار پوزیترون گسیل شده از ^{61}Cu بیش‌تر از ^{64}Cu است [۲]. مس-۶۱ برای نشان‌دار کردن مولکول‌های کوچک [۳ و ۴] برای مقاصد مختلف تشخیصی استفاده شده است. بلئومایسین (شکل ۱) یک آنتی‌بیوتیک است که در تومور جذب می‌شود و از دهه‌ی ۱۹۷۰ به صورت گسترده در شیمی درمانی مورد استفاده قرار گرفته است. بلئومایسین دو نقش عمده‌ی اتصال به DNA و واکنش آن در مجاورت سلول‌های توموری را ایفا می‌نماید. بلئومایسین در حضور یون آهن دو ظرفیتی و اکسیژن به شکل فعال بلئومایسین تبدیل و از قابلیت حمله به زنجیره‌ی DNA برخوردار شده و با ایجاد رادیکال‌های آزاد باعث شکستن زنجیره‌های سلول‌های توموری می‌گردد [۵]. بنابراین نشان‌داری بلئومایسین با رادیویازوتوپ‌های دو ظرفیتی ترکیب فعال دارویی‌ای را به دست می‌دهد که می‌توان به عنوان همراه بر رادیویازوتوپ‌ها، برای مقاصد تشخیص و درمان از آن استفاده کرد [۶].



تولید رادیونوکلید مس-۶۱ در سیکلوترون ۳۰ MeV مدل Cyclone-۳۰, IBA پژوهش‌شکده‌ی تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی انجام پذیرفت. هدف، لایه‌ای از روی طبیعی بود که از طریق آب کاری بر روی یک زیرلایه‌ی مسی با روکش نازکی از طلا به ضخامت $50\ \mu\text{m}$ نشانده شد. روکش طلا به منظور جلوگیری از ورود مس حامل به محصول در خلال فرایند جداسازی، مورد استفاده قرار گرفت. محاسبات مربوط به واکنش‌ها با استفاده از کد هسته‌ای آلیس (ALICE) [۱۱] نشان داد که بهترین محدوده‌ی انرژی برای واکنش ${}^{61}\text{Cu}(p,x){}^{\text{nat}}\text{Zn}$ بین ۱۲ تا ۲۲ MeV است. ضخامت هدف می‌بایست به اندازه‌ای باشد که انرژی پروتون را از ۲۲ MeV به حدود ۱۲ MeV برساند. برای به دست آوردن بازده بیش‌تر، پرتو با زاویه‌ی 6° به هدف تابیده شد. کد هسته‌ای SRIM [۱۲] برای تعیین بهترین ضخامت هدف، در محدوده‌ی انرژی تابش، مورد استفاده قرار گرفت. هدف با باریکه‌ای از پروتون‌های به انرژی ۲۲ MeV و جریان $150\ \mu\text{A}$ و به مدت ۷۵ دقیقه پرتو دهی شد.

۲-۲-۲ آب کاری روی و طلا

یک حمام آب کاری محتوی طلا مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. چنان چه از زاویه‌ی تابش 6° برای پرتو استفاده شود ضخامت مورد نیاز هدف به یک دهم مقدار اولیه می‌رسد. در این صورت، آب کاری هدف با ضخامت ۷۵ میکرومتر طلا مناسب می‌باشد.

۲-۲-۳ جداسازی شیمیایی

جداسازی شیمیایی، بدون افزایش همراه بر انجام شد. ماده‌ی هدف (روی طبیعی) که مورد پرتو دهی قرار گرفته بود در کلریدریک اسید ۱۰ مولار حاوی کمی H_2O_2 حل شد. محلول از ستونی از رزین AG50W به شکل H^+ و با مش ۲۰۰ تا ۴۰۰، به طول ۱۰ cm و به قطر ۱٫۳ cm، آماده‌سازی شده با عبور ۲۵ ml کلریدریک اسید ۹ مولار عبور داده شد. در مرحله‌ی بعد، ستون با عبور ۲۵ میلی‌لیتر از کلریدریک اسید ۹ مولار با نرخ جریان ۱ ml/min، به منظور خارج نمودن روی و مس شسته شد. محلول نهایی از ستونی به طول ۲۵ cm و به قطر ۱٫۷ cm از رزین

AG1X8 به شکل Cl^- و با مش ۱۰۰ تا ۲۰۰، آماده سازی شده با استفاده از محلول قبلی کلریدریک اسید ۶ مولار عبور داده شد. در نهایت، مس-۶۱ (${}^{61}\text{Cu}$) توسط ۵۰ میلی‌لیتر محلول کلریدریک اسید ۲ مولار شسته و از ستون به صورت کلرید مس (${}^{61}\text{Cu}$) CuCl_2 خارج گردید. کل این مراحل در حدود ۶۰ دقیقه به طول انجامید [۱۴].

۲-۲-۴ کنترل کیفی محصول

طیف‌نمایی پرتوگامای محصول نهایی، با استفاده از آشکارساز فوق خالص ژرمانیم (HPGe) و تحلیل گر چند کاناله‌ی مدل CanberraTM انجام پذیرفت. سطح زیر قله‌های مشاهده شده برای مدت زمان شمارش ۴ ساعت تعیین گردید. حضور عناصر روی و طلا در محلول نهایی مس-۶۱ کلرید با استفاده از روش‌های رنگ‌سنجی بررسی [۱۵ و ۱۶] و درجه‌ی خلوص شیمیایی محلول نهایی بالاتر از ۹۵٪ تعیین گردید.

۲-۲-۵ نشان‌داری سازی بلنومایسین توسط مس-۶۱

مقدار ۲٫۵ تا ۱۰ میلی کوری از محلول ${}^{61}\text{Cu}$ در محیط اسیدی (به حجم ۰٫۵ تا ۲ ml) به یک ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل و تحت جریان ملایم گاز نیتروژن خشک گردید. ترکیب بلنومایسین (۰٫۱ mg) و نرمال سالین (۰٫۱ ml) به ویال اضافه شده و در دمای اتاق قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی محلول مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از خلوص رادیوشیمیایی، محلول نهایی از یک فیلتر ۰٫۲۲ میکرون عبور داده شده و اسیدیته‌ی آن توسط بافر سدیم استات ۱ مولار در محدوده‌ی pH=۵-۷ تنظیم گردید.

۲-۲-۶ کنترل کیفی ${}^{61}\text{Cu}$ -BLM

۲-۲-۶-۱ کروماتوگرافی لایه‌ی نازک پرتوزا (RTLC)

پس از قرار گرفتن مقدار ۵ میکرولیتر از ${}^{61}\text{Cu}$ -BLM بر روی کاغذ سیلیکاژل، این آخری در تانک محتوی سیستم فاز متحرک متانول-آمونیم استات ۱۰٪ به نسبت ۱:۱ قرار داده شد. هم‌چنین می‌توان از محلول ۱۰ میلی مولار DTPA به عنوان فاز متحرک برای تمایز بین مس آزاد و رادیومس استفاده کرد. رادیوکروماتوگرافی از طریق شمارش کاغذهای کروماتوگرافی



محلول مس-۶۱ کلرید و یا مس ۶۱- بلئومایسین (مقدار $40 \pm 2 \mu\text{Ci}$ برای موش صحرایی و $10 \pm 2 \mu\text{Ci}$ برای موش سوری) از طریق ورید دمی تزریق شد. موش‌ها در زمان‌های معین قربانی شده و درصد دز تزریقی بر واحد گرم (%ID/gr) برای اندام‌های مختلف با استفاده از آشکارساز HPGe و بر مبنای سطح زیر قله 383keV محاسبه شد.

۲-۲-۱۰ تکاره برداری هم‌فروندی زمانی از موش‌های سالم و مبتلا به تومور این عمل، با تزریق $40 \mu\text{Ci}$ میکروکوری مس-۶۱ به شکل کلرید و هم‌چنین ترکیب نشان‌دار ^{61}Cu -BLM به هر دو نوع موش سالم و مبتلا طی زمان‌های مختلف دو تا سه ساعت انجام شد.

۳- نتایج

با ۷۶ دقیقه بمباران روی طبیعی با باریکه‌ای از پروتون‌ها به انرژی 22MeV و با جریان $150 \mu\text{A}$ ، مقدار فعالیت به دست آمده در پایان پرتودهی، برابر 222GBq ، معادل ۶ کوری، ($6 \text{Ci} \pm 5 \text{mCi}$) و بازده محصول برابر $440 \text{MBq}/\mu\text{Ah}$ به دست آمد. بازده جداسازی رادیوشیمیایی محصول بیش‌تر از ۹۵ درصد تعیین شد. مراحل کنترل کیفی محصول در دو مرحله انجام پذیرفت. کنترل رادیونوکلیدی، با استفاده از پرتوهای گامای $67/41$ ($4/23$ %)، $282/96$ ($12/2$ %)، 373 ($2/15$ %)، 511 ($122/9$ %)، 656 ($10/7$ %). و 1186keV ($3/7$ %) گسیل شده از رادیونوکلید مس-۶۱ خلوص رادیونوکلیدی را افزون بر ۹۹ درصد نشان داد. میزان فعالیت مس-۶۰ باقی مانده برابر $0/23$ درصد بود. خلوص شیمیایی با استفاده از روش رنگ‌سنجی بررسی شد. مقدار غلظت استاندارد فلز روی برابر با 1ppm می‌باشد و ترکیب مایل به صورتی که توسط چشم غیر مسلح قابل تشخیص است در مدت زمان آزمایش همان‌طور باقی می‌ماند. آزمون رنگ‌سنجی نشان داد که غلظت یون‌های مثبت روی خیلی کم‌تر از سطح مجاز بیشینه 5ppm است (کم‌تر از 1ppm روی) و غلظت طلا نیز کم‌تر از $0/9 \text{ppm}$ بود. در مطالعات قبلی عدد اکسایش - کاهش مس دوظرفیتی بلئومایسین Cu (II)-BLM در دمای 25 درجه و در محیط خنثی ($\text{pH}=7/0$) اندازه‌گیری و مشخص شد که این پتانسیل در محدوده‌ی مجاز تبدیل مس بلئومایسینی است که در

لایه‌ی نازک سیلیکا ژل سوار شده روی لایه‌ی پلی‌مری و با استفاده از دستگاه قرائت‌کننده‌ی کروماتوگرافی لایه نازک، مدل Bioscan AR2000، ساخت کشور فرانسه صورت گرفت.

۲-۲-۲-۲ کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

کنترل کیفی محلول نهایی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا صورت گرفت. اجزای شوینده عبارت بودند از آب و استونیتریل به نسبت ۱:۱ با نرخ جریان $1 \text{ml}/\text{min}$ و تحت فشار $130 \text{kgf}/\text{cm}^2$ برای مدت زمان ۲۰ دقیقه. این فرایند تحت گرادیان حجمی با استفاده از فاز ثابت معکوس انجام شد. کاتیون‌های مس مانند Cu^{2+} و CuCl_4^{2-} در زمان مشابه با سرعت بیش‌تری شسته شدند.

۲-۲-۲-۲ بررسی پایداری رادیودارو

بررسی پایداری، با قرار دادن مقدار $0/5 \text{mCi}$ از رادیوداروی ^{61}Cu BLM برای مدت ۵ ساعت در دمای اتاق، و تهیه‌ی پیوسته‌ی رادیوکروماتوگرام با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌ی نازک پرتوزا در فاصله‌های زمانی ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت. برای تهیه‌ی کروماتوگرام رادیودارو مقدار ۵ میکرولیتر از رادیودارو پس از قرار گرفتن بر روی کاغذ سیلیکاژل در داخل تانک کروماتوگرافی لایه‌ی نازک حاوی فاز متحرک- آمونیم استات ۱۰ درصد و متانول به نسبت ۱:۱- قرار داده شد.

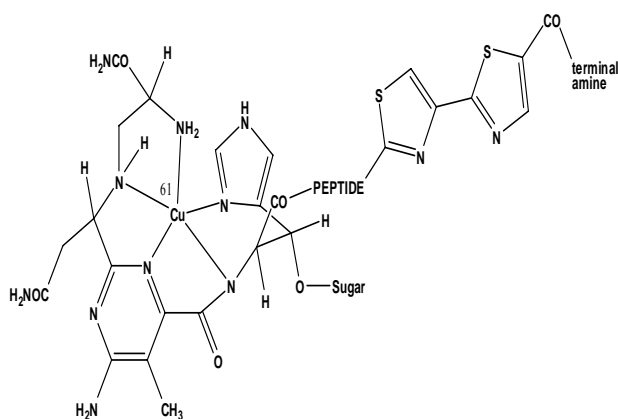
۲-۲-۲-۲-۱۸ پایداری ترکیب نشان‌دار در محیط زیستی سرم خون انسان

۵۰۰ میکرولیتر از سرم تازه‌ی خون انسان پس از اضافه شدن مقدار $36/1 \text{MBq}$ ($976 \mu\text{Ci}$) از ترکیب ^{61}Cu BLM به آن، در داخل یک ویال هم‌زده شده و در حمام آب گرم در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت انکوبه شد و در فواصل زمانی ۰، ۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ ساعت از آن رادیوکروماتوگرام لایه‌ی نازک تهیه گردید.

۲-۲-۲-۹ پراکنش زیستی ^{61}Cu BLM و ^{61}Cu CuCl₂ در موش‌های سالم و

سرطانی

^{61}Cu BLM و ^{61}Cu CuCl₂ به صورت مجزا به موش‌های صحرایی سالم و سرطانی تزریق شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از



شکل ۲- ساختار پیشنهادی ترکیب مس و بلئومایسین.

تشکیل شده است. درصد ترکیب و مولاریته در مقالات گزارش شده است [۲۲]. وزن مولکولی متوسط بلئومایسین ۱۴۹۵٫۲۲ دالتون است. در نتیجه، در شرایط بهینه‌ی نشان‌دارسازی فعالیت ویژه‌ی ۵۰ تا ۵۵ GBq/mM قابل دسترسی است. مراحل نشان‌دارسازی حدود ۴۵ دقیقه طول می‌کشد. نسبت سطح کل زیرقله‌های مس ۶۱- بلئومایسین ($R_f=0.7$ و $R_f=0.3$) به قله‌ی مس آزاد ($R_f=0.0$) نشان داد که بازده رادیوشیمیایی بیش‌تر از ۹۹٪ بود (شکل ۳).

نتایج نهایی کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا نشان داد که کاتیون آب‌دوست $^{61}\text{Cu}^{2+}$ در مدت زمان ۲٫۸۴ دقیقه از ستون خارج می‌شود در صورتی که ^{61}Cu BLM که ترکیبی با وزن مولکولی بالا می‌باشد در بیش از ۱۵/۳۳ دقیقه خارج می‌گردد. کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به تعداد ۹ بار انجام و هر بار بازده نشان‌دارسازی رادیودارو بیش از ۹۵ درصد بود (شکل‌های ۴ و ۵).

ترکیب نهایی رادیودارو توسط سالی‌ن نرمال رقیق گردیده و برای استریل شدن از فیلتر ۰٫۲۲ میکرون عبور داده شد. رادیوداروی ^{61}Cu -BLM در سرم خون تازه‌ی انسان، برای مدت زمان ۵ ساعت در دمای 37°C نگهداری شد، و مشاهده گردید که در کم‌تر از یک ساعت مس-۶۱ از ترکیب رادیودارو جدا نشد.

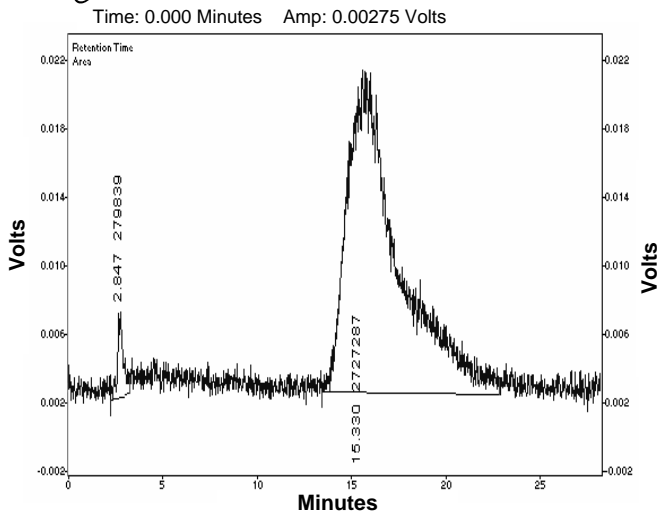
برای بررسی میزان تجمع رادیونوکلید مس-۶۱ در اندام‌های حیاتی و موردنظر در مدل حیوانی، ۴۰ میکروکوری از مس-۶۱ آزاد حل شده در سالی‌ن نرمال ($\text{pH}=6.5-7$) به ورید دم‌ی موش‌های صحرائی سالم تزریق و نمودار درصد دز تزریقی بر واحد گرم (%ID/gram) رسم شد (شکل ۶).

داخل سلول رخ می‌دهد [۱۷]. بنابراین ورود و اتصال کامل ترکیب در سلول‌ها، به ویژه در سطوح بالای تیول داخل سلولی مانند اغلب سلول‌های سرطانی که شامل متالوتیوپروتئین هستند امکان‌پذیر است [۱۸].

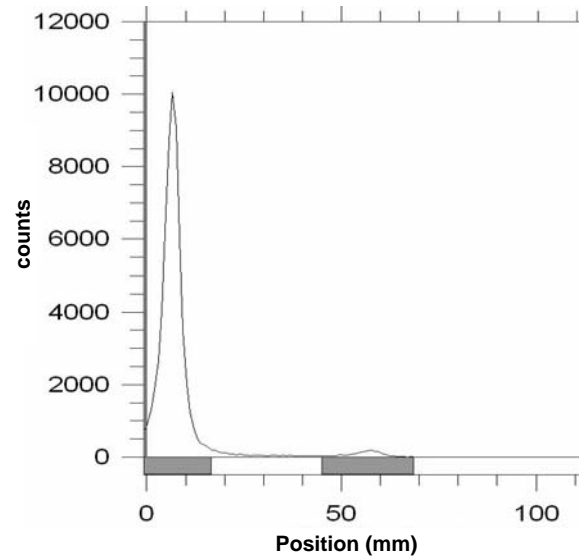
همان‌طور که گزارش شده است، ترکیب مس (II) بلئومایسین Cu (II) BLM دارای پایداری ترمودینامیکی و جنبشی مناسب می‌باشد و به آرامی در سلول کاهیده شده و توسط ترکیبات سولفوهایدریل در سلول تثبیت می‌شود. از طرفی پایداری این ترکیب در مجاورت سرم انسانی در مقالات گزارش شده است [۱۸]. ساختار ترکیب مس- بلئومایسین به صورت شکل ۲ پیشنهاد شده است [۱۹]. طیف نوری محلول ۱:۱ ترکیب مس (II) و بلئومایسین در محیطی با $\text{pH}=6-7$ قبلاً توسط روش‌های طیف‌سنجی تهیه شده است [۲۰]. در این تحقیق با توجه به شرایط نشان‌دارسازی نیز مقدار ۱:۱ پیشنهاد می‌گردد. همه‌ی این خصوصیات، طراحی و استفاده از رادیوداروی مس-۶۱ بلئومایسین را موجه می‌سازد.

نشان داده شده است که بعضی از ترکیبات بلئوماسین- فلز در سلول‌ها در مقایسه با بلئومایسین غیرسمی هستند در صورتی که سمیت سلولی کمپلکس مس II بلئومایسین در حد بلئومایسین و یا در مواردی بیش‌تر از بلئومایسین است. مانند کبالت (III)- بلئومایسین، شاهده‌ی مبنی بر آسیب به DNA در مورد این کمپلکس ارایه نشده است [۲۱]. تأثیرات مس (II)- بلئومایسین، به خاطر چندین گروه فعال قطبی که در این ساختار وجود دارد، بر روی سلول‌های سالم شبیه به فلز آزاد است. به همین دلیل نشان‌دارسازی بلئومایسین تأثیر زیادی در مشخصات کروماتوگرافیکی آن نمی‌گذارد و از این‌رو بلئومایسین نشان‌دار و غیرنشان‌دار دارای مقدار R_f یکسان هستند. قسمتی از بلئومایسین که دارای قطبیت بیش‌تری است شامل بلئومایسین نوع A_2 بوده و دارای R_f کم‌تری است و قسمت‌های دیگر بلئومایسین که شامل R_f بیش‌تر و نزدیک به قسمت قبل است بلئومایسین نوع B_2 و بلئومایسینیک اسید می‌باشد.

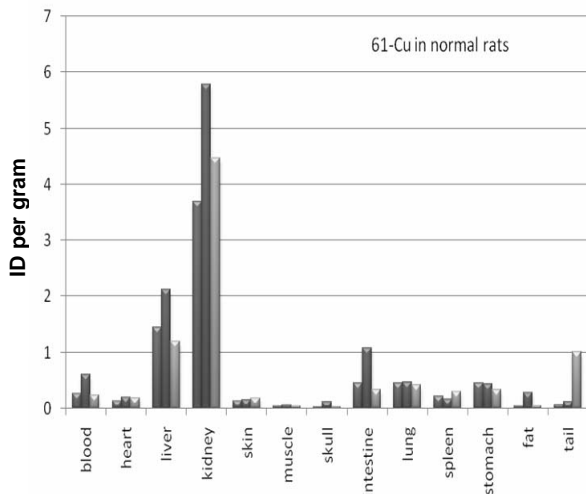
چون انواع مختلف بلئومایسین‌ها دارای مشخصات جذب یکسان در تومور می‌باشند، نیازی به جداسازی آن‌ها نیست. همانند شکل ۱ نمونه‌ی دارویی بلئومایسین اساساً از ۳ قسمت



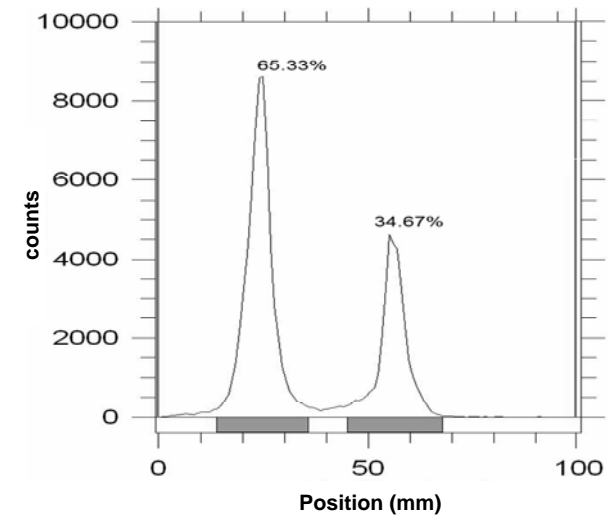
شکل ۵- کروماتوگرام HPLC مس- ^{61}Cu بلئومایسین.



(a)



شکل ۶- پراکنش زیستی مس کلرید ^{61}Cu در اندام‌های موش سالم، تا ۳ ساعت پس از تزریق.

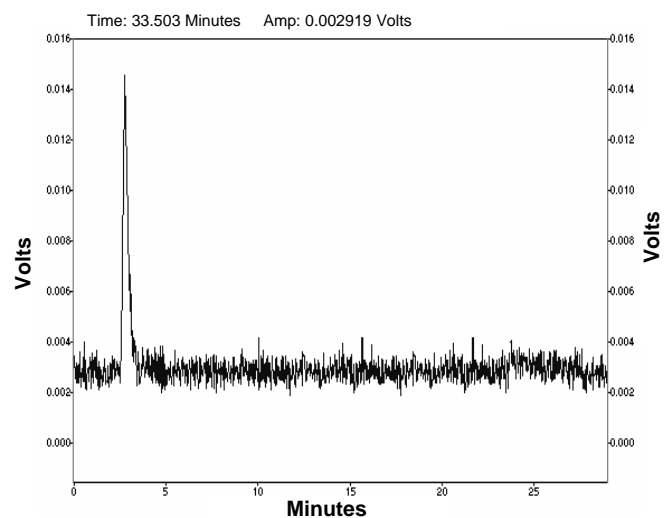


(b)

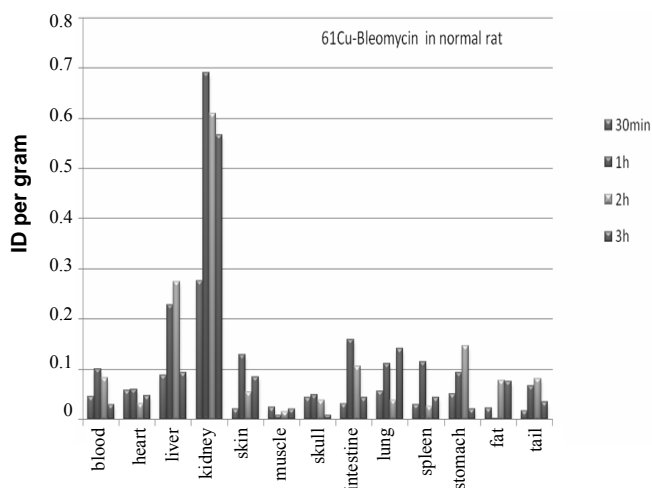
شکل ۳- رادیو کروماتوگرام مس- ^{61}Cu به صورت آزاد (Cu^{2+}) ، در بلئومایسین $(^{61}\text{Cu})\text{BLM}$.

قسمت عمده‌ی مس- ^{61}Cu تزریق شده، از طریق کلیه‌ها و مجاری ادرار دفع می‌شود و این به علت انحلال‌پذیری مس- ^{61}Cu در آب می‌باشد. هم‌چنین مقداری از مس آزاد در کبد جمع می‌شود زیرا کبد محل ذخیره‌ی اغلب فلزاتی است که از سرم منتقل می‌شوند. میزان جذب دستگاه گوارش در یک ساعت اول قابل توجه است، و این به دلیل ترشحات صفراوی از طریق دفع کبد می‌باشد که پس از ۲ ساعت مقدار قابل توجهی نیست. میزان جذب سایر اندام‌ها چندان قابل توجه نیست (شکل ۶).

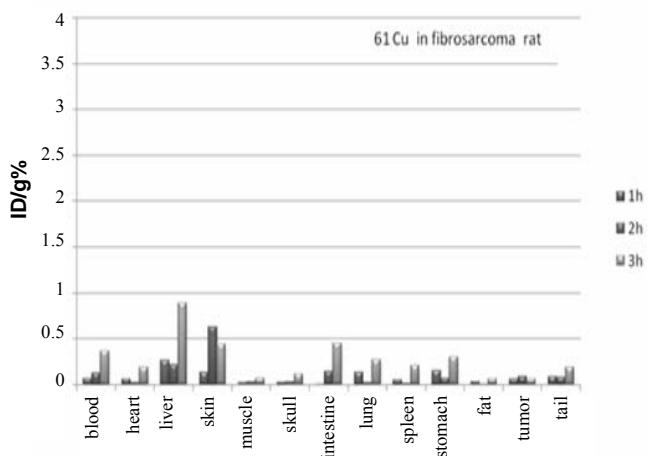
از آن جایی که بلئومایسین نشان‌دار شده رفتار مشابهی با بلئومایسین آزاد دارد، مسیر اصلی دفع بلئومایسین نشان‌دار شده با مس- ^{61}Cu همانند بلئومایسین آزاد مجاری ادرار می‌باشد. ۷۰٪ از بلئومایسین نشان‌دار شده با مس- ^{61}Cu در ۲۴ ساعت اولیه از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود [۲۳]. همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده



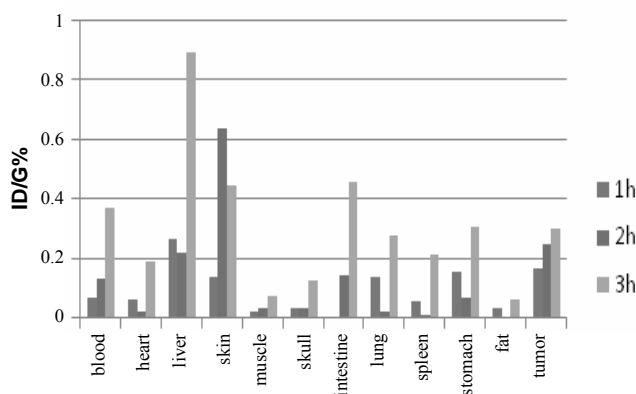
شکل ۴- کروماتوگرام HPLC کاتیون مس- ^{61}Cu .



شکل ۷- مقایسه‌ی پراکنش زیستی $^{61}\text{Cu-BLM}$ در اندام‌های مختلف موش سالم، تا ۳ ساعت پس از تزریق.



شکل ۸- مقایسه‌ی پراکنش زیستی $^{61}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$ در اندام‌های موش سرطانی، تا ۳ ساعت پس از تزریق.



شکل ۹- پراکنش زیستی $^{61}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$ در اندام‌های مختلف موش سرطانی، تا ۳ ساعت پس از تزریق.

است بیش‌ترین میزان جذب پرتوزایی در سه ساعت اول توسط کلیه‌ها می‌باشد. بعد از کلیه‌ها، اندامی که دارای جذب قابل توجهی است کبد می‌باشد. به طور طبیعی معده و روده‌ی کوچک نیز مقداری جذب داشته‌اند (شکل ۷).

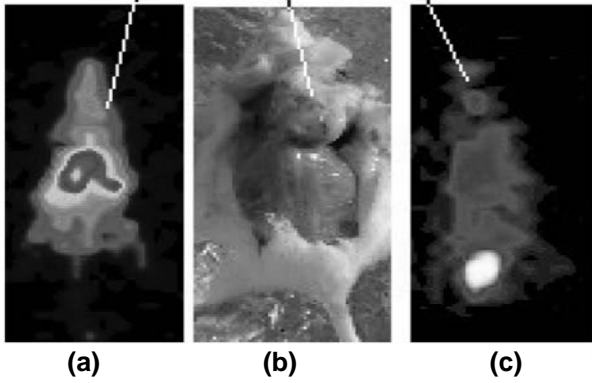
برای تعیین میزان جذب و تجمع رادیوداروی مس-۶۱ بلئومایسین ($^{61}\text{Cu-BLM}$) در موش‌های صحرایی دارای تومور بافت هم‌بند می‌بایست میزان جذب مس آزاد در اندام‌های حیاتی موش تعیین می‌گردید. از مقایسه‌ی این دو به رفتار ماده‌ی ردیاب پی‌برده شد. برای این منظور پراکنش زیستی مس-۶۱ آزاد در اندام‌های موش سالم تا ۳ ساعت پس از تزریق بررسی و مشاهده گردید که میزان جذب تومور در زمان‌های مختلف کم‌تر از ۰/۱ درصد بود، مس آزاد هیچ تجمعی در تومور نداشت و بیش‌ترین جذب توسط کلیه صورت گرفت. مقداری از مس آزاد نیز در کبد جمع شد و بقیه از طریق مجاری ادرار و سیستم گوارشی دفع گردید (شکل ۸).

شکل ۹ نشان می‌دهد که $^{61}\text{Cu-BLM}$ در تومور بافت هم‌بند موش‌های صحرایی جذب قابل توجهی داشته است. برای سهولت مقایسه‌ی میزان جذب اندام‌ها، میزان جذب کلیه از نمودار حذف شده است. میزان جذب تومور تا ۳ ساعت پس از تزریق افزایش می‌یابد و این افزایش در زمان‌های بعدی ممکن است ادامه پیدا کند. چون نیم-عمر ^{61}Cu مس-۶۱ این روند را محدود می‌سازد ترجیح داده شد که این بررسی تا ۳ ساعت پس از تزریق ادامه پیدا کند. میزان جذب در اندام‌های حیاتی در زمان ۳ ساعت بسیار خوب و قابل توجه بوده است.

همان‌طور که در شکل ۱۰ دیده می‌شود در ۲۰ دقیقه‌ی اول، ماده‌ی ردیاب در سیستم گوارشی و کلیه‌ها، در ۴۵ دقیقه پس از تزریق در کلیه‌ها و مقدار کمی از آن در سیستم گوارش، و در ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق فقط در کلیه‌ها مشاهده می‌شود و میزان جذب سایر اندام‌ها ناچیز می‌باشد. صحت این بررسی‌ها با گرفتن تصاویر دوربین گاما از موش‌های صحرایی تأیید گردید (شکل ۱۰). در شکل ۱۱ دو تصویر حاصل از اندازه‌گیری‌های هم‌فرودی مس-۶۱ کلرید و مس-۶۱ بلئومایسین توسط دوربین گاما آورده شده است. از مقایسه‌ی این دو تصویر می‌توان مشاهده کرد که مس-۶۱ بلئومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک پپتید نشان‌دار اغلب در کبد جمع شده است در صورتی که مقداری از مس-۶۱ آزاد توسط کلیه‌ها جذب و بقیه از طریق مثانه دفع شده است.



Fibrosarcoma tumor



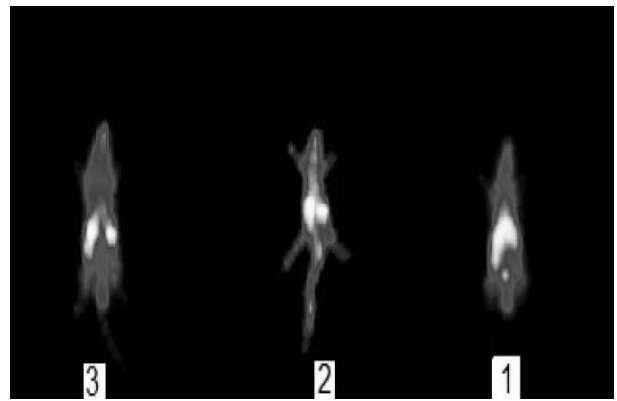
شکل ۱۲ - تصاویر حاصل از نگاره برداری همفرودی $^{61}\text{Cu}] \text{CuCl}_2$ (a)، و $^{61}\text{Cu}] \text{BLM}$ (c)، تزریق شده به، موش مبتلا به تومور بافت همبند (b)، ۳ ساعت پس از تزریق.

۷- نتیجه گیری

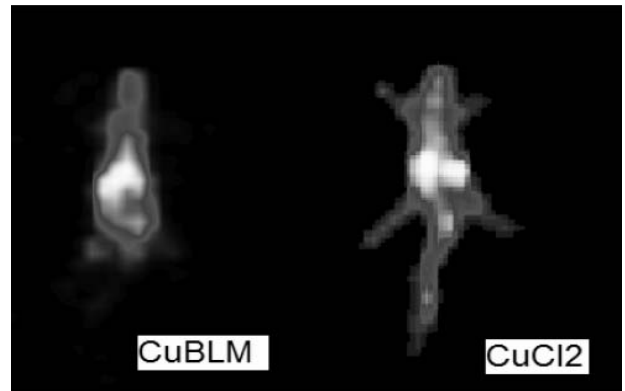
روشی که در این تحقیق برای تولید و جداسازی شیمیایی $^{61}\text{Cu}] \text{CuCl}_2$ استفاده شد کاملاً ساده و با هزینه‌ی مناسب بود. مراحل نشان‌دارسازی $^{61}\text{Cu}] \text{BLM}$ با بازده بالای ۹۸٪، حدود ۴۵ دقیقه به طول انجامید. خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از کروماتوگرافی لایه‌ی نازک پرتوزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بیش‌تر از ۹۸٪ تعیین شد. در بررسی پایداری ترکیب نشان‌دار در دمای اتاق، مشاهده گردید که با گذشت ۴ ساعت، ۶۱-مس از رادیودارو جدا نمی‌شود. رادیوداروی $^{61}\text{Cu}-\text{BLM}$ در سرم خون انسانی تازه، برای مدت زمان ۵ ساعت و در دمای 37°C نگهداری شد، و مشاهده گردید که در کم‌تر از یک ساعت ۶۱-مس از ترکیب رادیودارو جدا نشد. تصاویر حاصل از اندازه‌گیری‌های همفرودی در موش‌های صحرایی دارای تومور بافت همبند با استفاده از دوربین گاما نشان داد که رادیوداروی $^{61}\text{Cu}] \text{BLM}$ در تومور جذب قابل توجهی نسبت به سایر اندام‌های حیاتی موش دارد. $^{61}\text{Cu}] \text{BLM}$ یک رادیودارو با خاصیت گسیل پوزیترون (PET)، با نیم-عمر متوسط و مناسب ۳/۳ h است و در مطالعات ما نشان داده شد که دارای کیفیت رضایت‌بخشی بوده و برای بررسی‌های توموگرافی گسیل پوزیترون (PET) در انسان، در آینده، مناسب می‌باشد.

پی‌نوشت‌ها:

- ۱- PET: Positron Emission Tomography
- ۲- RTLC: Radioactive Thin-Layer Chromatography
- ۳- HPLC: High Pure Liquid Chromatography



شکل ۱۰ - تصاویر حاصل از نگاره برداری همفرودی $^{61}\text{Cu}] \text{CuCl}_2$ تزریق شده به موش سالم، در زمان‌های (۱) ۲۰، (۲) ۴۵، (۳) ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق.



شکل ۱۱ - مقایسه‌ی تصاویر حاصل از نگاره برداری همفرودی $^{61}\text{Cu}] \text{BLM}$ و $^{61}\text{Cu}] \text{CuCl}_2$ تزریق شده به موش سالم، ۲ ساعت پس از تزریق.

در بررسی‌های انجام شده مشاهده شد که بهترین زمان تصویربرداری از موش‌های صحرایی دارای تومور بافت همبند که به آن‌ها ۶۱-مس بلئومایسین تزریق شده است ۳ ساعت پس از تزریق می‌باشد. شکل ۱۲ میزان جذب ۶۱-مس و ۶۱-مس بلئومایسین را در مقایسه با تصویر گرفته شده از همان موش توسط دوربین عکاسی هنگام تشریح آن نشان می‌دهد که گواه خوبی برای اثبات میزان جذب در تومور می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود برای ۶۱-مس بلئومایسین بیش‌ترین میزان جذب در مثانه و تومور بافت همبند می‌باشد، در صورتی که برای ۶۱-مس جذب در سیستم گوارش و کبد و نه در تومور اتفاق می‌افتد.



References:

1. D.W. McCarthy, L.A. Bass, P.D. Cutler, R.E. Shefer, R.E. Klinkowstein, P. Herrero, J.S. Lewis, C.S. Cutler, C.J. Anderson, M.J. Welch, "High purity production and potential applications of copper-60 and copper-61," *Nucl. Med. Biol.* 26;4: 351-358 (1999).
2. T. Fukumura, K. Okada, F. Szelecsényi, Z. Kovács, K. Suzuki, "Practical production of ^{61}Cu using natural Co target and its simple purification with a chelating resin," *Radiochimica Acta*; 92, 209-214 (2004).
3. J.S. Lewis, T.L. Sharp, R. Lafortest, Y. Fujibayashi, M.J. Welch, "Tumor uptake of copper-diacetyl-bis (N4-Methylthiosemicarbazone): effect of changes in tissue oxygenation," *J. Nucl. Med.* 42, 655-661 (2001).
4. A.R. Jalilian, P. Rowshanfarzad, M. Sabet, A. Shafiee, "Preparation of [^{61}Cu]-2-acetylpyridine thiosemicarbazone complex as a possible PET tracer for malignancies," *Applied Radiat. Isotopes*, 64, 337-341 (2006).
5. S.T. Hoehn, H.D. Junker, R.C. Bunt, C.J. Turner, J. Stubbe, "Solution structure of Co(III)-Bleomycin-OOH bound to a phosphoglycolate lesion containing oligonucleotide: implications for bleomycin-induced double-strand DNA cleavage," *Biochemistry*, 22, 5894-5905 (2001).
6. T. Korppi-Tommola, H. Huhmar, H.J. Aronen, " ^{111}In -Labelled bleomycin complex for the differentiation of high- and low-grade gliomas," *Nucl. Med. Commun.* 20, 145-152 (1999).
7. H.A. Jaaskela-Saari, K.J. Kairemo, H.A. Ramsay, R. Grenman, "Labelling of bleomycin with auger-emitter increases cytotoxicity in squamous-cell cancer cell lines," *Intl. J. Radiat. Biol.* 73, 565-570 (1998).
8. P.H. Stern, S.E. Halpern, P.L. Hagan, S.B. Howell, J.E. Dabbs, R.M. Gordon, "Cytotoxic activity, tumor accumulation and tissue distribution of ruthenium-103-labeled-bleomycin," *J. Nat. Cancer Inst.* 64, 807-811 (1981).
9. R.C. Brooks, P. Carnochan, J.F. Vollano, Z. Powell, J.K. Sasabowski, S. Martellucci, M.C. Darkes, S.P. Fricker, B.A. Murrer, "Metal complexes of bleomycin: evaluation [^{105}Rh]-Bleomycin for use in targeted radiotherapy," *Nucl. Med. Biol.* 26, 421-430 (1999).
10. P. Rowshanfarzad, M. Sabet, A.R. Jalilian, M. Kamalidehghan, "An overview of copper radionuclides and production of ^{61}Cu by proton irradiation of ^{nat}Zn at a medical cyclotron," *Applied Radiat. Isotopes*, 64, 1563-1573 (2006).
11. M. Blann, J. Bislinghoff, "Code Alice/Livermore 91, lawrence livermore national laboratory," Internal Report, UCID-19614 (1991).
12. J.F. Ziegler, J.P. Biersack, U. Littmark, "The code of SRIM- the stopping and range of ions in matter," Version 2000. X (2000).
13. A.M. Weisberg, "Gold plating," 9th Ed, ASM International, 247, U.S.A (1990).
14. R. Schwarzbach, K. Zimmerman, P. Bläuenstein, A. Smith, P.A. Schubiger, "Development of a simple and selective separation of ^{67}Cu from irradiated zinc for use in antibody labelling: a comparison of methods," *Appl. Radiat Isot.* 46, 329-335 (1995).
15. Z. Marczenko, "In: spectrophotometric determination of elements," 4th Ed, John Wiley & Sons Inc, 281, New York (1976).
16. Z. Marczenko, "In: spectrophotometric determination of elements," 4th Ed, John Wiley & Sons Inc, 601, New York (1976).
17. D.L. Melnyk, S.B. Horwitz, J. Peisach, "The oxidation-reduction potential of copper-bleomycin," *Inorganica Chimica Acta*, 138, 75-78 (1987).
18. W.E. Antholine, D. Solaiman, L.A. Saryan, D.H. Petering, "Studies on the chemical reactivity of copper bleomycin," *J. Inorganic Biochem.* 11, 7544-47 (1982).
19. Y. Litaka, H. Nakamura, T. Nakatani, "Optical spectrometric properties of copper-bleomycin," *J. Antibiotics*, 31, 1973-1975 (1978).
20. R.D. Bereman, M.E. Winkler, "A spectral investigation of the copper complex of the antitumor compound bleomycin," *J. Inorg. Biochem.* 13, 95-104 (1980).
21. A.D. Nunn, J. Lunec, "A comparison of the effect of metal-bleomycin complexes on the DNA damage and survival of cultured mammalian cells," *Eur. J. Cancer.* 14, 857-863 (1978).
22. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, "Bleomycin monograph," 31st. Ed. Vo. 1, 546-547 (1996).
23. Welwyn, Herts, "Proceedings of First International Symposium on Bleomycin," (1973), London, Lundbeck Ltd, 34 (1972).