

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

شماره پیاپی ۷، جلد ۲، شماره ۴، پاییز ۸۸، صفحه ۵۱ تا صفحه ۶۱

ارزیابی جذب توموری قطعه $F(ab')_2$ آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱ نشاندار شده با ^{99m}Tc در مدل موشی مبتلا به سرطان پستان

مجتبی صلوتی^۱، هاله فروتن^۲

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان saloutim@yahoo.com

۲- گروه پژوهشی رادیوایزوتوپ، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران.

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۷

چکیده

در مقایسه با آنتی بادی‌های کامل، قطعه‌های $F(ab')_2$ ویژگی بهتر و قابل ملاحظه‌ای برای جذب و نفوذ در تومور نشان می‌دهند. به طور کلی، موادی با وزن مولکولی پایین‌تر، نسبت جذب را در تومور نسبت به سایر بافت‌ها به دلیل تصفیه سریع‌تر در کلیه‌ها بهبود می‌بخشند. هدف از این بررسی هضم آنزیمی آنتی بادی PR ۸۱ و نشاندارسازی قطعه $F(ab')_2$ تهیه شده با تکنسیوم به منظور تولید یک رادیو داروی زیستی جهت تشخیص سرطان پستان به روش رادیو ایمونوسنتی گرافی است. بدین منظور آنتی بادی PR ۸۱ با استفاده از آنزیم پپسین برای مدت ۲۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هضم گردید. قطعه $F(ab')_2$ تولید شده به وسیله ستون کروماتوگرافی پروتئین A با بافر فسفات سالیین تخلیص شدند. خلوص قطعه $F(ab')_2$ به وسیله روش الکتروفورز بیش از ۹۵٪ تعیین گردید. ایمونوراکتیویته قطعه‌های آنتی بادی به وسیله روش رادیوایمونواسی ^{99m}Tc نشان دارسازی قطعه $F(ab')_2$ با استفاده از هاینیک با تکنسیوم به یک اکتیویته ویژه $5/2 \pm 0/1$ ٪ نتیجه داد. پایداری برون تنی فرآورده نشاندار شده در سرم خون انسان اندازه‌گیری شده توسط روش کروماتوگرافی غربالی $50/2 \pm 0/3$ ٪ بود. بررسی توزیع حیاتی در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق در موش‌های BALB/c دارای تومور پستان پیوندی، تجمع کمپلکس تولید شده را ۴ ساعت پس از تزریق فرآورده با حساسیت بالایی در تومور پستان بدون تجمع مشخصی در سایر ارگان‌ها نشان داد.

کلید واژه: سرطان پستان، رادیوایمونوسنتی گرافی، آنتی بادی PR ۸۱، قطعه $F(ab')_2$ ، نشان دار سازی با تکنسیوم.

مقدمه

این روش از اختصاصی بودن آنتی بادی تهیه شده بر علیه آنتی ژن‌های سطحی تومور مورد نظر برای هدف‌گیری فعال سلول‌های سرطانی و نشان‌دار سازی آنتی بادی با یک رادیوایزوتوپ مناسب به منظور تصویربرداری استفاده می‌شود (۱۸). آنتی ژن موسین اپی تلیال انسانی (MUC1) به شدت در آدنوکارسینوماها شامل ۸۰٪ از انواع سرطان‌های پستان انسان بیان می‌شود (۳).

سالانه بیش از ۳۰۰۰۰ نفر در ایران بر اثر ابتلا به سرطان فوت می‌کنند. شیوع سرطان سینه در ایران به میزان ۲۰ مورد جدید در هر ۱۰۰۰۰۰ زن در سال بوده و از آن جاکه تقریباً ۳۰ میلیون نفر از جمعیت ایران را زنان تشکیل می‌دهند، این میزان معادل ۶۰۰۰ مورد جدید سرطان سینه در هر سال است (۱). رادیو ایمونوسنتی گرافی یک روش جدید در تشخیص سرطان در پزشکی هسته‌ای می‌باشد. در

منحصر به فرد شامل دو ناحیه اتصال آنتی ژنیک مولکول معروف به _pF(ab')_۲ حاصل می شود. این قطعه دارای وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتون بوده و چون فاقد قطعه FC است، لذا اتصال غیر اختصاصی کمتری ایجاد و می توان در موارد بالینی زیادی از آن استفاده نمود (۷،۲۵). هدف از این تحقیق هضم پپسینی آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱ به منظور تولید قطعه های _pF(ab')_۲ نشاندارسازی قطعه ها بدست آمده با ^{۹۹m}Tc و بررسی میزان جذب توموری کمپلکس تولید شده در مدل حیوانی پیش از شروع بررسی انسانی تشخیص سرطان پستان است.

مواد و روش ها

تهیه آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱

کرایوتیوب حاوی سلول های هیبریدومای تولید کننده آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱ را به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از اضافه کردن ۹ میلی لیتر محیط کشت کامل (با ۱۰٪ FCS) به کرایوتیوب، سانتریفوژ و رسوب حاصل (حاوی سلول های هیبریدوما) در محیط کشت RPMI کامل با ۲۰٪ FCS قرار گرفت. در طی روز های بعدی محیط رویی سلول ها جمع آوری و سلول ها با محیط کشت جدید تغذیه شدند. این محیط حاوی آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱ به همراه سایر پروتئین های دیگر بود. با استفاده از فیلترهایی با قطر منفذ مناسب، جداسازی و نگهداری مولکول هایی با وزن مولکولی بالا از مولکول های کوچک انجام و رسوب دهی با آمونیوم سولفات به منظور حذف پروتئین های غیر ایمونوگلوبینی موجود در نمونه انجام شد. سپس نمونه در بافر فسفات سالین حل و به روش لوری تعیین غلظت گردید و به سازمان انرژی اتمی ایران، بخش رادیو ایزوتوپ منتقل و در اندازه های کوچک تر در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا شروع مراحل بعدی تحقیق نگهداری شد.

هضم آنزیمی آنتی بادی PR ۸۱ به قطعه های _pF(ab')

پس از دیالیز آنتی بادی PR ۸۱ در بافر استات سدیم

آنتی بادی PR ۸۱ یک آنتی بادی مونوکلونال برعلیه آنتی ژن MUC۱ است که توسط گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس تولید و معرفی شده است (۱۷). این آنتی بادی به دلیل داشتن واکنش اختصاصی بالا با سلول های سرطانی پستان انسان جهت اهداف تشخیصی و درمانی سرطان پستان مناسب می باشد. نشاندارسازی آنتی بادی مونوکلونال PR ۸۱ با تکنسیوم توسط صلوتی و همکاران انجام و نشان داده شده است که آنتی بادی نشاندار شده می تواند با حساسیت بالایی تومور پستان را در مدل های حیوانی هدف گیری نماید (۲۱،۲۲،۲۳،۲۴). نظر به این که آنتی بادی PR ۸۱ یک آنتی بادی موشی است، تزریق آن به انسان می تواند منجر به واکنش های آلرژیک (Response ibody Response:HAMA Anti Murine Antibody) شود (۱۸). هم چنین آنتی بادی های کامل به دلیل درشت بودن، کلیرنس پایینی از کلیه ها داشته و با ایجاد اکتیویته زمینه بالا در تصویرهای سینتی گرافی منجر به عدم تشخیص تومورهای کوچک خواهند شد (۷،۱۰،۱۵،۱۶،۱۹). لذا ضروری است قبل از کاربرد آنتی بادی PR ۸۱ در انسان، هضم آنتی بادی به منظور تولید قطعه های _pF(ab')_۲ از آنتی بادی با توجه به این که این قطعه ها نسبت به آنتی بادی کامل از ایمنی زایی کمتر و کلیرنس بالاتری برخوردارند، صورت گیرد (۲۸). هم چنین با توجه به این که نیمه عمر پلاسمایی ملکول IgG بسیار طولانی تر از نیمه عمر فیزیکی ^{۹۹m}Tc می باشد، نشاندار ساختن ملکول IgG با این رادیوایزوتوپ مناسب نبوده و باید از قطعه های آن با وزن ملکولی کمتر استفاده کرد تا بین نیمه عمر آن ها اختلاف چشم گیری وجود نداشته باشد (۱۱). بیش از ۵۰ سال است که از آنزیم های پروتئولیتیک جهت شکستن آنتی بادی ها استفاده می شود. در این تحقیق از آنزیم پپسین جهت هضم آنتی بادی PR ۸۱ استفاده شد. در هضم پپسینی، اتصال دی سولفیدی بین دو زنجیره سنگین آنتی بادی واقع در قسمت انتهای مولکول (انتهای کربوکسی) قطع و در نتیجه یک قطعه

PR ۸۱ با ^{99m}Tc در این مرحله به منظور دستیابی به کمپلکسی پایدارتر و حفظ هر چه بیشتر ایمونوراکتیویته آنتی بادی در طی مراحل نشان‌دار سازی از هاینیک (HYNIC) به عنوان عامل همبند کننده دو منظوره و Tricine به عنوان کولیگاند جهت نشان‌دار سازی آنتی بادی با ^{99m}Tc به روش غیرمستقیم استفاده شد (۲۳). بدین منظور بافر آنتی بادی (بافر فسفات سالین) با بافر بورات ۰/۱ مولار با pH ۵/۸ به روش دیالیز تعویض گردید. شلاتور هاینیک با غلظت ۳۰ میلی مولار در دی متیل سولفو کسید (DMSO) به آنتی بادی به نسبت ۵۰ برابر مولی افزوده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. بافر آنتی بادی (بافر بورات) با بافر سترات به pH ۲/۵ به روش دیالیز تعویض و غلظت آنتی بادی در بافر سترات به روش لوری تعیین گردید. کولیگاند با استفاده از تراپسین و کلرید قلع تهیه و ^{99m}Tc به کولیگاند اضافه گردید. کمپلکس-Tricine- ^{99m}Tc به کمپلکس ^{99m}Tc -HYNIC-F(ab')_۲ به نسبت ۲۰ میلی کوری به ازاء هر یک میلی گرم آنتی بادی افزوده شد.

کنترل کیفی آنتی بادی نشان‌دار شده

پس از نشان‌دار سازی آنتی بادی منوکلونال با ^{99m}Tc به روش فوق، جهت بررسی خصوصیات فرآورده نشان‌دار شده آزمایش‌های زیر بر روی آن انجام گردید (۲۶، ۲۵، ۱۴، ۹، ۲).

تعیین بازده نشان‌دار سازی

در این تحقیق جهت تعیین بازده نشان‌دار سازی از روش ITLC-SG با فاز متحرک نرمال سالین استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ورقه ITLC در ابعاد ۱۴×۱ سانتی‌متر بریده و به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از ابتدای آن نمونه‌گذاری (۵ میکرولیتر) و پس از خشک شدن نمونه، ورقه را برای جداسازی در تانک محتوی نرمال سالین قرار داده و بعد از طی حدود ۱۰ سانتی‌متر توسط فاز متحرک، به ورقه فرصت داده شد تا خشک

۰/۱ مولار با pH ۲/۴، آنزیم پپسین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نسبت وزنی ۱ به ۲۰ (آنزیم به آنتی بادی) به آنتی بادی اضافه و محلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در واتر بث انکوبه شد. در زمان‌های ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ ساعت از محلول نمونه برداری و میزان هضم آنتی بادی با الکتروفورز به روش SDS-PAGE بررسی و زمان مناسب هضم به دست آمد. واکنش هضم با اضافه کردن تریس ۲HCl مولار با pH ۸ به میزان ۰/۰۲۵ حجم محلول آنتی بادی، پس از زمان مناسب جهت هضم کامل متوقف گشت. قطعه‌های F(ab')_۲ با استفاده از روش افینیتی کروماتوگرافی به وسیله پروتئین A تخلیص و خلوص آن با الکتروفورز به روش SDS-PAGE بررسی گردید (۲۰، ۵، ۴).

سنجش ایمونوراکتیویته قطعه‌های F(ab')_۲

از سلول‌های MCF ۷ (۰/۷ سلول در میلی‌لیتر)، رقت‌های متوالی با غلظت‌های $10^6 \times 1/25$ ، $10^6 \times 2/5$ ، $10^6 \times 5$ ، $10^6 \times 10/25$ ، $10^6 \times 31$ ، $10^6 \times 625$ ، $10^6 \times 31$ تهیه و حجم آن با بافر فسفات سالین دارای ۱٪ بووین سرم آلبومین به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد (به صورت ۳ تایی). سپس قطعه‌های F(ab')_۲ با I ۱۲۵ به روش کلرامین تی نشان‌دار و به هر یک از لوله‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر F(ab')_۲ نشان‌دار شده با غلظت ۴۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (حدود ۱۰۰۰۰ شمارش در دقیقه) اضافه شد. لوله‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سلول‌ها در سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. اکتیویته رسوب سلولی و محلول رویی هر لوله با استفاده از گاما کانتور شمارش و نسبت اکتیویته باند شده به اکتیویته کل برای هر نمونه محاسبه گردید. با استفاده از منحنی Lineweaver-Burk (رسم منحنی اکتیویته باند شده به اکتیویته کل در مقابل عکس غلظت سلول‌ها) و بر اساس روش شرح داده شده به وسیله Lindmo درصد ایمونوراکتیویته آنتی بادی نشان‌دار شده به دست آمد (۱۴).

نشان‌دار سازی قطعه‌های F(ab')_۲ آنتی بادی منوکلونال

آنانلیز و قسمت‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری و جداگانه با دستگاه شمارش گاما مورد شمارش قرار گرفتند.

بررسی توانایی اتصال سلولی

سلول‌های MCF۷ در یک پلیت ۹۶ چاهکی استریل (3×10^4 سلول در هر چاهک) کشت داده شدند تا به صورت تک لایه در کف هر چاهک رشد نمایند و به حالت توقف رشد برسند. این سلول‌ها توسط متانل سرد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. به هر چاهک مقدار ثابت ۱۵ کیلو بکرل از $F(ab')_2$ نشان‌دار شده، از غلظت صفر تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از PR ۸۱ سرد اضافه گردید. پس از گذشت ۳ ساعت در دمای اتاق، مقدار ماده رادیواکتیو متصل شده به سلول‌ها با استفاده از یک شمارش گراشعه گاما شمارش شد.

بررسی توزیع حیاتی $F(ab')_2$ نشاندار در موش‌های

مبتلا به سرطان پستان

تومور پستان تهیه شده از یک موش مبتلا به آدنوکارسینوما پستان خود به خود در ۳ گروه ۵ تایی از موش‌های BALB/c ماده در پهلوی راست پیوند گردید. پس از رشد تومورها به حدود ۱ سانتی متر مکعب (پس از گذشت ۳ هفته از زمان پیوند) قطعه $F(ab')_2$ آنتی بادی PR ۸۱ با ^{99m}Tc به روش غیر مستقیم با استفاده از HYNIC نشاندار و از طریق ورید دم به موش‌های مبتلا به تومور پستان (هر موش ۱۵-۱۰ میکروگرم آنتی بادی، ۳۰۰-۲۰۰ میکروکوری اکتیویته در حجم کلی ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر) تزریق گردید. ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق آنتی بادی نشان‌دار شده به صورت تصادفی تعدادی از موش‌ها کشته و اعضاء بدن موش‌ها شامل خون، کبد، طحال، کلیه، معده، روده‌ها، قلب، عضله و استخوان به علاوه تومور در هر یک از ساعت‌ها بیرون آورده شده، توزین و اکتیویته آن‌ها با استفاده از دستگاه گاما کانتر شمارش و درصد دوز جذب شده در هر گرم از بافت‌ها ریخته و با (g/ID) بیان گردید.

گردد. آن گاه ورقه را به قطعه‌های ۱ سانتی‌متری بریده و مقدار اکتیویته در هر قطعه توسط دستگاه شمارنده گاما شمارش می‌شود. مجموع اکتیویته موجود در دو سانتی‌متر اول به اکتیویته کل تقسیم تا بازده نشان‌دار سازی به دست آید. بازده نشان‌دار سازی در مقاطع زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه پس از شروع واکنش تعیین می‌گردد.

بررسی میزان رادیوکلوئیدها

میزان رادیوکلوئیدها با استفاده از روش الکتروفورز نترات سلولز تعیین گردید. برش‌هایی از کاغذ نترات سلولز به اندازه 150×80 میلی‌متر را در بافر الکتروفورز (بافر سیترات ۵ میلی مولار، فسفات ۰/۰۹ مولار و $pH=7/4$) خیسانده و در تانک الکتروفورز قرار داده شد. نمونه‌های ۵ میکرولیتری را روی برش‌ها ریخته شده و یک جریان ۲۰ میلی‌آمپری به مدت ۲ ساعت برقرار گردید. پس از خشک شدن، برش‌ها بریده شده و جداگانه توسط دستگاه گاما کانتر شمارش گردیده و با تقسیم اکتیویته محل ریختن نمونه به اکتیویته سایر قسمت‌ها میزان رادیوکلوئید به دست آمد.

بررسی پایداری کمپلکس نشاندار شده در درجه حرارت اتاق

در زمان‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از شروع نشان‌دار سازی، پایداری فرآورده نشان‌دار شده در درجه حرارت اتاق با استفاده از روش ITLC-SG اندازه‌گیری شد.

بررسی پایداری آنتی بادی نشاندار شده در سرم خون

انسان

جهت بررسی پایداری فرآورده تولید شده در سرم خون انسان در طی ۲۴ ساعت، از دستگاه کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین (FPLC) استفاده شد. در این روش از ستون کروماتوگرافی غربالی (Superose ۱۲HR ۱۰/۳۰) به عنوان فاز ساکن و از بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با $pH=7$ به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط آنتی بادی نشان‌دار شده و سرم تازه خون انسان با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر روی ستون ریخته و با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه توسط آشکارساز ماوراء بنفش

نتایج

هضم آنتی بادی

با توجه به آزمایش‌های به عمل آمده با الکتروفورز به روش SDS-PAGE مشخص گردید که ۲۸ ساعت پس از شروع واکنش هضم، بهترین زمان جهت هضم آنتی بادی PR۸۱ در نسبت مولی ۱ به ۲۰ (آنزیم به آنتی بادی) است (شکل ۱)، زیرا بعد از این مدت دیگر مولکول IgG تقریباً در محیط باقی نمانده و به قطعه‌های F(ab')_۲ با خلوص بیشتر از ۹۵٪ تبدیل می‌شوند و ادامه واکنش هضم نیز منجر به کاهش بیشتر ایمونواکتیویته آنتی بادی می‌گردد.

ایمونواکتیویته قطعه‌های F(ab')_۲ آنتی بادی PR۸۱
ایمونواکتیویته قطعه‌های آنتی بادی با استفاده از روش Lindmo، ۶۵/۲±۵/۱، با محور Y در نمودار ۱ برابر ۱/۵۳ است و طبق تعریف عکس این مقدار برابر ایمونواکتیویته است (نمودار ۱).

بازده نشان دارسازی

با استفاده از روش ITLC-SG، بازده نشان دارسازی

در مقاطع زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه پس از شروع واکنش تعیین شد. نتایج نشان داد که بازده نشان‌دار سازی ظرف یک ساعت پس از شروع واکنش به ۵/۲±۷۰/۱ می‌رسد (نمودار ۲).

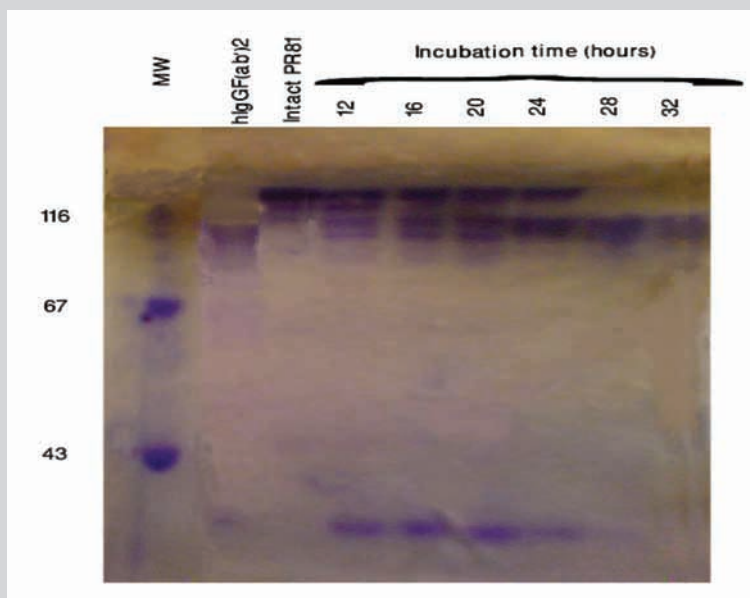
بررسی میزان رادیوکلوئیدها

نتایج به دست آمده از بررسی میزان رادیوکلوئیدها با استفاده از دستگاه الکتروفورز نیترات سلولز نشان داد که میزان رادیوکلوئیدها کمتر از ۰/۷±۴/۳٪ است (نمودار ۳).

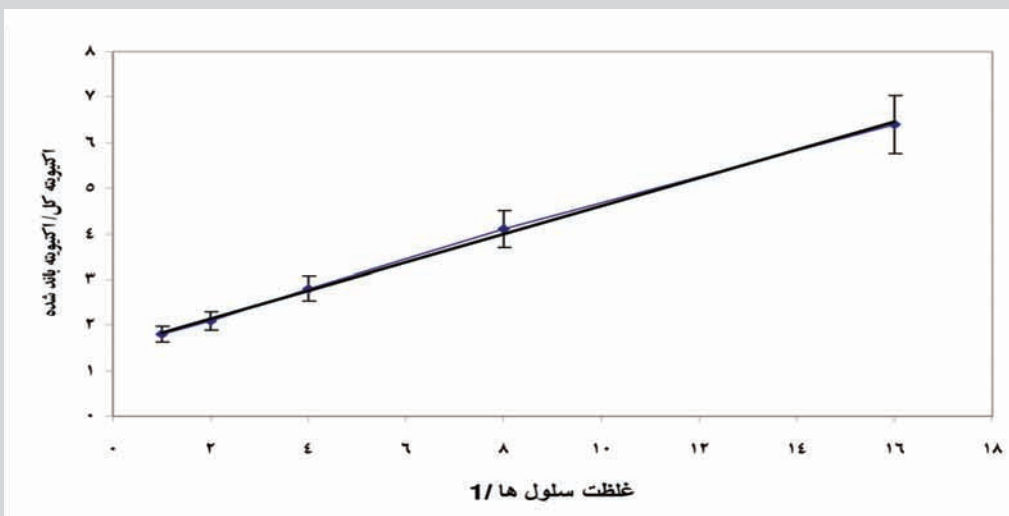
پایداری قطعه نشان دار شده در درجه حرارت اتاق

در نمودار ۴ پایداری کمپلکس نشان‌دار شده در درجه حرارت اتاق در زمان‌های مختلف پس از شروع نشان‌دار سازی (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، به دست آمده با روش ITLC-SG نشان داده شده است.

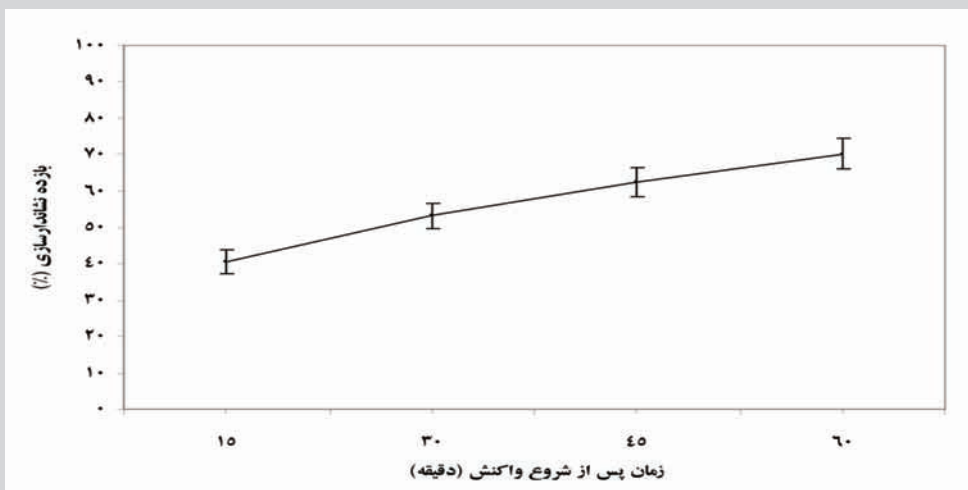
همان‌طور که مشاهده می‌شود آنتی بادی نشان‌دار شده از پایداری بسیار خوبی در دمای اتاق برخوردار است و کاهشی در میزان بازده پس از ۲۴ ساعت از شروع واکنش مشاهده نمی‌شود.



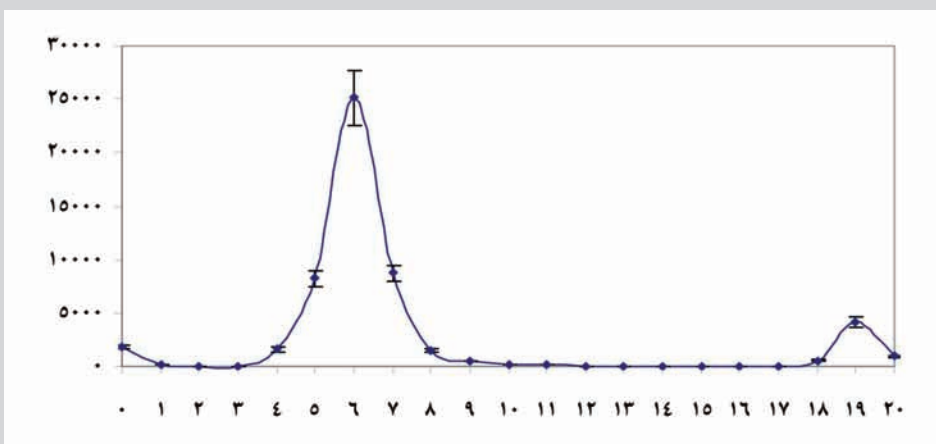
شکل ۱- الکتروفورز پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات از فرآورده ^{۹۹m}Tc-HYNIC-F(ab')_۲ با رنگ آمیزی کوماسی آبی. ستون اول: استانداردهای وزن مولکولی (MW)، ستون دوم: قطعه‌های F(ab')_۲ تهیه شده از hIgG به عنوان شاهد، ستون سوم: آنتی بادی PR۸۱ دست نخورده، ستون چهارم تا نهم: آنتی بادی PR۸۱ هضم شده توسط آنزیم پیپسین در زمان‌های ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ ساعت پس از شروع واکنش هضم.



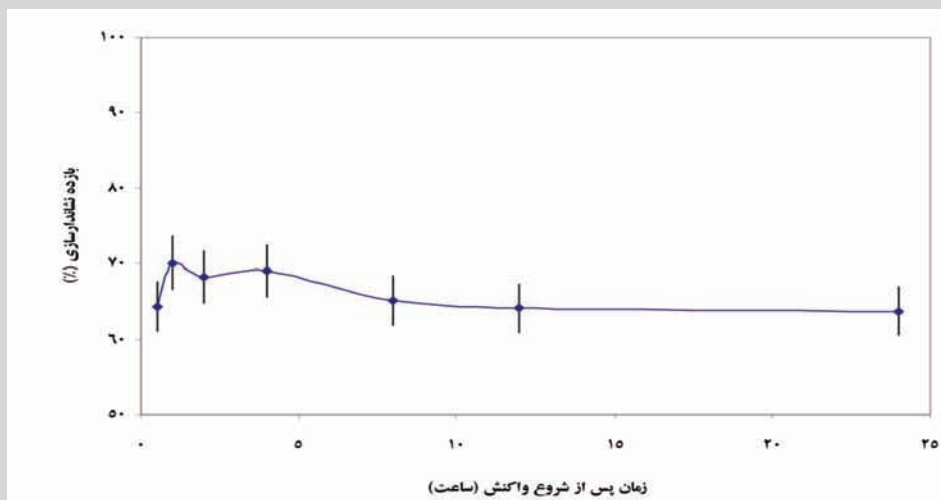
نمودار ۱- نمودار ایمونوراکتیویته در مورد توانایی فرآورده تولید شده در اتصال به سلول های MCF ۷



نمودار ۲- نمودار بازده نشاندارسازی قطعه آنتی بادی نشان دار شده با ^{99m}Tc با استفاده از HYNIC در طی ۶۰ دقیقه پس از شروع واکنش (n=۵).



نمودار ۳- رادیوکروماتوگرام قطعه آنتی بادی نشاندار شده با ^{99m}Tc با استفاده از HYNIC



نمودار ۴- نمودار پایداری کمپلکس $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab')}_2$ در طول ۲۴ ساعت پس از شروع واکنش در درجه حرارت اتاق (n=۵)

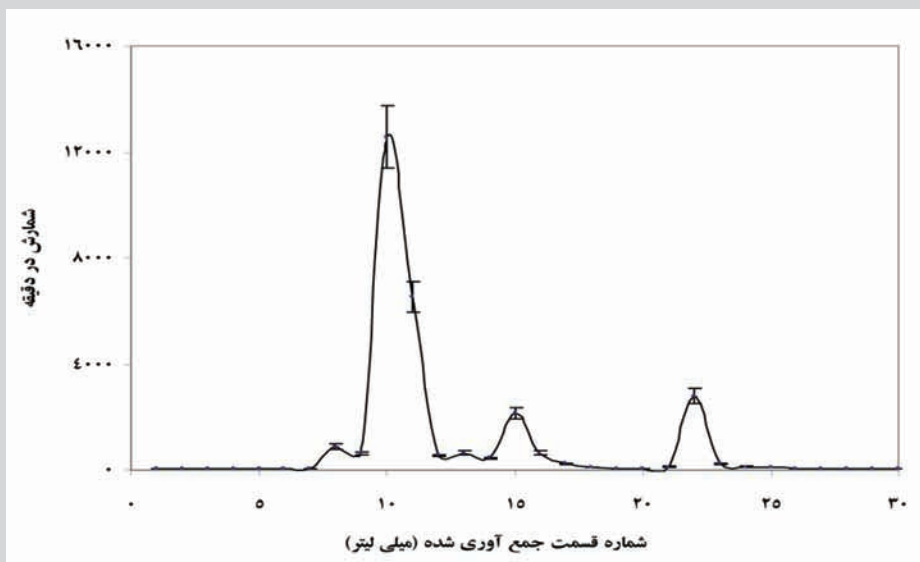
بررسی توزیع حیاتی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab')}_2$ در

موش‌های مبتلا به تومور پستان

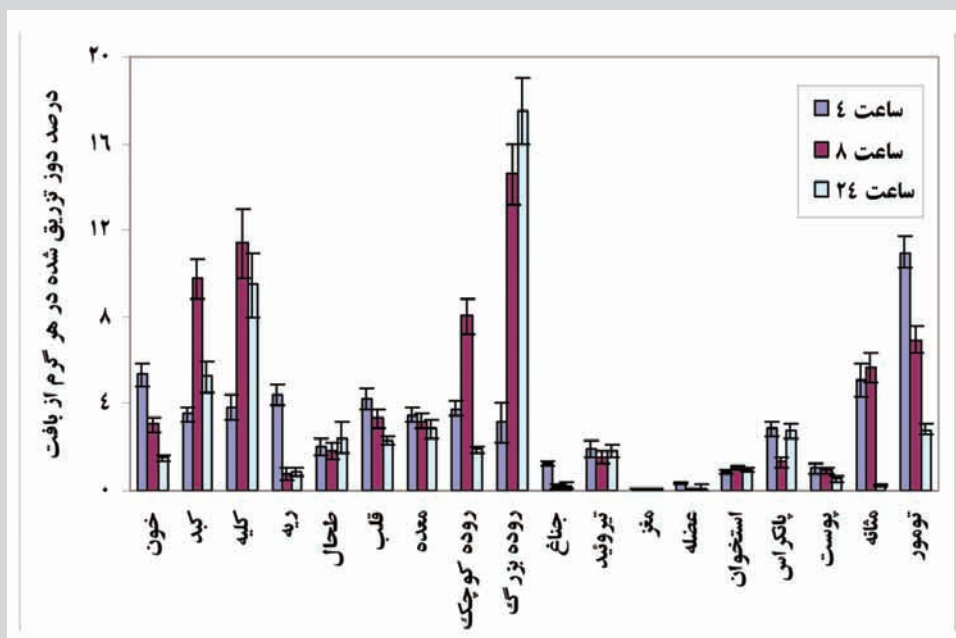
نمودار ۶ نتایج حاصل از توزیع حیاتی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab')}_2$ را در موش‌های بلب سی مبتلا به تومور پستان در ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق وریدی بر حسب متوسط درصد دوز تزریق شده در هر گرم از بافت نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که فرآورده تولید شده

پایداری قطعه نشاندار شده در سرم خون انسان

نتایج کروماتوگرافی غربالی نشان داد که $55.2 \pm 5.3\%$ از کل رادیواکتیویته به یک پیک همگن با یک زمان بازداری مشابه با آنتی بادی نشان دار نشده مربوط است. این نتایج پایداری آنتی بادی نشان دار شده در سرم خون انسان و در نتیجه مطلوب بودن فرآورده تولید شده جهت بررسی‌های تشخیصی درون تنی را نشان می‌دهد (نمودار ۵).



نمودار ۵- نمودار رادیوکروماتوگرافی غربالی از فرآورده $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab')}_2$ با دستگاه FPLC پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در سرم خون انسان



نمودار ۶- توزیع حیاتی ^{99m}Tc -HYNIC- $F(ab')$ در موش‌های بابل سی مبتلا به تومور پستان انجام شده در ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق و بیان شده بر حسب متوسط درصد دوز تزریق شده در هر گرم از بافت (ID/g).

کنیم $(5/2 \pm 70/1)$. این روش در مقایسه با روش‌های مستقیم نشان‌دار سازی نه تنها تمامی ویژگی‌های لازم روش‌های نشان‌دار سازی را دارا است بلکه به دلیل اتصال با واسطه ^{99m}Tc به آنتی بادی، قدرت اتصال آنتی بادی را تغییر نمی دهد. اندازه گیری ایمونوراکتیویته قطعه‌های $F(ab')$ توسط روش Lindmo کاهش قابل ملاحظه‌ای را در ایمونوراکتیویته آنتی بادی نشان‌دار شده نشان نمی دهد (۲۷).

در تحقیق حاضر به دلیل عدم دسترسی به موش nude مجبور بودیم که از روش تولید تومور پستان به روش پیوند بافت توموری از مدل موشی هم خون مبتلا به تومور پستان خودبه‌خود به سایر موش‌های هم خون استفاده کنیم. بدین منظور بار اول موش مبتلا به تومور پستان از گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد که خود یک موش هم خون توموری به روش پیوند بافت بود. تومور اولیه بافت پیوندی نیز از یک تومور خودبه‌خود ایجاد شده در یک موش BALB/c ماده هم خون بوده که بر طبق بررسی‌های پاتولوژیک گروه

۴ ساعت پس از تزریق به میزان بالایی نسبت به سایر بافت‌های طبیعی در تومور پستان تجمع یافته است.

بحث و نتیجه‌گیری

ساده‌ترین روش برای نشان‌دار ساختن آنتی بادی‌ها، روش مستقیم است که در طی آن پیوندهای دی سولفیدی در مولکول IgG توسط یک احیاء کننده ملایم، احیاء شده و به گروه‌های سولفیدریل تبدیل و سپس تکنسیم از طریق این گروه‌ها به آنتی بادی متصل می‌گردد (۲۶). اما متأسفانه این روش به دلیل کاهش قابل ملاحظه ایمونوراکتیویته آنتی بادی قابل کاربرد برای نشان‌دار سازی قطعه‌های $F(ab')$ آنتی بادی نیست (۲۵). به این منظور نشان‌دار سازی قطعه آنتی بادی با تکنسیوم به روش غیرمستقیم با استفاده از هاینیک به عنوان همبند مطرح گردید. زیرا بر طبق بررسی‌های گزارش شده این ماده منجر به بازده نشان‌دار سازی بالای آنتی بادی با خلوص بالا در مدت زمان کوتاهی می‌شود (۱۲، ۱۳). در این بررسی ما توانستیم با استفاده از هاینیک و تراپسین، قطعه $F(ab')$ آنتی بادی PR ۸۱ را با تکنسیوم با بازده بالا نشان‌دار

آنتی بادی از تومور، اکتیویته تومور پستان از ساعت هشتم پس از تزریق کاهش یافته و تفاوت اکتیویته تومور با سایر اندام‌ها رو به کاهش می‌گذارد و این تفاوت در ۲۴ ساعت پس از تزریق به حداقل خود می‌رسد. بر طبق بررسی‌های گزارش شده، نسبت اکتیویته تومور به بافت‌های اصلی از حدود ۲-۱/۵ راضی کننده است (۴). در این بررسی این نسبت $0.45 \pm 2/66$ در مورد رادیوداروی جدید است. میزان بالای اکتیویته در کبد، کلیه‌ها و روده‌ها نیز به علت متابولیزه شدن آنتی بادی نشان‌دار شده در کبد و وجود تکنسیم آزاد در خون به علت واپاشی کمپلکس تزریق شده است که در نتیجه تکنسیم در کلیه‌ها و روده‌ها تجمع پیدا می‌کند (۶). این موضوع به دلیل میزان تزریق پایین اکتیویته در بررسی‌های رادیوایمونوسینتی گرافی مهم

ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس، تومور بدخیم از نوع آدنوکارسینومای پستان می‌باشد (۸). سپس با روش پیوند بافت توموری به موش‌های BALB/c ماده هم خون، نمونه‌های مورد نظر جهت آزمایش‌های بعدی را تولید کردیم. سپس با نشاندار سازی قطعه $F(ab)'$ آنتی بادی PR ۸۱ به روش غیرمستقیم و تزریق پرتو، داروی تولیدی به موش‌های مبتلا به تومور پستان، آزمایش‌های توزیع حیاتی در ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق بر روی مدل موشی انجام شدند. نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که آنتی بادی نشان‌دار شده از همان ساعات اولیه (۴ ساعت پس از تزریق رادیو دارو) به میزان بالایی در تومور پستان نسبت به سایر بافت‌ها تجمع می‌یابد. با افزایش زمان پس از تزریق و به دلیل احتمالی جدا شدن تدریجی قطعه

منابع

ments in cancer radio-immunotherapy: influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer*, 77, 787-795.

6. Buchsbaun, D.J. (1995). Experimental approaches to increase radiolabeled antibody localization in tumor. *Cancer Res*, 55, 5729-5732.

7. Demignot, S., Garnett, M.C., Baldwin, R.W. (1989). Mouse IgG2b monoclonal antibody fragmentation. Preparation and purification of Fab, Fc and Fab/c fragments. *JIM*, 121, 209-217.

8. Ghazanfari, T., Mohammad, Z., Yaraie, R. (1998). Recognition and determination of immunogenicity of a spontaneous tumor in a BALB/c mouse. *Daneshvar*, 24 65-72.

9. Johnstone, A., Thorpe, R. (1996). Basic techniques. In: Johnstone A, Thorpe R, editors. *Immunochemistry in practice*. Blackwell Science Ltd, 1-34.

10. Kurkela, R., Vuolas, L., Vihko, P. (1988). Preparation of $F(ab)'$ fragments from monoclonal mouse IgG1 suitable for use in radioimaging.

۱- عامل بارز، ملیکه. ۱۳۸۲. بررسی ارتباط سقط و ابتلا به سرطان پستان. پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد رشته مامایی. دانشگاه تربیت مدرس.

2. Abrams, M.J., Juweid, M., Tenkate, C.I. (1990). Technetium-99m human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med*, 31, 2022-2028.

3. Akewanlop, C.h., Watanabe, M., Singh, B., Walker, M., Kufe, D.W., Hayes, D. (2001). Phagocytosis of breast cancer cells mediated by anti-MUC1 monoclonal antibody, DF3, and its bispecific antibody. *Cancer Research*, 61, 4061-4065.

4. Babaei, M.H., Farshidfar, R., Najafi, R. (2002). Evaluation of tumor targeting with radiolabeled $F(AB)'$ fragment of a humanized monoclonal antibody. *DARU*, 10(2), 49-53.

5. Behr, T.M., Memtsoudis, S., Sharkey, R.M., Blumenthal, R.D., Dunn, R.M., Gratz, S. (1998). Experimental studies on the role of antibody frag-

JIM, 110, 229-236.

11. Lamki, L.M. (1990). Radioimmunoscintigraphy of cancer, problems, pitfalls and prospects. In: Freeman, L.M. (ed) Nuclear Medicine Annual 1990, Raven Press, New York, 113 - 150.

12. Larsen. S.K., Caldwell, G., Higgins, J.D., Abram, M.S., Solomon, H.F. (1994). Technetium complex of tricine: useful precursor for the ^{99m}Tc labelling of hydrazino nicotinamide modified proteins. J Label Compd Radiopharm, 35, 1-2.

13. Lee, H.J., Pardridge, W. (2003). Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics and tumor imaging. Bioconjugate Chem, 14, 546-553.

14. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., Bunn, P.J. (1983). Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation of binding at infinite antigen excess. J Immunol Methods, 65, 55-63.

15. Mariani, M., Camagna, M., Tarditi, L., Seccamani, E. (1991). A new enzymatic method to obtain high -yield F(ab')₂ suitable for clinical use from mouse IgG1. Molecular Immunology, 28(1/2), 69-77.

16. Milenic, D.E., Esteban, J.M., Colcher, D. (1989). Comparison of methods for the generation of immunoreactive fragments of a monoclonal antibody (B72.3) reactive with human carcinomas. JIM, 120, 71-83.

17. Paknejad, M., Rasaee, M.J., Karami, F., Kashanian, S., Mohagheghi, M.A., Omidfar, K. (2003). Production of monoclonal antibody, PR81, recognizing the tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybridoma and Hybridomics, 22(3), 153-158.

18. Potamianos, S., Varvarigou, A.D., Archi-

mandritis, S.C. (2000). Radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: principles and application. Anticancer Res, 20, 925-948.

19. Rea, D.W., Ultee, M.E. (1993). A novel method for controlling the pepsin digestion of antibodies. JIM, 157, 165-173.

20. Rhodes, B.A., Torvestad, D.A., Breslow, K. (1982). ^{99m}Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies and antibody fragments. In: Burchell SW, Rhodes BA, editors. Tumor Imaging. New York: Mason. 111.

21. Salouti, M., Rajabi, H., Babaei, H., Rasaee, M.J., Najafi, R., Paknejad, M and et.al. (2005). ^{99m}Tc direct radiolabeling of PR81, a new anti-MUC1 monoclonal antibody for radioimmunoscintigraphy. Iran J N M, 23, 7-16.

22. Salouti, M., Rajabi, H., Babaei, M.H., Rasaee, M.J., Najafi, R. (2005). Radioimmunoscintigraphy of breast tumor xenografts in mouse model by ^{99m}Tc direct radiolabeling of a monoclonal antibody PR81. The Iranian Journal of Medical Physics, 2(8), 27-34 .

23. Salouti, M., Rajabi, H., Babaei, M.H., Rasaee, M.J., Najafi, R., Paknejad, M and et.al. (2006). A new monoclonal antibody radiopharmaceutical for radioimmunoscintigraphy of breast Cancer. Direct Labeling of Antibody and Its Quality Control, DARU, 14(1), 14-19.

24. Salouti, M., Rajabi, H., Babaei, M.H., Rasaee, M.J. (2008). Breast tumor targeting with ^{99m}Tc-HYNIC-PR81 complex as a new biologic radiopharmaceutical. Nuclear Medicine and Biology, 35, 763-768.

25. Schwarz, S.W., Connett, J.M., Anderson, C.J. (1994). Evaluation of a direct method for technetium labeling intact and F(ab')₂ 1A3, an anticolorectal monoclonal antibody. Nucl. Med. Biol, 21, 619 - 626.

26. Verbruggen, A.M. (1990). Radiopharma-

ceuticals: state of the art. *Eur J Nucl Med*, 17, 346 - 364.

27. Verhaar, M.J., Zonnenberg, B.A., Klerk, J.M.H., Blijham, G.H. (2000). Radioimmunodiagnosis and therapy. *Cancer Treatment Reviews*,

26, 3-10.

28. Yamaguchi, Y., Kim, H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I., Arata, Y. (1995). Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. *JIM*, 181, 259-267.

