جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نشاندارسازی ستوکسیمب با تکنسیوم^{99m}بوسیله شلاتورHynic و بررسی پراکنش زیستی آن در رت های سالم

سید میعاد هاشمی زاده ، سعید رجبی فر* ، بهروز علیرضاپور ، احسان معادی ، لیلا عونی
سازمان انرژی اتمی ایران ، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای ، پژوهشکده کاربرد پرتو ها

چکیده :

کانژوگاسسیونستوکسیمب با استفاده از شلاتورهای نیک با کمک تریسین و کلرید قلع با ۳۷ مگا بکرل تکنسیوم^{99m}پراکنش زیستی رادیو دارو در ارگانهای مختلف در رتهای سالم(n=3)در ۱ ، ۳ و ۲۴ ساعتبررسیشد، خلوص رادیونوکلئیدیتکنسیوم^{99m} با استفاده از دستگاه گاما کانترHPGe بررسی شد ، خلوص رادیوشیمیای ۹۶٪ در ۶۰ دقیقه در دمای اتاق بوسیله ی دستگاه RTLCاسکنربه دست آمد ، مطالعات پایداری در سرم خون و بافر فسفات سالین تا ۵ ساعت بیشتر از ۹۰٪ پایدار بود ، نتایج پراکنش زیستی در مورد رادیو دارو مناسب گزارش شد .

مقدمه :

ستوکسیمب یک آنتی بادی منوکلونال با پیوستگی بالاتر از فاکتور رشد اپیدرمال(EGFR)به گیرنده های این فاکتور در سطح سلول متصل می شود ، این آنتی بادی در درمان‌های بالینی برای بیماران مبتلا به سرطان‌های ریه، سر، گردن و کولورکتال موفق عمل کرده [۱]و همچنین در موارد تحقیقاتی بر روی سرطان سینه دارای اثر مثبت بوده[۲]، این تحقیق با هدف نشاندار سازی ستوکسیمب به وسیلیهتکنسیوم^{99m} و هاینیک به عنوان شلاتور انجام شد ، راندمانشاندار سازی با استفاده از دستگاه RTLC انجام شد ، آزمایش های مربوط به پایداری و همچنین پراکنش زیستی انجام شد .

در موضوعات مشابه تکنیک های مورد استفاده در تعدادی از مقالات و یافته های علمی مشاهده شد که نشاندار سازی و مطالعات حیوانی آنتی بادی ها با تکنسیوم انجام پذیرفته است ، از جمله آنها می توان به نشاندار سازی تراستوزومب با تکنسیوم^{99m} توسط Tang و همکارانش با استفاده از شلاتورهاینک که با روش Fab fragmentsکه برروی سرطان سینه در سال ۲۰۰۵ انجام شد[۳] و نشاندار سازی تراستوزومب با تکنسیوم^{99m}بصورت مستقیم با استفاده از تکنیک tricarbonyl ion توسط wan jouchen و همکارانش در سال ۲۰۰۸[٤] ، همچنین نشاندار سازی تراستوزومب با تکنسیوم^{99m} و با استفاده از هاینیک در سال ۲۰۱۳ توسط Calzada و همکارانش انجام شد [۵]

روش کار :تکنسیوم مورد استفاده در این پروژه از ژنراتور های ^{99}Mo/^{99m} Tc، ستوکسیمابIMC-C225 تحت نام اربیتوکس آنتی بادی منوکلونال مورد استفاده در این تحقیق و Hynicهیدرازینونیکوتینیک اسید شلاتور دو

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

عاملی برای تکنسیوم می باشد ، تریسینبه عنوان یک کولیگاند برای Hynicعمل کرده و از کلرید قلع عامل احیا کننده جهت جلوگیری از اکسید شدن تکنسیوم استفاده می شودسفادکسبرای انجام ژل کروماتوگرافی و همچنین از سرم خون انسانی برای انجام تست های پایداری استفاده شده است ، همچنین در این پروژه از تجهیزات مناسب و با کیفیت بالا مانند دستگاه RTLC Scanner، دستگاه گاماکانتر HPGe،دستگاه شمارندهچاهی (کوریمتر) ، ترازو ، ژنراتورمولیبدن / تکنسیوم^{99m}، دستگاه هیتر-استیرر (هات پلیت مگنت) ، ستون PD10 ، ستون های اولترافیلترVivaspin ، بایوفوتومتر ، دستگاه pHمتر ، دستگاه گاما کانتر ، کاغذ واتمن ،سانتریفوژ ، پلیتسیلیکاژل

کنجوگاسیون آنتی بادی ستوکسیماب با شلاتورS-Hynic :محلولی حاوی ستوکسیمب خالص سازی شده ۵۰۰ میلی گرم یا ۱۶۵ میکرو لیتر طبق قسمتی ازپروتوکل خالص سازی پروتئین با استفاده از ستون های ویوااسپسن ۳۰ کیلو دالتون و بافربیکربنات ۹/۲[:pH٦]، ۳۳ میکرو لیتر از سدیم بیکربنات ۱ مولار و ۱ میلی گرم از Hynic را در ۷۰ میکرو لیتر ازDMSOحل می کنیم ، مخلوط را در دمای ۱۸-۲۵ به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته تا واکنش مورد نظر کانژوگاسیونHynic با ستوکسیماب انجام شود . پس از کانژوگاسیون محلول مورد نظر را از ستون PD10 عبور داده با استفاده از بافربیکربنات تمام آن را خارج می کنیم تا هاینیک های که وارد واکنش نشده اند از محیط واکنش خارج شود . [۵]

نشاندارسازیکانژوگه Hynic-Cetuximab با تکنسیوم^{99m} :مقدار ۸۰ میلی گرم از تریسین را در ۸ میلی لیتر آب مقطر در یک ویال ریخته و pH آن را باHCl ۲ مولار در ٤/٥ تنظیم میکنیم (ویال A)

۸.٤ میلی گرم از $SnCl_2$را در ۰/۵ میلی لیتر ازHCl ۲ مولار حل کرده و با استفاده از نرمال سالین به حجم ۱۰ میلی لیتر میرسانیم (ویالB)

در این مرحله با استفاده از گاز نیتروژن به درون میکروتیوپ میدمیم تا اکسیژن از داخل محلول و از درون میکرو تیوپ به خارج رود به دلیل اینکه تکنسیوم باید در محیطی عاری از اکسیژن واکنش انجام دهد (در محیط دارای اکسیژن دچار اکسیداسیون می شود و به فرم کلوئیددر میاید)سپس آنتی بادی کانژوگه شده را با مخلوطی حاوی ۸۰ میکرو لیتر از ویال A و ۵۰ میکرو لیتر از ویال B مخلوط کرده و دوباره با گاز نیتروژن در آن می دمیم ، سپس محلول حاصل را به ویال حاوی ۱ میلی کوری تکنسیوم اضافه میکنیم در دمای محیط و در تاریکی برروی استیرر با استفاده از مگنت با درجه ۲ مخلوط می شود ؛ توجه کنید در این مرحله حجم کل محلول نباید بیشتر از ۲ میلی لیتر باشد ؛ محلول درون میکروتیوپ پایانی را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی گراد کنار میگذاریم تا واکنش نشاندار سازی مورد نظر انجام شود ،پس از انجام واکنش نشاندار سازی اقدام به نمونه برداری از رادیو دارویه مورد نظر در زمان های مختلف کرده و با نشانه گذاری بر رویه کاغذ واتمن یا پلیتسیلیکاژل درون تانک حلال گذاشته و با استفاده از دستگاه RTLCراندمانشاندارسازی را بررسی میکنیم .

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی پایداری رادیو دارو در سرم خون و بافر فسفات سالین :سرم خون و بافررا که قبلا تهیهکردیم به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر در دومیکروتیوپ میریزیم و میزان ۱۰۰ میکرولیتر حاوی حدود ۱۰۰ میکرو کوری از رادیو داروی تولید شده به آنها اضافه کرده و درونانیکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار میدهیم ، از میکروتیوپ حاوی رادیودارو در سرم خون و بافربا فواصل زمانی مشخص (۱ ،۲ ، ۳، ٤ و...) تا ۵ ساعت با توجه به نیمه عمر عنصر مورد استفاده در رادیو دارو نمونه برداریمی کنیم و بروی کاغذ سیلیکاژل لکه گذاری کرد و توسط دستگاه RTLC اسکن میکنیم تا میزان نشاندار و پایداری دارو در فواصل زمانی مشخص بررسی شود

بررسی پراکنش زیستی و نحوه محاسبه اکتیویته تجمعی در اندام های مختلف در پیکر موش صحرایی :

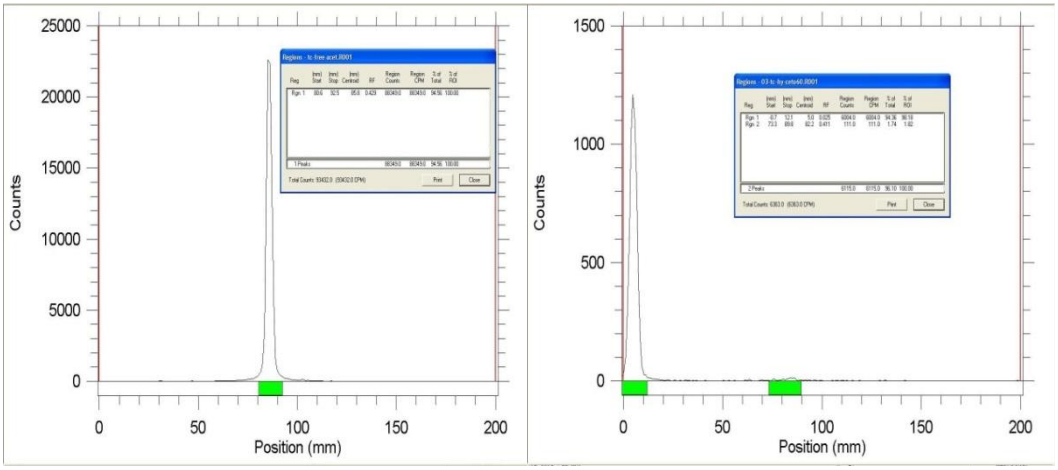
به منظور بررسی نحوه توزیع ، تجمع و دفع یون آزاد تکنسیوم و رادیو دارو تهیه شده در موش ، ۱۷۰ میلی کوری را برای هر موش میزان ۱۰۰ میکرو لیتر توسط سرنگ انسولین ار طریق سیاهرگ دمی تزریق نموده ، در زمان های ۱ ، ۳و ٢٤ ساعت پس از تزریق ، کشتار موش ها و تصویر برداری و تشریح و نمونه برداری از اندام های مختلف انجام می پذیرد ، پسازتزریقوریدیرادیودارو،عملتشریحموشهادربازهیزمانیمشخصانجاممیپذیرد. اندام های مورد نظر جداسازی شده توسط دستگاه HPGe گاما کانتر میزان اکتیویته هر بافت اندازه گیری می شود ، میزاناکتیویتهتجمعیافتهدرهراندامباعاملID/g٪ بیانمیشود و طبق روابط زیر محاسبه می گردد . رابطه (۱) و (۲)

رابطه : (۱)

رابطه : (۲)

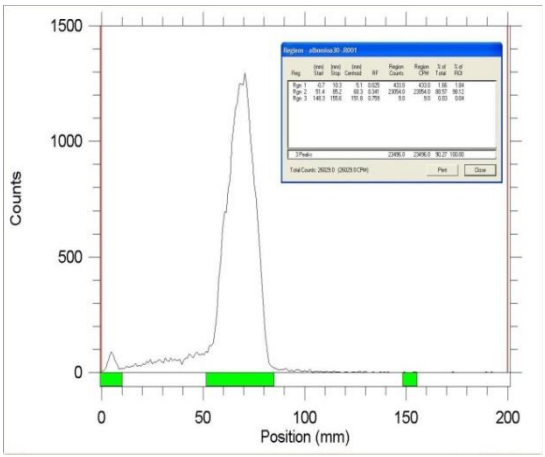
Eff: تصحیحبازهدتکتور،Br:شدتفراوانیاشعهگامادرانرژیرایوایزوتوپ، area: میزاناکتیویتهشمارششدهدستگاه، T: زمانشمارش،tissue net weight(g) : وزن ارگان مورد نظر(گرم) ، totalinjected tissue(Bq): اکتیویته تزریقی به بافت مورد نظر (بکرل)

نتایج :تست های مربوط به خلوص رادیو شیمیایتکنسیوم آزاد و رادیو دارو با دستگاه RTLC در حلال نرمال سالین ، DTPA یک میلی مول و استون انجام شد که از بین آنها حلال استون انتخاب شد و تست ها برروی پلیتسیلیکاژل انجام پذیرفت که با توجه به پیک درصد نشاندار سازی ٪۹۸ را نشان می دهد (شکل ۱)



شکل ۱ : اسکن RTLC مربوط به تکنسیوم آزاد (سمت راست) و رادیو دارو (سمت چپ) در حلال استون

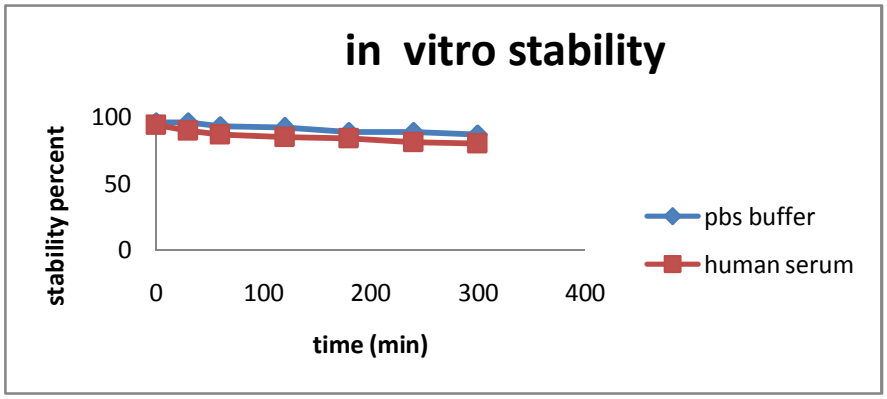
اما با توجه به اینکه اگر در رادیو دارو تهیه شده کلوئید تشکیل شده باشد و محل قرار گیری کلوئید نیز در این اسکن در RF ابتدایی است ، برای تمایز نسبت به رادیو دارو از حلال اتانول ؛ آمونیاک ؛ آب (۲؛۱؛۵) استفاده کردیم با این تمایز که این بار سطح پلیت را به محلول آلبومین آغشته کردیم که نسبت به آنتی بادی تراوا شود و رادیو دارو برروی آن به RF بالا حرکت کرده و کلوئید در پایین بماند (شکل ۲)



شکل (۲) : بررسی میزان کلوئید تشکیل شده در حلال اتانول ؛ آمونیاک ؛ آب (۲؛۱؛۵)

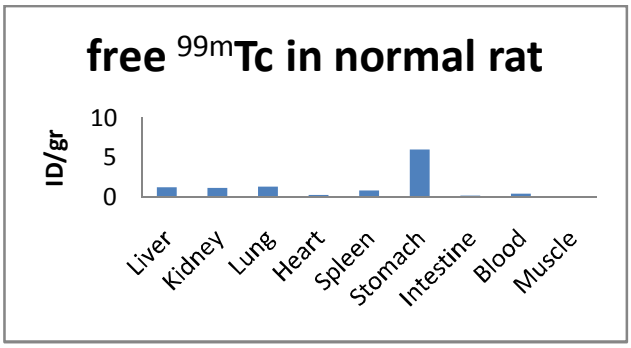
با کم کردن میزان ۲٪ کلوئید از راندمان ۹۸٪ به درصد حقیقی نشاندار سازی ۹۶٪ رسیدیم .

تست های مربوط به پایداری در سرم خون و در بافر فسفات سالین تا ۳۰۰ دقیقه انجام شد که رادیو داروی تهیه شده پایداری مناسبی را نشان داد . (نمودار ۱)

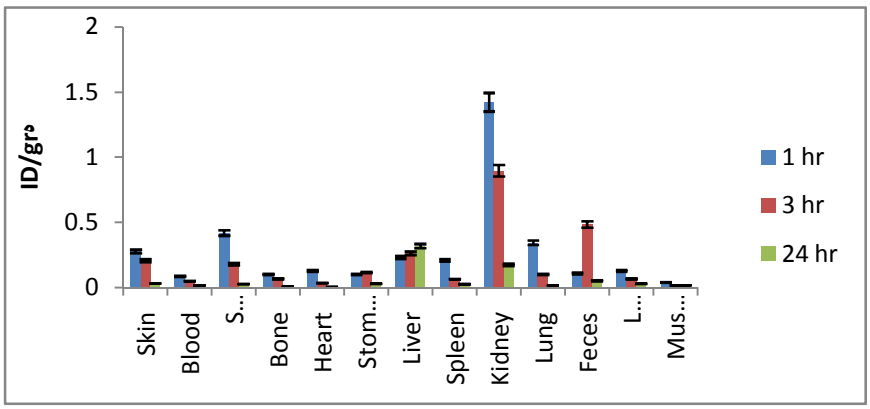


نمودار(۱) : پایداری رادیودارو در سرم خون انسانی و نرمال سالین

مطالعات حیوانی برای تکنسیوم آزاد در ۱ ساعت و برای رادیو ایمونوکانژوگه تهیه شده در ۱ ، ۳ و ۲٤ ساعت (n=3)در رت های نرمال انجام شد و نتایج زیر حاصل شد (نمودار ۲و۳)



نمودار(۲) : پراکنش زیستی تکنسیوم آزاد در رت نرمال در ۱ ساعت



نمودار (۳) : پراکنش زیستی رادیودارو در ۱ ، ۳ و ۲٤ ساعت در رت های نرمال

بحث و نتیجه گیری :خالص سازی آنتی بادی ستوکسیمب با راندمان بالا انجام و همچنین نشاندار سازی این آنتی بادی بر اساس پیک های حاصل از RTLCو پس از کم کردن میزان کلوئید با میزان ۹۶٪ انجام شد ، پایداری رادیو داروی ^{99m}Tc-Hynic-Cetuximab در سرم خون و بافر فسفات سالین تا ۳۰۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گرادمناسب بوده و در سرم خون به دلیل آنزیم های موجود اندکی کاهش یافت ، پراکنش زیستی رادیوداروی تهیه شده مناسب بوده و تمایر مورد نظر با تکسیوم آزاد در معده و سایر ارگان ها مشاهده شد ، همچنین تجمع در کلیه (دفع کلیوی) ، کاهش میزان رادیودارو از خون و جذب در سایر ارگان ها از جمله کبد نشان دهنده مناسب بودن نشاندار سازی و پراکنش زیستی می باشد .

مراجع :

[1] Hyunki Kim, Karri D. Folks, LinglingGuo, Jeffery C. Sellers, Naomi S. Fineberg, Cecil R. Stockard , Early Therapy Evaluation of Combined Cetuximab and Irinotecan in Orthotopic Pancreatic Tumor Xenografts by Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging , Molecular Imaging, Vol 10, No 3 , 153–167, 2011

[2] Shanu Modi, Gabriella D'Andrea, Larry Norton, TzyJyun Yao, James Caravelli, Peter P. Rosen, Clifford Hudis, Andrew D. Seidman , A Phase I Study of Cetuximab/Paclitaxel in Patients with Advanced-Stage Breast Cancer , Clinical Breast Cancer, Vol. 7, No. 3, 270-277, 2006

[3] Tang Y1, Scollard D, Chen P, Wang J, Holloway C, Reilly RM ,Imaging of HER2/neu expression in BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using [(99m)Tc]-HYNIC-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments , Nucl Med Commun. 26(5):427-32,2005

[4] W Chen, Ch Yen, S Lo, K Chen, J Lo ; Direct 99mTc labeling of Herceptin (trastuzumab) by 99mTc(I) tricarbonyl ion ; Applied Radiation and Isotopes 66, 340–345, 2008

[5] V Calzada, F Garcia, M Fernández, W Porcal1, T Quinn , O Alonso , J Pablo Gambini , P Cabral ; Labeling and Biological Evaluation of 99mTc-HYNICTrastuzumab as Potential Radiopharmaceutical for In Vivo Evaluation of HER2 Expression in Breast Cancer ; World Journal of Nuclear Medicine, 12/Issue 1, 2013

[6] B Alirezapour , A Jalilian , M Rasaee , S Rajabifar , K Yavari , M Kamalidehghan , F Bolourinovin, G Aslan ; Optimized preparation and preliminary evaluation of [64Cu]–DOTA–trastuzumab for targeting ErbB2/Neu expression ; J RadioanalNuclChem, 295:1261–1271, 2013