J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 52, pp. 67-71, 2010

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۵۲، صفحات ۷۱-۶۷، ۱۳۸۹

Sci. and Tech. note
یادداشت علمی و فنی

تعیین شرایط بهینه‌ی تهیه‌ی کمپلکس ^{67}Ga-Oxine برای نشان‌دارسازی سلول‌های سفید خون

امیررضا جلیلیان*[1]، آریندخت وکیلی[2]، سونا نظری[2]، فاطمه بلوری‌نوین[1]، سعید رجبی‌فر[1]
۱- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران
۲- دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران - ایران

چکیده: هدف از انجام این تحقیق، بررسی عوامل مؤثر بر تهیه‌ی کمپلکس ^{67}Ga-oxine برای مقاصد نشان‌دارسازی گلبول‌های سفید خون می‌باشد. ^{67}Ga تولید شده در سیکلوترون (۳۰MeV) پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج از طریق بمباران پروتونی هدف روی غنی شده و با استفاده از واکنش ^{67}Ga ^{68}Zn(p,۲n) به شکل ^{67}GaCl۳ در شرایط بهینه برای تهیه‌ی کمپلکس ^{67}Ga-oxine به کار گرفته شد. مخلوطی از ۳µl از ^{67}GaCl۳ با فعالیت ۲۰۰µCi و ۱۰۰µl از محلول اتانولی اکسین ۱mg/ml تبخیر شده و در مجاورت بافر استات با pH=۵/۵ به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵°C واکنش داده شد. ITLC[(1)] با فاز متحرک آمونیم استات ۱۰٪+ متانول (۱:۱) و کاغذ واتمن انجام و فعالیت با استفاده از دستگاه RTLC scanner (AR-2000) با هدف کنترل کیفی خوانده شد. در این شرایط خلوص رادیوشیمیایی ۹۵/۱۸٪ و فعالیت ویژه‌ی ۱۴۳۲GBq/mmol حاصل شد. سپس تخلیص گلبول‌های سفید خون تازه تهیه شده از داوطلبان انسانی و نشان‌دارسازی آن در دمای ۳۷ درجه انجام شد. ^{67}Ga-oxine به دلیلِ چربی دوستی و گسیل پرتوهای گاما مناسب می‌تواند ماده‌ای ارزان و قابل دسترس برای مقاصد نشان‌دارسازی سلول‌های خونی، بنیادین و هم‌چنین موجودات ذره‌بینی باشد.

***واژه‌های کلیدی:** گالیم- ۶۷، کمپلکس اکسینات، بهینه‌سازی، نشان‌دارسازی سلولی*

Optimization of [^{67}Ga]-Oxinate Complex Formation Conditions for white Blood Cell Labeling

A.R. Jalilian*[1], A. Vakili[2], S. Nazari[2], F. Bolourinovin[1], S. Rajabifar[1]
1- Agricultural Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 31485-498, Karaj-Iran
2- Department of Engineering and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, P.O. Box: 14515-775, Tehran-Iran

Abstract: In this work, the effective factors on the preparation of ^{67}Ga-oxinate complex for white blood cell labeling were determined. Gallium-67 was produced at AMIRS 30MeV cyclotron via ^{68}Zn(p,2n)^{67}Ga reaction in the from of $^{67}GaCl_3$, and was used for radiolabeling of oxinate complex at optimized conditions. A mixture of $^{67}GaCl_3$ (3uL, 200uCi) and ethanolic oxine solution (1mg/ml, 100µl) was evaporated and reacted at 25°C for 1 h in the presence of NaOAc solution (pH. 5.5). ITLC was performed using a mixture of ammonium actetae and methanol solution (1:1) followed by recording the activity using radio thin layer chromatography scanner. The radiochemical purity of %95.18 at these conditions was obtained (specific activity of 1432 GBq/mmol). Freshly prepared white blood cells were separated from human volunteers and used for labeling by the above mentioned complex at 37°C. ^{67}Ga-oxinate complex due to it's lipophilicity and suitable gamma rays is a suitable cell labeling agent and available for blood stem cell and microorganism studies.

***Keywords:** Gallium-67, Oxinate Complex, Optimization, Cell Labeling*

*email: ajalilian@nrcam.org

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۱/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۱/۲۴

۱- مقدمه

در بین مواد پرتوزای مورد استفاده در پزشکی هسته‌ای برای تصویربرداری از تومور، ^{67}Ga به علت دارابودن خصوصیات ارزشمند بالینی استفاده‌ی گسترده‌ای پیدا کرده است. سینتی‌گرافی با ^{67}Ga جهت مشخص نمودن مواضع توموری در بدن قدمت تقریباً ۳۰ ساله در پزشکی هسته‌ای تشخیصی دارد [۱].

رادیونوکلید ^{67}Ga نوکلیدی با نیم- عمر ۷۸٫۲۶ ساعت است که در الگوی واپاشی خود دارای پنج حالت گیراندازی الکترون می‌باشد و گاماهایی با انرژی ۹۳٫۳، ۱۸۴، ۳۰۰، ۳۹۳keV گسیل می‌کند. روش‌های مختلفی برای تولید ^{67}Ga در شتاب‌دهنده‌های ذرات باردار مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش‌ها هدف‌هایی مانند ^{65}Cu، ^{68}Zn و ^{67}Zn توسط ذرات بارداری چون پروتون، دوترون، ذرات α و He تا انرژی‌های حدود ۷۰MeV بمباران می‌شوند. جداسازی محصولات تولید شده به صورت عمده با روش‌هایی مثل تعویض یونی انجام می‌گیرد [۲ و ۳]. دو روش عمده‌ی زیر برای تولید رادیونوکلید ^{67}Ga استفاده می‌شود [۴].

- بمباران پروتونی هدف روی غنی شده

$$^{68}Zn(p,2n)^{67}Ga \quad , \quad E_p=20\text{-}25MeV$$

- بمباران هدف‌های مس طبیعی با ذرات آلفا

$$^{65}Cu(\alpha,2n)^{67}Ga \quad , \quad E_p=30\text{-}32MeV$$

تولید رادیونوکلید ^{67}Ga از طریق بمباران پروتونی روی غنی شده توسط سیکلوترون ۳۰MeV پژوهشکده کرج انجام می‌گیرد. دو رادیوایزوتوپ دیگر گالیم، ^{68}Ga و ^{66}Ga که هر دو پوزیترون گسیل هستند، قبلاً تهیه شده‌اند و با استفاده از ۸-هیدروکسی کینولین (اکسین) در نشان‌دارسازی گلبول‌های خون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ^{68}Ga دارای خواص فیزیکی بهتری نسبت به ^{66}Ga در مطالعات تصویربرداری می‌باشد. ^{67}Ga-oxine پیش از این برای نشان‌دارسازی گلبول‌های قرمز خون مورد استفاده قرار گرفته است [۵]. از آن جایی که براساس جستجوی نویسندگان در بررسی‌های کتابخانه‌ای روش‌های مستدلی برای تعیین شرایط بهینه‌ی نشان‌دارسازی این ترکیب موجود نبود بر آن شدیم شرایط بهینه‌ی تهیه‌ی کمپلکس ^{67}Ga-oxine را، که یک ترکیب مناسب برای SPECT می‌باشد، بررسی نماییم.

۲- روش‌های تجربی

۲-۱ مواد و وسایل

رادیوکروماتوگرافی لایه‌ی نازک به وسیله‌ی کاغذ واتمن با ابعاد ۱cm×۱۰cm و با استفاده از حلال آمونیم استات ۱۰٪+ متانول (۱:۱) به عنوان فاز متحرک انجام پذیرفت. با استفاده از دستگاه خوانش کاغذهای کروماتوگرافی (AR-2000) ساخت کشور فرانسه، هر یک از کاغذها اسکن شده و میزان خلوص رادیوشیمیایی تعیین گردید.

۲-۲ تهیه‌ی ^{67}Ga، گالیم [^{67}Ga] کلرید از هدف روی-۶۸ غنی شده

^{67}Ga از طریق بمباران پروتونی هدف روی-۶۸ غنی شده و با استفاده از واکنش هسته‌ای ^{68}Zn(p,۲n) ^{67}Ga تولید شد. مقدار ۴۰۰ تا ۵۰۰mg از ^{68}Zn به طریق آب‌کاری روی هدفی از مس نشانده شد. هدف با استفاده از باریکه‌ای از پروتون‌های ۲۴MeV تحت بمباران قرار گرفت. ناخالصی‌های عمر- کوتاه تولید شده در هدف پس از زمان خنک‌سازی حدود ۲ ساعت از بین رفتند و سایر ناخالصی‌ها در خلال روند جداسازی گالیم از روی توسط رزین‌های تبادلی یونی حذف شدند. برای انجام این عمل، ابتدا ۲۵ سانتی‌مترمکعب کلریدریک اسید ۹ نرمال برای آماده‌سازی رزین استفاده شد. محلول حاصل از انحلال هدف در هیدروکلریک اسید از رزین عبور داده شد تا ناخالصی‌های موجود در آن حذف شود. این ناخالصی‌ها که شامل دیگر ایزوتوپ‌های روی چون ^{66}Zn است وارد محول خروجی زرین شد در حالی که گالیم جذب رزین گردید. سپس رزین با ۲۵ سانتی‌متر مکعب از محلول هیدروکلریک اسید ۹ نرمال شسته شد تا دیگر ناخالصی‌ها شسته شوند و تنها گالیم در رزین باقی بماند. در نهایت گالیم توسط هیدروکلریک اسید ۴ نرمال از رزین خارج گردید.

۲-۳ تهیه‌ی کمپلکس ^{67}Ga-Oxine

حدود ۲۰۰μCi گالیم [^{67}Ga] کلرید به یک ویال بوروسیلیکات منتقل و با استفاده از گاز ازت N_2 تبخیر گردید. سپس به ویال‌های مجزا مقادیر ۲ml، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰μl از محلول اکسین اتانولیک با غلظت ۱mg/ml اضافه شده و تبخیر گردید. پس از تبخیر کامل اکسین، و اضافه نمودن حدود ۱ml بافر استات با pH=۵٫۵ به ویال و هم‌زدن به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۲۵°C (دمای محیط) در حمام آب گرم با دمای ۸۰°C نگه‌داشته شد و

در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت اندازه‌گیری‌های RTLC تکرار گردید.

در ادامه، با بررسی ترکیب نشان‌دار با استفاده از روش کروماتوگرافی با کارآیی بالا، نتایج روش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک تأیید شد.

۲-۴ تهیه‌ی گلبول سفید انسان از نمونه‌های خونی

تهیه‌ی گلبول سفید از خون کامل داوطلب سالم براساس یک پروتکل مورد تأیید اداره‌ی بهداشت ایالات متحده انجام شد [۶]. برای این منظور، ۱۰ میلی‌لیتر از خون یک داوطلب مرد سالم ۲۵ ساله در شرایط استریل از راه ورید بازویی تهیه و به لوله‌های محتوی ماده‌ی ضد انعقاد (ترجیحاً سدیم ادتات) منتقل گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ با قدرت ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰g و در دمای اتاق قرار داده شد. گلبول‌های قرمز در بخش پایینی، سرم در بالا و گلبول‌های سفید در بین این دو قرار گرفت. پلاسمای رویی با پیپت تا ۱ میلی‌متری سطح گلبول‌های قرمز برداشته شد. باقی‌مانده شامل گلبول‌های سفید با دقت توسط یک میکروپیپت تا حجم بیشینه‌ی ۰/۵ میلی‌لیتر برداشته شد.

۲-۵ نشان‌دارسازی گلبول سفید انسان با گالیم-۶۷ (III) اکسینات

به گلبول‌های سفید حاصل از فرایند فوق بلافاصله مقدار ۳ میلی‌لیتر محلول مقاوم حاوی گالیم- ۶۷ (III) اکسینات (با فعالیت ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروکوری) اضافه شد و مخلوط در دمای ۳۷ درجه با آهنگ هم‌زنی بسیار ملایم قرار گرفت. در زمان‌های ۳۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه مقدار یک میلی‌لیتر از مخلوط به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ با تندی ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. با جداسازی محلول رویی و بخش سلولی باقی‌مانده هر بخش به طور جداگانه در یک دزیمتر نوع چاهی شمارش شد. هر آزمون ۵ بار تکرار و میانگین‌گیری شد.

۳- یافته‌ها و بحث

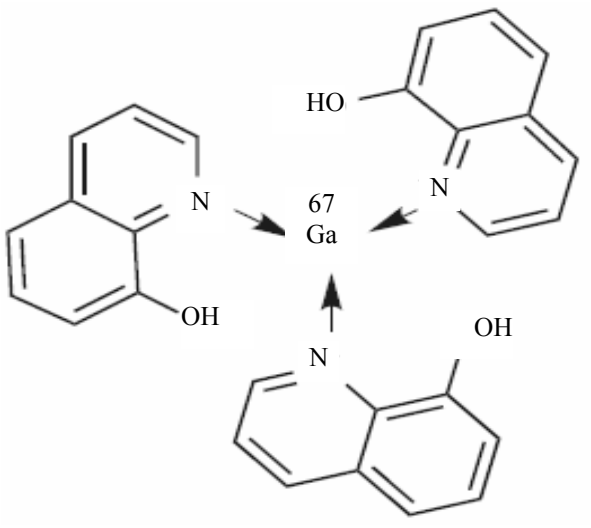
به منظور تعیین شرایط بهینه‌ی تهیه کمپلکس ^{67}Ga-Oxine (شکل ۱) بهینه‌سازی عواملی چون دما، زمان، pH و میزان اکسین انجام شد.

۳-۱ اسیدیته

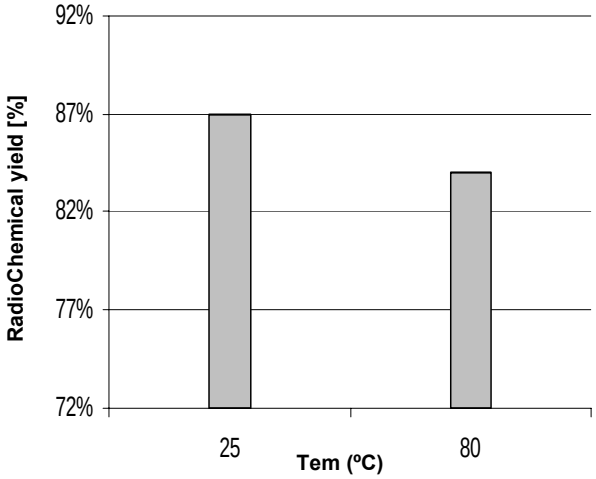
در زمان تهیه‌ی کمپلکس اکسین با گالیم-۶۷ به علت اضافه نمودن بافر استات با pH=۵/۵، pH همواره ثابت و برابر ۵/۵ باقی ماند. این pH برای تهیه‌ی رادیوداروها مناسب است. pHهای بالاتر از ۷ به دلیل تشکیل ژل‌های اکسیدی گالیم مورد بررسی قرار نگرفت.

۳-۲ دما

به منظور بهینه‌سازی دما، آزمایش‌ها در دو دمای ۲۵ و ۸۰°C انجام شدند. در این دو دما پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان نشان‌دارسازی در هر دو حدود ۸۳ تا ۸۷٪ بود، بنابراین با توجه به این که نشان‌دارسازی در دمای اتاق انجام می‌شود و درصد نشان‌دارسازی با دما به طور محسوسی تغییر نمی‌کند، دمای ۲۵°C (دمای محیط) به عنوان دمای مطلوب و مناسب برای این منظور در نظر گرفته شد (شکل ۲).



شکل ۱- ساختار مولکولی گالیم- ۶۷ (III) اکسینات.



شکل ۲- تغییرات بازده رادیوشیمیایی ^{67}Ga-Oxine در مدت زمان ۳۰ دقیقه برحسب دما.

۳-۳ مقدار اکسین

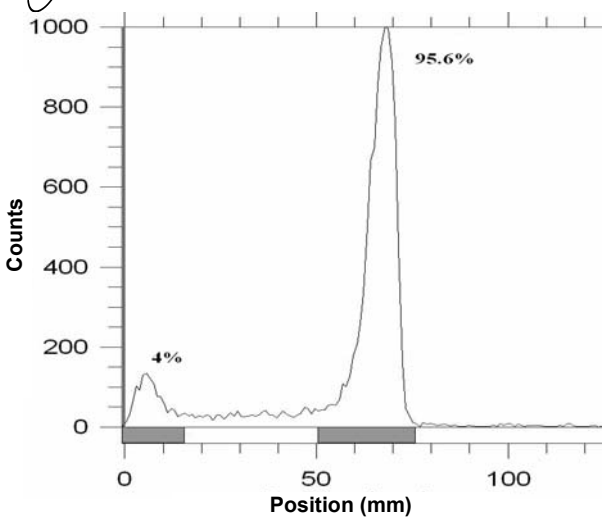
مقدار اکسین مورد استفاده در اولین آزمایش‌ها بیش از مقدار لازم و در حدود ۵mg در نظر گرفته شد، تا محل دقیق قله‌های رادیوشیمیایی حاصل شود. میزان نشان‌دارسازی در این حالت حدود ۹۰٪ به دست آمد. به علت اشباع بودن محیط از اکسین، تقریباً تمامی ^{67}Ga موجود واکنش داده بود. اگر چه با استفاده از مقدار ۵mg اکسین، نتیجه‌ی مطلوب به دست آمد. ولی به علت سمی بودن ماده‌ی اکسین، در صورتی که از این ترکیب برای نشان‌دارسازی گلبول‌ها، پلاکت و سلول‌های بنیادین استفاده شود، مرگ سلولی مشکل‌آفرین خواهد بود. در نتیجه لازم بود که کمینه مقدار اکسین که در آن بهترین درصد نشان‌دارسازی حاصل می‌شود تعیین گردد. بنابراین مقدار اکسین تا میزان 10^{3} برابر کاهش یافت و با مقادیر ۵۰، ۸۰، ۱۰۰μg آزمایش تکرار شد.

شکل ۳ کروماتوگرام لایه‌ی نازک را در شرایط بهینه نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، در زمان یک ساعت با افزایش مقدار اکسین درصد نشان‌دارسازی افزایش می‌یابد.

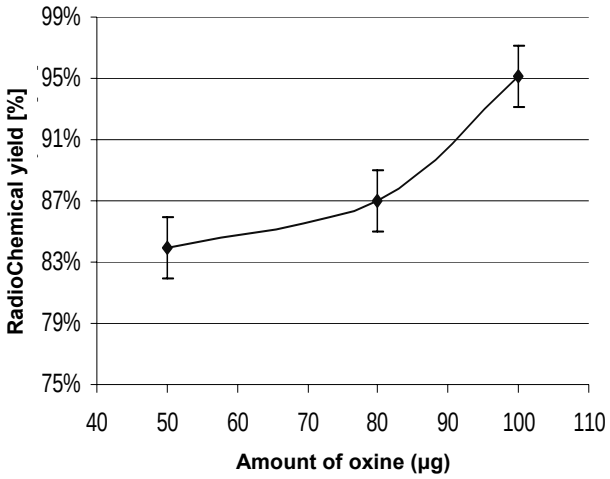
پس از گذشت ۲ ساعت درصد خلوص رادیوشیمیایی با مقدار اکسین برابر با ۱۰۰μg به حدود ۹۵٪ رسید. کروماتوگرافی HPLC نیز نتایج مشابهی را ارایه کرد (شکل ۵).

در دمای ۲۵°C میزان نشان‌دارسازی در زمان‌های ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه و پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان مقدار بازده رادیوشیمیایی افزایش می‌یابد، به طوری که پس از گذشت ۲ ساعت میزان خلوص رادیوشیمیایی به بیشینه مقدار رسیده است. البته نکته‌ی قابل توجه این است که ترکیب نشان‌دار پس از گذشت ۲۴ ساعت هم‌چنان به میزان ۸۵٪ نشان‌دار شده باقی می‌ماند در نتیجه می‌توان حتی پس از گذشت این مدت از این ترکیب جهت نشان‌دارسازی گلبول‌ها، لیپوزوم و حتی سلول‌های بنیادین استفاده نمود (شکل ۶).

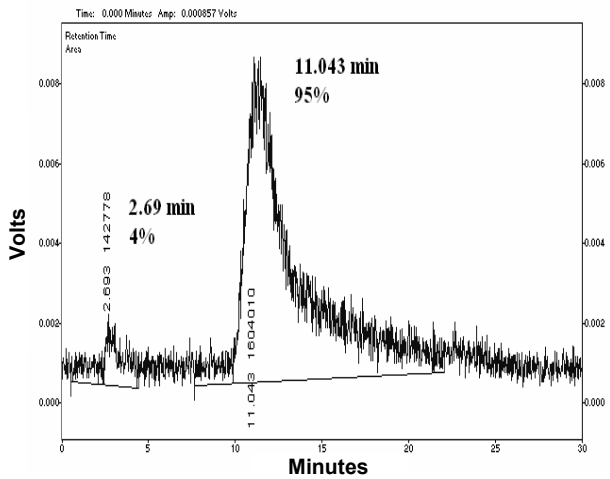
نشان‌دارسازی سلول‌های سفید خون در شرایط آزمایشگاهی برون تنی در بازه‌ی زمانی ۱۲۰ دقیقه و در دمای بدن انجام شد. همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود روند تقریباً خطی برداشت فعالیت در سلول‌ها به چشم می‌خورد. این روند از نظر سینتیک بیوشیمیایی نمایانگر یک برداشت براساس پدیده‌ی انتشار می‌باشد که برای بسیاری از مواد نشان‌دارکننده‌ی سلول‌های خونی قبلاً ملاحظه شده است.



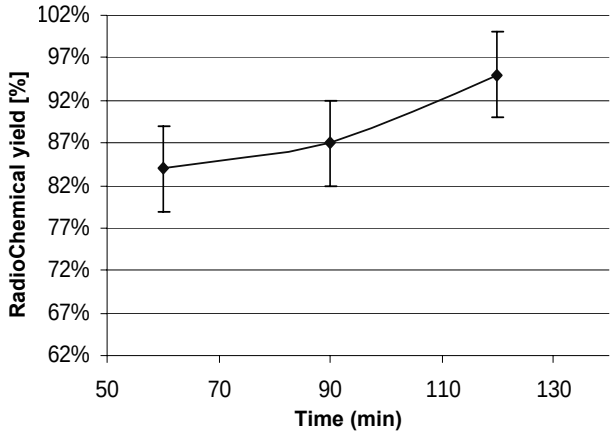
شکل ۳- کروماتوگرام (RTLC) ماده‌ی نشان‌دار با مقدار ۱۰۰μg پس از ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۵°C).



شکل ۴- تأثیر مقدار اکسین بر محصول رادیوشیمیایی ^{67}Ga-Oxine در ۲۵°C و درزمان ۱h.



شکل ۵- کروماتوگرام (HPLC) ماده‌ی نشان‌دار با مقدار ۱۰۰μg اکسین پس از ۲ ساعت در دمای اتاق ۲۵°C.



شکل ۶- تغییرات بازده رادیوشیمیایی ^{67}Ga-Oxine برحسب زمان در ۲۵°C.

جدول ۱ – خواص فیزیکی مهم‌ترین رادیوایزوتوپ‌های گالیم.

خواص	^{66}Ga	^{67}Ga	^{68}Ga
انرژی گاما (KeV)	۵۱۱، ۸۳۴، ۱۰۳۹، ۲۷۵۲	۹۳، ۱۸۴، ۳۰۰، ۳۹۳	۵۱۱
انرژی پوزیترون	۴۱۵۳	—	۱۹۰۰
طریقه واپاشی	B^+ ٪۵۷، EC(^{66}Zn) ٪۴۳	EC ٪۱۰۰	B^+ ٪۹۰، EC(^{68}Zn) ٪۱۰
نیم- عمر	۹٫۵ h	۷۸ h	۶۸ Min
روند تولید	^{66}Zn(p,۲n)^{66}Ga	^{68}Zn(p,۲n)^{67}Ga	^{68}Zn(p,۲n)^{68}Ga
ناخالصی	^{65}Zn	^{66}Ga	^{68}Ge
انرژی پروتون (MeV)	۶-۱۵	—	۱۲-۲۲

۴- نتیجه‌گیری

در این کار پژوهشی، میزان تولید کمپلکس اکسین و ^{67}Ga از طریق روش کروماتوگرافی در زمان‌های پس از نشان‌دارسازی مورد بررسی قرار گرفت. میزان pH به علت استفاده از بافر استات با pH =۵٫۵ تغییری نکرد. پس از گذشت ۱ ساعت از آماده‌سازی محلول، با انجام تست RTLC نتیجه‌ی مطلوب حاصل گردید. دمای اتاق دمای مناسب فرض شد. مقدار بهینه‌ی کمینه‌ی اکسین ۱۰۰μg تعیین شد. در شرایط بهینه، خلوص رادیوشیمیایی ^{67}Ga-Oxine بیش از ۹۵٪ با فعالیت ویژه ۱۴۳۲GBq/mmol تعیین گردید. متعاقب آن تخلیص گلبول‌های سفید خون تازه تهیه شده از داوطلبان انسانی، و نشان‌دارسازی آن در دمای ۳۷ درجه و شرایط بهینه انجام شد. از آن جا که ^{67}Ga رادیونوکلیدی است که گسیلنده‌ی گامای خالص می‌باشد، کمپلکس ^{67}Ga-Oxine می‌تواند کاربرد تشخیصی در نشان‌دارسازی گلبول‌های خون سلول‌های بنیادین و موجودات ذره‌بینی داشته باشد.

پی‌نوشت:

۱- ITLC: Instant Thin Layer Chromatography

References:

1. C. Bekerman, P.B. Hoffer, J.D. Bitran, "The rules of gallium-67 in the clinical evaluation of cancer," Semin. Nucl. Med. **14**, 296-323 (1984).

2. J. Ruhlmann, P. Oehr, H.J. Biersach, "Cost effectiveness of PET in oncology," 195-97 in: PET in oncology Ist edition Springer-Verlage Press, New York (1999).

3. C.M. Lederer, V.S. Shirly, "Table of Isotopes," 7th Edition. 211, John Willy and Sons Press. New York (1978).

4. A.R. Jalilian, P. Rowshanfarzad, M. Sabet, A. Rahiminejad-Kisomi A.A. Rajamand, "Development of [^{66}Ga]oxine complex; a possible PET tracer," Nukleonika **51**, 155-159 (2006).

5. L. Kostakoglow, J. Leonardo, I. Kujh, "Comparision of fluorine -18 fluorodeoxy glucose positron emission tomography and Ga-67 scintigraphy in evalution of lumphoma," Cancer **94**, 879-888 (2002).

6. http://www.ambion.com/techilb/append/supp/wbc/html.