# ساخت ترکیب BRIDA، تهیه و کنترل کیفی کیت BRIDA

# جهت بررسی فعالیت کبدی

دکتر علی‌اصغر یراقچی، دکتر رضا نجفی

بخش رادیوایزوتوپ، مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

## چکیده

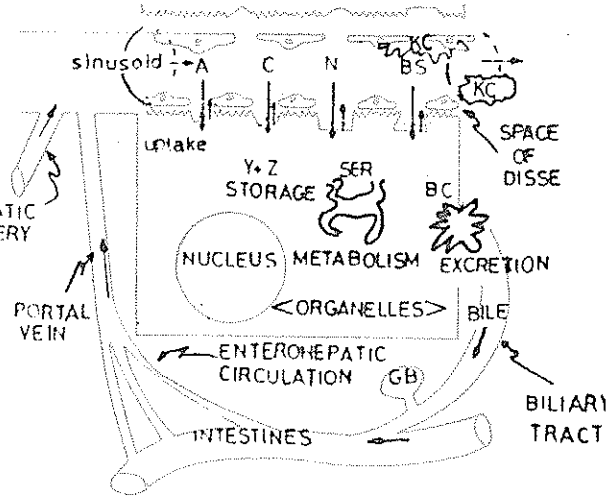
در این مقاله ساختمان شیمیایی، مکانیزم رفتاری مشتقات IDA بعنوان عوامل سنتی‌گرافی کبدی ـ صفراوی و نیز سیر تکاملی عوامل مختلف تصویربرداری از فعالیت کبدی بطور اجمال مورد بحث قرارمی‌گیرد. همچنین مراحل ساخت مبروفنین و تهیه و تولید آن بعنوان یک کیت مؤثر کبدی ـ صفراوی که در بخش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای ساخته‌شده است ارائه می‌شود. کمپلکس TC-99m-BRIDA با ویژگی متفاوت از سایر مشتقات IDA قادر است بعنوان یک عامل مؤثر، حتی در بیماران یرقانی، تصاویر روشن و واضحی از فعالیت کبدی به‌دست دهد. این کیت بصورت استریل و آپیروژن در ویالهای تزریقی به‌فرم لیوفیلیزه عرضه می‌گردد.

## مقدمه

از چند دههٔ گذشته تاکنون، پیشرفت‌های بسیاری برای بهبود تشخیص کوله سیست‌ها (Cholecystitis) با بهره‌گیری از روش سنتی‌گرافی به‌دست آمده است. این امر مدیون تحقیقاتی می‌باشد که در زمینهٔ رادیوداروها با نشاندارساختن شلاتهای (Chelates) مختلف با تکنزیوم 99m صورت گرفته است. دراینجا برای روشن‌شدن بیشتر مکانیسم رفتاری سلولهای کبدی درمقابل شلاتهای مختلف مورد استفاده در روش سنتی‌گرافی و همچنین کینتیک متفاوت آنها مختصری در باب بیوشیمی سلولهای کبدی و ساختار مولکولی عوامل سنتی‌گرافی و ویژگی‌های آنها بحث می‌شود.

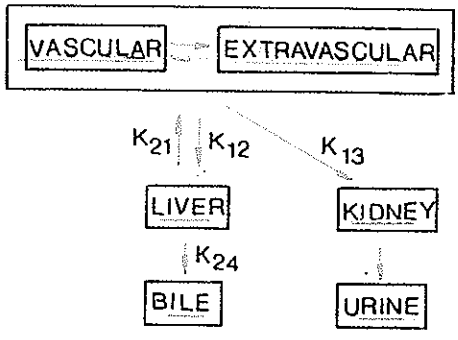
الف ـ مورفولوژی و بیوشیمی سلولهای کبدی ـ شونک (Shewenk 1980) (۱) به‌طور شماتیک انتقال ترکیبات صفرا در سیستم صفراوی چنین تشریح می‌کند (شکل ۱): موادی که ازطریق خون تزریق می‌شوند از ورید باب به سینوزوئیدهای (sinusoids) کبدی می‌رسند و از منافذ آندوتلیال (Endothelial) دیوار سینوزوئیدها عبورکرده وارد فضایی بنام دیس (Disse) می‌شوند که مایعات خونی در آن قراردارند. در این نقطه این مواد با سطح سلولهای کبدی تماس پیدامی‌کنند. جذب این مواد توسط سلول‌های کبدی انتخابی است و به پروتئین‌های غشای سلول بستگی دارد. دسته‌ای از ترکیبات رنگی مثل سولفوبروموفتالئین (BSP)، رزبنگال (RB)، ایندوسیانین سبز (ICG, Indocyanine green) نمک اسید صفراوی، بیلیروبین، پورفیرین‌ها (Prophyrins)، اسیدهای چرب آزاد، آمین‌های کواترنری با بار مثبت و قند استروئید خنثی کانژوگه بعد از عبور از غشای سلول کبد ممکن است با پروتئین سیتوپلاسم سلول فعل و انفعال انجام دهند یا اینکه بوسیله اورگانل‌های سلول (Organelles) متابولیزه شوند (Fritz berg 1982) (۲). خروج مواد از سلول کبدی ازطریق غشای بین سلولی بنام کانالیکول صفراوی (Bile canaliculi) صورت می‌گیرد. کانالیکول‌های صفراوی تشکیل فضای مجرایی را می‌دهند که اولین قسمت مجاری صفراوی است و منتهی به مجرای اصلی کبدی می‌شوند، مجرای کبدی با مجرای سیستک

یکی شده و مجرای صفراوی مشترک را تشکیل می‌دهند.




شکل (۱): نمایش شماتیک یک سلول کبدی، مواد به یکی از چهار صورت آنیونی (A)، کاتیونی (C)، خنثی (N)، نمک صفرا (BS) ازغشای سلول کبدی عبورکرده باپروتئین داخل سلول ترکیب شده ذخیره میشود(مثل پروتئین‌های Y,Z)
SER = Smooth endoplasmic
BC = Biliary canaliculus
GB = Gall blader
KC = Kupffer cells

همانطور که در شکل دیده می‌شود جذب مواد توسط سلولهای کبدی بصورت انتخابی و ازطریق غشای سلول صورت می‌گیرد، این مواد می‌توانند به فرم آنیونی، کاتیونی، غیریونی و نمک صفراوی باشند. لوبرگ (Loberg 1981) (۳). در شرایط inviro با رادیوداروی TC-99m-IDA یک مدل کینتیک دارویی را توضیح داد (شکل ۲).




شکل (۲): مدل سینتیک دارویی توزیع Invivo برای عوامل کبدی - صفراوی

بررسی فعالیت کبدی از اوایل قرن بیستم (۱۹۰۹) با تزریق مواد رنگی مثل ترکیبات فنل‌فتالئین‌های هالوژنه [سولفوبرومو‌فتالین BSP، کلروفلورسین (رزبنگال RB)] بعنوان ماده حاجب در عکس‌برداری با اشعهٔ X آغاز گردید.

تا حدود نیم قرن تحول چندانی در این روش صورت نگرفت، تا اینکه در سال ۱۹۵۵ تاپلین (Taplin) (۴) و همکارانش موفق شدند رزبنگال (RB) را با $I^{131}$ نشاندار ساخته و با استفاده از اشعهٔ گاما مسیر انتشار آن از کبد را به کمک کریستال یدورسدیم (Sodium Iodide) مشخص کنند.

با توسعه روش سنتی‌گرافی در اوایل ۱۹۶۰ گام مؤثری جهت مطالعه فعالیت کبدی برداشته شد. متعاقب آن مواد رنگین دیگری مانند BSP، بیلیروبین با $I^{131}$ نشاندار گردیدند. اما تا پیدایش تکنیزیم -99m هیچ یک از آنها نتوانستند جایگاه بالینی مناسبی را بدست آورند.

ب ـ ساختمان ملکولی لازم برای عوامل سنتی‌گرافی کبدی ـ صفراوی: در سال ۱۹۷۶ فرینو (Frinau) (۵) مشخصات لازم برای ساختمان ملکولی ترکیبات شلاتی نشاندارشده با تکنزیم -99m را که بتوانند ازطریق صفرا دفع شوند، توضیح داد. خصوصیات مذکور بقرار زیر می‌باشند:

۱ـ داشتن وزن ملکولی بین ۳۰۰ تا ۱۰۰۰، بطوریکه اگر وزن ملکولی کمپلکس مورد استفاده کمتر از ۳۰۰ باشد دفع ازطریق ادرار صورت می‌گیرد. برای مثال TC-99m-PG (تکنزیم، پیریدوکسیلیدین آمینواسید) با وزن ملکولی ۲۸۲ عمدتاً ازطریق کلیه‌ها دفع می‌شود، درحالیکه دو ملکول PG می‌توانند TC-99m کمپلکسی به وزن ملکولی ۴۱۱ ایجادکنند که مسیر دفع آن از کلیه به صفرا تغییر می‌کند.

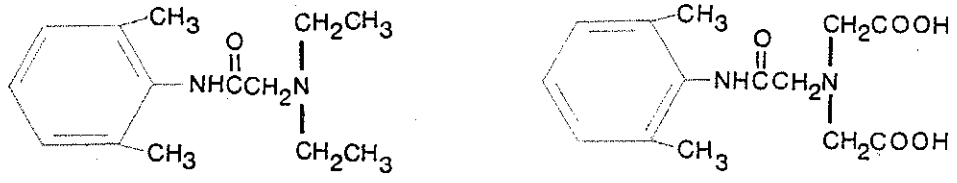
۲ـ داشتن گروه قطبی (ترجیحاً قابل یونیزه‌شدن) مثل کربوکسیلیک یا سولفونیک اسید (گروه اسیدی) نیز از عوامل مؤثر جهت بالابردن مقدار دفع ازطریق صفرا می‌باشد. فریزبرگ (Frizberg 1982) (۶) نشان داد که عوامل قطبی باعث حلالیت کمپلکس در آب، ایجاد پیوند با پروتئین ناقل و همچنین جذب مجدد از روده می‌گردد. اصولاً این ترکیبات مانند مواد اندوژن (Endogenous) که از کبد دفع می‌گردند از نوع آنیون‌های آلی هستند.

۳ـ دارابودن دو حلقه یا بیشتر در ساختمان شیمیائی لیگاند ـ تکنزیم -99m (TC-99m-Ligand) باعث می‌شود تا

دو قسمت هیدروفیلیک و لیپوفیلیک ملکول ازهم فاصله بیشتری بگیرند. قسمت لیپوفیل ملکول در پیوند با پروتئین نقش مؤثری داشته و ایجاد یک ملکول بزرگتر می‌کند، و امکان عبور از گلومرول کلیه‌ها را شدیداً کاهش می‌دهد.

۴ـ تشکیل پیوند با سرم آلبومین شرط دیگر انتقال آنیون‌های آلی به سلولهای کبدی می‌باشد، آلبومین نقش یک ناقل را داشته و پس از ورود به سلول کبدی آنیون آلی را رها کرده و خود آزاد می‌شود.

ج ـ مشتقات استانیلید و ایمینو دی‌استیک اسید: با توسعه رادیوداروها در سال ۱۹۷۵ هاروی (Harvy) (۷) و سایرین کمپلکس تکنزیم ۲ و ۶ دی‌متیل استانیلید و ایمینو دی‌استیک اسید (TC-99m-HIDA) را بعنوان یک عامل سنتی‌گرافی سیستم صفراوی معرفی کردند. HIDA به‌راحتی در شرایط دمای اطاق با تکنزیم احیاشده، تشکیل کمپلکس می‌دهد. دی‌متیل استانیلید و ایمینو دی‌استیک اسید درحقیقت آنالوگ لیدوکائین می‌باشد که در آن بجای عوامل متیل، کربوکسیلیک قرارگرفته‌اند (شکل ۴). سپس با




LIDOCAINE N-(2,6-DIMETHYLACETANILIDE) IMINODIACETIC ACID

شکل (۴) : فرمول شیمیایی لیدوکائین و HIDA

جایگزینی الکیل یا هالوژن‌های مختلف برروی حلقه فنیل در وضعیت‌های اورتو، پارا و متا از IDA مشتقات متعددی ساخته شدند که دارای ویژگی‌هایی که در سنتز مشتقات مختلف IDA توسط پژوهشگران پیگیری می‌شدند عبارتند از:

۱ـ سرعت خروج از خون

۲ـ افزایش جذب کبدی ($K_{21}$)

۳ـ عبور به مجاری صفراوی در فاصله زمانی مناسب ($K_{24}$)

۴ـ به‌حداقل رساندن دفع ازطریق ادرار ($K_{13}$)

۵ـ مقاومت نسبت به بیلیروبین

عوامل فوق در شکل ۲ که مدل کینتیک توزیع یک رادیوداروی کبدی ـ صفراوی در بدن می‌باشد نشان داده شده‌است.

همچنین تجزیه‌های رادیوشیمیایی ساختمان کمپلکس TC-99m-IDA نشان می‌دهد که دو مول IDA با یک مول TC-99m کمپلکسی با بار منفی (۱ـ) مشابه اسیدهای صفراوی تشکیل می‌دهند (۹) (شکل ۵).

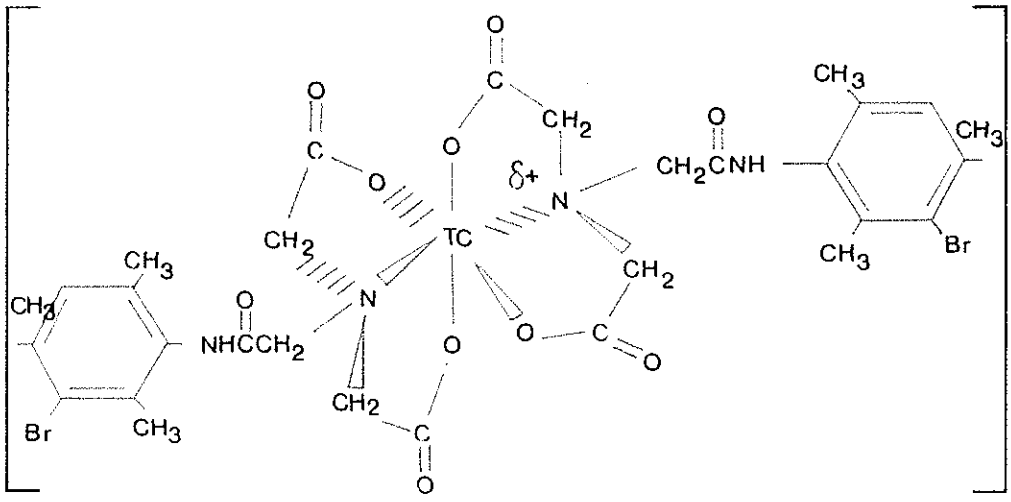
از مشهورترین مشتقات IDA که بطور کلینیکی مورد آزمایش قرارگرفته است می‌توان شش نمونه را ذکر کرد: HIDA (هایدا)، EHIDA (اتیل هایدا)، DISIDA (دی ایزوپروپیل آیدا)، PIPIDA (پارا ایزوپروپیل آیدا)، BIDA (پارابوتیل آیدا)، BRIDA (تری متیل بروموآیدا) (شکل ۶).

جهت بررسی و مقایسه خواص آنها آزمایشها و مطالعات متعددی برروی حیوان و انسان انجام گرفته است که نتایج بدست آمده بشرح زیر خلاصه می‌شود.

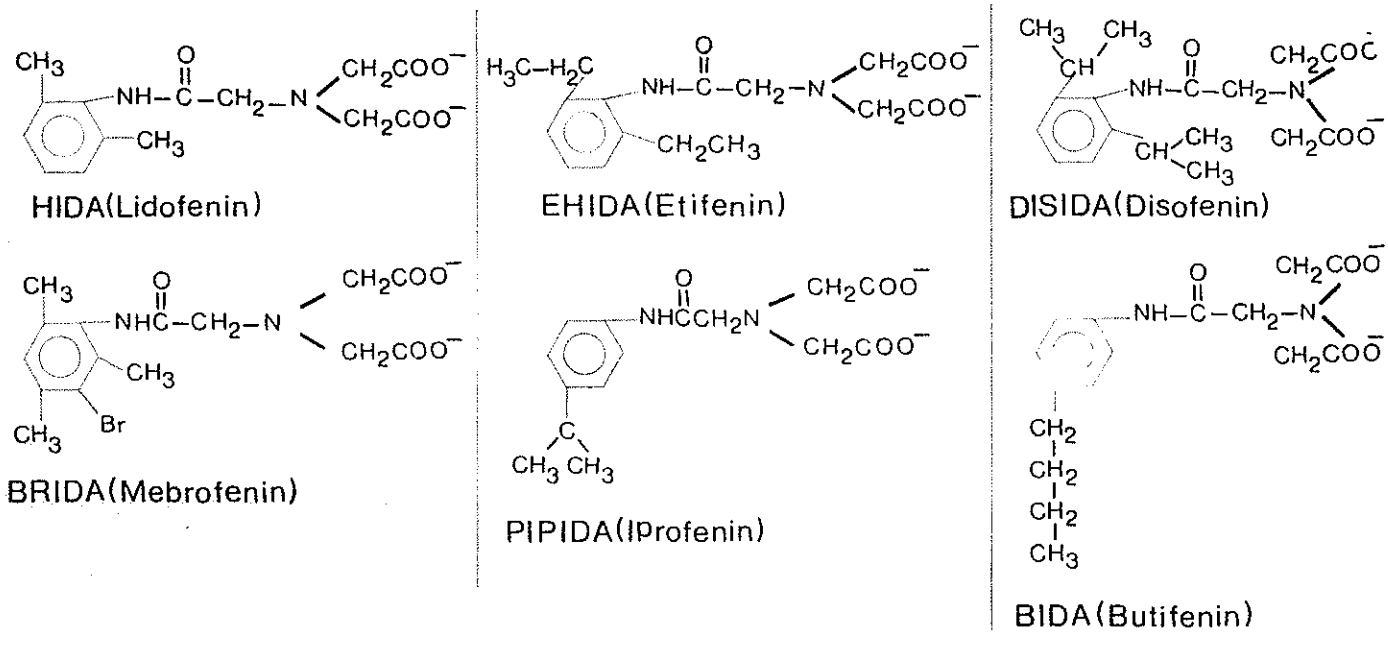
۱ـ ترکیب EHIDA بخاطر زمان انتقال سریع از کبد و دفع کمتر از سیستم ادراری نسبت به HIDA و PIPIDA دارای ویژگی بالاتری می‌باشد (۱۲، ۱۱، ۱۰).

۲ـ BIDA دارای زمان انتقال طولانی‌تر از کبد بوده و اجازه می‌دهد تا تصویر واضحی از مجاری صفرا داشت (۱۳).

۳ـ DISIDA دارای کینتیکی مشابه با EHIDA اما مقاوم‌تر نسبت به سطح بیلیروبین خون می‌باشد، یعنی رقیب



شکل (۵) : شمای ساختمان ملکولی کمپلکس 99m TC-BRIDA




شکل (۶) : ۶ نمونه مشتق IDAکه بطورکلینیکی مورد آزمایش قرارگرفته‌اند.

... برای جذب کبد درمقابل بیلیروبین است (۱۴) ... بطور قابل توجهی درمقابل بیلیروبین خون مقاوم است و
... BI دارای ویژگی بالا، سرعت دفع سریع از کبد و ... بهتر از DISIDA عمل می‌کند (۱۵) (جدول ۱).

جدول (۱)- سینتیک و ویژگی مشتقات TDA که بطور کلینیکی استفاده شده است.

| Compound | $T_{max}$ | $T_{50}$ | Specificity |
|---|---|---|---|
| O-Dimethyl | 4.7 | 9.6 | 63.4 |
| O-Diethyl | 5.3 | 9.1 | 83.8 |
| O-Diisopropyl | 5.9 | 26.7 | 89.6 |
| P-n-Sutyl | 3 | 18 | 86.0 |
| 2, 4, 6. Trimenthyl bromo | 4.1 | 5.5 | 94.6 |

اهمیت ساخت کیت مبروفنین (BRIDA) به لحاظ توجه بـه ویـژگی‌های آن جـهت سـنتی‌گرافـی کـبدی صـفراوی بخصوص در بیماران یرقانی انگیزه‌ای گـردید تـا سـنجش رادیوایزوتوپ مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایـــران سـنتز و فـرمولاسیون آن را بـعنوان یک کـیت رادیودارویی مهم مورد توجه قراردهد.

## روش و مواد اولیه

در تهیه کیت مبروفنین و بررسی کیفیت آن می‌توان سه مرحله سنتز، فرمولاسیون و کنترل کیفی را درنظر گرفت که ذیلاً بطور خلاصه شرح داده می‌شود:

مرحلهٔ سنتز - باتوجه به فرمول شکل ۶ سنتز این ماده در سه مرحله به شرح زیر صورت پذیرفت:

A- تهیه ۲ و ۴ و ۶ تری‌متیل کلرواستانیلید: ۰/۲۵ مول تری‌متیل آنیلین را در مقدار مناسبی اسید استیک حل کرده و در دمای زیر ۵ درجه سانتیگراد، ۰/۲ مول کلرواستیل کلراید را به‌آن اضافه می‌کنند و به‌کمک همزمن مغناطیسی مرتب آن را هم می‌زنند. در شرایـط مـناسب ۰/۷۶ مـول اسـتات سدیم حل‌شده در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و خوب مخلوط می‌کنند پس از یک سـاعت آن را بـا کـاغذ صـافی صاف و با آب مقطر شستشوی مـی‌دهند، مـاده حـاصل را خشک و برای سنتز مرحله دوم از آن استفاده می‌گردد.

را در مقدار B- برومینه‌کردن ماده A (۲ و ۴ و ۶ تری‌متیل کلرواستانیلید): ۰/۱۸ مول از مادهٔ محلول در A کافی اسید استیک خالص حل و ۰/۲۴ مول برم استیک اسید را ($Br_2$) در مدت ۲ ساعت قطره‌قطره به ظرف واکنش اضافه می‌کنند. مخلوط بـرای مـدت ۱۶ سـاعت در دمـای مـحیط هـم‌زده مـی‌شود (بـا هـمزن مـغناطیسی). ۵۰۰ مـیلی‌لیتر مـحلول ۰/۰۱۴ مولار سدیم متابی سولفیت را همراه همزدن مداوم به مخلوط اضافه و رسوب حاصل را فیلتر و سپس خشک می‌کنند.

ج - تهیه ۲ و ۴ و ۶ تری‌متیل ۳ بروموا‌ستانیلید و ایمینو دی‌استیک اسـید (مـبروفنین): ۰/۲۲ مـول از مـاده B را در مقداری مناسب اتانل ۹۵٪ حل‌کرده و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ایمینو دی‌استیک اسید (۰/۸ مولار) با pH کـاملاً قلیایی را به مـحلول واکـنش اضـافه و حـرارت مـی‌دهند. مخلوط را با کمک همزن مغناطیسی خوب همزده تا کاملاً حل شده سپس برای مدت ۵ ساعت آن را رفلاکس کـردیم درحالیکه pH محیط را بکـمک مـحلول سـود ۳/۷ دائـماً تنظیم و در حوالی ۱۰ نگه‌می‌دارند برای مدت ۵ ساعت آن را رفلاکس می‌کنند. پس از اینکه واکنش خاتمه یافت حلال اتانل را بکمک سیستم تبخیر در خلاء خـارج و از مـحلول باقی‌مانده بکمک اسید کلریدریک رسـوب تـهیه مـی‌کنند. برای خالص‌سازی آن، رسوب را پس از شستشوی مکرر با آب، در اتانل ۸۵٪ داغ حل و در سرما کریستال تشکیل شده آن را جدا می‌کنند. پس از اینکه کریستال حاصل را خشک کردند مقدار ۱۷/۴ گرم محصول (مبروفنین) با راندمان ۴۵ درصد بدست آمد.

## فرمولاسیون

فرمولی که در زیر ارائه می‌شود جـهت تـهیه ۱۲ کـیت آزمایشی می‌باشد و برای تولید انبوه آن به نسبت تعداد کیت موردنیاز ضرایب مقادیر افزایش پیدامی‌کند. تولید انـبوه در شرایطی کاملاً اسـتریل و عـاری از مـواد پـیروژن بـوده و کیت‌ها بصورت لیوفیلیزه تهیه می‌شوند.

۳۰۰ مـیلی‌گرم مـبروفنین را در حـجم ۶ مـیلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس به‌کمک محلول سود ۲/۷ مقدار pH آن برای حدود ۷ تنظیم شد تا پودر مبروفنین کاملاً حل گردد.

۰/۵ میلی‌لیتر محلول کلرور قلع (5mg/ml) به آن اضافه کرده و سپس pH آن برای حدود ۶ـ۵/۵ تنظیم و حجم آن به ۱۲ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول را از فیلتر میلی‌پور عبور می‌دهند و بین ۱۲ ویال بطور مساوی تقسیم می‌کنند. ویال‌ها را در فریزر قرارداده تا کاملاً منجمد شوند. سپس کنترل رادیوشیمیایی و آزمایشهای دیگر برروی آنها انجام گرفت.

برای بهترساختن فرمول فوق بررسی‌های لازم در عوامل گوناگون مثل غلظت کلرور قلع، میزان pH اکتیویته، زمان، دما و آنتی‌اکسیدان به‌عمل آمد، که نتایج آن ازنظر آزمایشهای رادیوشیمیایی و توزیع بیولوژیک در مبحث مربوطه بیان خواهد شد.

## کنترل کیفی

برای بررسی ساختمان شیمیایی مبروفنین و اطمینان از خلوص آن سه آزمایش زیر صورت گرفت:

۱ـ اندازه‌گیری نقطهٔ ذوب: در این آزمایش از دستگاه نقطه ذوب متلر (Metler) مدل $FP_{62}$ استفاده که با روش اپتیکوالکترونیک کارمی‌کند.

۲ـ تهیه طیف مادون قرمز (IR)ـ طیف‌های مورد نظر FTIR بروکر مدل SF566 به‌دست آمد (شکل ۷).

۳ـ تهیه طیف NMR: برای تهیه طیف NMR ازدستگاه ۱۰۰ مگاهرتز دانشکده داروسازی دانشگاه تهران استفاده شد (شکل ۸).

سپس برای تعیین خلوص رادیوشیمیایی و میزان بازدهی کمپلکس به‌وجود آمده بعد از نشاندار ساختن کیت با تکنزیم ($TC\text{-}99m\text{-}Co_4$) از روش کروماتوگرافی استفاده گشت، که در این آزمایشها از دو نوع حلال و دو نوع کاغذ مخصوص کروماتوگرافی به‌شرح زیر استفاده گردید:

۱ـ حلال متانل ۷۰٪ و (ITLC(SA که در آن ناخالصی $TC\text{-}99m\text{-}Co_2$ (تکنزیم احیاشده) در مبدأ باقی‌مانده و کمپلکس TC-99m-BRIDA و $TC\text{-}99m\text{-}Co_4$ به‌بالا رانده می‌شوند.

۲ـ حلال متیل اتیل کتون و کاغذ واتمن شماره ۱ که در آن کمپلکس $TC\text{-}99m\text{-}Co_2$ در مبدأ باقی‌مانده و $TC\text{-}99m\text{-}Co_4$ به‌بالای کاغذ کشیده می‌گردد.

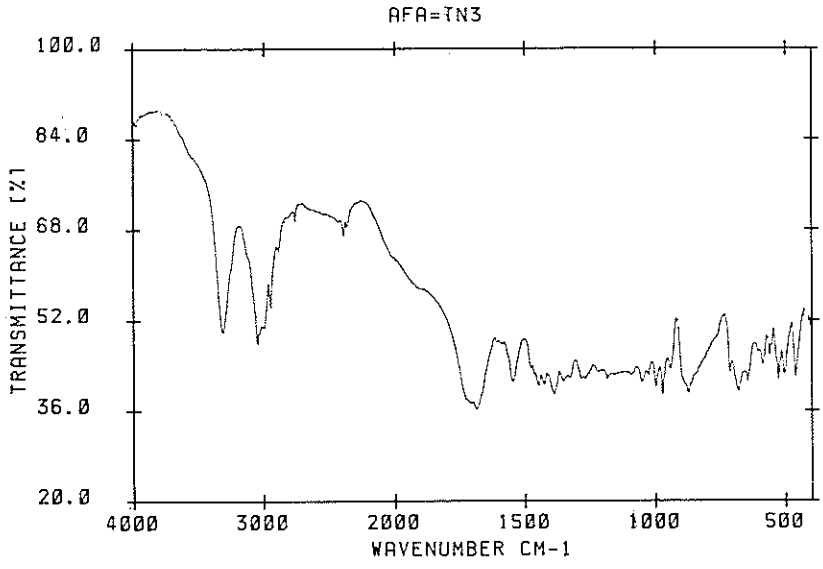
با استفاده از روش فوق و اندازه‌گیری قسمت به قسمت کاغذ توسط دتکتور یدید سدیم درصد خلوص و ناخالصی رادیوشیمیایی محاسبه گردید. بعد از بررسی رادیوشیمیایی جهت حصول اطمینان کافی از خلوص کمپلکس بوجودآمده آزمایش‌های بیولوژیک صورت گرفت. در آزمایش‌های مذکور از موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی نژاد Musculus و موش‌های سفید بزرگ (Rat) از نژاد Wistar و Spragu استفاده شد.

## نتایج

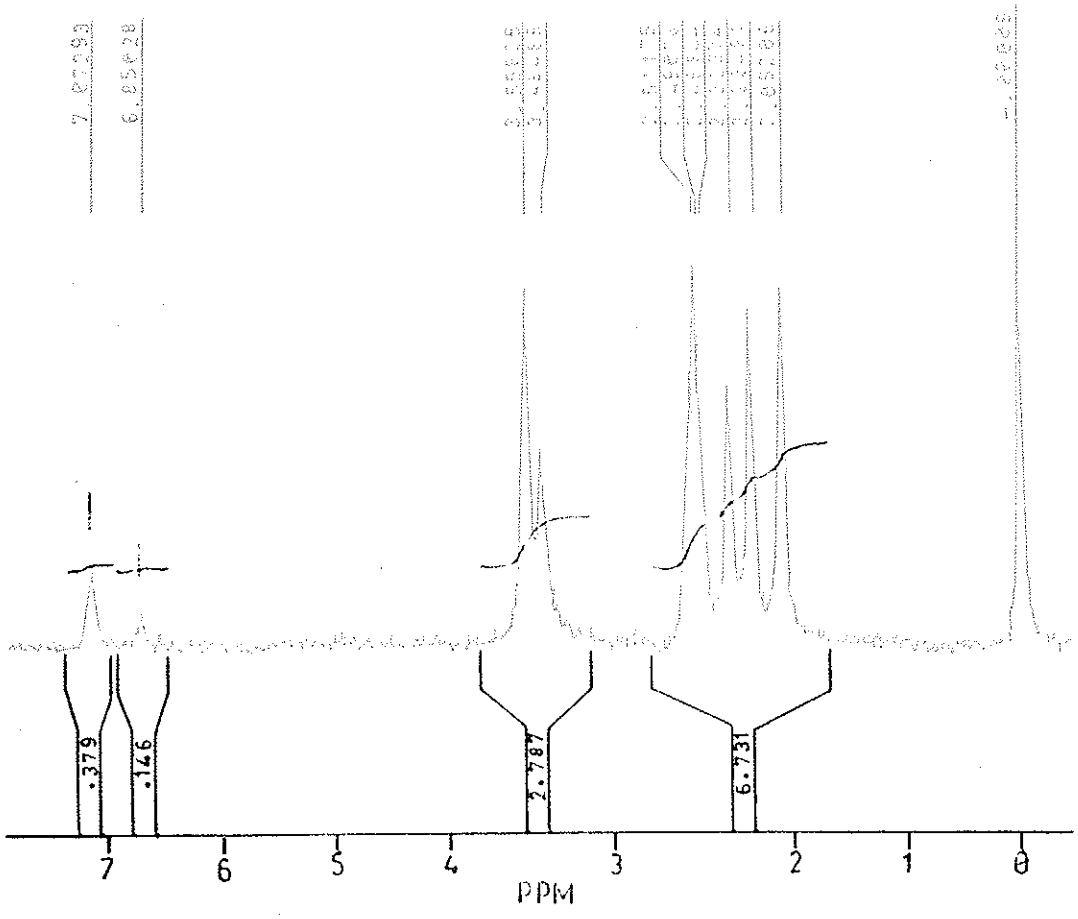
۱ـ نتایج حاصل از کنترل شیمیایی مبروفنین سنتزشده عبارتست از نقطهٔ ذوب که $195^{\circ}$ درجه سانتیگراد به‌دست آمد و طیف NMR آن در نواحی ۲/۱ و ۲/۲ و ۲/۳ برای ۹ هیدروژن مربوطه به سه عامل متیل ($Ar\text{-}(CH_3)_3$) و در ۳/۴ برای دو هیدروژن ($\text{-}N\text{-}CH_2\text{-}Co\text{-}$) و در ۳/۶ برای چهار هیدروژن [$\text{-}N(CH_2)_2$] و نیز ۷/۱ برای یک هیدروژن حلقهِ فنیل (Ar-H) پیک نشان داد. همچنین در بررسی طیف FTIR نواحی جذبی $1545cm^{-1}$ (کربوکسی)، $1675cm^{-1}$ (کربونیل) $3020cm^{-1}$ (حلقه فنیل)، $4320cm^{-1}$ (-NH-) به‌طور مشهود مشخص گردید و برای بررسی سمیت آن با تزریق مقادیر مختلفی از مبروفین به موشهای آزمایشگاهی مقدار LD50 آن درحدود ۲۶۰ـ۲۳۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بدست آمد.

۲ـ بررسی رادیوشیمیایی کمپلکس TC-99m-BRIDA با افزودن پرتکنتات برروی کیت و با تغییر عوامل مؤثر در افزایش کمپلکس تاحد ۹۸ درصد نتایج زیر حاصل گردید:

الف ـ تأثیر غلظت کلرور قلع دوظرفیتی ـ مقدار کلرور قلع در فرمولاسیون از میزان ۰/۱ تا ۱/۶ میلی‌گرم تغییر داده شد و تأثیر آن در ایجاد کمپلکس TC-99m-BRIDA مطابق با جدول ۲ اندازه‌گیری گردید.




شکل (۷) : طیف FTIR میروفنین سنتز شده




شکل (۸) : طیف NMR میروفنین سنتز شده

جدول (۲)ـ تأثیر غلظت قلع در میزان کمپلکس

| کلرور قلع | ۱/۶ | ۱/۴ | ۱/۲ | ۱ | ۰/۸ | ۰/۴ | ۰/۲ | ۰/۱ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| درصد کمپلکس | ۸۲±۱/۲ | ۸۸±۰/۳۹ | ۹۰/۹±۱/۳ | ۹۵/۲±۰/۸ | ۹۷/۳±۰/۲ | ۹۸/۴±۰/۲۷ | ۹۸±۱/۸۷ | ۹۷/۵±۱ |

ب ـ تأثیر pH ـ در این آزمایش حد pH بدست‌آمده برای فرمولاسیون ۵/۵ـ۶/۵ بود. حساسیت pH فرمولاسیون بقدری است که اگر pH کمتر یا بیشتر ازحد بدست آمده باشد رسوب ایجاد می‌گردد.

ج ـ تأثیر آنتی‌اکسیدان و پایداری کمپلکس ـ کلرور قلع نقش اصلی را در ایجاد کمپلکس بازی می‌کند و چون مقادیر کمی از آن استفاده می‌شود ضروریست برای بالابردن زمان انقضاء و پایداری کیت از یک آنتی اکسیدان سود جست. محققین این گروه از اسید آسکوربیک بعنوان آنتی‌اکسیدان استفاده کردند. تأثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان در میزان کمپلکس و پایداری آن در جدول ۳ بیان شده است.

جدول (۳)ـ درصد خلوص کمپلکس در حضور آنتی‌اکسیدان با اکتیویته ۲۰ میلی‌کوری

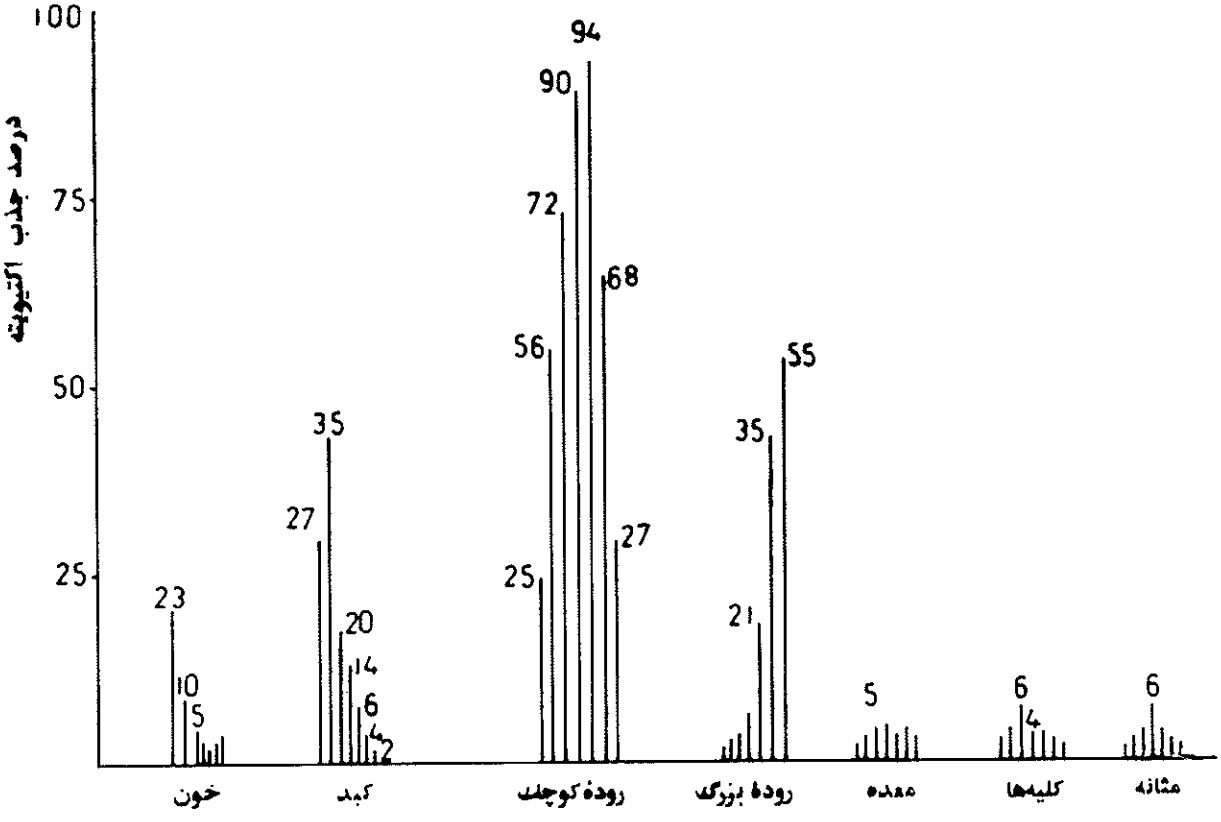
| غلظت آسکوربیک اسید / ساعت زمان | ۰ | ۰/۰۱ میکرومول | ۰/۱ میکرومول | ۱ میکرومول |
|---|---|---|---|---|
| ۰ | ۸۰±۱ | ۸۴±۰/۶ | ۸۱±۱/۵ | ۶۵±۲/۸ |
| ۰/۵ | ۹۸±۰/۴ | ۹۴/۲±۰/۹ | ۹۳±۰/۸ | ۷۵/۵±۱/۹ |
| ۱ | ۹۸±۰/۶ | ۹۵/۶±۱/۱ | ۹۶±۰/۵ | ۷۹±۰/۴ |
| ۲ | ۹۷/۲±۰/۷ | ۹۶/۴±۰/۵ | ۹۶±۰/۹ | ۸۷±۱/۲ |
| ۳ | ۹۷±۰/۲ | ۹۶/۷±۰/۹ | ۹۶/۹±۰/۱۴ | ۸۹/۳±۰/۷ |
| ۴ | ۹۷±۰/۷ | ۹۶/۶±۰/۱ | ۹۶±۰/۵ | ۹۲±۱/۲ |

د ـ تأثیر اکتیویته در میزان کمپلکس ـ کیت مبروفنین را با غلظت‌های مختلفی از اکتیویته نشاندار کرده، نتایج برای مقادیر ۵ تا ۱۵۰ میلی‌کوری تقریباً یکسان بوده و ۹۸ـ۹۵ درصد خلوط رادیوشیمیایی نشان داد. برای مقادیر بالای ۲۰۰ میلی‌کوری درصد کمپلکس کاسته شد و میزان ناخالصی رادیوشیمیایی افزایش یافت.

هـ ـ تأثیر زمان و دما ـ در دمای آزمایشگاه و برای زمان‌های مختلف کمپلکس مبروفنین مورد آزمایش رادیوشیمیایی قرارگرفت. ملاحظه شد که ۱۵ دقیقه بعد از افزایش $TC\text{-}99m\text{-}O_4$ خلوص رادیوشیمیایی به‌حداکثر مقدار خود یعنی ۹۸ درصد رسید و این مقدار تا ۶ ساعت بعد همچنان ثابت ماند.

۳ـ بررسی توزیع بیولوژیک TC-99m-BRIDA ـ ۸۰ میکروکوری از کمپلکس مبروفنین در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر را به دسته‌های ۵تایی از موشهای آزمایشگاهی ازطریق ورید دُمی تزریق کرده و در فواصل زمانی ۰ و ۵ و ۱۰ و ۲۰ و ۴۰ و ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق، تعداد ۵ عدد از موشها را کشته و تشریح می‌کنند (شکل ۹).

همچنین هیستوگرامی از خرگوش در فاصله ۵ دقیقه پس از تزریق کمپلکس تهیه شد که نشانگر کلیرانس آن از قلب، کلیه‌ها و کبد می‌باشد (شکل ۱۰). عکسی نیز توسط



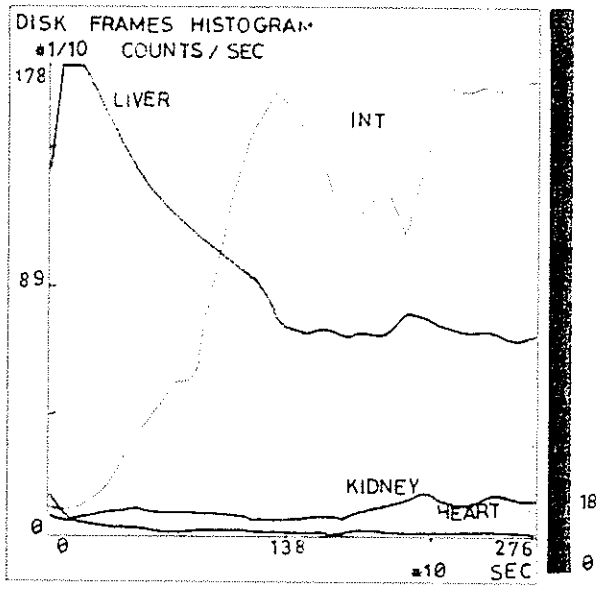

شکل (۹) : نمودار تشریح دسته‌های ۵ تایی موش‌های آزمایشگاهی در زمانهای ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق 99m TC-BRIDA

گاماکامرا از خرگوش گرفته شد که نحوه توزیع اکتیویته را در کبد، روده‌ها و کلیه‌ها در فاصله ۳۰ دقیقه پس از تزریق کمپلکس TC-99m-BRIDA نشان می‌دهد (شکل ۱۱).

## بحث

همانطور که در مقدمه اشاره گردید با جایگزینی الکیل یا هالوژن برروی حلقه فنیل «استانیلید و ایمینودی استیک اسید» می‌توان مشتقات مختلفی از ترکیبات IDA را ساخت. ویژگی هرکدام از این مشتقات بستگی به مقدار جذب کبدی ازطریق صفرا دارد. بطور کلی با جایگزین کردن الکیل‌های سبک برروی حلقه فنیل IDA در موقعیت اورتو می‌توان ترکیباتی بدست آورد که دفع آنها از صفرا سریع می‌باشد و نیز با جایگزینی اضافی در موقعیت‌های متا و پارا لیپوفیلیسیتی (Lipophilicity) ملکول را افزایش داد. ملکول مبروفنین با جایگزینی سه ملکول متیل ($CH_3$) در موقعیت‌های اورتو و پارا و یک اتم بُرم (Br) در موقعیت متای حلقه فنیل ساخته می‌شود (شکل ۶). کمپلکس این ملکول با لیپوفیلیسیتی بالا می‌تواند بطور نسبی درمقابل غلظت‌هایی از بیلیروبین خون مقاومت کند و در بیماران یرقانی بطور مؤثر ازطریق صفرا دفع شود. درحالیکه مشتقات دیگر IDA ازجمله TC-99m-EHIDA قدرت مقابله با بیلیروبین خون را نداشته و در بیماران مذکور دفع ازطریق کلیه‌ها صورت می‌گیرد (شکل ۱۲).

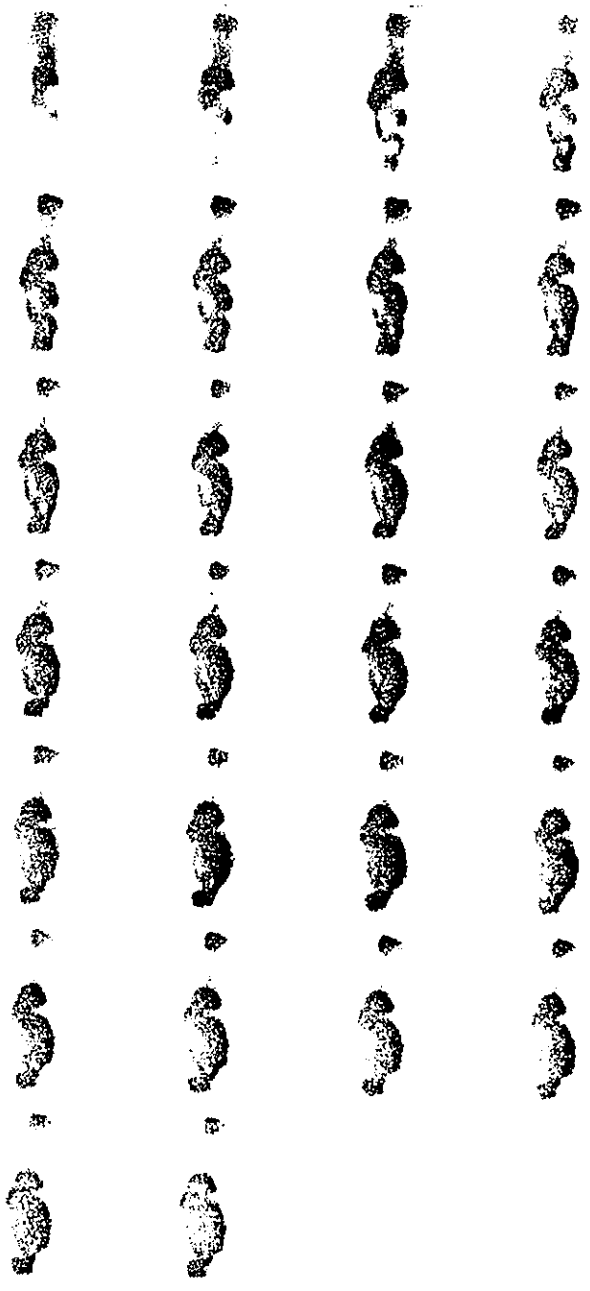
در گزارشات مختلف دو نوع مشتق TC-99m-DISIDA و TC-99m-BRIDA بصورت In Vitro برروی سلول‌های کبد در موش‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرارگرفتند. این گزارشات نشان می‌دهند که حضور ۱۰٪ وزنی بیلیروبین باعث کاهش مقدار جذب DISIDA (Uptake) تا ۷۱ درصد




شکل (۱۰) : نمایش هیستوگرامی از خرگوش تا ۴۵ دقیقه پس از تزریق 99m TC-BRIDA

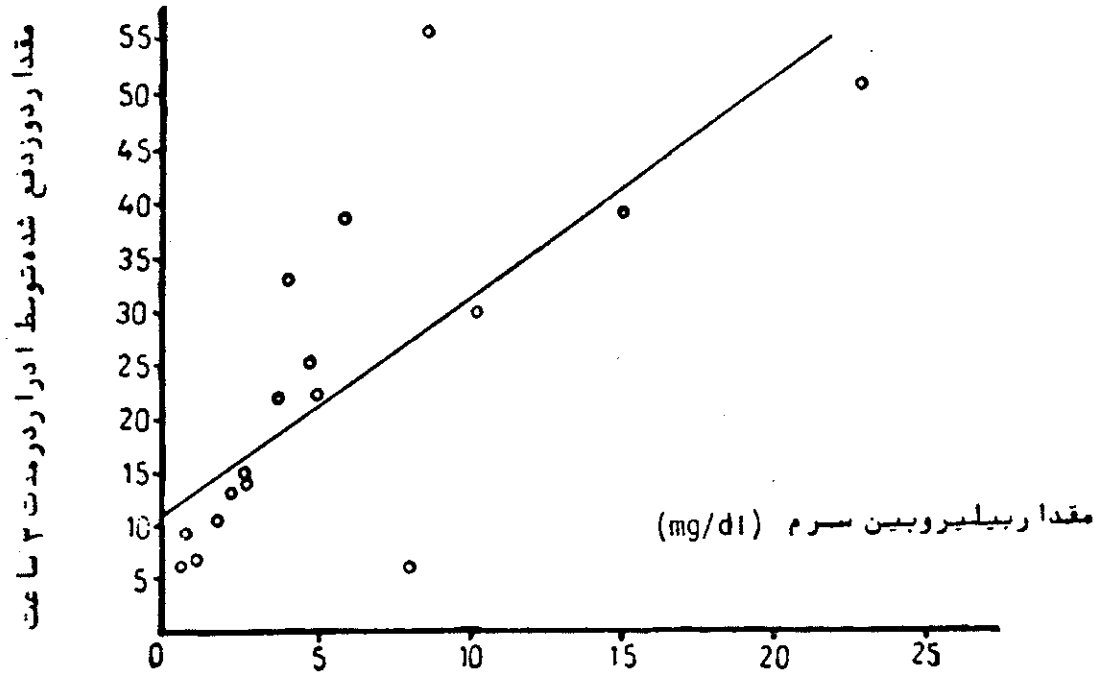
ملکول با لیپوفیلیسیتی بالا می‌تواند بطور نسبی درمقابل غلظت‌هایی از بیلیروبین خون مقاومت کند و در بیماران یرقانی بطور مؤثر ازطریق صفرا دفع شود. درحالیکه مشتقات دیگر IDA ازجمله TC-99m-EHIDA قدرت مقابله با بیلیروبین خون را نداشته و در بیماران مذکور دفع ازطریق کلیه‌ها صورت می‌گیرد (شکل ۱۲).

در گزارشات مختلف دو نوع مشتق TC-99m-DISIDA و TC-99m-BRIDA بصورت in Vitro برروی سلول‌های کبد در موش‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرارگرفتند. این گزارشات نشان می‌دهند که حضور ۱۰٪ وزنی بیلیروبین باعث کاهش مقدار جذب DISIDA (Uptake) تا ۷۱ درصد می‌گردد. در آخرین کار انجام‌شده بیان شده است که مقدار جذب BRIDA برای مقادیر حتی بیش از ۲۰٪ وزنی بیلیروبین نیز درحد ۷۰ درصد باقی می‌ماند (شکل ۱۳) علاوه بر مطالب فوق که اهمیت ساختمان ملکولی مبروفنین را بعنوان یک عامل سنتی‌گرافی معرفی می‌کند، عوامل دیگری چون ماده احیاکننده (کلرور قلع) و pH در فرمولاسیون کیت نقش مهمی دارند.



شکل (۱۱) : 99m TC-BRIDA درکبد و روده‌های خرگوش تا ۳۰ دقیقه پس از تزریق

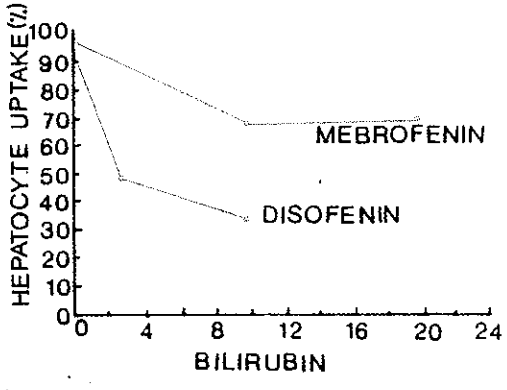
کلرور قلع دوظرفیتی که دارای مولکول آبی می‌باشد ($SnCl_2, 2H_2O$) یک احیاکننده قوی است که پرتکنتات سدیم (TC-99m-$O_4$ Na) را احیاکرده و آن را ظرفیت‌های




شکل (۱۲) : میزان دفع 99m TC-EHIDA از طریق ادرار با تغییر غلظت بیلیروبین خون

پائین خود به‌فرم شیمیایی اکسید تکنزیم ($TC\text{-}99m\text{-}O_2$) می‌رساند و سپس یک ملکول $TCo_2$ با دو ملکول لیگاند مبروفنین کمپلکسی پایدار تشکیل می‌دهد. فعالیت کلرورقلع و همچنین ایجاد کمپلکس بستگی به pH محیط واکنش دارد بطوریکه مقدار pH مناسب هم تثبیت کننده قلع در شرایط پایدار وهم نگهدارنده لیگاند در موقعیت کاملاً محلول می‌باشد. با آزمایشهای رادیوشیمیایی از طریق کروماتوگرافی می‌توان مقدار درصد کمپلکس TC-99m-BRIDA را به‌عنوان خلوص رادیوشیمیایی محاسبه کرد. مقدار ناخالصی بدست آمده از $TC\text{-}99m\text{-}o_2$ و $TC\text{-}99m\text{-}o_4$ در فرمولاسیون نهایی مبروفنین مجموعاً کمتر از ۵ درصد بود.

عواملی که باعث می‌شوند تا میزان ناخالصی در یک کیت لیوفیلیزه افزایش یابد عبارتند از اکسیژن هوا، حرارت و رطوبت که هرکدام می‌توانند برروی قلع (II) موجود در کیت تأثیر گذاشته، آن را اکسیده و یا هیدرولیز کنند. وقتی قلع (II) اکسید شود قلع (IV) به‌دست می‌آید که در این جا نقش خود




شکل (۱۳) : تاثیر بیلیروبین در جذب کبدی 99m TC-BRIDA و 99m TC-DISIDA بصورت Invitro بر روی کبد موشهای آزمایشگاهی

را بـه‌عنوان یک احیاکننده برای $TCo_4$ ازدست می‌دهد درنتیجه میزان ناخالصی $Tc\text{-}99m\text{-}o_4$ در محلول کیت بالا مـی‌رود و مـیزان کـمپلکس Tc-BRIDA کاهش می‌یابد. همچنین وجود میزان کم آب در کیت لیوفیلیزه و حرارت محیط باعث می‌گردند که قلع موجود در کیت را هیدرولیز کرده و درموقع افزودن پرتکنتات، کمپلکس تشکیل نشود و هیدرواکسید قلع (IV) بوجودآمده با تکنیزیم احیاشود و ایجاد کلوئید کند که بیشتر جذب سیستم رتیکولواندوتلیال (Reticuloendothelial) خواهد شود.

لذا علاوه بر کنترل معمول رادیوشیمی، شیمیایی و بیولوژیک برروی نمونه‌های کیت لیوفیلیزه ساخته شده، میزان رطوبت، خلأ و مدت زمان پایداری نیز کنترل گردد.

همچنین آزمایشهای شیمیایی کنترل قلع نشان داده که محلول کیت مبروفنین (در سالین) در شرایط دمای آزمایشگاه تا۴ ساعت پایدار است و سپس میزان قلع (II) موجود در آن به‌شدت اکسید و به قلع (IV) تبدیل می‌شود. این مسئله می‌تواند بعد از افزودن پرتکنتات مقدار ناخالصی رادیوشیمیایی را افزایش دهد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه همکاران بخش رادیوایزوتوپ بویژه خانم طیبه هادی‌زاد در امر سنتز، خانم شهناز طلوعی در کنترل شیمیایی و رادیوشیمیایی، آقای عبداله‌پور در ساخت کیت، خانم فاطمه محمود خان و آقامحمدی صابری در کنترل بیولوژیک و خانم دوست فرهی در تمام زمینه‌های فوق، تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

## References

1) Schwenh. M. Transport systems of Isolated hepatocytes studies on the transport of biliary compounds. Arch. Toci col. 44; 113-126; 1980.

2) Frizberg, A.R. The evaluation of hepatocyte function with radiotracers. In Billinghurst, M.W; editor studies of cellular Function using Radiotracer. Boca Radon, Fla: CRC Press. 1982: 7392.

3) Loberg. M.D., Nunn, A.D., Porter, D.W. Development of hepatobiliary agents. Nucl. Med. Annu. 1981: 1-33.

4) Taplin. G.V.; Meredith. O.M.,; Kade. H. The radioaotive I-131 Tagged rose bengal uptake excretion test for liver function using external gamma ray scintillation counting techniques. J. Lab. Clin. Med 45; 665-678; 1955.

5) Frinau. G. Why do TC-99m chelates workfor cholescintigraphy? Eur. J. Nucl. Med. 1: 137-139; 1976.

6) Frizberg, A.R.; Klingensmith. W.C: Auest for perfect hepatobiliary radiopharmaceutical. J. Nucl. Med, 23: 543-546; 1982.

7) Harvy. E, Loberg. M; copper. M. TC-99m HIDA A new radiopharmaceutical for hepatobiliary imaging. J. Nucl Med. 16; 533; 1975.

8) Chervu. L.R; Nunn. A.D; Lober, M.D. Radiopharmaceuticals for hepatobiliary imaging. Semin. Nucl. Med. 12; 5-17; 1982.

9) Lober. M.D; Fields. A.T. chemical structure of TC-99m Labeled N-(2, 6- Dimethyl phenyl carbamoyl methyl) imimodiacetic acid (TC-HIDA). Int. J. Appl. Radiat. Isot 29: 167-173; 1978.

10) Dudczak. R.; Kletter. K.; Anglberger, P.; Frishaul, H. comparison of two different biliary agents in healthy subjects and in paitients with liver disease. Ew. J. Nucl. Med. 4; 365-368; 1979.

11) Klingensmith. W.C; Fritzberg. A.R.; spitzer. V.M.; Koep. L. J. chlinical comparison of 99m-TC diethyl IDA AND 99m-TC-PIPIDA for evaluation of the hepatobiliary system. Radiology 134; 195-199; 1980.

12) Klingensmith. W.C.; Fritzberg. A. R; Spitzer. V.M; Kuni. C.C.; Shanahan. W.S.M. clinical comparison of diisopropyl- IDA TC99m and diethyl-IDA TC99m for evaluaton of the hepatobiliary system Radiology. 140; 791-795; 1981.

13) Hernandz. M.; Rosenthall. L.A. Crossover study comparing the kinetics of TC-99m labeled diisopropyl and P. butyl. IDA analogs in patients. Clin. Nucl. Med. 5; 159-165: 1980 a.

14) Hernandez. M.; Rosenthall. L.A Crossover study comparing the Kinetics of TC-99m- labeled diethyl and diisopropyl-IDA. Clin. Nucl. Med. 5; 352-258; 1980 b.

15) Klingensmith. W.C; Fritzberg. A.R; Spitzer. V.M; kuni, C.C; williamson. M.R; Gerhold. J.P. work in progress: clinical evaluation of TC-99m Trimethylbromo IDA and TC-99m- diisopropyl- IDA for hepatobiliary imaging. Radiology 146: 181-184: 1983.

16) Krishnamurthy. S; Krishnamurthy. G.t. Nuclear hepatology: Where is it heading now? J. Nucl. Med. 29: 1144-1149; 1988.

17) Krishnamarthy. quantitative assessment of hepatobiliary diseases with TC99m- IDA scintigraphy. Nucl, Med. Anna 1988: 309-330.