ارزیابی جذب آنتی بادی های مونوکلونال در تومور و ارگانهای حیاتی با دو روش تصویر برداری و تشریح

مجتبی صلوتی[1*]، حسین رجبی[2]، محمد حسین بابایی[3]

۱- استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه رادیو ایزوتوپ، پژوهشگاه علوم وفنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱٤ **تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۱۸**

چکیده

مقدمه: بررسی توزیع بیولوژیکی در مدل های حیوانی یکی از مهمترین روش های کنترل کیفی در بررسی میزان جذب پرتوداروها در تومور نسبت به سایر ارگانها است. هدف از پژوهش حاضر طراحی یک روش نرم افزاری جهت ارزیابی جذب پرتو دارو در تومور و ارگانهای حیاتی بدون کشتن حیوان مدل با استفاده از تصاویر سینتی گرافی در پزشکی هسته ای است.

مواد و روشها: پس از تزریق آنتی بادی PR81 نشاندار شده با تکنسیوم ۹۹ به ۳۰ موش BALB/c مبتلا به تومور پستان، تصاویر قدامی و خلفی از موشها ۱۶ ساعت پس از تزریق توسط یک دوربین گامای دو سر برداشته شده و پس از تبدیل آنها به فرمت اینترفایل و انتقال به کامپیوتر شخصی با استفاده از نرم افزار طراحی شده، زوج سازی شدند. سپس با رسم ROI دور هر ارگان، شمارش هر ارگان با در نظر گرفتن سهم شمارش زمینه و ضریب کالیبراسیون بدست آمد. پس از تصویر برداری موشها کشته شدند و اکتیویته ارگان های مورد نظر بطور جداگانه پس از توزین با استفاده از یک کنتور چاهی شمارش گردیدند. سپس شمارش بدست آمده برای هر ارگان از هر دو روش (بر حسب شمارش در دقیقه)، بر وزن بافت مورد نظر تقسیم، میانگین گیری و با هم مقایسه گردید.

نتایج: بین اکتیویته شمارش شده در هر ارگان در روش تشریح حیوان و اکتیویته محاسبه شده در همان ارگان با استفاده از روش نرم افزاری تفاوت معنی داری وجود داشت. با این وجود یک رابطه خطی بین شمارش ارگان های اصلی مشابه یافت شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که گرچه روش نرم افزاری طراحی شده نمی تواند به دلیل همپوشانی بافت ها با یکدیگر جهت تعیین اکتیویته مطلق همه ارگان ها جایگزین روش تهاجمی شود ولی می تواند جهت مقایسه نسبی اکتیویته تجمع یافته در تومور و ارگان های حیاتی به منظور ارزیابی اولیه کیفیت پرتوداروهای بیولوژیک جهت آشکارسازی تومورها استفاده شود. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۷، شماره ۴، پیاپی (۲۹)، زمستان ۸۹: ۴۶-۴۱)

واژگان کلیدی: توزیع بیولوژیکی، پرتودارو، تصاویرسینتی گرافی، PR81 نشاندارشده با تکنسیوم

* **نویسنده مسؤول: مجتبی صلوتی**

آدرس: گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

saloutim@yahoo.com

تلفن : ۴۲۶۱۲۲۱ (۲۴۱) ۹۸+

۱- مقدمه

تصویر برداری از تومور ها با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال نشاندار شده با مواد رادیو اکتیو یک روش امیدوار کننده جهت تشخیص زود رس سرطان در پزشکی هسته ای به روش رادیوایمونوسینتی گرافی است [۱]. بررسی توزیع بیولوژیکی در مدل های حیوانی یکی از مهمترین روشهای کنترل کیفی پرتو داروها است [۲]. میزان جذب یک پرتو دارو در تومور نسبت به سایر ارگانها پیش از مطالعات فاز انسانی ضروری است. این نوع آزمایش اغلب در حیوانات کوچک با هدف تعمیم نظری نتایج به انسان انجام می شود. در حال حاضر دو روش اساسی برای بررسی توزیع حیاتی مواد رادیو اکتیو در بافت های حیوانی وجود دارد. روش اول خارج کردن اندام ها و اندازه گیری اکتیویته موجود در آنها به وسیله شمارنده های چاهی است که روشی وقت گیر بوده و نیاز به کشتن و تشریح حیوانات دارد. کشتن حیوانات علاوه بر مسائل اخلاقی موجب از دست رفتن نمونه در هر اندازه گیری می شود که این خود موجب افزایش هزینه و صرف زمان برای یک تحقیق است. به خصوص به علت قیمت گزاف آنتی بادی های مونوکلونال این امر حائز اهمیت بیشتری است. روش دوم جهت بررسی توزیع حیاتی مواد رادیو اکتیو تصویر برداری و استخراج اطلاعات لازم با پردازش تصاویر است [۳]. مزیت اساسی این روش آن است که شمارش بافت های مختلف در هر نمونه حیوانی به تعداد دفعات دلخواه قابل اندازه گیری است. تصویر برداری برای این منظور عموما با استفاده از سیستم های تصویر برداری PET یا SPECT صورت می گیرد با این وجود در مورد میزان دقت این روش سوالاتی مطرح می باشد. در این تحقیق از آنتی بادی مونوکلونال PR81 نشاندار شده با تکنسیوم ۹۹ بعنوان پرتوداروی انتخابی جهت مقایسه دو روش استفاده گردید. آنتی بادی PR81 یک آنتی بادی مونوکلونال موشی بر علیه آنتی ژن MUC1 است که توسط گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس بر علیه سرطان پستان انسان تهیه شده است [٤]. نشاندارسازی این آنتی بادی با 99mTc به روش های مستقیم و غیر مستقیم توسط صلوتی و همکاران انجام و مشخص شده است که آنتی بادی نشاندار شده می تواند با حساسیت بالایی تومور پستان را در مدل های حیوانی هدف گیری نماید [٦، ٥]. هدف از تحقیق حاضر مقایسه این دو روش به منظور ارائه یک نرم افزار جهت ارزیابی جذب پرتو داروها در تومور و ارگانهای حیاتی بدون کشتن حیوانات مدل با استفاده از تصاویر سینتی گرافی در پزشکی هسته ای است. تفاوت نرم افزار طراحی شده در این تحقیق با نرم افزار های موجود، استفاده از تصاویر زوج سازی شده برای افزایش دقت و کاهش تضعیف در تصاویر و همچنین کمک گرفتن از فانتوم موش موبی (MOBY) [۷] برای تعیین حدود اندام ها است که برای اولین بار است که بدین شکل انجام می شود.

۲- مواد و روشها

۲-۱- آنتی بادی PR81

آنتی بادی مونوکلونال PR81 در گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و در ویال های یک میلی لیتری بافر فسفات سالین با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر در اختیار ما گذاشته شد.

۲-۲- نشاندار سازی آنتی بادی PR81

آنتی بادی منوکلونال PR81 با استفاده از نتایج مطالعات بدست آمده در مطالعات قبلی توسط صلوتی و همکاران، با تکنسیوم ۹۹ نشاندار گردید [۵]. بطور خلاصه، آنتی بادی در بافر فسفات سالین (PBS) با pH ۷/٤ با استفاده از ۲-مرکاپتواتانل با نسبت مولی از ۱:۲۰۰۰ (آنتی بادی:۲-مرکاپتواتانل) در درجه حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه احیا گردید. سپس آنتی بادی احیا شده بر روی ستون سفادکس جی-۵۰ با اندازه ۱۰ × ۱ سانتی متر با بافر فسفات سالین خالص سازی گردید. یک کیت استخوانی متیلن دی فسفانات با ۵ میلی لیتر سالین۰/۹٪ آماده شد. مقدار۲۰ میکرولیتر از محلول متیلن دی فسفانات به ازاء هر میلی گرم از آنتی بادی احیاء شده به محلول آنتی بادی در غلظت های ۱۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر افزوده شد.

سپس تکنسیوم (۲۰ میکروکوری به ازاء هر میکروگرم آنتی بادی) به مخلوط نهایی اضافه شد.

۲-۳- کنترل کیفی

بازده نشاندار سازی با روش کروماتوگرافی لایه نازک روی کاغذ واتمن بعنوان فاز ساکن و سالین بعنوان فازمتحرک انجام شد. میزان رادیوکلوئیدها با الکتروفورز نیترات سلولز تعیین شد. جهت ارزیابی پایداری فرآورده تولید شده پس از ٢٤ ساعت در سرم خون انسانی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از ستون کروماتوگرافی غربالی بعنوان فاز ساکن و بافر فسفات بعنوان فاز متحرک استفاده شد [۸].

۲-۴- مدل حیوانی تومور پستان

موش های همخون BALB/c ماده با روش پیوند بافت مبتلا به سرطان پستان شدند (۵). تومور اولیه بافت پیوندی، از تومور پستان خودبخود در یک موش BALB/c ماده هم خون تهیه شده بود. بر اساس مطالعات پاتولوژیک تومور این موش از نوع آدنوکارسینومای پستان بود (۹). تومور پستان تهیه شده در پهلوی چپ ۳۰ موش BALB/c ماده با وزن ۲۵ تا۳۵ گرم پیوند گردید.

۲-۵- تصویر برداری

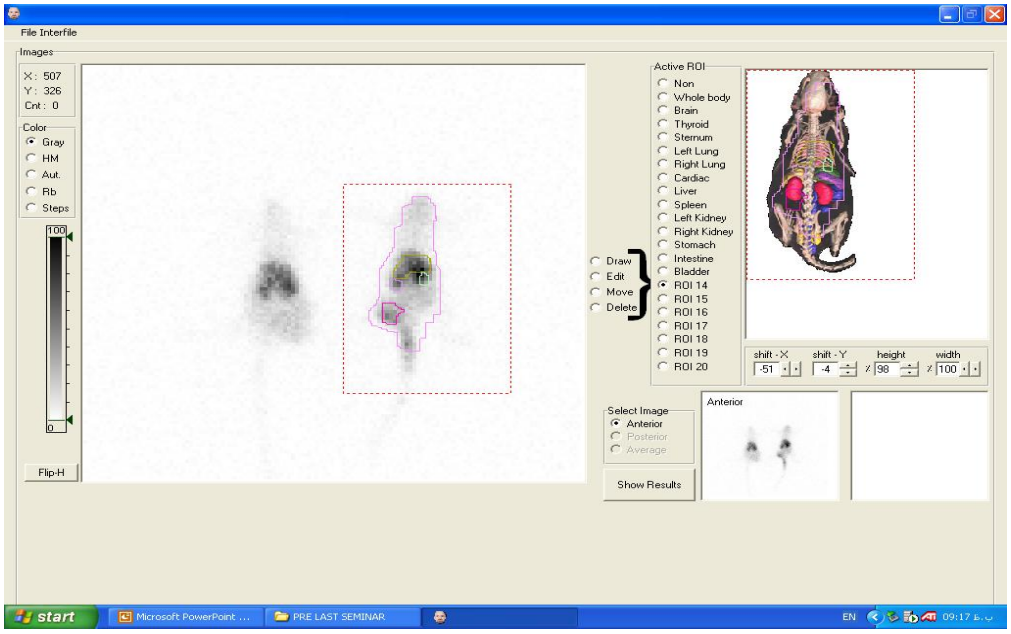
پس از رشد تومورها به حدود ۱ سانتی متر مکعب (پس ازگذشت ۳ هفته از زمان پیوند)، آنتی بادی نشاندار شده با تکنسیوم از طریق ورید دم به موش های مبتلا به تومور پستان (هر موش ۲۰ میکروگرم آنتی بادی، ٤۰۰ میکروکوری اکتیویته در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر) تزریق گردید. ١٦ ساعت پس ازتزریق آنتی بادی نشاندار شده تصویربرداری قدامی و خلفی کل بدن از موش ها با استفاده از دوربین گامای دو سر مجهز به کولیماتور جنرال پرپوز و کم انرژی انجام پذیرفت. برای هر موش در هر نما ۱۰۰ هزار شمارش ثبت گردید. تصاویر پس از تبدیل به فرمت interfile به کامپیوتر شخصی منتقل گردید.

۲-۶- بررسی توزیع حیاتی

بلافاصله پس از تصویربرداری، موش ها به وسیله گاز دی اکسید کربن کشته شدند و ارگان های مورد نظر جدا و پس از شستشو، توزین و اکتیویته آن ها با استفاده از یک کنتور چاهی شمارش گردید. سپس میانگین و انحراف معیار شمارش (بر حسب شمارش در دقیقه) بر وزن (بر حسب گرم)، برای هر ارگان محاسبه گردید.

۲-۷- آنالیز تصاویر

جهت پردازش نیمه اتوماتیک تصاویر یک نرم افزار در محیط visual basic 6 طراحی گردید. صفحه اصلی این نرم افزار در شکل ۱ نشان داده شده است. به وسیله این نرم افزار ابتدا دو تصویر قدامی و خلفی هر موش زوج سازی (conjugate) شدند. سپس به صورت دستی، تصویر یک موش مدل موبی با ابعاد موش مورد بررسی یکسان سازی شد. پس از این مرحله، محدوده بدن حیوان مورد آزمایش به صورت خودکار توسط نرم افزار مشخص شد. با فرض شباهت ساختار آناتومی موش مورد بررسی و موش مدل با استفاده از الگوی اندام های موش مدل، محدوده ارگان های موش مورد بررسی مشخص گردید. شمارش هر ناحیه (ارگان) با در نظر گرفتن سهم شمارش زمینه و ضریب کالیبراسیون تعیین شد. سپس میانگین و انحراف معیار شمارش (بر حسب شمارش در دقیقه) بر وزن (بر حسب گرم) برای هر ارگان محاسبه گردید. در پایان اندازه گیری های بدست آمده به وسیله هر دو روش (با استفاده از روش نرم افزاری و روش کشتن و تشریح موش ها) برای تومور و ارگانهای حیاتی با یکدیگر مقایسه گردیدند.



شکل ۱- نمایی از صفحه اصلی نرم افزار طراحی شده

۲-۸- آنالیز آماری

در این تحقیق از آزمون آماری t-test مزدوج، جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون همبستگی خطی بین دو متغیر جهت بررسی ارتباط بین مقادیر اندازه گیری شده با دو روش استفاده گردید.

۳- نتایج

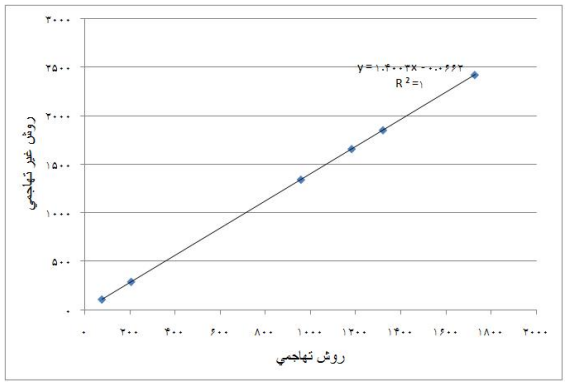
بازده نشاندارسازی آنتی بادی مونوکلونال PR81 در هنگام تزریق (ظرف یک ساعت پس از شروع واکنش) بیش از ۹۰٪ تعیین گردید. میزان رادیو کلوئید ها کمتر از ۳٪ بود. پایداری فرآورده نشاندار شده در سرم خون انسان بیش از ۷۰٪ پس از ۲٤ ساعت اندازه گیری گردید. جدول شماره ۱ نتایج اندازه گیری شمارش های بدست آمده از تومور و ارگان های حیاتی موش های BALB/c مبتلا به تومور پستان را بر حسب شمارش در دقیقه در هر گرم از بافت به وسیله روش تهاجمی و روش نرم افزاری نشان می دهد .

جدول ۱- نتایج اندازه گیری شمارش ها، ۱٦ ساعت پس از تزریق 99mTc -PR81 در تومور و ارگان های حیاتی به دست آمده به وسیله روش تهاجمی و روش نرم افزاری طراحی شده.

ارگان	روش تهاجمی		روش غیر تهاجمی	
	میانگین (شمارش در دقیقه در هر گرم از بافت)	انحراف معیار	میانگین (شمارش در دقیقه در هر گرم از بافت)	انحراف معیار
کبد	۱۳۲۲	۱۰۵	۱۸۵۱	۱٦٦
کلیه ها	۱۱۸۳	۹٤	۱٦۵۷	۱٤۹
ریه ها	۲۰۵	۱٦	۲۸۷	۲۵
قلب	۷۵	٦	۱۰۵	۹
روده ها	۱۷۲۹	۱۳۸	۲٤۲۱	۲۱۷
تومور	۹۵۸	۷٦	۱۳٤۱	۱۲۰

یک نگاه اجمالی به جدول نشانگر آنست که بین نتایج حاصله از شمارش اکتیویته در هر ارگان به روش نرم افزاری و روش کشتن و تشریح حیوان تفاوت قابل ملاحظه ای وجود دارد. آزمون تی مزدوج نیز بیانگر تفاوت معنی دار بین دو سری

داده ها است (P-value <۰/۰۰۱). اما نمودار ۱ نشانگر آن است که ارتباط خطی کاملی بین دو روش وجود دارد و ضریب پیرسون نیز بیانگر همبستگی بسیار بالا بین دو روش است (r=0.9999). عرض از مبدا بسیار کوچک منحنی خطی برازش داده شده نیز نشانگر عدم وجود بایاس قابل توجه بین دو روش است.



نمودار ۱- محور طول و محور عرض به ترتیب بیانگر شمارش اکتیویته بافت در روش تهاجمی و نرم افزاری است. خط راست برازش داده شده بیانگر ارتباط خطی کامل بین دو روش است.

٤- بحث

هدف از تحقیق حاضر برآورد توزیع بیولوژیکی پرتوداروها در بدن حیوانات آزمایشگاهی مدل در پزشکی هسته ای با استفاده از نرم افزار طراحی شده توسط نویسندگان این مقاله است تا به روش غیر تهاجمی اکتیویته تومور و ارگان های حیاتی بدون نیاز به کشتن و تشریح حیوان، تخمین زده شود. بدین منظور از آنتی بادی مونوکلونال PR81 به عنوان پرتوداروی انتخابی جهت مقایسه دو روش استفاده گردید. با استفاده از نتایج مطالعات انجام شده توسط صلوتی و همکاران، این آنتی بادی با استفاده از متیلن دی فسفونات بعنوان شلاتور با 99mTc نشاندار سازی و پس از مطالعات کنترل کیفی، به ۳۰ سر موش مبتلا به تومور پستان تزریق گردید. همچنین با توجه به مطالعات قبلی، زمان ١٦ ساعت پس از تزریق بعنوان بهترین زمان آزمایش انتخاب گردید [۱۰]. مقایسه نتایج بدست آمده بوسیله هر دو روش نشان داد که تفاوت قابل ملا حظه ای بین مقدار مطلق شمارش ها در دو روش وجود دارد. با این وجود یک ارتباط خطی کامل بین اکتیویته شمارش شده در بافت های اصلی مثل کلیه ها، ریه ها، قلب، روده ها، کبد و تومور بین دو روش مشاهده شد. عدم وجود بایاس بین دو سری از داده ها نشانگر آن است که هر یک از دو روش می تواند پس از کالیبراسیون به جای دیگری مورد استفاده قرار گیرد. به طور کلی داده های به دست آمده از تصاویر، بزرگتر از داده های به دست آمده از روش تهاجمی بودند. این امر می تواند ناشی از دو عامل باشد. علت نخست می تواند وجود شمارش های زمینه در نتایج روش غیر تهاجمی به دلیل همپوشانی بافت ها باشد. هر چند در این تحقیق شمارش های زمینه با روش سنتی از شمارش بافت کسر شده است اما احتمالا این روش نیاز به اصلاح دارد و باید با روش های پیچیده تر جایگزین شود. علت دوم می تواند در ارتباط با شتشوی بافت در روش تهاجمی باشد. بر اساس دستورالعمل های موجود، بافت های مورد نظر باید پس از جدا سازی و قبل از شمارش در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شوند تا خون موجود در آنها خارج شود. احتمالا این شستشو منجر به شستن مقدار قابل توجهی از اکتیویته بافت ها می شود و لذا شمارش ثبت شده در روش تهاجمی اندکی از شمارش واقعی کمتر می شود. این دو احتمال منافی یکدیگر نیستند و هر دو می توانند در نتایج تاثیر داشته باشند زیرا در روش غیر تهاجمی امکان کسر شمارش ناشی از وجود خون در بافت وجود ندارد.

٥- نتیجه گیری

روش نرم افزاری طراحی شده، می تواند جهت مقایسه نسبی رادیو اکتیویته تجمع یافته در تومور و ارگانهای حیاتی به منظور ارزیابی اولیه کیفیت هر پرتوداروی بیولوژیک برای هدف گیری تومور، بدون کشتن حیوانات مدل استفاده شود.

منابع

1. Potamianos S, Varvarigou AD, Archimandritis SC. Radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: priciples and applications. Anticancer Res. 2000 Mar-Apr;20(2A):925-48.
2. Mather SJ, Ellison D. Reduction mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. J Nucl Med. 1990 May;31(5):692-7.
3. Chen Y, Xiong Q, Yang X, Huang Z, Zhao Y, He L. Noninvasive scintigraphic detection of tumor with 99mTc-DTPA-deoxyglucose: an experimental study. Cancer Biother Radiopharm. 2007 Jun;22(3):403-5.
4. Paknejad M, Rasaee MJ, Karami F, Kashanian S, Mohagheghi MA, Omidfar K, et al. Production of monoclonal antibody, PR81, recognizing the tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybrid Hybridomics. 2003 Jun;22(3):153-8.
5. Salouti M, Rajabi H, Babaei MH, Rasaee MJ, Najafi R, Shafiee M, Mazidi M, Hasan ZM, Bitarafan Rajabi A, Namvar N, Altarihi TM, Mohammadnejad J. Radioimmunoscintigraphy of Breast Tumor Xenografts in mouse model by 99mTc Direct Radiolabeling of a Monoclonal Antibody PR81. Iranian journal of medical physics. 2005; 2(8): 45-52.
6. Salouti M, Rajabi H, Babaei MH, Rasaee MJ. Breast tumor targeting with 99mTc-HYNIC-PR81 complex as a new biologic radiopharmaceutical. Nucl Med Biol. 2008 Oct;35(7):763-8.
7. Larsson E, Strand SE, Ljungberg M, Jönsson BA. Mouse S-factors based on Monte Carlo simulations in the anatomical realistic Moby phantom for internal dosimetry. Cancer Biother Radiopharm. 2007 Jun; 22 (3):438-42.
8. Lee HJ, Pardridge W. Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics, and tumor imaging. Bioconjug Chem. 2003 May-Jun;14(3):546-53.
9. Ghazanfari T, Mohammad Z, Yaraie R. Recognition and determination of immunogenicity of a spontaneous tumor in a BALB/c mouse. Daneshvar. 1998;24:65-72.
10. Salouti M. Breast cancer imaging in BALB/c mice with 99mTc labeled anti-MUC1 monoclonal antibody (PR81): production of a new radiopharmaceutical, optimization of imaging protocol. [Ph.D Thesis]: Tarbiat Modares University; 2006.