مدل‌سازی پراکنش زیستی ترکیب نشاندار [^{64}Cu]Cu-NODAGA-RGD-Bombesin در موش‌های توموری

INC29-1114

نعیمه امرایی[۱*]، بهروز علیرضاپور[۲]، اصغر حدادی[۱] ، سمانه ذوالقدری[۲]، حسن یوسف نیا[۲]، فاطمه شاکری[۳]

۱. بخش مهندسی پرتوپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران، ایران.
۲. پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی: ۸۳۶-۱۴۸۹۳، تهران، ایران.
۳. گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، صندوق پستی ۴۵۱۳۹۵۶۱۱۱، زنجان، ایران.

چکیده:

در این مطالعه، با توجه به اهمیت مدل‌سازی ریاضی در تعیین دقیق‌تر پراکنش زیستی رادیودارو در بدن و همچنین نقش حائز اهمیت آن در مطالعات دوزیمتری، پراکنش زیستی ترکیب نشاندار Cu-NODAGA-RGD-Bombesin^{۶۴} با استفاده از کد ANACOMPTM مدل‌سازی گردید. برای این منظور، ابتدا اکتیویته هر بافت پس از تزریق ترکیب نشاندار در موش‌های توموری در بازه‌های زمانی مختلف با استفاده از آشکارساز ژرمانیوم با خلوص بالا تعیین گردید. سپس، با استفاده از مدل‌سازی پراکنش زیستی، روابط ریاضی مربوطه استخراج شد. نتایج پاک‌سازی سریع پپتید هترودایمر نشاندار شده را از خون نشان داد. با توجه به ماهیت آب‌دوست این ترکیب نشاندار، ترکیب می‌تواند به‌سرعت از طریق دستگاه ادراری دفع گردد که دلیل تجمع زیاد این ترکیب در کلیه‌ها در تمام فواصل پس از تزریق می‌باشد. این ویژگی تا حد زیادی سبب تجمع ناخواسته پپتید هترودایمر نشاندار شده می‌گردد که با سایر رادیوداروهای مبتنی بر پپتید نیز تطابق کامل دارد.

کلیدواژه‌ها : پپتید هترودیمر، مس-۶۴، پراکنش زیستی، مدل‌سازی.

Modeling the Biodistribution of [^{64}Cu]Cu-NODAGA-RGD-Bombesin Radiolabelled Compound in tumor-bearing Mice

N. Amraee[1*], B. Alirezapour[2], M.Hosntalab[1], A. Haddadi[1], S. Zolghadri[2], H. Yousefnia[2], F. Shakeri[3]

1. Faculty of Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.BOX:14515-775, Tehran, Iran.
2. Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), P.O.BOX: 14839-836, Tehran, Iran.
3. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Zanjan University Medical Sciences, Zanjan, Iran, Postal Code: 4513956111.

Abstract:

In this study, considering the importance of mathematical modeling in more precisely determination of radiopharmaceuticals biodistribution in the body, as well as its important role in dosimetry studies, the biodistribution of 64Cu-NODAGA-RGD-Bombesin was modeled using the ANACOMPTM code. For this purpose, the activity of each tissue was determined after injection of the labeled compound in tumoral mice at different time intervals using a high purity germanium detector (HPGe). Then, relevant mathematical relationships were extracted using biodistribution modeling. The results showed rapid clearance of the labeled heterodimer peptide from blood. Due to the hydrophilic nature of this labeled compound, the compound can be quickly excreted through the urinary tract, which is the reason for the large accumulation of this compound in the kidneys at all intervals after injection. This characteristic is largely caused by the unwanted accumulation of the labeled heterodimer peptide, which is fully compatible with other peptide-based radiopharmaceuticals.

Keywords : Heterodimer peptide, Copper-64, Biodistribution, Modeling.

۱. مقدمه

امروزه، به‌منظور درک بهتر تأثیر روش‌های رادیوتراپی و تصویربرداری جهت درمان و تشخیص سرطان‌ها، مدل‌سازی به‌وسیله روابط ریاضی و فیزیک، برای پیش‌بینی دقیق‌تر توزیع زیستی ترکیبات نشاندار انجام می‌پذیرد. برای این منظور، ابتدا میزان اکتیویته در هر ارگان اندازه‌گیری شده و سپس ارتباط بین ارگان‌های هدف و چشمه و درصد جذب در هر عضو تعیین می‌گردد. یک نوع از مدل‌سازی ریاضی آنالیز به روش Compartmental[1] است. در این روش، پدیده مورد بررسی، به قسمت‌های مجزا تقسیم شده و یک رابطه ریاضی بین آن‌ها برقرار می‌شود. هر قسمت توسط یک تابع x(t) معرفی می‌شود که مقدار آن در واحد زمان و برحسب میزان ورودی و خروجی بیان می‌گردد [۱].

$$\frac{dx}{dt} = \text{input rate- output rat}$$

این مدل در زمینه‌های مختلفی ازجمله فارماکوکینتیک[2]، اپیدمیولوژی[3]، بیومدیکال[4] ، نظریه سیستم‌ها[5]، نظریه پیچیدگی[6]، مهندسی و فیزیک کاربرد دارد. همچنین این مدل در طراحی رادیوداروها و تعیین اکتیویته تجمعی در هر یک از ارگان‌ها به‌منظور بررسی پراکنش زیستی و مطالعات دوزیمتری نقش اساسی دارد. این مدل‌سازی می‌تواند با استفاده از کد ANACOMP^{TM} یا نرم‌افزارهایی مانند Mathematica یا Origin و کدهای مشابه انجام پذیرد.

در این مطالعه، با توجه به اهمیت ^{64}Cu در تشخیص و درمان سرطان به‌صورت هم‌زمان [۲] و اثرات شناخته‌شده پپتیدهای بمبزین و اسید آرژنیل-گلایسیل-اسپارتیک[7] (RGD) در هدف‌گیری گیرنده‌های اینتگرین و گاسترین [۳ ، ٤] ترکیب نشاندار ^{64}Cu-NODAGA-RGD-Bombesin تولید گردید. سپس ترکیب نشاندار به موش‌های توموری تزریق گردید و پس از تعیین میزان اکتیویته در هر اندام در بازه‌های زمانی مختلف، پراکنش زیستی با استفاده از کد ANACOMP^{TM} مدل‌سازی گردید.

۲. روش کار

۲,۱. مواد و تجهیزات

پپتید هترودیمر NODAGA-RGD-BBN با خلوص بیش از ۹۹٪ از آژانس بین‌المللی انرژی اتمی (IAEA) (وین، اتریش) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدریچ (هایدلبرگ، آلمان) خریداری شد. از دستگاه خوانش کاغذهای کروماتوگرافی مدل Bioscan –AR2000 (پاریس، فرانسه) جهت تعیین خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشاندار استفاده گردید. اکتیویته نمونه‌ها توسط آشکارساز ژرمانیوم با خلوص بالا[8] مدل NIGC 4020 (شرکت DSG، آلمان) مجهز به تحلیلگر چندکاناله اندازه‌گیری شد. موش‌های توموری (۱۲ عدد) از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شدند. مطالعات حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های استاندارد در مورد استفاده از حیوانات زنده در تحقیقات علمی، انجام شد[۵]. نتایج به‌دست‌آمده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (میانگین ± انحراف معیار) نمایش داده می‌شوند و برای مقایسه داده‌ها بر اساس معنی‌داری آماری $P < ۰/۰۵$ از آزمون T Student استفاده شد.

۲,۲ . تهیه و کنترل کیفی ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN

^{64}Cu از واکنش ^{68}Zn(p,αn)^{64}Cu توسط سیکلوترون 30MeV کرج تولید گردید. خلوص رادیونوکلئیدی و شیمیایی مس-۶۴ توسط آشکارساز HPGe و دستگاه پلاسمای جفت شده القایی[9] مورد بررسی قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی مس-

1. Compartmental analysis
2. Pharmacokinetics
3. Epidemiology
4. Biomedicine
5. Systems theory
6. Complexity theory
7. Arginyl-glycyl-aspartic acid
8. HPGe
9. ICP

۶۴ با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک (RTLC) و DTPA 1mM به‌عنوان فاز متحرک و کاغذ واتمن به‌عنوان فاز متحرک بررسی گردید.

محلول مادر از پپتید هترودیمر NODAGA-RGD-BBN با غلظت 1mg/ml با حل نمودن پپتید در آب مقطر جهت استفاده در نشاندارسازی تهیه و نگهداری شد. میزان ۱۰ میکروگرم از پپتید هترودیمر به ویال حاوی مس-۶۴ (با اکتیویته ۷۴ مگابکرل) اضافه گردید. با استفاده از بافر سدیم استات،pH واکنش برابر با ۵/۵ تنظیم گردید. سپس ویال واکنش برای مدت ۱۰ دقیقه بر روی آلوبلاک با دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درنهایت ۸ میلی‌لیتر آب به محلول آزمایش اضافه گردید و از ستون C_{18} Sep-Pak عبور داده شد (ستون از قبل به ترتیب با ۵ میلی‌لیتر اتانول، ۱۰ میلی‌لیتر آب و ۱۰ میلی‌لیتر هوا شسته شده بود). در مرحله آخر ستون با ۱ میلی‌لیتر اتانول و ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۹٪ شستشو داده شد. خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشاندار توسط روش RTLC بررسی شد. از کاغذ واتمن به‌عنوان فاز ساکن و از مخلوط استات آمونیوم ۱۰٪ و متانول (۱:۱) به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد.

۲،۳. توزیع بیولوژیکی ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN در موش‌های توموری

۱/۸۵مگابکرل از ترکیب نشاندار از طریق ورید دمی به موش‌های توموری تزریق شد. برای در نظر گرفتن تجزیه‌وتحلیل آماری، سه موش در هر بازه زمانی در نظر گرفته شدند. سپس با اندازه‌گیری وزن هر بافت و اکتیویته آن در بازه‌های زمانی مشخص پس از تزریق، درصد دوز تزریقی به ازای وزن بافت تعیین گردید. اکتیویته هر بافت (A) توسط آشکارساز HPGeمطابق با رابطه ۱ محاسبه شد [٦] :

$$A=\frac{N}{\varepsilon\,\gamma\,t_s\,k_1\,k_2\,k_3\,k_3\,k_4\,k_5} \qquad (۱)$$

که در آن ε بازده آشکارساز در انرژی فوتوپیک، γ احتمال انتشار فوتوپیک، t_s زمان زنده جمع‌آوری طیف نمونه برحسب ثانیه،k1، k2، k3، k4 و k5 فاکتورهای اصلاحی به ترتیب برای واپاشی هسته از زمان جمع‌آوری نمونه برای شروع اندازه‌گیری، واپاشی هسته در طول دوره شمارش، خود تضعیفی در نمونه اندازه‌گیری‌شده، از دست دادن پالس‌ها به دلیل جمع‌بندی تصادفی و همرویدادی هستند. N نیز سطح پیک خالص تصحیح شده فوتوپیک مربوطه می‌باشد که به‌صورت زیر محاسبه می‌گردد:

$$N=N_s-(t_s/t_b)\,N_b \qquad (۲)$$

در رابطه فوق، N_s سطح پیک خالص در طیف نمونه ، N_b سطح پیک خالص مربوطه در طیف زمینه، t_s زمان زنده جمع‌آوری طیف نمونه برحسب ثانیه و t_b زمان زنده جمع‌آوری طیف زمینه برحسب ثانیه است.

است.

۲،۴.مدل‌سازی پراکنش زیستی ترکیب نشاندار در موش‌های توموری

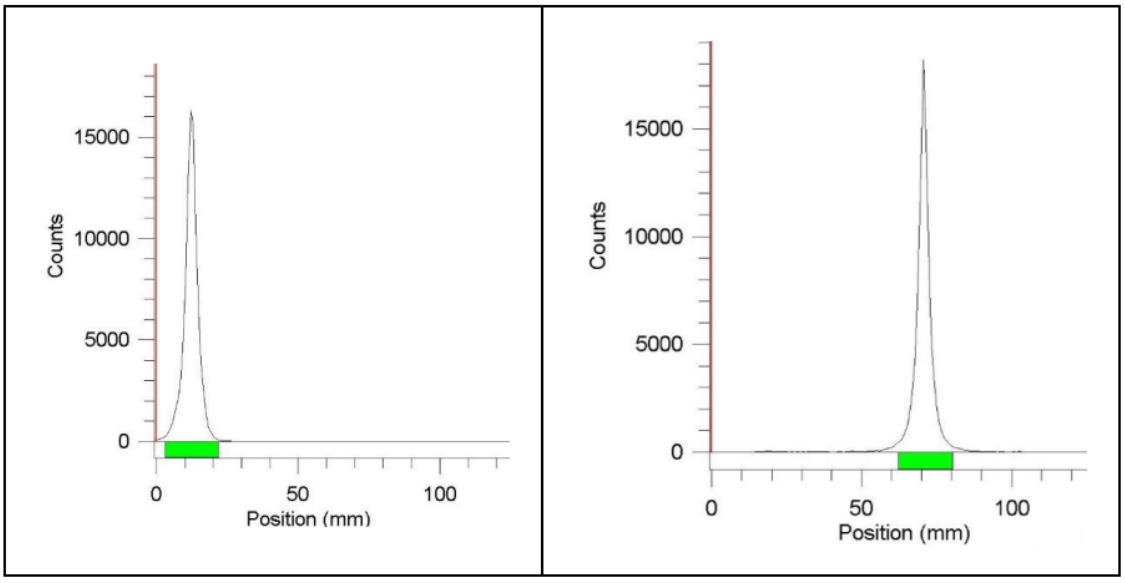
پس از اندازه‌گیری و محاسبه میزان اکتیویته هر اندام، که با استفاده از آشکارساز در بازه‌های زمانی منظم پس از تزریق انجام گردید، نتایج حاصله نشان‌دهنده تغییرات زمانی بود. با استفاده از ثابت‌های انتقال بر اساس ICRP 30 و ICRP 88، نحوه جذب رادیودارو در ارگان‌های اساسی به‌وسیله شبیه‌سازی نرم‌افزار ANACOMPTM مدل‌سازی گردید[۷ ، ۸].

۳. نتایج

۳.۱. تهیه و کنترل کیفی ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN

مس-۶۴ با خلوص رادیونوکلئیدی بیش از ۹۹،۹٪ و خلوص رادیو شیمیایی بیش از ۹۹٪ تولید گردید. همچنین نتایج نشان داد که غلظت مس و روی در محصول نهائی کمتر از ppm ۱ می‌باشد که در محدوده مجاز می‌باشد. ترکیب نشاندار

مطابق با روش ارائه‌شده در بخش ۲,۲ تولید گردید. خلوص رادیوشیمیایی محصول نهایی با استفاده روش RTLC مورد ارزیابی قرار گرفت. (شکل ۱). همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، درحالی‌که مس-۶۴ آزاد در ابتدای کاغذ باقی می‌ماند، رادیودارو به سمت بالای کاغذ مهاجرت نموده و در Rf=0.8 مشاهده می‌گردد. خلوص رادیوشیمیایی ترکیب نشاندار پس از خالص‌سازی بالاتر از ۹۹ درصد به دست آمد.



شکل ۱. کروماتوگرام مس-۶۴ آزاد (چپ) و ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN (راست)، فاز متحرک: استات آمونیوم ۱۰٪ : متانول (۱:۱) و فاز ساکن: کاغذ واتمن.

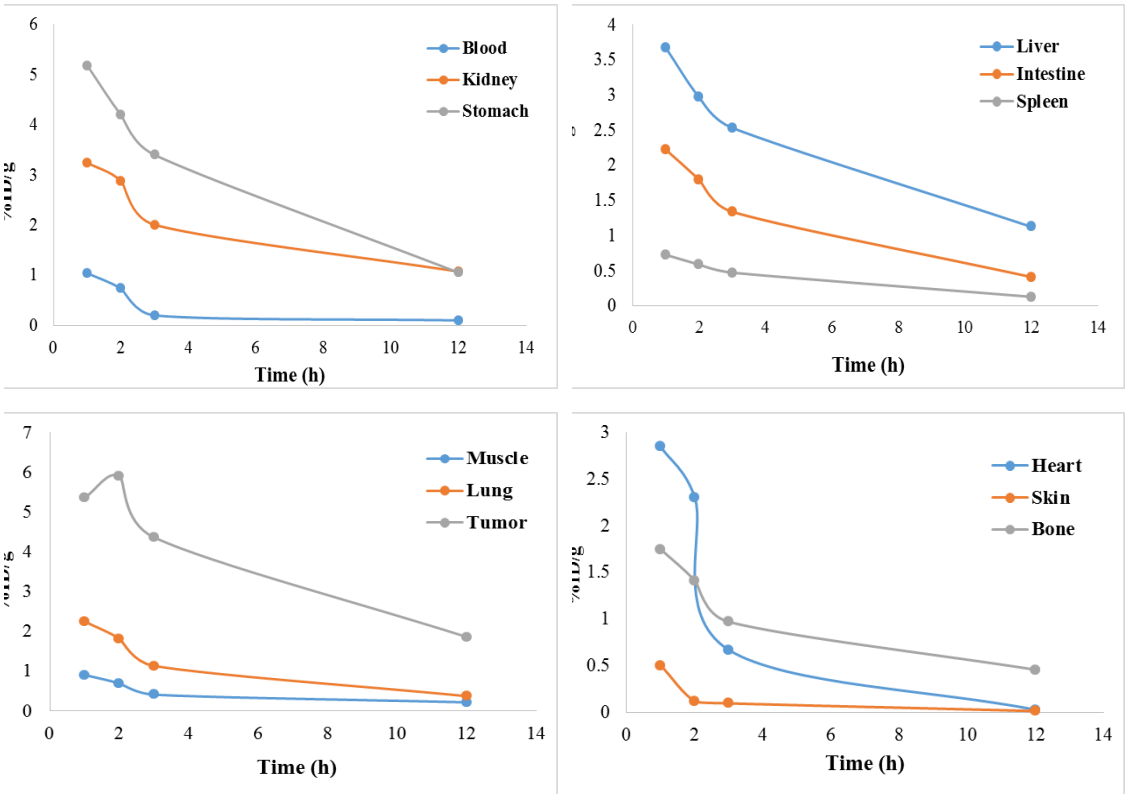
۳,۲ توزیع بیولوژیکی و مدل‌سازی پراکنش زیستی ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN در موش‌های توموری

درصد دز تزریقی به ازای گرم برای هر بافت در فواصل زمانی مشخص پس از تزریق ترکیب نشاندار محاسبه شد و روابط ریاضی حاکم بر تغییرات فعالیت برای خون و بافت‌های مختلف در زمان‌های مختلف توسط نرم‌افزار ANACOMP^{TM} به دست آمد. مدل پراکنش زیستی به‌دست‌آمده برای هر یک از بافت‌ها از روی نقاط توزیع زیستی حاصل از تشریح موش‌های توموری تزریق شده در روابط ۱ تا ۹ در جدول ۱ آورده شده و در شکل ۲ نشان داده شده است.

نقاط در نمودارهای مذکور مربوط به داده‌های توزیع زیستی استخراج‌شده از آزمایش‌های تجربی و منحنی‌ها مربوط به روابط ریاضی استخراج‌شده از نرم‌افزار برحسب توابع نمایی Multi exponential می‌باشد. این روابط ریاضی این امکان را فراهم می‌آورند تا بر اساس داده‌های تجربی در زمان‌های تشریح، بتوان توزیع زیستی در هر اندام را در زمان‌هایی که در آن تشریح صورت نگرفته است، برآورد نمود. نتایج به‌دست‌آمده پاک‌سازی سریع پپتید هترودایمر نشاندار شده را از خون نشان می‌دهد. همچنین نتایج تجمع زیاد این ترکیب در کلیه‌ها در تمام فواصل پس از تزریق را نشان می‌دهد که با توجه به ماهیت آب‌دوست این ترکیب نشاندار، ترکیب مذکور تمایل دارد به‌سرعت از طریق دستگاه ادراری دفع گردد. این ویژگی تا حد زیادی سبب تجمع ناخواسته پپتید هترودایمر نشاندار شد می‌گردد که با سایر رادیوداروهای مبتنی بر پپتید نیز تطابق کامل دارد [۹ ، ۱۰] . همچنین ترکیب نشاندار جذب بالایی را در اندام‌های دارای گیرنده پپتید آزادکننده گاسترین مانند معده، روده و ...، که هدف مناسبی برای پپتید بمبزین هستند، مشاهده می‌شود.

جدول۱. روابط ریاضی توزیع زیستی برای اندام اصلی موش توموری پس از تزریق ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN.

اندام	فرمولی ریاضی توزیع زیستی
قلب	$F1 = -551/365e^{(-2/847t)}+332/514e^{(-2/303*t)}+3/044e^{(-0/671t)}+0/04356e^{(-0/031t)}$
ریه	$F2=-322/0142e^{(-2/251t)}+3138/440151e^{(-1/821t)}-589/631813e^{(-1/136t)}+34/339703777e^{(-0/376t)}$
معده	$F3=-6794893226/78e^{(-5/072t)}+2800158370/325e^{(-3/597t)}-590294499/769e^{(-2/828t)}+2582980/983e^{(-1/214t)}$
روده	$F4=-7093/373283887e^{(-2/221t)}+8255/153603947e^{(-1/797t)}-2416/866464441e^{(-1/338t)}+56/205683765e^{(-0/41t)}$
کبد	$F5 =368/858e^{(-0/535t)}-346/19e^{(-0/565t)}-2/963e^{(-0/108t)}-19/461e^{(-0/165t)}$
طحال	$F6 =-2/619e^{(-0/726t)}+4/864e^{(-0/587t)}-2/018e^{(-0/473t)}+0/621e^{(-0/129t)}$
ماهیچه	$F7=-26/018e^{(-0/91t)}+38/624e^{(-0/698t)}-17/53e^{(-0/4139t)}+4/676e^{(-0/22t)}$
کلیه	$F8 =169/409e^{(-4/664t)}-189/441e^{(-5/002t)}+6/465e^{(-2/379t)}+3/084e^{(-0/75t)}$
پوست	$F9 =7/095e^{(-0/506t)}-93/329e^{(-0/123t)}+98/543e^{(-0/099t)}-10/678e^{(-0/017t)}$



شکل ۲. منحنی‌های تصحیح‌نشده به واپاشی برای اندام اصلی موش توموری پس از تزریق ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN.

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ترکیب نشاندار ^{64}Cu-NODAGA-RGD-BBN با خلوص رادیوشیمیایی بیش از ۹۹ درصد تهیه شد. نتایج توزیع زیستی نشان می‌دهد که درصد اکتیویته به ازای واحد جرم خون برای این ترکیب تنها ۳۰ دقیقه پس از

تزریق به کمتر از یک درصد خواهد رسید. با توجه به ماهیت آب‌دوست بودن این ترکیب، تجمع بالایی در کلیه (بیشتر از ۳ درصد) مشاهده گردید که با تجمع سایر رادیوداروهای پپتیدی مطابقت دارد. بر اساس مدل‌سازی پراکنش زیستی به‌دست‌آمده برای هر یک از بافت‌ها از روی نقاط توزیع زیستی حاصل از تشریح موش‌های توموری تزریق‌شده، روابط ریاضی مربوطه استخراج شد که مطابق با انتظار توابع نمایی Multi exponential می‌باشد. نتایج پاک‌سازی سریع پپتید هترودایمر نشاندار شد را از خون نشان داد .با توجه به ماهیت آب‌دوست این ترکیب نشاندار، ترکیب مذکور می‌تواند به‌سرعت از طریق دستگاه ادراری دفع گردد که دلیل تجمع زیاد این ترکیب در کلیه‌ها در تمام فواصل پس از تزریق می‌باشد. این ویژگی تا حد زیادی سبب تجمع ناخواسته پپتید هترودایمر نشاندار شد می‌گردد که با سایر رادیوداروهای مبتنی بر پپتید نیز تطابق کامل دارد.

۵. مراجع

1. Carson, R.E. Tracer Kinetic Modeling in PET. In: Bailey, D.L., Townsend, D.W., Valk, P.E., Maisey, M.N. (eds) Positron Emission Tomography. Springer, London (2005).
2 . Yang H, Gao F, McNeil B, Zhang C, Yuan Z, Zeisler S, Kumlin J, Zeisler J, Bénard F, Ramogida C, Schaffer P. Synthesis of DOTA-pyridine chelates for 64Cu coordination and radiolabeling of αMSH peptide. EJNMMI radiopharm chem 6, 1-16 (2021).
3. Tonini T, Rossi F, Claudio P.P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. Oncogene 22, 6549-56 (2003).
4. Fournier P, Dumulon-Perreault V, Ait-Mohand S, Langlois R, Bénard F, Lecomte R, Guérin B. Comparative study of 64Cu/NOTA-[D-Tyr6,βAla11, Thi13, Nle14]BBN (6-14) monomer and dimers for prostate cancer PET imaging. EJNMMI Res 2, 1-15 (2012).
5. Biological Council: Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations. 2nd edn. Biological Council, UK (1987).
6. Yousefnia H, Zolghadri S, Jalilian AR, Tajik M, Ghannadi-Maragheh M. Preliminary dosimetric evaluation of (166)Ho-TTHMP for human based on biodistribution data in rats. Appl Radiat Isot 94,260-265 (2014).
7 . ICRP Publication 30. Limits for Intakes of Radionuclides by Workers: An Addendum. Ann. ICRP 19 (1988).
8 . ICRP Publication 88. Doses to the Embryo and Fetus from Intakes of Radionuclides by the Mother. Ann. ICRP 31 (2001).
9 . Aghanejad A, Jalilian AR, Maus S, Yousefnia H, Geramifar P, Beiki D. Optimized production and quality control of 68Ga-DOTATATE. Iran J Nucl Med 24,29-36 (2016).
10 . Zolghadri S, Naderi M, Yousefnia H, Alirezapour B, Beiki D. Evaluation of the Possible Utilization of ^{68}Ga-DOTATOC in Diagnosis of Adenocarcinoma Breast Cancer. Asia Ocean J Nucl Med Biol 6, 41-49 (2018).