

بررسی میزان پایداری گادولینیوم همتوپورفیرین به عنوان عامل کنتراست تصاویر رزونانس مغناطیسی در موش

احسان خدامرادی^{۱*}، بهزاد مهکی^۲

(۱) کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
(۲) کارشناس ارشد آمار زیستی، عضو هیئت علمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت : ۸۶/۳/۷

تاریخ پذیرش : ۸۶/۷/۲۴

چکیده

مقدمه: ظهور سرطان پس از پیشرفت ضایعه دار در بدن نمایان می شود و در مراحل اولیه رشد آن، ضایعه قابل تشخیصی که در نگاره های عادی قابل مشاهده باشد، وجود ندارد. روش تشخیصی نگاره برداری رزونانس مغناطیسی (MRI)، تشخیص افتراقی سرطان در حد سلولی را امکان پذیر می سازد. در برخی موارد همچون آشکارسازی متاستازهای غدد لنفاوی، MRI معمولی نیز ضعیف است، در نتیجه لزوم استفاده از عوامل کنتراست نیز مورد توجه است. پایداری عامل کنتراست از عوامل مهم در استفاده از آنها به حساب می آید. در این تحقیق میزان پایداری عامل کنتراست گادولینیوم همتوپورفیرین (Gd-H) در موش بررسی شده است.

مواد و روش ها: به عضله پای چپ ۲۰ موش سلول های سرطان کولون (HT-29/219) تزریق شد. حدود ۳ تا ۵ هفته پس از تزریق که قطر توده سرطانی عضله چپ موش ها به ۳-۵ میلی متر رسید، به موش ها عامل کنتراست Gd-H تزریق شد. ۳، ۷ و ۲۴ ساعت پس از تزریق عامل کنتراست، موش ها ذبح شده و توده سرطانی و ارگان های حیاتی تشریح شد و سپس توسط روش هضم اسیدی به محلول تبدیل و برای NMR واسپکتروفوتومتر به ترتیب جهت تعیین زمان آسایش و غلظت گادولینیوم باند شده با بافت های سرطانی سانتیفریژ و تصفیه گردید. نتایج: در کبد و کلیه کمترین زمان آسایش به ترتیب مربوط به گروه های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق می شد. بیشترین شدت سیگنال ها در هر دو ارگان کبد و کلیه مربوط به ۲۴ ساعت است. در مورد توده سرطانی بیشترین غلظت گادولینیوم مربوط به ۲۴ ساعت پس از تزریق است.

بحث و نتیجه گیری: غلظت بیشتر گادولینیوم در ارگان ها منجر به کاهش زمان آسایش و افزایش شدت سیگنال می شود. تفاوت در کمترین زمان آسایش که در مورد کبد ۲۴ ساعت و کلیه ۷۲ ساعت است، نشان می دهد که تجمع در کبد در ۲۴ ساعت است و بعد از آن فرایند دفع کلیوی اتفاق می افتد و پس از ۷۲ ساعت بیشترین تجمع گادولینیوم به دست می آید. در نتیجه از لحاظ پایداری عامل Gd-H در موش پس از ۷۲ ساعت دفع می شود.

واژه های کلیدی: گادولینیوم همتوپورفیرین، سلولهای سرطان کولون، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی، زمان آسایش، شدت سیگنال، عامل کنتراست

* نویسنده مسئول : احسان خدامرادی، کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Or Email : eh_medph@yahoo.com Ehph_2000@yahoo.com

مقدمه

در بیماری‌هایی مثل سرطان که دومین علت مرگ و میر در جهان است (۱)، ظهور بیماری پس از پیشرفت ضایعه در بدن نمایان می‌شود و این بیماری‌ها غیر قابل پیش بینی هستند. تشخیص قطعی توسط روش‌های نگاره برداری سی تی اسکن (CT) و رادیولوژی جز در مراحل پیشرفته امکان پذیر نیست و درمان در این مرحله به هدف تسکین صورت می‌پذیرد. در مراحل اولیه رشد بیماری، ادم بافتی و ضایعه قابل تشخیص که در نگاره‌های عادی قابل مشاهده باشد وجود ندارد. در این روش‌ها علاوه بر استفاده از پرتوهای یونیزان، تشخیص افتراقی صورت نمی‌پذیرد و حتماً باید بیوپسی انجام شود. امروزه روش تشخیصی MRI که در آن از پرتو غیر یونیزان با شدت کم در گستره بسامدی امواج رادیویی استفاده می‌شود، در بسیاری از موارد، تشخیص افتراقی سرطان در حد سلولی و بدون نیاز به بیوپسی را امکان پذیر ساخته است (۳،۲).

روش تشخیصی رزونانس مغناطیسی پدیده‌ای است که در هسته بعضی از اتم‌های دارای اسپین (۴) رخ می‌دهد و شامل تابش یک سیگنال رادیویی (RF) قابل اندازه‌گیری توسط این هسته‌ها پس از تحریک به وسیله پالس‌های (RF) خارجی با فرکانس برابر با فرکانس لارمور هسته تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی قوی می‌باشد. تصاویر آناتومیکی بدن از سیگنال‌های ساطع شده توسط اتم‌های هیدروژن موجود در بدن بازسازی می‌شوند (۵). شدت تصاویر تابعی از پارامترهای چگالی پروتونی، زمان آسایش طولی (T1) و زمان آسایش عرضی (T2) می‌باشد. شدت سیگنال را خواص بافت‌های مختلف و پارامترهای دستگاهی که قابل تغییر و انتخاب هستند، مطابق فرمول زیر تعیین می‌کنند:

(۱)

$$I=N(H)\exp(-TE/T2)[(1-\exp(-TR/T1))]$$

که در این رابطه TR زمان بین پالس‌های تحریکی و TE مدت زمان بین اعمال پالس تحریکی و ثبت سیگنال است (۸،۵،۶،۷). با کاهش زمان آسایش طولی T1 طبق رابطه (۱)، شدت سیگنال

افزایش می‌یابد که این امر در غلظت‌های کم ماده کنتراست صادق است. در غلظت‌های بالای ماده، کنتراست به خاطر افزایش زمان آسایش عرضی T2 به جای افزایش، کاهش شدت رخ می‌دهد. MRI معمولی در آشکار سازی غدد لنفاوی ضعیف است، در نتیجه عوامل کنتراست نیز مورد توجه قرار گرفتند (۹). یکی از جدیدترین عوامل متالوپورفیرین‌ها هستند که قابلیت بیشتری نسبت به سایر عوامل کنتراست در رزونانس مغناطیسی دارند (۱۰). در این تحقیق عامل کنتراست گادولینیوم هماتوپورفیرین جهت تشخیص افتراقی سلول‌های سرطان کولون (HT-29/219) در موش‌های سوری به کار رفته است و بررسی میزان پایداری و تعیین مدت زمان دفع این عامل کنتراست در بافت‌های اصلی موش انجام گرفته است.

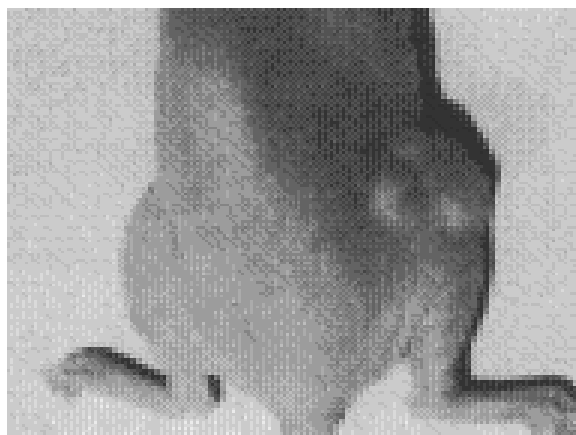
مواد و روش‌ها

سلول‌های سرطان کولون (HT-۲۹/۲۱۹) به صورت سوسپانسیون به عضله پای چپ ۲۰ موش سه ماهه نر با میانگین وزن ۲۷ گرم به میزان ۲۵۰ میکرولیتر و به تعداد ۵ × ۱۰^۶ سلول برای هر موش به صورت زیر جلدی تزریق شد. یک گروه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و عامل کنتراست به آن تزریق نگردید.

حدود ۳ تا ۵ هفته پس از تزریق سلول‌ها که قطر توده سرطانی عضله چپ موش‌ها به ۳-۵ میلی‌متر رسید (شکل ۱) به سه گروه پنج تایی اول عوامل کنتراست Gd-H به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد. ۳، ۷ و ۲۴ ساعت پس از تزریق عامل، موش‌ها با ماده پنتوباریتال سدیم بیهوش و سپس ذبح شدند و توده سرطانی و ارگان‌های حیاتی موش مثل کبد و کلیه تشریح شد. توده سرطانی و ارگان‌های حیاتی موش مثل کبد و کلیه خارج شده، توسط روش هضم اسیدی (۱۱) محتویات عامل کنتراست از بافت‌ها جدا و به محلول تبدیل گشت. این روش بدین طریق است که ۱۰۰-۵۰ mg از بافت در محلولی شامل اسید پرکلریک ۷۰ درصد و پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به ترتیب با نسبت‌های ۳/۳ mlit و ۶/۶ mlit قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰ rpm سانتیفریوژ شده

شوند. دستگاه طیف سنج UV از طریق جذب اشعه ماوراء بنفش غلظت یون گادولینیوم [Gd+3] آن اندازه گرفته شد. دستگاه مورد استفاده اسپکتروفوتومتری در محدوده طول موج ماوراء بنفش، مدل JENWAY ساخت شرکت DUNMOW ESSEX از کشور انگلستان می باشد و این دستگاه روی طول موج جذبی Gd که $342/249\text{nm}$ است، تنظیم گردیده و اندازه گیری ۳ بار برای هر نمونه انجام شد. توده سرطانی و ارگان های کبد و کلیه در بدن موش زنده زمان آسایش بیشتری نسبت به آنچه بدست آمده ، دارند و این به آن دلیل است که این قسمت ها در هنگام بیرون کشیدن و انجام آزمایش مقداری آب را در اثر پدیده تبخیر از دست می دهند که از این امر چشم پوشی شده است. از ترکیب اسید پرکلریک و پراکسید هیدروژن به همان نسبتی که در محلولهای روش هضم اسیدی استفاده شده بود به جای شاهد استفاده شد.

محلول های حاصل به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفوژ شده و با فیلتر Millipore با قطر روزنه ۰/۲ میکرومتر تصفیه شده و سپس به محلول حاصله 3mL آب مقطر اضافه شد پس از آن محلول ها جهت اندازه گیری زمان آسایش T1 و شدت سیگنال توسط سیستم NMR و تعیین میزان غلظت گادولینیوم باند شده با بافت های سرطانی توسط اسپکتروفوتومتر استفاده شدند. روش اعمال پالس IR، شامل ارسال پالس های ۹۰-۱۸۰ درجه، با فاصله زمانی $TR > 5T1$ می باشد. اندازه گیری زمان آسایش اسپین-شبهه و همچنین شدت های سیگنال توسط دستگاه NMR مدل DRX 500 AVANCE ساخت شرکت BRUKER کشور آلمان با فرکانس ۵۰۰MHz و میدان مغناطیسی ۱۱/۷ تسلا برای هیدروژن در دانشکده علوم دانشگاه تربیت مدرس تهران صورت گرفت. طبق پروتکل دستگاه، چون نمونه ها در فاز آبی هستند، باید در محلول D2O که دارای خلوص ۰/۹۹/۹ اتم دوتریم است حل



شکل ۱. نمایی از توده سرطانی موش

نتایج

به آن را نشان می دادند. در ارگان کلیه کمترین زمان آسایش مربوط به گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق می شد به طوری که زمان آسایش گروه ۷ ساعت پس از تزریق ، ۱۱/۷ درصد و گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق ، ۲۴/۹ درصد افزایش نسبت به آن را نشان می دادند(شکل ۲).

در بررسی توزیع زیستی عامل کنتراست Gd-H، زمان های آسایش نمونه ها اندازه گیری شده(جدول ۱) که در ارگان کبد کمترین زمان آسایش مربوط به گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق می شد به طوری که زمان آسایش گروه ۷ ساعت پس از تزریق ، ۲۰ درصد و گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق ، ۷ درصد افزایش نسبت

در مورد ارگان کلیه بیشترین غلظت یون گادولینیوم مربوط به گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق است. غلظت مذکور در گروه ۷ ساعت پس از تزریق، ۵۹/۷ درصد و در مورد گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق ۴۷ درصد کاهش نسبت به گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق را نشان می دهد.

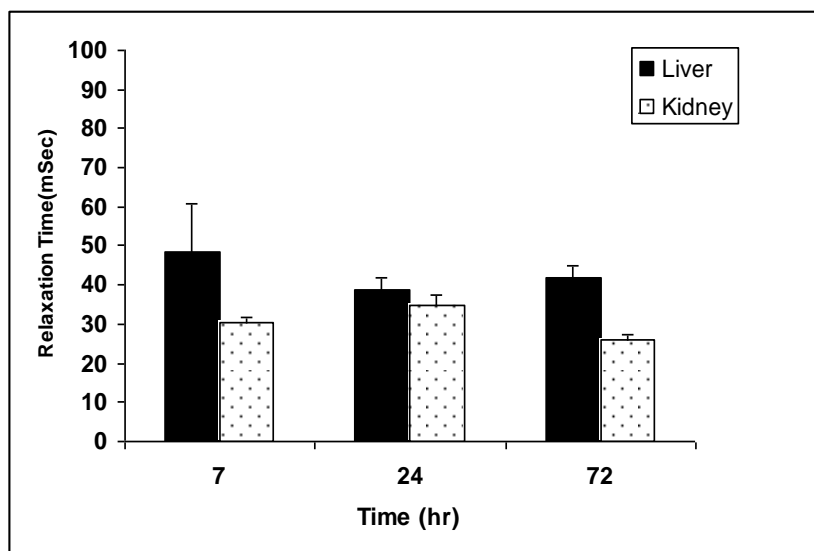
در مورد توده سرطانی بیشترین غلظت یون گادولینیوم (شکل ۴) مربوط به گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق است. مقدار کاهش این غلظت برای گروه ۷ ساعت پس از تزریق، ۳۵/۱ درصد و برای گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق، ۸۷/۸ درصد است.

داده های مربوط به شدت سیگنال (جدول ۲) نشان می دهد که در کبد بیشترین شدت مربوط به گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق است و گروه ۷ ساعت پس از تزریق، ۱۷/۵ درصد و گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق، ۰/۵ درصد کاهش نسبت به آن را نشان می دهند (شکل ۳).

غلظت یون گادولینیوم نمونه ها (جدول ۳) در مورد ارگان کبد بیشترین غلظت یون گادولینیوم مربوط به ۲۴ ساعت است و این کمیت برای گروه ۷ ساعت پس از تزریق، ۳۹/۷ درصد و برای گروه ۷۲ ساعت پس از تزریق، ۲۹/۴ درصد کاهش نسبت به آن را دارد.

جدول ۱. میانگین زمان های آسایش اسپین شبکه همراه عامل کنتراست Gd-H

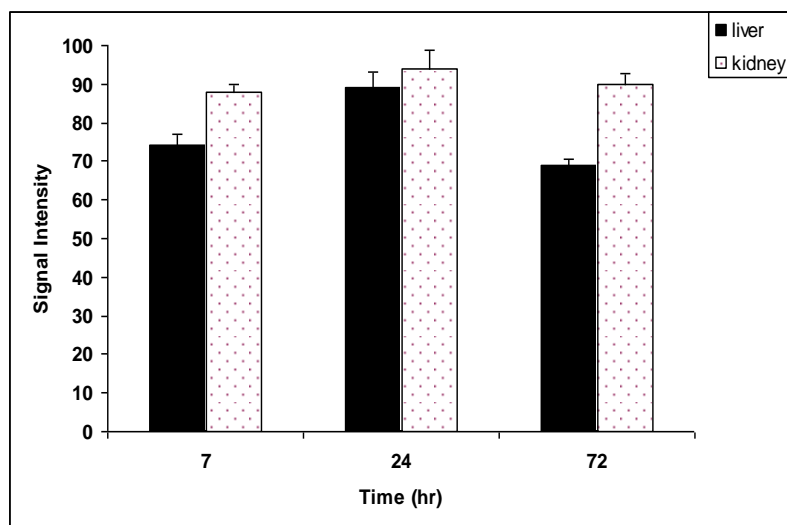
organ \ Time(hr)	Liver T1±SD(ms)	Kidney T1±SD(ms)
7	48.3±12.50	30.33±1.57
24	38.7±3.05	34.9±2.40
72	41.7±3.40	26.2±1.2



شکل ۲. نمودار میانگین زمان های آسایش اسپین شبکه توسط عامل کنتراست Gd-H در دو اندام کلیه و کبد در ۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق

جدول ۲. میانگین شدت های سیگنال محلولهای حاوی Gd-H در ۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق

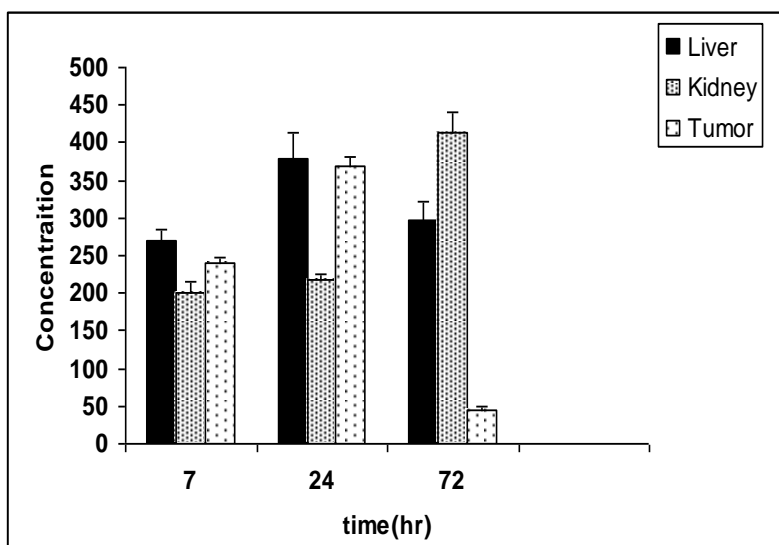
Organs	Liver	Kidney
Time(hr)		
7	0.737±0.021	0.877±0.016
24	0.025±0.893	0.015±0.936
72	0.007±0.889	0.011±0.894



شکل ۳. نمودار میانگین شدت های سیگنال در محلول های حاوی Gd-H در دو اندام کبد و کلیه

جدول ۳. میانگین غلظت یون گادولینیوم (بر حسب mM) در محلول های حاوی Gd-H در کبد، کلیه و توده سرطانی موش

Organs	Liver	Kidney	Tumor
Time(hr)	[Gd]±SD	[Gd]±SD	[Gd]±SD
7	271± 14	199.5±15.5	240±7
24	379±34	219 ±7	370±11.5
72	296±25.5	413±27	45±5



شکل ۴. نمودار میانگین غلظت یون گادولینیوم (بر حسب mM) در محلول های حاوی Gd-H در تومور، کبد و کلیه موش در ۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق

بحث و نتیجه گیری

دارد و با نتایج تعیین غلظت با اسپکتروفتومتر همخوانی لازم را دارد. لازم به ذکر است که کمترین زمان آسایش و بیشترین شدت سیگنال در ۲۴ ساعت پس از تزریق بدست آمده و بیشترین غلظت گادولینیوم نیز توسط اسپکتروفتومتر مربوط به ۲۴ ساعت پس از تزریق تشخیص داده شده است. در ارگان کلیه، کمترین زمان آسایش مربوط به ۷۲ ساعت پس از تزریق است ولی بیشترین شدت سیگنال مربوط به ۲۴ ساعت پس از تزریق می باشد که این امر به خاطر غلظت های زیاد در ۷۲ ساعت است. این امر در نتایج مربوط به غلظت تأیید شده و بیشترین غلظت مربوط به ۷۲ ساعت به دست آمده است. این بدان معنی است که در ۷۲ ساعت پس از تزریق فرآیند دفع کلیوی رخ داده و تجمع ارگان کلیه به حداکثر رسیده است. پس از لحاظ پایداری، عامل Gd-H در موش سوری ۷۲ ساعت پس از تزریق می ماند و سپس دفع می شود. این میزان پایداری در مقایسه با عامل کنتراست کلینیکی Gd-DTPA که به عنوان معیار سنجش سایر عوامل مطرح است (۱۵)، پایداری بیشتری دارد. با توجه به نمودار شماره ۴ می توان نتیجه گرفت که در مورد توزیع زیستی عامل Gd-H پس از ۲۴ ساعت بیشترین تجمع یون گادولینیوم در توده سرطانی حاصل شده و این زمان به عنوان بهترین زمان پس از تزریق جهت تصویربرداری به دست آمد.

عامل کنتراست مناسب در این روش می بایست ضمن اینکه جهت کاهش مسمومیت در غلظت های پایین مورد استفاده قرار گیرد باید به صورت مؤثر قادر به ایجاد تغییرات در پارامترهای حساس به کنتراست در تصاویر MRI باشد. همچنین می بایست بتواند در حالات *in vivo* در بالاترین غلظت نسبت به سایر نقاط بدن به هدف برسد و برای زمان کافی (جهت تصویربرداری) در آنجا بماند و پس از زمان لازم از بافت هدف پاک و از بدن دفع شود. در زمینه توسعه عوامل کنتراست، عوامل جدید پارامغناطیس گسترش روزافزونی دارند (۱۲). متالوپورفیرین ها به صورت داخل سلولی در میتوکندری جایگزین شده و این امر توجه بیشتر به این عوامل را می طلبد (۸). علت انتخاب Gd-H که جزء عوامل پارامغناطیس است، میزان واهلش بالای این عامل بوده است (۱۳).

براساس رابطه (۱) کاهش زمان آسایش T1 در غلظت های کم عامل کنتراست باعث افزایش شدت سیگنال شده و در غلظت های زیاد عامل کنتراست در نتیجه افزایش زمان آسایش T2، شدت سیگنال کاهش می یابد (۱۴). با توجه به مطلب فوق، برای ارگان کبد در هر سه زمان ۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، مشاهده رابطه عکس زمان آسایش و شدت سیگنال بیانگر این مطلب است که غلظت کم عامل در این مورد دخالت

References

- 1-Charld M.H. Cancer Treatment.Fifthedition: Pennsylvania, WB Sunder Company. 2001.
- 2-Raymond A. NMR Imaging : Review ; Encyclopedia of NMR. 1996:2462-2471.
- 3-Boshung CS. Radiologic Science for Technologists Physics, biology and Protection: Mosby. 1993.
- 4-Woodward PM, Hill G. MRI for Tecnologyists. Second Edition. 2001.
- 5-Boshung SC. Magnetic Resonance Imaging : Physical and Biological Principles. St. Louis Mosby. 1996.
- 6-Brown AM, Cemelka CR. MRI Basic Principles and Applications. NewYork: WILEY-LISS, Second Edition. 1999.
- 7-Roth K. NMR- Tomography and Spectroscopy in Medicine : An Introduction. Spring-Verlag. 1984.
- 8-Rinck AP. Relaxation Measurement in Whole Body MRI : Clinical Utility. 1995; 4042-4045.
- 9-Rung VM. Contrast-Enhanced Clinical Magnetic Resonance Imaging. Lexington KY. University Press of Kentuky.1997.
- 10-Haley TJ.Pharmacology and toxicology of the rare earth elements.*J Pharm Sci.*1997;54:663-670.
- 11-Tamat SR, More DE, Allen BJ. Determination of The Concentration of Complex Boronated Compounds in Biological Tissues by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Pigment Cell Research.*1989 ; Vol(2):281-285.
- 12-Weinmann h.j. Tissue-specific MR contrast agents. *European Journal of Radiology.* 2002; 46, 33-44.
- 13-Shahbazi D. Williams M. and Alen BJ. Synthesis and application of new gadolinium-porphyrins as potential mr imaging contrast agent for cancer detection in nude mice. *Biomedical Jornal.* 2003;1-8.
- 14-Curtet et al. Selective modification of NMR relaxation time in human colorectal carcinoma by using gadoliniumdiethylenetriaminpentaacetic asid conjugated with monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad.Sci USA.* 2007 ;19-9.
- 15-Weinmann HJ, Brasch RC, Press W.R, Wesbey GE. Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: a Potential NMR Contrast Agent. *American journal of Roontgenology.* 1984 ; 142(3): 619-724.