بررسی میزان پایداری گادولینیوم هماتوپورفیرین 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 هماتوپورفیرین(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 ۵-۳ 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 واسپکتروفتومتر به ترتیب جهت تعیین زمان آسایش و غلظت گادولینیوم باند شده با بافت های سرطانی سانتریفوژ و تصفیه گردید.

نتایج: در کبد و کلیه کمترین زمان آسایش به ترتیب مربوط به گروه های ۲۴و۷۲ 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 هماتوپورفیرین، 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.comEhph_2000@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

مقدمه

در بیماری هایی مثل سرطان کـه دومـین علـت مرگ و میر در جهان است(۱)، ظهـور بیمـاری پـس از پیشرفت ضـایعه در بـدن نمـــایان مـی شـود و ایـن بیماری ها غیر قابل پیش بینی هستند. تشخیص قطعـی توسط روش های نگاره برداری سی تی اسکن (CT) و رادیولوژی جز در مراحل پیشرفته امکان پـذیر نیسـت و درمان در این مرحله به هدف تسکین صورت می پذیرد. در مراحل اولیه رشد بیماری، ادم بـافتی و ضـایعه قابـل تشخیص که در نگاره های عادی قابـل مشـاهده باشـد وجـود نـدارد . درایـن روش هـا عـلاوه بـر اسـتفاده از پرتوهای یونیزان، تشخیص افتراقی صورت نمی پذیرد و حتمـاً بایـد بیوپسـی انجـام شـود. امـروزه روش تشخیصی MRI که در آن از پرتو غیر یونیزان با شدت کم در گستره بسامدی امواج رادیویی استفاده می شـود، در بسیاری از موارد، تشـخیص افتراقـی سـرطان درحـد سلولی و بدون نیاز بـه بیوپسـی را امکـان پـذیر سـاخته است(۳،۲).

روش تشخیصی رزونانس مغناطیسـی پدیـده ای است که در هسته بعضی از اتم های دارای اسپین(۴) رخ می دهد و شامل تابش یک سیگنال رادیویی(RF) قابل اندازه گیری توسط این هسته هـا پـس از تحریـک بـه وسیله پالس های (RF) خـارجی بـا فرکـانس برابـر بـا فرکانس لارمور هسته تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی قوی می باشد. تصاویر آناتومیکی بدن از سـیگنال هـای ساطع شده توسط اتم هـای هیـدروژن موجـود در بـدن بازسازی می شوند(۵). شدت تصاویر تابعی از پارامترهای چگـالی پروتـونی، زمـان آسـایش طـولی (T1) و زمـان آسایش عرضی(T2) می باشد. شدت سیگنال را خواص بافت های مختلف و پارامترهای دستگاهی که قابل تغییر و انتخاب هستند، مطابق فرمول زیر تعیین می کنند:

(۱)

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

که دراین رابطه TR زمان بین پالس های تحریکی و TE مدت زمان بـین اعمـال پـالس تحریکـی و ثبـت سیگنـــال است(۸،۵،۶،۷). با کاهش زمـان آســـایش طـولی T1 طبـــق رابطـه(۱)، شـدت سیگنـــال افـزایش می یـــابد که این امر در غلظـت هـای کـم ماده کنتراست صـــادق است. در غلظـت هـای بـالای ماده، کنتراست به خاطر افزایش زمـان آسـایش عرضـی T2 به جـای افـزایش، کـاهش شـدت رخ مـی دهـد. MRIمعمولی در آشکار سازی غدد لنفاوی ضعیف اسـت، در نتیجه عوامل کنتراست نیز مورد توجه قرار گرفتند(۹). یکی از جدیدترین عـوامل متالوپورفیرین ها هستند که قابلیت بیشتری نسـبت بـه سـایر عوامـل کنتراسـت در رزونانس مغناطیسی دارنـد(۱۰). در ایـن تحقیـق عامـل کنتراست گادولینیوم هماتوپورفیرین جهـت تشـخیص افتراقی سلول های سرطان کولـون (HT-29/219) در موش های سوری به کار رفتـه اسـت و بررسـی میـزان پایداری و تعیین مدت زمان دفع این عامل کنتراست در بافت های اصلی موش انجام گرفته است.

مواد و روش ها

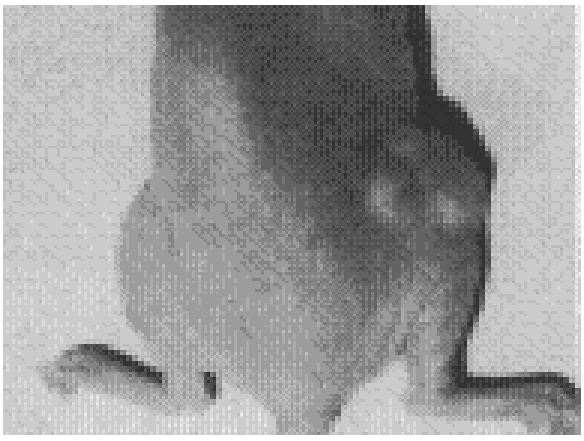
سـلول هـای سـرطان کولـون (HT-۲۹/۲۱۹) بـه صورت سوسپانسیون به عضله پای چپ ۲۰ مـوش سـه ماهـه نـر بـا میـانگین وزن ۲۷ گـرم بـه میـزان ۲۵۰ میکرولیتر و به تعداد ۵ ۱۰×۴ سلول برای هر مـوش بـه صورت زیر جلدی تزریق شد. یک گروه به عنوان گـروه کنترل در نظر گرفته شد و عامل کنتراست به آن تزریـق نگردید.

حدود ۳ تا ۵ هفته پس از تزریق سلول ها که قطر تـوده سـرطانی عضـله چـپ مـوش هـا بـه ۵-۳ میلـی متـر رسید(شـکل۱) بـه سـه گـروه پـنج تـایی اول عوامـل کنتراست Gd-H به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریـق شد. ۳، ۷ و۲۴ ساعت پس از تزریق عامل ، موش هـا بـا ماده پنتوباربیتال سدیم بیهوش و سپس ذبح شدند و توده سرطانی و ارگان های حیاتی مـوش مثـل کبـد و کلیـه تشریح شد. توده سرطانی و ارگـان هـای حیـاتی مـوش مثـل کبـد و کلیـه خـارج شـده، توسـط روش هضـم اسیدی(۱۱) محتویات عامل کنتراست از بافت ها جـدا و به محلول تبدیل گشت. این روش بدین طریق است که ۱۰۰mg- ۵۰ از بافت در محلولی شامل اسید پرکلریـک ۷۰ درصد و پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد بـه ترتیـب بـا نسبت هـای ۳mlit/. و ۶mlit/. قـــرار داده شـد و بـه مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰ rpm ســـانتریفوژ شـده

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

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 اسپکتروفتومتر استفاده شدند. روش اعمال پالس IR، شامل ارسال پالس های ۱۸۰-۹۰ درجه، با فاصله زمانی TR>5T1 می باشد. اندازه گیری زمان آسایش اسپین–شبکه 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 شوند. دستگاه طیف سنج UV از طریق جذب اشعه ماوراء بنفش غلظت یون گادولینیوم [Gd+3] آن اندازه گرفته شد. دستگاه مورد استفاده اسپکتروفتومتری 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 ۳۴۲/۲۴۹nm 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 واین 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 محلوهای روش هضم اسیدی استفاده شده بود به جای شاهد استفاده شد.



شکل ۱. نمایی از توده سرطانی موش

نتایج

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 گروه۷۲ ساعت پس از تزریق ، ۷ درصد افزایش نسبت 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(شکل۲).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

داده های مربوط به شدت سیگنال (جدول ۲) نشان می دهد که در کبد بیشترین شدت مربوط بـه گـروه ۲۴ ساعت پس از تزریـق اسـت و گـروه ۷ سـاعت پـس از تزریق ، ۱۷/۵ درصد و گروه ۷۲ ساعت پـس از تزریـق، ۰/۵ درصد کـاهش نسـبت بـه آن را نشـان مـی دهنـد (شکل۳).

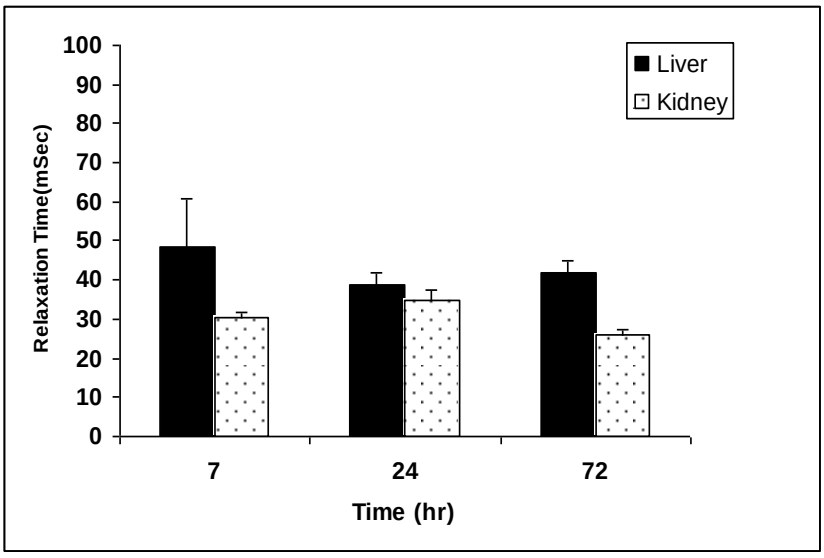
غلظت یون گادولینیوم نمونه ها (جدول ۳) در مورد ارگان کبد بیشترین غلظت یون گادولینیوم مربوط به ۲۴ ساعت است و این کمیت برای گـروه ۷ سـاعت پـس از تزریق ، ۳۹/۷ درصد و بـرای گـروه ۷۲ سـاعت پـس از تزریق ، ۲۹/۴ درصد کاهش نسبت به آن را دارد.

در مورد ارگان کلیه یشترین غلظت یون گادولینیوم مربوط به گروه ۷۲ ساعت پس از تزریـق اسـت. غلظـت مذکور در گروه ۷ ساعت پس از تزریـق، ۵۹/۷ درصـد و در مورد گروه ۲۴ ساعت پس از تزریق ۴۷ درصد کاهش نسبت به گروه ۷۲ سـاعت پـس از تزریـق را نشـان می دهد.

در مـورد تـوده سـرطانی بیشـترین غلظـت یـون گادولینیوم(شکل۴) مربوط به گـروه ۲۴ سـاعت پـس از تزریق است. مقدار کـاهش ایـن غلظـت بـرای گـروه ۷ ساعت پس از تزریـق ، ۳۵/۱ درصـد و بـرای گـروه ۷۲ ساعت پس از تزریق ، ۸۷/۸ درصد است.

جدول۱ . 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

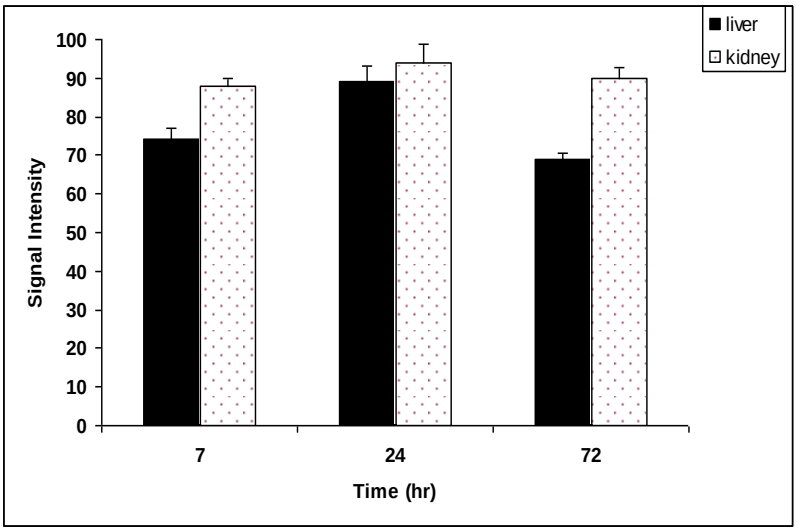


شکل۲ . نمودار میانگین زمان های آسایش اسپین شبکه توسط عامل کنتراست Gd-H **در دو اندام کلیه و کبد در ۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق**

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

جدول۲. میانگین شدت های سیگنال محلولهای حاوی Gd-H در ۷ ، ۲۴ و۷۲ ساعت پس از تزریق

Organs / Time(hr)	Liver	Kidney
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

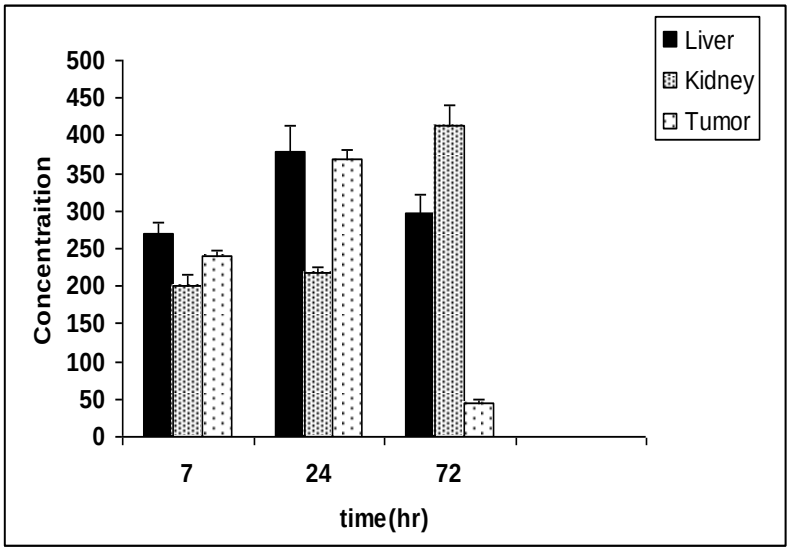


شکل۳. نمودار میانگین شدت های سیگنال در محلول های حاوی Gd-H در دو اندام کبد و کلیه

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

Organs / Time(hr)	Liver [Gd]±SD	Kidney [Gd]±SD	Tumor [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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]



شکل۴. نمودار میانگین غلظت یون گادولینیوم (بر حسبmM) در محلول های حاوی Gd-H در تومور، کبد و کلیه موش در۷، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تزریق

بحث و نتیجه گیری

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 جزءعوامل 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،۲۴و۷۲ ساعت پس از تزریق، مشاهده رابطه عکس زمان آسایش و شدت سیگنال بیانگر این مطلب است که غلظت کم عامل در این مورد دخالت 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 ازلحاظ 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 ۲۴ساعت بیشترین تجمع یون گادولینیوم در توده سرطانی حاصل شده و این زمان به عنوان بهترین زمان پس از تزریق جهت تصویربرداری به دست آمد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]

References

1-Charld M.H. Cancer Treatment.Fifthedition: Pensylvania, WB Sunder Company. 2001.
2-Raymond A. NMR Imaging : Review ; Encyclopedia of NMR. 1996:2462-2471.
3-Boshoung CS. Radiologic Science for Technologists Physics, biology and Protection: Mosby. 1993.
4-Woodwared 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- Temography and Spectroscopy in Medicine : An Introduction. Spring-Velarg. 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 monocolonal antibody. *Proc. Natl. Acad.Sci USA. 2007 ;19-9.*
15-Weinmann HJ, Brasch RC, Press W.R, Wesbey GE. Characteristics of Gadolinum-DTPA Complex: a Potential NMR Contrast Agent. *American journal of Roontgenology. 1984 ; 142(3): 619-724.*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-30]