

Gadolinium tartalmú kontrasztanyagok toxicitásának vizsgálata sejtenyészeten

Laczovics Attila¹, Szemán-Nagy Gábor², Tóth Melinda², Berényi Ervin²,

¹ Debreceni Egyetem, Orvosi Laboratóriumi és Képalkotó Diagnosztikai Tanszék

² Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

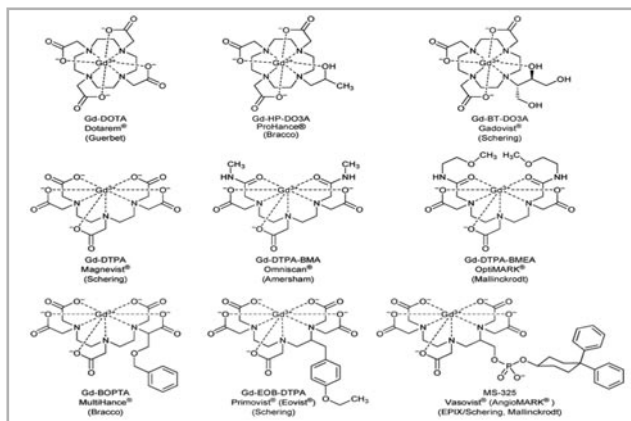
A gadolinium tartalmú kontrasztanyagok használata beépült az MRI vizsgálatok protokolljába. Munkánk során azt tűztük ki célul, hogy kifejlesztünk egy olyan módszert, melynek segítségével megítélhető klinikai forgalomban lévő ágensek toxicitása. Vizsgálatainkat kétféle sejtvonalon végeztük, három különböző szerkezettel rendelkező gadolinium tartalmú kontrasztanyag bevonásával. A172-es glioblastoma sejtvonalat és fibroblast sejteket 96 lyukú plateben szélesztettük. A kikapadást követően lecseréltük a tápfolyadékot, a sejtekre rákerültek az ágensek 1 $\mu\text{mol/ml}$ végkoncentrációban. A kelátok jelenlétében 24, illetve 48 óráig inkubáltuk tovább a sejteket 37°C-on, 5%-os CO_2 jelenléte mellett. Ezt követően a médiumot lecseréltük MTT-re [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]. A keletkezett kristályokat DMSO-ban oldottuk fel. A kapott oldat színintenzitása arányos a sejtek életképességével. Az MTT assay alkalmas az ágensek jelenlétében szélesztett sejtek életképességének és proliferációjának a vizsgálatára. A módszer rávilágít a kontrasztanyagok kémiai szerkezetének fontosságára, mely befolyásolja a gadolinium dúsulásának a mértékét.

The use of gadolinium containing contrast agents has been incorporated into the examination protocol of MRI studies. We set out to design a method with which we can determine the toxicity of commercially available gadolinium containing contrast agents. For our study we used two different cell lines, and four different gadolinium containing contrast agents. A-172 glioblastoma cell lines from astrocytes and fibroblast cells were grown in a 96 hole plate. Four hours later we exchanged the medium, then we added the contrast agents in 1 $\mu\text{mol/ml}$ of concentration. Cells were incubated in the presence of chelates for 24–, 48 hours at 37 degrees Celcius, and in the presence of 5% of CO_2 . Then we exchanged the medium for 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The colour intensity of the thus acquired solution is proportional to the viability of the cell. The MTT assay is suitable for the examination of the viability and proliferation of cells grown in the presence of contrast agents. Our method highlights the importance of the chemical structure of contrast agents which influences the uptake of gadolinium due to the different dissociative kinetics of the different complexes.

BEVEZETÉS

A gadolinium tartalmú kontrasztanyagok használata beépült az MRI vizsgálatok protokolljába, mivel a differenciál-diagnosztikát segíti, hogy a különböző típusú és grádusú tumorok eltérően halmozzák a kelátokat. A halmozás mértékét és mintázatát a vér-agy gát károsodás befolyásolja. A CNS daganatainak részletes osztályozását először Percival Bailey és Harvey Cushing alkották meg, 1926-ban, retrospektív vizsgálat alapján. Az elkülönítés elve a morfológiai kép és a betegség kimenetelének összehasonlításán alapult. James Watson Kernohan 1949-ben bevezette a ma ismert szövettani osztályozást (Grade I-IV), mely a sejtek differenciáltsági fokát és a mitosisok megjelenése mellett a betegség kimenetelét vette figyelembe. A nem ritkán előforduló kevert sejtes összetétel ellenére a WHO (World Health Organization) a gliómákat négy csoportba sorolja, azok rosszindulatúságának mértéke szerint. Minél magasabb a grádus, annál magasabb a malignitás foka és a tumor biológiai viselkedése is agresszívabb. Alacsony grádusúak (low-grade) a WHO I-II fokozatú gliómák, míg magas grádusúaknak (high-grade) a WHO III-IV malignitású gliómákat hívjuk. A szakirodalomban található adatok alapján egy alacsony grádussal rendelkező tumor mindössze 30%-os valószínűséggel fogja halmozni a kontrasztanyagot, míg magas grádus esetén a halmozás szinte 100%-os.

Ma kilencféle gadolinium tartalmú kontrasztanyag van klinikai forgalomban, melyek eltérő kémiai szerkezettel rendelkeznek (1. ábra). Három ágens makrociklusos komplex,



1. ábra
Klinikai forgalomban lévő, eltérő kémiai szerkezettel rendelkező kontrasztanyagok. A felső három makrociklusos, míg az alsó két sor nyílt láncú.

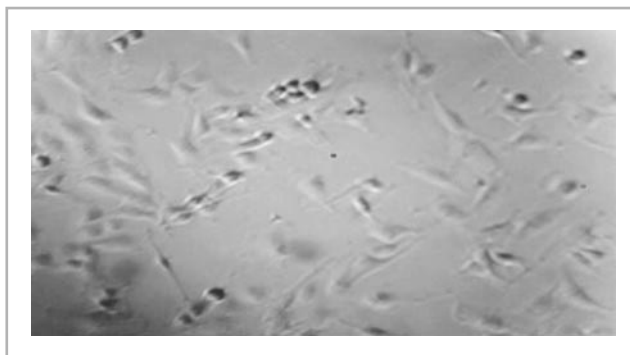
míg a maradék hat nyílt-láncú szerkezettel rendelkezik. A szerkezeti különbségeken túl, fontos eltérés az is, hogy bizonyos kelátok fiziológiás körülmények között negatív töltéssel rendelkeznek, míg vannak kontrasztanyagok, melyek töltés nélküli komplexek.

Már a '70-es években ismert volt a tény, hogy a gadolínium kiváló MR kontrasztanyag. Ez a ritkaföldfém (mely a lantanoidák csoportjában a 7. elem) azonban az emberi szervezet számára mérgező. A '80-as évek elején adva volt a feladat a koordinációs kémikusok előtt: a gadolíniumot „be kellett csomagolni”. A kémiai módosítást úgy kellett elvégezni, hogy a ritkaföldfém ne legyen toxikus az emberi szervezet számára, ugyanakkor a komplexnek továbbra is kiváló MR kontrasztanyag tulajdonsággal kellett rendelkeznie. Ezekről az anyagokról számos publikáció született, melyekben a kisebb, enyhe mellékhatások mellett (fejfájás, szédülés, hányinger, hányás, vizeleti inger stb) biztonságosnak találták ezeket a gadolínium komplexeket [1-3]. Ez a biztonságos jelző a kétezres évek közepén megkérdőjeleződött, amikor is a kontrasztanyagok használatát összefüggésbe hozták az NSF (Nefrogén Szisztémás Fibrózis) nevű betegséggel [4-8]. Abban az esetben, ha valakinek a veseműködése nem megfelelő, a vizeletkiválasztás nem a fiziológiás ütemben történik, a vizelet és a vizeletben kiválasztódott kontrasztanyag több időt tölt a szervezetben. Ez a többletidő elegendő lehet arra, hogy a gadolínium disszociáljon a komplexből, felhalmozódjon, s kiváltsa toxikus hatását [9-12].

Munkánk során azt tűztük ki célul, hogy kifejlesztünk egy olyan módszert, melynek segítségével megítélhető klinikai forgalomban lévő ágensek toxicitása a sejtekre nézve. Szerettük volna felhívni a figyelmet a kémiai szerkezetből adódó különbségekre, ezek fontosságára, ugyanis az eltérő disszociációs kinetikától függően a gadolínium felhalmozódásának a mértéke változó [13].

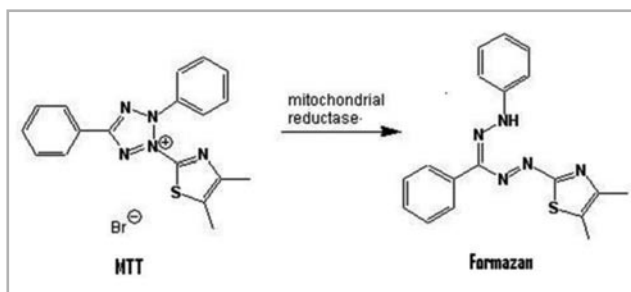
Kutatásunk során fibroblastokból származó-, illetve humán glioblastomából származó (A172) sejteket tenyésztettünk in vitro, 96 lyukú plate-ekben. A kitapadást követően lecseréltük a médiumot (azaz a tápfolyadékot), a sejtekre rákerült a kontrasztanyag 1 $\mu\text{mol/ml}$ végkoncentrációban. Használtunk egy egyszeresen negatív töltéssel rendelkező, makrociklusos ligandumot (gadoterate meglumine), illetve két, töltéssel nem rendelkező vegyületet, melyek nyílt láncú DTPA (Diethylenetriamine pentaacetate) származékok gadolínium(III)-kelátjai (gadoversetamide és gadodiamide). A kelátok jelenlétében 24, illetve 48 óráig inkubáltuk tovább a sejteket ugyanígy 37°C-on, 5%-os CO₂ jelenléte mellett. Természetesen voltak olyan tenyészetek is, melyekre nem került kontrasztanyag. Ezek a minták szolgáltak kontrollként. A sejtek növekedéséről minden percben webkamerás felvételt készítettünk, az így nyert képekből pedig time lapse videót készítettünk, aminek a segítségével a sejtek növekedéséről kaptunk információt (2. ábra).

Az általunk specifikált időt követően (24, illetve 48 óra) eltávolítottuk a sejtekről a médiumot. Ezt követően 200 μl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) került a sejtekre (a 96 lyukú plate minden egyes well-



2. ábra
Webkamerás felvétel az A172-es sejtenyészetéről. A képek életlensége abból következik hogy a rendszer kiátlagol 10 frame-et, amiből a végső kép elkészül. Így a végső képen látszik a folyadék réteg mozgásából eredő törésmutatóbeli változás, illetve a le nem tapadt sejtekre ható Brown-mozgás.

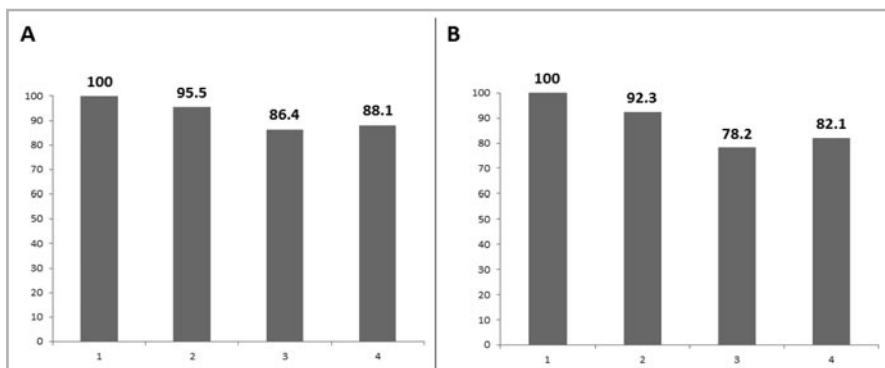
jébe), majd 90 percig inkubáltuk tovább a sejteket 37°C-on, 5%-os CO₂ jelenléte mellett. A alapmetódika az volt, hogy az élő sejtek a plate alján vannak kitapadva, a metabolikusan aktív sejtek endocitózissal veszik fel az MTT-t, melyet átalakítanak formazán-kristályokká (3. ábra).



3. ábra
Sematikus ábra az MTT kémiai szerkezetéről, mely intracellulárisan átalakul formazán kristályokká.

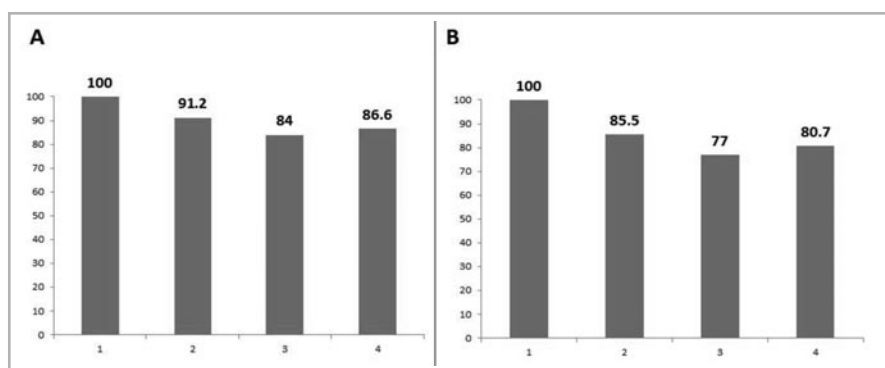
Ezt követően a sejtekről eltávolítottuk az MTT-t, majd a keletkezett kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel (200 μl DMSO/well). A sejteket visszatettük az inkubátorba, 15-20 percig. Ennyi idő alatt 37°C-on a DMSO feloldotta a formazán-kristályokat. Plate Reader segítségével 550 nm-es gerjesztés alkalmazásával olvastuk le az abszorbanciát. A kapott oldat színintenzitása arányos a sejtek életképességével, illetve a rendszerben lévő sejtek mennyiségével.

Eredményül azt kaptuk, hogy 24 óra után az A172-es sejtenyészetnél (4. ábra „A” része) a kontrollhoz (1. oszlop) képest – az itteni sejtszámot 100%-nak véve – a gadoterate meglumine-nal kezelt minták esetében (2. oszlop) tér el a legkevésbé a sejtszám. A legnagyobb különbség a gadoversetamide használata mellett volt megfigyelhető (3. oszlop), melyhez közelített a gadodiamide eredménye (4. oszlop). Az is megfigyelhető, hogy az idő múlásával (48 órán keresztül inkubáltuk a sejteket a kelátok jelenlétében), a kontrollhoz képest a különbség fokozódik, különös tekintettel a gadoversetamide és a gadodiamide jelenlétében szélesített sejtek esetében (4. ábra B része).



4. ábra

Az A172-es sejtvonal sejttségének százalékos változása 24 („A” kép) és 48 óra („B” kép) elteltével a kontroll mintára (1. oszlop) normalva. A 2. oszlopnál használt ágens: gadoterate meglumine, 3. oszlopnál használt ágens: gadoversetamide, 4. oszlopnál használt ágens: gadodiamide



5. ábra

Az fibroblast sejtvonal sejttségének százalékos változása 24 („A” kép) és 48 óra („B” kép) elteltével a kontroll mintára (1. oszlop) normalva. A 2. oszlopnál használt ágens: gadoterate meglumine, 3. oszlopnál használt ágens: gadoversetamide, 4. oszlopnál használt ágens: gadodiamide

Fibroblast sejtenyésztés esetén hasonló dolgot tapasztalunk (5. ábra). A makrociklusos ágens jelenlétében tenyésztett sejtek száma tért el legkevésbé a kontrolltól, szemben a nyíltláncú kelátokkal. Az is leolvasható a grafikonokról, hogy minél tovább vannak a kontrasztanyagok jelenlétében a sejtek, a kontrollhoz képest annál nagyobb lesz a különbség.

Jól látható, hogy különböző sejtek transzportmechanizmusai is jelentősen különbözhetnek. Továbbá az is kijelenthető, hogy az MTT assay alkalmas az ágensek jelenlétében

szélesített sejtek életképességének és proliferációjának a vizsgálatára. A módszer rávilágít a kontrasztanyagok kémiai szerkezetének fontosságára, mely befolyásolja a gadolínium dúsulásának a mértékét azáltal, hogy eltérő disszociációs kinetikát követnek a különböző komplexek. A gadolíniumot tartalmazó komplexekből 37°C-on a mérgező gadolínium felszabadulhat. Minél később választódik ki az ágens az emberi szervezetből, annál több toxikus ritkaföldfém disszociálódik ki a komplexből, annál több halmozódik fel.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Nelson, KL; Runge, Val M. M.D.: Basic Principles of MR Contrast, Topics in Magnetic Resonance Imaging, Volume 7, Issue 3 (1995)
- [2] Niendorf HP, Haustein J, Cornelius I, Alhassan A, Clauß W: Safety of gadolinium-DTPA: Extended clinical experience, Magnetic Resonance in Medicine, Volume 22, Issue 2, pages 222–228 (1991)
- [3] Larson KN, Gagnon AL, Darling MD, Patterson JW, Cropley TG: Nephrogenic Systemic Fibrosis Manifesting a Decade After Exposure to Gadolinium, JAMA Dermatol. Published online May 27, 2015. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.0976
- [4] Mendichovszky IA, Marks SD, Simcock CM, Olsen OE: Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis: time to tighten practice, Pediatric Radiology, Volume 38, Issue 5, pp 489-496 (2008)
- [5] Boyd AS, Zic JA, Abraham JL: Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermatopathy, J Am Acad Dermatol. 2007 Jan;56(1):27-30. Epub 2006 Nov 15.
- [6] High WA, Ayers RA, Chandler J, Zito G, Cowper SE: Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis, J Am Acad Dermatol, 2007 Jan;56(1):21-6. Epub 2006 Nov 9.
- [7] Thomsen HS, Morcos SK, Dawson P: Is there a causal re-

- lation between the administration of gadolinium based contrast media and the development of nephrogenic systemic fibrosis (NSF)?, *Clin Radiol*, 2006 Nov;61(11):905-6.
- [8] Baranyai Zs, Pálkás Z, Uggeri F, Maiocchi A, Aime S, Brücher E: Dissociation Kinetics of Open-Chain and Macrocyclic Gadolinium(III) – Aminopolycarboxylate Complexes Related to Magnetic Resonance Imaging: Catalytic Effect of Endogenous Ligands, *Chemistry – A European Journal*, Volume 18, Issue 51, pages 16426–16435 (2012)
- [9] Radbruch A, Weberling LD, Kieslich PJ, Eidel O, Burth S, Kickingereider P, Heiland S, Wick W, Schlemmer HP, Bendszus M: Gadolinium retention in the dentate nucleus and globus pallidus is dependent on the class of contrast agent, *Radiology*, 2015 Jun;275(3):783-91. doi: 10.1148/radiol.2015150337. Epub 2015 Apr 6.
- [10] Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, Toyoda K, Oba H, Kotoku J, Haruyama T, Kitajima K, Furui S: Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy, *Radiology*, 2015 May 5:142690.
- [11] Kanal E, Tweedle MF: Residual or retained gadolinium: practical implications for radiologists and our patients, *Radiology*. 2015 Jun;275(3):630-4. doi: 10.1148/radiol.2015150805. Epub 2015 May 5.
- [12] McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, Williamson EE, Eckel LJ: Intracranial Gadolinium Deposition after Contrast-enhanced MR Imaging, *Radiology*, 2015 Jun;275(3):772-82. doi: 10.1148/radiol.15150025. Epub 2015 Mar 5.
- [13] Kanda T, Osawa M, Oba H, Toyoda K, Kotoku J, Haruyama T, Takeshita K, Furui S: High Signal Intensity in Dentate Nucleus on Unenhanced T1-weighted MR Images: Association with Linear versus Macrocyclic Gadolinium Chelate Administration, *Radiology*, 2015 Jun;275(3):803-9. doi: 10.1148/radiol.14140364. Epub 2015 Jan 27.

A SZERZŐ BEMUTATÁSA



Laczovics Attila tanulmányait a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karán folytatta, képalkotó diagnosztikát, molekuláris biológiát: orvosbiológia-farmakológia specializációs modult végezve. Prof. Dr. Berényi Ervin témavezetése mellett a Debre-

ceni Egyetem Idegtudományi Doktori Iskola nappali tagozatos PhD hallgatója, ahol az „MR kontrasztanyagok eloszlásvizsgálata sejtenyészetben és állatkísérletes daganatmodellekben” című témán dolgozik. Kutatásait az Orvosi Laboratóriumi és Képalkotó Diagnosztikai Tanszéken végzi, emellett részt vesz az oktatásban és a vizsgáztatásban is.

A világ 600 legjobb egyeteme között a Semmelweis

Felkerült a világ 800 legjobb egyetemét tartalmazó, a londoni székhelyű Times Higher Education által publikált világrangsorra a Semmelweis Egyetem, mely eredményei alapján az 501-600. helyezés közötti sávban szerepel. A listán hat hazai felsőoktatási intézmény szerepel, melyek közül a legjobb helyre a Semmelweis Egyetemet rangsorolták az összeállítás készítői.

A világrangsor öt fő terület mutatói alapján méri az intézményeket: oktatási környezet, kutatás, idézettség, ipari bevételek és nemzetközi orientáció. A legjobban ez utóbbiban szerepelt a Semmelweis Egyetem, a külföldi hallgatók és oktatók arányának, valamint a nemzetközi együttműködésben születő publikációk kiemelkedő számának köszönhetően. A Times Higher Education rangsor összeállításához 1 126 intézménytől gyűjtöttek adatokat, 11,3 millió tudományos dolgozatot vizsgáltak meg és több mint 11 000 tudományos körben kiküldött kérdőívet elemeztek. A rangsor szerkesztője, Phil Baty úgy fogalmazott: ez a 12. év, hogy összeállítják a THE világrangsort, mely a világ legmagasabb presztízsű és legelismertebb rangsorai között van. Az oktatás, kutatás, tudás-transzfer és nemzetköziség mérése szigorú standardokon alapul. „A Semmelweis Egyetem számára kiemelkedő eredmény, hogy bekerült a világ legjobb egyetemei közé az 501-600. helyen” – fogalmazott.

Összesen 345 európai egyetem került fel a listára, melyet első három helyezettje a California Institute of Technology, a University of Oxford és a Stanford University. A magyar felsőoktatási intézmények közül felkerült a listára a 601-800. helyezés közötti intervallumba a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, a Debreceni Egyetem, az Eötvös Loránd Tudományegyetem, a Pécsi Tudományegyetem és a Szegedi Tudományegyetem

Forrás:SE