

Manyetik Rezonans Kontrast Ajanların Sıçan Beyni Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Fatma BEYAZAL ÇELİKER¹, Levent TÜMKAYA², Tolga MERCANTEPE²,
Mehmet BEYAZAL¹, Arzu TURAN³, Gülen BURAKGAZİ¹, Nur HÜRSOY¹

ÖZ

Amaç: Gadolinium tabanlı kontrast ajanlar (GBCA), manyetik rezonans görüntülemelerde (MRG) kontrast sağlamak amaçlı kullanılmaktadır. GBKA yapısına bağlı olarak beyin dokusu ve diğer dokularda birikim olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu prospektif hayvan çalışmasında, makrosiklik iyonik (Gadoterik asit) ve lineer noniyonik (Gadodiamide) GBKA'nın çoklu enjeksiyonlarının sıçan santral sinir sistemindeki etkisini histopatolojik olarak değerlendirmek ve moleküler yapısına göre karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlara haftada 4 gün gün aşırı, ve her seferinde 0.1 mmol (0,2 ml/kg) /mg/kg gadodiamide ve gadoterik asid 5 hafta boyunca uygulandıktan sonra 5 hafta ilaçsız bekletildi. Onuncu haftanın sonunda sıçanlar anestezi altında uyutulup beyin dokusundan örnekler alındı. Beyin dokusu örnekleri beyin dokusu üzerine yapılmış toksisite çalışmalarına uygun bir şekilde, serebral korteksten farklı alanlarda atipik nöron ve oligodendositler körlere olarak iki histopatolog tarafından ışık mikroskobu altında skorlanarak değerlendirildi. Elde edilen veriler Kruskal-Wallis testi ile ve gruplar arası karşılaştırmalar ise Tamhane T2 ile değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol ve serum fizyolojik grubuna ait deneklerin beyin dokusu ışık mikroskobik kesitlerinde gri ve beyaz cevher normal histolojik yapı özellikleri sergilediği izlendi. Gadodiamide uygulanmış grubun beyin dokusuna ait kesitlerinde tipik yapıda nöronlar ve oligodendrositler mevcut olup herhangi bir patoloji gözlemlenmedi. Gadoterik asit grubunda tipik yapıda oligodendrositler gözlenmekle beraber birkaç atipik nöron dışında herhangi bir patolojik yapı izlenmedi.

Sonuç: Gadolinium uzun süreli diagnostik alımlarında sıçan beyin hücrelerinde patolojik bulguya neden olmamaktadır. Bu bulgular kontrast maddenin kimyasal yapısına göre (lineer ya da makrosiklik) farklılık göstermemektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin; gadodiamide; gadoterik asit; manyetik rezonans kontrast ajan.

Histopathological Evaluation of the Effects of Magnetic Resonance Contrast Agents on the Rat Brain

ABSTRACT

Aim : Gadolinium-based contrast agents (GBCA) are used to provide contrast in magnetic resonance imaging (MRI). Previous studies have reported that repeated administrations of linear gadolinium- based contrast agents lead to their accumulation in the brain and other tissues depending on the GBKA structure. The purpose of this prospective animal study was to investigate the effect of multiple administrations of macrocyclic ionic (gadoteric acid) and linear nonionic (gadodiamide) gadolinium-based contrast agents (GBCAs) on rat brain tissue and to compare these molecules in terms of tissue damage.

Material and Methods: Sprague-Dawley male rats were administered 0.1 mmol (0.2 ml/kg)/mg/kg gadodiamide and gadoteric acid 4 days per week for 5 weeks. He was then kept drug-free for 5 weeks. At the end of the tenth week, the rats were put to sleep under anesthesia and samples were taken from the brain tissue. Atypical neurons and oligodendocytes from brain tissue samples were scored and evaluated by two histopathologists under a light microscope. The data obtained were evaluated with the Kruskal-Wallis test and the comparisons between the groups were Tamhane T2.

Results: Gray and white matter tissue in the brain tissue of the subjects belonging to the control and saline groups were normal histological. Brain tissue sections of the gadodiamide group had typical neurons and oligodendrocytes, and no pathology was observed. However, no pathological structure was observed except for a few atypical neurons.

Conclusion: Gadolinium does not cause pathological findings in rat brain cells in long-term diagnostic intakes. These findings do not differ according to the chemical structure of the contrast agent (linear or macrocyclic).

1 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye
2 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Histoloji Ve Embryoloji Anabilim Dalı, Rize, Türkiye
3 Acıbadem Bodrum Hastanesi, Muğla, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author Fatma BEYAZAL ÇELİKER, e-mail: fabece@yahoo.com
Geliş Tarihi / Received: 14.03.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 09. 10. 2022

GİRİŞ

Gadolinium bazlı MR kontrast ajanlar (GBKA), farklı şekillerde şelatlanmış gadolinium içeren maddeler olup manyetik rezonans görüntülemelerde kontrast sağlamak amaçlı kullanılmaktadır. GBKA'lar yapılarına göre lineer ve makrosiklik, iyonik- noniyonik olmak üzere sınıflanmıştır (1).

Uzun süre güvenli profile sahip oldukları bilinen GBKA'ların ilk olarak 2006 yılında lineer yapıdaki GBKA'nın böbrek yetmezliği bulunanlarda nefrojenik sistemik fibrosise (NSF) yol açtığı saptandı. GBKA'lar sitokin ve TGF-beta 1 GBKA gibi bazı maddelerin salınımına yol açarak NSF a yol açarlar (2). Lineer yapıda olanlar makrosiklik yapıdakilerle oranla NSK açısından daha risklidir (3). 2014 yılında Kanda ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kranial MR incelemelerde normal böbrek fonksiyonlu kişilerde beyin bazı bölgelerinde (globus pallidus and dentate nucleus) T1- ağırlıklı imajlarda GBKA ilişkili sinyal artışı olduğunu saptadı (4). Ancak GBKA ilişkili sinyal değişikliğinin histopatolojik değişikliğe yol açıp açmadığı belirsizliğini korumaktaydı. Son zamanlarda yapılan bir hayvan çalışmasında, iskemik felç oluşturulan beyin dokusunda lineer ve makrosiklik GBKA iskemik dokuda sağlam dokuya göre daha fazla biriktiği ve iskemik dokuda astrositlere hasar verdiği ancak makrosiklik GBKA lineerlere kıyasla daha fazla etkilediği bildirilmiştir (5). Ancak diğer nöral yapılarda etkisi hala net olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada, GBKA kullanımının merkezi sinir sistemini oluşturan nöron hücrelerinin yanında myelinin oluşumunda sorumlu olan oligodendrositler üzerindeki etkisini de araştırmak amaçlandı. Bu amaçla makrosiklik iyonik (Gadoterik asit) ve lineer noniyonik (Gadodiamide) GBKA'ların çoklu enjeksiyonlar şeklinde uygulandıktan sonra sıçan beyin dokusunda nöron ve oligodendrositler üzerindeki etkisi histopatolojik olarak değerlendirildi ve GBKA'nın moleküler yapılarıyla karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda ağırlıkları ortalama 250±38 gr olan 3-4 aylık Sprague-Dawley cinsi 32 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deneysel Hayvanları ve Araştırma Merkezinde (Rize, Turkey) üretildi. Bütün sıçanlar Ulusal Bilimler Akademisi tarafından hazırlanan ve Ulusal Sağlık Enstitülerince yayımlanan 'Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı için Kılavuz' bölümünde özetlenen ve Helsinki Bildirgesi kriterlerine uygun olarak bakıma alındı.

Çalışmamız, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu (Rize, Türkiye,) tarafından onaylandı (Etik Kurul No: 2017/4). Deneysel süresince sıçanlar 22±10C sıcaklıkta, standart 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde günlük su ile standart pelet yemler (Purina, Bayramoğlu, Erzurum, Turkey) verildi. Her grupta 8 adet olmak üzere sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Grup 1: Kontrol grubu, Grup 2: Serum fizyolojik grubu [serum fizyolojik (0,1cc/kg)(mmol(0,2 ml/kg)], Grup 3: Gadodiamide grubu, Grup 4: Gadoterik asit grubu. IV (kuyruk veni) 5 hafta boyunca haftada 4 kez, gün aşırı 0,6 mmol(1.2 ml/kg)/mg/kg uygulandıktan sonra 5 hafta ilaçsız olarak bekletildi (6,7).

10 haftanın sonunda sıçanlar anestezi altında uyutulup beyin dokusundan örnekler alındı.

Örnekler, beyin dokusu üzerine yapılmış toksisite çalışmalarına uygun bir şekilde alındı.

Histopatolojik Analiz Porsedürü

Sıçanlardan elde edilen beyin dokusu materyalleri 10% formalin ile 36 saat boyunca fikse edildi (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA). Fiksasyondan sonra artan alkol (Merck, Darmstadt, Germany) ve ksilol (Merck, Darmstadt, Germany) ile sabitleştirilip sert ve yumuşak parafin (Merck, Darmstadt, Germany) inklüzyonu yapılarak bloklandı. Parafin bloklarından mikrotom (Leica, RM2125RT, Germany) ile 4-5 µm kalınlığında örnekler alındı. Beyin dokusuna ait örnekler hematoksilin (Harris hematoksilin, Merck, Germany) ve Eosin (H&E) (Eosin G, Merck, Germany) boyası ile boyandı. Örnekler ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) değerlendirildi. Gözlemlenen bulgulara ait fotoğraflar Olympus DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotoğraf makinası ile fotoğraflandı.

Semi-Kantitatif Analiz

H&E boyası uygulanmış beyin dokusuna ait kesitlerde gözlemlenen histopatolojik değişiklikler daha önceki beyin dokusunda yapılmış çalışmalarda belirtildiği gibi atipik nöron ve oligodendrositler Tablo-1'de gösterildiği gibi skorlandı (8-14). Bu skorlama metodunda, birbirinden bağımsız iki histopatolog tarafından her bir preparat için beyin dokusunda randomize olarak belirlenmiş farklı on alanda semi-kantitatif analiz yapıldı.

Tablo 1. Serebral korteks histopatolojik skorlama metodu

Atipik/Dejeneratif Nöron	
Skor	Yüzde(%)
0	Hasar yok
1	0-25%
2	25-50%
3	50-75%
4	>75%
Atipik/dejeneratif Oligodendrosit	
Skor	Yüzde(%)
0	Hasar yok
1	0-25%
2	25-50%
3	50-75%
4	>75%
Lökosit İnfiltrasyonu	
Skor	Yüzde(%)
0	Hasar yok
1	0-25%
2	25-50%
3	50-75%
4	>75%

İstatistiksel Analiz

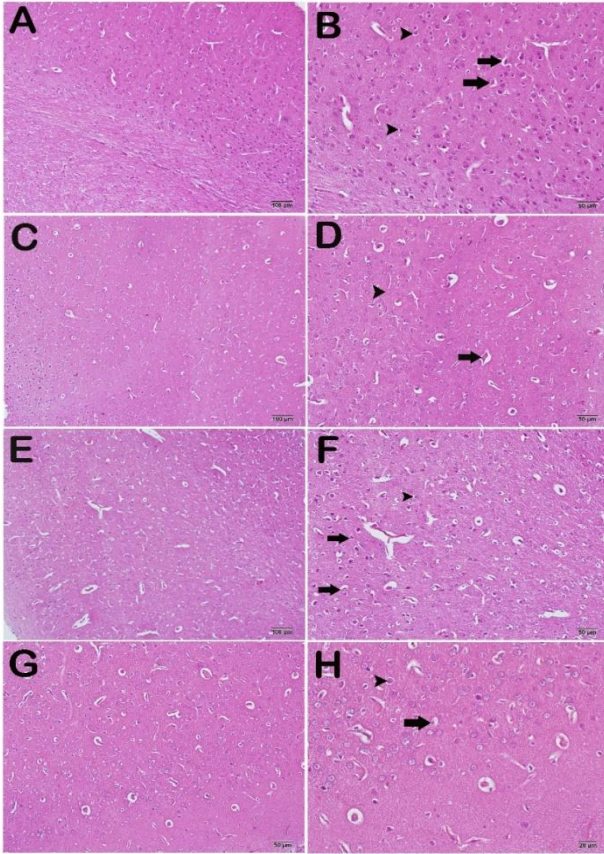
Çalışmamızda tüm veriler SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NJ, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Semi-kantitatif analizler sonucu elde edilen veriler maksimum ve minimum değerler göz önüne alınarak

median±standart sapma şeklinde hesaplandı. Gruplar arasındaki farklar kullanılarak non-parametrik Kruskal Wallis testi ve bunu takiben bir Tamhane testi uygulanarak analizler yapıldıktan sonra, grupların sayısal verileri analize tabi tutuldu. p değeri <0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait deneklerin beyin dokusu ışık mikroskopik kesitlerinde beyaz ve gri cevher normal histolojik yapı özellikleri sergilediği izlendi (Tablo 2) (şekil 1A-B)(HPS: 0,00±0,43). Serum fizyolojik grubuna ait beyin dokusu kontrol grubuna benzer olarak normal yapıda olduğu gözlemlendi (Tablo 2) (şekil 1C-D)(HPS: 0,00±0,52). Gadodiamide grubu beyin dokusuna ait kesitlerde tipik yapıda nöronlar ve oligodendrositler mevcut olup herhangi bir patoloji gözlemlenmedi (Tablo 2)(şekil 1E-F)(HPS: 0,50±0,46). Gadoteric acid grubunda tipik yapıda oligodendrositler gözlemlenmekle beraber birkaç atipik nöron dışında herhangi bir patolojik yapı izlenmedi (Tablo 2)(şekil 1G-H)(HPS: 1,00±0,52).



Şekil 1. Serebral korteks ışık mikroskopik görüntüsü. H&E.

Tablo 2. Histopatolojik Hasar Skorlaması (HPS) Analiz Sonuçları

Gruplar	HPS
Kontrol	0.00±0.43
Serum Fizyolojik	0.00±0.52
Gadodiamide	0.50±0.46
Gadoteric acid	1.00±0.52

*Median±Standart Deviation
[†]p<0.05 Kontrol grubuna kıyasla
 Kruskal Wallis -Tamhane's T2 test.

A(x10)-B(x20): Normal yapıdaki beyin dokusu izlenmekte. Tipik nöron (ok) ve oligodendrosit (ok başı)(HPS skor median değeri:0.00). **C(x10)-D(x20):** Serum fizyolojik grubuna ait kesitlerde normal yapıdaki nöronlar (ok) ve oligodendrosit hücreleri gözlenmekte. (HPS skor median değeri:0.00). **E(x10)-F(x20):** Gadodiamide grubuna kesitlerine ait ışık mikroskop görüntüsü. Nöronlar (ok). Oligodendrositler (ok başı). (HPS skor median değeri:0.50). **G(x20)-H(x40):** Gadoteric acid grubuna kesitlerine ait mikroskop görüntüsü. Nöronlar (ok). Oligodendrositler (ok başı) (HPS skor median değeri:1,00).

TARTIŞMA

Bu çalışma, lineer ve makrosiklik yapıda GBKA tekrarlayan uygulama sonrası serebral dokuda histopatolojik değişikliğe yol açmadığını göstermiştir (15). Histolojik olarak, sağlıklı sıçanlarda yapılan diğer çalışmalarda GBKA nöronal interstisyumda ve vasküler endotel duvarında az miktarda biriktiği ancak bizim çalışmamıza benzer şekilde, histolojik olarak analiz edilen beyinin farklı bölgelerine ait dokularda değişiklik saptanmadığı gözlenmiştir(16). Smith ve arkadaşlarının yaptığı başka bir hayvan çalışmasında da, lineer ve makrosiklik yapıda GBKA maruz bırakılan sıçanlarda beyin dokusunda erken ya da geç dönemde histopatolojik etki izlenmedi(6).

GBCA'nın sağlam bir kan-beyin bariyerini geçmediği düşünülmektedir bu nedenle gadolinyumun beyne ulaşma mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda sıçanlarda (17) ve insanlarda (18) serebrospinal sıvı yoluyla GBCA'ların olası bir beyin ekspresyonu yolu, böylece kan-beyin bariyerini aşarak ulaştığı tartışılmaktadır.

Taoka ve ark. (19) perivasküler boşluğun beyinde lenfatik sisteme karşılık gelen bir sistem oluşturduğunu varsaymış ve buna glia hücresi için 'gl' ve 'lenfatik' sistemi birleştiren bir kelime olan 'glimfatik sistem' adını vermiştir. Sistemik dolaşımdaki gadolinyum bazlı kontrast madde (GBCM) ile karşılaştırıldığında, beyin omurilik sıvısı boşluğuna glimfatik sistem yoluyla dağılan GBCM, beyin dokusunda uzun süre kalabildiğini belirtmektedir. Böylece glimfatik sistemin gadolinyumun doku birikiminde rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. GBCA'ların iskemik serebral yapılarda normal dokuya göre daha fazla birikimin olduğunu bildiren ve böylece kan-beyin bariyerinin bozulmasının beyin dokusunda Gd birikimini kolaylaştırabileceğini gösteren hayvan çalışmaları mevcuttur (5). Kan-beyin bariyerinin oluşumunda rol alan endotel ve perisitlerle etkileşime giren astrositlerin GBCA gibi ekzojen ajanların taşınmasında ve depolanmasında rol aldığını söyleyen araştırmalar mevcuttur (20). İskemik hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda GBKA'nın astrositlerde morfolojik değişikliklere ve hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (5). Astrositlerin, ekzojen nörotoksik ajanların taşınması ve birikmesinde çok önemli bir rol oynadığını bildiren başka bir çalışma ise Feng ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde sağlıklı sıçanlarla yaptıkları çalışmada, normal koşullar altında GBCA maruz bırakılan sıçan astrositlerinde hücre canlılığında önemli bir azalma, laktik dehidrojenaz (LDH) salınımında bir artış ve çekirdekte morfolojik

değişiklikler bildirmemiştir (21). Çalışmalarda oligodendrositlerle ilgili hücre bazlı değişiklikleri içeren çalışmaya raslamadık. Bu çalışma ile GBKA'nın kimyasal yapısına bağlı olmaksızın normal sıçan beyin dokusunda diğer nöronal yapılarla birlikte oligodendrosit üzerine de etkisinin olmadığını ve dolayısı ile myelin yapısında herhangi bir morfolojik değişiklik oluşturmayacağını göstermiş bulunmaktayız.

Sonuç olarak GBKA uzun süreli alımlarında sıçan beyin hücrelerinde nöron ve oligodendrositler üzerinde histopatolojik bulguya neden olmamaktadır. Bulgular kontrast maddenin kimyasal yapısına göre farklılık göstermemektedir. GBKA beyin dokusu üzerindeki etkilerinin ortaya konulması için özellikle elektron mikroskopik düzeyinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: F.B.Ç.; Tasarım: L.T.; Veri Toplama ve/veya İşleme: T.M.; Analiz: T.M.; Literatür Taraması: M.B.; Makale Yazımı: F.B.Ç., G.B.; Eleştirel İnceleme: A.T., N.H.

KAYNAKLAR

- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2293-352.
- Grobner T. Gadolinium - A specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(4): 1104-8.
- Frenzel T, Lengsfeld P, Schirmer H, Hütter J, Weinmann HJ. Stability of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in human serum at 37°C. *Invest Radiol.* 2008; 43(12): 817-28.
- Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, Kitajima K, Takenaka D. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: Relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology.* 2014; 270(3): 834-41.
- Huang XX, Jiang RH, Xu XQ, Zu QQ, Wu FY, Liu S, et al. Ischemic Stroke Increased Gadolinium Deposition in the Brain and Aggravated Astrocyte Injury After Gadolinium-Based Contrast Agent Administration: Linear Versus Macrocyclic Agents. *J Magn Reson Imaging.* 2021; 53(4): 1282-92.
- Smith APL, Marino M, Roberts J, Crowder JM, Castle J, Lowery L, et al. Clearance of gadolinium from the brain with no pathologic effect after repeated administration of gadodiamide in healthy rats: An analytical and histologic study. *Radiology.* 2017; 282(3): 743-51.
- Robert P, Lehericy S, Grand S, Violas X, Fretellier N, Idee JM, et al. T1-Weighted Hypersignal in the Deep Cerebellar Nuclei after Repeated Administrations of Gadolinium-Based Contrast Agents in Healthy Rats: Difference between Linear and Macrocyclic Agents. *Invest Radiol.* 2015; 50(8): 473-80.
- Tedeschi E, Caranci F, Giordano F, Angelini V, Coccozza S, Brunetti A. Gadolinium retention in the body: what we know and what we can do. *Radiol Medica.* 2017; 122(8): 589-600.
- Ramalho J, Ramalho M. Gadolinium deposition and chronic toxicity. *Magn Reson Imaging Clin N Am.* 2017;
- Al-boukai A a, Al-kassimi F a, Ibrahim GF, Shaik S a. Prediction of pulmonary hypertension in patients with or without interstitial lung disease. *Radiology.* 2011; 260(3): 875-83.
- Olchowy C, Cebulski K, Lasecki M, Chaber R, Olchowy A, Kałwak K, et al. The presence of the gadolinium-based contrast agent depositions in the brain and symptoms of gadolinium neurotoxicity-A systematic review. *PLoS One.* 2017; 12(2): 1-14.
- Abnormalities I, McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Paolini MA, et al. Gadolinium deposition in human brain tissues after contrast-enhanced mr imaging in adult patients without. *Radiology.* 2017; 000(0): 1-9.
- Öner AY, Barutcu B, Aykol Ş, Tali ET. Intrathecal Contrast-enhanced magnetic resonance imaging-related brain signal changes: residual gadolinium deposition? *Invest Radiol.* 2017; 52(4): 195-7.
- Lenkinski RE. Gadolinium retention and deposition revisited: how the chemical properties of gadolinium-based contrast agents and the use of animal models inform us about the behavior of these agents in the human brain. *Radiology.* 2017; 285(3): 721-4.
- McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, et al. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology.* 2015; 275(3): 772-82.
- Murata N, Gonzalez-Cuyar LF, Murata K, Fligner C, Dills R, Hippe D, et al. Macrocyclic and other non-group 1 gadolinium contrast agents deposit low levels of gadolinium in brain and bone tissue: Preliminary results from 9 patients with normal renal function. *Invest Radiol.* 2016; 51(7): 447-53.
- Jost G, Lenhard DC, Sieber MA, Lohrke J, Frenzel T, Pietsch H. Signal increase on unenhanced T1-weighted images in the rat brain after repeated, extended doses of gadolinium-based contrast agents comparison of linear and macrocyclic agents. *Invest Radiol.* 2016; 51(2): 83-9.
- Mamourian AC, Hoopes PJ, Lewis LD. Visualization of intravenously administered contrast material in the CSF on fluid-attenuated inversion-recovery MR images: An in vitro and animal- model investigation. *Am J Neuroradiol.* 2000; 21(1): 105-11.
- Taoka T, Naganawa S. Gadolinium-based contrast media, cerebrospinal fluid and the glymphatic system: Possible mechanisms for the deposition of gadolinium in the brain. *Magn Reson Med Sci.* 2018; 17(2): 111-9.
- Aime S, Caravan P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging.* 2009; 30(6): 1259-67.
- Feng XD, Xia Q, Yuan L, Huang HF, Yang X Da, Wang K. Gadolinium triggers unfolded protein responses (UPRs) in primary cultured rat cortical astrocytes via promotion of an influx of extracellular Ca²⁺. *Cell Biol Toxicol.* 2011; 27(1): 1-12.