

تفاوت وابسته به جنسیت در جذب و توزیع بور در مغز موش صحرائی: با رویکردی بر نوترون درمانی با بور

سامره گودرزی^{۱*}، بهنام الدین جامعی^۲، علی پذیرنده^۱

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده فنی و مهندسی

^۲ دانشگاه علوم پزشکی تهران (پردیس همت)، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم پایه

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، مطالعه‌ی نحوه توزیع بور به روش آلفا اتورادیوگرافی، در ۳ ناحیه مختلف مغزی شامل مغز پیشین، مغز میانی و مغز خلفی در نمونه های حیوانی از سه گروه موش صحرائی نر، ماده و نمونه های ماده بدون تخمدان و با فاصله های زمانی مختلف میان تزریق و پرفیوژن و مقایسه نتایج آنها با یکدیگر است. نتایج بدست آمده از این پژوهش تفاوت قابل ملاحظه ای را میان توزیع بور در نواحی پیشین، میانی و خلفی مغز موش صحرائی نشان می دهد. همچنین تفاوت در میزان تجمع بور در این سه ناحیه در بین گونه های نر و ماده و شباهت میان گروه نر و ماده بدون تخمدان، مشاهده شده است.

کلید واژه: نوترون درمانی با بور، آلفا اتورادیوگرافی، توزیع بور، مغز موش

۱. مقدمه

نوترون درمانی با بور بر پایه ی برهمکنش میان نوترون های حرارتی و بور ۱۰ استوار است که سبب آزاد شدن ذرات آلفا و لیتیم با انتقال خطی انرژی بالا طی واکنش هسته ای $^{10}B(n, \alpha)^7Li$ می شود [۱]. در این روش درمانی تجمع معینی از بور ۱۰ در بافت تومور، بافت سالم و خون برای موفقیت آمیز بودن پروتکل درمانی و محاسبه ی دز مجاز بافت سالم و بافت تومور امری ضروری است. بنابراین تعیین مقدار بور تجمع یافته در بافت سالم از نظر محاسبات دزیمتری موضوعی مهم و حیاتی به شمار می رود. گزارشاتی که توصیف کننده ی نحوه ی توزیع بور در بافت سالم باشد بسیار محدود است [۲]. در مطالعات گذشته که به طور کلی بر روی مقدار بور جذب شده در بافت های مختلف بدن با استفاده از نمونه حیوانی صورت گرفته است قسمت های مختلف بدن حیوان از نظر میزان جذب بور با یکدیگر مقایسه شده اند [۳]. اما نتایج حاصل از این تحقیق اطلاعات دقیق تری را درباره ی تفاوت در تجمع بور و دفع بیولوژیکی آن از بافت، در نواحی مختلف مغزی با جنسیت های متفاوت بدست می دهد؛ که هم در محاسبه ی دز مجاز بافت سالم و هم در تعیین زمان مناسب پرتودهی می تواند مفید واقع شود.

۲. روش کار

تکنیک آلفا آتورادیوگرافی، از میان تمام روش های موجود، انتخاب مناسبی برای تعیین توزیع بور و پاسخ به سوالات این تحقیق به شمار می رود؛ چراکه دارای قدرت تفکیک سطحی مناسب و حساسیت بالا و در حد ppm بوده و نیز ارزان، مطمئن و در دسترس است [۴]. در بکارگیری این تکنیک، از آشکارسازهای رد هسته ای حالت جامد از نوع پلی کربنات به عنوان آشکارساز ذرات آلفا ولتیم استفاده می شود [۵]. این تحقیق با بررسی رد ذرات آلفا و لیتیم بر روی سطح پلی کربنات که نمونه ای از بافت حاوی بور مغز موش صحرائی بالغ نژاد ویستار را احاطه کرده است صورت گرفته است. تعداد، گروه و نژاد نمونه های حیوانی مورد آزمایش به ترتیب زیر است:

- گروه اول: موش های صحرائی ماده، سه سر جهت تزریق ماده حاوی بور و یک سر نمونه کنترل، به وزن ۱۵۰ تا ۱۶۰ گرم و سن ۶۰ روز
- گروه دوم: موش های صحرائی نر، سه سر جهت تزریق ماده حاوی بور و یک سر نمونه کنترل، به وزن ۱۶۰ تا ۱۷۰ گرم و سن ۶۰ روز
- گروه اول: موش های صحرائی ماده، سه سر جهت تزریق ماده حاوی بور، به وزن ۱۴۰ گرم و سن ۳۰ روز

یک گروه از نمونه های ماده به منظور انجام عمل برداشت تخمدان جوان تر انتخاب شده اند و قبل از شروع آزمایش ها مورد جراحی قرار گرفته اند تا به هنگام شروع مراحل بیولوژیکی تحقیق، این حیوانات نیز پس از طی کردن دوره نقاهت، به سن بقیه نمونه های مورد آزمایش رسیده باشند. بنابراین آزمایش بر روی مغز ۱۱ موش صحرائی بالغ ۲ ماهه از نژاد ویستار به وزن میانگین ۱۶۰ گرم انجام گرفته است. بدین ترتیب که بعد از تزریق داخل صفاقی ۲ میلی لیتر محلول خنثی حاوی بور (۰/۰۰۵ گرم اسید بوریک + ۰/۰۰۵ بوراکس + ۱۰ میلی لیتر آب مقطر؛ $PH = 7/4$)، و با گذشت فاصله های زمانی متفاوت ۲ ساعت، ۴ ساعت و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور، حیوانات بر طبق پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی با استفاده کتامین و زایلازین بیهوش شده و به روش داخل قلبی پرفیوز شدند و مغزشان خارج گردید. به همین ترتیب در نمونه های کنترل نیز بدون تزریق ماده حاوی بور و تنها با بیهوشی و پرفیوژن، بافت مغز تهیه شد. بافت های تهیه شده به دلیل استفاده از مواد آلدئیدی (نرمال سالین، فیکساتیو و سوکروز) در پرفیوژن قلبی به خوبی تثبیت شده و بافت شکل و ساختار خود را حفظ می کند؛ بدون اینکه فرایند تثبیت بافت باعث خروج مواد جذب شده در بافت، از آن گردد [۶]. برشهای کروئال از قسمتهای پیشین، میانی و خلفی مغز سه گروه حیوانی شامل نمونه های تزریقی و کنترل نر، ماده و ماده بدون تخمدان، با استفاده از دستگاه میکروتوم انجمادی به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه و بین دو پلاستیک پلی کربنات ساندویچ شدند. نمونه ها در محل رابیت راکتور تحقیقاتی تهران تحت تابش شار نوترون های حرارتی ($1.0 \times 10^9 \text{ n.s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) قرار گرفتند. ردهای آلفا و لیتیم به وجود آمده حاصل از واکنش جذب $^{10}B(n, \alpha)^7Li$ بر روی آشکارساز پلی کربنات بعد از قرار دادن آن در محلول خوردگی (پتاس و اتانول به نسبت ۷۰ به ۳۰ در محلول، دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۹۰ دقیقه) زیر میکروسکوپ نوری مشاهده و به کمک CCD-Camera از محل ردها تعداد ۵۰ عکس به طور تصادفی گرفته شده است. توزیع بور در نواحی مورد مطالعه از طریق مقایسه ی میانگین شمارش های رد ذرات آلفا و

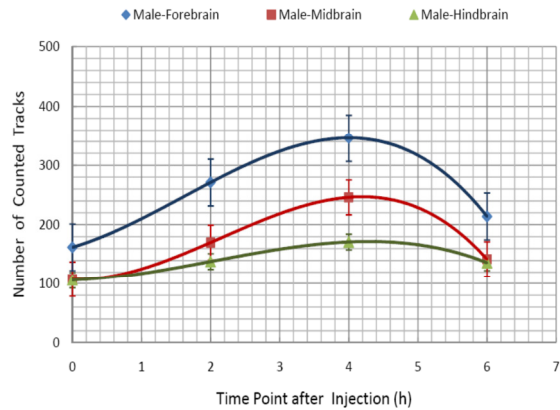
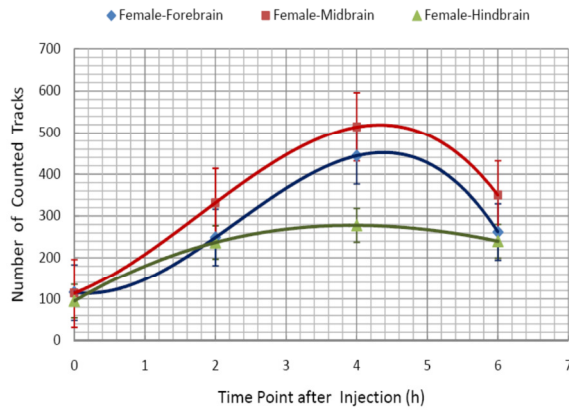
لیتیم ایجاد شده بر سطح پلی کربنات مربوط به هر ناحیه، مورد بررسی قرار گرفته است. به دلیل وجود هیدورژن و نیتروژن در بافت و برهمکنش آنها با نوترون، تعداد زیادی رد ذرات پروتون نیز بر روی پلی-کربنات مشاهده می شود که با توجه به شرایط خوردگی بکار رفته و نیز کم بودن انتقال خطی انرژی این ذرات در مقایسه با ذرات کوتاه برد آلفا و لیتیم، رد حاصل از آنها کوچکتر بوده و به راحتی از رد ذرات هسته ای سنگین قابل تمیز است [۷]. از آنجا که دو ذره ی آلفا و لیتیم در دو جهت مخالف آزاد می شوند، بر روی سطح آشکارساز هم ذرات آلفا و هم ذرات لیتیم شمارش می شود؛ چراکه به ازای هر واکنش، یا ذره ی لیتیم و یا ذره ی آلفا می تواند در یک سطح آشکار شود.

۳. نتایج

ردهای ذرات آلفا و لیتیم بر روی پلی کربنات های حاوی بافت، شمارش شده و نمودار شکل های ۱ تا ۶ از نتایج آن بدست آمده است. برای هر نمونه ی بافتی، ردهای ذرات بر روی ۵۰ عکس شمرد شده، میانگین گرفته شده و مقدار انحراف از معیار شمارش ها نیز بصورت خطای استاندارد بر روی نمودار نشان داده شده است. در جدول ۱-۳ خلاصه ای از نتایج تحقیق آمده است.

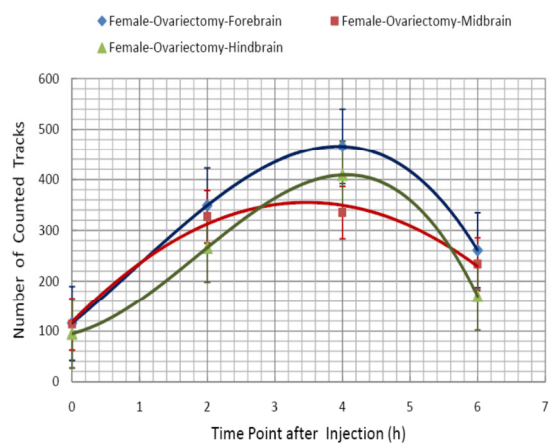
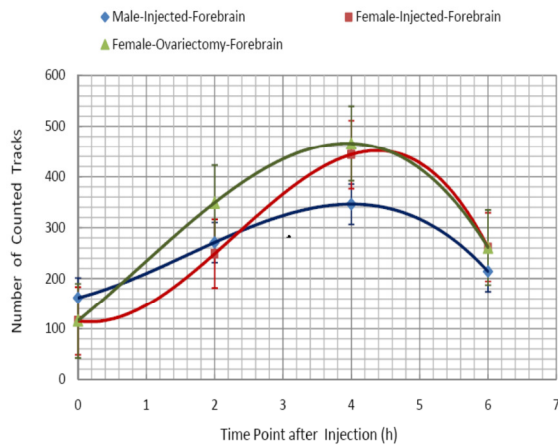
۴. بحث و نتیجه گیری

آگاهی از چگونگی تغییر تجمع بور در بافت (چه سالم و چه مبتلا) برای طرح ریزی زمان مناسب پرتو دهی در پروتکل های درمانی اهمیت دارد. زمان مناسب پرتو دهی در پروتکل های درمانی وقتی است که تجمع بور در بافت تومور به بیشترین مقدار و در بافت سالم و خون به کمترین مقدار خود رسیده باشد [۸]. در این تحقیق آزمایش بر روی حیوانات سالم انجام شده است تا مشخص شود که در چه مدت هایی پس از تزریق ماده حاوی بور مورد استفاده، میزان بور به مقدار حداکثر و حداقل خود در بافت سالم می رسد. حامل های بور نقش مهمی در اثر بخشی نوتون درمانی با بور دارند. هر حامل بوری توزیع سلولی و زیر سلولی منحصر بفردی دارد [۹]. از این رو روند تجمع بور ممکن است با به بکار بردن حامل های متفاوت بور تغییر کند؛ اگرچه در تحقیقات اخیر با استفاده از حامل های دیگری از بور که BPA را نیز شامل می شود، بیشترین تجمع بور، در بافت تومور و نیز در بافت سالم، در ۴ ساعت پس از تزریق حامل بور گزارش شده است که نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر را تایید می کند [۱۰]. از طرف دیگر عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی همچون افزایش غلظت بور در بافت با افزایش دمای عمومی بدن نمونه، افزایش غلظت بور در بافت متعاقب کاربرد پالس الکتریکی موضعی پس از تزریق حامل بور و استفاده از حامل های شیمیایی که قادر به تغییر نفوذ پذیری سد خونی- مغزی هستند نیز در میزان تجمع بور در بافت های سالم و مبتلا دخالت دارند [۱۱]. همچنین نحوه ی تزریق حامل بور می تواند در سرعت و میزان تجمع آن در بافت مؤثر باشد. برای مثال تزریق



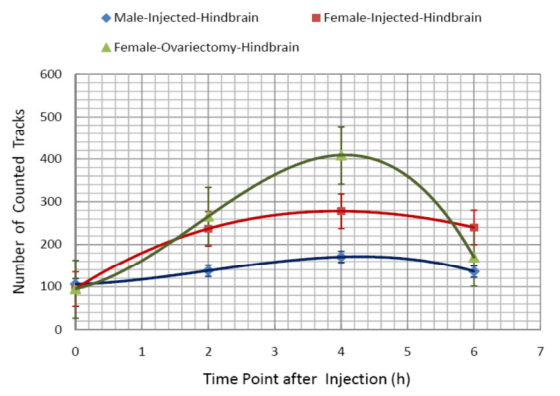
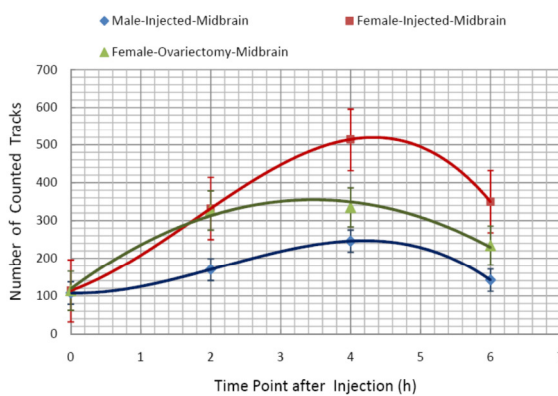
شکل ۲. نمودار ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل گروه ماده

شکل ۱. نمودار ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل گروه نر



شکل ۴. نمودار مقایسه‌ای ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل، مغز پیشین در هر ۳ گروه

شکل ۳. نمودار ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل گروه ماده بدون تخمدان



شکل ۴. نمودار مقایسه‌ای ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل، مغز میانی در هر ۳ گروه

شکل ۴. نمودار مقایسه‌ای ردهای شمارش شده، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از تزریق حامل بور و نمونه کنترل، مغز خلفی در هر ۳ گروه

جدول ۳-۱ : خلاصه نتایج تحقیق

گروه حیوانی نر	گروه حیوانی ماده	گروه حیوانی ماده بدون تخمدان
بیشترین ردهای شمارش شده : در مغز پیشین	بیشترین ردهای شمارش شده : در مغز میانی	بیشترین ردهای شمارش شده : در مغز پیشین
<ul style="list-style-type: none"> در هر سه گروه حیوانی تعداد ردها تا ساعت چهارم پس از تزریق حامل بور افزایش و پس از آن شروع به کاهش می کند که نشان دهندهی زمان شروع دفع بیولوژیکی بور از بافت است و در ساعت ششم پس از تزریق، تعداد ردها به کمترین مقدار خود می رسد. شباهت میان توزیع بور در نمونه های نر و ماده بدون تخمدان قابل توجه است. 		
مغز پیشین	مغز میانی	مغز خلفی
بیشترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی ماده بدون تخمدان کمترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی نر	بیشترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی ماده کمترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی نر	بیشترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی ماده بدون تخمدان کمترین ردهای شمارش شده: در گروه حیوانی نر
<ul style="list-style-type: none"> در هر سه ناحیه مغزی تعداد ردها تا ساعت چهارم پس از تزریق حامل بور افزایش و پس از آن شروع به کاهش می کند که نشان دهندهی زمان شروع دفع بیولوژیکی بور از بافت آن نمونه است و در ساعت ششم پس از تزریق، تعداد ردها به کمترین مقدار خود می رسد. در هر سه ناحیه مغزی جذب بور در نمونه های حیوانی نر، کمترین مقدار است. 		

داخل شریانی منجر به افزایش دو برابری غلظت بور در بافت در مقایسه با تزریق داخل وریدی می شود [۱۲].
تزریق داخل صفاقی نیز تجمع بیشتری از بور را در مقایسه با تزریق شکمی نشان داده است و بهره درمانی
نوترون درمانی با بور را به دلیل آسیب کمتر به بافت سالم افزایش می دهد [۱۳]. با وجود تحقیقات گسترده
اخیر هنوز هیچ حامل بوری که به طور ایده آل برای نوترون درمانی با بور مناسب باشد یافت نشده است. این
موضوع در مورد دو حامل بور BPA و BSH که بیش از دو دهه در این روش درمانی کاربرد داشته اند نیز
صدق می کند [۱۴]. با اینکه این دو حامل بور توزیع زیرسلولی متفاوتی نسبت به اسید بوریک دارند اما
استفادهی همزمان اسید بوریک با حامل بوری همچون BSH ممکن است به توزیع پور موثری در نوترون
درمانی با بور منجر شود [۱۵]. مطالعات بسیاری برای تعیین توزیع بور حامل های BPA و BSH و پایداری
آنها در بافت سالم، تومور و خون صورت گرفته است [۱۵، ۱۶ و ۱۷]، درحالی که تحقیقات در زمینه ی
چگونگی توزیع اسید بوریک در بافت بسیار اندک است. به طور کلی نتایجی که از این تحقیق بدست می آید
در کنار آزمایش های مشابه و با رویکردهای متفاوت قابل بحث خواهد بود؛ چراکه لازم است همین روند
آزمایش با همین پروتکل ها بر روی حیواناتی که قبلا توموردار شده اند انجام شود، تا زمان رسیدن میزان بور
به بیشترین مقدار خود در بافت تومور نیز مشخص و نتایج آن با آنچه که از مطالعه بر روی بافت سالم
بدست آمده مقایسه گردد. این نتایج تنها از مطالعه ی میکروسکوپی توزیع بور در بافت حاصل شده است که
به تنهایی قادر به پاسخگویی به سوالاتی در مورد علت تفاوت در توزیع بور در مغز نمونه های نر و ماده

نیست؛ چراکه این هدف از طریق مطالعه زیرسلولی نواحی مختلف مغزی، به روش‌های پیچیده‌ی بیولوژیکی و مطالعه‌ی متغیرهای مختلف ایجادکننده‌ی تفاوت در مکانیزم جذب سلولی میان گونه‌های نر و ماده قابل حصول است. به هر ترتیب تفاوت در توزیع بور در مغز برای دو جنس متفاوت می‌تواند منجر به پاسخ‌های متفاوت درمانی شود. همچنین تفاوت در تجمع بور تاثیر مستقیم بر فاکتورهای طرح درمان از جمله نحوه تابش‌دهی و زمان آن و نیز مقدار شار نوترونی خواهد داشت. از این رو آگاهی از نحوه‌ی توزیع بور در قسمت‌های مختلف مغز می‌تواند به نفع پروتکل درمانی مناسب باشد.

مراجع:

1. Tetsuya Yamamoto, et al. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. *Cancer Letters* 262:143–152. 2008.
2. Yasushi Shibata. Boron distribution in the normal rat brain after intravenous injection of boronophenylalanine-fructose. *J Neurooncol* .87:35–41. 2008.
3. H. J. Cho, et al. Determination of boron in a black mouse by prompt gamma activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 272, No.2:403–407. 2007.
4. Andrea Witting, et al. Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron neutron Capture Therapy. *Critical reviews in onvology/hematology*,68, 66-90. 2008.
5. C. HEPBURN, A. H. WINDLE. Solid state nuclear track detectors. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE* 15:279-301. 1980.
6. Michael Neumann, et al. Determination of the subcellular distribution of mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH) in human glioblastoma multiforme by electron microscopy. *Journal of Neuro-Oncology* 57: 97–104, 2002.
7. S. Mikado, et al. Application of neutron capture autoradiography to Boron Delivery seeking techniques for selective accumulation of boron compounds to tumor with intra-arterial administration of boron entrapped water-in-oil-in-water emulsion. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 605 171–174. 2009.
8. Kunio Yokoyama, et al. Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT. *Jurnal of Neuro-Oncology*. 78, 227-232. 2006.
9. C.H. Hsieh, et al. A simple model for quantification of the radiobiological effectiveness of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ capture reaction in BNCT. *Applied Radiation and Isotopes* 64: 306–314. 2006
10. Allah Detta and Garth S. Cruickshank. L-Amino Acid Transporter-1 and Boronophenylalanine-Based Boron Neutron Capture Therapy of Human Brain Tumors. *Cancer Res* 2009; 69: (5). March 1, 2009.
11. Koryakin S. N. Molecular- biological problems of drug design and mechanism of drug action compounds for neutron capture therapy and their distribution in tumors and surrounding tissues of animals (A REVIEW). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40. 2006.
12. Barth Rolf F, et al. Rat brain tumor models to assess the efficacy of boron neutron capture therapy: a critical evaluation. *Journal of Neuro-Oncology*, 62, 61–74. 2003.
13. Coderre JA, et al. Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex; *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 30(3): 643-52. 1994.
14. S. N. Koryakin. Molecular-Biological Problems of Drug Desine and mechanism of dug action. *Pharmaceutical Chemistry Journal*: Vol. 40, No. 11, 2006
15. F.I.Chou, et al. Suitability of boron carriers for BNCT: Accumulation of boron in malignant and normal liver cells after treatment with BPA, BSH and BA. *Applied Radiation and Isotopes* 67:S105–S108. 2009.