

## Експериментален модел за оценка на бъбречната функция с прототип на контрастно средство при 7T MRI

Румяна Бакалова,<sup>1,2</sup> Георги Хаджидеков,<sup>2</sup> Живко Желев,<sup>1</sup> Генчева Златева,<sup>2</sup> Любомир Спасов,<sup>2</sup> Ичио Аоки<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Център за молекулярен имиджинг, Национален институт за радиологични изследвания, 4-9-1 Анагава, Чиба 263-8555, Япония

<sup>2</sup>Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“, ул. „Козяк“ 1, София 1407, България

### Abstract

The present study shows that nitroxide derivative (carbamoyl-PROXYL) is suitable <sup>1</sup>H-MRI contrast probe for visualization of hypercholesterolemia-induced renal dysfunction in intact animals and clarifying the mechanism(s) of renal damage mediated by cholesterol. The probe was applied in a concentration, which was 3 times lower than the LD50 for intravenous administration in C57Bl/6 mice. Since the probe is excreted by kidneys, it could be considered harmless for mammals in the selected dose and appropriate candidate for translational research. The data were compared with those, obtained by conventional <sup>1</sup>H-MRI contrast agent Gd/DTPA for assessment of renal function in experimental animals and patients.

### Резюме

### Въведение

През 1984 година, в научната литература е докладвана възможността за използване на нитроксилните радикали като контрастно средство за T1 MRI и потенциалното им приложение в магнитнорезонансната образна диагностика [Afzal et al., 1984; Griffeth et al., 1984; Keana et al., 1987]. Нитроксилните радикали са малки молекули от пиперидинов („TEMPO“) или пиролидинов тип („PROXYL“), които са високочувствителни към окислително-редукционните процеси в биологичните тъкани, и намират широко приложение в EPR изследванията [Rosen et al., 1990; Utsumi & Yamada, 2003; Valgimigli et al., 2001]. При MRI се прилагат предимно нитроксилни радикали от пиролидинов тип, поради тяхната по-висока стабилност към редукция *in*

Наличието на хиперхолестеролемиа беше доказано чрез конвенционални тестове за нивата на общия холестерол, LDL-холестерола и HDL-холестерола в плазмата на животните. Паралелно бяха проведени следните биохимични тестове на серума на животните, показателни за функционалното състояние на бъбреците: общ белтък, албумин, урея, креатин, пикочна киселина, неотгачен фосфор, йонен баланс на кръвта (Na, K, Cl, Ca).

Експериментите бяха проведени в Националния институт за радиологични изследвания на Япония. Приложеният от нас протокол за развъждане, наблюдение и третиране на експерименталните животни беше одобрен от Комисията за поддържане на експериментални животни на Университета в Чиба, Япония. Проведените експерименти бяха в съответствие с изискванията на „Principles of Laboratory Animal Care” (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA; publication number 85-23, revised 1985) и „Guidelines of the Animal Investigation Committee of the National Institute of Radiological Sciences, Japan”.

#### ***MRI протокол***

MRI изследванията бяха проведени на 7T MRI (Kobelco & Jastec, Kobe, Japan) при използване на следните параметри: T<sub>1</sub>-weighted incoherent gradient-echo sequence (fast low-angle shot); repetition time = 75 ms; echo time = 3.2 ms; flip angle = 45 degrees; number of averages = 4; scan time = 19.2 seconds; matrix = 64 x 64; slice thickness = 1.0 mm; number of slices = 4. We selected the coronal slice orientations with a 300 x 300 x 1000 µm<sup>3</sup> nominal voxel resolution. Ninety-six seconds after starting the MRI scan (5 images acquired as pre-administration data), 100 µL of carbamoyl-PROXYL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; initial concentration - 100 mmol/L, in PBS, pH 7.4) or Gd-DTPA (Meglumine Gadopentetate, Bayer HealthCare, Osaka, Japan; final concentration - 0.125 mmol/kg) was injected via the tail vein. T<sub>1</sub>-weighted images were acquired continuously within ~20 min. The MRI data were analyzed using the ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) software.

Mice were anesthetized by isoflurane (1.2%, Abbott Japan, Tokyo, Japan) and placed in a body holder (Rapid Biomedical, Rimpac, Germany), stomach side down and fixed head. Polyethylene catheter (PE-10, Becton-Dickinson, NJ, USA) was placed in the tail vein for probe administration. The mouse was then placed in the <sup>1</sup>H-volume radio-frequency (RF) resonator (Bruker BioSpin) with surface RF receiver (Rapid Biomedical). Rectal temperature of the mouse was maintained at 37.0 ± 0.5 °C using an automatic controlled electric heater and monitored using an optical temperature probe (FOT-M and FTI-10, FISO Technology,



Quebec, Canada). A respiration sensor (SA Instruments, Edison, NY, USA) was placed on the chest of the mouse for monitoring.

Непосредствено преди инжектирането на контрастното средство, бяха направени пет контролни образа с посочените по-горе параметри. Динамични, контрастноусилени T<sub>1</sub>-образи бяха получени последователно в рамките на ~15 минути след инжектирането на контрастното вещество. Получените функционални MRI данни бяха анализирани чрез ImageJ софтуер (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Интензитетът на сигнала в определената зона на интерес (ROI) в бъбреците след инжектирането на пробата бяха нормализирани до средния интензитет на MRI сигнала в същата област преди прилагането на пробата (първите 5 аквизиции непосредствено преди инжектиране).

#### **Статистически анализ на резултатите**

The results are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE). Statistical analyses were conducted with SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). In Tables 1-3, the comparisons between the groups were performed with Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

#### **Резултати**

В таблица 1 са представени резултатите от биохимичните тестове на плазмата и серума на животните, подложени на нормална диета (ND) и диета с повишено съдържание на холестерол (CD). Беше регистрирано значително повишаване на общия холестерол и LDL холестерола и намаляване на HDL холестерола в плазмата на мишките, подложени на холестеролова диета, което е индикация за развитие на хиперхолестеролия. В серума на CD мишките бяха регистрирани повишени нива на албумина, уреята, креатина и пикочната киселина, което е индикация за ренална дисфункция.

**Table 1.** Biochemical test of plasma and serum of mice on ND or CD.

Parameter	ND mice (Group 1)	CD mice (Group 2)	P value
Total plasma cholesterol, (mg/dL)	109 $\pm$ 3	288 $\pm$ 11	<0.001
HDL cholesterol, (mg/dL)	96 $\pm$ 1	58 $\pm$ 5	<0.001
LDL cholesterol, (mg/dL)	13 $\pm$ 3	230 $\pm$ 8	<0.001

Total serum protein (g/dL)	5.00 ± 0.19	4.48 ± 0.26	Ns
Albumin (g/dL)	3.18 ± 0.15	2.24 ± 0.05	<0.01
BUN (mg/dL)	22.62 ± 2.16	28.05 ± 5.15	<0.05
CRE (mg/dL)	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.01	<0.01
UA (mg/dL)	1.60 ± 0.20	2.48 ± 0.22	<0.05
Na (mEq/L)	154.00 ± 1.00	153.75 ± 0.96	Ns
K (mEq/L)	4.76 ± 0.53	5.48 ± 0.26	Ns
Cl (mEq/L)	112.00 ± 1.58	111.75 ± 1.50	Ns
Ca (mg/dL)	8.72 ± 0.19	9.33 ± 0.36	Ns
IP (mg/dL)	8.80 ± 1.55	7.78 ± 2.15	Ns

The results are mean±SE. ns, non-significant; n=7, n – number of mice in each experimental group; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatine; UA, uric acid; IP□inorganic phosphorus; ND, normal diet; CD, cholesterol diet; HDL, high density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins.

Данните на фигура 1 показват динамиката на повишаване на MRI сигнала в бъбреците на мишки при инжектиране на carbamoyl-PROXYL. При ND-мишките, интензитетът на MRI сигнала нараства след инжектиране на carbamoyl-PROXYL, достига максимум (по време на гломерулната филтрация), след което намалява (във фазата на екскреция) до изходното ниво (фигура 1А). Тези промени в интензитета на сигнала се наблюдават в продължение на 14 минути. Времето, за което MRI сигналът намалява два пъти в сравнение с максималната регистрирана амплитуда, е около ~4 минути.

При CD-мишките, сигналният интензитет след инжектиране на carbamoyl-PROXYL се запазва със стойностите на изходното ниво. Цветното изображение на фигура 1Б демонстрира липсата на пик на гломерулна филтрация и фаза на екскреция в кинетичната крива при мишките на холестеролова диета.