

# ارزیابی حجم تومورهای تجربی در موش با استفاده از سیستم تصویربرداری نوری در مراحل مختلف رشد

## خلاصه

ملیحه سادات حسینی<sup>۱</sup>

مرجانہ حجازی<sup>۱،۲</sup>

جمشید حاجتی<sup>۳</sup>

زینب حتمی<sup>۴</sup>

هانیه محمدرضا<sup>۲</sup>

ابراهیم نجف زاده<sup>۱،۲</sup>

آرزو جمالی<sup>۳</sup>

آرش پورغلامی نژاد<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیک پزشکی و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۲</sup> آزمایشگاه لیزر و اپتیک، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۳</sup> گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
<sup>۴</sup> گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: مرجانہ حجازی، تلفن: ۰۰۹۱۲۴۴۱۳۳۹-۶۶۵۸۱۵۰۵، پست الکترونیک: Mhejazi@sina.tums.ac.ir

**مقدمه:** تصویربرداری مولکولی فلئورسنس در مد بازتابشی برای ارائه اطلاعات در مورد فرآیندهای پاتولوژیک یک روش قدرتمند است. رشد تومور یک فرآیند پاتولوژیک شایع است که می‌توان آن را به وسیله کولیس اندازه‌گیری کرد. دقت اندازه‌گیری هنگام استفاده از کولیس به مهارت کاربر بستگی دارد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که روش تصویربرداری مولکولی فلئورسنس (Fluorescence molecular imaging (FMI)) می‌تواند به‌عنوان روش دقیق‌تر جهت اندازه‌گیری آهنگ رشد تومور مورد استفاده قرار گیرد. هدف از ایجاد این پروژه اعتبار دادن به روش FMI جهت سنجش رشد تومور در مقایسه با روش‌های متداول اندازه‌گیری حجم تومور مانند اندازه‌گیری با کولیس است.

**روش بررسی:** در این مطالعه با استفاده از مدل حیوانی تومور، همبستگی بین روش غیرتهاجمی فلئورسنس و روش‌های سنتی مورد ارزیابی قرار گرفت. دودمان سلولی WEHI-164 در ۳۶ موش BALB/c که در سه گروه ۱۲ تایی تقسیم شده بودند به‌صورت زیر پوستی تزریق شد و پس از ۱۰ روز، اندازه تومور به وسیله کولیس اندازه‌گیری گردید. به‌طور همزمان اندازه تومور با تزریق ماده فلئورسنس در مرکز تومور توسط روش FMI اندازه‌گیری گردید. در نهایت همبستگی بین اندازه‌گیری حجم تومور توسط روش‌های سنتی و اندازه‌گیری توسط روش FMI توسط روش اسپیرمن و منحنی ROC ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان می‌دهد که ضریب بستگی اسپیرمن بین حجم تومور و ارتفاع منحنی شدت فلئورسنس در گروه اول، دوم و سوم شدت به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۵، ۰/۰۹ است. آنالیز منحنی ROC نشان می‌دهد که نقطه قطع حجم و وزن تومور به ترتیب ۹۳ میلی‌متر مکعب و ۰/۱۲ گرم می‌باشد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** در موقعیت ما، بین اندازه‌گیری رشد تومور در موش BALB/c توسط FMI با اندازه‌گیری توسط روش‌های مرسوم برای حجم و وزن، همبستگی معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین دقت اندازه‌گیری روش FMI در مورد رشد تومور در حیوانات کوچک نیاز به اصلاح و بهبود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** حجم تومور، تصویربرداری اپتیکی، موش بالبسی، فلئورسنس، سلول‌های WEHI-164

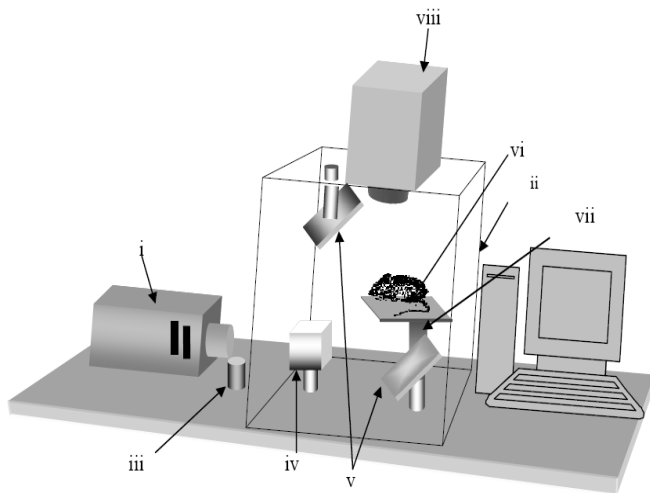
## مقدمه

تصویربرداری نوری مولکولی، روش تشخیصی غیرتهاجمی جهت مشاهده تغییرات مولکولی در سطح سلولی و زیرسلولی می‌باشد [۱] و [۲]. در سال‌های اخیر، کاربرد تصویربرداری نوری در تشخیص زودرس سرطان پوست، جراحی و تعیین روش‌های درمان گزارش شده است. برای تعیین روش‌های درمانی، بررسی حجم تومور موردنظر در طول اجرای روش درمانی بسیار اهمیت دارد. هم‌اکنون، تعیین حجم تومور توسط روش‌های اندازه‌گیری با کولیس و وزن کردن با ترازو صورت می‌گیرد. روش‌های مذکور از خطای کاربری بالایی برخوردار است. به‌طوری‌که مقدار دقیق حجم تومور از یک نمونه به نمونه دیگر تغییر می‌کند [۲، ۴، ۵]. به‌همین علت روش‌های تصویربرداری نوری به‌عنوان روش مناسب جهت تعیین حجم تومور نسبت به سایر

روش‌های تصویربرداری معرفی شده است. در این روش ماده فلئورسنس به داخل تومور تزریق می‌شود تا توسط پرتوی نوری تحریک گردد. بدین ترتیب بافت نشان‌دار شده مبادرت به تابش پرتوی فلئورسنس می‌نماید. شدت پرتوی تابشی با افزایش حجم تومور تغییر می‌کند تا نحوه رشد تومور قابل بررسی گردد.

یزدی و همکاران [۶] اقدام به بررسی روند رشد تومور بدخیم در کبد موش با استفاده از روش بیولومینسنت نمودند. به‌همین علت نحوه رشد تومورهای بدخیم در فواصل زمانی معین مورد بررسی قرار گرفت سپس با کشتن موش و جداسازی تومور، مبادرت به توزین تومور نمودند. در نهایت، بین تعداد سلول‌های سرطانی با افزایش شدت فلئورسنس همبستگی با  $p < 0/001$  به‌دست آوردند. اما، پس از بیست

بدین ترتیب با استفاده از عدسی‌های تلسکوپی، قطر پرتوی لیزر از یک میلی‌متر به ۱ سانتی‌متر افزایش می‌یابد تا سطح بدن موش به‌طور یکنواخت تحت تابش پرتو لیزر قرار بگیرد.



شکل ۱: الف) لیزر (شامل لیزر آرگون، دیود، هلیوم نئون)، ب) اطافک تصویربرداری، ج) بیم اسپلیتر، د) توان سنج، ه) آینه های بزرگ، و) صفحه شفاف، ز) دوربین CCD

همزمان با آماده‌سازی چینش اپتیکی مبادرت به ایجاد تومور در موش‌های بلب سی شد. به‌همین منظور سلول‌های WEHI-164 از رده فیبروسارکوما با منشأ موش از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. پس از آماده‌سازی سلول‌ها، یک‌ونیم میلیون سلول WEHI-164 در سمت راست موش‌های بلب سی در محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته تزریق شدند. رشد تومورها هر ۴۸ ساعت با اندازه‌گیری توسط کولیس صورت گرفت. در این اندازه‌گیری حجم تومور از رابطه حاصل ضرب پهنا در  $0.52$  طول تومور برحسب میلی‌متر مکعب به‌دست آمد. به‌طوری‌که با گذشت هر هفته، حیوانات با تومورهای هم‌اندازه در یک گروه قرار گرفتند و تصویربرداری شدند. نهایتاً موش‌ها به سه گروه دوازده‌تایی تقسیم شدند.

برای انجام تصویربرداری، موش‌ها جهت حذف تابش اتوفلئورسنت زوده شد و موش‌ها بر روی نگهدارنده مخصوص حیوان قرار گرفتند تا دمای بدن آن‌ها در حدود  $37$  درجه سانتی‌گراد حفظ شود. سپس حیوانات با تزریق ماده بیهوشی کتامین و زایلازین به‌مدت ۲۰ دقیقه بیهوش شدند. بعد از آماده‌سازی موش، انجام مراحل تصویربرداری شروع شد.

در مرحله اول تصویربرداری قبل از قراردادن نمونه بر نگهدارنده، تصویری جهت اندازه‌گیری نویز حرارتی CCD تهیه شد. سپس نمونه بر روی نگهدارنده قرار گرفت و ماده فلئورسنت فلئورسنتین ( $0.21$  میلی‌لیتر) در مرکز آن تزریق شد. پس از تزریق، تومور نشاندار شده تحت تابش پرتوی لیزر قرار گرفت تا شدت پرتوی فلئورسنت رسیده به سطح بدن نمونه توسط دوربین CCD بسیار

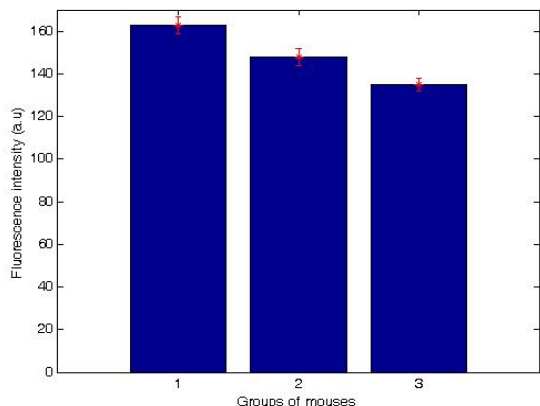
روز این همبستگی تفاوت معنی‌داری نشان داد [۶]. در سال ۲۰۰۷ کیارت و همکاران با استفاده از روش بیولومیسنت و تزریق داخل وریدی ماده فلئورسنت مبادرت به بررسی تغییرات حجم تومور کاشته شده در موش نمودند. به‌طوری‌که تکرارپذیری این روش ۸۲ درصد گزارش شد [۷]. قابل ذکر است که در این روش ابتدا سلول‌های سرطانی با ماده فلئورسنت مانند لوسی فراز نشان‌دار و جهت ایجاد تومور به موش تزریق می‌شوند. بنابراین سلول‌های سرطانی بدون تحریک توسط لیزر مبادرت به تابش پرتوی فلئورسنت می‌نمایند. لذا، در روش‌های بیولومیسنت، تومورهای عمقی به‌علت پایین بودن نسبت سیگنال به نویز قابل رؤیت نمی‌باشند. به‌همین دلیل اخیراً روش FMT جهت تصویربرداری از تومور در حین جراحی و تغییرات حجم آن گزارش شده است [۸]. نتایج این مقالات امکان پذیری استفاده از روش FMT را جهت ارزیابی اندازه، مورد تأیید قرار می‌دهد. اما تاکنون، همبستگی روش FMT با روش‌های متداول تعیین حجم تومور مورد ارزیابی آماری قرار نگرفته است.

بنابراین هدف این مقاله بررسی همبستگی روش FMT با روش‌های متداول (توزین و اندازه‌گیری با کولیس) می‌باشد تا جایگزینی این روش به‌جای روش‌های قبلی در کلینیک امکان‌پذیر گردد. به‌همین دلیل چینش اپتیکی ملکولی فلئورسنت در مد بازتابشی، طراحی و مورد استفاده قرار گرفت سپس با کاشت تومور در موش مبادرت به تصویربرداری از موش‌ها در فواصل زمانی معین گردید. در نهایت، مقادیر به‌دست آمده از حجم محاسبه شده از روش‌های متداول، مورد ارزیابی دقیق آماری قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده می‌تواند پیش‌آگهی بسیار مهمی را در مورد استفاده از روش جایگزین تعیین حجم تومور در اختیار متخصصان بالینی قرار دهد.

## روش بررسی

برای اندازه‌گیری روند رشد تومور، چینش اپتیکی در مد بازتابشی طراحی شد سپس سلول‌های تومورال در موش کاشته شد و با ماده فلئورسنت نشان‌دار گردید و در نهایت ارزیابی آماری جهت به‌دست آوردن همبستگی بین روش پیشنهادی و روش‌های متداول صورت گرفت. لذا سامانه تصویربرداری نوری در مد بازتابشی جهت تعیین حجم تومورهای تجربی در موش طراحی و ساخته شد (شکل ۱). در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد که چینش اپتیکی شامل لیزر DPSS با طول موج  $473$  نیک نانومتر، توان خروجی  $20$  میلی‌وات) دوربین سیار حساس CCD (ساخت کارخانه Andor)، عدسی‌های آکرومات (مدل AC254-030، با فواصل کانونی  $7$  و  $8$  سانتی‌متر، ساخت کارخانه Thorlabs) و فیلتر بلاگذر تحریکی (کارخانه Thorlabs) بود. در چینش طراحی شده پرتوی لیزر از عدسی‌های آکرومات عبور می‌کند تا به نمونه برسد. عدسی‌های آکرومات به فاصله  $15$  سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفتند تا به‌عنوان عدسی‌های تلسکوپی عمل نمایند.

تصاویر تهیه شده از تومورها در محیط MatLab باز شد و تحت پردازش قرار گرفت. برنامه پردازشی شامل یک فیلتر بالاگذر و یک فیلتر پایین‌گذر جهت کاهش نویز بود. همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، تصویر به‌دست آمده از تومور دارای پروفایل گوسی است. بنابراین بیشینه ارتفاع منحنی<sup>۲</sup> به‌عنوان معیاری برای اندازه‌گیری شدت فلئورسنت در نظر گرفته شد. نتایج به‌دست آمده از ارتفاع پروفایل شدت با توجه به آنالیز آماری گروه‌بندی موردنظر به‌صورت نمودار میله‌ای در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۴: ارتفاع پروفایل شدت با توجه به گروه‌بندی تومورها

همان‌طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد، شدت فلئورسانس در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب  $163/5 \pm 2/7$ ،  $148/7 \pm 4/3$  و  $133/25 \pm 6/6$  به‌دست آمد. بنابراین شدت ماده فلئورسنت با توجه به گروه‌بندی تومورها بر حسب وزن تومور روند کاهنده داشت. پس از کشتن موش، با استفاده از وسایل جراحی پوست آن برش داده شد. این برش با دقت بسیار زیاد انجام شد تا بافت تومورال آسیب نبیند. سپس تومور با چاقوی جراحی شماره ۴ برداشته شد. تومور جدا گردید و بلافاصله توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۲ رقم اعشار اندازه‌گیری شد. به‌علاوه دو قطر اصلی آن توسط کولیس دیجیتال محاسبه گردید. نتایج مربوط به اندازه‌گیری وزن تومور در شکل ۵ ملاحظه می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، وزن تومورها در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب  $0/1 \pm 0/04$  گرم،  $0/3 \pm 0/1$  گرم و  $0/14 \pm 0/045$  گرم به‌دست آمد. روند وزن تومورها افزایش می‌باشد که این نشانگر رشد تومور بر حسب زمان است. خاطر نشان می‌شود که ابعاد تومورها قبل از تصویربرداری و بعد از خارج نمودن تومور از بدن موش با کولیس اندازه گرفته شد. سپس با توجه به معادله<sup>۱</sup> [۳ و ۴] معادله (۱):

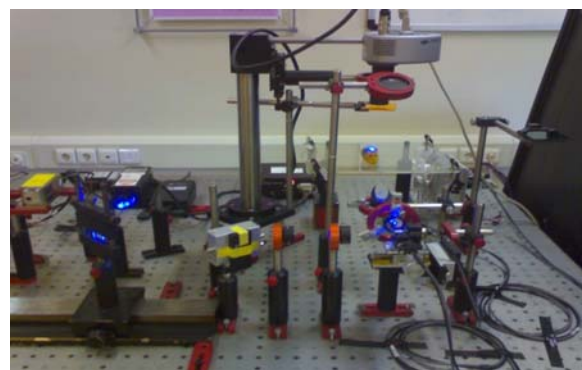
$$Tumor Volume = ((Width^2) \times Length) \times 0.52$$

<sup>2</sup> Full width at maximum height (FWHM)

حساس، دریافت و ذخیره گردد. پس از تهیه تصویر، نسبت کنتراست به نویز تصویر با استفاده از فیلتر میان‌گذر افزایش یافت سپس به تصویر به‌دست آمده منحنی گوسی برازش شد و بیشینه پهنا در نصف ارتفاع ۱ و ارتفاع منحنی به‌دست آمد. FWHM و ارتفاع منحنی به‌عنوان پارامترهای تعیین کننده شدت فلئورسنت محسوب شدند. همزمان با انجام روش‌های پردازش و آنالیز، موش قطع نخاع شد و تومور با دقت زیاد برداشته شد. ابعاد تومور جداشده توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۴ رقم اعشار و کولیس رقمی محاسبه گردید.

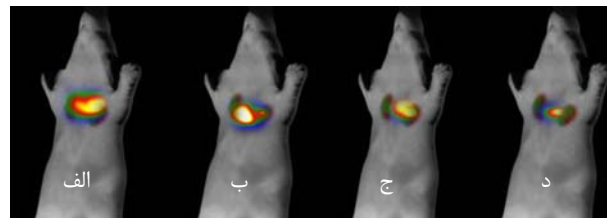
## یافته‌ها

در ابتدا چینش اپتیکی آماده و مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲: چیدمان اپتیکی

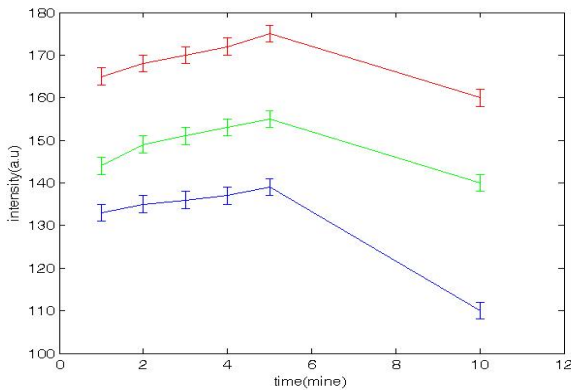
سپس مقدار  $0/02$  میلی‌لیتر از فلئورسین به‌عنوان مقدار بهینه جهت نشاندار کردن تومور تعیین و به مرکز تومور تزریق شد. پس از نشاندار کردن تومور، پرتوی لیزر در حدود ۱ تا ۸ ثانیه به‌طور یکنواخت بافت هدف را مورد تابش قرار داد. سپس شدت فلئورسانت رسیده به سطح بدن موش توسط دوربین CCD بسیار حساس تحت تصویربرداری قرار گرفت (شکل ۳).



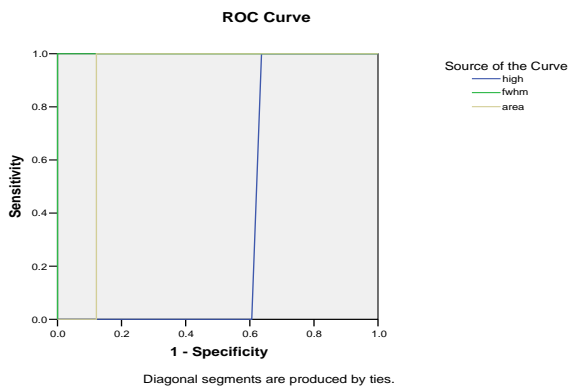
شکل ۳: تصاویر موش تومورال: الف) تومور با اندازه ۸۳ میلی‌متر مکعب، ب) تومور با اندازه ۸۷/۳ میلی‌متر مکعب، ج) تومور با اندازه ۱۳۰/۵ میلی‌متر مکعب، د) تومور با اندازه ۵۱۱ میلی‌متر مکعب

<sup>1</sup> Full Width at Half Maximum (FWHM)

بعد از آنالیز واریانس داده‌ها با توجه به طراحی این پژوهش و طراحی چیدمان مورد نظر برای مشخص نمودن نقطه برش<sup>۳</sup> داده‌ها از منحنی‌های ROC استفاده شد. در این منحنی محور عمودی حساسیت و محور افقی ویژگی می‌باشد. هرچه سطح زیر این منحنی به یک نزدیک‌تر باشد، پاسخ سیستم سامانه تصویربرداری دقیق‌تر است. برطبق شکل ۸ دقیق‌ترین پاسخ، مربوط به تومور با حجم ۹۳ میلی‌متر مکعب است.



شکل ۷: تغییرات شدت فلئورسانس با زمان پس از تزریق ماده فلئورسین در داخل تومور

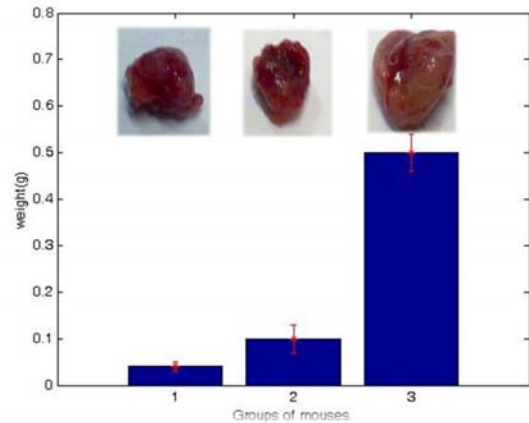


شکل ۸: منحنی ROC برای حجم ۹۳ میلی‌متر مکعب تومور

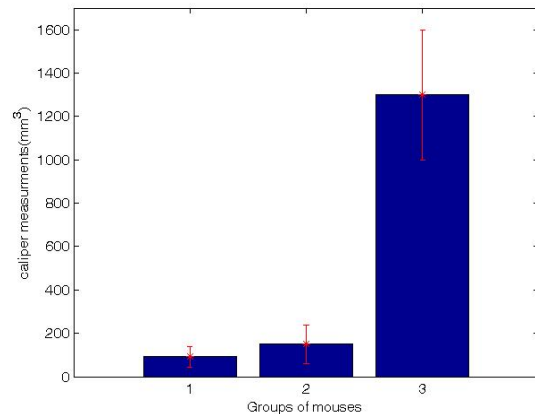
بر طبق جدول ۱ ویژگی برای حجم ۹۳ مترمکعب ۱۰۰ درصد و حساسیت آن ۸۰ درصد می‌باشد.

با توجه به منحنی‌های ROC دریافت شد که حجم تومور بهینه برای انجام این مطالعه ۹۳ میلی‌متر مکعب است و وزن تومور بهینه ۰/۱۲ گرم است. به علاوه در این حجم و وزن بهینه ویژگی و حساسیت به ترتیب ۱۰۰ و ۸۰ درصد می‌باشد. لذا، به دلیل تضعیف زیاد در عمق بیشتر و همچنین نکرور در مرکز تومور، تومورهای خیلی بزرگ مورد بررسی قرار نخواهند گرفت و نیز اندازه تومورها باید از کوچک‌ترین

حجم تومورها محاسبه گردید و طبق آنالیز آماری به دست آمد. با توجه به این اندازه‌گیری حجم در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب  $۸۴ \pm ۴۳/۶$ ،  $۱۵۰ \pm ۸۸/۲$  و  $۶۴۰ \pm ۲۳۹$  میلی‌متر مکعب می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، این نتایج نشان می‌دهد حجم تومور در هر گروه تغییرات زیادی دارد.



شکل ۵: وزن تومور بر حسب گرم در سه گروه تعیین شده



شکل ۶: حجم تومور بر حسب میلی‌متر مکعب در سه گروه تعیین شده

در حین انجام تصویربرداری، تصاویر متوالی بدون جابه‌جایی از موش تهیه شد. به همین‌منظور تصاویر متوالی هر یک دقیقه یکبار تا ۵ دقیقه پس از تزریق ماده فلئورسین در داخل تومور و آخرین تصویر بعد از گذشت ۱۰ دقیقه تهیه شد (شکل ۷) سپس تصاویر مربوطه ذخیره شدند و بیشینه شدت فلئورسانس آن‌ها توسط نرم افزار MatLab محاسبه گردید.

همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود، تغییرات شدت فلئورسنت در هر گروه با توجه به زمان تا لحظه ۵ دقیقه افزایش می‌یابد و بعد از آن شدت فلئورسانس کاهش می‌یابد. این مطلب نشان داد که در زمان ۵ دقیقه شدت ماده فلئورسنت به بیشینه مقدار خواهد رسید.

<sup>3</sup> cut off point

اندازه مورد بررسی تومور در این مطالعه بزرگتر باشد تا ماده فلئورسنت از آن نشت نکند.

جدول ۱: سطح زیر منحنی ROC برای متغیرهای مختلف

متغیرها	مساحت زیر منحنی ROC
ارتفاع	۰/۳۷۹
نصف ارتفاع بیشینه شدت	۱/۰۰۰
مساحت زیر منحنی شدت	۰/۸۷۹

## بحث

کاربرد تصویربرداری نوری در پزشکی در حال گسترش است. به طوری که استفاده از این روش در اندازه گیری غیرتهاجمی فعالیت های فیزیولوژیک، تصویربرداری از حیوانات آزمایشگاهی، بررسی گره های لنفاوی در حین جراحی و تصویربرداری مولکولی فلئورسنت گزارش شده است. در روش اخیر با استفاده از نشانگرهای فلورسنت، تصویربرداری عملکردی در سطوح ژنی، سلولی و ارگان ها میسر شده است. در روش تصویربرداری مولکولی فلئورسنت، ماده فلئورسنت به داخل ضایعه مورد نظر تزریق می شود سپس با تابش پرتوی لیزر، ماده نشاندار مبادرت به تابش پرتوی فلئورسنت می نماید که توسط دوربین حساس CCD دریافت و مورد بررسی قرار می گیرد.

لذا، هدف از انجام این پروژه بررسی کاربرد روش تصویربرداری نوری جهت تعیین همبستگی بین شدت فلئورسانس تابشی و حجم تومور در موش بود.

در سال ۱۹۹۹، مطالعه ای توسط سوئینی و همکاران [۹] جهت ارزیابی غیرتهاجمی سلول های توموری در موش انجام شد. آن ها از سلول های توموری A20 و BCL1 در ارگان های داخلی از قبیل ریه، کبد، گره های لنفاوی و استخوان در موش BALB/c استفاده کردند. اگرچه این سلول های توموری حساسیت بالایی نشان دادند اما، حساسیت آشکارسازی منابع داخلی به پارامترهای زیادی وابسته است. از جمله این پارامترها می توان به سطح بیان لوسی فراز، عمق سلول های نشان دار شده در بدن حیوان (فاصله ای که فوتون ها در بافت باید طی کنند) و حساسیت سیستم آشکارسازی اشاره نمود. لذا، در این مطالعه برای اجتناب از کاهش حساسیت به دلیل عمق سلول های نشاندار از تومورهای زیرجلدی و از دودمان سلولی WEHI-164 برای تومورال کردن موش استفاده شد.

پس از رشد تومورها، گروه بندی صورت گرفت. در این پروژه گروه بندی بر این اساس انجام شد که تومورهای با اندازه مشابه در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که در مطالعه ای که توسط ماساکی [۱۰] انجام پذیرفت، پس از تزریق دودمان سلولی و قبل از اینکه تومور در حیوان ظاهر شود، گروه بندی موش ها به طور تصادفی صورت گرفت.

مزیت نحوه گروه بندی در این مطالعه این است که با توجه به اینکه گروه بندی بر اساس اندازه مشابه صورت گرفته است، لذا تغییرات اندازه تومورها در هر گروه از تغییرات گروه بندی کمتر به صورت تصادفی می باشد.

پس از آماده سازی سامانه تصویربرداری، یکی از نکات مورد توجه این بود که در طول آزمون، تصویربرداری کلیه متغیرهای مداخله گر ثابت ماندند. به طوری که میزان ماده تزریق شده برای کلیه تومورها ثابت نگه داشته شد. لازم به ذکر است که این مقدار بر اساس حساسیت سیستم تصویربرداری تعیین شده بود. ماده پس از تزریق، داخل تومور تجمع کرد و به علت بزرگی اندازه مولکول قادر به ترشح از دیواره ها نبود.

برای پیگیری هدف مطالعه، اندازه گیری بیشینه ارتفاع پروفایل به دست آمده به عنوان معیاری برای ارزیابی حجم تومور تعیین شد. در نتیجه شدت فلئورسنت به دست آمده در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب  $163 \pm 27$ ،  $148 \pm 4$  و  $133 \pm 6$  به دست آمد. نتایج نشان می دهد با افزایش حجم تومور شدت فلئورسانس کاهش می یابد. در مطالعه انجام شده توسط یزدی و همکاران [۶] در سال ۲۰۰۳، شدت بیلومینسانس در محدوده ۱۰۶ تا ۱۰۱۰ بر حسب شمارش بر ثانیه به دست آمد. در سال ۲۰۰۴ نیلز و همکاران [۱۱] در مطالعه ای فعالیت لوسی فراز را با توجه به وزن تومور در محدوده  $106 \times 2/5$  تا  $106 \times 10$  بر حسب شمارش بر ثانیه به دست آوردند.

پس از اتمام تصویربرداری، پروفایل شدت فلئورسنت با توجه به زمان پیک زمانی تجمع فلئورسین در تومور محاسبه گردید. این زمان در این آزمون ۵ دقیقه به دست آمد. به علاوه در سال ۲۰۰۷ در مطالعه انجام شده توسط مارلین کیرتز و همکاران [۷] نیز این مدت زمان  $57 \pm 0.6$  دقیقه بود. همچنین zain paroo در سال ۲۰۰۴ مطالعه ای انجام داد [۱۲] که در آن به جای تزریق ماده فلئورسنت از لوسی فرین جهت بیان آنزیم لوسی فراز استفاده شد. حال آنکه در مطالعه انجام شده توسط زاین پارو، پیک زمانی تجمع لوسی فرین  $12.7 \pm 0.6$  دقیقه بود. علت این امر می تواند این باشد که در مطالعاتی که از مواد فلئورسنت هدفمند استفاده شده است بعد از تزریق، زمانی صرف می شود تا به طور هدفمند به سلول تومورال برسد. چون در این مطالعه تزریق به صورت داخل صفاقی صورت گرفت، لذا زمانی صرف خواهد شد تا این ماده به صورت هدفمند به ناحیه تومورال برسد و سپس در تومور تجمع یابد. نتایج به دست آمده با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده توسط مارلین و زاین پارو همخوانی دارد.

برای به دست آوردن همبستگی از روش آماری اسپیرمن استفاده شد. در این روش پس از آنالیز واریانس اختلاف سه گروه با متغیرهای حجم تومور، وزن، ارتفاع، نصف پهنای ارتفاع و مساحت زیر سطح منحنی به طور مجزا معنی دار به دست آمد. ارزیابی نشان می دهد در گروه اول ضرایب اسپیرمن بین حجم تومور، ارتفاع و مساحت زیر

علاوه بر تمام نتایج، منحنی‌های ROC نیز برای این پروژه به‌دست آمده است این نتایج نشان می‌دهد نقطهٔ برش برای حجم و وزن تومور که بهترین پاسخ را در برداشتند، به‌ترتیب ۹۳ میلی‌متر مکعب و ۰/۱۲ گرم به‌دست آمد. در روش‌های مشابه از روش ROC در هیچ مقاله‌ای استفاده نشده است.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد بین شدت فلئورسنت و حجم و وزن تومور ضریب همبستگی ۰/۵۱ به‌دست آمد. این ضریب نسبت به ضریب همبستگی به‌دست آمده از سایر تحقیقات مشابه، تفاوت بسیار کمی دارد.

سطح منحنی شدت به‌ترتیب ۰/۱۹، ۰/۱۰۳ و ۰/۰۹۱ و در گروه دوم ۰/۵۰۵، ۰/۱۲۶ و ۰/۰۹۱ و در گروه سوم ۰/۲۷۷، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۱۴ همچنین در گروه اول ضرایب اسپیرمن بین وزن تومور، ارتفاع، پهنای نصف ارتفاع و مساحت زیر سطح منحنی شدت به ترتیب ۰/۵۲۴، ۰/۰۹۵ و ۰/۱۳۲ و در گروه دوم ۰/۰۷۱، ۰/۱۲۴ و ۰/۲۲۹ و در گروه سوم ۰/۳۰۹، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۰۴ به‌دست آمد.

مارلین کیرتز و همکاران [۷] در سال ۲۰۰۷ و همچنین دین و همکاران [۳] در سال ۲۰۰۲ برای آنالیز داده‌های به‌دست آمده در مطالعهٔ خود از آزمون t-test استفاده کردند. برخلاف آن‌ها یزدی و همکاران [۶] در سال ۲۰۰۳ از روش ANOVA برای ارزیابی داده‌های مطالعهٔ خود استفاده کردند. در مطالعهٔ حاضر نیز از روش ANOVA برای ارزیابی داده‌ها استفاده گردید زیرا آزمون t-test برای ارزیابی دو گروه مورد آزمون به‌کار می‌رود درحالی‌که برای سه گروه مورد آزمون باید از روش ANOVA استفاده کرد. بنابراین نتایج به‌دست آمده از این پروژه دقت بالایی دارند.

### References

1. Massoud TF, Wang L, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003; 17(5): 545-80.
2. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001; 219: 316-33.
3. Diehn FE, Costouros NG, Miller MS. Noninvasive Fluorescent Imaging Reliably Estimates Biomass in Vivo. *Bio Techniques* 2002; 33: 1250-5.
4. Mette MJ, Jesper TJ, Tina B, Andreas K. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by micro CT is more accurate and reproducible than determined by F-FDG-micro PET or external caliper *BMC Medical Imaging* 2008; 8:16.
5. Feldman JP. A Mathematical model for tumor volume evaluation using two-dimension. *Journal of applied quantitative methods* 2009; 4(4): 55-62.
6. Sharafyazdi SH, Jing M, Mark W, Bryan M. Use of in vivo bioluminescence imaging to predict hepatic tumor burden in mice *JSR journal of surgical research* 2004; 120(2): 249-55.
7. Keyaerts M, Vanhove C, Caveliers V. Dynamic bioluminescence imaging for quantitative tumour burden assessment using IV or IP administration of D-luciferin: effect on intensity, time inetics and repeatability of photon emission *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(5): 999-1007.
8. Yiyong T, Hyabei J. Diffuse optical tomography guided quantitative fluorescence molecular tomography. *Appl Opt* 1995; 48: 38-40.
9. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12044-9.
10. Masaki N, Takeshi Y, Shinya K. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different invivo models *Cancer lett* 2005; 217(2): 243-53.
11. Smakman N, Martens A, Kranenburg O. Validation of Bioluminescence Imaging of cololrectal Liver Metastases in the Mouse. *Journal of Surgical Research* 2004; 122: 225-30.
12. Zain p, Robert A. Bollinger validating bioluminescence imaging as a high-throughput, Quantitative modality for assessing tumor burden molecular imaging 2004; 3(2): 117-24.