

**AGYI VÍZMOLEKULÁK ÉS AGYI METABOLITOK
VIZSGÁLATA IN VIVO MAGMÁGNESES REZONANCIÁS
KISÉRLETEKKEL**

Ph.D. tézis

Dr. Schwarcz Attila



Témavezető: Prof. Dr. Dóczi Tamás

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Idegsebészeti Klinika
2004

Előszó

A magmágneses rezonanciás (NMR) technikák elsajátítását 1999-ben kezdtem a PTE Orvostudományi Kar PhD hallgatójaként. Első eredményeim patkány illetve egér agyban történő *in vivo* víztartalom mérésről szóltak. A tanulmány alatt módomban állt a mikroképalkotás és az *in vivo* NMR proton spektroszkópia alapjait elsajátítani. Ezt követően 9 hónapon át diffúzió súlyozott képalkotással foglalkoztam szintén kisállat modellben a franciaországi Nemzeti Tudományos Kutató Központ gyf-sur-Yvette-i laboratóriumában. Az eddig megismert NMR technikák repertoár-ját egy göttingeni, németországi 10 hónapos ösztöndíj segítségével bővítettem, ahol egerek agyában kvantitatív lokalizált proton NMR spektroszkópiás méréseket végeztem. A fent említett négy tanulmányból négy tudományos közlemény született, melyek közül hármat a legmagasabb impakt faktorú NMR-rel foglalkozó lapban a *Magnetic Resonance in Medicine*-ben publikáltunk.

Továbbiakban, Magyarországon először a Pécsi Diagnosztikai Központban található humán MR készüléken *in vivo* agyi víztartalom mérési szekvenciát állítottam be betegek vizsgálatára. Ez utóbbinak a koponyaúri nyomás csökkentésére irányuló, adekvát terápia megválasztásában lenne jelentősége az agyi víztartalom *in vivo*, non-invazív monitorizálásával.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a PhD dolgozatomhoz szükséges munkában közreműködő és segítséget nyújtó személyeknek.

Köszönöm témavezetőm, Dóczi Tamás professzor úr folyamatos, lelkes támogatását és értékes javaslatait, melyek alapvető mértékben hozzájárultak a dolgozat illetve a tudományos közlemények megszületéséhez.

Hálás köszönet illeti Gallyas Ferenc professzor urat a támogatásért és a számos elmélyült beszélgetésért, melyek segítségével a központi idegrendszerrel alkotott képem nagy mértékben kibővült.

Köszönöm Sümegi Balázs professzor úrnak a lehetőséget, hogy intézetében az *in vivo* NMR méréseket elvégezhessem, az ő támogatása is alapvetően hozzájárult a PhD dolgozat megszületéséhez.

Köszönöm továbbá Berente Zoltán, Bogner Péter és Ósz Erzsébet türelmét, melyet az NMR alapjainak áldozatos tanítása során nyújtottak, az ő támogatásuk, lelkesedésük egész munkám során elkísért.

Hálával tartozom Jean-Claude Beloeil professzor úrnak és munkatársainak, Philippe Meric, Brigitte Gillet, Jean-Loup Correze, a franciaországi gyf-sur-Yvette-i NMR laboratóriumban, hogy tovább csiszolták a spinek csodálatos világáról alkotott tudásomat.

Külön köszönet illeti Jens Frahm professzor urat, aki világhírű göttingeni laboratóriumában fogadott egy akadémiai évre. Munkatársaival, Oliver Natt, Takashi Watanabe, Thomas Michaelis, bevezetett az *in vivo* NMR spektroszkópia világába, továbbá az NMR képalkotás bonyolult fizikai összefüggéseivel megismertetett.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom odaadó szeretetét és folyamatos támogatását.

Bevezető

A magmágneses rezonanciás (NMR) vizsgálatok külföldön a diagnosztika mellett már alapvető szerepet játszanak az agy patológiás folyamatainak feltérképezésében, addig Magyarországon, főleg a készülékek nagy leterheltsége miatt, csak az alapvető rutin diagnosztikus mérésekre nyílik lehetőség. Ily módon a magyar neuroradiológia NMR technikákkal foglalkozó területe, kísérletezésre alkalmas készülékek híján, nagymértékben elmaradt a világ élvonalától. 1999-ben a Pécsi Tudomány Egyetem Biokémiai Intézete képalkotásra is alkalmas nagy térerejű (9,4 Tesla) NMR készülék megvételére kapott lehetőséget, így megkezdődhetett a magyarországi úttörő munka a kísérletes *in vivo* NMR alkalmazások területén.

In vivo agyi víztartalom meghatározás

A különböző eredetű és típusú agyoedemák pontos diagnosztizálása napjainkban is sok esetben nehézségekbe ütközik. Az oedema kvantitatív mérése non-invasív módszerrel illetve a következményes intracranialis nyomásemelkedés non-invazív monitorizálása ma is megoldatlan problémát jelent. A pontos víztartalom mérés hiányában, a vizenyő csökkentésére irányuló terápiás beavatkozások ma sajnos empirikusak. Kísérletes feltételek között több laboratóriumi módszer is rendelkezésre áll víztartalom mérésére - hagyományos kiszáritásos technikák,

gravimetriás módszerek – ezek azonban invazivitásuk miatt embereken csak egészen speciális esetekben, s akkor is retrospektív módon, alkalmazhatók.

A computer tomográfias (CT) vizsgálat volt az első képalkotó eljárás mely pontosabb képet nyújtott a víztöbblet megjelenéséről a szövetben, de a CT kép keletkezésének mechanizmusából fakadóan alábecsült az elváltozás víztartalma.

A magmágneses rezonancián alapuló képalkotás megjelenése (MRI) egy nagy érzékenységgű, non-invasív módszert bocsát rendelkezésre a víztartalom növekedés illetve az oedema megjelenítésére, kvantifikálására.

Elsőként *in vitro* preparátumon patkányagyban mutatták ki a longitudinális relaxáció sebességének ($1/T_1$) a víztartalom (W) növekedésével együtt járó csökkenését. A kilencvenes évek végére lehetővé vált, igaz hosszabb vizsgálati idő alatt, T_1 térkép készítése emberi agy egy szeletéről *in vivo*. Ezek után a mátrix T_1 értékeit víztartalommá konvertálva előáll a “víz-térkép”.

Az agyi víztartalom mérésével kísérleti állatokban a kórosan emelkedett víztartalmat csökkentő gyógyszerek kipróbálására nyílik lehetőség.

Diffúzió súlyozott képalkotás

Stejskal és Tanner 1965-ben írta le elsőként, hogy oldatokban térgradiensek és statikus mágneses tér alkalmazásával az oldott molekulák diffúziója jellemezhető. Majd a nyolcvanas évek elején magmágneses rezonancián alapuló képalkotás (DWI) elterjedésével fedezték fel, hogy a DWI igen érzékeny

módszer a stroke folyamán bekövetkező sejt-szövetkárosodás pontos lokalizációjára. Majd egyre több féle pathológiás állapotban sikerült kimutatni rendkívüli érzékenységet, nevezetesen epilepsziában, sclerosis multiplexben, különböző eredetű gyulladásos folyamatokban és koponyatraumában. A nagymértékben elterjedt alkalmazás és a széleskörű alapkutató ellenére ma sem ismerjük pontosan a DWI mechanizmusát az agyszövetben. Több elképzelés is született arra vonatkozóan hogy a DWI erős diffúziós súlyozással képes lehet arra hogy az agyi extra és intracelluláris tereket non-invasív módon mérje.

In vivo spektroszkópia

Az mágneses rezonancián alapuló spektroszkópia (MRS) egyedülálló eszköz egyes agyi metabolit szintek és ezek abszolút koncentrációinak meghatározására. Bizonyított tény hogy szövet károsodás következtében fellépő laktat acidosis, már a noxiát követő percek belül, MRS-sel pontosan jellemezhető és a szöveti laktat koncentrációja *in vivo* mérhető. Továbbá az N-acetyl-aspartat, mely kizárólag az idegsejtekben fordul elő, *in vivo* mért koncentrációja prognosztikai jelentőségű stroke-ban és feltételezhetően koponyatraumában is. A spektroszkópiai méréssel nyert metabolitok aránya/koncentrációja meghatározza a daganat dignitását, „szövetani” diagnózis nyerhető *in vivo*, biopsia nélkül.

A transzgenikus technológia elterjedésével az egerekben előidézett pathológiás állapotok genetikai háttere jobban feltérképezhető. A molekuláris biológiai módszerek mellett nagy igény lenne egy non invazív vizsgálómódszerre is transzgenikus egerekben, azonban igen nagy technikai kihívást jelent az MRS alkalmazása egerek agyában, a kis voxel méretből eredő alacsony jel/zaj viszony miatt.

Célkitűzések

1. *In vivo* víztartalom mérés kidolgozása hidegsértéssel előidézett, agyödémás egerek agyában longitudinális relaxáció (T1) és equilibrium mágnesezettség meghatározásának segítségével.
2. Az irodalomban illetve az első kísérletsorozatban T1 és víztartalom mérésére használt nagy időigényű MRI szekvencia (inverzió visszatérítéses spin echo) kiváltása spektroszkópiai méréssel. A spektroszkópiai módszer segítségével T1 és következményes víztartalom lenne mérhető 1-2 percen belül, ellentétben a standard képalkotási szekvenciával, ahol ugyan ez kb. fél órát vesz igénybe.
3. A széles körben elterjedt *in vivo* víz diffúzió súlyozott képalkotás mechanizmusának tisztázása a kompartmentalizációval kapcsolatban. A diffúziósúlyozás erősségével arányos, biexponenciálisan lecsengő NMR jel analízisét végezzük el, olyan biológiai szövetben/szövetmodellben, ahol hiányzik a természetes kompartmentalizáció azaz az extra és intracelluláris tér.
4. Transzgenikus egerekben kiváltott patológiás agyi állapotok vizsgálatára alkalmas *in vivo*, kvantitatív NMR spektroszkópiás módszer kidolgozása. Vizsgáljuk továbbá a C57BL/6 egértörzs irodalomból ismert fokozott érzékenységét agyi ischemiában.

5. A Pécsi Diagnosztikai központban található klinikai, képalkotó NMR készüléken gyors T1 és víztartalom mérési szekvencia beállítása emberi agyban. Így az agyödéma csökkentésére irányuló (mai napig empirikus!) terápia nyomon követhető klinikai körülmények között.

Eredmények

1. *In vivo* víztartalom mérés egéragyban

Vasogen agy oedemát utánozó állapotot hoztunk létre egerekben az agyszövet fagyasztásos sérülésével. NMR képalkotás segítségével a víz longitudinális relaxációs idejét és a kép egy-egy téregységében található nyugalmi összes mágnesezettségét mértük élő állatokban. A vizsgálat után az oedemás és a normál agyszövet víztartalmát kiszáritással határoztuk meg. A mért NMR paraméterek, nevezetesen a longitudinális relaxációs idő és a nyugalmi összes mágnesezettség, és a kiszáritással mért víztartalmak között egyenes arányosságot találtunk igen szoros arányossági együtthatóval ($r > 0.98$). Továbbá a tiszta víz nyugalmi mágnesezettség értéke is követte az egyenes arányosság során kapott egyenletet. Így egy kalibrációs egyenes állítható fel a nyugalmi mágnesezettség és a víztartalom között, melynek segítségével az állatokban mért nyugalmi mágnesezettség érték közvetlenül víztartalom értéknek feleltethető meg. Az általunk alkalmazott módszer segítségével egerekben kb. fél óra alatt egy agyszeletben, melynek felbontása 195x97 mikrométer, víztartalom mérhető és ezáltal új, agyoedemát csökkentő gyógyszerek kipróbálására van lehetőség.

2. *In vivo* víztartalom mérés patkányagyban spektroszkópiás módszerrel

Második kísérletsorozatban a víztartalom meghatározásához szükséges időt kívántuk csökkenteni, hogy a kidolgozott módszer a klinikai gyakorlatban is használható legyen. Patkányokban hoztunk létre vasogen agyoedemát a fent említett módon, a normál és az oedemás agyterült víztartalmát hasonlóan kiszáritással határoztuk meg. Az oedemás és a normál agyterületben képalkotással kb. fél óra alatt és lokalizált spektroszkópiával kb. 2 perc alatt longitudinális relaxációs időt mértünk élő állatokban. A két módszer alapvető különbsége a mérési idő mellett, hogy képalkotó módszerrel egy agyszelet mikrométeres felbontású téregységeiben tudunk longitudinális relaxációs időt mérni, addig lokalizált spektroszkópiával ez a paraméter egy tetszőleges, milliméteres nagyságrendű téregységben határozható meg. A két módszerrel mért víz longitudinális relaxációs ideje és kiszáritással meghatározott víztartalmak között szoros lineáris arányosságot ($r = 0.96$) tapasztaltunk. A kalibrációs egyenes segítségével patkányokban az agy egyes területein 2 perc alatt víztartalom mérhető. Mivel hasonló kalibrációs egyenes alacsonyabb térerőn is rendelkezésre áll, így az általunk kidolgozott lokalizált spektroszkópiás módszerrel a klinikai gyakorlatban is percekben belül víztartalom mérhető agyoedemás betegekben.

3. Kompartmentalizáció szerepe a diffúzió súlyozott képalkotásban

Intakt és fagyasztással roncsolt egerek agyában mértük biexponenciális jelanalízissel a lassú és gyors diffúziójú víz molekulák arányát. A két különböző diffúziójú vízpopulációt eddig az extra és intracelluláris terekkel hozták összefüggésbe. Továbbá vízmolekulák diffúzióját meghatároztuk centrifugált vörösvértest szuszpenzióban is, ahol az extracelluláris teret az erős centrifugálásnak köszönhetően elimináltuk. Meglepő módon mind a két mintában, ahol a kompartmentalizáció hiányzott, nevezetesen a fagyasztással roncsolt egér agyban és a centrifugált vörösvértest szuszpenzióban, továbbra is egy lassú és egy gyors diffúziójú vízpopulációkat képviselő NMR jelet tudtunk detektálni. A fagyasztás egér agyat roncsoló hatását, a kompartmentalizáció eliminációját, elektronmikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk. Így megállapíthatjuk, hogy a víz diffúzió súlyozott képképzés során tapasztalt lassú és gyors diffúziójú vízpopuláció nem feleltethető meg az extra és intracelluláris tereknek, ahogyan az az irodalomban általánosan elfogadott volt. Hipotézisünk szerint a két különböző sebességgel diffundáló vízpopuláció, kötött és szabad állapotban található vízmolekulákat képvisel.

4. Kvantitatív lokalizált spektroszkópia egéragyban

C57Bl/6, Balb/C és NMRI egér törzsekben vizsgáltuk a nyugalmi agyi metabolit koncentrációkat *in vivo* NMR spektroszkópiával. A metabolitok kvantifikációját a spektrum egyes csúcsainak integrálásával végeztük. A görbe alatti terület

arányos a jelet kibocsátó spinek számával így arányos a koncentrációval. A három vizsgált egér törzsben egymáshoz viszonyítva az agy nyugalmi metabolit koncentrációi között nem volt szignifikáns különbség. Az *in vivo* mérést követően a mágnesben elhelyezkedő állatot izoflurán túladagolással feláldoztuk és még egy órán keresztül agyi proton spektrumokat nyertünk az ischémiás szövetben végbemenő változások nyomon követésére. A Balb/C és NMRI egerek esetében a nyilvánvaló glükóz és lactat változások mellett a mérhető metabolitok koncentrációja nem változott *post mortem* az első órában. A C57BL/6 egerek esetében az N-acetyl-aszpartát, creatin és cholin szintje is szignifikánsan csökkent. Megállapíthatjuk, hogy a C57BL/6 egér törzs agyi ischémiában tapasztalt fokozott érzékenységeért a circulus Willis-i eltérő anatómiája mellett intrinzik metabolikus tényezők is felelősek.

5. *In vivo* víztartalom mérés humán agyban

Egészséges önkénteseken egy optimalizált turbo-FLASH szekvencia segítségével humán agyi víztartalom mérésre alkalmas módszert dolgoztunk ki. Az önkéntesek agyáról 10 mm vastag durván $2 \times 2 \text{ mm}^2$ felbontású T1 súlyozott képeket készítettünk mindössze 2 perc alatt. MatLab software segítségével T1 térképet majd víztérképet nyertünk a T1 súlyozott képekből, ahol a kép minden egyes pixele a megfelelő terület valós víztartalmát mutatja. A humán agy egyes területein (cortex, corpus callosum, thalamus, putamen, nucleus caudatus) mért

víz-tartalom és T1 értékek megfeleltek az irodalmi adatoknak. A kidolgozott módszer segítségével az agy-oedema csökkentésére irányuló terápia pontos, gyors, non invazív mérés-sel nyomon követhető, a hatástalan terápia módosítható.

PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Schwarcz A, Berente Z, Osz E, Doczi T. In vivo water quantification in mouse brain at 9.4 Tesla in a vasogenic edema model. *Magn Reson Med* 2001;46:1246-1249 IF: 3.437

Schwarcz A, Berente Z, Osz E, Dóczi T. Fast in vivo water quantification in rat brain edema based on T1 measurement at high magnetic field. *Acta Neurochir* 2002;144:811-815 IF: 0.779

Schwarcz A, Watanabe T, Natt O, Boretius S, Frahm J, Michaelis T. Localized proton MRS of cerebral metabolite profiles in different mouse strains. *Magn Reson Med* 2003;49:822-827 IF: 3.25

Schwarcz A, Bogner P, Meric P, Correze JL, Berente Z, Gallyas F, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC. The existence of biexponential signal decay in magnetic resonance diffusion weighted imaging seems to be independent of compartmentalization. *Magn Reson Med* 2004;51:278-285 IF: 3.25

Egyéb közlemények:

Doczi T, **Schwarcz A**. Epidural mass. *J Neurosurg* 2003;99:617-618. IF: 2.626

Doczi T, **Schwarcz A**. Correlation of apparent diffusion coefficient and computed tomography density in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003;34:17-18. IF: 5.176

Gallyas F, **Schwarcz A**. Necrotic-like removal of apoptotic granule neurons from the rat dentate gyrus. *Acta Neuropathol* 2004 (submitted for publication)

Előadások:

Schwarcz A, Hollósy T. Circadian biológiai ritmus vizsgálata csirke tobozmirigy modellen. Házi TDK konferencia, February 20, 1999, Pécs, Hungary

Schwarcz A, Hollósy T. Circadian biológiai ritmus vizsgálata csirke tobozmirigy modellen. Országos TDK konferencia, April 1, 1999, Budapest, Hungary (Special Award of Richter Gedeon Chemical Factory)

Csernus V, **Schwarcz A**, Hollósy T, Mess B. A cAMP szerepe madár tobozmirigy in vitro ritmikus melatonin elválasztásának szabályozásában. Magyar Anatómiai Társaság Kongresszusa, May 22-23, 1999, Budapest, Hungary

Schwarcz A, Berente Z, Ósz E, Dóczi T. In vivo water quantification of rat brain at 9,4 Tesla in a vasogenic edema model. *CNS Injury Pannonian Symposium*, August 17-20, 2000, Pécs, Hungary

Bogner P, **Schwarcz A**, Berente Z, Reglodi D, Répa I. MR imaging of different brain edema models in rats at 9.4 Tesla (400 MHz). Tenth, Jubilee Congress of Hungarian Society of Neuroradiologists, September 21-23, 2000, Budapest, Hungary

Schwarcz A, Berente Z, Ösz E, Dóczy T. In vivo víz tartalom mérése patkány agyban egy vasogen oedema modellben. Magyar Tudományos Akadémia NMR Szekció Ülése, August 30-31, 2001, Pécs, Hungary

Bogner P, **Schwarcz A**, Berente Z, Dóczy T, Beloeil J-C. The origin of compartments in diffusion MR imaging: an in vivo and in vitro model. 3rd Congress of the Croatian Society of Radiology. June 5-8, 2002, Split, Croatia

Schwarcz A, Berente Z, Bogner P, Ösz E, Méric P, Gillet B, Beloeil JC, Doczi T. Role of NMR in the research of experimental brain edemas. 37th Congress of the European Society for Surgical Research, May 23-25, 2002, Szeged, Hungary

Schwarcz A, Bogner P, Méric P, Corrèze JL, Berente Z, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC. Evolution of compartmentalisation of water diffusion in mouse brain after ischemia and cold injury. 19th Annual Meeting of ESMRMB, August 22-25, 2002, Cannes, France

Schwarcz A, Watanabe T, Natt O, Boretius S, Michaelis T, Frahm J. Kvantitatív lokalizált proton spectroscopia globális agyi ischemiában különböző egértörzsekben. Magyar Neuroradiológiai Társaság XII. Kongresszusa, September 25-27, 2003, Dobogókő, Hungary

Schwarcz A, Kövér F, Bogner P, Vadon G, Dóczy T. T1 térkép és víztérkép előállítása betegeken mágneses magrezonanciás képalkotás segítségével: előzetes eredmények. Magyar Neuroradiológiai Társaság XII. Kongresszusa, September 25-27, 2003, Dobogókő, Hungary

Bogner P, Miseta A, Berente Z, **Schwarcz A**, Repa I. A fehérje hidráltás és vízkötöttség hatása a víz diffúziójára: human-teve eritrocita modell. Magyar

Neuroradiológiai Társaság XII. Kongresszusa, September 25-27, 2003, Dobogókő, Hungary

Schwarcz A, Berente Z, Ósz E, Pál J, Kövér F, Dóczi T. In vivo nuclear magnetic resonance studies for water quantification: experimental and human applications. Joint meeting of German and Hungarian Neurosurgical Society, April 25-28, 2004, Köln, Germany

Poszterek:

Csernus V, **Schwarcz A**, Mess B. The role of cAMP-mediated intracellular mechanisms in the control of the circadian melatonin release from explanted chicken pineals. Annual Meeting of Pineal Society, July 17-18, 1999, Tours, France

Schwarcz A, Bogner P, Méric P, Corrèze JL, Berente Z, Doczi T, Gillet B, Beloeil JC. Evolution de la compartimentalisation de la diffusion de l'eau dans le tissu cérébral de la souris après ischémie et traumatisme thermique. Conséquences pour la signification physiologique des différentes composantes de la diffusion cérébrale. Symposium on Brain Edema, May 27-29, 2002, Lausanne, Switzerland

Natt O, **Schwarcz A**, Watanabe T, Boretius S, Frahm J, Michaelis T. Localized proton MRS of cerebral metabolite profiles in different mouse strains. International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 11th Scientific Meeting and Exhibition, May 10-16, 2003, Toronto, Canada