

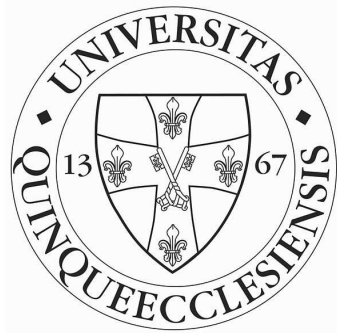
**Investigation of the hyponatremic brain edema, and
the involvement of epithelial sodium channels
in its evolution:**

Steier Roy, M.D.

Ph.D Thesis

**Department of Neurosurgery
University of Pécs, Medical School
Pécs, Hungary
2012**

**Supervisors: Prof. Dóczi Tamás, M.D., Ph.D., D.Sc.
Schwarcz Attila, M.D., Ph.D.**



Abbreviations:

ADC:	Apparent diffusion coefficient.
AVP:	Arginine vasopressin.
BBB:	Blood brain barrier.
CCD:	Cortical collecting duct.
Cho:	Choline.
Cr:	Creatine.
CSF:	Cerebrospinal fluid.
CV:	Coefficient of variation.
DWI:	Diffusion weighted imaging.
ENaC:	Epithelial sodium channel.
EM:	Electron microscopy.
EPI:	Echo planar imaging.
HN:	Hypernatremia.
HNB:	Hyponatremia + ICV Benzamil.
HNS:	Hyponatremia + ICV Saline.
ICV:	Intracerebroventricular.
IP:	Intraperitoneal.
MRI:	Magnetic resonance imaging.
MRS:	Magnetic resonance spectroscopy.
mT/m:	Militesla/meter.
NAA:	N-acetyl-aspartate.
NN:	Normonatremia.
NNB:	Normonatremia + ICV Benzamil.
PRESS:	Point resolved spectroscopy sequence.
RF:	Radio frequency
ROI:	Region of interest.
RVD:	Regulatory volume decrease.
SNR:	Signal to noise ratio.
SPAIR:	Spectral attenuated inversion recovery.
SD:	Standard deviation.
T:	Tesla.

I. INTRODUCTION:

1. Brain edema:

1.1. Brain edema - General:

Brain water homeostasis is imperative for the normal functioning central nervous system (CNS). Brain edema involves abnormal water accumulation in the brain. According to the “Monro-Kellie principle, the brain, cerebrospinal fluid (CSF) and the brain’s blood compartment are encased within the bony cranium of the skull and relatively rigid dura. An increase in any of these compartments comes at the “expense” of the others. In the event of brain swelling, due to brain edema, intracranial pressure (ICP) increases. Initially, the brain tries to counter-act this by shifting of CSF and decreasing of the blood compartment. In case that the insult causing the brain edema is so great, these compensatory mechanisms eventually fail and the ICP continues to rise. This can lead to cerebral herniations, which may result in death. Brain edema may be caused by a variety of pathologies. These include stroke, brain tumors, traumatic brain injury, systemic hyponatremia, hydrocephalus, infections, etc.

Brain edema was originally classified into cellular (cytotoxic) and vasogenic subtypes, though hydrocephalic and osmotic types of brain edema are also known.

Cellular brain edema is viewed in the event of an early stroke and hyponatremia. The intracellular (IC) compartment swells as water accumulates within the cells. On the other hand, in vasogenic brain edema, usually caused by brain tumors or brain abscesses, the extracellular (EC) compartment swells. This occurs due to increased movement of plasma proteins and water in to the EC space, permitted by a malfunctioning blood brain barrier (BBB). In the clinical practice however, more than one type or subtypes of brain edema can be present at a given time in a given pathology.

1.2. Hyponatremic brain edema:

Hyponatremia is one of the most common electrolyte disorders in hospitalized patients. During acute hyponatremia, in response to the hyponatremic stress, more and more water shifts into the intracellular space (IC). This causes cellular cerebral edema, which manifests the most important symptoms of this pathology. The ambiguous nature of acute hyponatremia and its inappropriate correction can result in life threatening conditions.

2. The brain’s response to hyponatremic challenge:

The initial response of brain cells to hypo-osmotic stress is swelling which is directed by water diffusion across cell membranes according to the concentration gradient. This in turn, is followed by a complex process aiming to restore the cells to their original volume regardless of the ongoing hypo-osmotic conditions. This process is known as regulatory volume decrease (RVD).

2.1. Regulatory volume decrease (RVD):

The chain of events making up RVD takes place in three stages. Initially a sensor detects a shift in the cell volume. This information then triggers signaling cascades which result in activation of several membrane channel proteins including swelling-activated Cl^- channels, stretch-activated, voltage-gated K^+ channels, Ca^{++} -dependent K^+ channels and neutral K^+/Cl^- co-transporters. Activation of ion channels induces cellular efflux of K^+ and Cl^- ions and organic osmolytes. At the conclusion of this reaction, it is the memory of the original cell volume that brings RVD to its end.

2.2. Epithelial sodium channels and Benzamil:

Epithelial Na channels (ENaC) are members of the ENaC/degenerin family of ion channel proteins. ENaCs are present in a variety of body tissues. These include the brain, kidney, urinary bladder, lungs, salivary and sweat gland ducts as well as in the distal colon.

Trans-epithelial sodium transport is a two-step process: initially Na enters the cell via amiloride-sensitive ENaCs located on the apical membrane of the cell. Then, using the Na-K-ATPases found at the baso-lateral membrane, the cell extrudes the Na.

Niisato et al. demonstrated that exposure of A6 cell monolayer to hypotonic stress increases cellular sodium uptake via translocation of preformed ENaC protein from the cytosolic store into the membrane and/or via generation of new channel proteins. The hypotonicity-stimulated transport could be completely inhibited by Benzamil, a specific Na channel blocker.

3. MRI:

Magnetic resonance imaging (MRI) is a technique that externally measures the nuclear magnetic resonance (NMR) signals originating from the subject, giving information about its internal structural anatomical as well as chemical composition.

In the case of small animal experiments, using the MR machine is superior to classical in-vitro techniques since the evolution of a given pathology can be studied in real time and in-vivo.

3.1. Diffusion weighted imaging (DWI):

MRI may be utilized to investigate microscopic water motion in the brain. Intra and extracellular diffusion coefficients as well as modifications in cellular volume fractions, are believed to influence the apparent diffusion coefficient (ADC).

In vasogenic edema, an increase of the extracellular volume fraction is implicated in the elevation of ADC. On the other hand, in cellular edema, it is believed that increased extracellular tortuosity and translocation of protons from a faster diffusing extracellular compartment into the slower diffusing intracellular space, contribute to the ADC decrease seen in this type of edema.

Finer changes of water motion become detectable as we measure with larger b-factors.

At high b-values the ADC becomes multi-exponential. Using a bi-exponential mathematical model, this decay can be interpreted as the sum of the fast (ADC_{fast}) and slowly (ADC_{slow}) diffusing components.

3.2. Magnetic resonance spectroscopy (MRS) - water signal:

Hydrogen protons are influenced by the chemical environment of the macromolecules in which they reside. In normal spectroscopy, due to this chemical shift, certain metabolites are resonating at different characteristic frequencies. Since the proton signal is much higher than the metabolites signals, we usually must suppress the water signal. By not suppressing the water signal, and eliminating other influencing factors, it is hypothesized that the integral of the water signal will be proportional to the number of protons in it, thereby estimating the amount of water present within the measured voxel.

II. AIMS:

The aim of our study was to better understand the process taking place during brain edema and find new and better ways for diagnosing and treating the hyponatremic brain edema in particular. Our hypothesis was that ENaC and sodium flux into the cells might be involved in the initiation and propagation of brain water accumulation in severe hyponatremia.

1. The initial goal was to test whether Benzamil hydrochloride, a specific ENaC blocker, has an effect on brain edema, and whether it has the power to decrease the hyponatremic edema.
2. The secondary aim was to develop a modality that would allow us to investigate brain edema and the effects of Benzamil hydrochloride in an in vivo experiment. For this task MRI was chosen. The advantage of using MRI is that the brain edema can be followed in the in vivo setting. In order to achieve this goal, the methodology that would allow us to scan small animals as test subjects had to be developed.
3. The tertiary goal of the research was to advance our knowledge about the initiation and propagation of the hyponatremic brain edema, as well as the dynamic effects of Benzamil treatment on it.
4. Another aim of the research was to better understand the background behind MR related observations of water movements in brain edema. The goal was to develop a new method to measure the hyponatremic brain edema, by using DWI biexponential analysis in an in vivo intracellular brain edema model.

II. Materials and methods:

1. Benzamil prevents water accumulation in hyponatremic rats:

Four groups of male Wistar rats were studied (n=13 in each group). Animals in group I with normonatremia received intracerebroventricular (ICV) 0.9% NaCl; animals in group II-IV were made hyponatraemic by intraperitoneal administration of 140 mmol/l dextrose solution in a dose of 20% per body weight. Rats were pretreated with ICV 0.9% NaCl (group II), 120 µg arginine vasopressin (AVP) (group III) or 4 µg benzamil-hydrochloride (group IV). Plasma sodium (ion selective electrode) plasma osmolality (vapour pressure osmometer) and brain sodium and potassium content (flame photometer) as well as brain water content (desiccation method) were measured after a 2-h hydration period.

2. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3T clinical MR scanner:

Eight Wistar rats (three females, five males) were used as test subjects. For the evaluation of the DWI mono- and biexponential approaches (b-value up to 6000 s/mm²) were used. Proton spectroscopy was performed using water as an internal reference. The rat brain was also scanned at a microscopic resolution of 130×130×130 µm³.

3. The influence of Benzamil hydrochloride on the evolution of hyponatremic brain edema as assessed by in vivo MRI study in rats:

Five groups of male Wistar rats were studied as follows: normonatremic, native animals (group NN, n=7), hyponatremic animals (group HN, n=8), hyponatremic animals treated with ICV benzamil (group HNB, n=8), hyponatremic animals treated with ICV saline (group HNS, n=5) and normonatremic animals treated with ICV benzamil (group NNB, n=5). Hyponatremia was

induced as mentioned above. Benzamil hydrochloride (4 μ g) was injected ICV to treated animals. MRI was applied to perform serial DWI to measure ADC and MRS to determine water signal. Serum sodium and potassium (ion selective electrode) as well as plasma osmolality (vapor pressure osmometer) were determined.

4. A biexponential DWI study in rat brain intracellular edema:

Intracellular edema was induced in ten male Wistar rats by way of water load, as mentioned above. A 3T MRI instrument was used to perform serial DWI, and MRS (water signal) measurements. Following the MR examination the brains of the animals were analyzed for electron microscopy, while serum sodium, potassium and plasma osmolality were determined as mentioned above.

III. Results:

1. Benzamil prevents water accumulation in hyponatremic rats:

Plasma sodium, osmolality and tissue sodium and potassium contents were markedly depressed in hyponatraemic rats (group II-IV, $p < 0.0005$ for each group) irrespective of drug pretreatment. Brain water content, however, responded to hyponatremia with an increase from $77.55 \pm 1.00\%$ to $78.45 \pm 0.94\%$ ($p < 0.01$), and it was further augmented to $79.35 \pm 0.80\%$ ($p < 0.0005$) by ICV AVP pretreatment. By contrast, benzamil administration prevented the rise of brain water caused by hyponatraemia ($77.61 \pm 1.04\%$).

2. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3T clinical MR scanner:

Diffusion-weighted imaging yielded accurate diffusion coefficient measurements throughout the b-value range. MRS of visible metabolites was carried out with acceptable accuracy. High-resolution T₂ weighted image achieved a microscopic resolution of $130 \times 130 \times 130 \mu\text{m}^3$

3. The influence of Benzamil hydrochloride on the evolution of hyponatremic brain edema as assessed by in vivo MRI study in rats:

During the course of hyponatemia, ADC declined steadily from the baseline (100%) to reach a minimum of $92.32 \pm 3.20\%$ at 90 min ($p < 0.0005$). This process was associated with an increase in water signal to a maximum of $5.95 \pm 2.62\%$ at 100 min ($p < 0.0005$). After pretreatment with benzamil, no consistent changes occurred either in ADC or in water signal.

4. A biexponential DWI study in rat brain intracellular edema:

Following the water load induction, ADC values started declining from $724 \pm 43 \mu\text{m}^2/\text{s}$ to $682 \pm 26 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0.0001$). ADC-fast values dropped from 948 ± 122 to $840 \pm 66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0.001$). ADC-slow showed a decrease from 226 ± 66 to $191 \pm 74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0.05$). There was a shift from the slow to the fast component at 110 min time point. The percentage of the fast component demonstrated moderate, yet significant increase from $76.56 \pm 7.79\%$ to $81.2 \pm 7.47\%$ ($p < 0.05$). The water signal was increasing by $4.98 \pm 3.52\%$ compared to the base line ($p < 0.01$). The results of the E.M. analysis, revealed that water was detected intracellularly, within astrocytic prevascular end-feet and cell bodies.

IV. Conclusions:

Our observations appear to suggest that an early cellular sodium uptake through the benzamil-sensitive activated sodium channels may be intimately involved in the development of brain edema in rats exposed to hyponatremic stress. The opposing effects of systemic hyponatremia on the brain-specific AQP4 and ENaCs, provide an important defense mechanism to act against excessive water accumulation and to protect brain volume.

ICV pretreatment with benzamil has an immediate anti-edematous effect that lasts for at least 2 hours on the cellular brain edema associated with acute hyponatremic stress in rats. The changes in serial MRS (water signal) give us yet another tool to continuously follow the progress of brain edema evolution in-vivo. The in-vivo results confirm in-vitro observations that benzamil prevents water accumulation in hyponatremic rats.

These observations suggest that, in the future, selective non-toxic inhibition of brain specific sodium channels by agents that can freely cross the BBB may provide a new therapeutic approach to prevent and treat hyponatremia associated brain edema in the early stages of its formation. In order to do this, the exact pharmacokinetics and the ideal timing of treatment with such sodium channel blockers would have to be worked out, especially when considering the clinical point of view, where the development or exact starting point of a brain edema are harder to determine.

Our MRI experiments point to the fact that reliable small animal imaging as well as DWI and MRS can be carried out on 3T clinical scanners.

The unexpected volume fraction changes that were detected in hypotonic edema appear to be substantially different from those observed in stroke. This may suggest that contrary to general opinion and radiology textbook data, the ADC decrease in stroke cannot be explained by mere water shift from extra to intracellular space (i.e. intracellular edema). It is plausible that other mechanisms such as decreased cytoplasmic streaming, membrane pump dysfunctions, changes in physical state of water (i.e. sol-gel transitions, free-bound transitions) etc. are involved in the ADC decrease seen in stroke.

Based on our results and the literature, the biexponential DWI analysis would have a clinical role in brain edema diagnosis and follow up of treatment.

V. Bibliography:

1. Articles grounding the thesis:

- Sulyok E, Pál J, Vajda Z, Steier R, Dóczi T. Benzamil prevents brain water accumulation in hyponatraemic rats. *Acta Neurochir (Wien)*. (2009) 151(9):1121-5.
- Aradi M, Steier R, Bukovics P, Szalay C, Perlaki G, Orsi G, Pál J, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3 T clinical scanner. [published online ahead of print Mar 22 2010]. *J Neuroradiol* (2010).
- Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Janszky J, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T. The influence of Benzamil hydrochloride on the evolution of hyponatremic brain edema as assessed by in vivo MRI study in rats. [Epub ahead of print 2011 Mar 29] *Acta Neurochir (Wien)*. (2011).
- Steier R, Aradi M, Pál J, Perlaki G, Orsi G, Bogner P, Galyas F, Bukovics P, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A. A biexponential DWI study in rat brain intracellular edema. [Epub ahead of print 2011 Apr 15] *Eur J Radiol*. 2011).

2. Presentations and posters grounding the thesis:

- Oral scientific progress reports at semiyearly meetings of the EU FP-6 "Aquaglyceroporins" to the rest of the consortium members. (Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T.)
- Oral contribution at the Neuroimaging Workshop in Szeged Hungary. March 2010: Effects of Benzamil in rat brain edema investigated by quantitative MR experiments. (Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Janszky J, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T.)
- Oral presentation at the 5th Pannonian Symposium on Central Nervous System Injury in Pecs Hungary. May 2010: Effects of Benzamil in rat brain edema investigated by quantitative MR experiments. (Steier R, Aradi M, Pál J, Perlaki G, Orsi G, Bogner P, Galyas F, Bukovics P, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A.)

**Az agy ödéma és az epithelialis nátrium csatornák annak
kialakulásában játszott szerepének vizsgálata**

Dr. Steier Roy

Ph.D tézis

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Idegsebészeti Klinika
2012**

Témavezetők: Prof. Dr. Dóczi Tamás Ph.D., D.Sc.

Dr. Schwarcz Attila Ph.D.



Rövidítések:

ADC:	Diffúziós koefficiens
AVP:	Arginin-vazopresszin
BBB:	Vér-agy gát
CCD:	Cortical collecting duct.
Cho:	Choline.
Cr:	Creatine.
CSF:	Cerebrospinális folyadék
CV:	Coefficient of variation.
DWI:	Diffúzió súlyozott képalkotás
EC:	Extracelluláris
ENaC:	Epitheliális nátrium csatorna
EM:	Electronmikroszkópia.
EPI:	Echo planar képalkotás
HN:	Hypernatraemia
HNB:	Hyponatraemia + intracerebroventrikuláris benzamil
HNS:	Hyponatraemia + intracerebroventrikuláris fiziológiás sóoldat
IC:	Intracelluláris
ICV:	Intracerebroventrikuláris
ICP:	Intrakraniális nyomás
IP:	Intraperitoneális
KIR:	Központi idegrendszer
MRI:	Mágeses rezonancia képalkotás
MRS:	Mágeses rezonancia spektroszkópia
mT/m:	Militesla/méter.
NAA:	N-acetil-aszpartát.
NMR:	Mágmágeses rezonancia
NN:	Normonatraemia.
NNB:	Normonatraemia + intracerebroventrikuláris benzamil
PRESS:	Point resolved spectroscopy sequence
RF:	Rádiófrekvencia
ROI:	Region of interest
RVD:	Regulatórikus térfogatcsökkenés
SNR:	Jel/zaj arány
SPAIR:	Spektrális kioltási inverziós visszatérés
SD:	Standard deviáció
T:	Tesla

I. BEVEZETÉS:

4. Agy ödéma:

4.1.1. Általános leírás:

Az agy vízhomeosztázisa elengedhetetlen része a központi idegrendszer (KIR) szabályos működésének. Agy ödéma kialakulása során kóros vízszaporulat jön létre az agyban. A Monroe-Kellie elv szerint az agyat, a cerebrospinalis folyadékot (CSF), és az agy vértartalmát a csontos agykoponya és a viszonylag merev dura veszi körül. Bármely összetevő mennyiségének növekedése kizárólag a másik kettő "kárára" történhet. Ha az agy térfogata megnő, növekszik az intrakraniális nyomás (ICP) is. Eleinte az agy a liquor és a vértartalom mennyiségének csökkentésével kompenzálni próbál. Amennyiben az ödémát kiváltó tényező elég erős, a kompenzációs mechanizmusok kimerülnek és a koponyaúri nyomás tovább növekszik. Ez herniációkhoz vezethet, mely halált okozhat. Agyödéma hátterében számos tényező állhat: stroke, agydaganatok, traumás agyi sérülés, szisztémás hyponatraemia, hydrocephalus, fertőzések stb.

Az agy ödémát eredetileg két kategóriába sorolták; celluláris (cytotoxicus) valamint vasogen csoport; ma már hydrocephalicus és ozmotikus típus is ismert.

Celluláris agy ödéma stroke korai fázisa és hyponatraemia során figyelhető meg. A sejten belüli vízfelhalmozódás hatására megnő az intracelluláris (IC) tér. Másfelől az általában daganatok, illetve tályogok okozta vasogénikus agy ödéma során az extracelluláris (EC) tér növekszik meg a megromlódott vér-agy gát (BBB) által átengedett nagyobb mennyiségű EC térbe történő fehérje- és vízmozgás hatására. A klinikai gyakorlat során azonban az agy ödéma több típusa lehet jelen ugyanazon időben, ugyanazon betegben.

4.2. Hyponatraemiás agy ödéma:

A hyponatraemia az egyik leggyakoribb elektrolitzavar a kórházban fekvő betegekben. Akut hyponatraemia során, a hyponatraemiás stresszre adott válaszként egyre több víz kerül az intracelluláris (IC) térbe, ez celluláris agy ödémát okoz, amely a kórkép vezető tüneteiert felelős. Az akut hyponatraemia tisztázatlan lefolyása és helytelen rendezése életveszélyes állapotokhoz vezethet.

5. Az agy válasza a hyponatraemiás stresszre:

Az agysejtek hypoozmotikus stresszre adott elsődleges válasza a duzzadás, melyet a koncentrációs gradiens által fenntartott transzmembrán víz diffúzió irányít. Ezt, egy az eredeti helyzet visszaállítására törekvő komplex folyamat követi, a fennálló hypoozmotikus körülményektől függetlenül. Ez a folyamat regulatórikus térfogatcsökkenésként (RVD) ismert.

5.1. Regulatórikus térfogatcsökkenés (RVD):

Az RVD-t felépítő események sorozata három szakaszra bontható. Kezdetben egy szenzor érzékeli a sejt térfogatában bekövetkezett változást. Ez az információ egy jelátviteli kaszkádott triggerrel, mely számos membráncsatorna fehérje, beleértve duzzadás aktiválta Cl⁻ csatornák, stressz aktivált, feszültségfüggő K⁺ csatornák, Ca⁺⁺ függő K⁺ csatornák és neutrális K⁺/Cl⁻ ko-transzporterek aktiválódását eredményezi. Az ioncsatornák aktivációja K⁺ és Cl⁻ ionok és organikus ozmolitek celluláris effluxát indukálják. A reakció végén a sejt eredeti térfogatának "emléke" állítja le az RVD folyamatot.

5.2. Epitheliális nátrium csatornák és benzamil:

Az epitheliális nátrium csatornák (ENaC) az ioncsatorna fehérjék ENaC/degenerin családjának tagjai. ENaC-k a test többféle szövetében fellelhetők. Megtalálhatók mind az agyban, a vesékben, a húgyhólyagban, a nyál- és verejtékmirigyekben, mind a colon disztális szakaszában. A transepitheliális nátrium transzport kétlépcsős folyamat: először a nátrium amilorid-szenzitív, a sejt apikális membránjában elhelyezkedő ENaC-on lép be a sejtbe, majd a basolaterális membránban lévő Na-K-ATPázok eltávolítják a nátrium ionokat. Niisato és munkatársai bemutatták, hogy a hypotóniás stressznek kitett A6 sejt monolayerben a korábban szintetizált ENaC fehérjék cytosolból a sejtmembránba történő transzlokációja és/vagy új csatorna fehérjék előállításának hatására megnő a celluláris nátrium felvétel. A hypotónicitás stimulálta transzport benzamillal, egy specifikus nátriumcsatorna-blokkolóval teljesen megakadályozható volt.

6. MRI:

A mágneses rezonancia képalkotás (MRI) egy a vizsgált objektumból jövő mágneses rezonanciát (NMR) külsőleg mérő módszer, mind az anatómiai szerkezetről, mind a kémiai összetételről információval szolgál.

Kísérlet során az MRI használata a klasszikus in-vitro kísérletekkel összehasonlítva kiemelkedő volt, mivel adott kóros állapotok evolúciója élőben figyelhető meg.

6.1. Diffúzió súlyozott képalkotás (DWI):

Az MRI jól használható a mikroszkópikus vízmozgás vizsgálatára. Az elképzelések szerint mind az intra- és az extracelluláris diffúziós koefficiens, valamint a sejtterefogat frakció változása is befolyásolja a diffúziós koefficiens (ADC).

Vasogénikus agyödémában az ADC emelkedése az extracelluláris térfogatfrakció megnövekedésével függ össze. Másfelől a celluláris típusú ödémában látott ADC csökkenés hátterében a megnövekedett extracelluláris tortuositást és a protonok, a gyorsabban diffundáló extracelluláris térből a lassabban diffundáló intracelluláris térbe való, transzlokációját feltételezik.

A méréseknél magasabb b-faktor használatakor a finom vízmozgások is detektálhatók. Magas b-faktor esetén az ADC multiexponenciális lesz. Biexponenciális matematikai modell használata esetén a szignálcsökkenés a gyors (ADC_{fast}) és a lassú (ADC_{slow}) diffúziós komponens összegeként interpretálható.

6.2. Mágneses rezonancia spektroszkópia (MRS) – vízjel:

A protonokat a környezetükben lévő makromolekulák által létrehozott kémiai környezet befolyásolja. Normál spektroszkópia során a kémiai környezet változása miatt bizonyos metabolitok rájuk jellemző különböző frekvenciájú rezonanciát mutatnak.

Mivel a protonszignál a metabolitok szignáljánál általában jóval erősebb, általában elnyomjuk a vízjelet. Amennyiben nem nyomjuk el a vízjelet és elimináljuk a befolyásoló faktorokat a feltételezések szerint a vízjel integrálját kapjuk, mely a protonok számával arányos, így az egy voxelen belüli víz molekulák mennyisége megbecsülhető.

II. CÉLOK:

Vizsgálataink célja az agyödéma folyamatainak részletesebb megértése, új és jobb diagnosztikai módszerek és terápiás lehetőségek felmérése volt, különös tekintettel a hyponatraemiás ödémára. Azt feltételeztük hogy az epitheliális nátrium csatornák és a nátrium influx a súlyos hyponatraemia alapján kialakuló agyödéma iniciációjában és propagációjában szerepet játszanak.

5. A kezdeti cél a benzamil-hydrochloride, egy specifikus ENaC blokkoló, agyödémára gyakorolt hatásának vizsgálata volt. Vizsgálni kívántuk, hogy képes-e a benzamil a hyponatraemiás agyödéma csökkentésére.
6. Másodlagos célunk egy olyan modalitás kifejlesztése volt, mellyel az agyödéma kialakulását, és a benzamil-hydrochlorid hatását in-vivo kísérletben vizsgálhatjuk. Az MRI-t választottuk erre a feladatra. MRI használatának előnye, hogy az agyödéma fejlődése élő körülmények között figyelemmel kísérhető. Ennek a célnak elérése érdekében egy a kisállatok vizsgálatára alkalmas módszert kellett kifejleszteni.
7. Harmadlagos kutatási célunk a hyponatraemiás agyödéma iniciációjáról és propagációjáról, valamint a benzamil kezelés hatásairól meglévő tudásanyagunk bővítése volt.
8. További célunk volt vízmozgások során látható MR megfigyelések részletesebb megértése, egy a hyponatraemiás agyödéma vizsgálatára alkalmas vizsgálati módszer kifejlesztése in vivo agyödéma modellen végzett DWI biexponenciális analízis segítségével.

II. Anyagok és módszerek:

5. A benzamil megelőzi a víz felszaporodást hyponatraemiás patkányokban:

Hím Wistar patkányok négy csoportját vizsgáltuk. (n=13 minden csoportban). Az I. csoport állatai normonatraemiásak voltak, 0,9%-os sóoldat intracerebrovasculáris (ICV) adásában részesültek; a II-IV csoport állatait hyponatraemiássá tettük 140 mmol/l-es dextróz oldat 20 %-os testtömeg dózis intraperitoneális (IP) adásával. A patkányokat 0,9 %-os sóoldat (II. csoport), 120 ug arginin-vazopresszin (AVP) (III. csoport) vagy 4 ug benzamil-hydrochlorid (IV. csoport) ICV adásával kezeltük elő. A plazma nátrium tartalmát (ionszelektív elektród), plazma ozmolalitást (vapour pressure osmometer), az agy nátrium és kálium tartalmát (láng photometer), valamint az agy víztartalmát (dessicatio módszer) mértük egy kétórás hydratio periódust követően.

6. A patkányagy kvantitatív proton MRI és MRS vizsgálata 3 Tesla (T) klinikai MR scannerrel:

Nyolc Wistar patkányt (három nőtény, öt hím) vizsgáltunk. A DWI értékeléséhez mono- és biexponenciális megközelítést használtunk (b-érték 6000 s/mm²-ig). Belső referenciahasználatával proton spektroszkópiát végeztünk. Mikroszkópos felbontással (130×130×130µm³) is scanneltük a patkányok agyát.

7. A benzamil-hydrochlorid hatásának mérése a hyponatraemiás agyödéma kialakulására in vivo MRI vizsgálattal:

Hím Wistar patkányok öt csoportját vizsgáltuk a következőképpen: normonatraemiás, natív állatok (NN csoport, n=7), hyponatraemiás állatok (HN csoport, n=8), hyponatraemiás állatok, 4µg ICV benzamillal kezelve (HNB csoport, n=8), hyponatraemiás állatok ICV fiziológias sóoldattal kezelve (HNS csoport, n=5) és normonatraemiás állatok 4µg ICV benzamillal kezelve (NNB csoport, n=5). A fent említett módon hyponatraemiát indukáltunk. ADC méréséhez MRI-

vel sorozatos DWI-t végeztünk, a vízjelet MR spektroszkópiával határoztuk meg. Ezt követően szérumszén, nátrium, kálium és plazma ozmolalitás meghatározást végeztünk.

8. Biexponenciális DWI vizsgálat patkánygyi intracelluláris ödémában:

Tíz hím Wistar patkányban a korábban említett módon intracelluláris ödémát idéztünk elő. 3T MRI készülékkel sorozatos DWI-t végeztünk, a vízjel mérésekhez MRS-t használtunk. Az MR vizsgálatot követően az állatok agyát elektronmikroszkópos (EM) módszerrel vizsgáltuk, miközben a szérumszén, nátrium, kálium és plazma ozmolalitás meghatározást végeztünk.

III. Eredmények:

5. A benzamil megelőzi a víz felszaporodást hyponatraemiás patkányokban:

A plazma nátrium, ozmolalitás és a szövetszén nátrium és kálium tartalom, függetlenül a gyógyszeres előkezeléstől, jelentősen csökkent a hyponatraemiás patkányokban (II-IV. csoport, $p < 0.0005$ minden csoportban). Az agy víz tartalma a hyponatraemiára adott válaszként $77.55 \pm 1.00\%$ -ról $78.45 \pm 0.94\%$ -ra ($p < 0.01$) növekedett, melyet az ICV AVP-nel való előkezelést tovább erősített. Ezzel szemben a benzamil adása megelőzte az agy víztartalmának hyponatraemia előidézte emelkedését ($77.61 \pm 1.04\%$).

6. A patkánygyi kvantitatív proton MRI és MRS vizsgálata 3 Tesla (T) klinikai MR scannerrel:

A diffúzió súlyozott képalkotás a teljes b-érték tartományban pontos diffúziós koefficiens meghatározást adott. A látható metabolitok MRS-ja elfogadható pontossággal volt kivitelezhető. A magas felbontású T_2 súlyozott kép mikroszkópos $130 \times 130 \times 130 \mu\text{m}^3$ -os felbontású képet eredményezett.

7. A benzamil-hydrochlorid hatásának mérése a hyponatraemiás agyödéma kialakulására in vivo MRI vizsgálattal:

A hyponatraemia során az ADC állandó csökkenést mutatott, a kiindulási 100% -ról a mérés 90-dik percen érve el a $92.32 \pm 3.20\%$ -os minimum értéket ($p < 0.0005$). Ez a folyamat a vízjel növekedésével társult, mely a mérés 100-dik percében érte el $5.95 \pm 2.62\%$ -os maximumát ($p < 0.0005$). Benzamillal történő előkezelést követően sem az ADC-ben sem a vízjelben nem jelentkezett konzisztens változás.

8. Biexponenciális DWI vizsgálat patkánygyi intracelluláris ödémában:

A vízterheléses indukciót követően az ADC értékek $724 \pm 43 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -ról $682 \pm 26 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -ra csökkentek ($p < 0.0001$). ADC_{fast} értékek 948 ± 122 -ről $840 \pm 66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -ra estek ($p < 0.001$). Az ADC_{slow} 226 ± 66 -ról $191 \pm 74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -re csökkent ($p < 0.05$). A mérés 110-dik percében a lassú komponensről a gyors komponensre való váltás következett be. A gyors komponens százalékos aránya mérsékelte, ámde szignifikáns $76.56 \pm 7.79\%$ -ról $81.2 \pm 7.47\%$ -ra való emelkedést mutatott ($p < 0.05$). A vízjel a kiindulási értékhez képest $4.98 \pm 3.52\%$ -kal emelkedett ($p < 0.01$). Az EM vizsgálatok eredményei a vizet intracellulárisan, az astrocyták perivascularis lábcskáiban és a sejtestben mutatták ki.

IV. Konklúzió:

Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a sejtek korai, benzamil-szenzitív aktivált nátrium csatornákon keresztüli nátriumfelvétele jelentős szerepet játszik a hyponatraemiás stressznek kitett patkányok agyödémájának kialakulásában. A szisztémás hyponatraemia az agy specifikus AQP4 és ENaC csatornákon kiváltott ellentétes hatása a túlzott vízfelhalmozódás elleni védekező mechanizmusok és az agyi térfogat fenntartásának fontos eleme.

Az intracerebrovaszkuláris benzamil előkezelésnek hyponatraemiás stressz kiváltotta agyödéma estén azonnali ödéma ellenes hatása van patkányokban, mely legalább két órán keresztül fennáll.

A sorozatos MRS (vízjel) mérések egy további lehetőséget kínálnak az agyödéma kialakulásának és progressziójának folyamatos in vivo vizsgálatára. Az in vivo mérési eredmények megerősítik azt az in vitro megfigyelést, miszerint a benzamil megelőzi a vízfelhalmozódást hyponatraemiás patkányokban.

Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a jövőben az agyspecifikus nátrium csatornák szelektív, nem toxikus gátlása olyan ágensek által, melyek szabadon hatolnak át a vér-agy gáton új terápiás lehetőséget nyújthat a hyponatraemia asszociált agyödéma korai stádiumában annak megelőzésében és kezelésében. Ennek eléréséhez meg kell vizsgálni ezen anyagok pontos farmakokintikáját, a nátrium csatorna blokkolókkal való kezelés ideális időzítését, különösen tekintettel a klinikai gyakorlatra, amikor az agyödéma kialakulásának pontos kezdete nehezen meghatározható.

MRI kísérletein rámutatnak arra, hogy 3T klinika scanner segítségével megbízható kisállat vizsgálatok, DWI és MRS is kivitelezhető.

A váratlan térfogat frakció változások, amelyeket a hypotoniás ödéma során észleltünk, a stroke-ban megfigyelttől jelentősen különböznek tünnek. Ez arra utalhat, hogy ellentétben a radiológiai könyvek által általánosan elfogadott véleménnyel a stroke-ban megfigyelt ADC csökkenés nem magyarázható pusztán a víz extracelluláris térből az intracelluláris térbe való eltolódásával (azaz intracelluláris ödéma). Valószínűsíthető, hogy más mechanizmusok, úgymint csökkent citoplazmikus áramlás, membrán pumpa diszfunkciók, a víz fizikai állapotának változása (szól-gél tranzíciók, vízkötöttség változások) stb. is részt vesznek a stroke során látott ADC csökkenésben.

Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a biexpoenciális DWI analízisnek klinika szerepe lehet az agyödéma diagnózisában és a terápia követésében.

V. Irodalomjegyzék:

3. A tézist megalapozó cikkek:

- Sulyok E, Pál J, Vajda Z, Steier R, Dóczi T. Benzamil prevents brain water accumulation in hyponatraemic rats. *Acta Neurochir (Wien)*. (2009) 151(9):1121-5.
- Aradi M, Steier R, Bukovics P, Szalay C, Perlaki G, Orsi G, Pál J, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3 T clinical scanner. [published online ahead of print Mar 22 2010]. *J Neuroradiol* (2010).
- Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Janszky J, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T. The influence of Benzamil hydrochloride on the evolution of hyponatremic brain edema as assessed by in vivo MRI study in rats. [Epub ahead of print 2011 Mar 29] *Acta Neurochir (Wien)*. (2011).
- Steier R, Aradi M, Pál J, Perlaki G, Orsi G, Bogner P, Galyas F, Bukovics P, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A. A biexponential DWI study in rat brain intracellular edema. [Epub ahead of print 2011 Apr 15] *Eur J Radiol*. 2011).

4. A tézist megalapozó előadások és poszterek:

- Oral scientific progress reports at semiyearly meetings of the EU FP-6 "Aquaglyceroporins" to the rest of the consortium members. (Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T.)
- Oral contribution at the Neuroimaging Workshop in Szeged Hungary. March 2010: Effects of Benzamil in rat brain edema investigated by quantitative MR experiments. (Steier R, Aradi M, Pál J, Bukovics P, Perlaki G, Orsi G, Janszky J, Schwarcz A, Sulyok E, Dóczi T.)
- Oral presentation at the 5th Pannonian Symposium on Central Nervous System Injury in Pecs Hungary. May 2010: Effects of Benzamil in rat brain edema investigated by quantitative MR experiments. (Steier R, Aradi M, Pál J, Perlaki G, Orsi G, Bogner P, Galyas F, Bukovics P, Janszky J, Dóczi T, Schwarcz A.)