

PhD értekezés tézisei

**Diffúzió és relaxáció heterogén közegben -
mágneses rezonancia vizsgálatok biológiai modelleken**

Kotek Gyula

Szegedi Tudományegyetem

Fizika Doktori Iskola

2008

PhD értekezés tézisei

**Diffúzió és relaxáció heterogén közegben -
mágneses rezonancia vizsgálatok biológiai modelleken**

Kotek Gyula

Program: Fizika Doktori Iskola
Programvezető: Dr. Szabó Gábor
Alprogram: Fizikai képalkotó módszerek az
orvostudományban - radiológia
Alprogramvezető: Dr. Csernay László

Szegedi Tudományegyetem
Fizika Doktori Iskola

2008

Tudományos előzmények

A diffúziós MR képalkotás a központi idegrendszer betegségein kívül a vese, a máj és a nyirokcsomók elváltozásainak diagnosztikájában játszik szerepet. A vízmolekulák sejtmérettel összevethető távolságú elmozdulásának tanulmányozása fényt derít a víztranszportban bekövetkező változásokra, valamint a szövetek geometriai és térbeli elhelyezkedési változásaira a kóros és egészséges állapotok összehasonlításában. A relaxációs mérések az oldott anyag koncentrációjának és minőségének változásáról adnak információt.

A diffúzió-súlyozott MR képalkotás egy alkalmazási területe az agyérbetegségek diagnosztikája, a stroke, az ischémiás állapotok vizsgálata. A stroke kialakulása során a diffúzió-súlyozott és T_2 relaxáció-súlyozott képek korrelálatlansága évek óta vár molekuláris szintű magyarázatra.

Több mechanizmus sejthető a jelenség mögött. Szöveti szinten citotoxikus ödéma kialakulása, később megnövekedett szöveti víztartalom léphet fel. Mikroszkópikus szinten víz áthelyeződése az extracelluláris térből az intracelluláris térbe, a sejtfal víz-permeabilitásának megváltozása, extracelluláris térben molekuláris csoportosulás (molecular crowding), az intracelluláris térben ozmotikusan aktív víz felszaporodása, és a vízmolekulák számára, a diffúziós mozgás során elérhető térfogatok geometriájának megváltozása (tortuosity), az MR jelintenzitást befolyásolják. Ezek a folyamatok ok-okozati összefüggésben állnak, állhatnak egymással.

Számos olyan állatokon végzett kísérlet eredménye áll rendelkezésre, amely a kóros folyamatokat modellezi. A mikroszkópikus magyarázathoz azonban ennél jóval egyszerűbb és kontrollálható vizsgálatokra van szükség. Az összetett élettani történések tisztázásához, és az MR képalkotásban megjelenő hatásának megértéséhez a szövetmodelleken végzett kísérletek adhatnak segítséget. A heterogén rendszerek diffúziós és relaxációs tulajdonságait illetően számos elméleti és szimulációs modell áll rendelkezésre. E modellek közötti átjárás nem mindig tisztázott, mint ahogyan érvényességi határaik sem. A modellek különböző kutatási területekről származnak, a geofizikától a polimerfizikán át a kvantumkémiaig. A megfelelő modell kiválasztása és alkalmazása lehetőséget ad az összetett élettani folyamatok elméleti modellezésére, új diagnosztikai eljárások fejlesztésére és a meglévő eljárások optimalizálására. A modellek érvényességi határait az MR mérések idő-, és térskálája pontosan kijelöli.

Célkitűzés

Vizsgálataink a stroke során felmerülő radiológiai probléma nyomán azt a célt tűzték ki, hogy ellenőrizhető modellkísérletekben a víz diffúziós tényezőjének és a T2 relaxációs időnek a kontrollálható paraméterektől való függését felderítsék. A vizsgálatok tárgyát kísérleti modell-oldatok, illetve sejtek szuszpenziói képezték. A kísérleti eredményeket elméleti modellekkel vettem össze, ennek célja a következő volt: a) a modellek érvényességét tesztelni, b) a validált modellek alapján összetett rendszerekben bekövetkező diffúziós tényező és T2 relaxációs idő változásokat megjósolni, c) az MR mérések tér-, és időskáláját illetően koherens képet kialakítani, amely támpontot ad a diagnosztika szakemberei számára. Vizsgálataim középpontjában heterogén (intra-, és extracelluláris közeget is tartalmazó) rendszerek diffúziós és relaxációs tulajdonságai álltak. Az intra-, és extracelluláris tér oldott molekulái minőségének és mennyiségének hatását vizsgáltam.

Proteolízis modell kísérletek

Egy homogén mintában a diffúziós és relaxációs tulajdonságokat a víz és az oldott anyag molekulái közötti kölcsönhatások határozzák meg. A molekuláris történések (proteinek degradálódása, polimerizációs folyamatok), valamint a koncentráció-változások egyszerre jelenhetnek meg élettani folyamatokban. E történések egymástól független hatásának vizsgálata állt a modell-kísérletek középpontjában.

Molekuláris crowding kísérletek

A VVT fehérjeállománya 95%-ban hemoglobin. A különböző fajok hemoglobinja eltérő hidrofilitású aminosavakat tartalmaz. Az intracelluláris tér molekuláinak vízzel való kölcsönhatása fajonkénti különböző. E kísérletek célja az extracelluláris tértől mentesnek mondható vörösvértest (VVT) masszák MR vizsgálatának és a minták ozmotikus viselkedésének összevetése volt. Az oldatkísérletekkel és a heterogén rendszereken végzett kísérletekkel való összehasonlításban a sejtfalak diffúziót gátló hatása meghatározható.

Intracelluláris (IC) és extracelluláris (EC) tér hatásának független vizsgálata

Az IC és EC tér koncentrációjának és oldott molekulái minőségének hatását vizsgáltuk VVT szuszpenziókon. Az EC tér koncentrációjának és az oldott molekulák minőségének hatását, valamint az IC tér koncentrációjának hatását vizsgáltuk. Célul tűztük ki olyan elméleti modell kiválasztását, amely a kísérleti eredményeket helyesen írja le. Ezek a kísérletek vezetnek a szövetekben tapasztalt MR eredmények értelmezéséhez, a heterogén közegek MR mérések által meghatározott idő-, és térskálájú viselkedésének leírásához.

Intracelluláris tér módosulásának hatása

A VVT szuszpenziók végzett kísérletek és elméleti modelljük rávilágítanak arra, hogy az in-vivo lezajló intracelluláris történéseket makroszkopikus voxelekben mért MR paraméterek alapján detektálni lehet. A sejtszuszenziókon végzett kísérletek célja felderíteni, az intracelluláris történések MR mérésekkel való detektálási lehetőségét. A Jurkat sejtek szuszpenzióján végzett kísérletek a számos kóros folyamatban (diabétesz, ischemia utáni reperfüzió, tumor genézis, apoptózis) megjelenő intracelluláris protein módosulás (O-glükolizáció) MR mérésekkel való detektálásának lehetőségét célozzák. A HeLa sejtek szuszpenzióján végzett kísérletek a sejtciklusok fázisainak MR mérésekkel való detektálásának lehetőségét célozzák. Ez utóbbi, további diagnosztikai eljárás alapkonceptiójának vizsgálata is egyben.

Módszerek

MR technikák

Az intracelluláris crowding kísérletek MR képalkotás módszerrel, az oldat-kísérletek, az EC/IC tér szerepét vizsgáló kísérletek, valamint az intracelluláris tér módosulásait vizsgáló kísérletek spektroszkópiai eljárással történtek. A kísérletek Varian^{UNITY} INOVA 400 WB MR berendezésen történtek (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). A mágnes típusa 89 mm bore méretű, függőleges elrendezésű 9,4 T térerősségű Oxford mágnes (Oxford Instruments Ltd., UK). A spektroszkópiai mérések gerjesztő és kiolvasó mérőfeje 5 mm mintatér átmérőjű ID-PFG típusú volt (Varian). A képalkotó mérések gerjesztő és kiolvasó eszköze, 35 mm mintatér átmérőjű multinukleáris, Litz térfogati tekercsel és aktív árnyékolással ellátott mérőfej volt. A mérőfej gradiens erősségének maximális értéke 350 mT/m (Doty Scientific Inc., Columbia, SC, USA). Az effektív diffúziós tényező meghatározása PFGSE (Pulsed Field Gradient Spin Echo) szekvenciával, a T2 relaxáció meghatározása CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) szekvenciával, a T1 relaxációs érték meghatározása inverziós technikával történt. Az exponenciális jelcsökkenésekből a diffúziós tényező (ADC), T2 és T1 relaxációs idők a Varian utólagos adatfeldolgozó szoftvercsomag segítségével került meghatározásra.

Oldatkísérletek

A proteolízis modell-kísérletekhez különböző molekulák oldatai készültek. Az oldott molekulák mérete hatásának vizsgálatához modell polimer PEG (Polietilén-glikol: HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H) oldatok, a biológiai polimerek vizsgálatához albumin és lizozim oldatok, a lizált fehérjék hatásának vizsgálatához pepton oldatok készültek.

VVT szuszpenziók

Humán és tevé vérmintákból származó eritrociták szuszpenziói szolgáltak a kísérletek alapjául. Az intracelluláris tér hatását ozmotikusan manipulált VVT szuszpenziókkal vizsgáltuk, illetve a különböző fajok VVT szuszpenziója tulajdonságainak összehasonlításával. Az extracelluláris tér hatását a szuszpenziós médiumokban oldott molekulák minőségének és mennyiségének változásán keresztül vizsgáltuk.

Intracelluláris módosulások

Jurkat sejtek különböző médiumban való inkubálásával az O-glükolizáció egyensúlyát módosítottuk. Az intracelluláris térben glükolizált fehérjéinek felszaporodásának hatását vizsgáltuk, a sejtek 50%-os szuszpenzióján végzett MR kísérletekkel, a diffúziós tényező és a T2 relaxációs idő mérésével. HeLa sejtek szinkronizálását értük el timidin felhasználásával. A szinkronizált sejtpopuláció fázisaiban mért diffúziós és relaxációs idők kerültek összehasonlításra.

Heterogén rendszerek elméleti modellezése

Összevetettük az effektív médium közelítés (EMT) eredményeit a VVT szuszpenziókon mért diffúziós kísérletek eredményeivel. Az EMT modelltől származó - heterogén rendszer paramétereit tartalmazó - összefüggést átalakítottuk egy dimenzió nélküli, származtatott paraméterek közötti összefüggéssé, amelyben minden paraméter egyszerűen mérhető, azonban egymástól nem független. E dimenziótlan paraméterek közötti összefüggés és a kísérletek eredményeinek egyezését vizsgáltuk. A relaxáció meghatározására diffúzió-korrigált térfogati súlyozást alkalmaztunk, e modell érvényességi határait vizsgáltuk.

Eredmények

Proteolízis modell – homogén biológiai modell

Kísérleteim alapján, a mért diffúziós tényezővel (ADC) és a T2 relaxációs tényezővel kapcsolatban a következő megállapítások tehetők.

- Az ADC az oldott molekulák koncentrációjától függ elsősorban, az oldott molekulák tömege sokkal kisebb mértékben befolyásolja. A koncentráció tág tartományában az ADC függése a koncentrációtól lineáris. Az ADC a koncentrációváltozások jó indikátorának bizonyult, de az oldott molekulák tömegére és minőségére érzéketlen.
- Az oldott és oldószer molekulák diffúziója széles koncentráció-tartományban lineáris összefüggést mutat. A magasabb oldott anyag koncentrációk tartományában ettől eltérés figyelhető meg, az oldott molekulák kölcsönhatásának köszönhetően.

- A T2 relaxációs tényező a koncentráció tág tartományában független a koncentrációtól (biológiai molekulák esetén), az oldott molekulák tömegétől és minőségétől erős függést mutat. A T2 relaxációs idő a molekulák minőségének jó indikátora.
- Az ADC és a T2 változásai különböző élettani folyamatokhoz köthetők, a kísérletek a két mennyiség korrelálatlan változásának lehetséges magyarázatát adják:
 - Az ischemia során fellépő folyamatok során az oldott molekulák spektrális összetételének megváltozása T2 változást idéz elő, feltételezhető tehát, hogy a megfigyelt T2 változások proteolitikus folyamatokat jeleznek.
 - Feltételezhető továbbá, hogy az ischemia során megfigyelt ADC változás, a fellépő koncentráció-változások (ödéma) hatása.

Ezek az eredmények a Magyar Neuroradiológiai Társaság XIV. Kongresszusa és Továbbképző Kurzusa keretében és a CNS Injury és a Magyar Idegsebészeti Társaság XVII. Kongresszusa keretében megtartott előadásaim keretében kerültek közlésre (3. és 4. számú közlemény).

Intracelluláris crowding

A teve és humán eritrocitákon végzett kísérleteink összhangban vannak az oldatokon végzett diffúziós kísérletekkel. A különböző hemoglobin oldatok azonos koncentráció mellett, közel azonos diffúziós tulajdonsággal bírnak. A hemoglobin molekulák különböző hidrofilitása a diffúziós folyamatokat csak kis mértékben módosítja. A hemoglobin-koncentráció csökkenése a víz diffúziójának csökkenéséhez vezet. Az IC tér hidrofilitása csak közvetetten, a víztartalom változásán keresztül befolyásolja az ADC értékét.

A sejtfalak jelenléte az MR mérések paramétereinek e tartományában a mono-exponenciális jelcsökkenéstől való eltérésben nyilvánul meg, a koncentráció hatása a gyors és lassú módusokban egyaránt megjelenik. A kísérletek igazolják, hogy a módusok megjelenése nem mindig köthető fizikailag elkülönült tértartományok jelenlétéhez. Ezek az eredmények a Cell Biology International folyóiratban kerültek közlésre (2. számú közlemény).

IC és EC tér független vizsgálata – heterogén biológiai rendszerek

A kísérletek eredményeit az EMT modell megfelelően írja le. Az EMT modellben a relatív paraméterekre való áttérés rendkívül sikeresnek bizonyult, a kísérletek MR mérésekre és egyszerű tömeg-meghatározásra redukálódtak. A kísérleti eredmények, valamint az elméleti modell alapján a következő megállapítások tehetők a heterogén rendszerekre az intracelluláris tér térfogatfrakciójának széles tartományában (ezek az eredmények a Magnetic Resonance Imaging folyóiratban kerültek közlésre, ld. 1. számú közlemény):

- A mért diffúziós tényező nem függ az extracelluláris tér oldott molekuláinak minőségétől, az ADC értéke lineárisan függ az oldott molekulák koncentrációjától, az oldatkísérletek eredményeivel összhangban.
- Az intracelluláris tér víztartalma az ADC értékét az EMT modellel összhangban befolyásolja, aszimmetrikusan a hipo-, és hiperozmotikus tartományokban. Az irodalomban tárgyalt mechanizmusokhoz képest ezt új érveléssel sikerült alátámasztani, valamint független vizsgálattal igazolni.
- A T2 relaxációs tényező az EC tér koncentrációjától tág tartományában független a koncentrációtól, az oldott molekulák tömegétől és minőségétől való függése elhanyagolható.
- A T2 relaxációs tényező az intracelluláris tér víztartalmától határozott függést mutat, a diffúzió-korrigált térfogati súlyozás modellje szerint. E modell az ergodikusnak tekinthető rendszerekben a térfogati súlyozástól eltérően helyesen írja le a heterogén rendszer T2 relaxációs idejének alakulását az intracelluláris térfogatfrakció változása függvényében.
- Az ischemia MR diagnosztikáját illetően a következő megállapítások tehetők:
 - Az extracelluláris tér változásai a vártnál kisebb relevanciával bírnak.
 - Megkérdőjelezhető, hogy a citotoxikus ödéma során fellépő sejtduzzadás ADC változáshoz vezet.
 - A hosszabb T2 relaxációs idők citotoxikus ödémára utalnak.

Intracelluláris módosulások

Az intracelluláris tér kóros és normális folyamatokban való megváltozását 50%-os sejtszuspenziókon diffúziós MR mérésekkel sikerült detektálnom. Az O-glükolizációs egyensúly eltolódását mesterségesen előidézve, az így megfigyelt ADC érték változása szignifikánsnak mutatkozott. Ugyanakkor nem mutatkozott szignifikáns változás a T2 értékben.

Egy szinkronizált populációban az intracelluláris tér változásai diffúziós MR mérésekkel detektálhatók. A kísérletek során a G2 fázis alatt szignifikáns ADC érték csökkenés figyelhető meg. A kísérletek érdekessége, hogy a várakozásokkal ellentétben a T2 értékekben nem következett be szignifikáns változás. Az eredmények közzlése folyamatban van.

További kutatási lehetőségek

Az elméleti modellek értékelése és a kísérleti eredmények további kutatási, és alkalmazási lehetőségeket vetnek fel.

- Ischemia hatásának vizsgálata sejtbiológiai modelleken és állatkísérletekben.
- Diffúzió Tenzor Képzés MR technikájának optimalizálása, mérési eredmények értelmezésének pontosítása.
- Kemoterápiában alkalmazott citotoxikus anyagok, sejtpopulációt szinkronizáló hatásának in-vivo, kvantitatív értékelése.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Gyula Kotek, Zoltán Berente, Attila Schwarcz, Zsolt Vajda, Janaki Hadjiev, Ildiko Horvath, Imre Repa, Attila Miseta, Peter Bogner:
Effects of intra- and extracellular space properties on diffusion and T2 relaxation in a tissue model.
Magnetic Resonance Imaging, 2008 September. 1.

2. Peter Bogner, Attila Miseta, Zoltan Berente, Attila Schwarcz, Gyula Kotek, Imre Repa:
Osmotic and diffusive properties of intracellular water in camel erythrocytes: effect of hemoglobin crowdedness.
Cell Biology International 2005 September, 29(9):731-6.

Az értekezés alapjául szolgáló előadások

3. Gy.Kotek, Z.Berente, Zs.Vajda, A.Schwartz, P.Bogner :
On the possible role of proteolysis in MRI contrast – model experiments
Magyar Neuroradiológiai Társaság XIV. Kongresszusa és Továbbképző Kurzusa
Budapest, 2006

4. Gy.Kotek, Z.Berente, Zs.Vajda, A.Schwarcz, P.Bogner:
Some aspects on the role of macromolecules in MRI contrast
CNS Injury és a Magyar Idegsebészeti Társaság XVII. Kongresszusa
Pécs, 2005

Egyéb fontosabb közlemények

5. Bajzik G, Auer T, Bogner P, Aradi M, Kotek G, Repa I, Doczi T, Schwarcz A.:
Quantitative brain proton MR spectroscopy based on measurement of the relaxation time T1 of water.
Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2008 Jul; 28(1):34-8.
6. Auer T, Barsi P, Bone B, Angyalosi A, Aradi M, Szalay C, Horvath RA, Kovacs N, Kotek G, Fogarasi A, Komoly S, Janszky I, Schwarcz A, Janszky J.:
History of simple febrile seizures is associated with hippocampal abnormalities in adults.
Epilepsia. 2008 Sep; 49(9):1562-9.
7. Schwarcz A, Ursprung Z, Berente Z, Bogner P, Kotek G, Méric P, Gillet B, Beloeil JC, Dóczi T.:
In vivo brain edema classification: New insight offered by large b-value diffusion-weighted MR imaging.
Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2007 Jan; 25(1):26-31.
8. Kovacs N, Nagy F, Kover F, Feldmann A, Llumiguano C, Janszky J, Kotek G, Doczi T, Balas I.:
Implanted deep brain stimulator and 1.0-Tesla magnetic resonance imaging.
Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2006 Dec; 24(6):1409-12.