

INTRINZIKUS MRI PARAMÉTER JELENTŐSÉGE A MYOCARDIÁLIS ISCHAEMIA DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

Ph.D Tézis Összefoglaló

Dr. Kiss Pál Péter

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel
Doktori program vezetője: Prof. Dr. Róth Erzsébet
Témavezető: Dr. Simor Tamás

Szívgyógyászati Klinika
Pécsi Tudomány Egyetem, Pécs, Magyarország

2010

2. BEVEZETÉS

2.1 AZ MRI KONTRASZTANYAGOK ÉS JELENTŐSÉGÜK

Az MRI szignál intenzitás alapvetően a proton relaxációs idők (T1 és T2) határozzák meg. Mivel az egészséges és beteg szövetek között legtöbbször nincs elégséges kontraszt, MRI kontrasztanyagokat, általában paramagnetikus lanthanide fém ion (legtöbbször Gadolinium) tartalmúakat, használunk. A szabad lanthanide ionok vízben való oldhatósága fiziológiai pH-n alacsony. A lanthanide ionok toxikusak, viszont negatív töltésű carboxylate csoportokkal rendelkező szerves chelator molekulákkal nem toxikus és vízben oldható komplexeket tudnak formálni. Mivel a kontrasztanyagok a szövetekhez a vérkeringés útján jutnak el, és amennyiben eloszlásuk az egészséges és beteg szövetekben különböző, relaxációs idő különbség alakul ki a két szövetféleség között, értékelhető kontrasztot létrehozva ezáltal az MRI képen.

2.2 AZ RI MÉRÉS JELENTŐSÉGE

A legtöbb MRI mérés a klinikai gyakorlatban szignálintenzitáson (SI) alapul. A kontrasztos MRI (ceMRI) a képen szöveti különbség akkor látható, ha különböző szignálintenzitás emelkedés (SIE) van a két szövet között. SIE a ceMRI-ben a megfigyelni kívánt szöveti térfogatelemben (voxel) jelenlévő kontrasztanyag koncentrációjától függ, de nem lineáris módon. Az SI nem egy intrinzikus paraméter, mértéke függ a használatos szekvenciától és az acquisíciós paraméterektől. Másik zavaró faktor az MRI tekercs által okozott inhomogenitás, amely mesterségesen lerontja a különböző szöveti SI értékeket a tekercstől mért relatív távolságtól függően.

Az egyedüli intrinzikus fizikai paraméter, amely lineáris mértékben változik, a kontrasztanyag által indukált paramagnetikus $\Delta R1$ (longitudinális relaxációs idő rövidülés), amely a kontrasztanyag koncentrációjától függően változik. Következésként megfelelő kontrasztanyag jelenlétében végzett R1 mérés nemcsak kvantitatív, de reprodukálható módszer is patológiai szöveti elváltozások detektálására.

2.3 KLINIKAI ALKALMAZÁSOK

A kontrasztos MRI egy fontos diagnosztikus eszköz a szívbetegségek kezelésében. Lehetővé teszi, hogy egy vizsgálat során a klinikusok a myocardium morfológiai és fiziológiai tulajdonságairól információhoz jussanak. A mi eredményeink alapján az R1 mapping, kiszűrve a fent részletezett faktorokat, kvantitatív és reprodukálható információt szolgáltathatnak a myocardium perfúziós defektusairól.

Nagy segítséget jelentene egy noninvazív diagnosztikus módszer kifejlesztése, amely a prosztatatraktust (PC) a korai fázisában kimutatná. A jelenleg használatos diagnosztikus eljárások (PSA, tübiopsia stb.) a DCE MRI-t is beleértve csak a PC késői fázisában adnak értékelhető információt. A mi módszerünkkel, Gd(ABE-DTTA) jelenlétében lehetséges volt kvantitatívan meghatározni a rákos sejtek tömegét a TRAMP egerek prosztatájában a korai, PIN fázisban.

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1 Meghatározni, hogy a kontraszt anyagunk Gd(ABE-DTTA) szignálintenzitás erősítő hatással rendelkezik a teljes mágneses mező tartományban, ahol a kísérleteinket elvégezni tervezzük.

3.2 Meghatározni, hogy az R1 mapping metódus több információt szolgáltat a szignálintenzitáson alapuló MRI képeknél. Ezt vizsgálandó a kutyaszív ischaemia-reperfúziós modellt fogunk használni. Ezenkívül az R1 mapping-et pixel-by-pixel módon fogjuk elvégezni, lehetővé téve az adott MRI készüléken elérhető legfinomabb felbontást.

3.3 Meghatározni, hogy az R1 mapping, hasonlóan a fent említett myocardiális modellhez, más betegségek diagnosztikájában, például prosztaták egér modelljében, is használható.

4 A GD(ABE-DTTA) KÜLÖNLEGES TULAJDONSÁGAI

4.1 BEVEZETÉS

A Gd(ABE-DTTA)-t a laboratóriumunkban fejlesztették ki. Sikeresen használták myocardiális ischaemia detektálására. A közelmúlt kísérleteiben myocardiális infarktus kimutatására is sikerrel alkalmaztuk. Nem mutatott káros fiziológiai hatást a kutyakísérletünk során az MRI kísérleteinkhez szükséges dózistartományban.

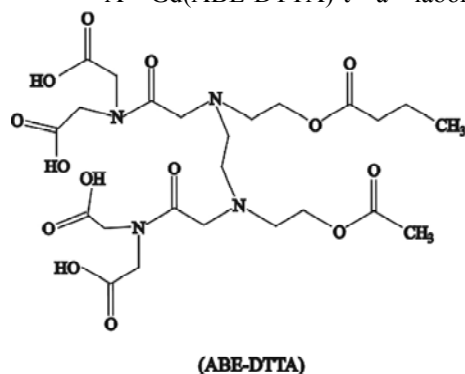


Figure 1. The molecular scheme of the (ABE-DTTA) ligand.

Mágneses mező erősségének függvényében longitudinális relaxivitása különleges karakterisztikát mutatott, magas

és nagyon magas (3-14 T) mezőkön (high and very high fields).

4.2 MÓDSZEREK

Gd(ABE-DTTA)-t a Saab-Ismail által közöltek alapján szintetizáltuk. 0.5 mM-os koncentrációjú mintákat készítettünk NMR és MRI kísérletinkhez.

A méréseket 20°C-on végeztük. A 0,0002–1.0T intervallumban a longitudinális relaxációs idő meghatározás a Koenig és Brown által közölt módon NMRD készüléken történt. 1T feletti mezőkön egyezős MRI és NMR készülékeket használtunk. Azokban a kísérletekben ahol NMR spektrométereket használtunk, az R1 értékeket a WINNMR szoftver által számoltuk ki a következő függvény alapján.

$$I_{(t)} = I_{(0)} + A \cdot \exp(-\tau/T_1) \quad (1)$$

Ahol $I_{(t)}$ a mért intenzitás a τ a pulzusközi idő. $I_{(0)}$, Az A és a T_1 a háromparaméteres függvény variáblis paraméterei.

Azokban a kísérletekben, ahol MRI készülékeket használtunk, a különböző T₁-kel készült képeket számítógépre exportáltuk képcsomagok formájában. A kontrasztanyag által indukált szignálintenzitás változásból a relaxációs idő rövidülést (ΔR_1) a következő formulával számoltuk ki.

$$\Delta R_1 = 1/T_{1(\text{obs})} - 1/T_{1(o)} \quad (2)$$

Ahol $T_{1(\text{obs})}$ a kontrasztanyagot tartalmazó oldatban megfigyelt víz proton relaxációs idő, és $T_{1(o)}$ a tiszta víz relaxációs ideje. A relaxitás r_1 a következő képlettel számoltuk ki:

$$r_1 = \Delta \cdot R_1 / c \quad (3)$$

ahol a c a kontrasztanyag koncentrációját (mM-ban) jelöli.

4.3 EREDMÉNYEK

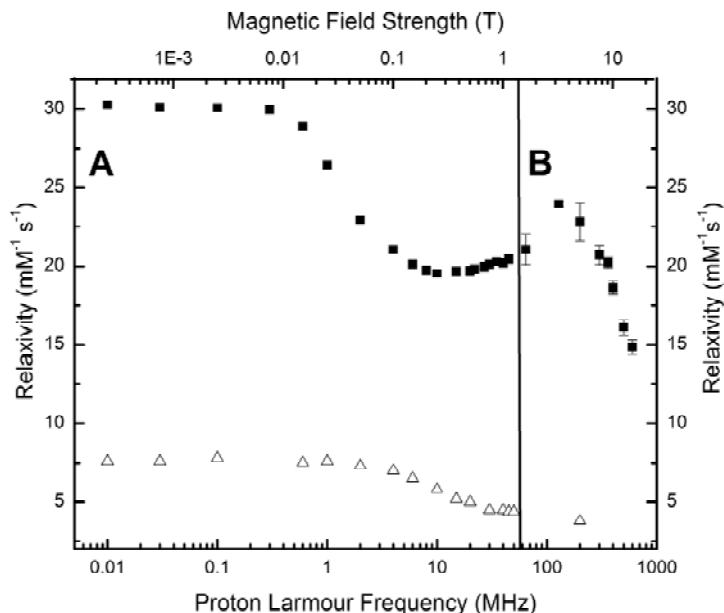


Figure 2 Field Dependency Profile of the longitudinal relaxivity of Gd(DTPA) and Gd(ABE-DTTA) **Figure 2 (A)** The relaxivities (■) of 0.5 mM aqueous solutions of Gd(ABE-DTTA) and of Gd(DTPA) (Δ) acquired with NMRD as a function of magnetic field strength. The Gd(DTPA) NMRD data were adapted from Kellar et al. (70). The measurements of Gd(ABE-DTTA) were carried out at 20 °C whereas the measurements of Gd(DTPA) were carried out at 25 °C. **Figure 2 (B)** The relaxivity at 20 °C of Gd(ABE-DTTA) (■) (n=12) and Gd(DTPA) carried out on a series of single field MRI and NMR instruments detailed in Table 1 as a function of magnetic field strength. The 4.7T datapoint for Gd(DTPA) (Δ), was adapted from Mikawa et al. (71). This study was carried out at 25 °C.

A 2. ábrán az NMRD készüléken mért relaxitás értékek (2A), valamint a 7 különböző egymazós gépen mért értékek (2B) láthatók a mágneses mező függvényében. Más kontrasztanyagokhoz hasonlóan, Gd(ABE-DTTA) (molekuláris súly=760) a maximális relaxitását 0.01 T alatti értékeken mutatja egy magas, 30 s⁻¹mM⁻¹ értékkel, amely

szokatlan egy kis molekula súlyú kontrasztanyagnál és amely csak makromolekuláris komplexekre jellemző.

Relaxivitása egyik lokális minimumot ($\sim 19\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) 0,2-0,3 T-nál (2A ábra) éri el. A jelenleg a klinikumban használt tipikus kontrasztanyagoktól eltérően a relaxivitása növekszik, ezen a ponton túl elérve egy lokális maximum értéket körülbelül 5T-nál (2B ábra) és ezután csökkenni kezd. Viszont, még 8,5T-nál is a relaxitás érték nem alacsonyabb 1,5T-nál mérténél. A jelenlegi klinikai gyakorlatban használt mágneses mezőnél, 1,5T-nál, a relaxitás $21,5\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ volt amely jelentősen nagyobb érték mint amit a jelenleg használatos kontrasztanyagoknál mérhetünk. Ahogy a mágneses mező növelésével a Gd(ABE-DTTA) relaxitása tovább növekedett, egy majdnem $24\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ maximum pontot elérve 3T-ás értéknél. Érdekes megjegyezni, hogy még 10T-a körül is a relaxitás még mindig a viszonylag magas $18,5\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ értéket mutatott.

4.4 KÖVETKEZTETÉSEK

A jelenség magyarázata ABE-DTTA ligand kémiai strukturájából adódhat, különös tekintettel a lipofil butyryl láncra. Az ilyen lipofil láncok micellák kialakulásához vezethetnek megnövelve ezáltal a reagáló komplexek effektív sugarát és így a megfigyelt mező-relaxitás összefüggést eredményezve. Függetlenül a jelenség pontos magyarázatától, valamint figyelembe véve a az MRI készülékek fejlesztésének trendjét amely egyre magasabb mezők használatát jelenti, a Gd(ABE-DTTA) egy használható kontraszt anyag lehet a magas mezőn mutatott erős relaxivitása miatt.

5. IN VIVO R1-ERŐSÍTÉS MAPPING KUTYA SZÍVIZOMBAN Gd(ABE-DTTA)-ceMRI HASZNÁLATÁVAL AKUT ISCHAEMIA-REPERFUSIO MODELLBEN

5.1 BEVEZETÉS

Az akut myocardialis ischaemia noninvasív ábrázolására alkalmas módszerre különösen nagy szüksége van. A ceMRI kevesebb rizikóval tudja kimutatni a myocardialis ischaemiát, de a jelenleg használatos ceMRI technikákat a felbontás és a vizsgált terület nagysága tekintetében még javítani kell. Jelen munkánkban az R1 mapping-ből származó eredményeinket mutatjuk be, amelyet egy hosszú életidejű kontrasztanyag (CA), Gd(ABE-DTTA), felhasználásával nyertünk és amely pixel-by-pixel alapú információt szolgáltat a myocardialis keringészavarról.

A bevezetőben részletezett okokból kifolyólag a szív háromdimenziós $\Delta R1$ térképe valódi reprezentációja a CA eloszlásának akár voxel-by-voxel szintig. Sajnos viszont a klinikumban jelenleg használatos MRI készülékekkel egy tipikus R1 mapping inversion recovery (IR) jelenleg 15 percig tart szívszeletenként.

Ebből következően a klinikumban jelenleg használatos kontrasztanyagok életideje túl rövid egy balkamra R1 mappinghez. Ezt a problémát megoldandó egy olyan kontrasztanyagot használtunk amely elegendő hosszú ideig marad a szövetekben egy R1 map elkészítéséhez.

5.2 MÓDSZEREK

Kísérleti modell

Tizenegy 17-19 kg-os kutyát használtunk fel az alkalmazott nyitott mellkasú, nem túlélő modellhez. Baloldali thoracotomia után az LAD coronária 1 cm-es szakaszát kireparáltuk annak teljes leszorításával ischaemiát indukáltunk.

Kísérleti protokoll

A 3-as ábrán a kísérleti protokollunk látható

	CONTROL	ISCHEMIA	REPERFUSION
Treatment	Normal flow in LAD Blue microspheres administered	Zero flow in LAD 5 th minute: Lemon microspheres administered	Post-ischemic flow in LAD 5 th minute: Eosin microspheres administered
Duration	40 min	30 min	40 min
MRI Sequences	Long and short axis cine images and IR images w/ various TIs acquired	From 10 th to 30 th minutes: Long and short axis cine images and IR images w/ various TIs acquired	From 10 th to 40 th minutes: Long and short axis cine images and IR images w/ various TIs acquired

Figure 3 Timeline of the experimental protocol. Left anterior descending coronary artery: LAD, inversion recovery (IR), inversion time (TI).

Perfúzió analízis microspherákkal

A myocardiális perfúziót meghatározandó a szövet- és vérmintákat Simor és munkatársai által leírtak alapján dolgoztuk fel.

Kontrasztanyag

A kontrasztanyagot az előző fejezetben leírtak alapján készítettük el és teszteltük.

MRI

Szelet orientáció

A 7 db rövid tengely szeletet tartalmazó rácsot a négyüregű hosszútengelyű cine kép végdiastolés képére illesztettük. Mivel a 30 perces ischaemiás periódus hosszúsága elégtelen lett volna a balkamra teljes leképezésére, egy, biztosan ischaemiás szeletet választottunk ki az R1 map elkészítéséhez. A cine MRI (általában SSFP szekvencia) képekből viszont a myocardiális funkciót a teljes balkamrára meghatároztuk.

Normalizált $\Delta R1$ mapping

1.5 Teszlás GE Signa Horizon CV MRI készüléken futó IR preparált segmented fast gradient echo szekvenciát használtunk az R1 méréshez. Az R1 értékek minden egyes region of interest-re (ROI) kiszámoltuk a TI- dependens szignálintenzitások alapján az alábbi összefüggés alapján.

$$SI = SI_0 (1 - A \cdot e^{-TI \cdot R1} + e^{-TR \cdot R1}) \quad (Eq 2)$$

Ahol az SI a megfigyelt szignálintenzitást jelöl, az SI_0 az equilibriumban mért szignálintenzitást, a TI az inverziós időt, a TR a ciklusidőt az A pedig egy ($A \leq 2$) paraméternek felel meg.

A jobboldali exponenciális kitevő a szignálsaturációt korrigálja. Két különböző felbontású post-aquiziációs kalkulációt végeztünk: a) R1 értékeket a mikroszféra perfúziós meghatározásnál alkalmazott fizikai szektoroknak megfelelően számoltuk ki, valamint b) az R1 értékeket voxel-by-voxel felbontással (egy voxel egy ROI-nak felelt meg) határoztuk meg, kihasználva ezzel az MRI által elérhető maximális felbontást.

MRI kép analízis

Az MRI képek analizisére az MR Analytical Software System (MASS) Version 5.0-t (Medis, Leiden, Netherlands) használtuk. A különböző TI-vel készült MRI képek egymásnak megfelelő ROI-ében mért szignálintenzitás értékekből határoztuk meg az R1 értékeket.

Myocardiális funkciót az SFFP movie-kból határoztuk meg.

Funkció és $\Delta R1$ analízis

Szignálintenzitást (SI) adatok minden egyes ROI-re megmértük. Ugyanabban az ROI-ben a myocardiális funkciót, úgymint falvastagodást (WT) és falmozgást (WM) meghatároztuk.

Az R1 értékeket minden egyes ROI-re meghatároztuk és a teljes szívszeletre egy R1 map-et hoztunk létre. A kontrasztanyag által indukált és az Eq 3 által meghatározott R1 erősítés arányos az adott voxelben kialakult CA koncentrációval.

$$\Delta R1_{ca} \sim R1_0 \cdot [CA] \quad (\text{Eq 3})$$

Ahol az $R1_0$ a prekontraszt R1.

Ez a koncentráció perfúziófüggő és így a $\Delta R1$ értéke egy adott pixelben a perfúzióval arányos. Egy adott pixelben a kontrasztanyag jelenlétében a megfigyelt relaxációs ráta ($R1_{obs}$) a kontrasztanyag nélkül kialakuló relaxációsráta és a kontrasztanyag indukált $\Delta R1$ összege. Ezért

$$\Delta R1_{ca} = R1_{obs} - R1_0 \quad \text{Eq(4)}$$

A megfelelő myocardiális perfúzió (MP) értékekkel összehasonlítva azok a szektorok amelyek 0.8 s^{-1} $\Delta R1$ értékkel rendelkeztek, ischaemiás ROI-knek tekintettük ($\Delta R1_{cai}$). Ennek megfelelően azok a szektorok amelyek $\Delta R1$ értéke nagyobb volt mint 0.8 s^{-1} nem ischaemiás, remote, ischaemiától távoli szektoroknak tekintettük. Azért, hogy a különböző mértékű kontrasztanyag felvétel következtében az individuális kutyák között kialakult különböző kontrasztanyag koncentrációt kiegyenlítsük, a $\Delta R1$ értékeket minden egyes állatban a nonischaemiás területeken megfigyelt $\Delta R1$ ($\Delta R1_{car}$) értékekre normalizáltuk.

$$\Delta R1_n = \Delta R1_{cai} / [\Delta R1_{car}] \quad \text{Eq(5)}$$

A így kiszámolt értékeket az anatómiai helyzetüknek megfelelően helyeztük el. Így ezen összes ROI-ból származó normalizált $\Delta R1_n$ adatok egy adott kutyában egy R1 erősítés képet adnak, amely megfelel a myocardiális perfúzió eloszlásának.

Regionális funkció analízis:

A $\Delta R1_n$ térképnek megfelelő regionális funkció map-et hoztunk létre. Minden egyes szektor myocardiális funkcióját összehasonlítottuk az adott szektor myocardiális perfúzió és $\Delta R1_n$ értékével.

Pixel-by-pixel képanalízis:

A myocardium $\Delta R1$ értékeinek magas rezolúciójú meghatározása érdekében a 8 különböző TI-vel készült, egymásra helyezhető 60*60 pixel méretű képrészletet vágunk ki, amely tartalmazta a balkamrát. A pixel-by-pixel $R1$ értékek meghatározása érdekében egy automatizált algoritmust alkalmaztunk, amely az Eq2-t használta a számítás során.

Perfúziós map:

Egy adott pixelben mért relaxációs ráta, következésként a $\Delta R1_n$ arányos a CA koncentrációjával. Ez a koncentráció perfúziófüggő, így a $\Delta R1_n$ értéke egy adott pixelben arányos a perfúzióval. Ezen összefüggés alapján a pixel-by-pixel $\Delta R1_n$ map átalakítható pixel-by-pixel perfúziós map-pé (PM).

Percent Perfusion Map (PPM)

A $\Delta R1_n$ értékek perfúziós értékké történő konverziójához megkerestük azt a pixel, amelyben a maximális $\Delta R1_n$ értéket ($\Delta R1_{nmax}$) mértük. Azért, hogy minden egyes voxelben meghatározzuk a Percen Perfusion értéket, a következő levezetést alkalmaztuk:

$$\begin{aligned} \Delta R1_{nmax} &\sim \text{Perfúzió}_{max} \\ \Delta R1_{nmin} &\sim \text{Perfúzió}_{min} \end{aligned} \quad \text{Eq(6)}$$

$$\Delta R1_n \sim \text{Perfúzió}$$

$$\Delta R1_n / \Delta R1_{nmax} = \text{Perfúzió} / \text{Perfúzió}_{max}$$

$$\text{Perfúzió} = (\Delta R1_n / \Delta R1_{nmax}) * \text{Perfúzió}_{max} \quad \text{Eq(7)}$$

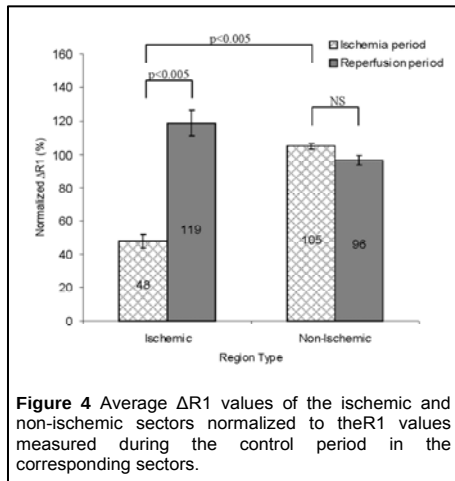
Tehát, egy adott pixel perfúzióját egy adott balkamrában belül kifejezhetjük, mint a maximális perfúzió százalékát, a Percent Perfusion (PP) paraméter bevezetésével, amelyet az Eq5 alapján számítunk ki :

$$PP = (\Delta R1_n / \Delta R1_{nmax}) * 100 \quad \text{Eq(8)}$$

A voxelek PP értéke alapján egy Percent Perfusion Map hozható létre.

Statisztikai analízis

Az adatain analízására SigmaStat version 3.0-t (SPSS, Inc) használtunk.



5.3 EREDMÉNYEK

A 4-es ábra a 11 kutyaszív ischaemiás (n=47) és nem-ischaemiás (n=94) szektoraiban mért $\Delta R1_n$ értékeit és a hozzájuk tartozó SD értékeket mutatja. Normalizált $\Delta R1$ értékeket használva (lásd MÓDSZEREK) az összes $\Delta R1$ érték az állatoktól független, egymással összehasonlítható.

A CA beadását követően az ischaemiás periódusban szignifikáns $\Delta R1_n$ különbséget találtunk az ischaemiás és a non-ischaemiás ROI-k között, amelyet Mann-Whitney teszttel igazoltunk ($p < 0,001$). A korábban ischaemiás területeken a reperfúzió során ez a különbség nemcsak hogy eltűnt, de –nagy valószínűséggel a hyperaemiának és az annak

következtében kialakult magasabb CA koncentrációnak köszönhetően– a $\Delta R1_n$ érték magasabb lett. Ez a különbség viszont nem volt szignifikáns. A 6. ábrán a kutyák egyikének ischaemiás szívseletéből származó $\Delta R1_n$, WT és WM map-eket és a hozzájuk tartozó MP adatokat ábrázoltuk. Hasonló színskálát használtunk, hogy a $\Delta R1_n$, a myocardiális perfúzió, és a két myocardiális funkció map-jei közötti összefüggéseket megfelelően ábrázolhassuk (Fig. 6).

Páronkénti korrelációt határoztunk meg a $\Delta R1_n$ és WT, a $\Delta R1_n$ és WM, valamint a $\Delta R1_n$ és MP értékei között a 11 kutyában talált összes ischaemiás szektorban. Az analízishez Pearson's Product Moment Correlation-t használtunk. A korrelációs koefficiensek értékeit a 3. táblázatban soroltuk fel.

Parameters	Correlation coefficient (R)	p value
$\Delta R1_n$ vs. MP	0.694	P<0.005
$\Delta R1_n$ vs. WT	0.534	P<0.005
$\Delta R1_n$ vs. WM	0.529	P<0.005

5.4 KÖVETKEZTETÉSEK

Ezen tanulmányunk a Gd(ABE-DTTA)-val végzett normalizált $\Delta R1$ mapping használhatóságát mutatja be myocardiális perfúzió mérés –következésként az ischaemiás régiók kvantitatív *in vivo* értékelése– esetén. A $\Delta R1_n$ map CA koncentráció myocardiumban kialakuló eloszlását mutatja, így az ischaemiát nemcsak vizualizálni képes, hanem annak kiterjedését is kvantifikálja. $\Delta R1_n$ mapping effektívebben mutatja a CA által indukált R1 növekedést, mint a hagyományos T1 súlyozott szignálintenzitáson

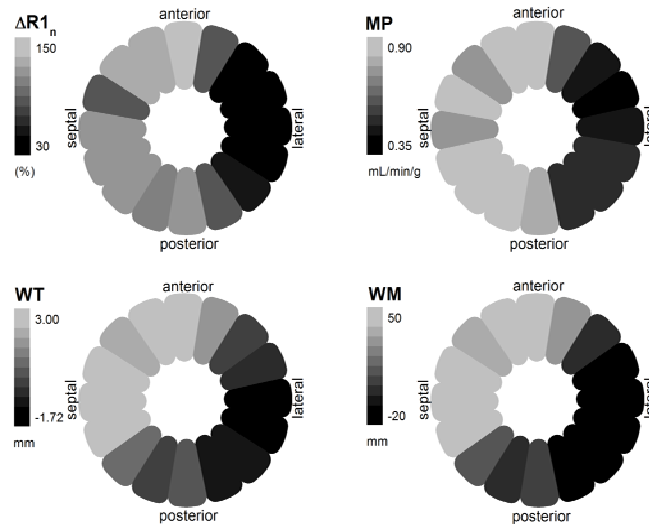


Figure 6 Each rosette illustrates one of the maps: $\Delta R1$, MP, WT, and WM, as a function of the position of a given myocardial sector. Similar colors for all parameters were applied to emphasize the correspondence among the parameters.

alapuló képek. Egy ilyen fajta térképezésnek viszont egy olyan CA-ra van szüksége, amelynek életideje a myocardiumban elég hosszú ahhoz, hogy az R1 pontos meghatározásához szükséges relatíve hosszú akvizíciós időt lehetővé tegye. Gd(ABE-DTTA) egy olyan kontrasztanyag, amely az elégségesen hosszú myocardiális életidejével gyakorlatilag változatlan koncentrációt biztosít egy komplett R1 szett akvizíciója során.

6. UGYANAZON MÓDSZER HASZNÁLATA EGY MÁS BETEGSÉGBEN: PROSTATATA NEOPLASIA VIRTUÁLIS *in vivo* BIOPSZIA TÉRKÉPE TRAMP EGEREKBEN.

6.1. BEVEZETÉS

A Prostatata Intraepitheliális Neoplasia (PIN) a prosztata egy precancerosus állapota, amely a legtöbb betegben 10 éven belül prostatarákká fejlődik. Egy noninvazív módszer, pl. egyfajta MRI metódus, amely ezt a korai markert detektálni tudná, nagy előnyt jelentene. Az eredményeink azt mutatják, hogy a laboratóriumunkban kifejlesztett kontrasztanyag, Gd(ABE-DTTA), a TRAMP egerek prostatájában, a szöveti ráksejt tartalommal fordított arányban oszlik el. Egy olyan módszert használtunk amely kombinálta a kontrasztanyagunk jelenlétében kivitelezett ceMRI-t egy különösen hasznos képanalizáló módszerrel, az R1 térképezéssel. Kísérleteinkben 12 TRAMP és 3 kontroll egérben sikerült különbséget tennünk a normál és alacsony PIN szövetek és a magas PIN és jól differenciált adenocarcinoma között.

6.2. MÓDSZEREK

Kontrasztanyag (Gd(ABE-DTTA))

A kontrasztanyagot az előzőekben leírtak alapján készítettük el és teszteltük.

Anesthesia és kontrasztanyag beadás az MRI-t megelőzően

Az egereket kezdetben 0,15 vol % isoflorannal altattuk el, majd az anesthaesiát 0,12vol% koncentrációval tartottuk fenn. A kontrasztanyagot a farokvénába injektáltuk, az alkalmazott dózis 0,05 μ mol/testsúly gramm volt. Az egereket ezek után egy MRI tekercsbe helyeztük.

MRI

Egy 4.7T Bruker MRI készüléket használtunk, amely egy 78 mm átmérőjű „body coil”-al volt felszerelve. A kezdeti beállítások (tuning, shimming, erősítő beállítás, stb) után a prostata pozíciójának meghatározása érdekében egy gyors T2 súlyozott képcsomagot gyűjtöttünk. Ezek után egy 2 mm vastag tomografikus szeletet jelöltünk ki, amely az egész prostatát tartalmazta és amely általában a közepén magába foglalta az urethrát. Ezt a szeletet használtuk a prosztata R1 map meghatározására, inversion recovery (IR) szekvenciát alkalmazva a következő paraméterekkel: FOV: 5 cm, matrix: 128x128, voxel méret: 0.39mmx0.39x2.0mm, szeletszám: 1, ciklusidő (TR): 3000 ms, inverziós idők (TI): 60,100,200,300,600,800,és 1000 ms. A kísérlet végén a még mindig anaesthetizált állatokat ketamin és xylazine keverékével túlaltattuk, amelyet cervicalis diszlokáció követett.

R1 map:

Egy 60x60 pixeles Region of Interest (ROI)-et választottunk ki. Ez a képek azon része volt, amely a prostata mindkét lebenyét tartalmazta. Ebben a 60x60-as mátrixban határoztuk meg a prostaták R1 térképét a szignálintenzitás és TI idők összefüggése alapján, a korábbiakban leírtak alapján.

Normalizált R1 Map és Neoplastic Index Map:

A különböző állatokban meghatározott R1 értékek különbségének eliminálása érdekében az R1 értékeket a combizomban meghatározott R1 értékekre normalizáltuk ($R1_{norm}$). Megfigyeltük, hogy a kontrasztanyag beadását követően a legalacsonyabb relaxivitású

voxelek ($R1_{lo}$) egy adott prostatán belül azon szöveti területeknek felelnek meg, amelyek PIN3-4 hystologiai score-t mutatnak (lásd: MÓDSZEREK) A legnagyobb relaxivitású területek ($R1_{hi}$) viszont azon területek voltak, amelyek a legkevesebb PIN3-4 területet tartalmazták. Tehát egy adott voxel relaxivitását a PIN1-2 vs. PIN3-4 szövetek relatív aránya határozza meg. Következésként egy adott voxel $R1$ értéke ($R1_v$) a ($R1_{hi}$)-tól ($R1_{lo}$)-ig terjedő skálán helyezkedik el. Így a különbség $\Delta_v = R1_{hi} - R1_v$ az adott voxel neoplasticitásával van összefüggésben. Ha az $R1_v = R1_{lo}$ akkor Δ_v eléri maximális értékét teljes neoplasticitást mutatva az adott voxelben. Ebből következően egy százalékos neoplasticitási index (NI_v) számolható ki minden egyes voxelben a Δ_v maximális $R1$ skálára történő normalizálásával (Eq 2)

$$NI_v = \frac{\Delta_v \cdot 100}{R1_{hi} - R1_{lo}} \quad \text{Eq 2}$$

NI_v 100%-os értéket mutat amikor az $R1_v = R1_{lo}$ (maximális neoplasticitás) és nulla mikor $R1_v = R1_{hi}$ (teljes mértékben normál szövet) így az összes voxel NI értékének meghatározása után a prostata pixel by pixel $R1$ térképe voxel-by-voxel NI térképpé konvertálható amely kvantitativ reflektálja a minden voxel neoplasma-tartalmát. Az összes prostata voxel NI_v értékének alapján, azon sejtek térfogata amelyeknek szövettani score-ja a PIN3-at meghaladja a Equation 3 alapján kiszámolható:

$$NV = V_v \cdot \sum_{v=1}^n NI_v \quad \text{[Eq 3]}$$

Ahol V_v a voxel térfogat, az n a prostata voxelek száma

A kísérleteinkből származó NV értékeket a 4-es táblázatban ábrázoltuk.

Table 4. Total prostate volume, mean NI ($\overline{NI}$), NI border values, neoplastic volume values, acquired in the twelve TRAMP mice, are shown. The lowest NI values acquired in a region with a histological score 3 or above were considered NI border values.

	Prostate Volume (μL)		NI Border Value	Neoplastic Volume (μL)
TRAMP 1	266	0.68	64	181
TRAMP 2	120	0.70	69	84
TRAMP 3	84	0.77	70	64
TRAMP 4	80	0.75	64	60
TRAMP 5	91	0.62	69	57
TRAMP 6	313	0.68	68	213
TRAMP 7	216	0.71	76	153
TRAMP 8	275	0.57	62	157
TRAMP 9	145	0.61	65	88
TRAMP 10	124	0.71	61	88
TRAMP 11	413	0.62	62	256
TRAMP 12	157	0.70	65	109

Szövettani analízis

A prostatát tartalmazó blokkot hystológiai analízis céljára kivágtuk, amelyet az urethra mentén horizontálisan félbevágtunk és 5 μm vastag szeleteket készítettünk. A mikroszkópos metszeteken a hystológiaiilag homogén régiók területét, amelyek a normalizált $R1$ map-eken felismerhetők voltak, megmértük és a hystológiai score-ukat meghatároztuk.

A nem rákos szövetek 1,2 vagy 3-as score-t kaptak, amely egészséges, alacsony grade PIN és magas grade PIN-t jelentett, ebben a sorrendben. A 4-es score jól differenciált adenocarcinómát jelentett. Ezen területeknek megfelelő areákat a kalkulált $R1$, normalizált $R1$ és NI térképeken szintén megmértük. Mindegyik régióban frakcionális neoplasziás területet számoltunk ki (neoplasziás terület/total prosztatalebens terület) mind a

szöveti metszeteken, mind pedig az R1 térképeken. Az egyéb MRI paramétereket (normalizált R1,NI) szintén megmértük a megfelelő régiókban és további analízisre exportáltuk.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízisre SigmaStat 2.03 verziójú (SPSS, Inc) szoftvert használtunk.

6.3 EREDMÉNYEK

A 13-as ábrán a szövettani metszeteken és az MRI képeken meghatározott prostata területek koregisztrációja látható a hystológiai score megjelenítésével. A 14-es ábrán pedig a frakcionális neoplasiás területek értékének összevetése látható, amelyet az MRI képeken és a hystológiai metszeteken mértünk.

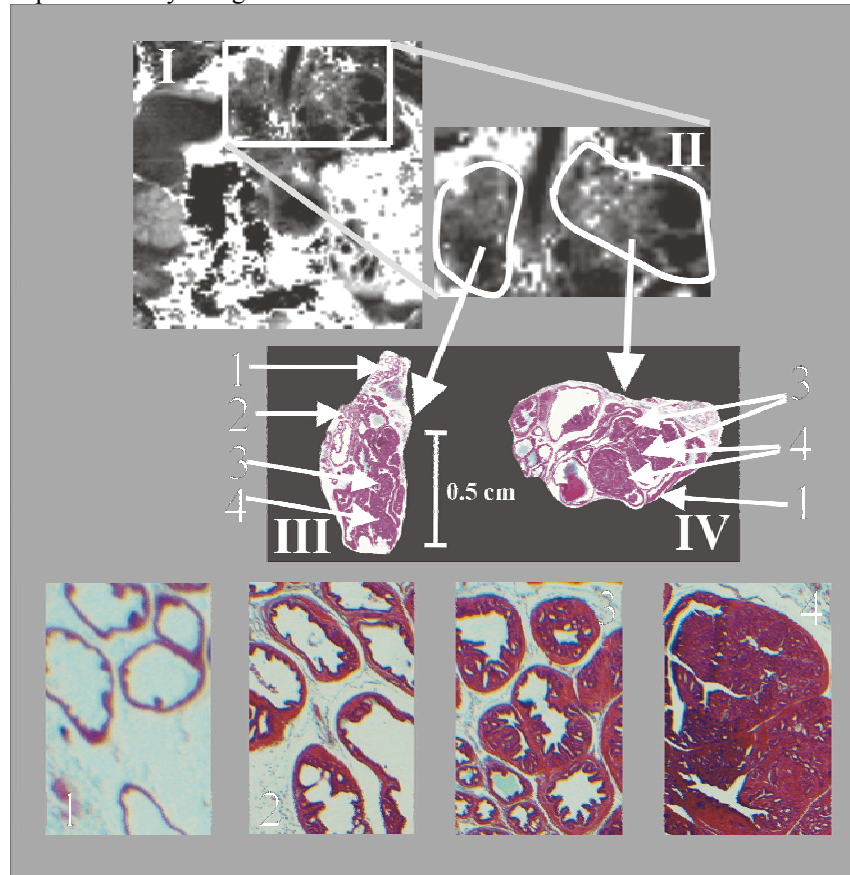
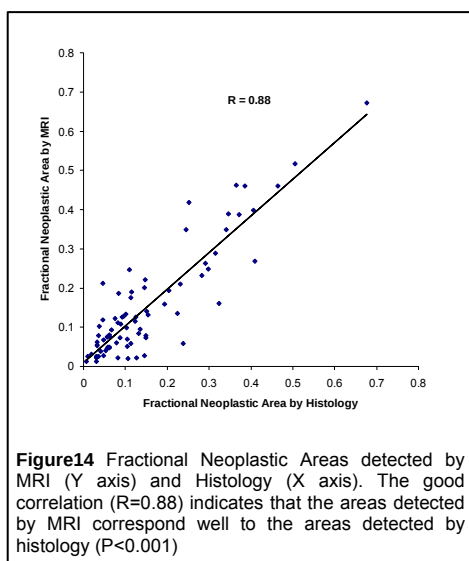


Figure13 The calculated R1 map (I), the magnified section of the prostate (II), and the histological sections of the two lobes (III-left lobe, IV-right lobe) are shown. Normal (score 1), low grade PIN (score 2), high grade PIN (score 3) and well differentiated adenocarcinoma (score 4) can be identified. The white arrows indicate the position of areas with different histological scores in the prostate tissue.

6.4 KÖVETKEZTETÉSEK

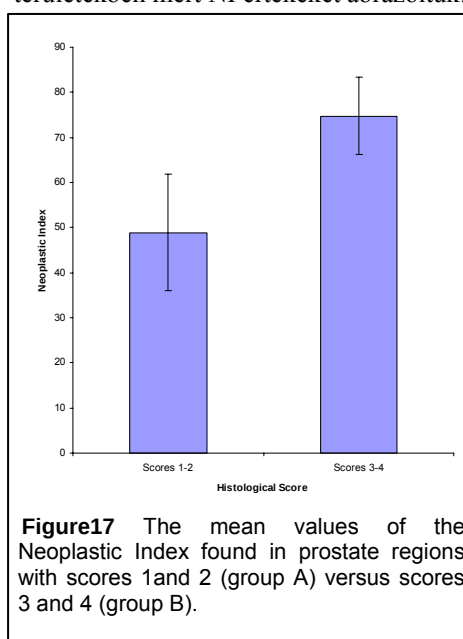
Az eredményeink alapján a Gd(ABE-DTTA) a prostata szövetben a prostata szövet neoplasziás tartalmával fordított arányban oszlik el a TRAMP egér modellben. Tehát egy adott prosztata volumen R1 értéke a PIN 3-as és 4-es score-ba sorolható neoplasziás szövetek aránya határozza meg. Ebből



Következésként megállapítható, hogy egy non-invazív metódus, a Gd(ABE-DTTA) jelenlétében készített R1 térkép sikeresen különbséget tudott tenni a prostata neoplasia korai és előrehaladott formája között TRAMP egerekben.

7. DISZKUSSZIÓ

Jelen munkánkban sikerült bizonyítanunk, hogy a Gd(ABE-DTTA) sikeresen használható high field-en R1 mérés céljából és így R1 térképek készítésére. A Gd(DTPA) amely a leggyakoribb klinikai kontrasztanyag, relaxivitása a mágneses mező erősségének növekedésével csökken. Gd(ABE-DTTA) viszont very high field-en, kb. 5 T-nál mutatott maximális relaxivitást (2B ábra). Ahogy az eredményeink mutatják ez a kontrasztanyag 1,5 és 10T között bármilyen mezőnél használható anélkül, hogy lényegesen csökkenne a hatásossága. A myocardiális ischaemia kutyakísérleteinkben a CA ischaemiás vs. nonischaemiás miocardiumban mutatott eloszlási különbsége alapján, a $\Delta R1_n$ értékek szignifikánsan



alacsonyabbak voltak az ischaemias régiókban, mint a nonischaemias területeken az ischaemias periódus során.

A reperfüzió során ez a különbség eltűnt (4. ábra). Az individuális kísérletekben mért ΔR_1 értékek összefüggést mutattak a regionális funkció paraméterekkel, amelyet MRI-jal határoztunk meg (WT, WM). Ugyanezt az összefüggést találtuk a MP értékekkel (6. ábra). A jó összefüggés a különböző paraméterek között nyilvánvaló. A csökkent perfúziójú területek tisztán mutatkoznak a ΔR_{1n} térképen.

Szintén jó összefüggés figyelhető meg a ΔR_{1n} térkép által meghatározott csökkent perfúziójú szektorok lokalizációja és az MP térképen látható lokalizációk között. Bemutattuk a Gd(ABE-DTTA) használata mellett mért ΔR_{1n} map-ek maximális felbontását myocardiális perfúzió meghatározásakor. Miután a korellációt az MP és ΔR_{1n} meghatároztuk, a pixel-by-pixel a ΔR_{1n} térkép transzformálható PP térképpé ugyanolyan magas rezolúcióval. Érdemes kiemelni, hogy ezzel a módszerrel az elérhető rezolúció sokkal magasabb, mint a –postmortem „goldstandard”-nek tekintett– microsphaerás perfúzió meghatározásnál elérhető 1 cm³-es felbontás.

A mi kontrasztanyagunkkal és módszerünkkel (R1 mapping) egy teljesen más betegség, a prostatarák, modelljét tanulmányoztuk TRAMP egerekben, hogy lássuk vajon használhatók-e diagnosztikus célra egy ilyen betegségben is. A post-contrast átlag normalizált R1 érték, amelyet a magas grade PIN és jól definiált carcinomákban mértünk, nem különbözött a pre-contrast értéktől. Ebből arra következtethetünk, hogy a magas grade PIN és WD régiók nem vettek fel Gd(ABE-DTTA)-t, ellentétben a normál és alacsony grade PIN régiókkal. Egyik lehetséges magyarázat, amely alátámasztja a megfigyeléseinket, a neoplasias prostata területeken kialakuló abnormális élfalszerkezet. Ozava és munkatársai számoltak be ilyen abnormális övezetről prostatában. Az abnormális élfal-szerkezet csökkentheti a kontrasztanyag bejutását a magas grade-del rendelkező prostata területekre, csak úgy, mint ahogy a chemoterápiás gyógyszerek is gyakran nem jutnak el a tumorokba. A mi eredményeink a humán gyakorlatban találtakkal ellentétesek, ahol is a post-contrast MRI szignálintenzitás magasabb a rákos területeken, mint a normál szövetekben. Az eredményeink viszont jól megérthetők a Jain és munkatársai által leírtak tükrében. Ők azt találták, hogy a tumorokban az angiogenezis fejlődés alatt egy bizonyos időablakban a pro- és antiangiogenikus faktorok (thrombospondin-1 és VEGF) egyenlőtlen termelődése következtében a tumorszövet vérellátása az abnormális érszerkezet miatt károsodik.

Összefoglalva a mi módszerünk egész prostatán végzett post-mortem biopsiának felel meg, amelyet élő organizmuson végeztünk. A mi módszerünk tulajdonképpen egy *in-vivo* biopsia map-et eredményezett (VBM).

Munkánkban különböző betegségek modelljeiben bizonyítottuk, hogy egy olyan kontrasztanyag jelenlétében készült R1 map, amely hosszú élettartammal és a high field-en megtartott relaxivitással rendelkezik, kvantitatív és reprodukálható információkat szolgáltat a klinikusok részére.

8. ÚJ FELFEDEZÉSEK

8.1 A Gd(ABE-DTTA) különleges field-relaxivitas összefüggésére derült fény; nem úgy mint a legtöbb kereskedelemben kapható MRI kontrasztanyag, a Gd(ABE-DTTA) a maximum relaxivitas erősítést kb. 5T-nál mutatta. Ez alkalmassá teszi a high-

field-en történő használatra. Ez egy lényeges felfedezés az MRI készülékek fejlődésének jelenlegi irányának ismeretében.

8.2 A szignálintenzitáson alapuló perfúzió vizsgálat tökéletlensége leginkább a „single image” módszer jellegéből következik, úgymint a field inhomogenitás, coil effektus, stb. Az R1 mérés viszont ezen hatások legfőbbjét eliminálni képes. Jelenleg a legtöbb MRI készüléken az R1 mérés ideje meghaladja a kereskedelembe kapható kontrasztanyagok féléletidejét. Gd(ABE-DTTA) elég hosszú életidővel rendelkezik a vérben ahhoz, hogy egy ilyen paramétert a jelenlétében megmérjünk. Sikeresen használtuk egy myocardiális ischaemia-reperfúzió kutya modellben kvantitatíven és reprodukálhatóan meghatározandó a myocardiális ischaemiát voxel-by-voxel felbontással.

8.3 A legtöbb prosztaták detektálására alkalmas MRI módszer a betegséget csak a késői, előrehaladott fázisában tudja vizualizálni. A mi kontrasztanyagunk és módszerünk használatával sikeresen detektáltuk a prosztatában intraepitheliális neoplasziát a korai szakaszában TRAMP egerekben és meg tudtunk különböztetni PIN1-2 sejteket tartalmazó egérprostata voxeleket a PIN3-4 sejteket tartalmazóktól.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm az önzetlen segítségét az alábbiakban felsorolt tanárainknak, barátainknak és munkatársainknak:

Gabriel A Elgavish, PhD
Simor Tamás, MD, Ph.D.
Papp Lajos, MD, D.Sc.
Róth Erzsébet, MD, D.Sc.
Juhász-Nagy Sándor, MD, D.Sc. †
Horvath Iván, MD, PhD,
Szokodi István, MD, PhD
Tóth Miklós, MD, DSc
Surányi Pál, MD, PhD
Ruzsics Balázs, MD, PhD
Cziráki Attila, MD, PhD
Isam A Eltoun, MD
Hejmel László, MD, PhD
Brandy Jewell
Kekesi Violetta, PhD
Kovacs Attila
Lénárd László, MD, PhD
Szendrei Eszter
Huadong Zeng, PhD

Szintén hálával tartozom családomnak a szeretetért és megértésért.

10.1 PAPERS – RELATED TO THESIS

1. **P. Kiss**, P. Suranyi, T. Simor, N.H. Saab-Ismail, A. Elgavish, L. Hejjel, G.A. Elgavish: *In Vivo* R1-Enhancement Mapping of Canine Myocardium Using ceMRI with Gd(ABE-DTTA) in an Acute Ischemia-Reperfusion Model. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*; *J Magn Reson Imaging*. 2006 Sep;24(3):571-9. **IF: 1.651**
2. B. Ruzsics, P. Surányi, **P. Kiss**, B.C. Brott, A. Elgavish, N.H. Saab-Ismail, G.A. Elgavish: Gd(ABE-DTTA), a novel contrast agent, at the MRI-effective dose shows absence of deleterious physiological effects in dogs. *Pharmacology*. 2006;77(4):188-94. *Epub* 2006 Jul 27. **IF:1.019**
3. P. Surányi, **P. Kiss**, T. Simor, A. Elgavish, G.A. Elgavish: A combined method for the determination of myocardial perfusion in experimental animals using microspheres and MRI. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*; 2007;9(3):549-56. **IF:2.016**
4. P. Suranyi, **P. Kiss**, B.C. Brott, T. Simor, A. Elgavish, B. Ruzsics, N.H. Saab-Ismail, G.A. Elgavish: Percent Infarct Mapping – A R₁-map Based ceMRI Method for Determining Myocardial Viability Distribution. *Magn Reson Med*. 2006 Sep;56(3):535-45. **IF: 3.405**
5. P. Suranyi, **P. Kiss**, B. Ruzsics, B.C. Brott, T. Simor, A. Elgavish, R.A. Baker, N.H. Saab-Ismail, G.A. Elgavish: In Vivo Myocardial Tissue Kinetics of Gd(ABE-DTTA), a Tissue-Persistent Contrast Agent. *Magn Reson Med*. 2007 Jul;58(1):55-64. **IF: 3.405**
6. P. Suranyi, **P. Kiss**, B. Ruzsics, B.C. Brott, T. Simor, G.A. Elgavish: Equilibrium Signal Intensity-Mapping, an MRI Method for Fast Mapping of Longitudinal Relaxation Rates and for Image Enhancement. *Magn Reson Imaging*. 2007 Jun;25(5):641-51. *Epub* 2006 Nov 21. **IF: 1.672**
7. B. Ruzsics, P. Surányi, **P. Kiss**, B. C. Brott, S. Litovsky, T.S. Denney Jr, I. Aban, S.G. Lloyd, T. Simor, G.A. Elgavish, H. Gupta: Myocardial strain in sub-acute peri-infarct myocardium. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2009 Feb;25(2):151-9. **IF: 1.268**
8. B. Ruzsics, P. Surányi, **P. Kiss**, B. C. Brott, S.S. Singh, S. Litovsky, I. Aban, S.G. Lloyd, T. Simor, G.A. Elgavish, H. Gupta: Automated multidetector computed tomography evaluation of subacutely infarcted myocardium. *J Cardiovasc Comput Tomogr*. 2008 Jan;2(1):26-32. *Epub* 2007 Nov 19. **IF: not yet available**
9. B. Ruzsics, P. Surányi, **P. Kiss**, B. C. Brott, A. Elgavish, T. Simor, G.A. Elgavish: Head-to-head comparison between delayed enhancement and percent infarct mapping for assessment of myocardial infarct size in a canine model. *J Magn Reson Imaging*. 2008 Dec;28(6):1386-92. **IF: 1.651**

10. **P. Kiss**, I. A. Eltoun, P. Suranyi, H. Zeng, T. Simor, A. Elgavish, G. A. Elgavish: Virtual in vivo Biopsy Map of Early Prostate Neoplasm in TRAMP Mice by MRI. *Prostate*. 2009 Apr 1;69(5):449-58. **IF:2.601**

10.2 PAPERS – NOT RELATED TO THESIS

1. I. Szokodi, F. Horkay, B. Merkely, F. Solti, L. Geller, **P. Kiss**, L. Selmecci, V. Kekesi, O. Vuolteenaho, H. Ruskoaho, A. Juhasz-Nagy, M. Toth: Intrapericardial infusion of endothelin-1 induces ventricular arrhythmias in dogs. *Cardiovascular Research*. 38(2):356-64, 1998 May. 98375058 **IF: 3.092**

10.3 SUPPLEMENTS

1. F. Horkay, I. Szokodi, B. Merkely, F. Solti, L. Geller, **P. Kiss**, L. Selmecci, I. Horvath, V. Kekesi, A. Juhasz-Nagy, M. Toth: Potential pathophysiologic role of endothelin-1 in canine pericardial fluid. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 31 Suppl 1:S401-2, 1998. 98257852 **IF: 1.709**

2. I. Szokodi, F. Horkay, **P. Kiss**, L. Selmecci, I. Horvath, O. Vuolteenaho, H. Ruskoaho, A. Juhasz-Nagy, M. Toth: Characterization of canine pericardial fluid endothelin-1 levels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 31 Suppl 1:S399-400, 1998. 98257851 **IF: 1.709**

3. P. Turbucz, **P. Kiss**, F. Horkay, I. Szokodi, R. deChatel, L. Selmecci, A. Juhasz-Nagy, I. Karadi, M. Toth: High pericardial fluid levels of endothelin are not caused by altered neutral endopeptidase activity in cardiac patients. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 31 Suppl 1:S287-9, 1998. 98257817 **IF: 1.709**

4. **P. Kiss**, I. Horvath, I. Szokodi, P. Toth, V. Kekesi, A. Juhasz-Nagy, M. Toth: Endothelin does not interact with angiotensin II in the coronary vascular bed of anesthetized dogs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 31 Suppl 1:S103-5, 1998. 98257768 **IF: 1.709**

10.4 ORAL PRESENTATIONS

1. **P. Kiss**, P. Suranyi, T. Simor, N.H. Saab-Ismael, A. Elgavish, L. Hejjel, and G.A. Elgavish *In Vivo* T1 Mapping of Canine Hearts Using Gd(ABE-DTTA) in an Ischemia-Reperfusion Model. *Oral presentation at the Annual Meeting of The International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Toronto, ON, Canada, July 10-16, 2003*

2. **P. Kiss**, P. Surányi, B. Ruzsics, B.C. Brott, T. Simor, and G.A. Elgavish: Ex Vivo Percent Infarct Mapping Using Gd(DTPA): R1-Based MRI Quantification of Myocardial Viability. *Oral presentation at the 14th Annual Meeting of the North American Society for Cardiac Imaging 2006, Las Vegas, Nevada, USA*

10.5 POSTER PRESENTATIONS

1. **P. Kiss**, A. Gustin, D. Buchsbaum, T. Simor, L. Lenard, S. Vickers, and G.A. Elgavish ¹⁹F NMR As a Tool to Measure The Efficiency of Adenoviral CD Gene Transfer. In Vitro and In Vivo Monitoring of 5-FC to 5-FU Conversion. *Poster presentation at the Annual Meeting of The International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Denver, CO, USA, April 1-7, 2000*
2. **P. Kiss**, L. Lenard, T. Simor, J. Forder, R. Mentor, A. Elgavish, and G.A. Elgavish MR Imaging As a Tool to Monitor Prostate Tumor Development in Mice with Mutant p53 Gene *Poster presentation at the Annual Meeting of The International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Glasgow, Scotland, UK, April 21-27, 2001*
3. **P. Kiss**, T. Simor, L. Lenard, L. Hejjel, P. Suranyi, N.H. Saab-Ismail, and G. A. Elgavish Relaxivity of Gd(ABE-DTTA) Increases with Magnetic Field Strength Up to 5T. A Contrast Agent for High Field Imaging. *Poster presentation at the Annual Meeting of The International Society for Magnetic Resonance in Medicine, Honolulu, Hawaii, USA, May 18-26, 2002*
4. **P. Kiss**, A. Elgavish, I-E. Eltoum, P. Suranyi, H. Zeng, T. Simor, B. Ruzsics, G. A. Elgavish: Early Detection of Prostate Neoplasm Using Pixel-by-pixel R1 Mapping Following Gd(ABE-DTTA) Administration in TRAMP Mice. *Poster presentation at the 14th Annual Meeting & Scientific Sessions of International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 2006, Seattle, Washington, USA.*

10.6 PATENT

G. A. Elgavish, P. Suranyi, T. Simor and **P. Kiss**: Differentiation of Tissue Clinical Parameters Using Nuclear Magnetic Resonance Techniques. Provisional Patent, U.S. Patent and Trademark Office No. 45,587. Docket Number **P72418US00GP**