

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 tüneteikért 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 hypotonicitás 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 szignálsökkenés 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 nőstény, 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 -ról $840 \pm 66 \mu\text{m}^2/\text{s}$ -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 különbözőnek tűnnek. 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.)