

Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék MR kontrasztanyagként való felhasználási lehetősége intrakraniális tumorokban

Doktori értekezés

Dr. Várallyay Péter

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Nagy Zoltán D.Sc., professor emeritus

Hivatalos bírálók: Dr. Dósa Edit Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bajzik Gábor Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsgabizottság elnöke:
Dr. Alpár Alán D.Sc., egyetemi tanár

Komplex vizsgabizottság tagjai:
Dr. Kovács Tibor Ph.D., egyetemi docens
Dr. Madarász Emília D.Sc., professor emerita

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	5
3. IRODALMI HÁTTÉR	7
3.1. Központi idegrendszeri barrierek.....	7
3.2. Circumventriculáris szervek	8
3.3. A vér–agy-gát	8
3.3.1. A vér–agy-gát általános jellemzése és a neurovaszkuláris egység.....	8
3.3.2. A vér–agy-gát funkciói.....	10
3.3.3. Az agyi kapilláris endothelsejtek jellegzetességei	11
3.3.4. Az endothelsejtek közötti záró sejtkapcsolatok: tight junction (TJ).....	12
3.3.5. A tight junction permeabilitását befolyásoló tényezők	13
3.3.6. A vér–agy-gát indukciója és fenntartása	14
3.3.7. A vér–agy-gát transzportmechanizmusai	16
3.3.7. Ion és víztranszport, víz homeosztázis és agyödéma	18
3.3.8. A vér–agy-gát jelentősége különböző kóros folyamatokban	20
3.3.9. Agytumороk és a vér–agy-gát; vér–tumor-gát.....	20
3.3.10. A vér–agy-gát leképezése.....	22
3.4. MR kontrasztanyagok	22
3.4.1. Gadolínium alapú kontrasztanyagok	23
3.4.2. Az anyagok mágneses tulajdonságai, szuszceptibilitás	24
3.4.3. Szuperparamágneses vas-oxid részecskék: általános jellemzés	25
3.4.4. Az értekezésben használt (U)SPIO-k speciális tulajdonságai	27
3.4.4.1. Ferumoxides (Feridex IV.).....	27
3.4.4.2. Ferumoxtran-10 (Combidex).....	28
3.4.4.3. Ferumoxytol (Feraheme).....	28
3.4.5. Vizsgálatainkat megelőző fő preklinikai és klinikai (U)SPIO-s eredmények	31
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	33

4.1. Két szuperparamágneses vas-oxid nanorészecske, a ferumoxides (SPIO) és a ferumoxtran (USPIO) összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal intrakraniális tumorokban MR képalkotással	33
4.2. Ferumoxtran (USPIO) halmozás pre- és postoperatív MR vizsgálatokon malignus agytumoros betegekben, valamint fénymikroszkópos korreláció	33
4.3. A második generációs USPIO, a ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása malignus gliomákban.	33
5. MÓDSZEREK	34
5.1. Ferumoxides és ferumoxtran összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal különböző intrakraniális tumorokban.....	34
5.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran képalkotás malignus agytumoros betegekben.	37
5.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása	40
6. EREDMÉNYEK	44
6.1. Ferumoxides és Ferumoxtran összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal különböző intrakraniális tumorokban.....	44
6.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran képalkotás malignus agytumoros betegekben	49
6.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása.....	57
7. MEGBESZÉLÉS	61
7.1. A ferumoxides és ferumoxtran által okozott jelintenzitás változások gadolínium alapú kontrasztanyaggal való összehasonlító vizsgálatának megbeszélése.....	61
7.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran tumor képalkotás és a hisztológia eredményeinek megbeszélése	66
7.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlító vizsgálatának megbeszélése	70
8. KÖVETKEZTETÉSEK	75

8.1. Ferumoxides és ferumoxtran versus gadolínium alapú kontrasztanyag	75
8.2. Ferumoxtran halmozás malignus tumorokban pre- és postoperatív MR vizsgálatokon és hisztológia	75
8.3. Ferumoxytol és gadoteridol halmozás objektív mérése és változása a terápia következtében	76
9. ÖSSZEFOGLALÁS	77
10. SUMMARY	78
11. IRODALOMJEGYZÉK	79
12. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK.....	93
13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜLI KÖZLEMÉNYEK.....	94
14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AQP:	aquaporin
ATP:	adenozin-trifoszfát
BAT:	brain around enhancing tumor (halmozó tumor körüli agyállomány)
cAMP:	ciklikus adenozin-monofoszfát
CRT:	chemoradiotherapy (kemoradioterápia)
D:	Dalton
DAB	diaminobenzidin
FSE:	fast spin echo (gyors spin echo)
FDA:	Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság)
FOV:	field of view
GAKA:	gadolinium alapú kontrasztanyag
GBM:	glioblastoma multiforme
Gd:	gadolinium
GFAP:	glial fibrillary acidic protein (gliális fibrilláris savas protein)
GRE:	grádiens echo
iv.:	intravénás
IRB:	Institutional Review Board (Intézeti Etikai Bizottság)
KA:	kontrasztanyag
KIR:	központi idegrendszer
MION:	monocrystalline iron-oxide nanoparticle (monokristályos vas-oxid nanorészecske)
MPS:	mononuclear phagocyte system (mononukleáris fagocita rendszer)
MR:	mágneses rezonancia
NEX:	number of excitations (gerjesztések száma)
NVE:	neurovaszkuláris egység
NSF:	nephrogenic systemic fibrosis (nephrogén szisztémás fibrózis)
P-gp:	P-glycoprotein
r1:	relaxivitas 1
r2:	relaxivitas 2
ROI:	region of interest
SE:	spin echo
SI:	signal intensity (jelintenzitás)
SM:	sclerosis multiplex
SPIO:	superparamagnetic iron-oxide (szuperparamágneses vas-oxid)
T:	Tesla
TE:	echo idő
TI:	inverziós idő
TR:	repetíciós idő
USPIO:	ultrasmall superparamagnetic iron-oxide (ultrakicsiny szuperparamágneses vas-oxid)
VEGF:	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endotheliális növekedési factor)
WHO:	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
ZO:	zonulo occludens

2. BEVEZETÉS

A mágneses rezonanciás (MR) képalkotás – fizikai alapjainak köszönhetően – kiváló szöveti differenciálási képességgel rendelkezik. A szövetek közötti vizuálisan érzékelhető jelintenzitás különbséget, azaz a kontrasztot elsősorban a szövetek intrinzik tulajdonságai, így a protondenzitás, valamint a T1 és T2 relaxációs időkonstansok határozzák meg. Egyéb szöveti jellemzők, a diffúzió, a szuszceptibilitás, az áramlás, a kémiai eltolódás és a perfúzió szintén szerepet játszanak a kontraszt kialakításában. Ezen kívül, a szekvenciák különböző paramétereinek – döntően a repetíciós idő (TR), az echo idő (TE), az inverziós idő (TI) és a kibillentési szög – beállításával tovább befolyásolhatjuk a kontrasztot (*Nitz – Reimer 1999*). Bár ezek a lehetőségek a vizsgálatok egy részében a szövetek között elegendő kontrasztot biztosítanak a diagnózis felállításához, nagyon gyakran kontrasztanyag (KA) alkalmazása szükséges bizonyos kórfolyamatok detektálásához, a diagnózis pontosításához, a terápiás hatás monitorizálásához vagy funkcionális és fiziológiai adatok nyeréséhez. Az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (Food and Drug Administration; FDA) becslése szerint az USA-ban évente kb. 10 millió kontrasztanyagos MR vizsgálat készül (*Zhou et al. 2013*). A fentiek alapján a KA-k alkalmazása tehát rendkívüli jelentőségű.

A KA-k olyan molekulák, amelyek – fiziko-kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően – fokozzák a különböző szövetek közötti kontrasztot és ezzel elősegítik a szövetek közötti differenciálási lehetőséget. Komputertomográfias (CT) vizsgálatokkal jó tartalmú KA, míg MR vizsgálatokkal elsősorban gadolínium (Gd) alapú kontrasztanyag (GAKA) intravénás (iv.) beadásával fokozható a szövetek közötti kontraszt.

A központi idegrendszert (KIR) alkotó agy és gerincvelő – szemben az egyéb szövetekkel – normális esetben nem halmozzák a kontrasztanyagokat. Ennek oka, hogy a KIR-ben a kapillárisok szintjében – a perifériás kapillárisoktól eltérően – létezik egy különleges permeabilitás barrier, a vér–agy-gát, mely fizikai gátat képez a legtöbb hidrofil molekulával szemben, így a vízdékony CT és MR KA-k extravazációját is megakadályozza. Ezért a KIR-ben akkor jön létre parenchymás halmozás, ha valamilyen kóros folyamat a vér–agy-gátat károsítja és a KA elhagyhatja az intravaszkuláris teret és beléphet az extravaszkuláris extracelluláris térbe.

A GAKA-kkal kapcsolatos utóbbi években felmerülő aggodalmak miatt és a specificitás fokozása érdekében az egyéb alternatív – mangán vagy vas-oxid tartalmú – MR KA-k iránti kutatások is előtérbe kerültek (*Gale et al. 2015, Finn et al. 2017*). Az aggodalmak között szerepel a nephrogén szisztémás fibrózis (NSF) lehetősége a beszűkült vesefunkcióval rendelkező betegekben (*Grobner – Prischl 2007*), valamint legújabban a Gd agy- és egyéb szöveten belüli depozíciója, melynek klinikai jelentősége egyenlőre nem teljesen tisztázott (*Kanda et al. 2015*). Mindkét nemkívánatos folyamatért inkább a lineáris GAKA-k, mint a makrociklikus molekulák tehetőek felelőssé, ami miatt a lineáris molekulák használatát korlátozták, sőt Európában be is tiltották őket (*Ramalho et al. 2016, Runge 2017, McDonald RJ et al. 2017*).

Az értekezésben vas-oxid alapú nanorészecskék MR kontrasztanyagként való alkalmazási lehetőségét tárgyalom intrakraniális daganatok esetében. Mivel az ismertetésre kerülő újszerű vas-oxid alapú kontrasztanyagok KIR-en belüli, MR képalkotással való detektálása is nagyrészt kapcsolódik a vér–agy-gát funkciójához és épségéhez, és a vas-oxid nanorészecskék összehasonlításra kerülnek a GAKA-val, ezért az irodalmi háttér fejezetén belül először részletesen tárgyalom a vér–agy-gát felépítését, funkcióját és szerepét a különböző patológias folyamatokban, majd a hagyományos GAKA halmozás biofizikai hátterét, az alkalmazott vas-oxid alapú nanorészecskék típusait és jellegzetességeit, valamint az ezekhez fűződő fontos preklinikai vizsgálatok eredményeit ismertetem.

3. IRODALMI HÁTTÉR

3.1. Központi idegrendszeri barrierek

A neuronok közötti gyors és megbízható kémiai és elektromos jelátvitel a lokális ionos mikrokörnyezet pontos szabályozása nélkül nem lenne lehetséges. Az evolúció során valószínűleg ez volt az a hajtóerő, mely olyan szabályozó mechanizmusok kifejlődéséhez vezetett, amelyek biztosítják a belső környezet állandóságát. A vér és az agyszövet közötti határokon lévő barrierek kulcsfontosságú szerepet játszanak ebben a szabályozásban (*Abbot 1992, Abbot et al. 2005*).

Az első ilyen barrier a vér–agy-gát, mely a törzsfajlás során először a porcos halakban, a tömörfejűek alosztályában jelent meg (*Bundgaard 1982*). Az agyban és gerincvelőben ezt a gátat a kapillárisokat bélelő endothelsejtek és a közöttük lévő záró sejtkapcsolatok (tight junction; TJ) hozzák létre (*Reese – Karnovsky 1967, Brightman – Reese 1969*). Az agyi endothelium a legnagyobb határfelületet képezi a vér és a KIR között, anatómiai régió függvényében a felület 150-200 cm²/g szövet, így a felnőtt agyban óriási, 12-18 m² összfelület áll rendelkezésre a vér és agy közötti cserefolyamatokhoz (*Nag – Begley 2005*). A neuronok / glia sejtek és a kapillárisok közötti távolság tipikusan 8-20 µm, így ha egy molekula a vér–agy-gáton keresztül jut, akkor a rövid diffúziós távolság miatt a sejtekhez is könnyen eljut. (*Schlageter et al 1999*).

A második barrier a vér–liquor-gát, melyet a plexus choroideus epithelsejtei és a közöttük – az apikális (liquor felé néző) felszínhez közel – elhelyezkedő TJ-k alkotnak (*Brightman – Reese 1969*). A plexusban az epithel sejtek alatt fenesztrált kapilláris található. A liquor a plexus choroideus epithelsejtjein keresztül szekretálódik a kamrarendszerbe (*Brown et al. 2004*).

A harmadik barrier a dura alatt elhelyezkedő arachnoid hártya képezi, mely egy többrétegű epithelium és a belső réteg sejtjei közötti TJ-kkel hatásos gátat alkot a liquor és a vér között. Mivel az arachnoid avaszkuláris és relatíve kis felületet képvisel, ezért a vér és a KIR közötti cserefolyamatokban nem játszik jelentős szerepet (*Kandel et al. 2000*).

3.2. Circumventriculáris szervek

A KIR-en belül normálisan is előfordulnak olyan kis területek, ahol a vér–agy-gát fiziológiásan hiányzik: ilyenek az area postrema, eminencia medialis, tuber cinereum, hypothalamus, hypophysis nyél, neurohypophysis, corpus pineale, lamina terminalis és subfornicalis szerv, összefoglaló néven a circumventriculáris szervek (*Zlokovich 2008*). Ezek a területek közvetlenül kapcsolatba léphetnek a vérben keringő molekulákkal és ezáltal alapvető szabályozó funkciókat (pl. hormonok termelése és transzportja) töltenek be. A kapillárisok a circumventriculáris szervekben fenesztráltak, de barrier ezen régiókban is létezik, mégpedig az epitheliális sejtekben (tanyciták és ependymalis sejtek), és ez biztosítja azt, hogy a keringő anyagok bediffundálhatnak a circumventriculáris szervekbe, de azon túl nem kerülhetnek (*Duvernoy et al. 2007*).

3.3. A vér–agy-gát

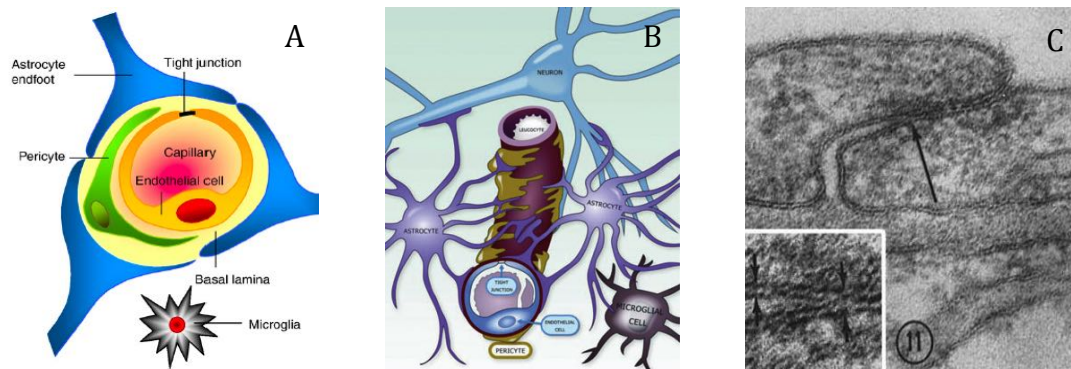
3.3.1. A vér–agy-gát általános jellemzése és a neurovaszkuláris egység

A vér–agy-gát egy nagymértékben szelektív anatómiai és fiziológiai permeabilitás barrier, ami szabályozza az agyszövet tápanyagainak és egyéb biológiailag fontos anyagoknak a be- és kilépését, és ezáltal biztosítja a cerebrális metabolizmushoz és neuronális aktivitáshoz szükséges belső környezet fenntartását (*Brighman et al. 1970*).

A permeabilitást szabályozó funkció egyrészt az endothelsejtek és a közöttük lévő TJ-k révén egy fizikai barriertől (*Rees – Karnovsky 1967, Brightmann – Reese 1969, Nagy 1990*) (1. ábra), másrészt pedig transzport és metabolikus barriertől származik. A záró sejtkapcsolatok a paracelluláris molekulaáramlást korlátozzák, a speciális transzport mechanizmusok a transzcelluláris anyagáramlást szabályozzák, az endothelsejtekben lévő enzimek pedig az áthaladó molekulákat metabolizálják. A barrier funkció dinamikusan változhat és szabályozódhat mind fiziológiás, mind patológiás körülmények között (*Abbot et al. 2006*).

A vér–agy-gátban az endothelium nem elkülönülten, hanem egy celluláris komplexben, ennek elemeivel összehangoltan működik. Ezt a neurovaszkuláris

egységet (NVE) a kapilláris szegmens (endothelsejtek és bazális membrán), a környező pericyták, a perivaszkuláris astrocyták és mikrogliák, valamint ezen sejtek működését befolyásoló néhány (általában <8) “kliens” neuron alkotja (Iadecola – Nedergaard 2007) (1. ábra). A pericyták a kapillárisok mentén nem folytonosan helyezkednek el és nyúlványaikkal az endothel felszín 30-90 %-át fedik. A bazális membrán mind az endothelsejteket, mind a pericytákat körbezárja. Az astrocyták végtalpai a kapillárisokat körbevéve komplex hálózatot alkotnak és az endothelsejteket akár 99%-ban is beburkolhatják. A neuronok axonvégződése vazokonstriktor neurotranszmitterekkel és peptidekkel hatnak az arteriolák simaizomsejtjeire, és ezzel szabályozzák a lokális véráramlást. A mikrogliák a KIR rezidens immunkompetens sejtjei (Abbot et al. 2010). Az NVE összehangolja a véráramlást a metabolikus igényekkel, továbbá szabályozza az adozin, laktát vagy az endothelsejtekből származó nitrogén-monoxid (NO) által indukált vazodilatációt (Nagy – Nardai 2017). A pericyta/endothelsejt arány és az astrocyta végtalpak által fedett kapilláris felszín nagysága alapvetően befolyásolja a kapilláris permeabilitást (Armulik et al. 2005).



1. ábra. **A és B. Neurovaszkuláris egység a vér–agy-gát sejt kapcsolataival.** Forrás: A. Abbot et al 2010, B. Abbot – Friedman 2012. **C. Az endothelsejtek közötti rést TJ (nyíl) zárja le, mely pentalaminális struktúrát mutat (nagyított belső kép).** Forrás: Reese – Karnovsky 1967.

Az NVE celluláris komponensei közötti réskapcsolatok (gap junction) kulcsfontosságú szabályozó szerepet játszanak: alacsony ellenállású csatornáként funkcionálnak a szomszédos sejtek citoplazmái között a kis oldott anyagok, ionok és second messengerek számára (Unger et al. 1999). A réskapcsolatok nagymértékben

befolyásolják az intercelluláris Ca^{2+} transzportot is, ami viszont kritikus a vér–agy-gát funkciójának fenntartásában (Nagy *et al.* 1985a).

3.3.2. A vér–agy-gát funkciói

Ion homeosztázis: a neuronok közötti normális jelátvitelhez nélkülözhetetlen az optimális ion összetétel és pH, melyet a vér–agy-gát speciális ioncsatornákkal és transzporterekkel szabályoz. (Somjen 2004).

Neurotranszmitterek: a központi és perifériás idegrendszer neurotranszmitter pool-jai közötti keveredést és ezzel az azonos transzmittereket felhasználó neurális hálózatok közötti interferenciát a vér–agy-gát akadályozza meg. Ha a plazmában nagy koncentrációban lévő glutamát excitátoros neurotranszmitter kóros mennyiségben kerül az intersticiális térbe, mint pl. ishaemia esetében, az excitotoxicitást, súlyos neuron károsodást okoz. Ezen kívül a kóros mennyiségű glutamát Ca^{2+} túlterhelést, oxidatív stresszt, mitokondriális diszfunkciót és DNS fragmentációt okoz (Kostandy 2012).

Makromolekulák: A legtöbb makromolekula agyba történő bejutását a vér–agy-gát megakadályozza. A liquor protein koncentrációja csak töredéke a plazma fehérje koncentrációjának és az egyes fehérjék aránya is jelentősen különbözik. A plazma proteinek, mint pl. az albumin, protrombin/trombin és plazminogén/plazmin idegszövet károsítók és apoptózishoz vezethetnek, ha bekerülnek az intersticiális térbe (Gingrich – Traynelis 2000).

Neurotoxinok: A vérben keringő neurotoxikus molekulákkal szemben a vér–agy-gát védelmet biztosít. A neurotoxinok lehetnek endogén metabolitok, proteinek vagy xenobiotikumok. Több, az ATP-kötő kazetta (ATP-binding cassette; ABC) szuperfehérje családba tartozó energiafüggő efflux transzporter aktívan kipumpálja ezeket a toxinokat az agyszövetből (Begley 2004).

Tápanyagellátás: A vér–agy-gát csak kicsi passzív permeabilitást mutat több alapvető vízdékony tápanyaggal és metabolittal szemben, ezért az endothelsejtek lumenális és abluminális membránjában speciális transzport rendszerek expresszálódnak, melyek biztosítják az idegszövet optimális tápanyagellátását (Zhang *et al.* 2002).

Immunológiai elszigetelődés: a vér–agy-gátnak köszönhetően a KIR kiváltságos immunológiai státusszal rendelkezik, melyet jól mutat az a tény, miszerint allogén vagy xenogén graftok képesek túlélni a KIR-ben, de szisztémásan gyorsan kilökődnek (*Neuwelt 2004*). Ugyanakkor a KIR-ből az extracelluláris folyadék és a liquor a nyaki nyirokcsomókba is áramolhat (a nervus olfactorius mentén és egyéb paravaszkuláris, paraneurális úton) és így aktiválódhat a szisztémás immunrendszer is (*Knopf et al. 1998*). A liquor és intersticiális folyadék nyaki nyirokcsomókba való kiáramlását szuperparamágneses vas-oxid részecskékkel is kimutattuk (*Muldoon et al. 2004*). Normális esetben, a mononukleáris sejtek diapedezissel, az endothelsejtek citoplazmáján keresztül képesek keresztülhatolni a vér–agy-gáton, nem pedig paracellulárisan, mint ahogy azt korábban vélték (*Egelhardt – Wohlburg 2004*). Ugyanakkor patológiás körülmények között, mint pl. gyulladásozó folyamatokban citokinek és egyéb ágensek hatására az endothelsejtek közötti TJ-k megnyílhatnak és ekkor a mononukleáris sejtek számára a paracelluláris sejt migráció is lehetségessé válik (*Bolton et al. 1998*). A vér–agy-gáton keresztül jutó leukocyta a perivaszkuláris terekben, főleg a kis venulák körül akkumulálódnak, és így a perivaszkuláris tér a koordinált immunválasz kialakulásának helyszínének tekinthető (*Konsman et al. 2007*). A KIR immunológiai elszigetelődése tehát csak részleges, és a különböző patológiás folyamatokban a károsodott vér–agy-gáton keresztüli leukocyta migráció jelentős lehet.

3.3.3. Az agyi kapilláris endothelsejtek jellegzetességei

Az agyi kapillárisok endothelsejtjei stratégiai fontosságú helyet foglalnak el a keringő vér és az agyszövet között. Normális körülmények között az endothelium trombólis-rezisztens felszínét biztosít, fenntartja a vér folyékonyágát, megakadályozza a thrombocyta és a leukocyta adhézióját és az intrinzik és extrinzik koagulációs rendszer aktiválódását (*Nagy et al. 2005*). Ezen kívül szelektív barrierként működik a vér és az extravaszkuláris kompartmentek között, valamint részt vesz a keringő vérkomponensek és az agyszövet közötti jelkövetítésben (*Nagy 1990*).

Az endothelsejtek egyrétegben (monolayer) alkotják a kapillárisok falát, kifejezetten vékony sejtek, a lumenális és ablumenális membrán közötti távolság csak kb. 500 nm. A

szervezetben más helyeken előforduló kapillárisoktól eltérően: *a.)* a cerebrális kapilláris nem fenestrált, *b.)* az endothelsejtek közötti rést TJ-k zárják le, *c.)* az endothelsejtekben a pinocitózis (nem-specifikus folyadékfázisú endocitózis) csak minimális, ami miatt a transzcelluláris transzport korlátozott, *d.)* a mitokondriumok száma nagy, ami biztosítja a szükséges energiát az aktív transzportfolyamatokhoz, *e.)* a TJ-k miatt a cerebrális endothelium nagy elektromos ellenállással rendelkezik, ami korlátozza a paracelluláris permeabilitást, valamint *f.)* az endothelsejtek a lumenális és abluminalis membránon különböző speciális transzport proteinek expresszálnak, ami miatt az endothelsejtek funkcionálisan polarizáltak. (*Reese – Karnovsky 1967, Betz et al. 1980, Nagy et al. 1984, Claudio et al. 1989, Brightman – Kadota 1992, Rubin – Staddon 1999*). Ezen különleges tulajdonságok együttesen biztosítják a restriktív, de a mindenkori metabolikus igényeknek megfelelő pontosan szabályozott permeabilitást.

Az agyi kapillárisok transzendotheliális elektromos ellenállása rendkívül nagy, akár a $2000 \Omega \times \text{cm}^2$ -t is elérheti, míg más szövetekben csak maximum $33 \Omega \times \text{cm}^2$ mérhető (*Butt et al. 1990*). A nagy ellenállás a TJ-knek és az endothel sejtfelszín negatív töltésének, ez pedig a membrán glikoproteinek és glikolipidek szíalsavas végződéseinek, a foszfolipidek foszfor-csoportjainak és a heparin szulfát-csoportjainak tulajdonítható (*Nagy et al. 1983*).

3.3.4. Az endothelsejtek közötti záró sejtkapcsolatok: tight junction (TJ)

Az agyi kapilláris endothelsejtek laterális membránjai között – szemben a nem-cerebrális endotheliummal – azokat szorosan összekapcsoló TJ található. Normális körülmények között a TJ megakadályozza a vérben lévő proteinek extravazációját és jelentősen korlátozza az oldott anyagok paracelluláris diffúzióját a vérből az agy extracelluláris folyadékterébe (*Begley – Brightman 2003, Wolburg et al. 2009*).

Elektronmikroszkópos képeken a TJ-k az intercelluláris réseket lezáró pentalamináris struktúraként ábrázolódnak, amiben a középső lamina vékonyabb, mintha csak a szomszédos sejtmembránok külső rétegei egymás mellett helyezkednének el, ami arra utal, hogy ezek a membránok összeolvadnak (1. ábra C). Az intercelluláris részben több TJ is elhelyezkedhet szakaszosan lezárva az apiko-bazális irányban a sejtek közötti rést.

(Reese – Karnovsky 1967, Brightman – Reese 1969). A sejteket övszerűen körbevevő TJ-k nem csak a tormaperoxidáz, hanem a kisebb mikroperoxidáz és a jóval kisebb lantán átjutását is megakadályozzák (Reese et al. 1971, Nagy et al. 1979a,b). Fagyasztva-töréses technikával készült elektronmikroszkópos képeken a kapilláris TJ egy bonyolult, többszörös, folytonos fonálszerű struktúraként ábrázolódik (Nagy et al. 1984), valamint szegmentális különbségek is kimutathatók: hasonló TJ-k még a posztkapilláris venulákban is megfigyelhetők, míg artériákban és gyűjtővénákban a kapcsolódási komplex sokkal kevésbé bonyolult szerveződésű (Nagy 1990).

Mikrostrukturálisan a TJ két, egymással szemben elhelyezkedő integrál membrán proteinek sorából áll, amelyek egymással “cipzárszerűen” olyan szorosan kapcsolódnak, hogy az intercelluláris rést lezárják. Endothelsejteken kívül a choroid plexus epithelsejtjei között is hasonló TJ-k detektálhatók. Különböző epitheliumok TJ-ét vizsgálva egy nagy molekulású polipeptidet (zonula occludens-1, 225000 Dalton; Da) sikerült azonosítani, mely úgy tűnik, hogy az emlősök TJ-iben ubikviter komponens (Stevenson et al. 1986).

3.3.5. A tight junction permeabilitását befolyásoló tényezők

A TJ-k dinamikusan változó struktúrák és integritásuk fenntartásában a Ca^{2+} alapvető szerepet játszik: Ca^{2+} hiányos oldatban a TJ-k progresszív fragmentálódása és diszkonnekciója alakul ki, míg a Ca^{2+} inkubációs folyadékhoz való hozzáadása a TJ-k újraképződését eredményezi (Meldolesi et al. 1978, Nagy et al. 1985a). A TJ-k permeabilitásának változása összefügg az endothel felszíni töltésének változásaival is: a polikation protaminszulfáttal vagy alacsony pH-jú oldattal való perfúzió után patkányagyban az endotheliális sejtfelszín negatív töltésének csökkenését és a tormaperoxidáz extravazációját lehet detektálni, aminek struktúrális háttéréként döntően az interendotheliális TJ-k szétnyílása mutatható ki (Nagy et al. 1981, 1983, 1985b).

Ischaemia esetén, amikor anaerob glikolízis és következményes laktát acidózis a lokális pH csökkenését okozza, szintén a TJ-k megnyílása jön létre (Nagy et al. 2005).

Hiperozmotikus oldattal való perfundálás után az interendotheliális TJ-k az endothelsejtek összezsugorodása következtében megnyílnak és makromolekulák

számára átjárhatóvá válnak (*Rapoport 1970, Rapoport et al. 1972*), ami elektronmikroszkóppal is kimutatható (*Brightman et al 1973, Nagy et al. 1979b*).

Nyomás-pulzus modellben és Araminnal (szimpatikomimetikum) indukált akut hipertenzióban is detektálható a TJ-k megnyílása a kapilláris falak túlfeszítése miatt (*Nagy et al. 1979a,c*). A TJ-k komplett szétválasztódásának direkt vizualizálása kriofixációs technikával vált elérhetővé (*Nagy et al. 1988*), a korábban alkalmazott aldehid fixálás csak indirekt bizonyítékokkal szolgált a keringő tracer extracelluláris megjelenésével.

A thrombogenetikus és fibrinolitikus faktorok endothelsejtekkel való interakciója sejtkontrakciót és a vér–agy-gát permeabilitásának megváltozását okozza, amit humán endothelsejt kultúrában (*Nagy et al. 1995*) és in vivo is kimutattak (*Nagy et al. 1998*). Ez a mechanizmus szerepet játszhat az ischaemiás vazogén ödéma képződésében.

Az NVE sejteiből származó vazoaktív faktorok és citokinek szintén befolyásolják a TJ-k szerveződését és a paracelluláris permeabilitást (*Abbot et al. 2006*).

3.3.6. A vér–agy-gát indukciója és fenntartása

Az endothelsejtek barrier tulajdonságainak a kialakulásában döntő jelentősége van a mikrokörnyezetnek (*Stewart – Wiley 1981, Nagy – Martinez 1991*).

Az astrocyták kulcsszerepet játszanak a vér–agy-gát jellegzetességeinek létrehozásában és fenntartásában, így a TJ-k képződésében és a különböző transzporterek lumenális és ablumenális endothel membránon való polarizált expressziójának kialakításában (*Abbott 2002; Wolburg et al. 2009*). Az astrocyták elősegítik a TJ-k expresszióját és az interendotheliális kapcsolatok hosszúsága és komplexitása szignifikánsan nagyobb a ko-kultúrában, mint a csak endotheliális kultúrában (*Tao Cheng et al. 1987, Nagy – Martinez 1991*). Az endothelsejtek közötti TJ képződést astrocyta-kondicionált médiummal is indukálni lehet, ami bizonyítja az astrocytáktól származó oldékony vegyületek, citokinek és egyéb faktorok hatását (*Abbott 2002*). Ezek a molekulák többek között felülregulálják az endotheliális ciklikus adenozin-monofoszfátot (cAMP), mely az aktin citoskeleton relaxációjával azonnal képes a TJ rezisztencia fokozására (*Brightman – Kadota 1992*). Az astrocyták

tápanyagokat is biztosítanak a neuronok számára, szabályozzák a glutamát szintet és neutrophinokat is termelnek (Nagy – Nardai 2017).

Az astrocyták működésére viszont az endothesejtek is kihatnak, pl. az endotheliumból származó leukémia inhibiting factor (LIF) segítségével szabályozzák azok növekedését és differenciációját (Mi et al. 2001). A két sejt közötti kölcsönös kapcsolat nélkülözhetetlen a kapilláris normális differenciálódási folyamatában és a vér–agy–gát kialakulásában (Nico et al. 1994).

A pericyták legtöbbször a TJ-kkel szemben helyezkednek el, ami lehetővé teszi számukra, hogy trofikus faktorok kibocsátásával, majd parakrin jelátvitellel a vér–agy–gát funkciót szabályozzák (Lai – Kuo 2005). Mind in vitro, izolált mikroerekben és in vivo, agyszelet kultúrákban is a pericyták kontrakcióját és dilatációját lehet megfigyelni (Fernández-Klett et al. 2010). Azt is kimutatták, hogy a kapilláris pericyták szabályozzák az agyi véráramlást mind ép, mind kóros körülmények között, és a kapillárisok aktív dilatációja megelőzi az arteriolák kitágulását szenzoros stimulus hatására (Hall et al. 2014). Úgy tűnik, hogy a pericyták kontrakciója tehető felelőssé ischaemia esetén az inkomplett mikroér reperfüzió (úgynevezett “no reflow fenomén”) kialakulásáért (Yemisci et al. 2009) is. A kapilláris véráramlás szabályozáson kívül, a pericyták elsődlegesnek vélt funkciói az endothel proliferáció, migráció, differenciáció és túlélés, valamint az új kapillárisok növekedésének és elágazódásainak szabályozása. Ezzel összhangban állatkísérletekben kimutatták, hogy a pericyták hiánya korrelál az endothel hyperpláziával, a nagyobb kapilláris átmérővel, az endothesejtek kóros alakjával és mikrostruktúrájával, a junkciós proteinek megváltozott celluláris eloszlásával és a transendotheliális permeabilitás fokozódásával (Hellström et al. 2001). In vitro kísérletben azt is kimutatták, hogy az agyból származó pericyták neuronokká képesek differenciálódni (Dore-Duffy et al. 2006). Ezek az eredmények azt hangsúlyozzák, hogy a pericyták nem csak az angiogenezisben, hanem a neuronális differenciálódási képesség miatt a post-stroke plaszticitásban is kulcsfontosságú szerepet játszanak (Nagy et al. 2017).

A bazális membrán fizikai stabilitást ad a kapillárisnak és megfelelő közeget biztosít a sejtek kapcsolódásához. Összetétele szerint két “lemezre” osztható: az endothesejteket körbevevő és a pericytákat is beágyazó perivaszkuláris extracelluláris mátrix (bazális lamina-1), valamint az ettől különböző, az astrocyta végtalpak mentén

lévő és az agyi parenchymát határoló extracelluláris mátrix (bazális lamina-2) (Abbot *et al.* 2010). A bazális membránt a pericyták termelik, fő építőelemei a kollagén, a fibronectin és a laminin, valamint glikoproteinek és proteoglikánok (Lai – Kuo 2005). Az agyi kapilláris permeabilitást nagymértékben befolyásolják a bazális membránban történő változások is, így pl. stroke-ban és gyulladásos folyamatokban a bazális membrán károsodása is hozzájárul az ödéma képződéshez (Asashi *et al.* 2001).

A mikrogliak az agy immunkompetens rezidens sejtjei. Immunológiai surveillance szerepükön kívül fontosak a vér–agy-gát integritásának fenntartásában, valamint a sejtek közötti kommunikáció és a transzcelluláris transzport folyamatok szabályozásában (Pardridge 1992).

A neuronok az NVE alkotórészeként a vér–agy-gát szabályozásában és valószínűleg indukciójában is részt vesznek. Az astrocyták és az endothelsejtek noradrenerg, szerotoninerg, kolinerg és GABA-erg neuronokkal innerváltak (Abbot *et al.* 2010).

3.3.7. A vér–agy-gát transzportmechanizmusai

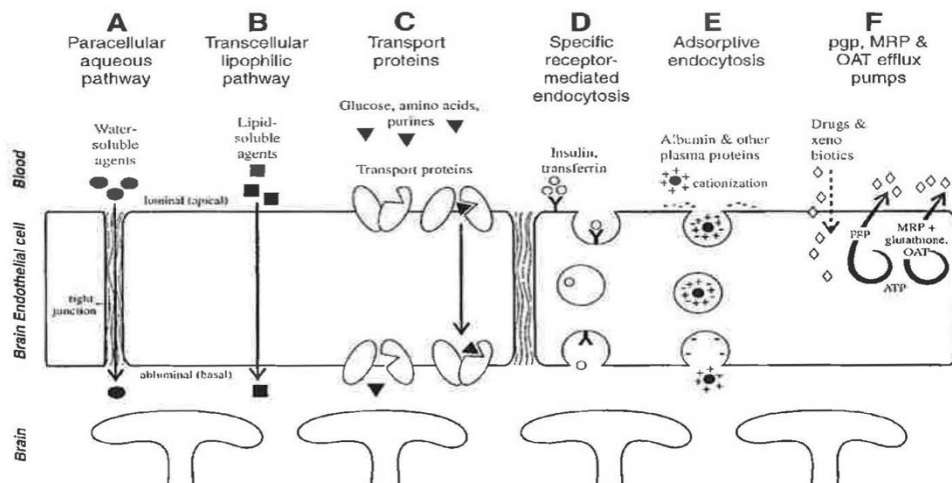
A tápanyagok, ionok és egyéb molekulák a.) *paracelluláris diffúzióval*, vagy b.) az endothelsejteken keresztül, *transzcelluláris úton* juthatnak át a vér–agy-gáton.

Paracelluláris diffúzió: ezzel a passzív folyamattal csak a kis lipofil (< 400 Da) és minimális mennyiségben kicsi, vízdékony molekulák kerülhetnek át a vér–agy-gáton a koncentráció grádiens irányának megfelelően (2. ábra). A paracelluláris permeabilitás függ a TJ-k integritásától, az endothelsejtek morfológiai változásától, valamint elektrokémiai, hidrosztatikus és ozmotikus grádiensektől (Nagy *et al.* 1979b, 1981, 1985a,b, Neuwelt 2004, Zlokovicz 2008). A TJ-k az ionok passzív átjutását sem engedik, és ezzel megakadályozzák, hogy az agyszöveti elektrolit szintek kövessék a vérben lévő elektrolit fluktuációkat (Kimelberg 2004).

Transzcelluláris út: lehet energiafüggő vagy energiát nem igénylő folyamat. Ide tartozik a transzcelluláris diffúzió, a karrier-mediált transzport, a receptor-mediált transzcitózis és az adszorpció-mediált transzcitózis, valamint az efflux transzport rendszer (2. ábra).

Transzcelluláris diffúzió: az oldott anyagok endothelsejteken keresztüli passzív

diffúzióját alapvetően a molekula lipidoldékonysága szabja meg. A permeabilitást az octanol/víz partíciós koefficienssel lehet megjósolni (*Pardridge 1999*). A diffúziót korlátozó tényezők a molekula tömege (> 450 Da), nagy poláris felszíne ($> 80\text{\AA}^2$) és hidrogénkötéseinek a száma (> 6); ez utóbbi nagymértékben megnöveli a vízfázisból a membránlipidbe való átkerüléshez szükséges energiát (*Abbot et al. 2010*). A pozitív töltésű vegyületek penetrációja viszont könnyebb, mivel a negatív töltésű endothel sejtmembránhoz való affinitásuk nagyobb (*Nagy et al. 1981*). A vérben oldott gázok, O_2 és CO_2 is a koncentráció grádiens irányában passzív diffúzióval kerülnek át a vér-agy-gáton, így a gáztranszport mindaddig adekvát, míg a véráramlás fiziológiai határok között marad (*Abbot et al. 2010*).



2. ábra. A vér-agy-gát transzportmechanizmusai. Forrás: *Neuwelt 2004*.

Karrier-mediált transzport: szaturálható folyamat, ami lehet energia függő, vagy független. A karrier fehérjék számtalan, a metabolizmushoz nélkülözhetetlen oldott anyag transzportját végzik, legfontosabbak a glukóz, aminosavak, nukleozidok, monokarboxil savak, organikus anionok és kationok. A transzport fehérjék egy része polarizáltan expresszálódik az endothelsejteken vagy a lumenális, vagy az ablumenális membránon, míg más transzporterek mindkét membránon megtalálhatók. Az endothelsejteken a Na-független glukóz transzporter a GLUT-1 expresszálódása 3-4x nagyobb az ablumenális, mint a lumenális membránon. (*Betz et al 1980*).

Receptor-mediált transzcitózis: szaturálható, aktív folyamat, a fő mechanizmus, mellyel makromolekulák (proteinek, peptidok pl. inzulin, transferrin, leptin, LDL)

kerülhetnek át a vér–agy-gáton (*Zlokovic et al. 1990*). A folyamat során a makromolekula (ligand) speciális membránreceptorhoz kapcsolódik és ez triggereli az endocitózist, majd a képződő vezikula a citoplazmán keresztülhalad és exocitózissal ürül az ellenkező oldalon (*Palade – Bruns 1968*).

Adszorpció-mediált transzcitózis: pozitív töltésű kationok interakciója a sejt felszín negatív töltésű komponenseivel indukálja az endocitózist, majd a transzcitózist. Így szállítódnak pl. az albumin és egyéb plazma proteinek (*Pardridge 1994*).

Efflux transzport rendszer: néhány lipofil molekula és gyógyszer agyba való penetrációja jóval kisebb, mint ami a partíciós koefficiense alapján várható. Ennek oka, hogy ezek a vegyületek aktívan effluktálódnak az endothelsejtek membránjában elhelyezkedő efflux transzporterek segítségével. Ezek a transzport fehérjék az ABC transzporter szupercsaládba tartoznak. A legfontosabb efflux transzporterek: P-glycoprotein (P-gp, Multidrug Resistance Protein), a Multidrug Resistance-associated Proteinek (MRPs) és a Breast Cancer Resistance Protein (BRCP). A P-gp és BRCP a lumenális, míg az MRP-k mindkét membránoldalon elhelyezkedhetnek. Ezek a rendszerek aktív pumpák, ATP igényesek és fő szerepük, hogy az agyból és az endotheliumból visszaszállítsák a potenciális neurotoxikus (endogén és xenobiotikus) molekulákat a vérbe, tehát neuroprotektív és méregtelenítő funkciót látnak el. Ugyanakkor, mivel különböző gyógyszerek ezen efflux transzporterek szubsztrátjai lehetnek, ezért a gyógyszerek agyba való penetrációja jelentősen csökkenhet. (*Schinkel 1996, Begley 2004, Zlokovicz 2008, Neuwelt et al. 2011*).

3.3.7. Ion és víztranszport, víz homeosztázis és agyödéma

Az energia-függő $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP-áz az abluminális oldalon helyezkedik el, az endothelsejtekben lévő Na^+ -ot az intersticiális térbe, a K^+ -ot pedig onnan az endothelsejtekbe viszi. Egyéb ion pumpákkal együtt, mint a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ és $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ döntő jelentősége van a transzmembrán elektrokémiai grádiens és a víz homeosztázis fenntartásában (*Neuwelt et al. 2011*).

A vér–agy-gáton keresztüli ion mozgásokat a víz is követi. A víz transzcelluláris diffúzióval vagy facilitált diffúzióval vízcsatorna-fehérjéken (aquaporin; AQP) halad

keresztül organikus és inorganikus ionok kíséretében. A KIR-ben az aquaporinok közül leginkább az AQP4 expresszálódik főleg az astrocytáknak. Az AQP4 szerepe a víz homeosztázisban és az ödéma képződésben kulcsfontosságú (*Badaut et al. 2002*).

Klatzo az agyödéma két típusát különböztette meg eltérő pathomechanizmusuk alapján. A citotoxikus ödéma hátterében celluláris duzzadás áll, míg a vazogén ödémában a fokozott vaszkuláris permeabilitás vezet a folyadék akkumulációhoz az extracelluláris térben (*Klatzo 1967, Klatzo, 1987*).

A citotoxikus ödéma keletkezésében a fő szerep az astrocyta végtalpokban lévő AQP4 vízcsatornáké: az ödéma folyadék az intravaszkuláris térből intakt vér–agy-gát (tight junction) mellett az AQP4-en keresztül áramlik és elsősorban az astrocyta talpakban akkumulálódik (*Bonomini – Rezzani 2010*).

A vazogén ödémában viszont a vér–agy-gát TJ-k permeabilitása változik meg, ami lehetővé teszi a plazma folyadék (víz és oldott anyagok, szérum proteinek) közvetlen extracelluláris térbe való áramlását az astrocyta nyúlványok kikerülésével (*Bonomini – Rezzani 2010*). A szérum proteinek extravazációja és az agyszöveti folyadékretenció között szoros kapcsolat van (*Klatzo 1987*). Az extravazálódott proteinek az astrocyták képesek felvenni és ezzel elősegítik az ödéma felszívódását (*Klatzo et al. 1980*). Az extracelluláris többletfolyadék eliminálása az AQP4 csatornákon keresztül transzcelluláris úton is történhet (*Papadopoulos et al. 2004*).

Különböző KIR-i patológias folyamatokban (ischemia, vérzés, trauma, tumor, infekció) a kialakuló agyödéma a vezető komplikáció. A szteroidok a tight junction fehérjék képződését felülregulálják, ezzel azokat erősítik, ezért a vazogén ödémát csökkentik, viszont nincs érdemi hatásuk a korai ischaemia által okozott citotoxikus ödémában (*Harke 2008*). Az ischaemia későbbi fázisában viszont vazogén ödéma is kialakul, mégpedig bifázisosan: a barrier első megnyílása az oklúziót, majd a reperfüziót követő reaktív hiperémiával kapcsolatos, míg a második fázis már a súlyos ischaemiás agyszöveti károsodás során később alakul ki (*Klatzo 1987*).

A vazogén ödémaképződés ellen hat a vér–agy-gát azon tulajdonsága is, hogy a hidraulikus konduktivitása kicsi (a hidrosztatikus nyomás által indukált vízfiltrációval szemben kifejezetten nagy az ellenállása), ami megakadályozza a víz tömegáramlását és vele együtt az ionok és fehérjék áramlását az agyba (*Fenstermacher 1984*).

3.3.8. A vér–agy-gát jelentősége különböző kóros folyamatokban

A vér–agy-gát fizikai és funkcionális integritása számtalan kóros folyamatban megváltozhat. A barrier diszfunkció létrejöhet a TJ-k különböző mértékű károsodása, az endotheliális és gliális transzport rendszerek, enzimek és csatornák megváltozott expressziója és működése, valamint a lumenális adhézis molekulák felülregulálása miatt, mely leukocita adhéziónak és transzmigrációnak eredményez (*Neuwelt et al. 2011*). A kóros folyamatokban az NVE sejt-sejt interakcióinak megváltozása – különösen az endothelsejtek és astrocyták között –, valamint a mikroglia aktivációja citokinek és kemokinek szekretálásával szintén kimutatható (*Smith et al. 2012*).

A vér–agy-gát számtalan KIR-i patológiás folyamatban involvált: pl. gyulladás (abscessus, meningitis, encephalitis), SM, trauma, ischaemia, tumor, demenciák, Alzheimer kór, Parkinson betegség, epilepszia, depresszió, hepatikus encephalopathia, HIV, valamint magashegyi betegségben kialakult agyödéma. A legtöbb esetben különböző mechanizmusok kombinációja detektálható a barrier zavar hátterében, és nem állapítható meg pontosan, hogy a betegség kezdetén a barrier károsodás oki tényező-e, azonban a barrier zavar hozzájárul a betegség kifejlődéséhez és súlyosbításához (*Persidsky et al. 2006, Neuwelt et al. 2011, Nagy et al. 1995, 1998*).

3.3.9. Agytumrok és a vér–agy-gát; vér–tumor-gát

Az agytumrokra illetően létezik egy téves felfogás, miszerint az endotheliális gát vagy nyitott (mint szisztémás tumorokban), vagy zárt (mint a normális agyszövetben). A valóságban az agytumrok érhálózata egyfajta köztes permeabilitással rendelkezik: a neovaszkularizáció miatt kóros kapillárisok alakulnak ki, melyek fenesztráltak, az endothelsejtek pinocitotikus aktivitása fokozott, a perivaszkuláris astrocyta végtalpak hiányoznak és a TJ-k különböző mértékben kóros szerkezetűek. A vér–tumor-gát kóros permeabilitását és az ödéma képződését a vaszkuláris endotheliális növekedési factor (VEGF) fokozott expresszálódása tovább növeli. A permeabilis vér–tumor-gát lehetővé teszi ugyan bizonyos proteinek és gyógyszerek vérből agytumorba való kerülését, de összességében elmondhatjuk, hogy a primér és metasztatikus agydaganatok hatásos

kezelésének egyik akadálya maga a vér–agy-gát, mely korlátozza a megfelelő gyógyszer koncentráció elérését (*van Tellingen et al. 2015*).

Kemoszenzitív tumorok, mint pl. kissejtes tüdőrák, emlőrák, lymphoma és csírasejtes daganatok esetében komplett szisztémás választ lehet elérni, miközben a KIR-i manifesztáció progrediálódik (*Doolittle et al. 2002*). A szisztémás és KIR-i tumorok terápiás válasz különbsége több tényezőre vezethető vissza. A vér–tumor-gát kifejezetten heterogén, azaz általában sokkal permeábilisabb a tumor központi részében, mint a jól vaszkularizált, aktívan proliferálódó, infiltráló perifériás részen, azaz a tumor-agyszövet határon, ahol a vér–tumor-barrier már inkább vér–agy-gát jellegű. Ez a tumoron belüli különböző permeabilitás meredeken csökkenő kemoterápiás szer koncentrációt eredményez a gyorsan növekvő tumor periférián, mivel a centrális, hipoxiás, permeábilis tumorrész felől a diffúzió erősen korlátozott (*van Tellingen et al. 2015*). Ez a kemoterápia hatástalanságának egyik fő oka lehet. Másrészt, a kezelés hatására, a tumorvolumen csökkenésével a vér–tumor-gát integritása is javul, pl. primér KIR-i lymphomában 6 hét kemoterápia után a vér–agy-gát integritásának helyreállítását lehet kimutatni (*Ott et al. 1991*), de a regresszió csak rövid ideig tart. A vér–agy-gát ozmotikus megnyitásával és ezt kísérő intraarteriális kemoterápiás kezeléssel azonban a primér KIR-i lymphomás betegek túlélése javítható: 42%-os 5 éves túlélési ráta kognitív funkció veszteség nélkül (*McAllister et al. 2000*).

A vér–agy-gát ozmotikus megnyitásának lehetősége régóta ismert (*Rapoport 1970*). Hazai kutatók, Nagy és mtsi. is sikeresen alkalmazták kísérleti körülmények között (*Nagy et al. 1979b, 1988*). Klinikai használhatóságát Neuwelt és mtsi. bizonyították (*Neuwelt 1989, Kroll and Neuwelt 1998*). A vér–agy-gát ozmotikus megnyitása után lényegesen magasabb, akár 100-szoros szöveti gyógyszer koncentráció érhető el az iv. beadáshoz képest (*Kraemer et al. 2002*). Csírasejt tumoros, sőt gliomás betegek is sikeresen kezelhetők ezzel a módszerrel (*Jahnke et al. 2008, Guillaume et al. 2010*). Fontos előnye a vér–agy-gát ozmotikus megnyitásos módszernek, hogy miután a vér–agy-gát ismét zárult, a szisztémás keringésben lévő gyógyszerek kelátokkal, vagy egyéb módosító ágensekkel (pl. tiosulfát) semlegesíthetők, tehát a szisztémás toxicitás csökkenthető, míg az agytumorban a gyógyszer nem hatástalanodik, mivel az újra bezárult vér–agy-gát ismét két külön kompartmentet képez. Másik előny, hogy a kezelés nem társul kognitív funkció veszteséssel, szemben a sugárterápiával (*Neuwelt 2004*).

3.3.10. A vér–agy-gát leképezése

A vér–agy-gát károsodásának kimutatásához leggyakrabban kis, vízdékony, rövid plazma felezési idejű (<1 óra) KA-kat használunk. CT esetében a jódtartalmú KA denzitásfokozódás, azaz halmozás formájában mutatja a vér–agy-gát károsodás helyeit, legyen az tumor, gyulladás vagy egyéb patológia. A Hounsfield egységekben (HU) mérhető denzitás fokozódás a KA koncentrációjával egyenesen arányos.

MR vizsgálat során a vér–agy-gát sérülés kimutatásához vízdékony, paramagnetikus GAKA-t használunk, mely jelintenzitás fokozódást okoz a T1-súlyozott képeken, és a halmozás a CT-hez képest nagyobb szenzitivitással mutatkozik. A CT-n lévő halmozással szemben, az MR-en látható jelintenzitás fokozódás a KA-t indirekt módon mutatja a szöveti T1 relaxációs időállandó megváltoztatása révén, valamint a jelintenzitás fokozódás és a KA koncentráció közötti összefüggés nem lineáris.

A kutatás alapjául szolgáló és a dolgozat fő témáját adó szuperparamágneses vas-oxid részecskék szintén alkalmasak a vér–agy-gát integritás vizsgálatára, amint azt a későbbiekben részletesen ismertetett eredmények is mutatják.

3.4. MR kontrasztanyagok

Az MR kontrasztanyagokat a következő jellemzők alapján lehet csoportosítani: mágneses tulajdonságok, kémiai összetétel, ionos és nem-ionos, az MR képalkotás mely paraméterét változtatja meg, pozitív vagy negatív kontrasztot okoz-e, milyen fém atomot tartalmaz, a szervezetbe való beadás formája, biodisztribúció és alkalmazás. Eloszlásuk szerint intersticiális-extracelluláris, intravaszkuláris (blood pool) és célszerv/sejt specifikus KA-kat különböztetünk meg.

A GAKA-k és a szuperparamágneses vas-oxid részecskék ezen tulajdonságokban lényeges különbségeket mutatnak, melyeket összefoglalóan az 1. táblázat tartalmaz.

3.4.1. Gadolínium alapú kontrasztanyagok

A ma használt MR KA-k csaknem kivétel nélkül extracelluláris eloszlásúak és Gd alapúak. A Gd a lantanoidák közé tartozó ritkaföldfém, önmagában toxikus, ezért csak kelátokkal (pl. diethylentriaminpentacetat; DTPA) szorosan kapcsolva alkalmazható, így a Gd ion nem disszociálódik és nem kerül szabad formában a keringésbe. A jelenleg forgalomban lévő GAKA-k egy részében a kelát lineáris, más részükben ciklikus formában tartja kötésben a Gd-t, molekulatömegük kb. 500 Da, méretük kb. 1 nm.

A GAKA plazma felezési ideje kb. 1.5 óra, tehát rövid ideig tartózkodik a keringésben, gyorsan extravazálódik és eloszlik az extracelluláris térben (wash-in fázis) a mindenkori koncentráció grádiens által meghatározott sebességű diffúzióval. A halmozás sebessége és mértéke függ a vaszkularitástól, a perfúziótól és a kapilláris permeabilitástól. A szöveti halmozás maximuma a beadás után néhány perccel (3-10 perc) várható. A rövid ekvilibrium fázis után a GAKA gyorsan elkezd kimosódni (wash-out fázis) a szövetekből és a halmozás kb. 2 óra múlva már nem látható. Ép vesefunkció esetében a GAKA 98 %-a 24 órán belül a vesén keresztül kiürül, és kb. három nap múlva a vizeletben sem lehet már Gd-t kimutatni. Beszűkült vesefunkció esetében viszont a plazma felezési idő jelentősen meghosszabbodhat, és fordítottan arányos a maradék glomeruláris funkcióval (*Bellin – Van 2008*).

A T1-súlyozott képeken látható jelintenzitás fokozódás a GAKA szöveti T1 relaxációs időt rövidítő hatásának a következménye. A Gd ion erősen paramágneses, mivel külső elektronhéján 7 páratlan elektron helyezkedik el, melyek együttesen óriási mágneses momentumot eredményeznek. A GAKA molekula úgy van kialakítva, hogy egy vízmolekula nagyon közel (átlagosan ~0.25 nm) tud férközni a GAKA központi részében lévő Gd ionhoz. Ekkor történik az úgynevezett “inner sphere” relaxáció a dipól-dipól interakció következményeként, vagyis a víz hidrogén-protonok és a Gd-elektronok elektromágneses mezőinek kölcsönhatása révén. A GAKA molekula erős paramágneses hatása messzebb is érvényesül, és az úgynevezett “outer sphere” relaxáció a távolabb lévő (~0.5 nm) vízburokra is kihat (*De León et al. 2015*).

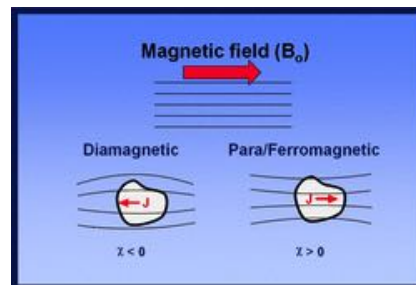
A GAKA nem csak a T1 relaxációt, hanem a T2 és T2* relaxációt is elősegíti, mivel a Gd erős paramágnesessége miatt a lokális mágneses mező torzul, ami intravoxel mágneses inhomogenitást és következményesen a precesszáló protonok fázisvesztését

és a jelintenzitás csökkenését okozza. A rutin MR képalkotás során a Gd enyhe T2-rövidítő hatása nem észlelhető, mivel a szokványos alacsony dózisok és extracelluláris Gd koncentrációk mellett a Gd T1-rövidítő hatása dominál és elnyomja az előbbi effektust. A T2* relaxációs effektust használjuk ki a dinamikus szuszceptibilitás kontrasztos (DSC) perfúziós vizsgálat során, amikor a KA bolus iv. beadása után, a first pass során a még intravaszkuláris, kompartmentalizált és nagy koncentrációjú Gd erős mágneses mezője jelentősen torzítja a lokális mágneses teret, ezért a T2*-súlyozott képeken koncentráció függő jelintenzitás csökkenés jön létre (Zaharchuk 2015).

3.4.2. Az anyagok mágneses tulajdonságai, szuszceptibilitás

Ha egy anyag mágneses térbe kerül, akkor az valamilyen mértékben átmegneseződik. Ez a mágneses térre való érzékenység a szuszceptibilitás, vagy másképpen kifejezve az anyagok mágnesezhetőségének a mértéke. A szuszceptibilitás jele a χ (chi), ami egyenlő az anyagban keltett belső mágnesezettség (polaritás; J) nagysága és a külső mágneses mező erősségének (indukció; B_0) a hányadosával; $\chi = J/B_0$, tehát mértékegység nélküli szám (3. ábra). A szuszceptibilitás szerint az anyagokat négy csoportba sorolhatjuk:

- Diamágneses
- Paramágneses
- Szuperparamágneses
- Ferromágneses



3. ábra. **Mágneses szuszceptibilitás.**

Forrás: *Elster, mri-q.com 2018*

A diamágneses tulajdonság esetén, az anyagon belül a külső mágneses térrel ellentétesen irányuló mágnesezettség alakul ki, az anyagon keresztülhaladó mágneses erővonalak széttolódnak és ezért az effektív mágneses mező az anyagon gyengül. A szuszceptibilitás tehát negatív; $\chi < 0$ (3. ábra). Az élő szervezeteket felépítő anyagok és molekulák (pl. víz, zsír, kalcium) nagyrészt diamágnesesek.

A paramágneses anyagokban a külső mágneses térrel megegyező irányú mágnesezettség alakul ki, az anyagon keresztülhaladó mágneses erővonalak úgy torzulnak, hogy sűrűbbé válnak, így a mágneses mező az anyagon belül felerősödik. A szuszceptibilitás pozitív; $\chi > 0$ (3. ábra). Amint viszont az anyag kikerül a külső mágneses térből, elveszíti a belső mágnesezettségét. A GAKA-k, valamint egyéb fémek (vas, réz, mangán) kelátjai és a deoxihemoglobin is ebbe a csoportba tartoznak.

A ferromágneses anyagok a külső mágneses térben erősen és permanensen felmágneseződnek. A szuszceptibilitás rendkívül erősen pozitív; $\chi \gg 0$ (3. ábra). Ide tartozik pl. a vas, a kobalt és a nikkell. A ferromágnesesség annak köszönhető, hogy ezen anyagokban az atomok bizonyos csoportja tartományokat (domén) képez, melyekben az elemi mágneses momentumok azonos irányban állnak. Mivel a szomszédos domének orientációja véletlenszerű, ezért az anyag eredő mágnesezettsége lehet zérus is. Külső mágneses tér hatására viszont a domének egy irányba rendeződnek, így erős belső mágnesesség alakul ki, ami a külső tér hatásának megszűntével is megmarad, mert a domének véletlenszerű orientációja nem áll vissza. Az emberi szervezetben nyomokban előforduló magnetiten kívül nincs endogén ferromágneses anyag. Számtalan fémes idegentest és műtéti implantátum viszont ferromágneses.

A szuperparamágneses tulajdonság a ferro- és a paramágneses jellemzők között helyezkedik el. Úgy jöhet létre, hogy egy ferromágneses anyagot “felaprítunk” és egy doménnél kisebb méret alkot egy partikulumot. Magnetit esetében az egy-domén limit részecskeméret 120 nm. A mágneses térbe helyezett szuperparamágneses anyag erősen felmágneseződik, (a szuszceptibilitás erősen pozitív, $\chi \gg 0$), mégpedig nagyobb mértékben, mint egy paramágneses anyag, viszont ha a külső mágneses tér megszűnik, a belső mágnesesség is elveszik, hasonlóan a paramágneses anyagokhoz. Természetes szuperparamágneses anyagok a ferritin és a hemosziderin, melyek proteinekbe ágyazott vaskonglomerátumok (*Elster 2018*).

3.4.3. Szuperparamágneses vas-oxid részecskék: általános jellemzés

A fent említett szuperparamágneses tulajdonságok képezik az alapját annak, hogy a vírusrétegtől szuperparamágneses vas-oxid részecskék (**SuperParamagnetic Iron Oxide**

particles; **SPIO**) MR kontrasztanyagként használhatók. Csoportosításuk hidrodinamikus átmérőjük alapján történik: megállapodás szerint az 50 nm feletti részecskéket standard vagy kicsiny (SPIO), a 10-50 nm közötti partikulumokat ultrakicsiny (ultra small, USPIO), míg a 10 nm alattiakat nagyon kicsi (very small, VSPIO) szuperparamágneses vas-oxid részecskéknél nevezük (*Corot et al. 2006*).

Az SPIO részecskék központi részében mikrokristályos vas-oxid, magnetit (Fe_3O_4) található, ezt pedig valamilyen burok, többnyire dextran vagy szemisztetikus szénhidrát veszi körül. A magnetit ferromágneses, és a természetben előforduló ásványok között a legerősebben mágnesezhető. A részecskék a méretbeli és a burok különbségeken kívül eltérést mutathatnak a kristályos mag szerkezetében, valamint a burok komplettségében, vastagságában és töltésében is. Mindezen jellemzők együttesen határozzák meg a farmakológiai tulajdonságokat, az opszonizációt és a celluláris felvétel mértékét, valamint a plazma felezési időt. A szöveti jelintenzitás változás maximuma a beadás után több órával várható. (*Laurent et al. 2008*) (1. táblázat).

Mind preklinikai, mind klinikai adatok alapján az SPIO metabolizmusa három fázisú modell szerint történik: a kezdeti vaszkuláris disztribúciót követi a lassú fagocitózis, azaz a mononukleáris fagocita rendszer (mononuclear phagocyte system; MPS) sejtjeiben (főleg máj, lép, csontvelő, nyirokrendszer) való akkumuláció. Az MPS sejtekben az SPIO részecske lizoszómákba kerül, itt az alacsony pH-jú közegben a burok lehasad, a vas pedig az intracelluláris vasraktárba (ferritin) kerül és részt vesz a sejt metabolizmusban és/vagy transferrinhez kötődve az erythroid prekursor sejtekhez szállítódik és felhasználódik a hemoglobin szintézishez (*Advanced Magnetics Inc. 2005, Neuwelt 2009, Weinstein et al. 2010*) (1. táblázat).

A ferritin legnagyobb mennyiségben az MPS-ben, a máj, a lép és csontvelő sejtjeinek citoplazmájában található, kb. 4000 vas atom raktározódik benne, és a szervezetben lévő vas kb. 25%-a ferritin formájában tárolódik.

A GAKA-val összehasonlítva az (U)SPIO nagyobb T1 és T2 relaxivitással rendelkezik, mely MR kontrasztanyagként való felhasználásra különösen alkalmassá teszi (1. táblázat). A relaxitás (r_1 és r_2) azt mutatja meg, hogy adott koncentrációban egy KA milyen mértékű relaxációs ráta ($1/T_1$ és $1/T_2$) változást okoz. A relaxációs ráta változást a KA koncentráció függvényében ábrázolhatjuk, és az így kapott függvény meredeksége a relaxitás. Az (U)SPIO-k T2 relaxivitása kb. 10-20-szor, T1 relaxivitása

pedig 2-4-szer nagyobb, mint a GAKA-k T2 és T1 relaxivitása. Ezen kívül, míg a GAKA-k r1 és r2 értéke között kicsi a különbség, az (U)SPIO-k r2 értéke jóval nagyobb, mint az r1 értéke (1. táblázat).

Fentiek alapján az (U)SPIO-kat elsődlegesen negatív KA-ként tartjuk számon, mivel a T2- és T2*-súlyozott képeken jelintenzitás csökkenést okoznak (akárcsak a hemosziderin). Az (U)SPIO részecskék ugyanakkor jelentős T1 relaxivitással is rendelkeznek. Állatkísérletekben hamar kiderült, hogy a patkányagyba befecskendezett (U)SPIO a T1-súlyozott képeken halmozást okoz a GAKA-hoz hasonlóan. A T1 jelintenzitás fokozódás – szemben a T2 jelintenzitás csökkenéssel – azonban a koncentráció függvényében bifázisos, azaz alacsonyabb koncentrációk esetén a jelintenzitás fokozódás egy darabig erősödik, majd nagyobb koncentráció esetén a jelintenzitás csökkeni kezd, sőt akár hipointenzitás is kialakulhat. Ez annak a következménye, hogy nagy koncentrációk esetén a T1-súlyozott képeken is mindig jelenlévő T2-relaxációs hatás kezd dominálni (*Neuwelt et al. 1994*). Az r1/r2 hányados csökken a mágneses térerő fokozódásával és ez a jelenség (U)SPIO-k esetében különösen jelentős lehet (*Rohrer et al. 2005*). Ezért az (U)SPIO-k jobb T1-súlyozott kontrasztot mutatnak alacsonyabb térerőn (*Neuwelt et al. 2007*).

3.4.4. Az értekezésben használt (U)SPIO-k speciális tulajdonságai

3.4.4.1. Ferumoxides (Feridex IV.)

A részecske lézer fényszórás technikával mért hidrodinamikus átmérője 120-180 nm, így SPIO-nak kategorizálható (*Corot et al. 2006*). A készítményben tehát meglehetősen nagy a méretbeli szórás és a részecskék szabálytalan alakúak. A partikulum központi részében a vas-oxid (magnetit, Fe₃O₄) kristály aggregátumok formájában van jelen, melyet inkomplett és vékony, kb. 3.3 nm dextrán burok veszi körül. A ferumoxides plazma felezési ideje kb. 2 óra, mivel az MPS sejtek relatíve gyorsan felveszik a részecskéket, mert az inkomplett dextrán burok, a negatív felszíni töltés és a nagy méret miatt a ferumoxides gyorsan opszonizálódik és könnyen kötődik fehérjékhez (*Jung – Jacobs 1995, Weinstein et al. 2010*) (1. táblázat).

Az értekezés alapját képező cikkek írásakor a ferumoxides (Feridex IV., Advanced Magnetics, Cambridge, MA), az FDA által jóváhagyott KA volt a máj MR képalkotásának kiegészítésére. A részecskéket az MPS rendszer sejtjeihez tartozó Kupfer sejtek felveszik és ez a szöveti akkumuláció csökkenti a máj jelintenzitását a T2-súlyozott képeken. A csökkent MPS funkciójú máj léziók (különböző tumorok) nem, vagy kisebb mértékben veszik fel a részecskéket, így a normális és abnormális szövetek közötti kontraszt fokozódik (*Mergo et al. 1998*).

3.4.4.2. Ferumoxtran-10 (Combidex)

A részecske hidrodinamikus átmérője 15-30 nm, így az USPIO-k közé tartozik (*Corot et al. 2006*). Központi részében a magnetit monokristályos formában van jelen. Mivel az MPS sejtjei csak lassan képesek eliminálni a részecskéket a keringésből, a ferumoxtran plazma felezési ideje 24-30 óra, tehát blood-pool anyagként is használható. A hosszú plazma felezési idő elsősorban a vastag (8-12 nm) és komplett dextran burok és az unimodális részecskeméret következménye (*Jung – Jacobs 1995*) (1. táblázat).

Az értekezés alapját képező cikkek írásakor a ferumoxtran-10 (Combidex, Advanced Magnetics, Cambridge, MA) metasztatikus nyirokcsomók MR vizsgálatára szánt, már fázis III vizsgálaton átesett és FDA elfogadásra benyújtott kísérleti készítmény volt. Normális esetben a makrofágok által fagocitált USPIO jelintenzitás csökkenést okoz a késői fázisban (24-36 órás) készített T2- vagy T2*-súlyozott felvételeken, szemben a kóros nyirokcsomókkal, melyek – az MPS sejteket helyettesítő tumorszövet miatt – nem, vagy csak részben veszik fel a ferumoxtrant (*Advanced Magnetics Inc. 2005*).

3.4.4.3 Ferumoxytol (Feraheme)

Ez a részecske is az USPIO-k csoportjába tartozik, mivel hidrodinamikus átmérője 30 nm (*Corot et al. 2006*). A magnetit magot nem dextran, hanem szemiszintetikus szénhidrát, karboximetildextrán burkolja, ami a bioaktív vasat izolálja a plazma komponensektől és ezért hosszú, 14 órás plazma felezési idővel rendelkezik (1.

táblázat). A plazmából való extravazálódás után a nanorészecskéket az MPS eliminálja, elsősorban a máj, lép és csontvelő. A ferumoxytol (Feraheme, Advanced Magnetic, Inc., Cambridge, MA) 2009 óta az FDA által krónikus vesebetegek vashiányos anémiájának kezelésére elfogadott készítmény. Off-label MR kontrasztanyagként való alkalmazhatóságát több tanulmányban vizsgálták (*Weinstein et al. 2010, Toth et al. 2017*).

A ferumoxytol maximális dózisa 510 mg, szükség esetén 3-8 nap múlva ez az adag megismételhető. Ha a betegnek nincs vasraktározási betegsége (hemochromatosis, hemosiderosis), akkor ez a dózis biztonságos, azaz vastúlادagolás nem történik. A biztonsági profil gyermekekben is kiváló és a képalkotáshoz tipikusan használt 1-5 mg/kg dózisonak (alacsonyabb, mint a terápiás dózis) a hemoglobin értékekre nincs jelentős hatása (*Muehe et al. 2016*). Eredeti ajánlás szerint a fenti adagot hígítatlanul intravénásan 1ml/sec (30mg/sec) sebességgel lehetett adni. 2015-ben viszont az FDA módosította a gyógyszer leírását, és felhívja a figyelmet súlyos hiperszenzitív, anafilaxiás reakció lehetőségére. A bólusban (17 ml; 510mg) való befecskendezés helyett lassú, 15 perces infúzióban, hígítva javasolt az 510 mg-os dózist beadni, amivel csökkenthető a mellékhatások előfordulási gyakorisága (*US FDA 2015*). Mindazonáltal a pre- és postmarketing vizsgálatok nagyon kis számban regisztráltak anafilaxiás eseményt (0.2% és 0.02%) és az újabban végzett vizsgálatokban a súlyos reakciók csekély aránya (0-1%) hasonló volt (*Vasanawala et al. 2016*). A képalkotáshoz több fázis is rendelkezésre áll (1. táblázat): 1. *Dinamikus fázis* (1 mg/kg bolus): a GAKA-val készített perfúziós vizsgálatokhoz képest pontosabb relatív vértérfogat (relative cerebral blood volume; rCBV) értékek számolhatók, mivel korai kontrasztkilépés nincs (*Várallyay CG et al. 2018*). 2. *blood-pool fázis*: a hosszú plazma felezési idő miatt a beadás után rövid idővel készített vizsgálaton a ferumoxytol még intravaszkuláris lokalizációjú. Még kifejezetten permeábilis agytumороk esetében is lehetséges nagy felbontású steady-state perfúziós térkép készítése (3-7 mg/kg dózis) (*Várallyay CG et al. 2013*), míg angiográfiás képeken (3-4 mg/kg dózis) a perifériás erek ábrázolódnak rendkívül jól (*Finn et al. 2016*). 3. *késői fázis*: az agytumороkban a jelintenzitás változások a beadás után 24 órával érik el a maximumot (*Neuwelt et al. 2007, 2009, Dósa et al. 2011, Hamilton et al. 2011*).

1. táblázat. Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (*ferumoxides*, *ferumoxtran* és *ferumoxytol*) és a gadoteridol legfontosabb tulajdonságai.

Tulajdonság	Ferumoxides	Ferumoxtran	Ferumoxytol	Gadoteridol
Központi elem	Fe	Fe	Fe	Gd
Molekuláris összetétel	Vas-oxid + inkomplett, vékony burkolat, Dextran T10	Vas-oxid + komplett, vaskos burkolat, Dextran T10, T1	Vas-oxid + komplett burkolat, Polyglucos- sorbitol- carboxymethyl- ether	Gd- kelát, Gd-10-(2-hydroxy- propyl)-1,4,7,10 tetraazacyclododecan -1,4,7-triacetic acid
Részecske- méret (nm) ^a	120-180 SPIO	15-30 USPIO	30 USPIO	1 GAKA
Relaxivitas (mM ⁻¹ sec ⁻¹) ^b	r1=10,1 r2=120	r1=9.9 r2=65	r1=15 r2=89	r1=4 r2=6
Dózis	0.56 mg/kg	2.6 mg/kg	1-7 mg/kg	0.1 mmol/kg
Plazma felezési idő	2 óra	24-30 óra	14 óra	1,6 óra
Intakt vér-agy- gáton keresztüli permeabilitás	nincs	nincs	nincs	nincs
maximális jelintenzitás a beadás után ^c	4 óra	24-72 óra	24 óra	3.5-25 perc
Jelintenzitás T1-súlyozott képen ^c	Minimális jelfokozódás	Fokozott (nagyon nagy koncentrációban alacsony)	Fokozott (nagyon nagy koncentrációban alacsony)	Fokozott
Jelintenzitás T2-súlyozott képen ^c	Jelcsökkenés nem látható	Csökkent	Csökkent	Általában nem változik
Jelintenzitás T2*-súlyozott képen ^c	Jelcsökkenés nem látható	Csökkent	Csökkent	Bólusban csökkent

1. táblázat folytatás. **Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (*ferumoxides*, *ferumoxtran* és *ferumoxytol*) és a gadoteridol legfontosabb tulajdonságai.**

Eloszlás	Intracelluláris, MPS sejtekben	Blood pool fázis, majd késői fázis: extra- és intracelluláris: MPS sejtekben. makrofágok + reaktív astrocyták ^c	Dinamikus fázis, blood pool fázis, majd késői fázis: extra- és intracelluláris: MPS sejtekben. makrofágok + reaktív astrocyták ^c	Dinamikus fázis, Extracelluláris fázis
Kiválasztás	A szervezet vasraktáraiban tárolódik és felhasználódik a hemoglobin szintézisben. A burok széklettel és vizelettel ürül ki.		Vesén keresztül	

a: Lézerszórásos technikával mért hidrodinamikus átmérő

b: Relaxivitás ($\text{mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$), 1.5 T-n, 37 C vízben vagy plazmában; per mM Gd vagy Fe

c: agytumorkban

(Módosítva: *Corot et al. 2006, Weinstein et al. 2010, Neuwelt et al. 2009, Toth et al. 2017*)

3.4.5. Vizsgálatainkat megelőző fő preklinikai és klinikai (U)SPIO-s eredmények

Az (U)SPIO részecskék nem képesek átjutni a normális vér–agy-gáton. Patkányagyba *direkt módon* befecskendezett vagy a vér–agy-gát *ozmotikus megnyitása után* intraarteriálisan beadott USPIO MR-en látott jelintenzitás változásának a helye és kiterjedése jól korrelált a szöveti vasfestődéssel. Fénymikroszkóppal a neuronok testében és nyúlványaiban lehetett vasat látni. A részecskék elektronmikroszkóppal is detektálhatók. Hematoxylin-eozin (HE) és myelin festés semmilyen lényeges neurotoxikus hatást nem mutatott a beadás után 90 nappal (*Neuwelt et al. 1994, Muldoon et al. 1995, 1999, 2005*). Más szerzők in vitro sejtjelöléses kísérletekben nem találtak szabadgyök képződésre és reaktív oxigén származékra utaló toxikus hatást (*Arbab et al. 2004*).

Patkányagyba inokulált gliális tumorokban USPIO iv. beadása után részben tumorsejtekben, részben makrofágokban és az endothelsejtekben, valamint az intersticiumban mutattak ki USPIO akkumulációt. In vitro kísérletekben is sikerült különböző sejtvonalak, így metabolikusan aktív glioma sejtek USPIO-val való jelölése

(Zimmer et al. 1995, Egelhof et al. 1998, Moore et al. 2000, Weissleder et al. 1997). Egy mindössze négy beteget magába foglaló humán tanulmányban is kimutattak USPIO által okozott halmozást gliomában és melanoma metasztázisban *(Enochs et al. 1999).*

Az (U)SPIO-k fiziko-kémiai tulajdonságai, a részletes preklinikai vizsgálatok és a patkánygyban kimutatott szöveti toxicitás hiánya, valamint (U)SPIO-t alkalmazó több – főleg a májat *(Mergo et al. 1998)*, lépét *(Weissleder et al. 1998)*, nyirokcsomókat *(Harisinghani et al. 1997)* és ereket *(Taylor et al. 1999)* vizsgáló – sikeres humán MR tanulmány eredményei képezték az alapját annak, hogy **elsőként az irodalomban klinikai vizsgálatban, nagy esetszámban, humán intrakraniális tumorokban is teszteljük két vas-oxid nanorészecske, a ferumoxides és a ferumoxtran MR kontrasztanyagként való alkalmazhatóságát. Ezen (U)SPIO-k humán KIR-i felhasználási lehetősége addig nem volt tisztázott.** A ferumoxytollal később végzett KIR-i vizsgálatok döntő részben ezen tanulmányaink *(Várallyay P et al. 2002, Neuwelt et al. 2004)* eredményein alapultak.

4. CÉLKITŰZÉSEK

4.1. Két szuperparamágneses vas-oxid nanorészecske, a ferumoxides (SPIO) és a ferumoxtran (USPIO) összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal intrakraniális tumorokban MR képalkotással.

1. Megállapítsuk, hogy a két vas-oxid részecske, a ferumoxides (SPIO) és a ferumoxtran (USPIO) milyen jelintenzitás változásokat okoz az MR képeken humán intrakraniális tumorokban.
2. Összehasonlítsuk a két (U)SPIO által okozott jelintenzitás változásokat egymással és a GAKA által okozott halmozással.
3. Kiderítsük, hogy melyik MR szekvencia a legalkalmasabb a jelintenzitás változások detektálására.
4. Összehasonlítsuk az MR képeken látható jelintenzitás változások eloszlását a szöveti vasfestődéssel és kimutassuk az intracelluláris vas lokalizációt.

4.2. Ferumoxtran (USPIO) halmozás pre- és postoperatív MR vizsgálatokon malignus agytumoros betegeknél, valamint fénymikroszkópos korreláció.

1. Malignus agytumoros betegek pre- és postoperatív MR képein vizsgáljuk a ferumoxtran által okozott halmozást és reziduum megítélhetőségét.
2. Szöveti vizsgálatokkal pontosítsuk a ferumoxtran szöveti és intracelluláris jelenlétét.

4.3. A második generációs USPIO, a ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása malignus gliomákban

1. Objektív, szemiautomatikus módszerrel összehasonlítsuk a két KA halmozás volumenét és jelintenzitását.
2. Megvizsgáljuk, hogy a ferumoxytol és a GAKA halmozás hasonlóan változik-e a tumorok kezelése során.

5. MÓDSZEREK

5.1. Ferumoxides és ferumoxtran összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal különböző intrakraniális tumorokban

Húsz primér és metasztatikus intrakraniális tumoros beteget (életkor eloszlás 30-66 év, átlagéletkor 42.2 év) vizsgáltunk (2. táblázat). A klinikai vizsgálatot az FDA és az Oregoni Orvosi Egyetem Etikai Bizottsága (Oregon Health and Sciences University Institutional Review Board; IRB) is jóváhagyta és minden beteg írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételbe.

MR képképzés: 1. rutin Gd-kontrasztos [Omniscan (gadodiamide); Nycomed Imaging AS, Oslo, Norway, (0.1 mmol/testtömeg kg)] MR vizsgálat készült az (U)SPIO infúzió előtt 1-28 nappal. 2. (U)SPIO infúzió után végzett MR vizsgálat: az első hat beteg – randomizálással – vagy ferumoxides (SPIO), vagy ferumoxtran (USPIO) infúzióban részesült, majd ezután kizárólag ferumoxtrant használtunk, mivel a ferumoxides nem okozott érdemi jelintenzitás változást (2. táblázat). Így három beteg kapott iv. ferumoxides infúziót a javasolt, 0.56 mg/testtömeg kg-os klinikai dózisban, és a beadás után 30 perccel és 4 órával készült MR vizsgálat. Tizenhét betegnek adtunk iv. ferumoxtrant 2.6 mg/testtömeg kg-os dózisban 50 ml sóoldatban hígítva és 4 ml/perc sebességgel infundálva, az FDA által elfogadott kísérleti új gyógyszer jóváhagyási engedélye (Investigational New Drug approval) alapján. Mivel ismert volt a ferumoxtran hosszabb plazma felezési ideje, az MR vizsgálatokat 6 és 24 órával a ferumoxtran infúzió után végeztük 5 betegnél, míg a maradék 12 betegnél csak 24 órás MR vizsgálat készült, mert az első 5 betegnél kiderült, hogy a jelintenzitás változások a 24 órás képeken intenzívebbek voltak és nagyobb területet érintettek.

MR szekvenciák: (U)SPIO infúzió után minden betegnél *spin-echo (SE) T1-súlyozott* (TR:500/TE:13/NEX:2), *fast SE (FSE) T2-súlyozott* (3000/95/2), *FSE protondenzitás-súlyozott* (2500/13/2) és *grádiens-echo (GRE) T2*-súlyozott* (750/23/2, kibillentési szög 10°) képek készültek. Ezen kívül három beteg esetében echo-planar SE T2-súlyozott (4880/90/2; echo-planar imaging factor 11) és echo-planar GRE T2*-súlyozott (750/23/2, kibillentési szög 10°, echo-planar imaging factor 3) szekvenciákat is alkalmaztunk.

2. táblázat. Demográfiai adatok, (U)SPIO típusa és MR jelintenzitás változások

Beteg sorszám # nem / életkor (évek)	Hisztológiai diagnózis	Tumor lokalizáció	(U)SPIO	Vas felvétel	T1 jelintenzitás változás	T2 jelintenzitás változás
1. N / 48	Metasztitikus nagy sejtes karcinóma	cerebellum	<i>ferumoxides</i>	-	-	-
2. F / 46	Anaplasztikus oligo	J temporoparietális	<i>ferumoxides</i>	+ *	+	-
3. N / 53	Meningeoma	B frontális	<i>ferumoxides</i>	-	-	-
4. F / 54	GBM	B thalamus, parietális	ferumoxtran	+	+	+
5. F / 55	Anaplasztikus oligo	B temporális	ferumoxtran	+ †	+	+
6. F / 54	Oligo	B frontotemporális	ferumoxtran	-	-	-
7. N / 47	Hamartoma	B temporális	ferumoxtran	+ *	+	-
8. N / 30	Medulloblastoma	cerebellum	ferumoxtran	+ †	+	+
9. F / 58	Anaplasztikus oligo	J hátsó temporális	ferumoxtran	+ †!	+	+
10. F / 55	Laphám karcinóma	Nasopharynx és koponya bázis	ferumoxtran	+	+	+
11. F / 50	Laphám karcinóma	Nasopharynx és koponya bázis	ferumoxtran	+	+	+
12. N / 42	Meningeoma	B petroclivális	ferumoxtran	+ †	+	+
13. F / 57	Oligo	J parietális	ferumoxtran	-	-	-
14. F / 55	Anaplasztikus glioma	B temporális	ferumoxtran	+ *	+	-
15. N / 54	GBM	J temporoparietális	ferumoxtran	+	+	+
16. N / 66	GBM	J frontális	ferumoxtran	+ †	+	+
17. N / 57	Anaplasztikus oligo	J frontális	ferumoxtran	+ †!	+	+
18. F / 54	Hypophysis makroadenoma	Intra- és supraselláris	ferumoxtran	+	+	+
19. F / 39	GBM	B fronto-operculáris	ferumoxtran	+	+	+
20. F / 46	Anaplasztikus oligo	J hátsó temporális	ferumoxtran	+ †!	+	+

Magyarázat: B: Bal, J: Jobb, +: igen, -: nem, F: férfi, N: nő, oligo: oligodendroglioma, GBM: glioblastoma multiforme

* a vas akkumuláció csak minimális volt a Gd halmozáshoz képest.

† a ROI-val mért ferumoxtran halmozás (ld. anyag és módszerek fejezet) regionálisan kifejezettebb volt, mint a Gd halmozás.

! ferumoxtran halmozást olyan helyen is látni lehetett, ahol Gd halmozás nem volt jelen.

A vizsgálatokat 1.5T-s berendezéssel (Gyrosan, Philips, Best, the Netherlands vagy Horizon LX, GE Medical Systems, Milwaukee, WI) végeztük (field of view; FOV 23 cm, mátrix méret 256 x 192, szeletvastagság 3 mm, a szeletek közötti távolság 1 mm).

Kvantitatív analízis: A ferumoxides infúziót kapó három beteg közül csak egy esetben lehetett minimális jelintenzitás változást látni (2. táblázat), ezért ezekben a betegekben kvantitatív értékelést nem végeztünk.

A ferumoxtran infúzióban részesülő 17 beteg közül, a kvantitatív elemzésbe a két nasopharyngeális karcinómában szenvedő beteget (#10 és #11 beteg) nem lehetett bevonni, mivel mindkét esetben csak minimális intrakraniális terjedés volt a foramen ovale régiójában a dura involválásával, és ezért a pontos mérés kivitelezhetetlen volt. A maradék 15 betegben a Gd halmozást és a ferumoxtran által okozott jelintenzitás változást a következőképpen hasonlítottuk össze: kis mérési régiókat (region of interest; ROI) helyeztünk a ferumoxtran infúzió után készült SE T1-súlyozott képeken a maximális és a minimális ferumoxtran-halmozásos tumor területbe, valamint a ferumoxtran halmozást nem mutató tumor komponensbe és referenciaként a normális jelintenzitású állományba. Ezen kívül a pre-ferumoxtran-halmozásos FSE T2-súlyozott képek és a Gd-halmozásos SE T1-súlyozott képek összevetésével egy ROI-t helyeztünk a Gd-halmozó tumor körüli T2 hiperintenzitásba (brain around enhancing tumor; BAT), hogy itt is mérjük az USPIO által okozott esetleges jelintenzitás változásokat. Ezek után ugyanezen régiókba tettünk ROI-kat az alábbi táblázatban feltüntetett szekvenciákon (3. táblázat).

3. táblázat. ROI-k elhelyezése az alábbi szekvenciákon történt.

	ferumoxtran előtt		ferumoxtran után
	pre-Gd	post-Gd	
SE T1	+	+	+
FSE T2	+	-	+
GRE T2*	+(2)	-	+

+: ROI elhelyezés történt, -: nem készült, (2): csak két betegben állt rendelkezésre

A ROI-kban mért jelintenzitásokat normalizáltuk: egy specifikus ROI jelintenzitás értékét elosztottuk a normális agyterületből származó ROI jelintenzitás értékével. Ezeket a normalizált jelintenzitás értékeket minden szekvencia esetében (3. táblázat) összehasonlítottuk egymással. A statisztikai számítást páros-mintás t próbával (paired-

sample t test) végeztük és szignifikáns különbségnek a $P < 0.05$ értéket tekintettük. A fent leírt analízis módszer kizárta annak a lehetőségét, hogy vakon – tehát a KA (Gd, ferumoxtran) ismerete nélkül – végezzük a képek elemzését, mivel az összehasonlításhoz a ROI-kat a ferumoxtran-halmozásos képeken kellett elhelyezni.

Szövetteni elemzés: a biopsziás mintákat neutrális pufferolt formalinban legalább 24-48 órán keresztül immerzió fixáltuk, majd tojássárga zselatinba ágyaztuk. Az egész biopsziás mintából 100 μm vastagsággal készültek vibratóm sorozatmetszetek. A szöveti vaskimutatást diaminobenzidin (DAB)-Perls festéssel végeztük a korábbi leírásoknak megfelelően hematoxilin háttérfestéssel (*Muldoon et al. 1995*). A metszetek értékelését Lesile L. Muldoon sejtbiológus és Randal R. Nixon neuropatológus végezték.

5.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran képalkotás malignus agytumoros betegekben

Hét különféle szövettani típusú, malignus agytumoros beteg (életkor eloszlás 22-68 év, átlagéletkor 49.9 év) került a teljes vizsgálatba (4. táblázat), mely az FDA és az IRB által jóváhagyott protokoll szerint történt. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot kaptunk. Három ferumoxtran infúzióban nem részesülő beteg biopsziás mintája szolgált kontrollként a szövettani összehasonlításhoz: egy GBM, egy oligodendroglioma és egy astrocytoma.

MR vizsgálati protokoll és műtét:

1. Gd-halmozásos MR: rutin pre- és postkontrasztos MR vizsgálat készült GAKA [Omniscan (gadodiamide); Nycomed Imaging AS, Oslo, Norway] iv. adásával standard, 0.1 mmol/testtömeg kg dózissal 1-28 nappal (átlag 13 nap) a ferumoxtran infúzió előtt.

2. Preoperatív ferumoxtran-halmozásos MR: ferumoxtran iv. infúziója (2.6 mg Fe/kg dózis, 50 ml normál sóoldatban hígítva, 4 ml/min flow) után 24 órával készült MR vizsgálat. Ez után 4 órán belül a betegek műtétre kerültek: mindegyik betegnél kraniotómia történt, hat esetben tumor rezekcióval és egy esetben csak biopsziával.

3. Postoperatív ferumoxtran-halmozásos MR: 16-33 órával (átlag 22 óra) a preoperatív ferumoxtran-halmozásos MR után, átlag 18 órával a műtét után újabb MR

vizsgálat készült először GAKA nélkül, majd GAKA-val (Omniscan, 0.1 mmol/kg).

4. Műtét utáni késői MR: három betegnél tudunk két héten belül követéses MR vizsgálatot végezni. A #3 betegnél 4 nappal, a #5 betegnél 8 nappal és a #2 betegnél 12 nappal készült az MR vizsgálat a műtét után. Ezen kívül a #7 betegnél 5 hónapon keresztül havonta rutin Gd-halmozásos MR vizsgálatok történtek, valamint ugyanezen beteg esetében intraoperatív 0.15 T MR vizsgálat is készült.

Mindegyik MR vizsgálat tartalmazott axiális SE T1-súlyozott és axiális FSE T2-súlyozott mérést. Ezekon kívül, a ferumoxtran-halmozásos MR vizsgálatokat GRE T2*-súlyozott szekvenciával egészítettük ki, mivel a korábbi, 5.1. vizsgálatunkban a SE T1-súlyozott képek mellett ez adódott a másik legjobb mérésnek a ferumoxtran akkumuláció detektálására. Az MR vizsgálatok 1.5 T mágnessel készültek és az alkalmazott paraméterek megegyeztek a korábbi, 5.1. vizsgálatunkban használtakkal. Az intraoperatív MR vizsgálatot PoleStar N-10 (Odin Medical Technologies, Yokneam Elit, Israel) berendezéssel végeztük.

4. táblázat. **Demográfiai adatok, valamint a ferumoxtran és Gd halmozás összehasonlítása a pre- és postoperatív MR vizsgálatokon**

Beteg sorszám #/nem / kor (évek)	Diagnózis/műtét	Preop gadolinium halmozás	Preop ferumoxtran halmozás	Postop reziduális ferumoxtran halmozó terület	Postop extra gadolinium halmozó terület
1. / F / 59	Anaplasticus oligo / rezekció	+	+ !	?	-
2. / N / 67	GBM / rezekció	+	+ !	+	-
3. / F / 68	GBM / rezekció	+	+ !	+	-
4. / F / 40	GBM / rezekció	+	+	?	-
5. / F / 42	Met / rezekció	+	+	?	-
6. / F / 47	Anaplasticus oligo / rezekció	+	+ !	+	-
7. / N / 26	Anaplasticus oligo / biopszia	+	+ !	+	-

Magyarázat: F: férfi, N: nő, +: igen, -: nem, oligo: oligodendroglioma, GBM: glioblastoma multiforme, Met: metasztázis

? reziduum nem volt egyértelmű, mivel a műtét után jelentős morfológiai változás jött létre az érintett területben és a rezekciós üreg peremének fokozott jelintenzitása véres hemosztatikus anyagtól vagy reziduális ferumoxtrantól is származhatott.

! ferumoxtran halmozást olyan helyen is látni lehetett, ahol Gd halmozás nem volt jelen.

Kvantitatív értékelés: az alábbi vizsgálatokon, a SE T1-, FSE T2-, és a GRE T2*-súlyozott szekvenciákon ROI-kat helyeztünk a következő területekbe.

1. a preoperatív ferumoxtran-halmozásos MR-en, a normális jelintenzitású fehérállományba (frontális lebeny), a tumorba és a halmozó tumor körüli állományba (BAT) tettünk ROI-kat, utóbbit közvetlenül a ferumoxtran-halmozó tumorperem mellett egy 1 cm átmérőjű területen. A tumor jelintenzitását négy esetben abból a tumorrészből mértük, ami a postoperatív MR vizsgálaton reziduális területként ábrázolódt (4. táblázat). Ez a módszer lehetővé tette a reziduális ferumoxtran halmozás összehasonlítását a műtét előtti ferumoxtran halmozással. Reziduális területeknek minősítettük azokat a ferumoxtran-halmozó régiókat, amelyek a pre- és postoperatív MR képeken ugyanolyan morfológiával és azonos lokalizációban ábrázolódtak. Három betegben reziduális területet nem lehetett egyértelműen azonosítani, mert az esetleges kis reziduális ferumoxtran, valamint a postoperatív vérdegradációs termékek és hemosztatikus anyagok jelintenzitása között nem lehetett különbséget tenni (4. táblázat); ekkor a tumoron belüli ROI-t a legintenzívebb ferumoxtran jelintenzitás változás helyébe tettük.

2. A postoperatív ferumoxtran-halmozásos MR vizsgálaton, mind GAKA adása előtt és után ugyanezen területekbe helyeztünk ROI-kat. Értelemszerűen a BAT ROI-t közvetlenül a rezekciós üreg mellé tettük. Ezen kívül ROI-kat helyeztünk a műteti üreg geometriai közepébe és peremébe, amit a rezekciós terület széli részén egy 5 mm átmérőjű ROI-val mértünk, valamint a kraniotómia alatti postoperatív extraaxiális folyadékgyülembe. A #7 betegnél csak a kis biopsziás üreg középső részének jelintenzitását mérhettük, de a perem jelintenzitását nem lehetett korrektül meghatározni.

A különböző ROI-kból nyert jelintenzitás értékeket a korábbi, 5.1. tanulmányban leírtakkal megegyező módon normalizáltuk és analizáltuk. A ROI-k pontos elhelyezése az idegsebészekkel konszenzus alapján történt, akik kiegészítő információkkal szolgáltak a rezekció mértékét és így a lehetséges reziduális tumor jelenlétét, a műtét alatti vérzést, valamint a felhasznált hemosztatikus anyagok típusát és elhelyezését illetően (5. táblázat). A statisztikai analízist Microsoft Excel programmal végeztük.

A dura és az erek jelintenzitását csak szubjektíven értékeltük, mivel a pontos mérés lehetetlennek bizonyult a kis ROI-k, a képek különböző dőlésszöge és az áramlási

műtermékek miatt.

Szövetteni vizsgálat: a biopsziás minták fixálása a korábbi, 5.1. vizsgálatban leírtakhoz hasonló módon történt. A vasfestés (DAB-Perls + hematoxin háttérfestés) és az immunhisztokémiai festés 100 µm-es vibratóm metszeteken készült. Az immunfestés az astrocyták azonosításához egy antihumán GFAP (glial fibrillary acid protein) monoklonális antitesttel (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) és biotinált szekunder antitesttel, valamint vörös színt adó alkalikus foszfatáz szubsztráttal (Vector ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) történt. Az értékelést Lesile L. Muldoon sejtbiológus és Randal R. Nixon neuropatológus végezték.

5.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása

58 agydaganatos beteg (37 férfi és 21 nő, átlag életkor +/- SD: 51,32 +/- 13,25 év) került ebbe a tanulmányba, mely az IRB és HIPAA (Health Insurance Portability and Accountability Act) által jóváhagyott protokoll alapján történt. Minden beteg beleegyező nyilatkozatot adott a vizsgálatban való részvételhez.

Beteg beválasztás: egy beteg akkor kerülhetett a vizsgálatba, ha a szövettani diagnózis high-grade glioma (WHO grade III vagy IV) volt, és mind Gd-halmozásos, mind ferumoxytol-halmozásos MR vizsgálatok is rendelkezésre álltak. Az 58 betegnek (40 GBM, 1 gliosarcoma, 6 anaplasticus astrocytoma, 9 anaplasticus oligodendroglioma, 2 anaplasticus oligoastrocytoma) összesen 193 komplex MR vizsgálata (193 post-gadoteridol és 193 post-ferumoxytol) került az analízisbe, egy betegnek maximum hat komplex vizsgálata volt. A komplex MR vizsgálatokat az addig kapott terápia szerint csoportosítottuk: 8 vizsgálat kemoradioterápia (CRT) előtt; 107 vizsgálat post-CRT 90 napon belül; 15 vizsgálat post-CRT több mint 90 nappal; 63 vizsgálat bevacizumab (Avastin, Genetech, South San Frisco, CA) után. A vizsgálatok előtti szteroid szedését (igen/nem) szintén regisztráltuk.

MR képalkotás: a vizsgálatok 3 T-s berendezéssel (TIM Trio, Siemens, Erlangen Germany) készültek. Prekontrasztos, post-GAKA (gadoteridol, 0.1 mmol/kg) és 24 óras post-ferumoxytol SE T1-súlyozott képek készültek azonos paraméterekkel: TR/TE 900/11 ms, kibillentési szög 90°, FOV 180 x 240 mm, mátrix 192 X 256, axiális

szeletek száma 44, szeletvastagság 2 mm, szeletek közötti távolság 0. A ferumoxytol a post-gadoteridol-os vizsgálat után került beadásra, 4 mg/kg dózisban, 1:1 arányban sóoldatban hígítva, ami 15 mg/mL koncentrációt eredményezett. Ezután kb. 24 órával (átlag +/- SD: 23.1 +/- 2.51 óra) készültek a késői ferumoxytol-halmozásos MR képek.

Képanalízis: A gadoteridol-halmozásos és a ferumoxytol-halmozásos képeket koregisztráltuk a pre-kontrasztos képekhez az FMRIB Software Library (FSL) Lineáris Image Registration Tool (FLIRT) használatával. Ezután a halmozó tumorokat fél-automatikus módszerrel szegmentáltuk: manuálisan ROI-t rajzoltunk a kontrasztos (post-gadoteridol és post-ferumoxytol) koregisztált képeken úgy, hogy a ROI minden szeletben lefedje a vizuálisan halmozásnak látott összes voxelt és egyúttal normális szürke- és fehérállományt is magába foglaljon a halmozás közelében, majd ez a ROI került a pre-kontrasztos szeletekre is (*Jenkinson et al. 2012*) (4. ábra).

A végső kontraszt-halmozásos maszkot három független binumerikus maszk $A \cap B \cap C$ metszete határozta meg a következő összefüggés alapján:

$$A_i = \text{CON}_i > \overline{\text{CON}_{i \subseteq Q}} + 0.5 \times \sigma_{i \subseteq Q}; \quad [1]$$

$$B_i \subseteq Q; \quad [2]$$

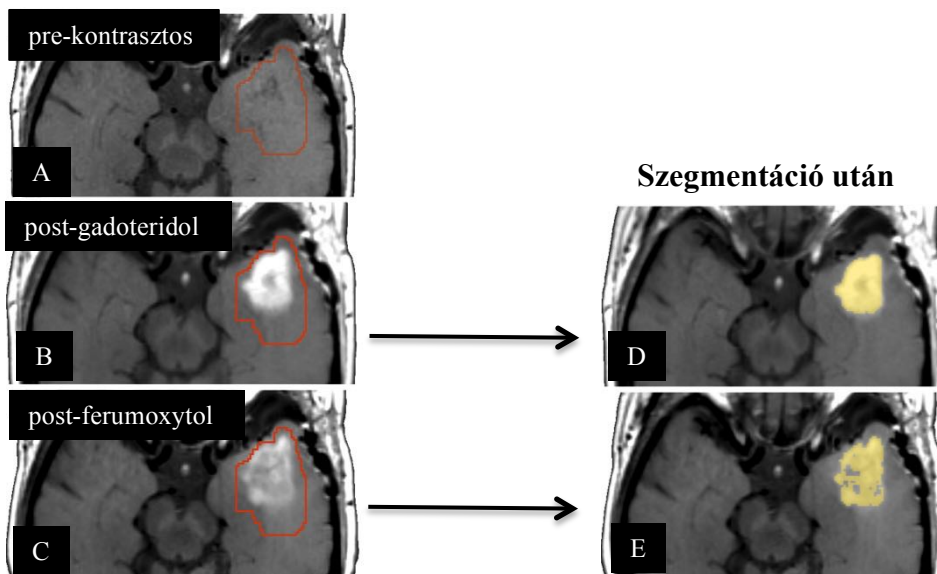
$$C_i = \text{CON}_i / \text{NONCON}_i > \overline{\text{CON}_{i \subseteq Q}} + 0.5 \times \sigma_{i \subseteq Q} / \overline{\text{NONCON}_{i \subseteq Q}}; \quad [3]$$

ahol i : egy voxel, CON: egy kontraszt-halmozásos T1-súlyozott kép, NONCON: egy nem-kontraszt-halmozásos T1-súlyozott kép, Q : a manuálisan rajzolt ROI maszk, $\sigma_{i \subseteq Q}$: egy kontraszt-halmozásos képen a ROI-n belüli voxelek jelintenzitás értékének standard deviációja és \subseteq : a megfelelő részhalmaz. Vagyis ahhoz, hogy egy voxel a végső kontrasztos maszkba tartozzon a következő feltételeknek kell teljesülnie: 1. a kontraszt-halmozásos képen a voxel jelintenzitás értékének nagyobbnak kell lenni, mint a kontraszt-halmozásos képen a manuálisan rajzolt maszkon belül a voxelek jelintenzitás értékének átlaga plusz az értékek standard deviációjának a fele, 2. A voxel bele kell tartozzon a manuálisan rajzolt maszkba és 3. a kontraszt-halmozásos képen a voxel jelintenzitás értéke / a nem-kontraszt-halmozásos képen a voxel jelintenzitás értéke hányadosának nagyobbnak kell lenni, mint az a hányados, amit a kontraszt-halmozásos képen a ROI-n belüli voxelek átlag jelintenzitás értéke plusz az értékek standard deviációjának a fele / a nem-kontraszt-halmozásos képen a ROI-n belüli voxelek átlag jelintenzitás értéke ad. Az [1] és [3] képletben a standard deviáció beszámítása

korrekciós megfontolások miatt szükséges, ugyanis a kontrasztos képen a ROI-n belüli átlag jelintenzitás érték lejjebb állítható pl. liquort tartalmazó voxelek belemérése miatt, de a ROI-n belüli jelintenzitás értékek standard deviációja felének az átlaghoz való hozzáadása enyhén megemeli és ezzel korrigálja a halmozási küszöbértéket.

A halmozás volumene: mindkét KA esetében a teljes halmozó volument úgy számoltuk, hogy a halmozó maszkokban lévő voxelek számát beszoroztuk a voxel volumenével. Mivel az abszolút volumen értékek eloszlása erős jobbra ferdeséget mutatott (tehát relatíve sok kis volumen mellett relatíve kevés nagy volument lehetett mérni), ezért a volumen értékek köbgyökét vettük (“D”-nek nevezzük), amivel a normál eloszlás jobban megközelíthető és a statisztikai teszt pontosítható. Ezzel a nagy és kis volumenek közötti nagy különbség “elsimítható”; pl. 27 mm^3 és 8 mm^3 között a különbség nagy, de ezek köbgyöke között (3 mm és 2 mm) a különbség már kicsi.

A halmozás jelintenzitása: a halmozás jelintenzitásokat normalizáltuk a manuálisan rajzolt ROI-n belüli nem-halmozó voxelek (a Q-n belül a végső maszk komplementje) jelintenzitásával. A normalizált jelintenzitást “SI”-nek (Signal Intensity) nevezzük.



4. ábra. **Képanalízis:** ugyanazon ROI (pirossal körberajzolt terület) került felhelyezésre a koregisztrált pre-kontrasztos (A), a post-gadoteridol (B) és a post-ferumoxytol (C) T1-súlyozott képekre. Automatikus szegmentáció után a gadoteridol-halmozásos (D) és a ferumoxytol-halmozásos (E) maszk.

Statisztikai analízis: A normál eloszlás feltételezés teljesítéséhez tehát a volumen értékek köbgyökével készültek a számítások. A betegekben a tumorok méretében való

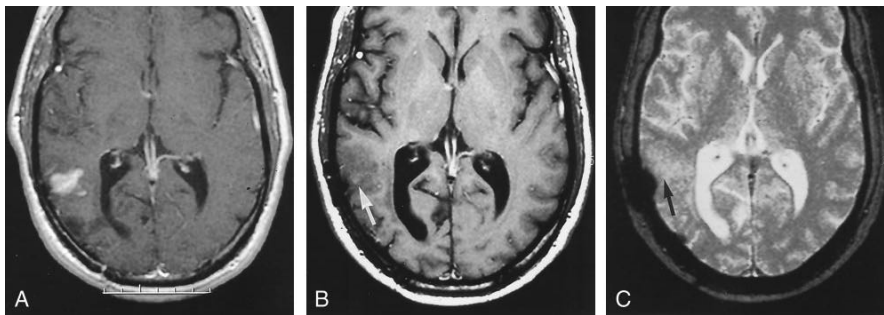
nagy variabilitás miatt, az abszolút különbség helyett relatív differenciát számoltunk a köbgyök volumenek (D) és az egységesség miatt a jelintenzitások(SI) között is. A volumen relatív különbség a $(D_{Fe}-D_{Gd})/D_{Gd}$, míg a SI relatív különbség $(SI_{Fe}-SI_{Gd})/SI_{Gd}$ képlet alapján számolható. Ezzel csökkenthető az a nemkívánatos jelenség, hogy a lézió mérete jelentősen befolyásolja az eredményeket. Például egy nagy lézió esetében az abszolút különbség a két KA között nagy lehet (pl. $D_{Fe}-D_{Gd}=100-90=10$), de ha ezt relatív különbséggé konvertáljuk, akkor a nagy különbség eltűnik ($10/90=1/9$), és azonos lehet kis léziók közötti relatív különbséggel (pl. $(10-9)/9=1/9$).

A ferumoxytol és gadoteridol halmozás köbgyök volumenei (D_{Fe} és D_{Gd}) és normalizált jelintenzitásai (SI_{Fe} és SI_{Gd}) közötti kapcsolat számításához a Pearson korrelációt alkalmaztuk. A ferumoxytol és gadoteridol halmozás általános összehasonlítása egy random effektus modell szerint történt. A különböző betegcsoportok között a két KA volumenének (D) és jelintenzitásának (SI) relatív különbségeit pedig egy lineáris kevert effektus modell szerint hasonlítottuk össze, figyelembe véve a lehetséges zavaró változókat (mint az MR vizsgálat időpontja a ferumoxytol beadás után, előzetes radioterápia, szteroid kezelés, életkor és nem). Ezen kívül a bevacizumab (N=26) és szteroid (N=26) terápia hatását (véletlen, hogy mindkét csoportba ugyanannyi beteg került) a két KA volumen (D) és jelintenzitás (SI) relatív különbségére szintén lineáris kevert effektus modell szerint vizsgáltuk. $P < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai analízis SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC) programmal készült.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Ferumoxides és ferumoxtran összehasonlítása gadolínium alapú kontrasztanyaggal különböző intrakraniális tumorokban

Ferumoxides: A három betegből csak egy esetben ábrázolódtott minimális – a vas akkumulációjára utaló – T1 jelintenzitás fokozódás a 4 órás vizsgálaton, mely jóval kisebb és halványabb volt, mint a Gd halmozás. A T2- és GRE T2*-súlyozott képeken nem lehetett jelintenzitás változást detektálni (5. ábra).



5. ábra. #2 beteg, anaplasztikus oligodendroglioma.

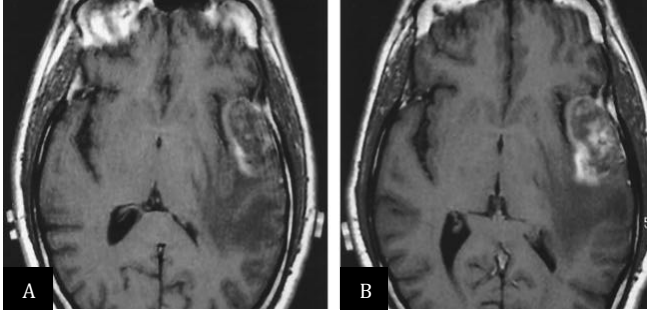
A, Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott képen jobb hátsó temporális intenzíven halmozó kis tumor látható.

B és C, Négy órával ferumoxides infúzió után, a SE T1-súlyozott kép (B) csak pontszerű jelintenzitás fokozódást mutat (nyíl), míg a GRE T2*-súlyozott képen (C) nem lehet jelintenzitás csökkenést látni (nyíl). A laterális, csont körüli kis jelmentes terület a C képen korábbi kraniotómia miatti műtermék!

Ferumoxtran: A 17 betegből 15 esetben ábrázolódtott a vas akkumulációjára utaló T1 és T2, vagy csak T1 rövidülés (6-8. ábra). Csak a két low-grade oligodendroglioma nem mutatott értékelhető jelintenzitás változást egyik súlyozásnál sem (2. táblázat, 9. ábra). A 15 pozitív esetben, a T1-súlyozott képeken a jelintenzitás fokozódást (halmozást) könnyen lehetett detektálni, emellett a vas akkumuláció leginkább a GRE T2*-súlyozott felvételeken ábrázolódtott jelintenzitás csökkenés formájában. A 15 agytumorból 13 esetben a ferumoxtran jelintenzitás változások közel egybe estek a Gd halmozásos területekkel (6-8. ábra), de három malignus tumorban olyan régiókban is detektáltunk ferumoxtrant, ahol Gd halmozás nem ábrázolódtott (2. táblázat, 7. ábra).

A vénák és durális sinusok variábilis T1 hiperintenzitást és perzisztáló T2 hipointenzitást mutattak a perzisztáló ferumoxtran vérkoncentráció miatt.

Kvantitatív analízis: A ferumoxtran T1 és T2 rövidítési effektusa egyértelmű volt (10. és 11. ábra), és a 6 órás és 24 órás képeket összehasonlítva az USPIO progresszív akkumulációjára utaló szignifikáns jelintenzitás fokozódást lehetett látni ($P < 0.05$), valamint a halmozás kiterjedése is nagyobb lett a későbbi képeken (6. ábra).



6. ábra. #5 beteg, **anaplasztikus oligodendroglioma.**

A és B, 6 órával (A) és 24 órával (B) a ferumoxtran infúzió után készült SE T1-súlyozott képeken progresszív perifériás és foltos centrális halmozás látható a bal temporalis tumorban.

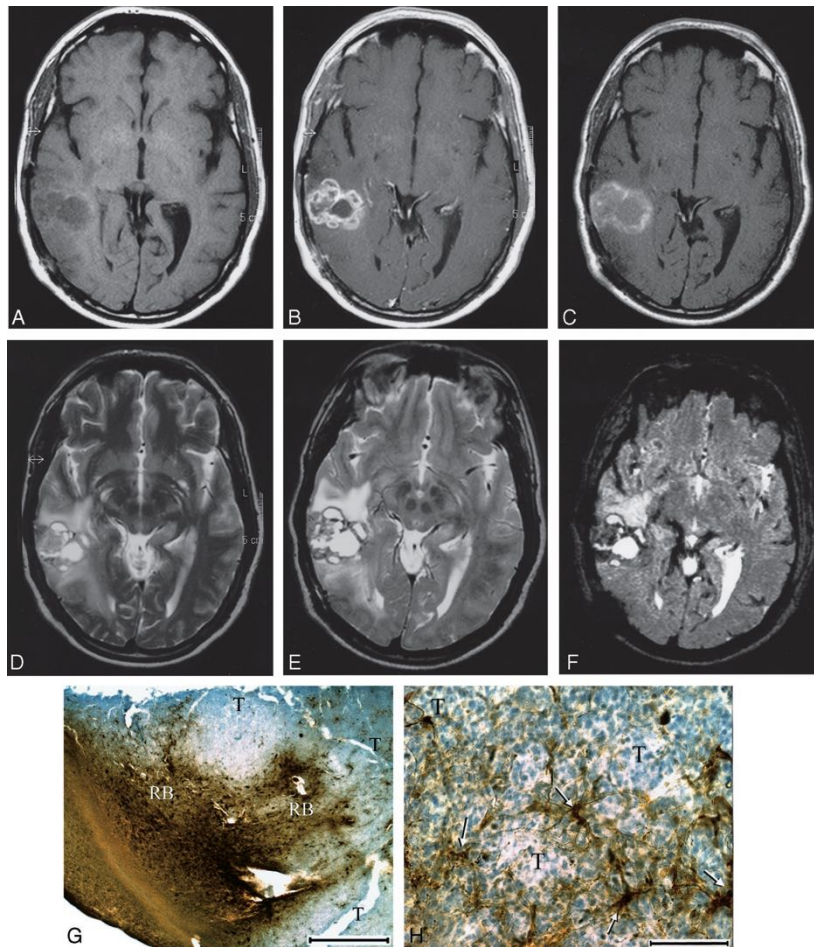
Hét esetben régiónálisan (vagy a maximális és/vagy a minimális ROI-ban) nagyobb normalizált T1 jelintenzitást mértünk ferumoxtrannal mint GAKA-val (2. táblázat, 7. ábra).

A normalizált jelintenzitások régiónkénti átlag értékeit elemezve, a SE T1-súlyozott képeken a maximális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban látott jelintenzitás fokozódás szignifikáns ($P < 0.001$) és hasonló volt ferumoxtrannal és GAKA-val (10. ábra). A minimális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban mind a Gd ($P < 0.001$), mind a ferumoxtran ($P < 0.005$) halmozása szignifikánsnak adódott, de a jelintenzitás a Gd-halmozás esetében erősebb volt ($P < 0.05$) (10. ábra).

Az FSE T2-súlyozott képeken mind a maximális, mind a minimális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban jelentős jelintenzitás csökkenést ($P < 0.001$, $P < 0.01$) lehetett detektálni a prekontrasztos képekhez képest (11. ábra).

A GRE T2*-súlyozott képeken a minimális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban és a BAT régióban szignifikánsan alacsonyabb jelintenzitást ($P < 0.005$, $P < 0.05$) mértünk, mint a FSE T2-súlyozott képeken (11. ábra) és vizuálisan is egyértelműen könnyebb volt a jelintenzitás csökkenés detektálása a GRE T2*-súlyozott képeken (7. ábra). A két betegben, akiknél rendelkezésre állt pre- és post-ferumoxtran GRE T2*-súlyozott kép is, a jelintenzitás százalékos csökkenését számoltuk és ezt összehasonlítottuk a FSE T2-

súlyozott képeken lévő jelintenzitás csökkenéssel. Az első beteg a GRE T2*-súlyozott képeken a maximális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban 77%-os, a minimális ferumoxtran-halmozásos ROI-ban pedig 55%-os jelintenzitás csökkenést mutatott, míg a FSE T2-súlyozott képeken ugyanezen ROI-kban 65% és 10 %-os jelintenzitás csökkenést lehetett mérni. A második beteg 62%, 30% és 38%, 13.5% jelintenzitás csökkenéseket mutatott a fenti sorrendnek megfelelően.



7. ábra. #9 beteg, anaplasztikus oligodendroglioma.

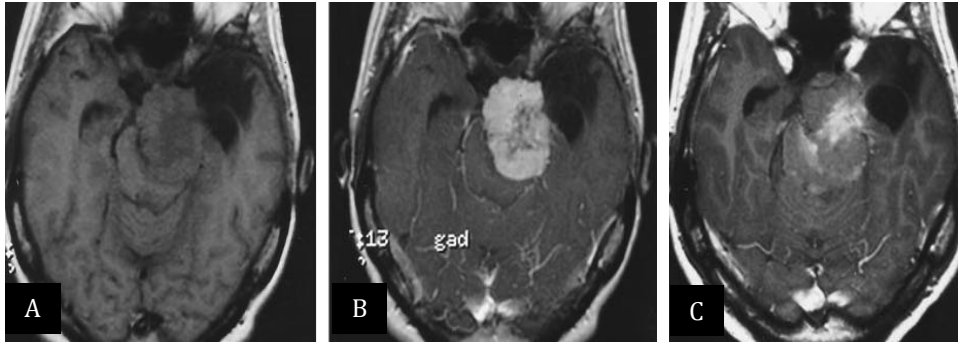
A és B, Natív (A) és Gd-halmozásos (B) SE T1-súlyozott képeken jobb hátsó temporális tumor látható intenzív, lobulált perifériás halmozással és nem-halmozó centrális területtel.

C, 24 órával a ferumoxtran infúzió után, a SE T1-súlyozott kép jelentős jelintenzitás fokozódást mutat hasonló lokalizációban, de kisebb mértékű perifériás lobuláltsággal a Gd-halmozáshoz képest. Az is megfigyelhető, hogy a Gd-t nem halmozó centrális tumorrész izointenzív lett a fehérállományal, ami ferumoxtran akkumulációra utal.

D–F, FSE T2-súlyozott kép ferumoxtran infúzió előtt (D) valamint FSE T2-súlyozott (E) és GRE T2*-súlyozott képek (F) 24 órával ferumoxtran infúzió után heterogén jelintenzitású tumort mutatnak perifériás csökkent jelintenzitással, ami a GRE T2*

képen sokkal intenzívebb. Az alacsony jelintenzitású területek eloszlása hasonló a SE T1-súlyozott képen (C) látható fokozott jelintenzitású területekhez.

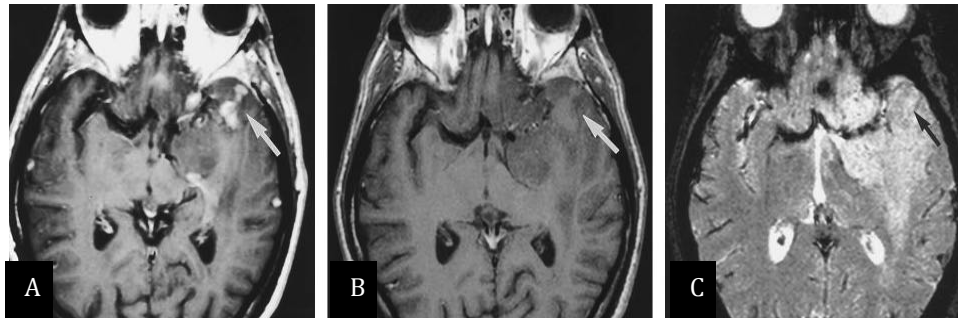
G és H, Szöveti vasfestés (DAB-Perls) mikrofotói. A G képen (eredeti nagyítás x7.5; a szakasz 1 mm-t jelez) a tumor (T) és körülötte perifériásan a tumor-reaktív agy határ (reactive brain; RB) látható, utóbbi helyen intenzív barna vasfestődéssel. A H képen (eredeti nagyítás x100; a szakasz 0.1 mm-t jelez) a tumor-reaktív agy határon a sejteken belüli vas inkább fibrilláris nyúlványokkal rendelkező parenchymális sejtekben (nyilak), mint a kerek tumorsejtekben (T) látható.



8. ábra. #12 beteg, meningeoma radioterápia után.

A és B, Natív (A) és Gd-halmozásos (B) SE T1-súlyozott képek: a tumor a centrális rész kivételével élénk halmozást mutat a B képen.

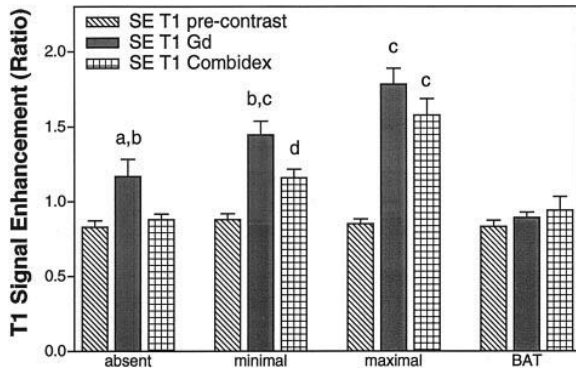
C, SE T1-súlyozott kép 24 órával ferumoxtran infúzió után: erős ferumoxtran halmozás látható a tumor centrális, Gd-t kevésbé halmozó részében és csak minimális ferumoxtran halmozás ábrázolódik a környező, Gd-t intenzíven halmozó tumorrrészben.



9. ábra. #6 beteg, oligodendroglioma.

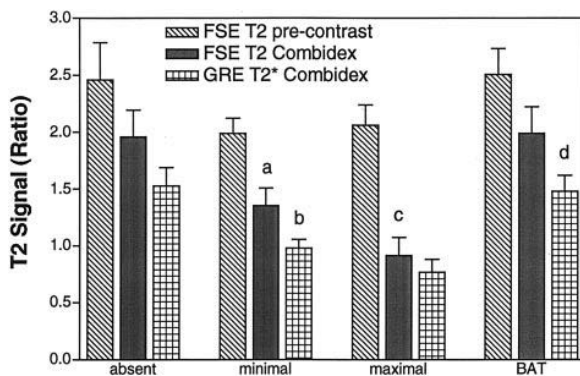
A, Gd-halmozásos SE T1-súlyozott kép bal fronto-temporális kiterjedt infiltráló tumort mutat, melynek elülső temporális részében kis halmozás látható (nyíl).

B és C, 24 órával ferumoxtran infúzió után, a SE T1-súlyozott kép (B) és GRE T2*-súlyozott kép (C) nem mutat jelintenzitás változást (nyíl), mely arra utal, hogy vas akkumuláció nem alakult ki.



10. ábra. SE T1-súlyozott MR képek összehasonlítása 15 betegben.

Átlag normalizált SE T1 jelintenzitás értékek standard átlag hibával a hiányzó, a minimális és a maximális ferumoxtran (Combindex) halmozásos tumor régiókban, valamint a tumor körüli agyban (brain around tumor; BAT). a = $P < 0.05$ a Gd halmozás a prekontrasztos értékhez képest; b = $P < 0.05$ a Gd halmozás a ferumoxtran halmozáshoz képest; c = $P < 0.001$ a prekontrasztos értékkel összehasonlítva; d = $P < 0.005$ a prekontrasztos értékkel összehasonlítva.



11. ábra. FSE T2-súlyozott és GRE T2*-súlyozott MR képek összehasonlítása 15 betegben. Átlag normalizált T2 jelintenzitás értékek standard átlag hibával a hiányzó, a minimális és a maximális ferumoxtran (Combindex) halmozásos tumor régiókban valamint a tumor körüli agyban (brain around tumor; BAT). a = $P < 0.01$ a prekontrasztos FSE T2-vel összehasonlítva; b = $P < 0.005$ a ferumoxtran-halmozásos GRE T2* összehasonlítva a ferumoxtran-halmozásos FSE T2-vel; c = $P < 0.001$ a prekontrasztos FSE T2-vel összehasonlítva; d = $P < 0.05$ a ferumoxtran-halmozásos GRE T2* összehasonlítva a ferumoxtran-halmozásos FSE T2-vel.

A három betegben elkészült post-ferumoxtran echo-planar GRE T2*- versus echo-planar SE T2-súlyozott képek között, valamint ezek és a GRE T2*-súlyozott képek között nem volt egyértelmű jelintenzitás különbség, és a szuszceptibilitási műtermékek, valamint a geometriai torzítás az echo-planar szekvenciákon jelentősebbnek mutatkozott.

Hisztológia: a #9 beteg (anaplasztikus oligodendroglioma) biopsziás mintájában (7G és H ábra) a denz tumoron belül csak szórványosan lehetett festődő sejteket látni. A tumorban többnyire olyan sejtek mutattak vasfestődést, melyek vékony fibrilláris nyúlványokkal rendelkeztek astrocyta eredetre utalva. A vasfestődés jóval markánsabb volt a tumor perifériáján, azaz a tumor–agy határon, és a festődés eloszlása jó korrelációt mutatott az MR jelintenzitás változásokkal (7. ábra).

6.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran képalkotás malignus agytumoros betegekben

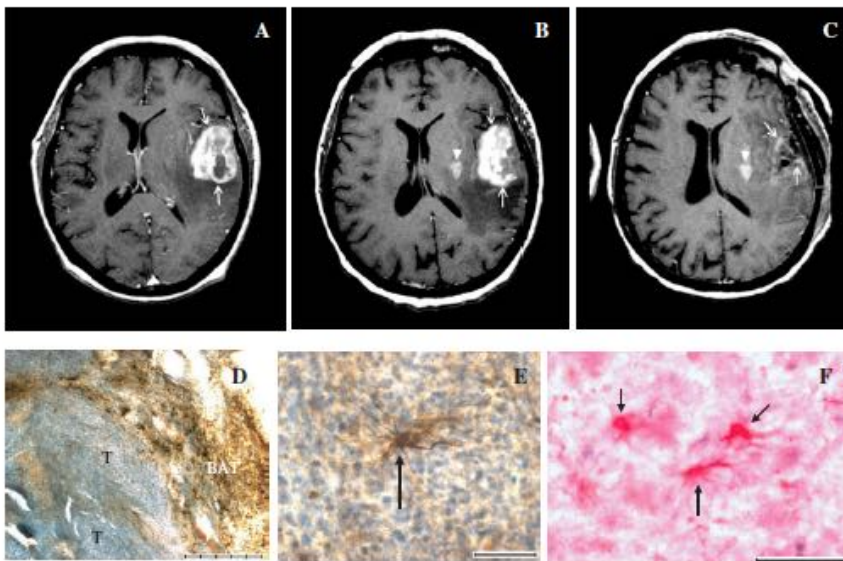
A ferumoxtran lassú infúziója után semmilyen szövődmény nem jelentkezett. Mindegyik malignus tumorban lehetett Gd halmozást látni, ami az egyik alapfeltétele volt a vizsgálatban való részvételnek.

Tumor jelintenzitás: A ferumoxtran infúzió után 24 órával készült MR felvételeken az összes tumor mutatott ferumoxtran akkumulációra utaló T1 és T2 rövidülési effektust (4. táblázat). Egy betegben a 0.15 T intraoperatív MR berendezéssel is egyértelmű halmozás ábrázolódott. Az előző 5.1. tanulmánnyal összhangban, ebben a vizsgálatban is egyértelműbben lehetett detektálni a fokozott T1 jelintenzitást, mint a T2 jelintenzitás csökkenést, ezért elsősorban a SE T1-súlyozott képek elemzésére koncentráltunk.

Az egyik igen fontos észrevétel az, hogy a hét betegből öt esetben (#1, #2, #3, #6 és #7 beteg) olyan területeken is lehetett ferumoxtran halmozást látni, ahol Gd halmozás nem volt jelen (4. táblázat). A ferumoxtran halmozás vagy kiterjedtebb volt mint a Gd-halmozó fő tumor massa, vagy új területeken jelent meg extra léziókat mutatva (12, 13. és 14. ábra). A #4 és #5 betegben a tumor ferumoxtran halmozása lényegében megegyezett a Gd halmozást mutató területtel (15. és 16. ábra).

A reziduális területek SE T1 jelintenzitása: A pre- és postoperatív ferumoxtran-halmozásos felvételek összehasonlítása során, a hétből négy esetben lehetett reziduális ferumoxtran-halmozó területeket látni (4. és 5. táblázat). A maradék három tumor esetében reziduumot nem lehetett postosan megítélni, részben az alkalmazott hemosztázis (H₂O₂, Surgicel) és vérdegradációs termékek USPIO-hoz hasonló jelintenzitása miatt, részben pedig a műtét következtében az adott régiót érintő kifejezett

morfológiai változások miatt (4. és 5. táblázat). A #2 és #7 betegben a reziduális ferumoxtran-halmozó terület normalizált jelintenzitása csak 22% és 18%-kal volt kisebb, mint ugyanezen régiók preoperatív normalizált jelintenzitása (14. ábra). A többi reziduális terület jelintenzitása még kisebb mértékben csökkent. Valamennyi reziduális ferumoxtran-halmozó területet könnyen ki lehetett mutatni, mivel normalizált jelintenzitásuk fokozott maradt (5. táblázat, 12. és 14. ábra).



12. ábra. **GBM (#3 beteg).**

A. Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott képen bal oldali fronto-laterális nagy halmozó tumor (nyílak) látható.

B. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép intenzív ferumoxtran halmozást mutat a tumorban (nyílak). Ezen kívül egy új, extra ferumoxtran-halmozó terület is megjelent a fő tumor massa mellett mediálisan a putamen területében (nyílhegy). Ezen MR vizsgálat után 4 órán belül műtetre került sor.

C. 5 nappal a ferumoxtran infúzió után és 4 nappal a műtét után, postoperatív SE T1-súlyozott képen a reziduális ferumoxtran-halmozó terület a putamenben még mindig egyértelműen és tisztán ábrázolódik (nyílhegy). Az üreg peremének egyes részei fokozott jelintenzitást mutatnak (nyílak) (Surgicelt használtak).

D és E. Vasfestéses (DAB-Perls) mikrofotók. A D képen (eredeti nagyítás x25; a szakasz 0.5 mm-t jelez) intenzív vasfestődés látható a tumor körüli agyállományban (brain around tumor; BAT), de a tumorban (T) nem. Az E képen (eredeti nagyítás x200; a szakasz 0.05 mm-t jelez) egy reaktív sejt denz vasfestődést mutat (nyíl), míg a tumorsejtekben csak minimális festődés (vasfelvétel) ábrázolódik.

F. GFAP immuncitokémiai festés mikrofotója. A GFAP-pozitív astrocyták ugyanolyan morfológiát mutatnak, mint a vas-pozitív sejtek az E képen (eredeti nagyítás x200; a szakasz 0.05 mm-t jelez).

A detektálható reziduális ferumoxtran-halmozó területek lényegében egybe estek a preoperatív extra ferumoxtran-halmozó területekkel (12. és 14. ábra), és a postoperatív vizsgálaton GAKA adása után ezekben vagy új területekben Gd halmozás nem volt azonosítható (4. táblázat).

A tumor körüli agyállomány (BAT) SE T1 jelintenzitása: a pre- és postoperatív ferumoxtran-halmozásos képeket összehasonlítva nem lehetett jelintenzitás változásokat látni a BAT területében, tehát nem keletkezett intraparenchymális sérülés/vérzés a műtét során és nem alakult ki ferumoxtran akkumuláció az üreg körül.

A postoperatív ferumoxtran-halmozásos vizsgálat GAKA előtti és utáni képeit összehasonlítva, a BAT nem mutatott Gd halmozást, vagyis műtét miatti vér–agy-gát károsodás nem jelentkezett ezen betegeknél a műtét után 24 órán belül készült képeken.

A fentieknek megfelelően, a BAT területében lévő csökkent T1 normalizált jelintenzitás (ödéma és/vagy infiltráló tumor) a postoperatív képeken is fennmaradt GAKA előtt és után is, valamint statisztikailag nem jelentkezett szignifikáns különbség a pre- és postoperatív BAT átlag jelintenzitásban. Viszont, a reziduális ferumoxtran-halmozó területek átlag jelintenzitása szignifikánsan magasabb volt ($P < 0.05$), mint a BAT jelintenzitása, vagyis a reziduális területek könnyedén elkülöníthetők maradtak.

5. táblázat. A pre- és postoperatív ferumoxtran-halmozásos SE T1-súlyozott képeken mért normalizált jelintenzitás* az egyes ROI-kban, valamint a műtét közben alkalmazott anyagok.

Beteg sorszám	Preoperatív jelintenzitás tumor	Postoperatív jelintenzitás				Hemosztázis				Kemoterápia
		Reziduális terület	Rezekciós üreg közepe	Rezekciós üreg pereme	Extraaxiális folyadék	Parenchymális			Epi- durális	Parenchymális
#						H ₂ O ₂	Surgicel	Gelfoam	Gelfoam	Gliadel
1	↑	?	↑↑	↑	↑↑	+	+	-	-	-
2	↑↑	↑	↑	↑↑	↑	-	+	-	-	+
3	↑	↑	↑	↑	↑	+	+	+	+	-
4	↑	?	↓	↑	↑	+	+	-	+	-
5	↑	?	↓	↑	→	+	+	-	+	-
6	↑	↑	↓	↑	↑	-	+	+	-	-
7	↑	↑	↑	nincs mérve	↑↑	-	-	+	-	-

Magyarázat: +: használtak, -: nem használtak, ↑: fokozott (>1.0 and <2.0), ↑↑: erősen fokozott (≥ 2.0), →: izointenzív (= 1.0), ↓: csökkent (< 1.0) normalizált jelintenzitás. ? reziduum nem volt egyértelmű, mivel a műtét után jelentős morfológiai változás jött létre az érintett területben és a rezekciós üreg peremének fokozott jelintenzitása véres hemosztatikus anyagtól vagy reziduális ferumoxtrantól is származhatott.

*A jelintenzitást a normális fehérállománnyal normalizáltuk.

A rezekciós üreg középső részének és peremének, valamint az extraaxiális folyadékgyülemnek a SE T1 jelintenzitása: a rezekciós üreg centrumának normalizált jelintenzitása változatos volt: vagy fokozott, vagy csökkent. Az üreg pereme minden esetben fokozott normalizált T1 jelintenzitást mutatott, míg az extraaxiális postoperatív folyadékgyülem normalizált jelintenzitását izointenzívnek vagy hiperintenzívnek mértük (5. táblázat). A #2 betegnél a rezekciós üreg peremének normalizált jelintenzitása jóval magasabb volt, mint a reziduális ferumoxtran jelintenzitása, ami ebben az esetben lehetővé tette azt, hogy a reziduális ferumoxtran-halmozó területet elkülönítsük a rezekciós üreg peremétől (5. táblázat, 14. ábra). A többi esetben viszont a rezekciós üreg peremének fokozott T1 jelintenzitása nem különbözött a reziduális ferumoxtran jelintenzitásától, vagy azokban az esetekben, amikor reziduális lézió jelenléte nem volt egyértelmű, akkor az üreg peremének jelintenzitása nem különbözött a preoperatív ferumoxtran halmozás jelintenzitásától (5. táblázat, 12, 15. és 16. ábra).

Az erek és a dura SE T1 jelintenzitása: a ferumoxtran-halmozásos képeken az erekben a fokozott jelintenzitás legjobban a nagy vénákban és a durális sinusokban volt látható. GAKA adása után az erek jelintenzitása kissé tovább fokozódott.

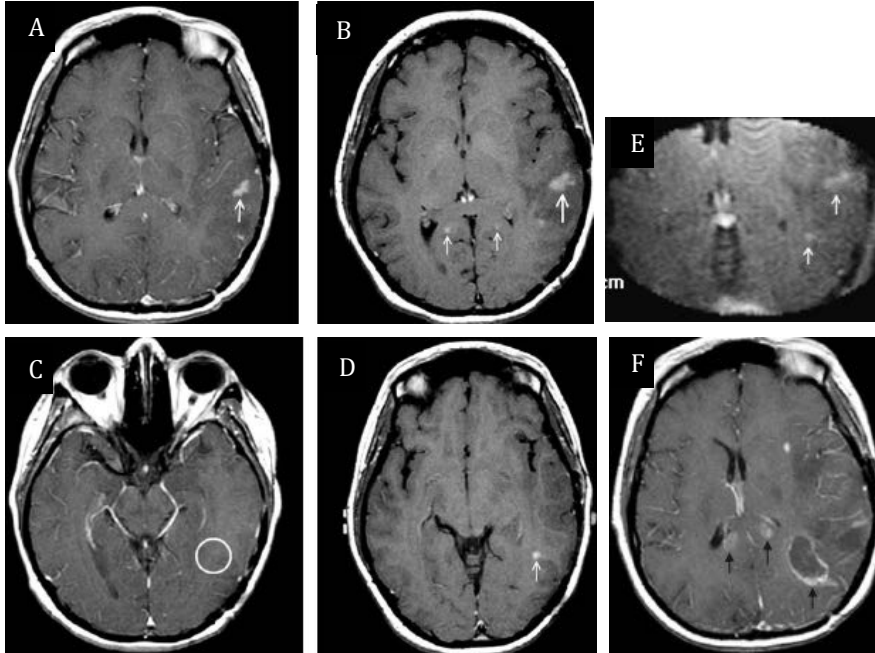
A kraniotómia alatt a dura nem mutatott egyértelmű halmozást a GAKA adása előtti postoperatív ferumoxtran-halmozásos vagy késői MR vizsgálatokon; ez azt jelenti, hogy a maradék keringő ferumoxtran nem okozott durális halmozást a vizsgált szériában. GAKA adása után viszont mindegyik esetben halvány durális halmozást lehetett észlelni (14. és 15. ábra).

Késői MR vizsgálatok: három betegben állt rendelkezésre. A #3 betegben a reziduális ferumoxtran-halmozó terület a műtét utáni 4. napon is könnyen látható maradt (12. ábra). A #5 betegnél a műtét után 8 nappal az üreg peremének kezdeti fokozott T1 jelintenzitása halványodott, aminek eredete – véres hemosztatikus anyag vagy reziduális ferumoxtran – továbbra is kérdéses maradt. A #2 beteg esetében a műtét után 12 nappal reziduális ferumoxtran halmozást már nem lehetett detektálni.

GAKA adása után a #2 és #5 esetekben, a műtéti üreg szokásos postoperatív peremszéli halmozást mutatott a várakozásoknak megfelelően. A #3 beteg a késői MR vizsgálat során nem kapott GAKA-t, mert a vizsgálatot idő előtt megszakította.

Különösen érdekes a #7 beteg esete (13. ábra), akinek a követése során havonta készült MR vizsgálat. A postoperatív 5. hónapos MR vizsgálaton egyértelműen Gd-

halmozó léziók jelentek meg azokban a területekben, ahol a preoperatív MR vizsgálatokon csak ferumoxtran halmozást lehetett látni Gd-halmozás nélkül (13F ábra).



13. ábra. Anaplasztikus oligodendroglioma (#7 beteg).

A. Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott kép egy bal temporális, szolidan halmozó kis tumort mutat (nyíl).

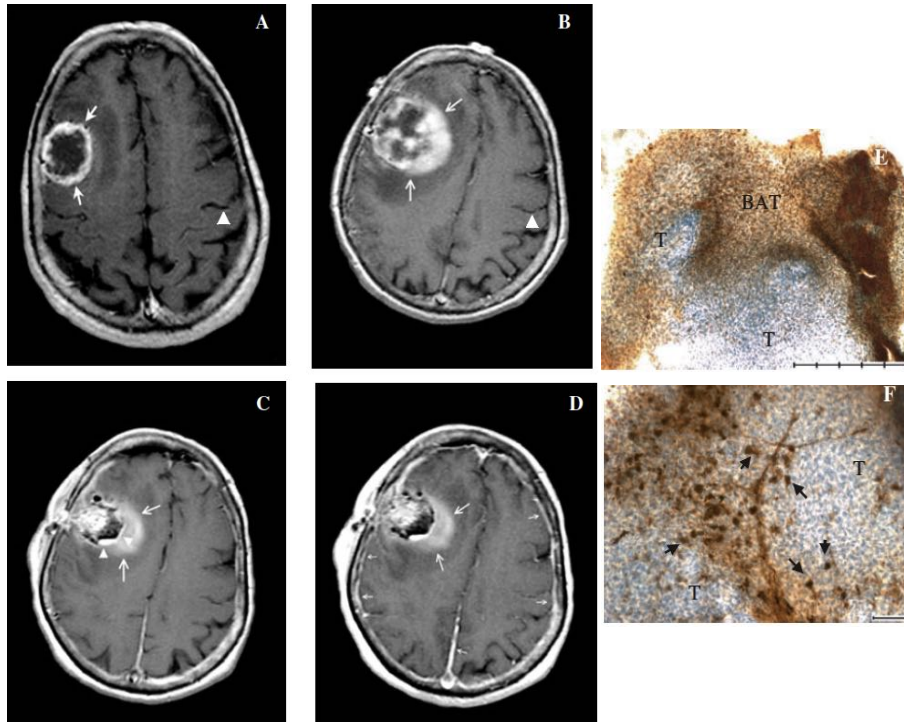
B. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép nagyobb ferumoxtran-halmozó tumort (nyíl) ábrázol. Ezen kívül két új, apró, extra ferumoxtran-halmozó lézió is látható a splenium mögött mindkét oldalon (kis nyilak).

C. Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott képen nem lehet kóros halmozást látni a bal hátsó temporalis régióban (körrel jelölve).

D. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép extra ferumoxtran-halmozó léziót mutat a bal hátsó temporalis régióban (kis nyíl). Megjegyzendő, hogy a C és D képek eltérő döntési síkban készültek, ezért a frontális részek különbözőek, de a releváns hátsó régiók síkja megegyezik: a felső vermis és a bal plexus choroideus hasonló morfológiával ábrázolódik.

E. 25 órával a ferumoxtran infúzió után készült T1-súlyozott kép intraoperatív 0.15 T MR berendezéssel: a két nagyobb ferumoxtran-halmozó lézió a bal temporalis lebenyben könnyen azonosítható (nyilak). Ezen kívül, a két apró ferumoxtran-halmozó lézió a splenium mögött (lásd B képen) szintén látható volt halványan (nincsenek mutatva).

F. Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott kép 5 hónappal később új halmozó tumor fókuszokat mutat, amik az eredeti gadolínium-halmozásos képeken (A és C) nem voltak láthatók. Fontos megjegyezni, hogy az új Gd-halmozó tumorok közül három lézió (nyilak) azokban a területekben alakult ki, ahol a ferumoxtran már mutatott halmozást (a gadolíniummal ellentétben) a kezdeti vizsgálaton, a B és D képeken.



14. ábra. **GBM (#2 beteg).**

A. Gadolínium-halmozásos SE T1-súlyozott képen jobb frontálisan egyenetlen gyűrűs halmozású tumor látható (nyilak). A bal centrális sulcus laterális részét megjelöltük (nyílhegy) szelet azonosítási céllal.

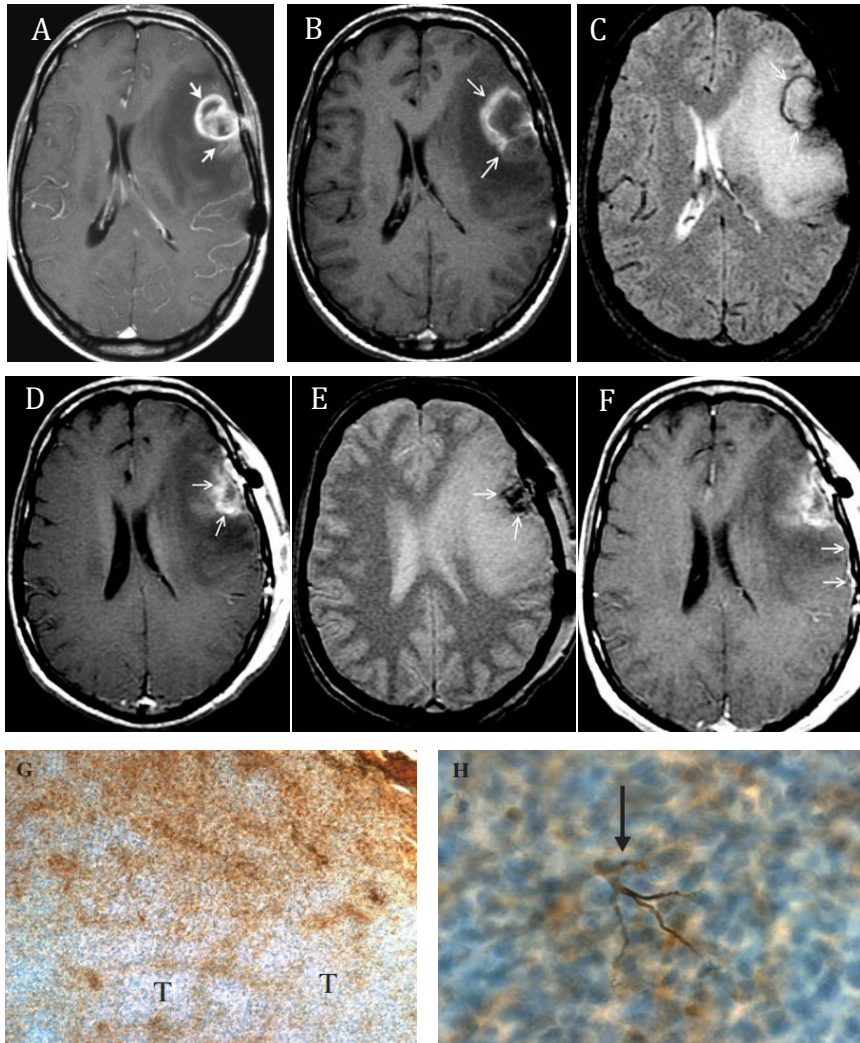
B. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép a jobb frontális tumort nagyobb kiterjedésű ferumoxtran halmozással mutatja (nyilak). Ezen MR vizsgálat után 4 órán belül műtetre került sor. A bal centrális sulcus laterális részét ismét megjelöltük (nyílhegy) szelet azonosítási céllal.

C és D. 57 órával a ferumoxtran infúzió és 29 órával a műtét után, a postoperatív SE T1-súlyozott képen (C) reziduális ferumoxtran-halmozó terület (nyilak) látható a műteti üreg mellett mediálisan. Az üreg Gliadel-lel kitöltött. A műteti üreget határoló erősen hiperintenzív perem (nyílhegyek) nagy valószínűséggel Surgicel. Gadolínium adása után (D) nem látható jelintenzitás változás sem a reziduális ferumoxtran-halmozó területben (nyilak), sem az üreg körüli agyban. Gadolíniummal halmozást mutat a craniotómia alatti dura, valamint a falx és az ellenoldali dura is (kis nyilak).

E és F. vassfestéses (DAB-Perls) mikrofotók. Az E képen intenzív barna vassfestődés látható a tumor–agy határon (BAT), míg minimális vas detektálható a sűrű, kéken festődő tumorban (T) (eredeti nagyítás x25; a szakasz 0.5 mm-t jelez). Az F kép egy kis területet mutat a tumoron belül ér és makrofág festődéssel (nyilak) (eredeti nagyítás x50; a szakasz 0.1 mm-t jelez).

FSE T2 és GRE T2* szekvenciák: általánosságban a FSE T2 és a GRE T2* felvételeken a fent leírtakhoz hasonló eredményeket lehetett látni, de a reziduális ferumoxtran jelintenzitást a normális agyállománytól kevésbé egyértelműen lehetett vizuálisan differenciálni. A BAT területe nem mutatott észrevehető jelintenzitás

változást a pre- és postoperatív képeket összehasonlítva, és a BAT fokozott normalizált jelintenzitású maradt a postoperatív képeken. A műteti üreg centrumának és peremének, valamint a postoperatív extraaxiális folyadékgyülemnek a jelintenzitása inhomogéne fokozott vagy csökkent volt és ezek a jelintenzitások gyakran hasonlóak voltak, mint a reziduális terület vagy az eredeti tumor ferumoxtran jelintenzitása (15. ábra).



15. ábra. **GBM (#4 beteg).**

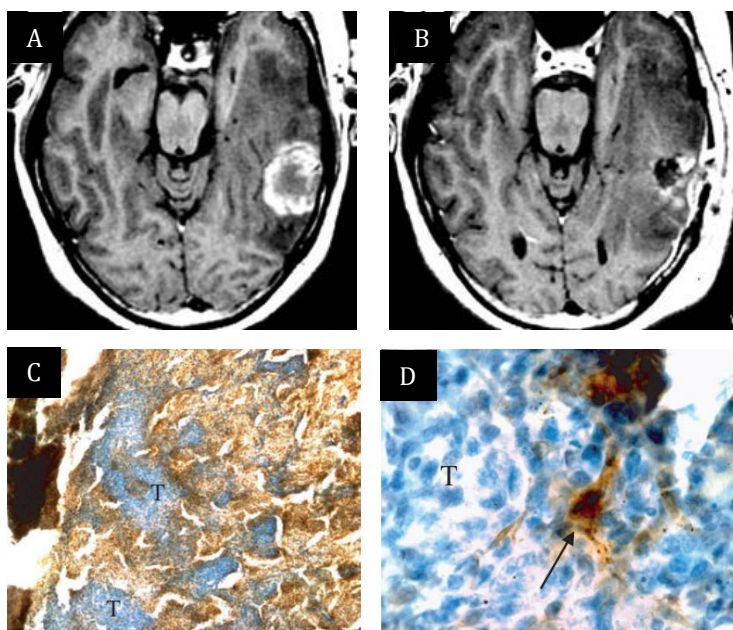
A. Gadolinium-halmozásos SE T1-súlyozott képen bal frontális gyűrűsen halmozó tumor látható (nyilak).

B and C. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép (B) és GRE T2*-súlyozott kép (C) a bal frontális tumort gyűrűs ferumoxtran akkumulációval mutatja (nyilak). Ezen MR vizsgálat után 4 órán belül műtetre került sor.

D, E and F. 50 órával a ferumoxtran infúzió és 22 órával a műtét után, postoperatív SE T1-súlyozott kép (D) fokozott és GRE T2*-súlyozott kép (E) csökkent jelintenzitást mutat a műteti területben, ami hasonló a preoperatív képeken (B és C) látható tumor ferumoxtran jelintenzitásához. Mivel a műteti üreg összeesett és hemosztázisként

Surgicelt valamint H_2O_2 -t is használtak, lehetetlen megmondani, hogy a műtéti területben látott jelintenzitás változások reziduális ferumoxtrant vagy véres hemosztatikus anyagot mutatnak. Gadolinium adása után (F), a kraniotómia alatt durális halmozás látható (kis nyilak), de intraparenchymális halmozás nem jelenik meg.

G and H. vasfestéses (DAB-Perls) mikrofotók. A G képen közepes fokú barna vasfestődés látható a tumor szélén, míg a sűrű tumorban (T) csak minimális vas detektálható (eredeti nagyítás x25). A H kép a tumoron belüli kis területet mutat halvány vasfestődéssel néhány tumorsejtben, míg intenzív festődéssel egy nyúlványokkal rendelkező reaktív sejtben (astrocyta) (eredeti nagyítás x200).



16. ábra. **Metasztázis (#5 beteg).**

A. 24 órával a ferumoxtran infúzió után, preoperatív SE T1-súlyozott kép bal hátsó temporalis gyűrűsén halmozó tumort mutat.

B. 54 órával a ferumoxtran infúzió és 24 órával a műtét után, postoperatív SE T1-súlyozott kép fokozott T1 jelintenzitást mutat a rezekciós terület széli részein, ami jelezhet reziduális ferumoxtrant, vagy lehet vér és hemosztatikus anyag (Surgicel és H_2O_2) kombinációjának a következménye is.

C and D. vasfestéses (DAB-Perls) mikrofotók. A C képen közepes fokú barna vasfestődés látható a denz tumorszigetek körül (eredeti nagyítás x25). A D kép a tumoron belüli kis területet mutat halvány vasfestődéssel néhány tumorsejtben, míg intenzív festődéssel a reaktív astrocytáknak (nyíl) és erekben (eredeti nagyítás x200).

Hisztológia és vas hisztokémia: A ferumoxtrant kapó hét beteg közül hat esetben a rezekciós mintát vasat kimutató hisztokémiai módszerrel vizsgáltuk (12, 14, 15 és 16. ábra). A #7 beteg biopsziás anyaga nem került vasfestésre, mivel a minta túl kicsi volt. Az összes megfestett szövetminta hasonló jellegzetességekkel rendelkezett.

A denz, kék nukleáris festődésű tumorrészek csak elszórtan mutattak enyhe barna

festődést, ami csak minimális vas jelenlétére utal. Ezzel szemben, közepes fokú vagy intenzív barna vasfestődést lehetett látni a tumor–agyszövet határon (12D, 14E, 15G és 16C ábra), néhány ér és kötőszövet (14F és 16D ábra), valamint nekrotikus terület festődésével együtt. Hasonló enyhe vagy közepes fokú vasfestődés volt az erekben és nekrotikus területekben a kontroll betegek biopsziás mintáiban is, akik nem kaptak ferumoxtrant. Ez annak köszönhető, hogy a DAB-Perls festés nem különbözteti meg a ferumoxtrant és egyéb vasforrást, mint pl. a hemosziderint vagy előzetes vérzést; ezért az *extracelluláris* vas nem tulajdonítható biztosan a ferumoxtrannak.

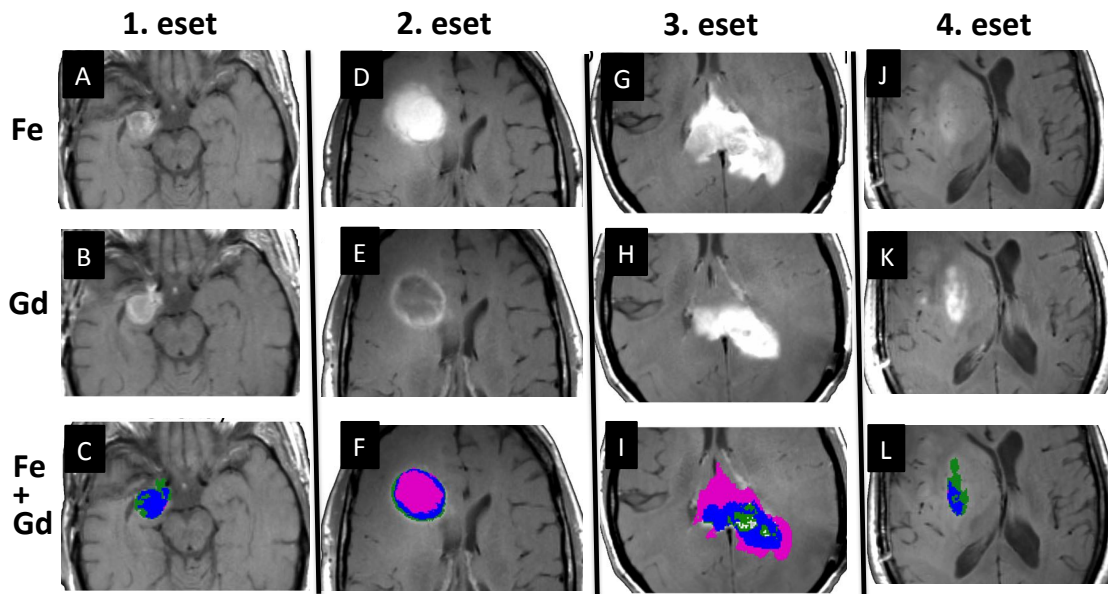
Ezzel ellentétben, a *celluláris* festődés egyértelműen jelezte a ferumoxtran felvételt, ami elsősorban a reaktív sejtekben, makrofágokban (14F ábra) és reaktív astrocytákban (12E és F, 15H és 16D ábra) koncentrálnak a tumoron belül és a tumor periferiáján, míg a tumorsejtek vasfelvétele elhanyagolható. A vasfestődés kiterjedt a citoplazmatikus nyúlványok periferiás részébe is, ami hemosziderin festődésre nem jellegzetes. Ez a celluláris festődés a kontroll mintákban nem volt kimutatható.

6.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlítása

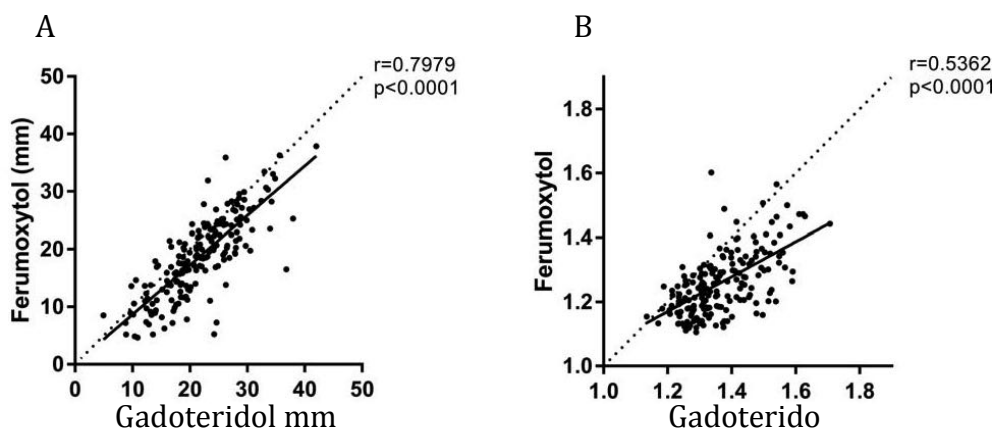
A két KA halmozásának általános összehasonlítása: A 17. ábra négy esetet mutat hasonló (A.-C. képek) vagy különböző (D.-L. képek) ferumoxytol és gadoteridol halmozással (17. ábra).

Erős korrelációt lehetett kimutatni a két KA volumenének köbgyök értékei ($r=0.7979$, $P<0.0001$), és jelintenzitásai között ($r=0.5362$, $P<0.0001$) (18. ábra). Az összes MR vizsgálatot együttesen figyelembe véve, a halmozás volumenének köbgyök értéke (D) 3.00 mm-rel vagy 13.83%-kal volt kisebb ferumoxytollal, mint gadoteridollal ($P<0.0001$) (19. ábra, A). A halmozás jelintenzitása (SI) ferumoxytollal 7.24%-kal adódott kisebbnek, mint gadoteridollal ($P<0.0001$) (19. ábra, B).

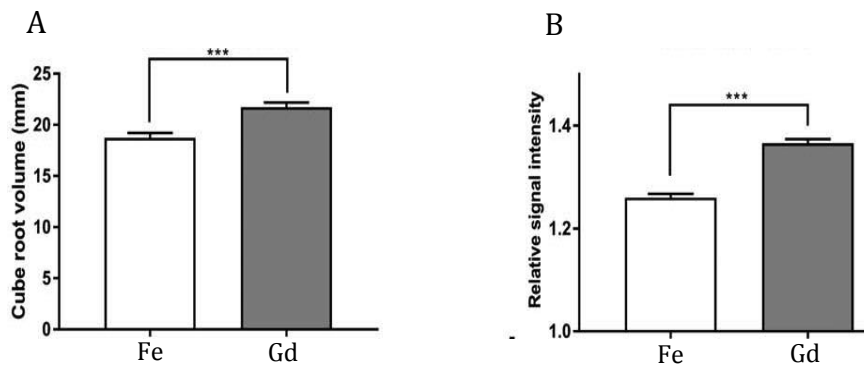
A két KA halmozásának összehasonlítása a betegcsoportok között: A négy betegcsoportban a KA-k D és SI relatív különbségei között nem volt szignifikáns különbség (D, $P=0.7905$ és SI, $P=0.3725$) a betegjellemzők figyelembevétele után (20. ábra).



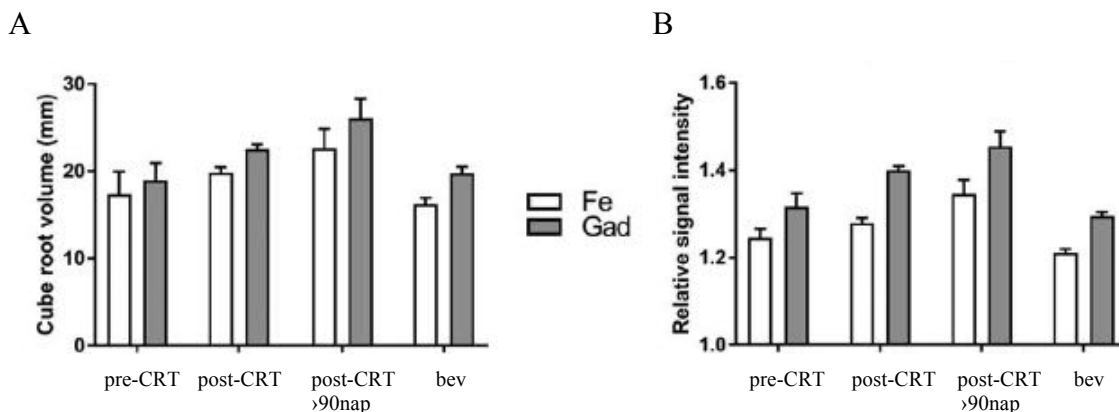
17. ábra. **Ferumoxytol (Fe) és gadoteridol (Gd) halmozás négy különböző esetben.** A legelső sorban a C.-L. képek a két kontrasztanyag halmozást együttesen, átfedésben mutatják; zöld: csak gadoteridol, rózsaszín: csak ferumoxytol, kék: mind ferumoxytol, mind gadoteridol halmozást mutató pixelek. 1. eset (A.-C.): 57 éves férfi, grade IV glioblastoma, bevacizumab kezelés után. A ferumoxytol halmozás (A) hasonló a gadoteridol halmozáshoz (B). 2. eset (D.-F.): 45 éves férfi, grade IV glioblastoma, kemoirradiációs kezelés után 90 napon belül. A ferumoxytol akkumulálódik a tumor nekrotikus üregében (D), míg a gadoteridol gyűrűs halmozást mutat (E). 3. eset (G.-I.): 48 éves nő, grade IV glioblastoma, kemoirradiációs kezelés után 90 napon belül. A ferumoxytol halmozás (G) nagyobb, mint a gadoteridol halmozás (H). 4. eset (J.-L.): 59 éves férfi, grade III anaplasticus oligodendroglioma, bevacizumab kezelés után. A ferumoxytol halmozás (J) kevésbé kifejezett, mint a gadoteridol halmozás (K).



18. ábra. **Köbgyök volumenek (A) és jelintenzitások (B) korrelációja.** A szórásgörbék erős korrelációt mutatnak a két KA halmozása között, mind a köbgyök volumenek (A), mind a jelintenzitások (B) esetében.

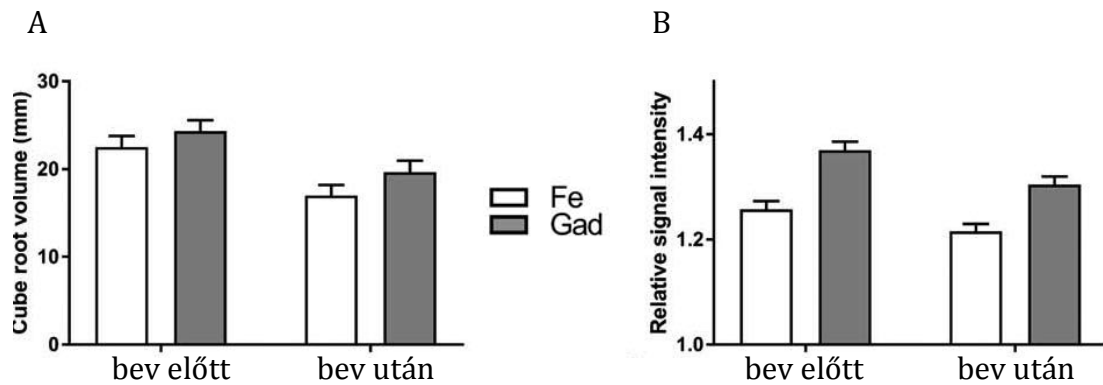


19. ábra. Oszlopdiagram: a két KA-halmozás köbgyök volumenének (A) és jelintenzitásának (B) összehasonlítása az összes MR vizsgálatban. A köbgyökvolumenek között (A) és a jelintenzitások között (B) a relatív különbség szignifikáns, ($P < 0.0001$ mindkét esetben). Fe:ferumoxytol; Gd: gadoteridol; a hibásávok az átlag standard hibáját mutatják.

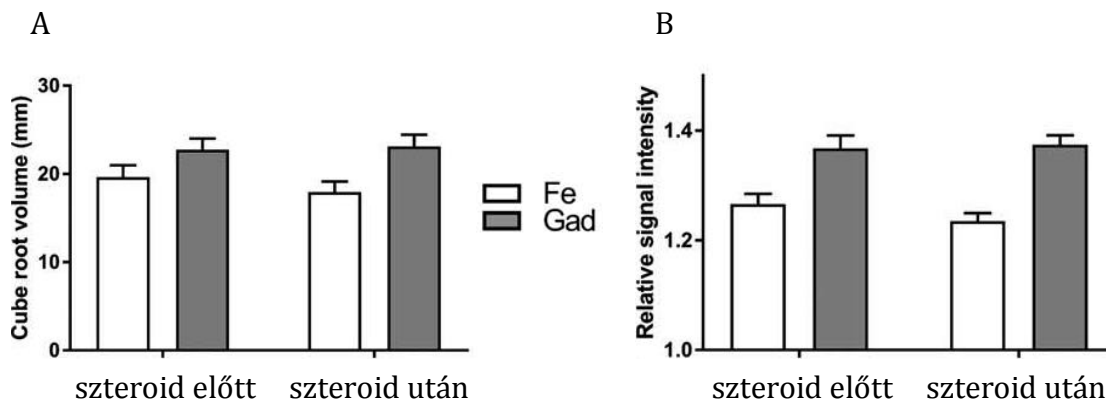


20. ábra. Oszlopdiagram: a két KA-halmozás köbgyök volumene (A) és jelintenzitása (B) a különböző betegcsoportokban. A négy betegcsoportban a két KA köbgyök volumeneinek és jelintenzitásainak relatív különbségei nem mutattak szignifikáns különbséget. Fe:ferumoxytol; Gad: gadoteridol; pre-CRT: kemoradioterápia előtt; post-CRT: kemoradioterápia után 90 napon belül; post-CRT >90: kemoradioterápia után több mint 90 nappal; bev: bevacizumab után. A hibásávok az átlag standard hibáját mutatják.

A két KA halmozásának összehasonlítása bevacizumab és szteroid terápia előtt és után: Mindkét csoportban ugyanannyi, 26-26 beteg állt rendelkezésre. A KA-k relatív különbségét a bevacizumab terápia nem változtatta meg jelentősen (bevacizumab előtt versus bevacizumab után, köbgyök volumen: 3.6%, $P=0.5234$; jelintenzitás: -1.5% , $P=0.2442$ (21. ábra). Ehhez hasonlóan a szteroid terápia hatására sem változott meg jelentősen a két KA halmozása közötti relatív különbség (szteroid előtt versus szteroid után, köbgyök volumen: 5.28% $P=0.3774$; jelintenzitás: 2.9%, $P=0.0741$ (22. ábra).



21. ábra. Oszlopdiagram: a két KA-halmozás köbgyök volumene (A) és jelintenzitása (B) bevacizumab terápia előtt és után ugyanazon betegeknél, N=26. A két KA halmozás köbgyök volumene (A) és jelintenzitása (B) közötti relatív különbség nem változott meg szignifikánsan a terápia hatására. Fe:ferumoxytol; Gad: gadoteridol; bev: bevacizumab. A hibaszávok az átlag standard hibáját mutatják.



22. ábra. Oszlopdiagram: a két KA-halmozás köbgyök volumene (A) és jelintenzitása (B) szteroid terápia előtt és után ugyanazon betegeknél, N=26. A két KA halmozás köbgyök volumene (A) és jelintenzitása (B) közötti relatív különbség nem változott meg szignifikánsan a terápia hatására. Fe:ferumoxytol; Gad: gadoteridol. A hibaszávok az átlag standard hibáját mutatják.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. A ferumoxides és ferumoxtran által okozott jelintenzitás változások gadolinium alapú kontrasztanyaggal való összehasonlító vizsgálatának megbeszélése

A munka célja az volt, hogy 1. két vas-oxid nanorészecske (ferumoxides és ferumoxtran) MR kontrasztanyagként való alkalmazhatóságát vizsgáljuk KIR-i tumorokban, és 2. összehasonlítsuk ezen (U)SPIO-k által okozott jelintenzitás változásokat a Gd halmozással.

Ferumoxides infúzió után, a lehetséges maximális dózist alkalmazva, a tumorokban érdemi jelintenzitás változást nem detektáltunk. Ennek magyarázata elsősorban a ferumoxides nanorészecske szerkezetében rejlik. A csak vékony (3.3 nm) és inkomplett dextrán burok miatt ez az SPIO könnyen kötődik plazma fehérjékhez – azaz gyorsan opsonizálódik –, ami megkönnyíti a fagocita sejtek membránjához való kötődést és a fagocitózist, így ez a részecske rövid plazma felezési idővel rendelkezik. Ezt a hipotézist látszik alátámasztani az a tény is, hogy még a meningeomában sem lehetett vas akkumulációra utaló jelintenzitás változást kimutatni (2. táblázat), annak ellenére, hogy a meningeomák nem rendelkeznek vér–agy-gáttal és kifejezetten vaszkularizáltak. Más tényezők, mint a ferumoxides részecske relatív nagy mérete, méretbeli szórása és szabálytalan alakja, valamint a csaknem 5x kisebb dózis (a ferumoxtrannal összehasonlítva, de az alkalmazott dózis a legmagasabb klinikailag elfogadott dózis volt) szintén hozzájárulhatott ahhoz, hogy ferumoxides infúzió után érdemi vas akkumulációt nem lehetett látni a tumorokban.

Ferumoxtran infúzió után, a Gd-halmozásos területek nagy részében jelintenzitás változásokat lehetett látni, ami az USPIO tumorban való akkumulációjára utalt (2. táblázat). A ferumoxtrannak vastagabb (8-12 nm) és teljes dextrán borítása van, ami megakadályozza a plazma proteinekkel és membránokkal való reakciót és elnyújtott plazma felezési időt (24-30 óra) eredményez, ami viszont elég hosszú lehet ahhoz, hogy a ferumoxtran partikulumok “megtalálják” a kóros vér–agy-gát leginkább permeábilis részeit. A ferumoxtran kisebb mérete és egyenletesebb méret eloszlása is szerepet játszhat abban, hogy ez az USPIO könnyebben áthatoljon a károsodott vér–agy-gáton

(endotheliális tight-junction és bazális membrán). Az eloszlásbeli különbségeket korábbi kísérlet is alátámasztja: patkányagyban a vér–agy-gát ozmotikus megnyitása és MION (monocrystalline iron-oxide nanoparticle, a ferumoxtran preklinikai formulája), valamint ferumoxides intraarteriális befecskendezése után a két részecske lokalizációja különbözött. Fénymikroszkóppal a vasat MION esetében intra- és extracellulárisan és kapillárisokban, míg ferumoxides esetében csak a kapillárisok falában lehetett látni. Elektronmikroszkóppal a ferumoxides elektron-denz partikulumai a kapilláris endothel sejtek és a bazális membrán között helyezkedtek el, de a bazális membránon túl az extracelluláris térben nem voltak kimutathatók. Ezzel szemben a MION főleg intracellulárisan (szinapszisok közelében és részben pericytákban) és extracellulárisan, a bazális membránon túl volt detektálható. A ferumoxides bazális membránon való megakadásáért valószínűleg a részecske gyors opszonizációja mellett a dextran burok enyhe negatív töltése is felelőssé tehető (*Muldoon et al. 1999*).

Vizsgálatunkban a ferumoxtran a T1-súlyozott képeken csak fokozott jelintenzitást okozott a tumorokban, tehát a javasolt klinikai dózist alkalmazva, a vas akkumuláció nem ért el olyan koncentrációt, ami csökkent T1 jelintenzitást eredményezhetett volna. A GAKA-hoz képest a vas-oxid részecskék relaxivitása nagyobb és a vas nagyon kis mennyisége (akár 1 μg) is elegendő lehet az MR jelintenzitás változás létrehozásához (*Neuwelt et al. 1994*).

A GAKA halmozás mechanizmusa és farmakodinamikája jól dokumentált, ahogy azt a bevezetőben már részleteztem (*De León et al. 2015*). Felmerül a kérdés, hogy más KA-k esetében milyen feltételeknek kell teljesülnie az MR jelintenzitás változás létrehozásához és mi lehet a halmozás mechanizmusa. A KA mérete alapvető szerepet játszhat. A GAKA molekulásúlya kb. 500 Dalton, mérete 0.3-1 nm, míg a ferumoxtran molekulásúlya több tízezer Dalton, a mérete pedig 30 nm (*Weinstein et al. 2010*). Azaz, az USPIO kb. 30-100x nagyobb, mint a GAKA. Ezért ésszerűnek látszó feltételezés az, hogy ha a vér–agy-gát átteresztővé válik a kicsiny GAKA molekulák számára, ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy a vér–agy-gát a jóval nagyobb méretű és tömegű vas-oxid nanorészecskék számára is permeábilis lesz (*Barnett et al. 1995*). A ferumoxtran akkumuláció és halmozás összefüggést mutathat a sejtek metabolikus aktivitásával is. Korábbi in vitro tanulmányok kimutatták, hogy a metabolikusan aktív sejtek, mint pl. a malignus glia sejtek, endocitózissal felveszik a vas-oxid nanorészecskéket (*Weissleder*

et al. 1997). Egyes kutatók szerint a malignus glia sejtek *in vivo* is felvehetik a vas-oxid nanorészecskéket (*Enochs et al. 1999, Egelhof et al. 1998, Zimmer et al. 1995, Moore et al. 2000*), de más állatkísérletek szerint a tumorsejtekben való vas akkumuláció nagyon gyenge lehet, és függhet a tumor és az SPIO típusától (*Muldoon et al. 2005*). További szövettani és elektronmikroszkópos vizsgálatok szükségesek, a vas-oxid partikulumok pontos helyének a meghatározásához a tumorban és a tumor körüli állományban *in vivo*.

A fentiekén kívül a ferumoxtran halmozás függeni látszik a partikulumokat felvenni képes parenchymális sejtek mennyiségétől is. Egy erős ferumoxtran halmozású tumor szövettani elemzése szerint (7. ábra), a tumor belső részében csak szórványosan festődő sejteket lehetett látni, míg a tumor perifériás részén és a halmozó tumor körüli agyállományban a vasfestődés kifejezetten erős volt. A kis kerek morfológia alapján néhány festődő sejt valószínűleg tumorsejt, azonban a festődő sejtek nagyrésze keskeny fibrilláris nyúlványokat mutatott astrocyta morfológiának megfelelően.

Az eredmények alapján a ferumoxtran halmozást alapvetően két jelenség határozhatja meg. Először: a ferumoxtran nanorészecskéknél az intravaszkuláris térből át kell jutnia a vér–agy-gáton keresztül az intersticiális térbe. Másodsor: olyan parenchymális sejteknek kell jelen lenniük, melyek képesek fagocitálni és ezzel akkumulálni a ferumoxtran partikulumokat. Tehát a minimális vagy hiányzó ferumoxtran halmozás a tumorok azon területein belül, melyek Gd halmozást mutattak azzal magyarázható leginkább, hogy a vér–agy-gát különböző mértékben permeabilis a kicsiny GAKA és a nagy USPIO (ferumoxtran) számára, és/vagy csekély az USPIO részecskéket felvevő sejtek mennyisége vagy ezek fagocita képessége. Így a két low-grade oligodendroglioma hiányzó (#6 és #13 beteg, 9. ábra) és a hamartoma (#7 beteg) minimális ferumoxtran halmozása a Gd halmozáshoz képest valószínűleg a fent részletezett lehetséges mechanizmusoknak köszönhető.

A meningeoma (#12 beteg, 8. ábra) az intenzív Gd halmozás ellenére, kisebb mértékű és régiónálisan különböző ferumoxtran halmozást mutatott, aminek a hátterében elsősorban a meningeoma vaszkuláris endotheliumának eltérő permeabilitása állhat, azaz jóval nagyobb átteresztőképesség a kicsi GAKA-val, mint a nagy USPIO-val szemben, kivéve a tumor centrális részét. Másrészt az is feltételezhető, hogy a meningeomában nincsenek olyan parenchymális sejtek, melyek képesek a ferumoxtrant felvenni és “csapdába ejteni”. A #14 betegben az anaplasticus glioma csak elszórtan

mutatott ferumoxtran halmozást a homogénebben Gd-halmozó tumoron belül. Ebben a két esetben (#12 és #14) fontos megjegyezni, hogy mindkét beteg sugárterápián esett át, ami károsíthatta a vaszkuláris endotheliumot, endothel proliferációt okozva, ami viszont gyengítheti a ferumoxtran extravazációját (*Remsen et al. 1997*). A nagyméretű hypophysis tumor (#18 beteg) az intenzív Gd halmozás ellenére szintén csak gyenge ferumoxtran halmozást mutatott; ez nagy valószínűséggel a vaszkuláris endothelium eltérő permeabilitásának és annak a következménye, hogy csak kevés olyan sejt van a tumorban, amely képes felvenni a ferumoxtrant.

A következő különleges megfigyelés az, hogy három malignus tumor esetében olyan területek is mutattak ferumoxtran halmozást, ahol Gd halmozás nem volt jelen (2. táblázat). Ez a jelenség azt valószínűsíti, hogy valamilyen más mechanizmussal – nem az intercelluláris kapcsolatokon át – is történhet a ferumoxtran vér–agy-gáton keresztüli áthatolása. A #20 anaplasztikus oligodendrogliomás beteg jelentősen fokozott T1 és csökkent T2 jelintenzitást mutatott a halmozó tumor körüli állományban, az oedemás T2 hyperintenzitáson belül, ahol Gd halmozást egyáltalán nem lehetett látni. Érdekes módon viszont a szolid tumor kisebb mértékű halmozást mutatott ferumoxtrannal, mint GAKA-val. Ez a jelenség a következőkkel magyarázható: mivel a ferumoxtran nem képes áthatolni az intakt vér–agy-gáton keresztül, még jóval nagyobb dózisokat intraarteriálisan alkalmazva sem, lehetséges, hogy a ferumoxtran valamilyen mechanizmussal kiterjedhet a Gd-halmozó területből a nem-Gd-halmozó területbe. Ezen mechanizmusok között szóba jöhet a diffúzió (kis valószínűséggel) vagy inkább a konvekció és/vagy intracelluláris transzport (valószínűbb) (*Neuwelt et al. 1994*). Másodszor, a ferumoxtran valamilyen más – az intercelluláris kapcsolatokat kikerülő – mechanizmussal is átjuthat az endotheliumon keresztül ezekbe a területekbe, és aztán ott egy akkumulációs mechanizmussal felhalmozódhat, mely a GAKA esetében nem létezik. Állatkísérletek és / vagy nagyobb klinikai esetszám szükséges ezen jelenség további vizsgálatához.

Szintén érdekes megfigyelés a tumorokban történő intenzív perifériás ferumoxtran akkumuláció a minimális centrális akkumulációval szemben. Invazív emlő tumorokban hisztológiai és MR vizsgálattal is elsősorban perifériás, reaktív sejtekben történő ferumoxtran akkumulációt lehetett látni a tumor–normális szövet határon az általunk vizsgált agytumorhoz hasonlóan (7. ábra) (*Harms et al. 2000*).

Korábbi megfigyeléssel összhangban (*Enochs et al. 1999*), a ferumoxtran-halmozó tumorokban a tumorhatár élesen és hosszantartóan kirajzolódott a ferumoxtran halmozásos MR képeken, és a kontúrélességben nem mutatkozott lényeges különbség a 6 órás és a 24 órás felvétel között. A GAKA az idő múlásával könnyen diffundál a környező állományba és ezért a tumorkontúr elmosódottá válik. Ezzel szemben a ferumoxtran diffúziója jóval kisebb mértékű, feltehetően a nagyobb méret, a kisebb diffúziós koefficiens és a celluláris uptake következményeként, ami a tumorkontúr élességének hosszan tartó megőrződését eredményezi. Másik jól ismert jelenség, hogy a műtéti beavatkozás során sérült vér–agy-gát Gd halmozást eredményezhet, ami nehezíti a reziduális tumor megítélhetőségét. Egy állatkísérletben viszont az iv. befecskendezett USPIO nem okozott jelintenzitás változást a műtétilag károsított állományban szemben a GAKA-val (*Knauth et al. 2001*). Fenti különbségek alkalmassá tehetik a ferumoxtrant arra, hogy egyszeri beadással végezzük a pre-, intra- és postoperatív értékelést. Ezt a lehetőséget is tanulmányoztuk a következő, 5.2. klinikai vizsgálatunkban.

Az USPIO-k másik felhasználási lehetősége, hogy modellezhetik a vírusok agytumoron belüli eloszlását. Ennek elsősorban a vírus-mediált génterápia szempontjából lehet jelentősége. A vírusok eljuttatása a vér–agy-gáton keresztül a tumorba és a tumor körüli állományba az egyik legjelentősebb akadálya a sikeres terápiának. A vírusok bejuttatásához korábbi kísérletek direkt intersticiális befecskendezést vagy a vér–agy-gát ozmotikus megnyitása utáni intraarteriális infúziót javasoltak. MION és adenovírus együttes befecskendezése után (vér–agy-gát ozmotikus megnyitással vagy intracerebrális inokulációval) a két ágens volumen eloszlása nagyon hasonlóan mutatkozott (*Muldoon et al. 1995*). A vér–agy-gát ozmotikus megnyitása és intraarteriális beadás után, elektronmikroszkóppal intracelluláris MION-t lehetett detektálni patkány neuronokban és pericytáiban (*Neuwelt et al. 1994, Muldoon et al. 1999*), és hasonló módszerrel bejuttatva az adenovírusok intracelluláris jelenlétét is igazolták transzgen protein expressziós immunfestéssel (*Muldoon et al. 1995*). A jelen vizsgálatunk kimutatta, hogy az iv. beadott vírusméretű USPIO nanorészecskék ténylegesen akkumulálódnak a tumorokban, és a hisztológiai mintákban ki lehetett mutatni a vas jelenlétét mind a tumorban, mind a tumor–agy határon intracellulárisan és intersticiálisan is (7. ábra). Mivel az USPIO mérete a vírusokéhoz hasonló, és mind az USPIO-k, mind a vírusok intracellulárisan lokalizálhatók, ezért ezek a vas-oxid

nanopartikulumok modellként szolgálhatnak a vírusok eloszlásának tanulmányozásához mind transzvaszkuláris, mind intersticiális bejuttatás után.

A vizsgálat korlátja a viszonylag kis esetszám és a tumorok különbözősége. További vizsgálatok szükségesek nagyobb esetszámmal annak kimutatásához, hogy a különböző tumorokban (pl. low grade, high grade gliomák, meningeomák) a ferumoxtran pontosan milyen mértékben akkumulálódik, és ez milyen különböző MR jeleltéréseket von maga után, valamint az esetenként eltérő halmozási mintázat a GAKA és a ferumoxtran között milyen differenciál diagnosztikai lehetőséget rejt magában. További hisztológiai (fény- és elektronmikroszkópos) vizsgálatokkal pontosítandó a vas-oxid részecskék szöveti lokalizációja, valamint az akkumuláció mechanizmusa.

7.2. Pre- és postoperatív MR vizsgálatokon való ferumoxtran tumor képképzés és a hisztológia eredményeinek megbeszélése

A vizsgálat célja az volt, hogy 1. malignus agytumoros betegek pre- és postoperatív MR képein vizsgáljuk a ferumoxtran által okozott halmozást és reziduum megítélhetőségét, valamint 2. pontosítsuk a vas szöveti és intracelluláris jelenlétét.

Extra léziók detektálásának lehetősége ferumoxtrannal, amelyek GAKA-val nem láthatók: Az elsőként tárgyalt vizsgálatunkban bebizonyítottuk, hogy a ferumoxtran akkumulálódik a különféle malignus agytumorokban (*Várallyay P et al. 2002*). Az egyik igen jelentős – és az 5.1. vizsgálatunkkal egybevágó – eredményünk az a tény, hogy léteznek olyan területek, amelyek csak ferumoxtrannal, de GAKA-val nem halmoznak (4. táblázat, 12., 13. és 14. ábra). A fontos kérdés az, hogy vajon ezek az extra ferumoxtran-halmozó területek hisztológiailag minek felelhetnek meg. A műtétek az első Gd-halmozásos MR és idegsebészeti indikáció alapján történtek, vagyis lehetetlen volt minden ferumoxtran-halmozó területből a szöveti mintavétel. Mivel az eredményeink szerint a vasfestődés elsősorban reaktív sejtekre volt jellemző, nem lehetünk biztosak abban, hogy ezek a csak ferumoxtran-halmozó léziók ténylegesen tumornak feleltek meg (12., 13. és 14. ábra). Azonban, ezek az extra ferumoxtran-halmozó területek kóros T2 hyperintenzitáson belül voltak detektálhatók. Az is ismert, hogy a malignus gliomák esetében a Gd-halmozó tumor csak a “jéghegy csúcsa”, és a

környező jelzavar ödéma és infiltráló tumor keveréke, sőt normális agyból is izoláltak malignus glioma sejteket. (*Silbergeld et al. 1997*). Szintén bizonyított, hogy a tumorokban ugyanakkor makrofágok és reaktív astrocyták is előfordulnak (*Muldoon et al. 2005*). Mindezek miatt tehát igen valószínű, hogy a kóros T2 hyperintenzitáson belüli, csak ferumoxtrant-halmozó területek tumort reprezentálnak reaktív sejtekkel. Ezt az a tény is alátámasztani látszik, hogy a követéses MR vizsgálatokon egy betegben új Gd-halmozó léziók alakultak ki azokban a területekben, ahol korábban a preoperatív MR képeken csak ferumoxtran halmozást lehetett látni (13. ábra). A fő tényezők, melyek ahhoz szükségesek, hogy ferumoxtran halmozás kialakulhasson Gd-t nem halmozó területekben valószínűleg a hosszú plazma felezési idő, mely lehetővé teszi a vér–agy-gáton keresztüli lassú átszivárgást, valamint az ezt követő intracelluláris felvétel és akkumuláció a reaktív sejtekben, ami hisztológiailag jól detektálható.

A ferumoxtran-halmozó léziók egyébként alacsony térerejű (0.15T) intraoperatív MR-en is jól láthatók (13E ábra), így a tumor rezekció ferumoxtran-halmozásos intraoperatív MR segítségével is végezhető.

Reziduális ferumoxtran-halmozó területek a műtét utáni MR képeken: a hétből négy esetben ábrázolódtak a postoperatív MR vizsgálatokon reziduális ferumoxtran-halmozó területek, melyeknek jelintenzitása – a biológiai felezési időnek megfelelően – kissé halványodott a műtét előtti MR-hez képest, de továbbra is fokozott normalizált T1 jelintenzitást mutattak (5. táblázat), és könnyedén láthatóak maradtak a ferumoxtran infúzió utáni kb. 48 órás vagy későbbi (akár 5. napos !) postoperatív MR vizsgálatokon is (12. és 14. ábra). Tehát a ferumoxtran (plazma felezési ideje 24-30 óra) által okozott szöveti jelintenzitás változás könnyen detektálható marad még két plazma felezési idő eltelte után is. Ez az időablak, amikor a vas-oxid nanorészecskék csaknem teljesen eliminálódnak a vérből, de az agyi léziókban még hosszan tartóan raktározódnak, elméletileg lehetővé teheti a postoperatív MR vizsgálaton a reziduális tumor megítélését anélkül, hogy újra KA-t kellene adni és, hogy műtét által indukált zavaró halmozás jöjjön létre, ami GAKA esetében probléma.

Bár a klinikai gyakorlatban a műtét utáni 1-4 napon belül végzett MR vizsgálat minimalizálja a műtét által indukált benignus Gd halmozást (*Forsting et al. 1993*), több tanulmányban is igazoltak intraoperatív és korai postoperatív KA halmozást, melynek lehetséges mechanizmusai: a műtét során sérült erekből való KA szivárgás, vér–agy-gát

károsodás, postoperatív ischaemia és intraoperatív állományi sérülés/vérzés, valamint autoregulációs zavar miatti luxus perfúzió a sérült területben. Ezen kívül perioperatív szteroid adása, az MR szekvencia paraméterek és a KA dózisa is befolyásolhatja a postoperatív kontraszthalmozást (*Crocker et al. 1976, Elster et al 1990, Henegar et al. 1996, Knauth et al 1999, Spetzger et al. 1998*). A ferumoxtran tehát megoldást jelenthet erre a problémára, amit korábbi állatkísérlet is igazolt (*Knauth et al 2001*).

Mivel a hisztokémia a ferumoxtran felvételt elsősorban reaktív sejtekben mutatta a tumor peremén és a BAT-ben, felmerülhet annak a lehetősége, hogy a postoperatív ferumoxtran halmozás egy része attól származik, hogy a műtéti trauma stimulálja a részecskefelvételt újabb reaktív sejtekbe és területekbe. Műtét indukálta vér–agy-gát károsodást viszont nem lehetett kimutatni a postoperatív Gd-halmozásos MR vizsgálaton és az üreg körüli állományban sem jelentkezett újabb ferumoxtran akkumuláció. Másrészt, reaktív astrocyták és makrofágok/mikrogliaák mindig jelen vannak a tumorokban és környezetükben, és az átlag 18 órás postoperatív időkeret nem valószínű, hogy elegendő lenne ahhoz, hogy “új” reaktív sejtek jelentős populációja képződjön a tumorban vagy migráljon a tumor területébe.

6. táblázat. A különböző stádiumú vér*, a ferumoxtran és különböző hemosztatikus anyagok+vér jelintenzitása a SE T1-súlyozott és a FSE T2-súlyozott képeken. A jelintenzitások a normális agy jelintenzitásához viszonyítottak†.

MR szekvencia	Hiperakut vér	Akut vér	Korai szubakut vér	Késői szubakut vér	Krónikus vér	Ferumoxtran a tumorban	Surgicel + vér	H2O2 + vér	Gelfoam + vér
SE T1	↓/ →	↓/ →	↑	↑	↓/ –	↑	↑	↑	↑/ →
FSE T2	↑	↓	↓	↑	↓	↓/ →	↓	↓	↓

Magyarázat: ↑: fokozott jelintenzitás, ↓: csökkent jelintenzitás, →: izointenzív, –: nem látható, /: vagy

*A vérömleny stádiumainak időpontjai: hiperakut vér: <1 nap, akut vér: 1-3 nap, korai szubakut vér: 4-7 nap, késői szubakut vér: 1- 4 hét, krónikus vér: >4 hét.

†A jelintenzitás változások az irodalom alapján. A GRE T2* képeken a jelintenzitás változások a FSE T2 képekhez hasonlóak, de a GRE T2* alacsony jelintenzitások sokkal kifejezettebbek.

Ideális esetben a korai postoperatív fázisban (<=3 nap) a vér jelintenzitása könnyedén elkülöníthető lenne az akkumulálódott vas-oxid jelintenzitásától, mivel az USPIO

partikulumok jelintenzitása különbözik a hiperakut fázisú vér jelintenzitásától mind a T1- mind a T2-súlyozott felvételeken és az akut vér jelintenzitásától a T1-súlyozott képeken (6. táblázat) (*Gomori et al. 1985*), vagyis a reziduális ferumoxtran-halmozó terület és a műtéti üregben vagy mellette lévő postoperatív vér elkülöníthető lenne. Sajnos azonban a legtöbb esetben a postoperatív vér jelintenzitása nem követi az intracerebrális hematomák szokványos jelintenzitás változásait. A vér jelintenzitását ugyanis nagymértékben befolyásolják a műtét során alkalmazott hemosztatikus anyagok. Mind a Surgicel, mind a H₂O₂ felgyorsítja az oxihemoglobin származékainak képződését és így már korán (műtét után 4 napon belül is!) methemoglobin alakulhat ki következményes T1 és T2 relaxáció rövidítési effektussal. A Surgicel akár percekben belül megváltoztatja a vér jelintenzitását, mégpedig perzisztáló fokozott T1 és csökkent T2 jelintenzitást eredményez (6. táblázat) (*Spiller et al. 2001*). A fentiekből nyilvánvaló, hogy szükség lenne olyan hemosztatikus anyagra, ami nem gyorsítja fel a hemoglobin lebomlását; ezzel elkerülhető lenne a vér korai postoperatív T1 jelintenzitás fokozódása és a reziduális ferumoxtran halmozás jól elkülöníthető maradhatna.

Ferumoxtran lokalizáció a szövetmintákban: A ferumoxtran-halmozó régiókból származó szövetminták minden esetben malignus tumort mutattak (4. táblázat). A vas hisztokémia a tumoron belül csak szórványos pozitív festést, míg a tumor perifériás részén és a BAT-ben erős vasfestést jelzett (12., 14., 15. és 16. ábra). Bár néhány tumorsejt mutatott halvány festődést, a celluláris festődés elsősorban olyan sejteket érintett, amelyek makrofág (vagy aktivált mikroglia) morfológiát mutattak, vagy csillag-alakkal és fibrilláris nyúlványokkal rendelkeztek reaktív astrocytáknak megfelelően. Ezzel szemben, a kontroll betegekben ilyen celluláris festődést nem lehetett detektálni. Bár a DAB-Perls festés nem képes különbséget tenni az extracelluláris ferumoxtran és a természetes vasforrások (vérzés vagy hemosziderin) között, a celluláris vasfestődés egyértelműen jelzi a ferumoxtran felvételt. Az MR jelintenzitás változások és hisztológia közvetlen korrelációja USPIO-val lehetséges, de GAKA-val nem, ami jelentős előnyt jelenthet a ferumoxtran használatához.

A vizsgálat korlátja elsősorban a kis esetszám. További vizsgálatok folynak több beteg bevonásával annak tisztázására, hogy az intraoperatív MR vizsgálatokon a tumorok perzisztáló USPIO halmozása hogyan segítheti a rezekció kivitelezését. Úgyszintén, további vizsgálatok szükségesek az extra ferumoxtran-halmozó területek

szöveti elemzésére, valamint a postoperatív MR vizsgálatokon a reziduális USPIO halmozás és vérdegradációs termékek elkülönítési lehetőségére.

7.3. A ferumoxytol és a gadoteridol halmozás kvantitatív összehasonlító vizsgálatának megbeszélése

A munka célja az volt, hogy 1. objektív módszerrel összehasonlítsuk a ferumoxytol és a gadoteridol halmozásának volumenét és jelintenzitását és 2. megállapítsuk, hogy a két KA halmozása hasonlóan változik-e a tumorok kezelése során.

Ferumoxytol versus gadoteridol: az egész betegcsoportot együttesen elemezve a ferumoxytol kisebb halmozó volument és halványabb T1 hiperintenzitást mutatott a gadoteridolhoz képest az alkalmazott MR vizsgálati paraméterek mellett (19. ábra). Az egyes kezelési csoportokban a két KA közötti különbség azonban már nem volt szignifikáns (20. ábra). A két KA közötti jó korreláció (18. ábra), valamint az, hogy a KA-k relatív különbsége nem változott meg jelentősen a négy kezelési csoportban arra utal, hogy a kétfajta KA a tumorok kezelése során hasonlóan viselkedik. Ez látszik a vér–agy-gát permeabilitását megváltoztató bevacizumab és szteroid terápia előtti és utáni méréseken is: a két KA relatív különbsége nem változott meg a kezelés hatására, azaz ha a gadoteridol volumene vagy jelintenzitása változik, akkor ezt a változást követi a ferumoxytol is. Bár a két KA halmozási mechanizmusa különböző, a terápiás követés során a hasonló viselkedés valószínűleg annak köszönhető, hogy a ferumoxytolnak is elég idő áll rendelkezésre ahhoz (beadás után 24 órával készült MR vizsgálat), hogy a károsodott vér–agy-gáton keresztül extravazálódjon, ami a gadoteridol esetében nagyon rövid időn belül megtörténik. Ha a ferumoxytol beadása után hamarabb készülné az MR vizsgálat, akkor nagyobb különbség mutatkozna a két KA között. Fontos észrevétel az is, hogy a bevacizumab terápia hatására mind a két KA halmozás volumene csökkent (21. ábra).

Eredményeink hasonlóak a korábbi tanulmányokhoz, melyekben szintén enyhén kisebb volument és jelintenzitást mértek ferumoxytollal, mint gadoteridollal, de ezekben a vizsgálatokban különböző patológiás folyamatok szerepeltek, a mérést manuális módszerrel végezték és különböző ferumoxytol dózisokat alkalmaztak (*Hamilton et al.*

2011, Dosa et al. 2011). Ezzel szemben a jelen tanulmányban a beteganyag homogén volt, mivel nagy számban csak high-grade gliomás betegeket vizsgáltunk, valamint a mérés egy objektív módszerrel szemiautomatikusan történt.

A halmozást befolyásoló faktorok: az összes beteg együttes elemzése során a két KA között észlelt különbség több tényező következménye lehet. A halmozás nagysága és jelintenzitása függ a patológiás folyamattól, a KA relaxivitásától, a mágneses térerőtől (B_0), az adott szekvencia paramétereitől, a KA dózistól, a képképzés és a KA beadása között eltelt időtől és az adott KA halmozási mechanizmusától (Rohrer et al. 2005, Neuwelt et al. 2007, Weinstein et al. 2010). A jelen vizsgálatban a két KA-t ugyanazon patológiás folyamatban hasonlítottuk össze, 3T-s berendezéssel és azonos szekvencia paraméterekkel. A többi előzőekben felsorolt faktor viszont különbözött. A ferumoxytol T1 relaxivitása 1.5T-n nagyobb ($15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), mint a gadoteridol ($4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) (1. táblázat), de a jelen vizsgálat 3T-s berendezéssel készült. A ferumoxytol T1 relaxivitásáról jelenleg nincs pontos adat 3T mellett, viszont egy másik SPIO, a ferumoxides kisebb T1 relaxivitással ($2.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) rendelkezik, mint a gadoteridol ($3.7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) 3T-n, 37 C fokon, plazmában (Rohrer et al. 2005), aminek alacsonyabb jelintenzitás lesz az eredménye egy T1-súlyozott képen ugyanazon szekvencia paraméterek mellett. Így lehetséges, hogy a ferumoxytol esetében a nagyobb térerő hasonló jelenséget okoz. Ezt támasztja alá az a tény is, miszerint a térerő fokozódásával az $r1/r2$ hányados csökken és ez a jelenség az USPIO-k esetén kifejezetten érvényesül. Ezért a hiperintenzív halmozás a T1-súlyozott képeken könnyebben jön létre alacsonyabb térerők esetén, és még 0.15T intraoperatív MR-en is jó T1 kontrasztot lehet látni (Hunt et al. 2005). 1.5T versus 3T, és 3T versus 7T térerő összehasonlítása alacsonyabb térerőn erősebb és nagyobb halmozást mutatott és 12T-n egy preklinikai kísérletben már nem lehetett USPIO-val T1-súlyozott halmozást detektálni (Weinstein et al. 2010). Fentiek alapján egyértelmű, hogy a térerő döntően befolyásolja a ferumoxytol jelintenzitás fokozódás mértékét és kiterjedését.

A ferumoxytol dózisának növelésével a halmozás normalizált jelintenzitása nagyobbá válik és a relatív különbség a ferumoxytol és a gadoteridol halmozás jelintenzitása között csökken (még nem publikált adatok).

A halmozás dinamikája tekintetében a két KA között alapvető különbség van, mely részben a különböző molekuláris méret és részben az eltérő eliminációs mechanizmus

és plazma felezési idő következménye (1. táblázat) (*Corot et al. 2006*). A gadoteridol az agyi parenchymában a maximális halmozást 10 perccel a beadás után éri el (*McLachlan et al. 1992*), míg a ferumoxytol maximális halmozása a beadás után 24-48 órával látható, valamint a halmozás kiterjedése az idő függvényében növekszik, még akár 70 órával a beadás után is (*Neuwelt et al. 2007, Landry et al. 2005*). Ezen kívül, míg a gadoteridol extracelluláris KA, addig a ferumoxytol mind extracellulárisan, mind intracellulárisan is jelen lehet (*McConnell et al. 2016*).

Fentiek alapján, a térerő, a ferumoxytol dózis és a beadás után a leképezésig eltelt idő befolyásolja a ferumoxytol halmozást, és ezek optimális megválasztásával a két KA halmozásának jelintenzitása és volumene jobban megközelítheti egymást. Az optimális ferumoxytol dózis és a leképezési idő meghatározása nem volt a jelen tanulmány feladata. A vizsgálatunkban az általánosan használt ferumoxytol dózist és a tipikus 24 óras képalkotási időzítést hasonlítottuk össze a standard GAKA-s halmozó képekkel.

Klinikai megfontolások: fontos kérdés az, hogy van-e klinikai következménye annak, ha a ferumoxytol halmozás jelintenzitása és mérete enyhén kisebb, mint a GAKA halmozásé, és milyen mértékű különbség fogadható el a klinikumban. Ha a képalkotás célja csak a tumor jelenlétének a bizonyítása és a tumor lokalizáció és morfológia meghatározása, akkor kis különbség a két KA között klinikailag nem jelentős. Ha viszont egy tumor követése során a klinikai kérdés a progresszió, akkor nyilván ugyanazt a KA-t kell használni a követéses MR vizsgálatok során, mint az alap vizsgálatnál, mert csak így ítélné meg pontosan a tumor változása.

Krónikus vesebetegek esetében, akiknél GAKA nem adható a nephrogén szisztémás fibrózis kialakulásának veszélye miatt, a ferumoxytol lehetséges alternatív KA-ként szolgálhat. Mivel a vas fontos elem a szervezetben és a ferumoxytol vasmagja beépül a természetes vasraktárakba, ezért vastárolási betegségben nem szenvedő embereknek adva a vaslerakódás miatti toxicitás esélye nagyon kicsi (*Muehe et al. 2016, Neuwelt et al. 2009, Varallyay CG et al. 2017, Vasanawala et al. 2016*).

Ezen kívül, a ferumoxytollal történő MR vizsgálat plusz információkkal szolgálhat a KIR-i léziók diagnózisában: blood pool tulajdonsága miatt nagy felbontású GRE T2* képeken mind a normális, mind a patológiás vaszkulatura kiválóan ábrázolódik (*Várallyay P et al. 2017*), és nagy felbontású steady-state CBV térkép is készíthető, amivel meghatározható a tumor legmalignusabb része a pontos idegsebészeti célzáshoz

(*Varallyay CG et al. 2013*). DSC dinamikus vizsgálattal a kemoradioterápia utáni pszeudoprogredió versus valódi progresszió és bevacizumab terápia utáni pszeudoprogredió versus valódi regresszió differenciálását is segítheti (*Varallyay CG et al. 2009, Gahramanov et al. 2013*). A ferumoxytol alkalmas lehet durális alapú metasztázisok és meningeomák elkülönítésére is, mivel a meningeomák nem veszik fel az USPIO-t, de GAKA-val mindkettő halmoz (*Hamilton et al. 2016*). Nagy T2 relaxivitása miatt a vér–agy-gát zavart mutató léziókban csökkent jelintenzitás látható a késői T2-súlyozott MR képeken, ami a GAKA esetében nem jön létre a gyors washout fázis miatt (*Hamilton et al. 2011, Dosa et al. 2011*). A két KA közötti alkalmankénti halmozási minta különbség szintén plusz információkat adhat a tumor patológiájáról és jelenlegi kutatások tárgyát képezi.

Ferumoxytol (USPIO) akkumuláció és halmozás: az extravazáció mechanizmusa nem teljesen tisztázott folyamat. Bár több SPIO-val is lehetséges in vitro és in vivo sejtmegjelölés, a ferumoxytol (és a ferumoxtran) esetében érdemi mononukleáris leukocita uptake in vivo nem figyelhető meg, még protamin-szulfáttal képzett komplex esetében sem (*Wu et al. 2007*). Tehát a ferumoxytol diapedesissel való átjutása a vér–agy-gáton nem valószínű, bár kis mértékben nem zárható ki. A vizsgálatok inkább azt mutatják, hogy a ferumoxytol nanorészecske önmagában kerül át a vér–agy-gáton, melynek pontos mechanizmusa nem ismert, mindenesetre a vér–agy-gát kóros permeabilitása alapvető fontosságúnak tűnik. Az interendotheliális átjutás mellett felmerül transzcitózis lehetősége is, bár eddig igazolni nem tudták. Ha az USPIO átjutott az érfalon, akkor részben intersticiálisan, részben intracellulárisan helyezkedik el. Az intracelluláris részecske felvétel az astrocytákba (főleg a TJ-khez közeli duzzadt végtalpakba) és a makrofágokba történik, és valószínűleg a hosszú ideig perzisztáló halmozás (pozitív vagy negatív) az MR képeken ennek tulajdonítható (*McConnell et al. 2016*).

Mivel a gyulladásozó sejtek (makrofágok és reaktív astrocyták) és barrier zavar a legtöbb agyi lézióban (pl. tumor, gyulladás, SM, infekció, ischaemia, trauma) jelen van, ezért a késői MR képeken az USPIO halmozás az általános gyulladásozó reakció biomarkerének tekinthető, tehát az USPIO halmozás nem tumor specifikus. Viszont a passzív target (iv. infúzió után) módszerrel is kimutatható bizonyos tumorok közötti USPIO halmozás különbség: pl. a meningeomák nem, de a durális metasztázisok

halmozzák a ferumoxytolt (*Hamilton et al. 2016*), valamint patkányagyba implantált különböző tumorokban (LX-1 SCLC, U87 glioma és CALU6 SCLC) eltérő USPIO (ferumoxtran) halmozást lehet detektálni, tehát az USPIO uptake függhet a tumor típusától, akkor is ha a tumorok malignusak (*Muldoon et al. 2005*). A vas-oxid részecskékhez kapcsolható specifikus ligandokkal a specificitás növelhető, mellyel kapcsolatban számtalan kutatás folyik: pl: egy peptid, a klorotoxin (skorpió mérge) specifikusan kötődik a glioma és egyéb tumorsejtekhez, melyek mátrix metalloproteináz-2-t expresszálnak, és ezt a peptidet vas-oxid nanorészecskével konjugálva MR-rel láthatóvá tehető a tumor, mivel a részecskéket a glioma sejtek internalizálják (*Sun et al 2008*).

A tanulmány korlátja: az összes beteg számához viszonyítva az egyes betegcsoportokba relatíve kevesebb beteg kerülhetett, ami korlátozza a statisztikai analízis erősségét. A bevacizumab és szteroid terápia előtti és utáni MR vizsgálatok között eltelt idő az egyes betegek esetében különböző volt, de a ferumoxytol és a gadoteridol halmozás ugyanazon időben készült vizsgálaton lett összehasonlítva. Ezen kívül, mivel ez egy klinikai vizsgálat volt, a betegek a bevacizumab és szteroid mellett más terápiaiban is részesülhettek, ami esetleg szintén befolyásolhatta az eredményeket.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

8.1 Ferumoxides és ferumoxtran versus gadolínium alapú kontrasztanyag

1. A ferumoxtran USPIO – a ferumoxides SPIO-val ellentétben – iv. KA-ként alkalmazható intrakraniális tumorok, főleg malignus gliomák MR vizsgálatában.

2. A ferumoxtran akkumulációja progresszív, a jelintenzitás változások a 24 órás MR vizsgálaton erősebbek és nagyobb kiterjedésűek, mint a 6 órás képeken.

3. A malignus tumorok mindegyike mutatott ferumoxtran halmozást, de a low grade gliomákban történő ferumoxtran akkumuláció mértékének megállapításához további vizsgálatok szükségesek.

4. Intraaxiális tumorok esetében a ferumoxtran halmozás egyrészt a vér–agy-gát sérülés mértékétől, másrészt a tumorban és a tumor–agyszövet határon lévő, az USPIO-t fagocitálni képes parenchymális sejtek mennyiségétől függhet. Extraaxiális tumorokban, amelyek nem rendelkeznek vér–agy-gáttal, a ferumoxtran akkumuláció a vaszkuláris endothelium különböző mértékű permeabilitásától és a vas-oxid részecskéket felvenni képes parenchymális sejtek jelenlététől függhet. Mindkét esetben az extravazáció mértékét előzetes sugárterápia befolyásolhatja.

5. A SE T1-súlyozott és a GRE T2*-súlyozott szekvencia a két legalkalmasabb mérés az USPIO akkumuláció MR vizsgálatával való detektálására.

6. A ferumoxtran intratumorális kimutatása alkalmassá teheti ezt az USPIO-t arra is, hogy víruseloszlást modellezzünk malignus agytumorok génterápiás kezeléséhez.

7. A szövettani vizsgálaton a vasfestődés eloszlása jól megfelelt az MR képeken látható jelintenzitás változásoknak, és az USPIO akkumulációt elsősorban a tumor perifériáján astrocyta morfológiájú sejtekben és nem a tumor centrumban lehetett látni.

8.2. Ferumoxtran halmozás malignus tumorokban pre- és postoperatív MR vizsgálatokon és hisztológia

1. A ferumoxtran olyan extra területeken is mutathat halmozást (a Gd-halmozó tumor közelében vagy attól távol), ahol Gd halmozás nem detektálható, mely korai pathológiás

folyamatot jelez.

2. A postoperatív képeken a reziduális ferumoxtran-halmozó területek perzisztáló, könnyen detektálható fokozott T1 jelintenzitást mutatnak 2-5 nappal az USPIO infúziója után is, ami lehetővé teszi reziduális tumor értékelését (intra- és postoperatív) ismételt KA adása és zavaró GAKA halmozása nélkül.

3. A ferumoxtran halmozás alacsony térerejű intraoperatív (0.15 T) MR-en is jól látható.

4. A perzisztáló és extra területeken is megjelenő ferumoxtran halmozásért valószínűleg a következő mechanizmus a felelős: a hosszú plazma felezési idő (24 – 30 óra) lehetővé teszi a nanorészecskék kóros vér–agy-gáton keresztüli lassú átjutását, amit azután intracelluláris akkumuláció követ.

5. A vas-oxid részecskék felvétele elsősorban a reaktív sejtekben (astrocyták, makrofágok), nem pedig a tumorsejtekben látható mind a tumoron belül, mind pedig a tumor körül.

6. A ferumoxtran egyedülálló KA, mivel mind MR vizsgálattal, mind fénymikroszkóppal (sőt elektronmikroszkóppal) is tanulmányozható.

8.3. Ferumoxytol és gadoteridol halmozás objektív mérése és változása a terápia következtében

1. A második generációs USPIO, a ferumoxytol késői halmozásának objektív összehasonlítása a standard Gd halmozással, valamint annak vizsgálata, hogy a ferumoxytol képes-e detektálni a tumorterápia során létrejövő változásokat fontos lépés afelé, hogy a ferumoxytol alternatív MR KA-ként elfogadásra kerülhessen.

2. A két KA halmozás volumenei és jelintenzitásai közötti korreláció nagyon ígéretes azzal együtt, hogy a terápiás követés során a ferumoxytol és a gadoteridol hasonlóan viselkedik.

3. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy a ferumoxytol dózisa és a képképzés időzítése hogyan befolyásolja pontosan a késői MR képeken a tumor halmozást és ennek milyen klinikai jelentősége van.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék MR kontrasztanyagként való alkalmazási lehetőségét vizsgáltuk humán intrakraniális tumorokban. Háromféle vas-oxid nanorészecskét tanulmányoztunk: ferumoxides, ferumoxtran és ferumoxytol.

Elsőként az SPIO csoportba tartozó (> 50 nm) ferumoxides és az USPIO-k közé sorolható (< 50 nm) ferumoxtran által okozott jelintenzitás változásokat hasonlítottuk össze a Gd halmozással, valamint hisztokémiai módszerrel azonosítottuk a vas szöveti és intracelluláris lokalizációját. A ferumoxides nem alkalmas MR KA-ként való használatra, mivel nem okoz jelintenzitás változást az agytumorokban. Ugyanakkor a ferumoxtran, megközelítőleg a Gd halmozás régiójában, jól detektálható jelintenzitás változásokat okoz, melyek progresszív jelleggel a ferumoxtran infúzió után 24 óra körül érik el a maximumot. Fontos észrevétel, hogy a ferumoxtran olyan területeken is mutathat halmozást, ahol patológias folyamat már elindult, de Gd halmozás nincs. Ezek az extra ferumoxtran-halmozó területek nagy valószínűséggel tumort reprezentálnak reaktív sejtekkel, mivel a gliomák körüli T2 jelzavaron belül helyezkedtek el, amiben jól ismert tény a tumorsejtek infiltrációja; egy betegben ilyen extra léziók helyében a későbbiekben Gd-t halmozó tumor progresszió alakult ki. A postoperatív képeken a reziduális ferumoxtran-halmozó területek jól láthatóak maradnak 2-5 nappal a ferumoxtran beadása után is, mely felveti annak a lehetőségét, hogy egyszeri USPIO beadással végezzük mind a preoperatív értékelést, mind intra- és postoperatív a tumor rezekció megítélését. A ferumoxtran képalkotás segíthet a műtét által indukált, és a reziduális tumor vizsgálatát gyakran zavaró Gd halmozás kiküszöbölésében is.

A második generációs USPIO, a ferumoxytol és a gadoteridol malignus gliomákban való halmozása között – mind a volumenek, mind a jelintenzitások tekintetében – objektív, szemiautomatikus módszerrel mérve erős korreláció mutatható ki, és a terápiás követés során a ferumoxytol és a gadoteridol halmozása hasonlóan változik.

Az USPIO-k egyedülálló KA-k, mivel mind MR vizsgálattal, mind fény- és elektron mikroszkóppal is vizsgálhatók. A károsodott vér–agy-gáton való lassú keresztüljutás után az USPIO részecskék részben intersticiálisan, részben intracellulárisan főleg reaktív astrocytáknak és makrofágokban találhatóak, és a hosszú ideig perzisztáló jelintenzitás változás valószínűleg a celluláris uptake-nek tulajdonítható.

10. SUMMARY

Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles were studied as potential MRI contrast agents in human intracranial tumors. Three different types of nanoparticle were examined: ferumoxides, ferumoxtran and ferumoxytol.

First, the SPIO (> 50 nm) particle ferumoxides and the USPIO (< 50 nm) particle ferumoxtran were tested for inducing MRI signal changes and were compared with Gd enhancement as well as histochemistry to localize iron intracellularly. Ferumoxides cannot be used as an MRI contrast agent, since it did not cause signal changes in brain tumors. On the contrary, ferumoxtran showed readily detectable signal alterations in the approximate regions where Gd enhancement was present and the iron accumulation was progressive with signal changes peaking at around 24 hours after ferumoxtran infusion. Another important observation is, that there were areas, which showed enhancement with ferumoxtran due to early pathological effects but not with Gd. These extra ferumoxtran-enhancing regions most likely represent tumor with reactive cells, since they were located in areas of high T2 signal change, which is known to have infiltrating tumor cells in case of a malignant glioma. In addition, in one case progressive Gd-enhancing tumor developed in regions of extra ferumoxtran enhancement. Postoperative MRI showed clearly visible residual ferumoxtran enhancing regions at 2-5 days after ferumoxtran infusion. This provides at least a theoretical basis to assess residual tumor with a single preoperative USPIO infusion and without the need to re-administer a contrast agent during intra- or postoperative MRI. Ferumoxtran may also help lessen the problem of benign postoperative surgery induced Gd enhancement, which makes it often difficult to assess residual tumor.

The second generation USPIO, ferumoxytol and gadoteridol show strong correlation between their enhancement volumes and signal intensities in malignant gliomas measuring with an objective semiautomatic method and during follow up after therapy ferumoxytol and Gd enhancement volume and signal intensity change similarly.

USPIOs are unique agents, since they can be detected with MRI as well as light- and electron microscopy. After breaching the abnormal blood-brain barrier, USPIO is found interstitially and intracellularly in macrophages and reactive astrocytes and the long persisting signal change on MR images is most likely the result of this cellular uptake.

11. IRODALOMJEGYZÉK

Abbott NJ, Friedman A. (2012) Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia*, 53: Suppl 6: 1-6.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1): 13-25.

Abbott NJ, Rönnbäck L. Hansson E. (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1): 41-53.

Abbott NJ. (2002) Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat*, 200(6): 629-638.

Abbott, N.J. (2005) Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1): 5-23.

Abbott, N.J. Comparative physiology of the blood–brain barrier. In: Bradbury, M.W.B. (Ed.), *Physiology and Pharmacology of the Blood–Brain Barrier*. Springer, Heidelberg, 1992: 371-396.

Advanced Magnetics, Inc. Cambridge, MA Available for Public Disclosure without redaction. Combidex (ferumoxtran-10) NDA 21-115 Oncology Drugs Advisory Committee Briefing Document January 28, 2005, volume 1 of 2.

Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. (2004) Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*, 104(4): 1217-1223.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97(6): 512-523.

Asahi M1, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. (2001) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*, 21(19): 7724-7732.

Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. (2002) Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(4): 367-378.

Barnett PA1, Roman-Goldstein S, Ramsey F, McCormick CI, Sexton G, Szumowski J, Neuwelt EA. (1995) Differential permeability and quantitative MR imaging of a human lung carcinoma brain xenograft in the nude rat. *Am J Pathol*, 146(2): 436-449.

Begley DJ, Brightman MW. (2003) Structural and functional aspects of the blood–brain barrier. *Prog Drug Res*, 61: 39-78.

Begley DJ. (2004) ABC transporters and the blood–brain barrier. *Curr Pharm Des*, 10(12): 1295-1312.

Bellin MF, Van Der Molen AJ. (2008) Extracellular gadolinium-based contrast media: an overview. *Eur J Radiol*, 66(2): 160-167.

Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. (1980) Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and anti-luminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res*, 192(1): 17-28.

Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. (1998) Loss of tight junction proteins occludin and zonula-occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil induced blood–brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*, 86(4): 1245-1257.

Bonomini F, Rezzani R. (2010) BBB and aquaporin. *Curr Neuropharmacol*, 8(2): 92-96.

Brightman MW, Hori M, Rapoport SI, Reese TS, Westergaard E. (1973) Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J Comp Neurol*, 152(4): 317-325.

Brightman MW, Kadota Y. (1992) Nonpermeable and permeable vessels of the brain. *NIDA Res Monogr*, 120: 87-107.

Brightman MW, Klatzo I, Olsson Y, Reese TS. (1970) The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci*, 10(3):215-239.

Brightman MW, Reese TS. (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40(3): 648-677.

Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. (2004) Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*, 129(4): 957-970.

Bundgard M. (1982) The ultrastructure of cerebral blood capillaries in the ratfish, *Chimaera monstrosa*. *Cell Tissue Res*, 226(1): 145-154.

Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. (1990) Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetised rats: a developmental study. *J Physiol*, 429: 47-62.

Claudio, L, Kress Y, Norton WT, Brosnan CF. (1989) Increased vesicular transport and decreased mitochondrial content in blood–brain barrier endothelial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 135(6): 1157-1168.

Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(14): 1471-1504.

Crocker EF, Zimmerman RA, Phelps ME, Kuhl DE. (1976) The effect of steroids on the extravascular distribution of radiographic contrast material and technetium pertechnetate in brain tumors as determined by computed tomography. *Radiology*, 119(2): 471–474.

De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, et al. (2015) Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *J Magn Reson Imaging*, 42(3): 545-565.

Doolittle ND, Abrey LE, Ferrari N, Hall WA, Laws ER Jr, Mclendon RE, Muldoon LL, Peereboom D, Peterson DR, Reynolds CP, Senter P, Neuwelt EA. (2002) Targeted delivery in primary and metastatic brain tumors: Enhanced delivery versus neurotoxicity. *Clin Cancer Res*, 8(6): 1702-1709.

Dore-Duffy P, Katychhev A, Wang X, Van Buren E. (2006) CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(5): 613-624.

Dosa E, Guillaume DJ, Haluska M, Lacy CA, Hamilton BE, Njus JM, Rooney WD, Kraemer DF, Muldoon LL, Neuwelt EA. (2011) Magnetic resonance imaging of intracranial tumors: intra-patient comparison of gadoteridol and ferumoxytol. *Neuro Oncol*, 13(2): 251-260.

Duvernoy HM, Risold PY. (2007) The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev*, 56(1): 119-147.

Egelhof T, Delbeck N, Hartmann M, et al. (1998) Can superparamagnetic contrast media improve MRI-tomographic images of experimental gliomas? *Radiologe*, 38(11): 943-947.

Elster AD. (2018) mriquestions.com.

Elster AD, DiPersio DA. (1990) Cranial postoperative site: assessment with contrast-enhanced MR imaging. *Radiology*, 174(1): 93-98.

Engelhardt B, Wolburg H. (2004) Mini-review: transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*, 34(11): 2955-2963.

Enochs WS, Harsh G, Hochberg F, Weissleder R. (1999) Improved delineation of human brain tumors on MR images using a long-circulating, superparamagnetic iron oxide agent. *J Magn Reson Imaging*, 9(2):228-232.

Fenstermacher JD. Volume regulation of the central nervous system. In: Edema. Staub NC, Taylor AE (Eds.). Raven Press, New York, 1984: 383-404.

Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. (2010) Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(51): 22290-5.

Finn JP, Nguyen KL, Han F, Zhou Z, Salusky I, Ayad I, Hu P. (2016) Cardiovascular MRI with ferumoxytol. *Clin Radiol*, 71(8): 796-806.

Finn JP, Nguyen KL, Hu P. (2017) Ferumoxytol vs. gadolinium agents for contrast-

enhanced MRI: thoughts on evolving indications, risks, and benefits. *J Magn Reson Imaging*, 46(3): 919-923.

Forsting M, Albert FK, Kunze S, Adams HP, Zenner D, Sartor K. (1993) Extirpation of glioblastomas: MR and CT followup of residual tumor and regrowth patterns. *AJNR Am J Neuroradiol*, 14(1): 77-87.

Gahramanov S1, Muldoon LL, Varallyay CG, Li X, Kraemer DF, Fu R, Hamilton BE, Rooney WD, Neuwelt EA. (2013) Pseudoprogession of glioblastoma after chemo- and radiation therapy: diagnosis by using dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging with ferumoxytol versus gadoteridol and correlation with survival. *Radiology*, 266(3): 842-852.

Gale EM, Atanasova IP, Blasi F, Ay I, Caravan P. (2015) A manganese alternative to gadolinium for MRI contrast. *J Am Chem Soc*, 137(49): 15548-57.

Gingrich MB, Traynelis SF. (2000) Serine proteases and brain damage — is there a link? *Trends Neurosci*, 23(9): 399–407.

Gomori JM, Grossman RI, Goldberg HI, Zimmerman RA, Bilaniuk LT. (1985) Intracranial hematomas: imaging by highfield MR. *Radiology* 157(1): 87-93.

Grobner T, Prischl FC. (2007) Gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Kidney Int*, 72(3): 260-264.

Guillaume DJ, Doolittle ND, Gahramanov S, Hedrick NA, Delashaw JB, Neuwelt EA. (2010) Intra-arterial chemotherapy with osmotic blood-brain barrier disruption for aggressive oligodendroglial tumors: results of a phase I study. *Neurosurgery*, 66(1): 48-58; discussion 58.

Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494): 55-60.

Hamilton BE, Nesbit GM, Dosa E, Gahramanov S, Rooney B, Nesbit EG, Raines J, Neuwelt EA. (2011) Comparative analysis of ferumoxytol and gadoteridol enhancement using T1- and T2-weighted MRI in neuroimaging. *AJR Am J Roentgenol*, 197(4): 981-988.

Hamilton BE, Woltjer RL, Prola-Netto J, Nesbit GM, Gahramanov S, Pham T, Wagner J, Neuwelt EA. (2016) Ferumoxytol-enhanced MRI differentiation of meningioma from dural metastases: a pilot study with immunohistochemical observations. *J Neurooncol*, 129(2): 301-309.

Harisinghani MG1, Saini S, Slater GJ, Schnall MD, Rifkin MD. (1997) MR imaging of pelvic lymph nodes in primary pelvic carcinoma with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (Combidex): preliminary observations. *J Magn Reson Imaging*, 7(1):161-163.

Harke N, Leers J, Kietz S, Drenckhahn D, Forster C. (2008) Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element. *Mol Cell Endocrinol*, 295(1-2): 39-47.

Harms SE, Hinton T, Manning L, Korourian S. (2000) New MRI contrast agent for labeling of tumor-associated macrophages that stimulate tumor angiogenesis (abstr). In: *Proceedings of the Eighth Meeting of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine 2000*. Berkeley, Calif: International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 616.

Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 153(3): 543-553.

Henegar MM, Moran CJ, Silbergeld DL. (1996) Early postoperative magnetic resonance imaging following nonneoplastic cortical resection. *J Neurosurg*, 84(2):174-179.

Hunt MA, Bago AG, Neuwelt EA. (2005) Single-dose contrast agent for intraoperative MR imaging of intrinsic brain tumors by using ferumoxtran-10. *AJNR Am J Neuroradiol*, 26(5): 1084-1088.

Iadecola C, Nedergaard M. (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, 10(11): 1369-1376.

Jahnke K, Kraemer DF, Knight KR, Fortin D, Bell S, Doolittle ND, Muldoon LL, Neuwelt EA. (2008) Intraarterial chemotherapy and osmotic blood-brain barrier disruption for patients with embryonal and germ cell tumors of the central nervous system. *Cancer*, 112(3): 581-588.

Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TE, Woolrich MW, Smith SM. (2012) FSL. *Neuroimage*, 62(2): 782-790.

Jung CW, Jacobs P. (1995) Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn Reson Imaging*, 13(5): 661-674.

Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, Toyoda K, Oba H, Kotoku J, Haruyama T, Kitajima K, Furui S. (2015) Gadolinium-based Contrast Agent Accumulates in the Brain Even in Subjects without Severe Renal Dysfunction: Evaluation of Autopsy Brain Specimens with Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. *Radiology*, 276(1): 228-232.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principles of Neural Science*, 4th Ed. McGraw-Hill, New York, 2000: 1294.

Kimelberg HK. (2004) Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*, 129(4): 851-860.

Klatzo I. (1987) Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*, 72(3): 236-239.

Klatzo I, Chui E, Fujiwara K, Spatz M. (1980) Resolution of vasogenic brain edema. *Adv Neurol*, 28: 359-373.

Klatzo I. (1967) Presidential address. Neuropathologic aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*, 26(1): 1-14.

Knauth M, Aras N, Wirts CR, Dörfler A, Engelhorn T, Sartor K. (1999) Surgically induced intracranial contrast enhancement: potential source of diagnostic error in intraoperative MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 20(8): 1547-1553.

Knauth M, Egelhof T, Roth SU, Wirtz CR, Sartor K. (2001) Monocrystalline iron oxide nanoparticles: possible solution to the problem of surgically induced intracranial contrast enhancement in intraoperative MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22(1): 99-102.

Knopf PM, Barling-Berg CJ, Cserr HF, Basu D, Sirulnick EJ, Nolan SC, Park JT, Keir G, Thompson EJ, Hickey WF. (1998) Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: Tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. *J Immunol*, 161(2): 692-701.

Konsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (2007) (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin. Sci. (Lond)*, 112(1): 1-25.

Kostandy BB. (2012) The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*, 33(2): 223-37.

Kraemer DF, Fortin D, Neuwelt EA. (2002) Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: Recent developments and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2(3): 216-224.

Kroll RA, Neuwelt EA. (1988) Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: Osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, 42(5): 1083-1100.

Lai CH, Kuo KH. (2005) The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*. 50(2): 258-65.

Landry R, Jacobs PM, Davis R, Shenouda M, Bolton WK. (2005) Pharmacokinetic study of ferumoxytol: a new iron replacement therapy in normal subjects and hemodialysis patients. *Am J Nephrol*, 25(4): 400-410.

Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 108(6): 2064-2110.

- McAllister LD, Doolittle ND, Guastadisegni PE, Kraemer DF, Lacy CA, Crossen JR, Neuwelt EA. (2000) Cognitive outcomes and long-term follow-up results after enhanced chemotherapy delivery for primary central nervous system lymphoma. *Neurosurgery*, 46(1):51-60.
- McConnell HL, Schwartz DL, Richardson BE, Woltjer RL, Muldoon LL, Neuwelt EA. (2016) Ferumoxytol nanoparticle uptake in brain during acute neuroinflammation is cell-specific. *Nanomedicine* 12(6): 1535-1542.
- McDonald RJ, McDonald JS, Dai D, Schroeder D, Jentoft ME, Murray DL, Kadirvel R, Eckel LJ, Kallmes DF. (2017) Comparison of Gadolinium Concentrations within Multiple Rat Organs after Intravenous Administration of Linear versus Macrocyclic Gadolinium Chelates. *Radiology*, 285(2): 536-545.
- McLachlan SJ, Eaton S, De Simone DN. (1992) Pharmacokinetic behavior of gadoteridol injection. *Invest Radiol*, 27(Suppl 1): S12–S15.
- Meldolesi J, Castiglioni G, Parma R, Nassivera N, De Camilli P. (1978) Ca⁺⁺-dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. Effect of drugs. *J Cell Biol*, 79(1): 156-172.
- Mergo PJ, Engelken JD, Helmberger T, Ros PR. (1998) MRI in focal liver disease: a comparison of small and ultra-small superparamagnetic iron oxide as hepatic contrast agents. *J Magn Reson Imaging*, 8(5): 1073-1078.
- Mi H, Haeberle H, Barres BA. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci*, 21(5): 1538-1547.
- Moore A, Marecos E, Bogdanov A Jr, Weissleder R. (2000) Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*, 214(2): 568-574.
- Muehe AM, Feng D, von Eyben R, Luna-Fineman S, Link MP, Muthig T, Huddleston AE, Neuwelt EA, Daldrup-Link HE. (2016) Safety report of ferumoxytol for magnetic resonance imaging in children and young adults. *Invest Radiol*, 51(4):221-227.
- Muldoon LL, Nilaver G, Kroll RA, Pagel MA, Breakefield XO, Chiocca EA, Davidson BL, Weissleder R, Neuwelt EA. (1995) Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpesvirus and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol*, 147(6):1840-1851.
- Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Roman-Goldstein S, Jones RS, Neuwelt EA (1999) A physiological barrier distal to the anatomic blood-brain barrier in a model of transvascular delivery. *AJNR Am J Neuroradiol*, 20(2): 217-222.
- Muldoon LL, Sándor M, Pinkston KE, Neuwelt EA. (2005) Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor. *Neurosurgery*, 57(4):785-796

Muldoon LL, Varallyay P, Kraemer DF, K.iwic G, Pinkston K, WalkerRosenfeld SL, Neuwelt EA (2004) Trafficking of superparamagnetic iron oxide particles (Combidex) from brain to lymph nodes in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(1): 70-79.

Nagy S, Begley DJ. Blood–brain barrier, exchange of metabolites and gases. In: Kalimo, H. (Ed.), *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases*. ISN Neuropath. Press, Basel, 2005: 22-29.

Nagy Z, Goehlert UG, Wolfe LS, Hüttner I. (1985a) Ca²⁺ depletion-induced disconnection of tight junctions in isolated rat brain microvessels. *Acta Neuropathol*, 68(1): 48-52.

Nagy Z, Kolev K, Csonka E, Pék M, Machovich R. (1995) Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors. An in vitro cell culture model. *Stroke*, 26(2): 265-270.

Nagy Z, Kolev K, Csonka E, Vastag M, Machovich R. (1998) Perturbation of the integrity of the blood-brain barrier by fibrinolytic enzymes. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 9(6): 471-478.

Nagy Z, Martinez K. (1991) Astrocytic induction of endothelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 633:395-404.

Nagy Z, Mathieson G, Hüttner I. (1979a) Opening of tight junctions in cerebral endothelium. II. Effect of pressure-pulse induced acute arterial hypertension. *J Comp Neurol*, 185(3): 579-585.

Nagy Z, Mathieson G, Hüttner I. (1979c) Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase in acute arterial hypertension. *Acta Neuropathol*, 48(1): 45-53.

Nagy Z, Nardai S. (2017) Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside. *Brain Res Bull*, 134: 30-37.

Nagy Z, Pappius HM, Mathieson G, Hüttner I. (1979b) Opening of tight junctions in cerebral endothelium. I. Effect of hyperosmolar mannitol infused through the internal carotid artery. *J Comp Neurol*, 185(3): 569-578.

Nagy Z, Peters H, Hüttner I. (1981) Endothelial surface charge: blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase induced by the polycation protamin sulfate. *Acta Neuropathol Suppl*, 7: 7-9.

Nagy Z, Peters H, Hüttner I. (1983) Charge-related alterations of the cerebral endothelium. *Lab Invest*, 49(6): 662-671.

Nagy Z, Peters H, Hüttner I. (1984) Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest*, 50(3): 313-322.

Nagy Z, Pettigrew KD, Meiselman S, Brightman MW. (1988) Cerebral vessels

cryofixed after hyperosmosis or cold injury in normothermic and hypothermic frogs. *Brain Res*, 440(2): 315-327.

Nagy Z, Szabó M, Hüttner I. (1985b) Blood-brain barrier impairment by low pH buffer perfusion via the internal carotid artery in rat. *Acta Neuropathol*, 68(2): 160-163.

Nagy Z, Vastag M, Kolev K, Bori Z, Karáidi I, Skopál J. (2005) Human cerebral microvessel endothelial cell culture as a model system to study the blood-brain interface in ischemic/hypoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol*, 25(1): 201-210.

Nagy Z. The blood-brain barrier and the cerebral endothelium. In Johansson BB., Owman Ch and Windner H. (eds), *Pathophysiology of the blood-brain barrier*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1990: 11-29.

Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR. (2011) Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*, 12(3):169-182.

Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, Watnick SG. (2009) Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int*, 75(5): 465-474.

Neuwelt EA, Várallyay CG, Manninger S, Solymosi D, Haluska M, Hunt MA, Nesbit G, Stevens A, Jerosch-Herold M, Jacobs PM, Hoffman JM. (2007) The potential of ferumoxytol nanoparticle magnetic resonance imaging, perfusion, and angiography in central nervous system malignancy: a pilot study. *Neurosurgery*, 60(4): 601-612.

Neuwelt EA, Várallyay P, Bagó AG, Muldoon LL, Nesbit G, Nixon R. (2004) Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(5): 456-471.

Neuwelt EA, Weissleder R, Nilaver G, Kroll RA, Roman-Goldstein S, Szumowski J, Pagel MA, Jones RS, Remsen LG, McCormick CI, Shannon EM, Muldoon LL. (1994) Delivery of virus-sized iron oxide particles to rodent CNS neurons. *Neurosurgery*, 34(4): 777-784.

Neuwelt EA. (2004) Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, 54(1): 131-140; discussion 141-142.

Neuwelt EA. *Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation*. Plenum Press, New York, 1989: 1-24.

Nico B, Cantino D, Sassoé Pognetto M, Bertossi M, Ribatti D, Roncali L. (1994) Orthogonal arrays of particles (OAPs) in perivascular astrocytes and tight junctions in endothelial cells. A comparative study in developing and adult brain microvessels. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 26(1): 103-109.

Nitz WR, Reimer P. (1999) Contrast mechanisms in MR imaging. *Eur Radiol*, 9(6): 1032-1046.

Ott R, Brada M, Flower MA, Babich JW, Cherry SR, Deehan BJ. (1991) Measurements of blood-brain barrier permeability in patients undergoing radiotherapy and chemotherapy for primary cerebral lymphoma. *Eur J Cancer*, 27(11): 1356-1361.

Palade GE, Bruns RR. (1968) Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol*, 37(3): 633-649.

Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. (2004) Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*, 18(11): 1291-1293.

Pardridge WM. (1992) Recent developments in peptide drug delivery to the brain. *Pharmacol Toxicol*, 71(1): 3-10.

Pardridge WM. (1994) New approaches to drug delivery through the blood-brain barrier. *Trends Biotechnol*, 12(6): 239-245.

Pardridge WM. (1999) Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*, 5(6): 556-569.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3): 223-236.

Ramalho J, Semelka RC, Ramalho M, Nunes RH, AlObaidy M, Castillo M. (2016) Gadolinium-Based Contrast Agent Accumulation and Toxicity: An Update. *AJNR Am J Neuroradiol*, 37(7): 1192-1198.

Rapoport SI, Hori M, Klatzo I. (1972) Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am J Physiol*, 223(2): 323-331.

Rapoport SI. (1970) Effect of concentrated solutions on blood-brain barrier. *Am J Physiol*. 219(1): 270-274.

Reese TS, Feder N, Brightman MW. (1971) Electron microscopic study of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers with microperoxidase. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30(1): 137-138.

Reese TS., Karnovsky MJ. (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34(1): 207-217.

Remsen LG, McCormick CI, Sexton G, Pearse HD, Garcia R, Mass M, Roman-Goldstein S, Neuwelt EA. (1997) Long-term toxicity and neuropathology associated with the sequencing of cranial irradiation and enhanced chemotherapy delivery. *Neurosurgery*, 40(5): 1034-1042.

Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. (2005) Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol*, 40(11): 715-724.

Rubin LL, Staddon JM. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*, 22: 11-28.

Runge VM. (2017) Critical Questions Regarding Gadolinium Deposition in the Brain and Body After Injections of the Gadolinium-Based Contrast Agents, Safety and Clinical Recommendations in Consideration of the EMA's Pharmacovigilance and Risk Assessment Committee Recommendation for Suspension of the Marketing Authorizations for 4 Linear Agents. *Invest Radiol*, 52(6): 317-323.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest*, 97(11): 2517-2524.

Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. (1999). Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc Res*, 58(3): 312-328.

Silbergeld DL, Chicoine MR (1997) Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. *J Neurosurg*, 86(3): 525-531.

Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*, 87(1): 10-20.

Somjen GG. *Ions in the Brain*. Oxford Univ Press, Oxford, 2004.

Spetzger U, Thron A, Gilsbach JM. (1998) Immediate postoperative CT contrast enhancement following surgery of cerebral tumoral lesions. *J Comput Assist Tomogr*, 22(1): 120-125.

Spiller M, Tenner MS, Couldwell WT. (2001) Effect of absorbable topical hemostatic agents on the relaxation time of blood: an in vitro study with implication for postoperative magnetic resonance imaging. *J Neurosurg*, 95(4): 687-693.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia, *J Cell Biol*, 103(3): 755-756

Stewart PA, Wiley MJ. (1981) Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail chick transplantation chimeras. *Dev Biol*, 84(1): 183-192.

Sun C, Veiseh O, Gunn J, Fang C, Hansen S, Lee D, Sze R, Ellenbogen RG, Olson J, Zhang M. (2008) In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobe. *Small*, 4(3): 372-379

Tao-Cheng JH1, Nagy Z, Brightman MW. (1987) Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci*, 7(10): 3293-3299.

Taylor AM1, Panting JR, Keegan J, Gatehouse PD, Amin D, Jhooti P, Yang GZ, McGill S, Burman ED, Francis JM, Firmin DN, Pennell DJ. (1999) Safety and preliminary findings with the intravascular contrast agent NC100150 injection for MR coronary angiography. *J Magn Reson Imaging*, 9(2): 220-227.

Toth GB, Varallyay CG, Horvath A, Bashir MR, Choyke PL, Daldrup-Link HE, Dosa E, Finn JP, Gahramanov S, Harisinghani M, Macdougall I, Neuwelt A, Vasanaawala SS, Ambady P, Barajas R, Cetas JS, Ciporen J, DeLoughery TJ, Doolittle ND, Fu R, Grinstead J, Guimaraes AR, Hamilton BE, Li X, McConnell HL, Muldoon LL, Nesbit G, Netto JP, Petterson D, Rooney WD, Schwartz D, Szidonya L, Neuwelt EA. (2017) Current and potential imaging applications of ferumoxytol for magnetic resonance imaging. *Kidney Int*, 92(1):47-66.

Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. (1999) Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*, 19; 283(5405): 1176-1180.

US Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA strengthens warnings and changes prescribing instructions to decrease the risk of serious allergic reactions with anemia drug Feraheme (ferumoxytol). 2015.

van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. (2015) Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist Updat*, 19: 1-12.

Varallyay CG, Nesbit E, Fu R, Gahramanov S, Moloney B, Earl E, Muldoon LL, Li X, Rooney WD, Neuwelt EA. (2013) High-resolution steady-state cerebral blood volume maps in patients with central nervous system neoplasms using ferumoxytol, a superparamagnetic iron oxide nanoparticle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(5): 780-786.

Varallyay CG, Nesbit E, Horvath A, Várallyay P, Fu R, Gahramanov S, Muldon LL, Li X, Rooney WD, Neuwelt EA. Cerebral Blood Volume Mapping With Ferumoxytol in Dynamic Susceptibility Contrast Perfusion MRI: Comparison to Standard of Care. (2018) *J Magn Reson Imaging*, 48(2): 441-448.

Varallyay CG, Toth GB, Fu R, Netto JP, Firkins J, Ambady P, Neuwelt EA. (2017) What does the boxed warning tell us? Safe practice of using ferumoxytol as an MRI contrast agent. *AJNR Am J Neuroradiol*, 38(7): 1297-1302.

Varallyay CG, Muldoon LL, Gahramanov S, Wu YJ, Goodman JA, Li X, Pike MM, Neuwelt EA. (2009) Dynamic MRI using iron oxide nanoparticles to assess early vascular effects of antiangiogenic versus corticosteroid treatment in a glioma model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(4): 853-60.

Várallyay P, Nesbit G, Muldoon LL, Nixon RR, Delashaw J, Cohen JI, Petrillo A, Rink D, Neuwelt EA. (2002) Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide

particles ferumoxides and ferumoxtran-10 with a gadolinium chelate in imaging intracranial tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*, 23(4): 510-519.

Varallyay P, Varallyay CG, Horvath A, Szidonya L, Fu R, Toth G, Neuwelt EA. (2017) Visualisation of normal and abnormal brain vasculature with different ferumoxytol doses. *ASCO Annual Meeting, Chicago, USA, J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr e13517)

Vasanawala SS, Nguyen KL, Hope MD, Bridges MD, Hope TA, Reeder SB, Bashir MR. (2016) Safety and technique of ferumoxytol administration for MRI. *Magn Reson Med*, 75(5): 2107-2111.

Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney WD, Muldoon LL, Neuwelt EA. (2010) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(1): 15-35.

Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A Jr. (1997) Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging*, 7(1): 258-263.

Weissleder R, Hahn PF, Stark DD, Elizondo G, Saini S, Todd LE, Wittenberg J, Ferrucci JT. (1998) Superparamagnetic iron oxide: enhanced detection of focal splenic tumors with MR imaging. *Radiology*, 169(2): 399-403.

Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, 335(1): 75-96.

Wu YJ, Muldoon LL, Varallyay C, Markwardt S, Jones RE, Neuwelt EA (2007) In vivo leukocyte labeling with intravenous ferumoxides/protamine sulfate complex and in vitro characterization for cellular magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(5): C1698-1708

Yemisci M, GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, CAN A, TOPALKARA K, DALKARA T. (2009) Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med*, 15(9): 1031-1037.

Zaharchuk G. (2007) Theoretical basis of hemodynamic MR imaging techniques to measure cerebral blood volume, cerebral blood flow, and permeability. *AJNR Am J Neuroradiol*, 28(10): 1850-1858.

Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, Swaan PW. (2002) Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metab. Rev*, 34(4): 709-750.

Zhou Z, Lu ZR. (2013) Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 5(1): 1-18.

Zimmer C, Weissleder R, Poss K, Bogdanova A, Wright SC Jr, Enochs WS. (1995) MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas. *Radiology*, 197(2): 533-538.

Zlokovic BV. (2008) The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2): 178-201.

Zlokovic, B.V., Skundric, D.S., Segal, M.B., Lipovac, M.N., Mackic, J.B., Davson, H. (1990) A saturable mechanism for transport of immunoglobulin G across the blood–brain barrier of the guinea pig. *Exp Neurol*, 107(3): 263-270.

12. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Várallyay P**, Nesbit G, Muldoon LL, Nixon RR, Delashaw J, Cohen JI, Petrillo A, Rink D, Neuwelt EA. (2002) Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide particles ferumoxides and ferumoxtran-10 with a gadolinium chelate in imaging intracranial tumors. *AJNR Am J Neuroradiol*, 23(4): 510-519.
IF: 2.463
 2. Neuwelt EA, **Várallyay P**, Bago AG, Muldoon LL, Nesbit G, Nixon R. (2004) Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(5): 456-471.
IF: 3.402
 3. Muldoon LL, **Várallyay P**, Kraemer DF, Kiwic G, Pinkston K, Walker-Rosenfeld SL, Neuwelt EA. (2004) Trafficking of superparamagnetic iron oxide particles (Combidex) from brain to lymph nodes in the rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30(1):70-79.
IF: 3.402
 4. Horváth A, Varallyay CG, Schwartz D, Toth GB, Netto JP, Barajas R, **Várallyay P**, Szidonya L, Firkins J, Youngers E, Fu R, Ambady P, Bogner P, Neuwelt EA. (2018) Quantitative comparison of delayed ferumoxytol T1 enhancement with immediate gadoteridol enhancement in high grade gliomas. *Magn Reson Med*, 80(1):224-230.
IF: 4.082
 5. Varallyay CG, Nesbit E, Horvath A, **Várallyay P**, Fu R, Gahramanov S, Muldon LL, Li X, Rooney WD, Neuwelt EA. (2018) Cerebral Blood Volume Mapping With Ferumoxytol in Dynamic Susceptibility Contrast Perfusion MRI: Comparison to Standard of Care. *J Magn Reson Imaging*, 48(2):441-448
IF: 3.612
- Idézhető nemzetközi absztrakt
6. **Várallyay P**, Varallyay CG, Horvath A, Szidonya L, Fu R, Toth G, Neuwelt EA. (2017) Visualisation of normal and abnormal brain vasculature with different ferumoxytol doses. 53rd Annual Meeting of the American-Society-of Clinical Oncology ASCO, J Clin Oncol 35: (S15) (abstr e13517)

13. A DISSZERTÁCIÓ TÉMAKÖRÉN KÍVÜLI KÖZLEMÉNYEK

1. Berényi Ervin, Kövér Ferenc, **Várallyay Péter**, Szikora István. (2017) Az optimális betegkiválasztást támogató képalkotó diagnosztika alapelvei akut ischaemiás stroke-ban. *Magyar Radiológia*, 91(2): 79-90.
2. Téglási V, Reiniger L, Fábíán K, Pipek O, Csala I, Bagó AG, **Várallyay P**, Vízkeleti L, Rojkó L, Tímár J, Döme B, Szállási Z, Swanton C, Moldvay J. (2017) Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. *Neuro Oncol*, 19(8): 1058-1067.
IF: 9.384
3. Fábíán K, Gyulai M, Furák J, **Várallyay P**, Jäckel M, Bogos K, Döme B, Pápay J, Tímár J, Szállási Z, Moldvay J. (2016) Significance of Primary Tumor Location and Histology for Brain Metastasis Development and Peritumoral Brain Edema in Lung Cancer. *Oncology*, 91(5): 237-242. IF: 2.262
4. **Várallyay P**. (2014) Újdonságok és új lehetőségek az agydaganatok radiológiai diagnosztikájában. Novelties and new possibilities in radiological diagnostics of brain tumors. *Magy Onkol*, 58(4): 261-268.
5. Szűcs Anna, Barcs Gábor, Winkler Gábor, Soós Zsuzsanna, Folyovich András, Kelemen Anna, **Várallyay Péter**, Kamondi Anita. (2014) Anti-glutamate-decarboxilase antibodies: A liaison between localisation related epilepsy, stiff-person-syndrome and type-1 diabetes mellitus. *Ideggyogy Sz*, 67(7-8): 269-271.
IF: 0.386
6. Bagó GA, Osztie E, **Várallyay P**, Fedorcsák I. (2013) Tumort utánzó barrierzavarok a neuroonkológiai terápia során. Treatment-induced tumor-like lesions in the course of neurooncological therapy. *Magy Onkol*, 57(4): 240-250.
7. Szucs A, **Várallyay P**, Osztie E, Papp E, Sólyom A, Finta L, Varga D, Barcs G, Holló A, Kamondi A. (2012) Clinical experiences with Creutzfeldt-Jakob disease: three case studies. *Ideggyogy Sz*, 65(11-12): 401-410. IF: 0.348
8. **Várallyay Péter**. (2011) Az agydaganatok – Onco update, 2010. *Magyar Radiológia*, 85(1-2): 8-24.
9. **Várallyay Peter**. Az agydaganatok képalkotó diagnosztikája. In: Bodoki Gy (szerk.), *Onco Update 2009. Melania Kiadó Kft, Budapest 2009: 142-169.*

10. Neuwelt EA, Guastadisegni PE, **Várallyay P**, Doolittle ND. (2005) Imaging changes and cognitive outcome in primary CNS lymphoma after enhanced chemotherapy delivery. *AJNR Am J Neuroradiol*, 26(2): 258-265. IF: 2.525
11. Osztie É, **Várallyay P**, Doolittle ND, Lacy C, Jones G, Nickolson HS, Neuwelt EA. (2001) Combined Intraarterial Carboplatin, Intraarterial Etoposide Phosphate, and IV Cytosin Chemotherapy for Progressive Optic-Hypothalamic Gliomas in Young Children. *AJNR Am J Neuroradiol*, 22(5): 818-823. IF: 2.240
12. Kiss Zs, **Várallyay P**, Fazekas P, Kajári É. (1998) High resolution CT signs of pulmonary Histiocytosis-X. *Magyar Radiológia*, 72(4):99-102.

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Tisztelettel köszönöm Nagy Zoltán professzor úrnak, hogy elvállalta a témavezetői feladatokat. Munkám során végig támogatott, bármikor biztosított konzultációs lehetőséget, valamint óriási tapasztalatával és nélkülözhetetlen tanácsaival segített a disszertáció megírásában.

Köszönettel és hálával tartozom Edward A. Neuwelt professzornak, az Oregon Health and Sciences University (Portland, USA) Blood–Brain Barrier programja vezetőjének, akinek az irányítása alatt – neuroradiológiai onkológus fellow-ként – a kutatásaimat és klinikai munkámat végezhettem. Rendkívüli nagylelkűséggel segített nekem és családomnak amerikai tanulmányaim alatt, valamint lehetővé tette, hogy évekkel később ismét bekapcsolódhassak a kutatásokba. Az oregoni egyetemen a Blood–Brain-Barrier programban résztvevő munkatársak közül külön köszönöm a hisztológiai konzultációs lehetőségeket Leslie L. Muldoonnak és Randal R. Nixonnak, akik a szövettani metszeteket elemezték. Nancy Doolittle, Paul Guastadisegni és Bagó Attila segítőkészségére is mindig számíthattam. A jelenlegi csapatból Horváth Andrea, Várallyay Csanád, Daniel Schwarz és Rochelle Fu segítsége volt nélkülözhetetlen a képek postprocessálásában és a statisztikai számításokban. A neuroradiológiai részlegből Gary Nesbit osztályvezető főorvosnak, akinek irányítása alatt mint neuroradiológus fellow is dolgozhattam, és munkatársainak tartozom hálával. Bármikor fordultam hozzájuk kérdéseimmel, mindig szívesen és kedvesen segítettek. Sokat tanultam Paul Wang-tól a portlandi neuroradiológiai osztály MR kutató vezetőjétől.

Hálásan köszönöm Szikora István tanár úrnak a segítséget az amerikai tanulmányúthoz szükséges ügyek intézésében, valamint Nyáry István professzor úrnak, az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet volt főigazgatójának és Martos János osztályvezető főorvos úrnak, hogy engedélyezték és lehetővé tették a külföldi tanulmányutamat.

Szeretettel mondok köszönetet Karlinger Kinga professzor asszonynak, hogy kedves nőgátásaival és tanácsaival sarkallt a disszertáció megírására.

Köszönettel tartozom az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet Radiológiai Osztályán dolgozó munkatársaimnak is, hogy kitarítottak távollétem ideje alatt.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm feleségemnek és négy „csemetémnek”, hogy az idő- és energiaigényes munka során szeretettel és türelemmel támogattak.