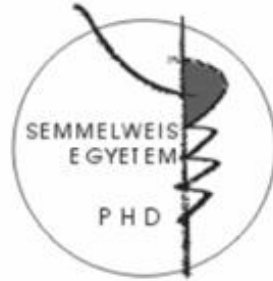


Vas-oxid tartalmú MR-kontrasztanyagok a központi idegrendszer képalkotó diagnosztikájában:  
MR-perfúziós vizsgálat ferumoxytollal agytumороk és kezelésük nyomon követésére

Doktori tézisek magyar nyelven

**Dr. Várallyay Csanád**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Hüttl Kálmán egyetemi tanár, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kovács Tibor egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Martos János osztályvezető főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fidy Judit egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szirmai Imre egyetemi tanár, az MTA doktora  
Dr. Barsi Péter egyetemi docens, Ph.D.

Budapest  
2012

### ***Rövidítések:***

BEV: bevacizumab (45mg/kg) kezelt állatcsoport  
CNS: központi idegrendszer  
CTR: kontroll csoport  
DEX 12: dexamethasone (12mg/kg/nap) kezelt állatcsoport  
DEX 2: dexamethasone (2mg/kg/nap) kezelt állatcsoport  
DSC: dynamic susceptibility contrast  
GBCA: gadolínium alapú kontrasztanyag  
GBM: glioblastoma  
IF: impact factor  
MR(I): mágneses rezonanciás (képalkotás)  
MRA: MR-angiográfia  
PWI: perfúzió súlyozott képalkotás  
rCBV: relative cerebral blood volume  
rMTT: relative mean transit time  
ROI: region of interest  
T: tesla  
T1w: T1-súlyozott  
TOF: time of flight  
TTP: time to peak  
USPIO: ultrasmall superparamagnetic iron oxide  
VEGF: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

# 1 BEVEZETÉS

Magas malignitású gliómák, úgy mint glioblastoma (GBM), anaplasztikus astrocytoma és anaplasztikus oligodendroglioma kezelése általában kombinált sugárkezeléssel és temozolomide kemoterápiával kezdődik, majd adjuváns temozolomide adással folytatódik. Ezen túl, progresszió esetén, másodvonalbeli kezelésként adhatók angiogenezisgátló szerek. Ezek egy gyakran alkalmazott képviselője a bevacizumab (Avastin®), egy monoklonális antitest, amely a vaszkuláris endotheliális növekedési faktort (VEGF) gátolja. A terápiás válasz radiológiai értékelése általában a MacDonald kritériumrendszerrel történik, amely kontrasztanyag-halmozáson alapul, T1-súlyozott (T1w) mágneses rezonancia (MR) képeken. A tumor magas permeabilitású ereinek normalizálása bevacizumab-kezelés után csökkent kontrasztanyag-halmozást eredményez, amely csökkent tumorvolumenként értelmezhető. A látszólag kedvező terápiás válasz ellenére tumorprogresszió előfordul kontrasztanyag-halmozás nélkül, infiltratíván növekvő tumorként bevacizumabbal kezelt betegeknél. Ez a bevacizumab-indukálta pszeudoregresszió kihívást jelent a neuroradiológiában. Hasonlóképpen, a sugárkezelés következtében kialakuló tranziens érpermeabilitás-növekedés a kontraszthalmozás emelkedéséhez vezethet anélkül, hogy a mögöttes tumorvolumen növekedne, ezt pszeudoprogesszióknak nevezzük. Mindkét pseudo-jelenség problémát jelent a klinikai gyakorlatban, így ezek leküzdésére alternatív radiológiai módszerek valamint kritériumrendszer kidolgozására van szükség.

Doktori értekezésem egy vasoxid tartalmú szuperparamágneses (USPIO) MR-kontrasztanyaggal, a ferumoxytollal foglalkozik, valamint ennek alkalmazhatóságával magas malignitású primer rosszindulatú agydaganatok képalkotó diagnosztikájában. Kutatásaink végső célja az agydaganatok diagnosztikájának előmozdítása, beleértve a nagyobb specificitású és szenzitivitású módszerek kidolgozását, valamint a korai terápiás válaszok valós megítélését. Ez segítséget jelenthetne az optimális terápia megválasztásában. A morfológiai képalkotás mellett, a kutatás dinamikus MR-módszerek lehetőségeit vizsgálja, különösen a „dynamic susceptibility contrast” (DSC) perfúzió súlyozott képalkotást (PWI). Ebben ferumoxytol alkalmazása előnyös lehet annak két fontos tulajdonsága miatt: az érpályában marad (blood pool) röviddel intravénás beadás után, valamint erős T2\*-csökkentő hatású.

Az értekezés egy klinikai és egy preklinikai tanulmány eredményeiről számol be. Minthogy a klinikai rész kronológiailag is előbb zajlott, valamint elsősorban a morfológiai képalkotásra összpontosít, ezzel szemben az állatkísérletes vizsgálatok annál újabb, dinamikus MR-technikákat alkalmaznak, ezért a klinikai rész kerül először tárgyalásra.

## **2 CÉLKITŰZÉSEK**

### ***2.1 Klinikai Vizsgálatok***

Ferumoxytol ebben a vizsgálat-sorozatban került elsőként klinikai felhasználásra a központi idegrendszeri MR-képzéskészítésben. A kutatás ezen részének célja a ferumoxytol lehetőségeinek felderítése agytumorban szenvedő betegek esetében.

1. A kontraszthalmozás időbeni változásának meghatározása, valamint a standard gadolínium-tartalmú kontrasztanyaggal való összehasonlítása T1-súlyozott képeken.
2. Ferumoxytol jelentőségének felmérése egyéb MR-szekvenciákban, beleértve a time of flight (TOF) MR-angiográfiát (MRA), valamint a DSC perfúziós mérést.
3. A ferumoxytol-halmozás mágnesestérő-függésének meghatározása.

### ***2.2 Állatkísérletes vizsgálatok***

4. Egy olyan kísérleti protokoll kidolgozása, mely patkány intrakraniális tumor modellben lehetővé teszi a dinamikus MR-képzéskészítést 12T térerőn standardizált kontrasztanyag bőlussal.
5. Ferumoxytol és gadolínium kontrasztanyagok összehasonlítása DSC perfúziós mérésekben.
6. Az antiangiogén szer, bevacizumab-terápiára kialakuló korai változások kimutatása kettős kontrasztanyag módszerrel, ferumoxytol-perfúzió és gadodiamide érpermeabilitás meghatározásával.

## **3 MÓDSZEREK**

### ***3.1 Klinikai vizsgálatok***

Tizenkettő, malignus agydaganatban szenvedő beteg vett részt a tanulmányban. A betegek sorozatos MR-vizsgálaton vettek részt a ferumoxytol-beadáást követő 72 órán belül 1,5 és 3T térerejű mágnesekben egyaránt. Ennek a hosszú plazmafelezési idejű (14-21 óra) kontrasztanyag halmozásának időbeli lefolyását értékeltük minkét mágneses térerőn. A ferumoxytol-halmozás a kiindulási gadolíniumos kontraszthalmozással is összehasonlításra került. PWI, TOF MRA és kvantitatív T1-mérések is elvégzésre kerültek mind ferumoxytol, mind gadodiamide kontrasztanyagokkal. Region of interest (ROI) alapú analízist végeztünk a relatív cerebral blood volume (rCBV), relatív mean transit time (rMTT) és kvantitatív T1-mérés eredményeinek összehasonlítására a gadolínium-halmozó valamint annak környezetében lévő területeken.

### ***3.2 Preklinikai vizsgálatok***

Csökkent immunrendszerű, tímuszmentes patkányokba intracerebrálisan implantált U87 humán glióma xenograftot alkalmaztunk dinamikus MRI értékeléséhez 12T térerőn. Először (n=2) összehasonlítottuk a gadodiamide-dal, majd egy nappal később ferumoxytollal végzett DSC-perfúziós méréseket. A tumor ROI-ban az idő-intenzitás görbéket elemeztük, valamint az rCBV-t meghatároztuk mindkét vizsgált kontrasztanyag esetében. A tanulmány második és egyben fő részében dinamikus MR-mérésekkel értékeltük a korai vaszkuláris válaszokat angiogenezisgátló szerek, valamint kortikoszteroidok adását

követően a fent említett tumormodellben. 17 patkányban végeztünk DSC MR-perfúziós mérést ferumoxytollal, majd ezután T1-súlyozott DCE MRI segítségével gadodiamide-dal az érpermeabilitás megítélése céljából. A kezelést követő 24, 48 és 72 óra elteltével megismételtük a kezdeti dinamikus méréseket. A kezelési csoportok a következők voltak: BEV: bevacizumab (45mg/kg egyszeri intravénás dózis) n=5; DEX-2: dexamethason (2mg/kg naponta) n=4, DEX-12: dexamethason (12mg/kg naponta) n=5, és a CTR: kontroll n=3. A rCBV értékeket tumorban ROI alapon ítéltük meg. DCE mérésekben az érpermeabilitást a maximális halmozás intenzitásig (time to peak, TTP) eltelt idővel jellemeztük. Az rCBV és TTP változásokat statisztikailag elemeztük repeated measurement of two-way ANOVA módszerrel és Tukey post hoc statisztikai teszttel.  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak.

## 4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1 Klinikai vizsgálatok

Ferumoxytol-halmozás kimutatható volt minden vizsgált beteg esetében 1,5 és 3T mágneses térerőkön, valamint 0,15T térerejű intraoperatív szkennerekben is azon betegeknél, akiknél tumorrezekcióra is sor került. A ferumoxytol-halmozás maximális intenzitása 24-28 órával a beadás után volt észlelhető. A halmozó térfogat az eltelt idővel arányosan növekedett a környező, T2-hiperintenzív régióban. 1,5T térerőn a halmozás jelintenzitása magasabbnak bizonyult, mint 3T térerőn. A legtöbb esetben a ferumoxytol-halmozás kevésbé volt jelintenzív, mint gadolínium-tartalmú kontrasztanyag esetében, de azzal többnyire megfelelő halmozási mintázat volt látható. Halmozásbeli különbségek a kissé eltérő extravazációval magyarázhatók, valamint ferumoxytol esetében a szöveti akkumulációban a gyulladásozó sejtek általi fagocitózis is közrejátszhat. DSC-vizsgálatokra is alkalmas volt mindkét kontrasztanyag. Olyan daganatoknál azonban, melyekben a vaszkuláris permeabilitás magas volt, a korai vaszkuláris szivárgás a kis molekulású gadodiamide-nál túlbecsülte az rCBV-t. Ez csak gadolínium esetében volt így, ferumoxytolnál nem. Ez a jelenség az idő-intenzitás görbén is egyértelműen megmutatkozott. Ennek ellenére nem volt szignifikáns különbség az rCBV vagy rMTT értékeknél gadolínium és ferumoxytol között, a teljes vizsgált populációt tekintve. TOF MRA mérésnél több ér ábrázolódot kontrasztanyaggal, mint anélkül, ferumoxytollal végezve nem volt látható extravazáció. A kvantitatív T1 értékek a gadolínium-halmozó területen nem mutattak jelentős változást röviddel ferumoxytol-adást



követően. Ezen eredmények megerősítették, hogy a ferumoxytol intravaszkulárisan marad a beadást követő korai szakaszban, amely alkalmassá teheti mikro- és makrovaszkuláris képalkotásra.

#### ***4.2 Preklinikai vizsgálatok***

Az U87 tumor-modell megfelelő intrakraniális modellnek bizonyult DSC MR-perfúzió tesztelésére. A gyors kontrasztanyag-extravázáció gadodiamide-beadás után ebben a modellben lényegesen alulértékelt az rCBV-t az erős T1-hatás miatt. Ez ferumoxytollal nem volt tapasztalható. A kettős kontrasztanyagos képalkotás is sikeresen alkalmazható volt. Az először beadott ferumoxytol nem befolyásolta jelentősen a gadodiamide-dal végzett permeabilitásmérést, egyedül „arterial input function” nem volt meghatározható a nagy koncentrációjú intravaszkuláris vas-oxid részecskék miatt. Ferumoxytol bólussal az rCBV-t mértük, majd az ezt követő gadodiamide bólus lehetőséget nyújtott a halmozás dinamikájának elemzésére, ezáltal az érpermeabilitás meghatározására, mint maximális halmozásig eltelt idő (TTP).

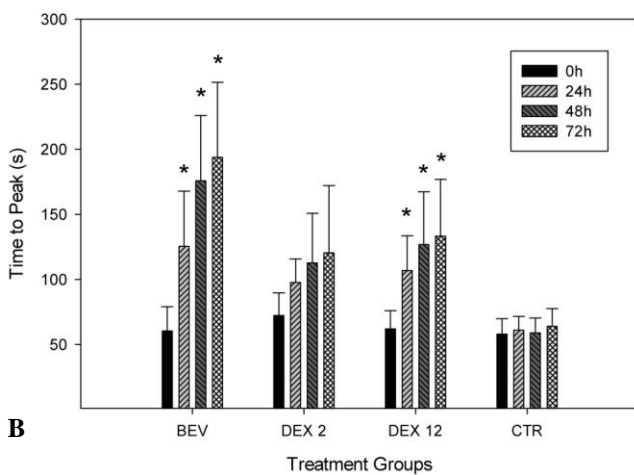
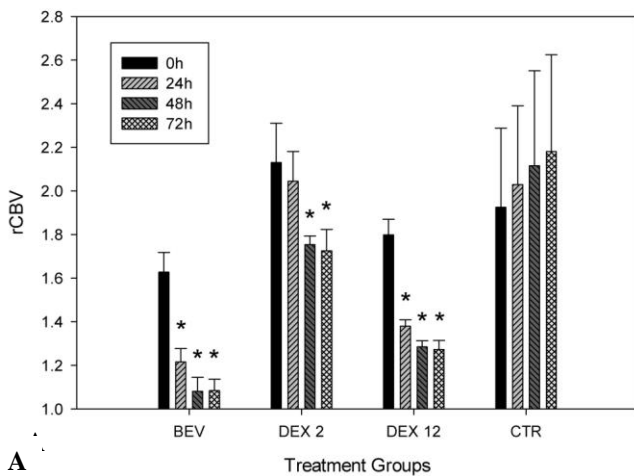
A korai terápiás válasz értékelésében mind az rCBV, mind a TTP szignifikáns változásokat mutatott. (1. ábra): A BEV csoportban, a kezdeti rCBV ( $1,628 \pm 0,091$ ) (átlag  $\pm$  standard hiba), lecsökkent mind a 24, 48 és 72 órás időpontokban  $1,214 \pm 0,061$ ,  $1,082 \pm 0,064$  és  $1,084 \pm 0,052$  értékekre. (ábra 1A). A DEX 2 csoportban is a kezdeti rCBV ( $2,130 \pm 0,180$ ) szignifikáns csökkenése volt észlelhető a 48 és 72 órás időpontokban ( $1,755 \pm 0,040$  és  $1,725 \pm 0,098$ ). A DEX 12 csoportban, a kezdeti  $1,800 \pm 0,072$  rCBV érték jelentősen csökkent minden időpontban, az  $1,380 \pm 0,029$ , (24 óra),  $1,286 \pm 0,028$  (48 óra)

és  $1,272\pm 0,041$  (72 óra) értékekre. A CTR csoportban, nem volt jelentős változás a kezdeti  $1,927\pm 0,363$  rCBV értékhez képest.

A kezelési csoportok összehasonlításában a normalizált relatív rCBV a BEV és DEX 12 csoportban szignifikánsan lecsökkent a CTR és DEX 2 csoportokhoz képest mindhárom kezelés utáni időpontban. A BEV és DEX 12 csoportok között nem jelentkezett szignifikáns különbség. A DEX 2 csoport a 48 és 72 órás időpontokban mutatott szignifikáns eltérést a CTR csoporthoz képest.

Az érpermeabilitásban talált változások a következők voltak (1b ábra): A BEV csoportban, a kezdeti TTP  $60\pm 19$ s szignifikánsan megnyúlt mind a 24, 48 és 72 óra kezelés utáni időpontban  $125\pm 42$ s,  $176\pm 50$ s, és  $194\pm 58$ s értékekre. Hasonlóképpen, a DEX 12 csoportban, a kiindulási  $62\pm 14$ s maximális halmozási eltelt idő megnövekedett  $107\pm 27$ s,  $127\pm 41$ s, és  $133\pm 44$ s értékekre. A TTP kiindulási értéke a DEX 2 ( $72\pm 17$ s) és CTR ( $58\pm 12$ s) csoportokban nem változott szignifikánsan a vizsgálat során.

A TTP kezdeti értékekhez való normalizálása után a 24 órás időpontban nem volt szignifikáns eltérés az egyes kezelési csoportok között. A kezelés utáni 48 órás időpontban a BEV csoportban szignifikáns növekedés ( $3,023\pm 0,58$ ) volt tapasztalható a CTR ( $1,071\pm 0,05$ ), valamint a DEX 2 ( $1,517\pm 0,25$ ) csoportokhoz képest, de a DEX 12 ( $1,907\pm 0,16$ ,  $p = 0,051$ ) csoporthoz képest nem volt szignifikáns. A 72 órás kezelés utáni időpontban, a normalizált TTP a BEV csoportban  $3,313\pm 0,59$  szignifikánsan magasabb volt, mint a másik három csoportban (CTR:  $1,110\pm 0,06$ , DEX 2:  $1,581\pm 0,37$ , és a DEX 12:  $2,064\pm 0,34$ ). További szignifikáns különbség a csoportok között nem volt kimutatható.



1. ábra: Az rCBV (A) és a TTP (B) korai változásai kezelés után.

\* szignifikáns változás a kezdeti értékhez képest ( $p < 0,05$ )

## 5 KÖVETKEZTETÉSEK

A ferumoxytol, intravénás bólusban is adható USPIO kontrasztanyag kiegészítő információkkal szolgálhat agydaganatok MR-diagnosztikájában, valamint utánkövetésében. A DSC-perfúziós mérés a jövőben nagy jelentőségűvé válhat angiogenezis-gátló terápia monitorozására. A ferumoxytol különösen ígéretes, az Egyesült Államok Food and Drug Administration (FDA) által elfogadott, és a központi idegrendszer különféle megbetegedéseinek vizsgálatára használható. Kettős kontrasztanyag dinamikusan MR-vizsgálatra is alkalmazható gadolínium-tartalmú kontrasztanyaggal kombinációban, így ferumoxytollal a rCBV, majd gadolíniumos kontrasztanyaggal az érpermeabilitás is mérhető egyetlen MR-vizsgálat alkalmával. MR-képképzéssel bevacizumab, érújdonképződés-gátló szer korai vaszkuláris hatásait keresve 24 órával bevacizumab injekció után már jelentős rCBV és érpermeabilitás-csökkenés volt észlelhető, hasonlóan, de még kifejezettebben, mint nagy dózisú kortikoszteroid adása esetén. Jelen kutatásunk előrelépést jelent a tumorterápia utánkövetésében dinamikusan MR-vizsgálati szekvenciák alkalmazásánál, melyek kiegészítésül szolgálhatnak a ma neuroradiológiában használatos, leginkább kontrasztthalmazáson alapuló kritériumrendszerhez. Eredményeink segíthetik a jövőben a pseudoresponse és pseudoprogression fontos diagnosztikus problémák megoldását, amely kutatásaink legfőbb távlati célja.

## **6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK**

### ***6.1 Klinikai vizsgálatok***

1. Ferumoxytol alkalmazható mint MR-kontrasztanyag intrakraniális tumoroknál. A kontrasztanyag-halmozás 24 órával az intravénás beadás után a legjelintenzívebb, általában kevésbé jelintenzív, mint a gadolínium-tartalmú kontrasztanyaggal megjeleníthető T1 halmozás.
2. A ferumoxytol beadás után néhány perccel még intravaszkulárisan helyezkedik el, ezért eredményesen használható az erek megjelenítésére a TOF szekvencián, valamint alkalmas DSC-perfúziós mérésre.
3. A gadolíniumos kontrasztanyagokkal ellentétben a ferumoxytol halmozása az alacsonyabb mágneses térerőn jelintenzívebb.

### ***6.2 Preklinikai vizsgálatok***

4. Ferumoxytol és a gadolínium-tartalmú kontrasztanyagok egy ülésben is alkalmazhatók, mely révén a perfúziós és az érpermeabilitás mérések egyszerre, azonban egymástól függetlenül mérhetők.
5. A U87 tumor-modell érpermeabilitása jelentős mértékű gadolínium-tartalmú kontrasztanyagoknál, ferumoxytolnál viszont nem, így ez utóbbival mérve az rCBV értékek precízebbek.
6. Bevacizumab angiogenezis-gátló terápia a nagy dóziszú szteroidkezeléshez hasonlóan mind az rCBV-t, mind pedig az érpermeabilitást gyorsan csökkenti.

## 7 A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

1. Neuwelt EA, Varallyay CG, Manninger S, Solymosi D, Haluska M, Hunt MA, Nesbit G, Stevens A, Jerosch-Herold M, Jacobs PM, Hoffman JM. The potential of ferumoxytol nanoparticle magnetic resonance imaging, perfusion, and angiography in central nervous system malignancy: a pilot study. *Neurosurgery* **60**:(4) pp. 601-611. (2007) IF: 3.007
2. Varallyay CG, Muldoon LL, Gahramanov S, Wu YJ, Goodman JA, Li X, Pike MM, Neuwelt EA. 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) pp. 853-860. (2009) IF: 5.457
3. Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney WD, Muldoon LL, Neuwelt EA. 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) pp. 15-35. (2010) IF: 4.522
4. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM, Watnick SG. 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) pp. 465-474. (2009) IF: 6.193
5. Gahramanov S, Raslan AM, Muldoon LL, Hamilton BE, Rooney WD, Varallyay CG, Njus JM, Haluska M, Neuwelt EA. Potential for differentiation of pseudoprogression from true tumor progression with dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging using ferumoxytol vs. gadoteridol: a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **79**:(2) pp. 514-523. (2011) IF: 4.503\*

## 8 További tudományos publikációk

1. Doolittle ND, Jahnke K, Belanger R, Ryan DA, Nance RW Jr, Lacy CA, Tyson RM, Haluska M, Hedrick NA, Varallyay C, Neuwelt EA. Potential of chemo-immunotherapy and radioimmunotherapy in relapsed primary central nervous system (CNS) lymphoma. *Leuk Lymphoma* **48**:(9) pp. 1712-1720. (2007) IF: 1.512
2. Várallyay Cs, Balázs Gy, Lénárd Zs, Bérczi V, Belics Z, Bajzik G, Wragg P, Hüttl, Kálmán, Jolesz, Ferenc A. MR imaging follow up after MR-guided focused ultrasound surgery for uterine leiomyomas.: Early and mid term results. *Interventional Medicine & Applied Science* **1**:(1) pp. 46-51. (2009)
3. Berczi V, Molnar AA, Apor A, Kovacs V, Ruzics C, Varallyay C, Huttl K, Monos E, Nadasy GL. Non-invasive assessment of human large vein diameter, capacity, distensibility and ellipticity in situ: dependence on anatomical location, age, body position and pressure. *Eur J Appl Physiol* **95**:(4) pp. 283-289. (2005) IF: 1.619
4. Li X, Rooney WD, Varallyay CG, Gahramanov S, Muldoon LL, Goodman JA, Tagge IJ, Selzer AH, Pike MM, Neuwelt EA, Springer CS Jr. Dynamic-contrast-enhanced-MRI with extravasating contrast reagent: rat cerebral glioma blood volume determination. *J Magn Reson* **206**:(2) pp. 190-199. (2010) IF: 2.333
5. Wu YJ, Muldoon LL, Varallyay C, Markwardt S, Jones RE, Neuwelt EA. 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) pp. C1698-C1708. (2007) IF: 4.230

6. Jahnke K, Muldoon LL, Varallyay CG, Lewin SJ, Brown RD, Kraemer DF, Soussain C, Neuwelt EA. Efficacy and MRI of rituximab and methotrexate treatment in a nude rat model of CNS lymphoma. *Neuro Oncol* **11**:(5) pp. 503-513. (2009) IF: 4.984
7. Jahnke K, Muldoon LL, Varallyay CG, Lewin SJ, Kraemer DF, Neuwelt EA. Bevacizumab and carboplatin increase survival and asymptomatic tumor volume in a glioma model. *Neuro Oncol* **11**:(2) pp. 142-150. (2009) IF: 4.984
8. Wu YJ, Muldoon LL, Dickey DT, Lewin SJ, Varallyay CG, Neuwelt EA. Cyclophosphamide enhances human tumor growth in nude rat xenografted tumor models. *Neoplasia* **11**:(2) pp. 187-195. (2009) IF: 5.025
9. Soussain C, Muldoon LL, Varallyay C, Jahnke K, DePaula L, Neuwelt EA. Characterization and magnetic resonance imaging of a rat model of human B-cell central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res* **13**:(8) pp. 2504-2511. (2007) IF: 6.250