

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Kutyák cerebrospinalis folyadéktereinek anatómiai
viszonyai, térbeli modellezése és térfogatmérése**

PhD értekezés tézisei

Dr. Reinitz László Zoltán

2015

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Prof. Dr. Sótonyi Péter, DSc
tanszékvezető, egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövet-tani Tanszék
témavezető

.....

Prof. Dr. Halasy Katalin, DSc
egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Anatómiai és Szövet-tani Tanszék
témabizottság tagja

.....

Dr. Baska Ferenc, PhD
tanszékvezető, egyetemi docens
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Patológiai Tanszék
témabizottság tagja

1. BEVEZETÉS

Az agyat a koponyaüregben belül, valamint a gerincvelőt a gerinccsatornában több rétegből álló burokrendszer veszi körül, a burkok közötti üreget (subarachnoidealis tér; spatium subarachnoideale; SA tér) pedig az agygerincvelői folyadék (cerebrospinal fluid, CSF) tölti ki. A CSF nagyrészt az agykamrákban termelődik és - fajtól függő számú és helyeződésű -, jellemzően a nyúltagyvelő környékén található csatornákon át lép ki az agyvelő külső felületére, illetve innen áramlik tovább a gerinc és az agy köré. A visszaszívását különböző vénás plexusok végzik, így a CSF nyomására és keringésének jellemzőire az aktuális vénás nyomás közvetlen hatást gyakorol. Sűrűsége majdnem azonos a vízével, sejttartalma minimális, de jelentős mennyiségben tartalmaz cukrot, anyagcsere termékeket és különböző ionokat. Élettani jelentősége elsősorban a központi idegrendszer (Central Nervous System – CNS) fizikai behatásoktól való védelme, de részt vesz az idegsejtek táplálásában, a felesleges anyagcsere-termékek eltávolításában és az ingerületátvivő anyagok transzportjában is.

Klinikai jelentősége ennek megfelelően sokrétű. A CSF-ből vett minták elemzése nagy diagnosztikai jelentőségű, ahogy az SA térbe jutott kontraszt anyag

megoszlásának vizsgálata (myelographia, CT-myelographia) is. A CSF mennyiségének abnormális megnövekedését rengeteg tényező okozhatja, az így kialakult vízfejűség (hydrocephalus) és/vagy syringomyelia többnyire súlyos, maradandó károsodásokat okoz, terápiájukban a korai felismerés kulcsfontosságú. A myelographia a humán gyógyászatban háttérbe szorult a mágneses rezonancia vizsgálatán alapuló képalkotó eljárás (Magnetic Resonance Imaging, MRI) térhódításával, de az állatorvosi ellátás piacorientált szerkezetéből adódóan a házi kedvencek, elsősorban a kutyák esetében továbbra is széles körűen használják. Az eljárás során használt kontrasztanyag mennyiség adagolása vitatott, mert ugyan van kimutatható összefüggés az állatok testmérete és a myelographia mellékhatásaként esetenként jelentkező idegrendszeri tünetek között, de ennek háttere feltáratlan.

A hydrocephalus gyakori fejlődési rendellenesség, de sok esetben szerzett kórformaként, felnőtt korban is kialakul. Utóbbi esetekben sokszor sikerül a háttérben egy, a CSF szabad áramlását akadályozó képletet azonosítani, de a legtöbbször eredete meghatározatlan marad. Kutyákban történő diagnosztikáját nehezíti, hogy a kutya CSF mennyiségére, illetve annak megoszlására

vonatkozóan nincs semmilyen értékelhető irodalmi adat, és nincs a gyakorlati körülmények között, élő állaton, megfelelő megbízhatósággal használható mérési eljárás sem.

PhD kutatásom keretében így azt a célt tűztem ki, hogy kidolgozzunk egy, a klinikai körülmények között is alkalmazható, nagy pontosságú módszert a CSF térfogatának *in vivo* meghatározására és egészséges állatokon végzett csoportos vizsgálattal megállapítsuk a kutya CSF mennyiségére, eloszlására, testméretektől való függésére vonatkozó alapvető összefüggéseket. Kutatásom hosszú távon a SA térbe adandó gyógyszer vagy kontrasztanyag optimális mennyiségének meghatározását, valamint a hydrocephalus és más, hasonló kórformák diagnosztikájának megkönnyítését célozza. Kiemelt célkitűzéseink között szerepelt, hogy az anatómia oktatása során használható, jó minőségű fényképeket, számítógépes modelleket, animációkat, és preparátumokat készítsünk.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

Az irodalomkutatás eredményeképp a különböző *post mortem* méréseket teljes mértékben elvetettük és kizárólag az MRI technika *in vivo* alkalmazása mellett döntöttünk. Mivel ilyen jellegű átfogó mérésről nem találtunk hivatkozást, első lépésként a meglévő humán mérések tapasztalatait felhasználva a mérési protokollt kellett kidolgozunk.

Az MRI vizsgálatokat a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében (KE) hajtottuk végre, egy 1,5T mágneses térerejű, zárt MRI berendezésen (Siemens Magnetom Avanto (Siemens AG, Erlangen, Németország).

Az előtanulmányokhoz szükséges mérésekben két kutya vett részt, amelyek diagnosztikai célú vizsgálatokra érkeztek a KE-be, neurológiai tünetektől mentesek voltak, és tulajdonosaik írásban hozzájárultak a CSF kimutatását célzó szekvenciák lefuttatásához is az állatokon. A vizsgálathoz szükséges narkózist propofol iv. alkalmazásával indukáltuk, majd intubálást követően izoflurán-oxigén gáz eleggyel inhalációs anesztéziát alkalmaztunk. A narkózis beálltát követően lefuttattuk rajtuk a CSF kimutatásra kidolgozott alábbi szekvenciát a CNS teljes hosszában. Az MRI felvételek értékelése során

az egyik kutya extracranialis régiójában porckorongszérvet találtunk, így az EC területet érintő mérésekből kizártuk.

A másik kutyán a második nyakcsigolyával kezdődően a hatodik ágyékcsigolyáig minden második csigolyán lemértük a dura mater dorsalis és ventralis lemeze közötti távolságát (intradurális vastagság) és az adott szeleten a gerincvelő átmérőjét. Ez alapján elkészítettük a SA tér extracranialis (EC) szakaszának modelljét (fantomot). Ezt a fantomot ismert térfogatú vízzel feltöltöttük és ugyanakkor az MRI vizsgálatnak vetettük alá, mint korábban a kutyákat.

Az MRI adatok számítógépes feldolgozásához a 3D Slicer programot használtuk, amelyen előzőleg egy egér agyából származó immunhisztokémiai metszetsorozaton meghatároztuk a művelethez szükséges eszközöket. Ezekkel rekonstruáltuk a fantomban lévő folyadékteret és mértük meg a modell térfogatát.

Ezt követően 12, egészséges, 2-5 év közötti kan ivarú, gazdájuk által felajánlott keverék kutyán is elvégeztük az MRI vizsgálatot és a számítógépes rekonstrukción alapuló mérést. A kutatást a SzIE-ÁOTK Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága hagyta jóvá. Az állatok mindegyike magántulajdonban volt, a tulajdonos írásban hozzájárult a vizsgálatokban való részvételhez.

A fantomon végzett módszerrel megegyező módon a kapott MRI sorozatokon rekonstruáltuk az EC és az intracranialis (IC) SA teret valamint az agykamrákat. Megmértük ezek össztérfogatát valamint ezek anatómiai rekeszeinek térfogatát is.

Az „R” statisztikai szoftverrel lineáris regresszióval vizsgáltuk az állatok fizikai méretei (testtömeg, marmagasság, gerincvelő hossz) és a CSF térfogati értékek közötti összefüggéseket.

3. EREDMÉNYEK

Validációs mérések

A fantomról kapott mérési eredmény 99,96%-os pontossággal adta vissza a valós térfogatot. Az alanyok gerince mellé fektetett, ismert térfogatú vizet tartalmazó tartályok mérései eredménye $99,8 \pm 3,1\%$ volt.

Az EC SA tér mérési eredményei

Az EC SA térben készült modellek anatómiailag pontosak, térfogatukat 20,21-44,06 ml között mértük. A nyaki szakasz aránya $41,03 \pm 3,33\%$, a háti szakaszé $35,93 \pm 2,13\%$; az ágyéki szakasz aránya $23,06 \pm 1,92\%$ volt.

A statisztikai elemzéssel a következő összefüggést állapítottuk meg a kilogrammban kifejezett testtömeg (BW) és a milliliterben kifejezett EC CSF térfogat ($V_{EC\ CSF}$) között ($p=0,0002$; korrigált $r^2=0,74$):

$$V_{EC\ CSF} = BW * 0,93 + 11,8 \quad (1. \text{ egyenlet})$$

A gerincvelő hosszát és a marmagasságot önmagukban vizsgálva ennél gyengébb összefüggést mutattak az EC CSF térfogattal, míg a testtömeggel együtt a számolva a modell pontosságát nem növelték. Szintén nem találtunk összefüggést a testtömeg és a nyaki szakasz

térfogatának aránya ($p=0,907$), a háti szakasz aránya ($p=0,43$) és az ágyéki szakasz aránya ($p=0,50$) között.

Az agykamrák mérési eredményei

Az agykamrák 3D rekonstrukciója során készített modellek nem minden esetben követték pontosan az anatómiai tankönyvi leírásokat, kisebb recessusok esetenként hiányoztak, de ezek hiánya – méretükből adódóan – nem befolyásolta a méréseket. A kamrák össztérfogatát 0,97-2,94 ml közöttinek mértük, aminek $62,12\pm 11,7\%$ -a a két oldalsó agykamra, $17,58\pm 4,92\%$ -a a harmadik agykamra, $4,85\pm 1,57\%$ -a a Sylvius-féle csatorna és $15,45\pm 6,61\%$ -a a negyedik agykamra. Az egyes alanyokban a lateralis agykamrák 11 esetben (91,7%) mutattak szignifikáns eltérést egymáshoz képest; 6 állatnál (50%) a jobb, 5 (41,7 %) esetben a bal kamra javára. A statisztikai elemzés nem mutatott ki szignifikáns összefüggést a felvett fizikai jellemzők és az alanyok agykamráinak térfogatai között.

Az IC SA tér mérési eredményei

Az IC SA tér rekonstrukciós modelljein a külső folyadékréteg minden esetben hiányos a temporalis

területeken. Az anatómiai leírásban felsorolt öblök és mélyedések jól követhetőek.

A kompartment össztérfogatát 8,44-22,62 ml között mértük.

A statisztikai elemzés során a következő összefüggést állapítottuk meg a BW és a milliliterben kifejezett IC CSF térfogat ($V_{IC\ CSF}$) között ($p=0,0085$; korrigált $r^2=0,468$):

$$V_{IC\ CSF}=BW*0,62+0,12 \quad (2a. \text{ egyenlet})$$

A 12-es alany értékei az IC SA térben mért CSF-re vonatkozóan a testtömeghez képest kiugróan magasnak bizonyultak, kizárását követően a vonatkozó képlet az alábbiak szerint módosult ($p=8,3*10^{-5}$; korrigált $r^2=0,817$):

$$V_{IC\ CSF}=BW*0,48+3,44 \quad (2b. \text{ egyenlet})$$

Az eredmények összesítése

Az összesített CSF térfogatot 29,62-67,74 ml közöttinek mértük, amelynek 28,57% \pm 4,91%-a az IC SA térben, 4,45% \pm 1,96%-a az agykamrákban és 66,99% \pm 5,15%-a az EC SA térben található. A BW és az össztérfogat ($V_{Full\ CSF}$) között az alábbi összefüggés áll fenn ($p=1,94*10^{-5}$; korrigált $r^2=0,836$):

$$V_{Full\ CSF}=BW*1,39+17,5 \quad (3. \text{ egyenlet})$$

4. MEGVITATÁS

Munkánk célja a kutya CSF térfogatának és megoszlásának in vivo meghatározása volt. Mivel élő állapotban a CSF folyamatos termelődése és élettani szerepe miatt a teljes térfogatot eltávolítani nem lehet, térfogatának meghatározására kézenfekvő a post mortem direkt mérés az atlantooccipitalis vagy a lumbosacralis résen keresztüli leszívással, illetve a gerinc és az agykoponya megnyitásával. A CSF nyomása, termelődése, térfogata és a keringés közötti szoros kapcsolat, az agykamrák közötti összeköttetést biztosító nyílások mérete és az agykamrák anatómiai felépítése, valamint a CNS interstitiumával fenntartott ozmotikus kapcsolat miatt a post mortem végzett vizsgálat nem kivitelezhető pontosan.

Felmerülhet a korróziós technikán alapuló modellezés, és az így kapott preparátumok térfogatmérése, de a használt feltöltő anyagok szöveti zsugorodást okoznak, a kérdéses terület maradéktalan kitöltése esetleges, valamint a feltöltés során a valódi térfogati viszonyokat nem tudjuk visszaadni, mert az anyag injektálásakor fellépő nyomás az idegszöveteket ellenőrizhetetlen módon komprimálhatja.

Mindezen okok miatt a post mortem mérések használatát bevezető vagy ellenőrző vizsgálatként is elvetettük és a modern képalkotó eljárások kizárólagos, és in vivo használata mellett döntöttünk.

Ezek közül az MRI alkalmas natív módon a CSF kimutatására, CT-vel ez csak kontrasztanyag bejuttatásával (CT-myelographia) lehetséges, ami viszont a bejuttatott anyag térfogatán, illetve annak a CSF felszívódására és termelésre gyakorolt hatásán keresztül befolyásolta volna eredményeinket. Mivel az irodalomban a vizsgálattal szemben támasztott valamennyi követelménynek megfelelő mérési eljárást nem találtunk, a leírt tapasztalatok alapján dolgoztuk ki módszerünket. A méréseket klinikai körülmények között megismételhető módon végeztük, a kapott MRI felvételeken műtermék nem ábrázolódott. A kialakított eljárás alapvető pontosságának bizonyítását két módszerrel hajtottuk végre. Mivel minden, az eljárás igazolására szolgáló mérés legalább 99%-os pontosságot eredményezett kijelenthető, hogy a térfogati adatok kielégítő pontosságúak, az alanyok pillanatnyi CSF térfogatának megfelelnek.

A vizsgálati csoporttal szemben támasztott követelmények eredményeképp külső tényezők (kor, fajta,

ivar, egészségügyi állapot stb.) méréseinket nem befolyásolták, ugyanakkor eredményeink értelmezhetőségét egy adott korcsoportra és ivarra szűkítik.

A kapott modellek anatómiailag pontosak. A testtömeg és az összesített CSF térfogat összefüggését leíró 3. egyenlet magas szignifikancia szintje arra utal, hogy az agykamrák és az IC SA tér mérése során hiányosan megjelenített területek térfogata az összesített értékhez képest elhanyagolható.

A kamrai térfogatról illetve a lateralis kamrák szimmetriaviszonyairól szóló kisszámú cikkben található adatoktól eredményeink nem különböznek.

A hagyományos, a CSF és a testtömeg közötti egyenes arányossági összefüggésen alapulótól eltérő dózisdagolási javaslatokat a szerzők közül egyedül Arany-Tóth támasztotta alá konkrét mérési adatokkal, a többi szerző ajánlásai tapasztalati úton alakultak ki. Méréseink és az ő dózisdagolási javaslatok majdnem azonos (korrigált $r^2=0,9774$) regressziós modellt eredményeztek a 7,5-35,0 kg testtömeg tartományban és azon kívül is (5,0-80,0 kg; korrigált $r^2=0,9923$). Ez alapján feltételezhető, hogy eredményeink extrapolálhatóak a vizsgált testtömeg tartományon kívül is, valamint arra utal, hogy az Arany-

Tóth által mért eltérő nyomásreakció háttérében csak a CSF kompartmentek eltérő mérete áll.

A kis egyedszám miatt nem jelenthetjük ki, hogy sikerült meghatározni a kutya CSF térfogatának élettani alapértékeit, de eredményeink jó alapot nyújtanak a további vizsgálatokhoz, például a szukákkal vagy más korcsoportokkal való összevetéshez. Eredményeink alátámasztják, hogy a SA-térbe való valamennyi gyógyszer illetve kontrasztanyag bejuttatására vonatkozó dóziszajavaslatoikat felül kell bírálni. A CSF térfogat megoszlásának ismerete segíthet a syringomyelia és a hydrocephalus diagnosztikájában.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztunk egy, a klinikai körülmények között is alkalmazható eljárást a CSF egyes kompartmentjeinek vagy egészének *in vivo* térfogatmérésére. Módszerünk pontosságát két módszerrel ellenőriztük 99,96% és $99,8 \pm 3,1$ %-os eredményekkel. Az eljárás más állatfajokon is alkalmazható, így egyrészt a CSF-vel és az SA térrel kapcsolatos kutatásokban, másrészt a hydrocephalus diagnosztikájában is használható.
2. Nemzetközi szinten először mértük MRI-vel kutyák teljes CSF térfogatát.
3. Meghatároztuk a CSF megoszlását az egyes kompartmentek között és azokon belül is.
4. Összefüggést igazoltunk az EC CSF térfogata és a testtömeg között.
5. Megállapítottuk a 7,5-35,0 TTKG tartományban a 3-5 év közötti kan kutyák összesített CSF térfogatértékeit, ennek összefüggését a testméretekkel. Eredményeink bizonyítják, hogy a SA térbe való gyógyszer-, vagy kontrasztanyag bevitel során az adagolás egyenes arányosságon alapuló megközelítése felülvizsgálatra szorul.

6. Megállapítottuk, hogy a kutyák oldalsó agykamráinak aszimmetriája normális, gyakori jelenség akár 1:1,5 arányban is, ugyanakkor a szimmetrikus elrendeződés sem kóros, az esetek mintegy 10%-ban megfigyelhető.

7. A CSF ösztérfogatára vonatkozó adatainkkal alátámasztottuk a korábbi, volumenterheléses adatok alapján, myelographia-hoz készített kontraszt anyag adagolás javaslatot.

8. Oktatási és demonstrációs célra alkalmas ábrákat, preparátumokat, háromdimenziós, számítógépes modelleket és animációkat készítettünk a CNS folyadéktereiről.

6. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI

Folyóirat közlemények

Reinitz L., Petneházy Ö., Bajzik G., Biró G., Garamvölgyi R., Benedek B., Sótonyi P.: Módszer a kutya (*Canis familiaris*) agykamráinak in vivo térfogatmérésére MRI-vel. *Magyar Állatorvosok Lapja* 135. évf. 2013/8 pp. 451-460 (IF.: 0,185)

Reinitz L., Bajzik G., Garamvölgyi R., Petneházy Ö., Lassó A., Abonyi-Tóth Zs., Lőrincz B., Sótonyi P.: Comparison between magnetic resonance imaging estimates of extracranial CSF volume and physical measurements in healthy dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* Vol. 56, No. 6, 2015, pp 658–665. (IF.: 1,453) (IF.: 1,453)

Reinitz L., Szőke B., Várkonyi E., Sótonyi P., Jancsik V.: Three-dimensional visualization of the distribution of melanin-concentrating hormone producing neurons in the mouse hypothalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 71, pp. 20-25. (IF.: 1,500)

Konferencia megjelenések

Reinitz L., Petneházy Ö., Bajzik G., Biró G., Garamvölgyi R., Benedek B., Sótónyi P.: **Módszer a kutya (*Canis familiaris*) agykamráinak in vivo térfogatmérésére MRI-vel.** *Magyar Anatómus Társaság XVIII. Kongresszusa*; Budapest; 2013. 06.13-15

Reinitz L., Szőke B., Gerics B., Sótónyi P., Jancsik V.: **3-D reconstruction of the distribution of melanin-concentrating hormone producing neurons in the mouse hypothalamus.** *International Brain Research Organization Workshop 2014; Debrecen, 2014.01.16-17*

Reinitz L., Bajzik G., Garamvölgyi R., Petneházy Ö., Lassó A., Abonyi-Tóth Zs., Lőrincz B., Benedek B., Sótónyi P.: **Volumetric measurements of the canine cerebrospinal fluid using magnetic resonance imaging.** *The XXXth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists*; Cluj-Napoca; 2014.07. 23-26

Reinitz L., Bajzik G., Garamvölgyi R., Benedek B., Petneházy Ö., Lassó A., Abonyi-Tóth Z., Lőrincz B., Sótónyi P.: **Volume and distribution of the cerebrospinal fluid in dogs.** *A Magyar Anatómus Társaság XIX. Kongresszusa. Szeged; 2015.06.11-13.*

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet

- Prof. Dr. Sótorny Péter témavezetőmnek a támogatásáért, hasznos tanácsaiért, ösztökélésért.
- A Kaposvári Egyetem munkatársainak, Bajzik Gábornak, Garamvölgyi Ritának, Petneházy Örsnek, Lőrincz Borbálának, Bíró Gergelynek, Szántó Andrásnak és Lukács Gábornak, a mérésekért és az állandó támogatásukért.
- Benedek Bianka TDK hallgatónak a kutyák altatásában és a mérésekben nyújtott segítségéért.
- Lassó Andrásnak és Steve Piepernek, a 3D Slicer fejlesztőinek a technikai támogatásért.
- Abonyi-Tóth Zsoltnak a statisztikai elemzésekért.
- Oláh Editnek, Orbán Évának, Pádár Évának és a SzIE-ÁOTK Könyvtár többi dolgozójának, a munkához szükséges tudományos munkák beszerzéséért.
- A kutyák gazdáinak, akik önzetlenül segítettek a vizsgálatban, kockáztatva szeretett kedvencük egészségét.
- az Anatómiai és Szövetani Tanszék összes dolgozójának a folyamatos támogatásukért, kollegialitásukért, és segítőkészségükért.
- és legfőképp Édesanyámnak és a családomnak, akik a legtöbb áldozatot hozták, hogy ez a munka elkészülhessen.