

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ IM H. NIEWODNICZAŃSKIEGO

Polska Akademia Nauk

Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej

Rozprawa doktorska

OBRAZOWANIE STANU CZYNNOŚCIOWEGO
UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO *IN VIVO*
Z WYKORZYSTANIEM METOD OBRAZOWANIA
REZONANSEM MAGNETYCZNYM

mgr Katarzyna Byk

Promotor:

dr hab. Bogusław Tomanek

Promotor pomocniczy:

dr Tomasz Skórka

Kraków, 2016r.

*Panu doktorowi hab. Bogusławowi Tomankowi
dziękuję za życzliwość, cenne uwagi i pomoc w trakcie pisania pracy.*

*Panu doktorowi Tomaszowi Skórcie
dziękuję za poświęcony czas, opiekę nad częścią eksperymentalną badań
jak również za przekazaną mi wiedzę.*

*Chciałabym również podziękować Panu Profesorowi Stefanowi Chłopickiemu
za wsparcie i wskazówki dotyczące biologicznej części prowadzonych badań.*

*Kolegom i Koleżankom z Zakładu Tomografii Magnetyczno–Rezonansowej
dziękuję za życzliwość i pomoc podczas prowadzonych badań.*

Praca przygotowana w ramach **Międzynarodowego Studium Doktoranckiego**
IFJ PAN



oraz projektu „JCET2 - Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny - Innowacyjna Gospodarka, Działanie 1.1.2)



SPIS TREŚCI

SPIS NAJCZĘŚCIEJ WYSTĘPUJĄCYCH SKRÓTÓW **7**

WSTĘP **8**

1. PODSTAWY OBRAZOWANIA MAGNETYCZNO-REZONANSOWEGO **14**

1.1. ZJAWISKO MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO	14
1.2. SYGNAŁ SWOBODNEJ PRECESJI, RELAKSACJA JĄDROWA	17
1.2.1. POMIAR CZASU T_2	19
1.2.2. POMIAR CZASU T_1	20
1.3. GRADIENTY POLA GŁÓWNEGO, PRZESTRZEŃ K	20
1.4. SZYBKIE SEKWENCJE OBRAZOWANIA	22
1.4.1. FLASH	22
1.4.2. RAREst	24
1.4.3. EPI	25
1.5. TECHNIKI OBRAZOWANIA PERFUZJI I PRZEPLYWU	26
1.5.1. POMIAR PERFUZJI	26
1.5.2. DCE-MRI	28
1.5.3. POMIAR PRĘDKOŚCI METODĄ KONTRASTU FAZY	30

2. WĄTROBA **33**

2.1. BUDOWA I FUNKCJE	33
2.2. KRAŻENIE	34
2.2.1. MECHANIZMY REGULACJI PRZEPLYWU KRWI	35
2.2.2. MIKROKRAŻENIE	35
2.3. OSTRY STAN ZAPALNY WĄTROBY	36
2.3.1. ZMIANY STRUKTURALNE WĄTROBY	37
2.3.2. ZMIANY PERFUZJI	37
2.3.3. AKTYWACJA LIMFOCYTÓW	37
2.4. ZWIERZĘCY MODEL OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY	38

3. MATERIAŁY I METODY	39
3.1. APARATURA POMIAROWA I WYKORZYSTANE SUBSTANCJE	39
3.1.1. ŚRODEK KONTRASTOWY - PRIMOVIST™	40
3.2. PROTOKOŁY EKSPERYMENTALNE	40
3.2.1. POMIAR RELAKSACYJNOŚCI ŚRODKA KONTRASTOWEGO	40
3.2.2. BADANIE PÓŹNYCH ZMIAN W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY	41
3.2.3. BADANIE WCZESNYCH ZMIAN W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY	43
3.3. ANALIZY WYNIKÓW	45
3.3.1. RELAKSACYJNOŚĆ ŚRODKA KONTRASTOWEGO	45
3.3.2. ANALIZA TEKSTUR	46
3.3.3. ANALIZA FRAKTALNA	49
3.3.4. WYZNACZANIE WARTOŚCI PERFUZJI I CZASU RELAKSACJI T_1	50
3.3.5. EMPIRYCZNE MODELOWANIE MATEMATYCZNE (EMM)	50
3.3.6. MODELOWANIE KOMPARTMENTOWE (MK)	52
3.3.7. WYZNACZENIE PRĘDKOŚCI PRZEPIYU KRWI	55
3.3.8. OCENA HISTOLOGICZNA I BIOCHEMICZNA	56
3.3.9. TESTY STATYSTYCZNE	57
4. WYNIKI	58
4.1. POMIAR RELAKSACYJNOŚCI ŚRODKA KONTRASTOWEGO	58
4.2. PÓŹNE ZMIANY W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY	59
4.2.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZWIERZĄT, HISTOPATOLOGIA, BIOCHEMIA	59
4.2.2. ANALIZA TEKSTUR	63
4.2.3. ANALIZA FRAKTALNA	65
4.2.4. PERFUZJA I CZAS RELAKSACJI T_1	66
4.2.5. EMPIRYCZNE MODELOWANIE MATEMATYCZNE (EMM)	68
4.2.6. MODELOWANIE KOMPARTMENTOWE (MK)	72
4.3. WCZESNE ZMIANY W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY	76
4.3.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZWIERZĄT. BIOCHEMIA	76
4.3.2. PERFUZJA I CZAS RELAKSACJI T_1	76
4.3.3. POMIAR PRĘDKOŚCI PRZEPIYU KRWI	79

<u>5.</u>	<u>DYSKUSJA</u>	<u>82</u>
<u>6.</u>	<u>WNIOSKI</u>	<u>92</u>
<u>7.</u>	<u>ANEKS</u>	<u>93</u>
7.1.	BARWIENIE OMSB	93
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>94</u>

SPIS NAJCZĘŚCIEJ WYSTĘPUJĄCYCH SKRÓTÓW

ALF – *ang. acute liver failure*, ostre zapalenie wątroby;

ASL – *ang. arterial spin labelling*, magnetyczne znakowanie spinów krwi tętniczej;

CA – *ang. contrast agent*, środek kontrastowy;

ConA – *ang. concanavalin A*, konkanawalina A;

DCE-MRI – *ang. dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging*, dynamiczne obrazowanie magnetyczno-rezonansowe z zastosowaniem środka kontrastowego;

EMM – empiryczne modelowanie matematyczne;

MK – modelowanie kompartmentowe;

MR – magnetyczno-rezonansowy;

MRI – *ang. magnetic resonance imaging*, obrazowanie magnetyczno – rezonansowe;

PC-MRI – *ang. phase contrast MRI*, pomiar MR metodą kontrastu fazy;

ROI – *ang. region of interest*, obszar wybierany do analizy;

WSTĘP

Celem pracy było zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MRI, *ang. Magnetic Resonance Imaging*) pozwalającego na scharakteryzowanie wpływu stanu zapalnego na pracę układu krążenia na przykładzie ostrego zapalenia wątroby (ALF, *ang. Acute Liver Failure*). Zakres pracy obejmuje implementację zwierzęcego modelu ostrego zapalenia wątroby, dobór metod pomiarowych obrazowania magnetyczno-rezonansowego (MR), optymalizację parametrów sekwencji obrazujących oraz dobór technik analizy obrazu. W badaniach użyto następujących technik obrazowania MR: magnetycznego znakowania spinów krwi tętniczej (ASL, *ang. Arterial Spin Labeling*), obrazowania dynamicznego z zastosowaniem kontrastu (DCE-MRI, *ang. Dynamic Contrast-Enhanced MRI*), obrazowanie metodą kontrastu fazy (PC-MRI, *ang. Phase Contrast MRI*) oraz obrazowania anatomicznego do zbadania zmian struktury tkanki.

Obrazowanie MR jest uznaną nieinwazyjną metodą uzyskiwania obrazu wnętrza obiektów biologicznych, w szczególności tkanek miękkich. Jest stosowane zarówno w badaniach podstawowych jak i w diagnostyce medycznej. Oparte jest na odkrytym przez Feliksa Blocha i Edwarda Purcella w 1946 roku zjawisku magnetycznego rezonansu jądrowego. Badania i rozwój technik opartych o zjawisko magnetyzmu jądrowego były kilkakrotnie nagrodzane Nagrodą Nobla. Nagrody przyznano dla: Otto Sterna w 1943 roku w dziedzinie fizyki za wkład w rozwój metody wiązki molekularnej i odkrycie momentu magnetycznego protonu, Isidora Rabiego w 1944 roku w dziedzinie fizyki za rezonansową metodę obserwacji właściwości magnetycznych jąder atomowych, F. Blocha i E. Purcella w 1952 roku w dziedzinie fizyki za rozwój metod pomiarów magnetyzmu jądrowego, Richarda Ernsta w 1991 roku w dziedzinie chemii za rozwój metod badań wysokorozdzielczą spektroskopią rezonansu magnetycznego, Kurta Wüthricha w 2002 w dziedzinie chemii za rozwój technik spektroskopii magnetyczno-rezonansowej dla badań trójwymiarowej struktury cząsteczek oraz dla Paula Lauterbura i Petera Mansfielda w 2003 roku w dziedzinie medycyny i fizjologii za wprowadzenie metod obrazowania MR do diagnostyki. Przyznanie Nagród Nobla w trzech dziedzinach nauki świadczy o uniwersalności metod opartych na zjawisku magnetycznego rezonansu jądrowego.

ALF jest chorobą o gwałtownym przebiegu, powodującą dysfunkcję wielu organów i prowadzącą do trudnych w leczeniu komplikacji [1, 2]. Szczególnie zły wpływ

na stan organizmu ma obniżające się ciśnienie krwi i dysfunkcje układu sercowo–naczyniowego prowadzące do niewystarczającego mikrokrażenia w organach [1, 3]. Wstępna opieka kliniczna polega na zapewnieniu warunków pozwalających na maksymalną możliwą regenerację i przywrócenie czynności wątroby [1]. Pozwala to na ograniczenie komplikacji związanych z ALF i przeprowadzenie przeszczepu wątroby, który jest najskuteczniejszą formą terapii [2, 4, 5]. Dlatego bardzo ważnym aspektem jest szybkość i celność diagnostyki. To właśnie ona decyduje o możliwości przeprowadzenia transplantacji. Brakującym elementem w diagnostyce ALF, opartej na testach biochemicznych, jest odpowiednia technika obrazowania pozwalająca na uzyskanie bezpośredniej interpretacji stanu i czynności naczyń i tkanki. Dotychczas najczęściej używaną metodą jest ultrasonografia, której stosowanie obarczone jest jednak wątpliwościami, ponieważ może prowadzić do błędnie pozytywnych wniosków ze względu na przebudowę tkanki zachodzącą na skutek ALF [6]. Obrazowanie MR, będące również techniką nieinwazyjną, a przy okazji dającą możliwość szerokiego i różnorodnego wglądu w badany obiekt, może przy odpowiednim doborze metod i parametrów przysłużyć się do badań nad ALF.

Wykorzystanie modeli zwierzęcych pozwala na badanie zmian chorobowych w kontrolowany sposób w warunkach *in vivo*. W niniejszej pracy wykorzystano obrazowanie MR do zbadania zmian czynności układu krwionośnego w ostrym zapaleniu wątroby, w szczególności badania zmian na poziomie mikrokrażenia. Posłużono się modelem zwierzęcym, w którym ALF wywołany jest dożylnym podaniem konkanawaliny A (ConA, *ang. concanavalin A*) [7-10]. W przeprowadzonych badaniach, podjęto próbę określenia zmian zachodzących w układzie krążenia we wczesnym i zaawansowanym stadium ALF. Model zweryfikowano badaniami histopatologicznym. Dodatkowo, na potrzeby analizy danych wykonano pomiary relaksacyjności użytego w badaniach środka kontrastowego.

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego wynika z oddziaływania wypadkowej magnetyzacji próbki pochodzenia jądrowego z rotującym polem magnetycznym o odpowiedniej częstotliwości (częstość Larmora). Powstanie magnetyzacji uwarunkowane jest umieszczeniem próbki w silnym zewnętrznym polu magnetycznym, co skutkuje częściowym uporządkowaniem spinów jądrowych (polaryzacją) i określa zarazem częstość rezonansową. Zastosowanie dodatkowych, liniowo zmiennych w przestrzeni pól magnetycznych pozwala na zróżnicowanie częstości rezonansowej, co może być użyte do uzyskania mapy gęstości jąder – obrazu wnętrza próbki. Najczęściej obrazowanymi jądrami

w żywych organizmach są jądra wodoru, które są związane przede wszystkim w cząsteczkach wody. Typowe obrazy MR są mapami gęstości protonów ważonymi czasami relaksacji, tj. czasami charakterystycznymi procesów oddziaływania spinów między sobą oraz spinów z siecią prowadzącymi do równowagowego położenia magnetyzacji. Ich rejestracja jest możliwa dzięki technikom kodowania przestrzennego jednak uzyskiwana jakość obrazów warunkowana jest czułością tej techniki a dodatkowo zależy od wielu czynników związanych z badanym obiektem, aparaturą i samym pomiarem. Na wybór metody badawczej wpływ ma obrona hipoteza badawcza i konieczność uzyskania adekwatnych obrazów. Dalsze dostosowanie parametrów wybranej metody ma zwykle na celu uzyskanie optymalnych dla danego zagadnienia skonstrastowania oraz jakości obrazu MR.

Procesy zachodzące w stanie zapalnym wątroby są procesami o dużej dynamice wpływającymi na funkcje zarówno wątroby jak i na stan całego organizmu. Istotną kwestią prowadzonych eksperymentów było uzyskanie charakterystyki zmian zachodzących w strukturze i funkcjach układu krążenia a w szczególności mikrokrażenia wątroby. Na wybór metod pomiarowych oraz sekwencji obrazujących wpływ miał badany obiekt. Wątroba wyróżniająca się unikalną organizacją układu naczyniowego m.in. podwójnym układem doprowadzania krwi i skomplikowanym układem naczyń zatokowych stanowi duże wyzwanie dla obrazowania *in vivo*. Dodatkowymi okolicznościami zwiększającymi stopień komplikacji badania są małe rozmiary badanego obiektu wymagające podwyższonej zdolności rozdzielczej w stosunku do badań ludzi, co przy porównywalnych stałych fizjologicznych (takich jak np. prędkość przepływu krwi w aorcie) powoduje również relatywnie zwiększone wymagania, co do czasowej zdolności rozdzielczej w badaniach procesów dynamicznych.

Wspierając się doniesieniami literaturowymi o ALF [1, 3-5, 11-14] wytypowano grupę parametrów, które mogły nieść informacje o zmianach wywoływanych przez postępującą chorobę. W trakcie rozwoju ALF obserwuje się aktywację komórek śródbłonna naczyń zatokowych (LSEC, *ang. Liver Sinusoidal Endothelial Cells*), komórek Kupffera i komórek układu odpornościowego [13, 14]. W odpowiedzi na pojawienie się stanu zapalnego wydzielane są cytokiny prozapalne i białka ostrej fazy [13]. Dochodzi również do uszkodzenia komórek wątrobowych oraz zaburzeń w wydzielaniu czynników odpowiedzialnych za rozszerzalność i kurczliwość naczyń krwionośnych [1, 3, 4, 11, 12]. Wybranymi parametrami były zatem: perfuzja, czas relaksacji tkanki podłużnej (T_1), określenie jakościowe i ilościowe kinetyki środka kontrastowego w tkance oraz przepływ krwi przez duże naczynia krwionośne związane z wątrobą.

Bezpośredni pomiar perfuzji tkankowej wykonano techniką ASL [15, 16]. W technice tej znakowaniem krwi nazywamy wysycenie lub inwersję magnetyzacji związanej ze spinami protonów znajdujących się we krwi, przy czym miejsce znakowania spinów nie musi być identyczne z obrazowaną warstwą. Mierząc perfuzję, mierzy się przepływ krwi przez naczynia o średnicach znacznie mniejszych [17] od możliwej do uzyskania rozdzielczości skanera MR. Znakowanie powoduje relatywnie niewielką zmianę mierzonego sygnału (1-2%) [18] co powoduje, że przy wszystkich zaletach tej techniki, jej efektywna czułość jest relatywnie niska.

Inną metodą jednoczesnego pomiaru perfuzji i funkcji hepatocytów jest dynamiczne badanie wzmocnienia kontrastowego w pomiarach DCE-MRI. Technika ta bazuje na podaniu, zwykle dożylnym, środka kontrastowego (CA, *ang. Contrast Agent*) i śledzeniu jego kinetyki w organizmie na podstawie zmian obserwowanych na wykonywanych sukcesywnie obrazach. CA wprowadzone zostały do badań w latach 1980-ych [19]. Wpływają na kontrast w obrazie MR poprzez zmiany czasów relaksacji podłużnej i poprzecznej obrazowanych tkanek [20, 21]. Przedstawienie w formie wykresu zmian intensywności pikseli w obrazie pod wpływem CA od czasu pozwala na wnioskowanie o dynamicznych procesach w tkance [22]. Perfuzja w takich badaniach utożsamiana jest z fazą napływu i wychwytu kontrastu w tkance [23, 24]. Jest to częsta metoda jej pomiaru w badaniach przeprowadzanych u ludzi, jednak w przypadku małych zwierząt jest znacznie trudniejsza w stosowaniu, ze względu na większą dynamikę rytmu pracy serca (u człowieka 60–80 uderzeń na minutę (bpm), u myszy 400–600 bpm).

Przepływ wrotny może być oszacowany w innym pomiarze z wykorzystaniem metody FLOWMAP. Przepływ krwi w naczyniach w tej metodzie jest mierzony zmianą fazy płynących spinów poddanych działaniu gradientu kodującego (często bipolarnego niedającego przyczynku do fazy spinów stacjonarnych) dodanego do sekwencji obrazującej [18, 25]. Pomiar prędkości przepływu krwi w kolejnych fazach cyklu pracy serca daje możliwość zbadania zarówno tego parametru jak i wielkości transportu krwi przez wątrobę. Spadek prędkości krwi w obiegu wrotnym może być związany ze wzrostem oporów przepływu w wątrobie [26, 27]. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę, że większość krwi przepływającej przez wątrobę pochodzi z obiegu wrotnego [11] oszacowanie zmian transportu może wnieść dodatkową istotną informację związaną z ewentualnymi zaburzeniami perfuzji.

Powyższe techniki dają możliwość komplementarnej oceny czynności mikrokrążenia w wątrobie myszy. Ciekawą i uzupełniającą informację dają badania strukturalne będące tłem dla zmian czynnościowych zachodzących w tkance. Pośrednim wynikiem mówiącym o zmianach i w strukturze i czynności tkanki jest przebieg późnej fazy wypłukiwania środka kontrastowego w badaniu DCE-MRI. Proces ten może świadczyć zarówno o zmianach w tkance jak i czynności hepatocytów [28, 29]. Również czasy relaksacji w tkance, zmierzone bez udziału środka kontrastowego, mogą posłużyć za parametr jej uszkodzenia [30-32]. Wynik tego badania związany jest ze zmianami w strukturze tkanki, np. wydłużenie czasu relaksacji w zwłóknieniu [32]. W zastosowanym protokole mapy czasu relaksacji uzyskiwane były równocześnie z mapami perfuzji, gdyż zastosowana metoda pomiarowa wiąże ruch płynów przez tkankę ze zmianami pozornego czasu relaksacji podłużnej [15, 16].

Wymienione wyżej badania wykorzystują techniki obrazowania o wyższym stopniu komplikacji protokołu i relatywnie niskim stosunku sygnału do szumu, gdyż praktycznie wszystkie, poza pomiarem map T_1 , bazują na obrazach subtrakcyjnych będących różnicą, jaką uzyskuje się między obrazem ważonym a obrazem referencyjnym. Dla uzyskania uzupełniającej informacji o zmianach w strukturze tkanki i ich bezpośredniego badania na anatomicznych obrazach MR wykonano pomiary bazujące na wielokrotnym echu spinowym, pozwalającym na szybkie uzyskanie obrazu o wysokiej rozdzielczości przestrzennej. Uzyskane w ten sposób obrazy poddano dobranym metodom analizy w celu wydobycia maksymalnej ilości informacji oraz ewentualnego wskazania parametrów mogących stać się markerami choroby. Wykorzystano analizę tekstur [33, 34] i analizę fraktalną [35-38]. Techniki te pozwalają na zbadanie cech powierzchni obrazu poprzez badanie zależności pomiędzy pikselami oraz na wykrycie czy analizowany obraz posiada cechy samopodobieństwa. W efekcie możliwe jest ich użycie do sprawdzenia czy zmiany zachodzące na poziomie struktury tkanki pod wpływem ostrego stanu zapalnego mogą być zauważalne w bezpośrednim badaniu w organizacji obrazu MR.

W pracy zastosowano również techniki modelowania sygnału uzyskiwanego z dynamicznych pomiarów z pozytywnym wzmocnieniem kontrastowym. Dane uzyskane z pomiarów DCE-MRI modelowano metodą empiryczną (jakościową) [22, 39, 40] i kompartmentową (ilościową) [22, 41-44]. Pierwsza metoda pozwala na opis krzywej farmakokinetyki środka kontrastowego, w tym na uzyskanie informacji o perfuzji i uszkodzeniu tkanki. Natomiast druga pozwala na wnioskowanie dotyczące zaburzenia przepływu na poziomie różnych struktur tkankowych, np. przechodzenie środka kontrastowego

przez ścianę naczynia. Z pomiarów ASL uzyskano informację o zmianie perfuzji oraz o zmianie czasu relaksacji podłużnej tkanki chorej w stosunku do tkanki zdrowej.

Praca podzielona została na siedem rozdziałów. Pierwsze dwa rozdziały zawierają wprowadzenie teoretyczne. W Rozdziale 1 opisano podstawy zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego, opartej na nim metodzie pomiarowej, jaką jest obrazowanie magnetyczno–rezonansowe oraz krótki przegląd sekwencji i technik MR, które zastosowano w przeprowadzonych eksperymentach. W Rozdziale 2 dokonano charakterystyki wątroby ze szczególnym uwzględnieniem przebiegu ostrego stanu zapalnego oraz badanego zwierzęcego modelu ALF. W Rozdziale 3 przedstawiono przeprowadzone eksperymenty i ich protokoły, aparaturę pomiarową oraz użyte metody analizy obrazów. W Rozdziale 4 przedstawiono wyniki, natomiast w Rozdziale 5 dyskusję. Wnioski z przeprowadzonych badań zebrano w Rozdziale 6. Pracę kończy aneks (Rozdział 7), zawierający dodatkowe informacje z zakresu przedstawionych badań, oraz Bibliografia.

1. PODSTAWY OBRAZOWANIA MAGNETYCZNO-REZONANSOWEGO

1.1. ZJAWISKO MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO

Elementy jądra atomowego – protony i neutrony, są obdarzone spinem, który może przyjmować wartości $\pm 1/2$. Moment pędu całego jądra (\vec{K} , [Js]) jest sumą spinów poszczególnych elementów i może przyjmować różne wartości, w tym zero.

Z niezerowym momentem pędu związany jest moment magnetyczny ($\vec{\mu}$, [J/T]):

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{K} \quad 1.1$$

gdzie: γ – współczynnik giromagnetyczny [MHz/T]. γ zależy od znaku, wielkości i sposobu rozłożenia ładunku w jądrze.

W obrazowaniu MR najczęściej wykorzystuje się właściwości magnetyczne jąder wodoru (spin jądrowy $1/2$), których koncentracja w żywym organizmie a także relatywnie wysoki współczynnik giromagnetyczny (42.58 MHz/T) sprzyjają otrzymywaniu silnego sygnału MR.

Moment magnetyczny jądra atomowego umieszczonego w polu magnetycznym o indukcji \vec{B}_0 precesuje wokół kierunku tego pola. Umownie przyjmuje się układ współrzędnych kartezyjskich, w którym $\vec{B}_0 \parallel Z$. Częstość precesji ($\vec{\omega}_0$) wektora $\vec{\mu}$ jest równa:

$$\vec{\omega}_0 = \gamma \vec{B}_0 \quad 1.2$$

Częstość $\vec{\omega}_0$ nazywana jest częstością Larmora. Jest ona proporcjonalna do wektora indukcji magnetycznej. Częstość Larmora jest wielkością charakterystyczną dla danego jądra.

Energia oddziaływania momentów jądrowych z polem magnetycznym przedstawia się następująco [45]:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad 1.3$$

Na podstawie mechaniki kwantowej, dla protonu obdarzonego spinem $1/2$ możliwe są dwa stany energetyczne $\pm 1/2$ [45]. Preferowanym stanem energetycznym jest ten o niższej energii. Liczbę obsadzeń poszczególnych stanów energetycznych dla próbki w stanie równowagi termodynamicznej określa rozkład Boltzmann'a:

$$N(m_i) = C \exp \left[-\frac{E(m_i)}{kT} \right] \quad 1.4$$

gdzie: $N(m_i)$ – liczba obsadzeń poziomu m_i , C – współczynnik proporcjonalności, $E(m_i)$ – energia poziomu m_i , k – stała Boltzmann'a, $k=1,380 \cdot 10^{-16}$ J/K, T – temperatura bezwzględna próbki. W temperaturze pokojowej różnica w liczbie obsadzeń jest niewielka,

jednak gwarantuje wystąpienie mierzalnego wypadkowego momentu magnetycznego próbki (\vec{M}'). Poszczególne składowe \vec{M}' w wybranym układzie współrzędnych można zapisać:

$$M'_z = \sum \mu_z = \sum \mu_z(m)N(m) \quad 1.5$$

$$M'_i = \sum \mu_i = 0 \quad 1.6$$

gdzie: $\mu_z(m) = m\gamma$ – wartość momentu magnetycznego dla poziomu m , $N(m)$ – obsadzenie poziomu m , $i=x,y$. Jak widać z powyższych wzorów wektor \vec{M}' ma tylko jedną niezerową składową M'_z . Oś Z jest wyróżniona, ponieważ jest to kierunek zewnętrznego pola magnetycznego. Natomiast w płaszczyźnie XY wypadkowy moment magnetyczny próbki zeruje się. Spowodowane jest to brakiem wyróżnionego kierunku w płaszczyźnie XY oraz idącym za tym równomiernym rozłożeniem rzutów μ_x, μ_y na tę płaszczyznę.

Wypadkowy moment magnetyczny próbki przypadający na jednostkę objętości (V) jest ważnym parametrem opisującym właściwości próbki. Parametr jest nazywany magnetyzacją próbki (\vec{M} , [A/m]), którą wyznacza się ze wzoru:

$$\vec{M} = \frac{\vec{M}'}{V} \quad 1.7$$

Składowe tak przedstawionej magnetyzacji są analogiczne do wcześniej wyprowadzonych składowych wypadkowego momentu magnetycznego (równania 1.5 i 1.6) a w stanie równowagi tylko składowa M_z przyjmuje wartość różną od zera.

W próbce znajdującej się w stanie równowagi, wektor magnetyzacji jest nieruchomy a jego zwrot jest zgodny ze zwrotem wektora indukcji magnetycznej \vec{B}_0 . W przypadku zaburzenia stanu równowagi, wektor \vec{M} odchyli się od pierwotnego kierunku rozpoczynając precesję [46]:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad 1.8$$

Takie równanie można rozwiązać przechodząc do wirującego układu współrzędnych $X'Y'Z'$. Przyjmując, że nowy układ wiruje z prędkością kątową $\vec{\omega}$ wokół osi Z , możemy zapisać równanie ruchu magnetyzacji w tym układzie:

$$\left(\frac{d\vec{M}}{dt}\right)' = \gamma \vec{M} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}\right) \quad 1.9$$

Z powyższego równania widać, że wektor magnetyzacji będzie nieruchomy w układzie wirującym w przypadku, gdy częstość wirowania tego układu będzie równa częstości

Larmora, czyli częstości precesji spinów jądrowych w polu magnetycznym (równanie 1.2). Ponieważ równania 1.8 i 1.9 są podobne, wyrażenie w nawiasie w równaniu 1.9 można nazwać polem efektywnym (\vec{B}_{eff}).

Czynnikiem zaburzającym może być pole \vec{B}_1 , wirujące w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku pola \vec{B}_0 . Wyrażenie na pole efektywne powiększa się wtedy o wektor indukcji magnetycznej \vec{B}_1 :

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{B}_1 \quad 1.10$$

W szczególnym przypadku, kiedy częstość pola wirującego \vec{B}_1 będzie równa częstości Larmora, pole efektywne \vec{B}_{eff} będzie równe polu \vec{B}_1 . Właśnie to zjawisko precesji wektora magnetyzacji wokół pola \vec{B}_1 nazywamy magnetycznym rezonansem jądrowym.

Pojawienie się pola \vec{B}_1 o częstości rezonansowej powoduje wytrącenie magnetyzacji z położenia równowagi (Rysunek 1.1). Jednocześnie obserwuje się powrót magnetyzacji do stan równowagi, mianowicie narastanie składowej magnetyzacji w kierunku uprzywilejowanym (Z), oraz zanik składowych M_x i M_y . Procesy te można opisać równaniami:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_\infty}{T_1} \quad 1.11$$

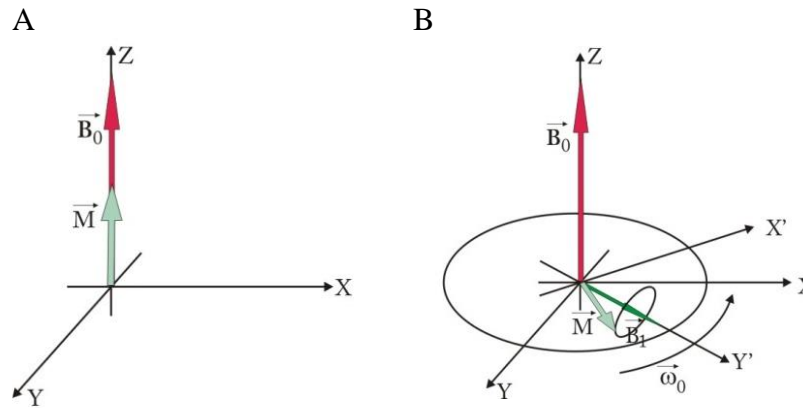
$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad 1.12$$

Rozwiązania równań 1.11 i 1.12 przedstawiają się następująco:

$$M_z = M_\infty \left(1 - \exp \left[-\frac{t}{T_1} \right] \right) \quad 1.13$$

$$M_{x,y} = M_\perp \exp \left[-\frac{t}{T_2} \right] \quad 1.14$$

gdzie: M_∞ – maksymalna wartość magnetyzacji osiągnięta w stanie równowagi, $M_\perp = \sqrt{M_x^2 + M_y^2}$ – maksymalna wartość magnetyzacji osiągnięta na płaszczyźnie XY, t – czas, $T_{1,2}$ – stałe o wymiarze czasu.



Rysunek 1.1: Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego. **(A)** Układ w stanie równowagi. Wektor magnetyzacji jest nieruchomy i ułożony równoległe do kierunku pola magnetycznego \vec{B}_0 . **(B)** Pojawienie się w układzie wirującego pola \vec{B}_1 powoduje wytrącenie wektora magnetyzacji z położenia równowagi. Wpływ pola \vec{B}_0 na wektor magnetyzacji jest zniwelowany w przypadku, gdy częstość wirowania pola \vec{B}_1 jest równa częstości Larmora. Zachodzi zjawisko rezonansu magnetycznego.

Proces odrastania składowej M_z nazywany jest relaksacją podłużną lub spinowo–sieciową. Szybkość tego procesu określona jest przez stałą czasową T_1 zwaną czasem relaksacji podłużnej. Gdy składowa podłużna magnetyzacji osiągnie wartość maksymalną M_∞ cały układ osiąga stan równowagi charakteryzujący się minimum energetycznym. Natomiast w płaszczyźnie poprzecznej, po wyłączeniu pola \vec{B}_1 obserwowany jest eksponencjalny zanik składowej M_\perp . Proces nazywany jest relaksacją poprzeczną lub spinowo–spinową. Stałą czasową określającą szybkość zaniku M_\perp jest T_2 .

1.2.SYGNAŁ SWOBODNEJ PRECESJI, RELAKSACJA JĄDROWA

Pole \vec{B}_1 prostopadłe do \vec{B}_0 można wygenerować cewką, np. objętościową typu *birdcage*, nadawczo – odbiorczą, umieszczoną w stałym polu \vec{B}_0 . Ze względu na częstość, z jaką wiruje pole \vec{B}_1 cewki nazywane są cewkami radiowej częstości (RF, *ang. Radio Frequency*). Pole \vec{B}_1 zazwyczaj ma charakter pulsacyjny. Impulsy zmiennego pola magnetycznego mogą wychylić magnetyzację z położenia równowagi o określony kąt:

$$\alpha = \gamma |B_1| \tau \quad 1.15$$

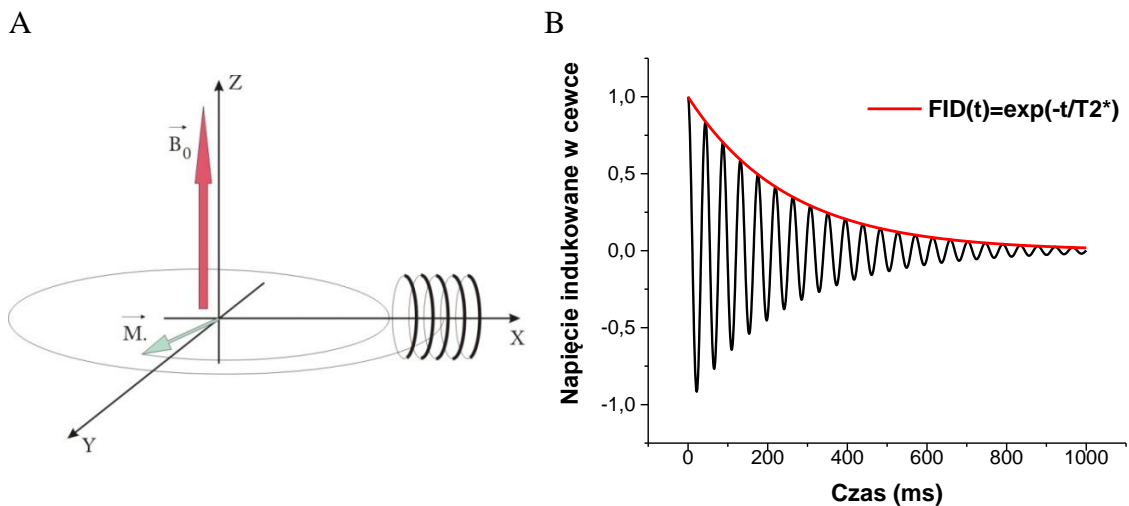
gdzie: α – kąt, o jaki odchylił się wektor magnetyzacji, τ – czas trwania impulsu pola magnetycznego \vec{B}_1 . Kąt α może osiągać dowolne wartości, jednak najczęściej stosowane

są impulsy $\pi/2$ lub π odwracające wektor magnetyzacji o 90 lub 180 stopni od położenia równowagi.

W przypadku zastosowania impulsu $\pi/2$, wektor magnetyzacji zostaje przerzucony do płaszczyzny XY. Jego składowa M_{\perp} osiąga wartość maksymalną. Rozpoczyna się precesja i proces relaksacji opisane równaniami 1.13 i 1.14. Relaksację poprzeczną, czyli zanik składowej M_{\perp} można obserwować bezpośrednio. Obracająca się składowa M_{\perp} powoduje wyindukowanie się siły elektromotorycznej w cewce (Rysunek 1.2). Sygnał swobodnej precesji (FID, *ang. Free Induction Decay*) obserwowany z układu wirującego $X'Y'Z$ dla jednorodnej próbki ciekwej można opisać równaniem:

$$\text{FID}(t) = \exp\left(-\frac{t}{T_2^*}\right) \quad 1.16$$

gdzie: T_2^* - czas relaksacji poprzecznej uwzględniający procesy termodynamiczne i wpływ niejednorodności pola magnetycznego, $T_2^* < T_2$.



Rysunek 1.2: (A) Powstawanie sygnału swobodnej precesji (FID) w układzie. (B) Zależność napięcia indukowanego w cewce od czasu.

Czasy relaksacji podłużnej i poprzecznej są cechami charakterystycznymi badanej tkanki i dlatego wykorzystywane są w diagnostyce. Na zmianę czasów relaksacji mogą mieć wpływ zmiany strukturalne budowy wynikające z procesów chorobotwórczych a także zmiany dynamiczne związane z przepływami wewnątrztkankowymi [47], co przekłada się na wartość obserwowanego sygnału. Parametry sekwencji można tak dobrać by obrazy były zależne (ważone) od czasów relaksacji.

Dla niejednorodnych próbek składających się z podukładów o różnych czasach T_2 różnica sygnałów narasta z czasem trwania sygnału FID, co może być wykorzystane w obrazowaniu do manewrowania kontrastem T_2 lub T_2^* uzyskiwanych obrazów.

Dla czasu T_1 , kolejne wzbudzenia próbki dokonywane są z reguły po czasie kilkukrotnie dłuższym od czasu relaksacji podłużnej próbki w celu zapewnienia maksymalnego odrostu magnetyzacji i co za tym idzie intensywności sygnału. Możliwe jest też ponowne wzbudzenie próbki we wcześniejszym momencie, które spowoduje, że intensywność sygnału uzyskanego z próbki będzie mniejsza. Takie działanie pozwalają na manipulację kontrastem obrazu MR [48], w tym wypadku ważenie przez czas T_1 .

1.2.1. POMIAR CZASU T_2

Podstawowym sposobem pomiaru czasu relaksacji T_2 jest sekwencja z wykorzystaniem echa spinowego (SE). W tej sekwencji wykorzystuje się impuls $\pi/2$ odwracający magnetyzację do płaszczyzny XY, a następnie stosuje się impuls π . Wielokrotne użycie impulsu π (sekwencja CPMG lub multi-echo) [45] pozwala na pomiar czasu T_2 .

Po zastosowaniu impulsu $\pi/2$ pojawia się składowa M_{\perp} wirująca w płaszczyźnie XY i indukująca sygnał FID w cewce nadawczo – odbiorczej. W trakcie ruchu M_{\perp} dochodzi do jej rozfazowania. Poszczególne magnetyzacje elementarne precesują z różnymi prędkościami, do czego przyczyniają się niejednorodności pola magnetycznego, oddziaływania pomiędzy spinami oraz ruch dyfuzyjny atomów [46]. Impuls π zastosowany po czasie τ od impulsu $\pi/2$, dokonuje reorganizacji elementarnych magnetyzacji. Fazy wszystkich składowych zostaną zmienione o 180° . Składowe o większej prędkości, wyprzedzające inne o pewien kąt, będą teraz opóźniać się o ten sam kąt przy zachowaniu prędkości. Po czasie τ dojdzie do wyrównania ruchu magnetyzacji elementarnych i indukcji sygnału zwanego echem spinowym w cewce. Obwiednia echa spinowego jest symetryczna, ponieważ proces narastania sygnału FID i jego zaniku są spowodowane tymi samymi czynnikami.

W przypadku kilkukrotnego stosowania impulsu π , kolejne sygnały FID będą się charakteryzowały zmniejszającą się amplitudą ze względu na proces relaksacji T_2 . Użytkujemy ciąg ech spinowych, z których obwiedni można wyznaczyć czas relaksacji T_2 :

$$M_{\perp} = M_0 e^{-t/T_2} \quad 1.17$$

Narastanie i zanik poszczególnych ech jest opisywane czasem T_2^* . Czas T_2^* uwzględnia czynniki wpływające na proces relaksacji, w tym niejednorodności głównego pola magnetycznego oraz lokalne zmiany pola magnetycznego indukowane przez momenty magnetyczne innych nukleonów lub elektronów znajdujących się w próbce.

1.2.2. POMIAR CZASU T_1

Pomiaru czasu relaksacji T_1 zwanego spinowo – sieciowym można dokonać poprzez zastosowanie impulsów π i $\pi/2$. Jest to metoda wykorzystująca odwracanie i przyrost magnetyzacji (IR *ang. Inversion Recovery*). Istniejącą w stanie równowagi magnetyzację odwraca się impulsem π . Po odwróceniu, wektor magnetyzacji rozpoczyna proces powrotu do stanu równowagi. Względna wartość składowej M_z , po czasie TI od inwersji (*ang. Inversion Time*), można zmierzyć stosując impulsu $\pi/2$. Taki impuls spowoduje przerzucenie magnetyzacji do płaszczyzny XY, dzięki czemu możliwy będzie pomiar napięcia indukowanego w cewce. Od czasu TI zależy, w jakim stopniu składowa M_z zdoła odrosnąć i jaka będzie początkowa wartość sygnału FID po inwersji. Im dłuższy czas TI tym wyższa wartość M_z . Stosując różne czasy inwersji TI można wykreślić zależność M_z od czasu oraz wyznaczyć wartość czasu T_1 :

$$M_z = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad 1.18$$

1.3. GRADIENTY POLA GŁÓWNEGO, PRZESTRZEŃ K

Podstawowym polem magnetycznym wykorzystywanym w obrazowaniu MR jest silne polaryzujące pole \vec{B}_0 wytwarzane przez magnes. Ważnym parametrem tego pola jest jego jednorodność. Brak jednorodności powoduje, że jądra o tym samym współczynniku γ mają różne wartości częstości rezonansowej (wzór 1.2). W celu likwidacji niejednorodności pola \vec{B}_0 pochodzących od magnesu wprowadza się cewki korekcyjne.

Z drugiej strony, wprowadzając znaną zmianę pola magnetycznego w pewnej objętości próbki i tym samym wpływając na wartość rezonansową badanych jąder, można uzyskać przestrzenną lokalizację sygnału pochodzącego z tej objętości. Do tego celu używa się gradientu pola magnetycznego. Cewki produkujące gradient wprowadzają liniową zmienność pola \vec{B}_0 w danym kierunku. Zazwyczaj stosuje się trzy pary wzajemnie prostopadłych cewek, tak by zapewnić zmianę w każdym kierunku układu. Wartość pola magnetycznego takiego układu wyraża się wzorem:

$$B = B_0 + \vec{G}\vec{r} \quad 1.19$$

gdzie: \vec{r} - odległość punktu od początku układu współrzędnych, \vec{G} - gradient. Zmianie ulega wyrażenie na częstość rezonansową:

$$\omega(x, y, z) = \gamma(B_0 + G_x x + G_y y + G_z z) \quad 1.20$$

Dzięki takiej zmianie wartości częstości rezonansowej możliwa jest identyfikacja przestrzenna każdego punktu badanej próbki. W praktyce stosuje się inną nomenklaturę gradientów: gradienty warstwy (G_s), częstości (G_r) i fazy (G_p), będące kombinacjami gradientów G_x , G_y i G_z .

W cewce odbiorczej zbierany jest sygnał generowany przez magnetyzację poprzeczną próbki [18]:

$$S(t) = \int M_{\perp}(\vec{r}) B_{\perp}(\vec{r}) e^{-i\varphi(\vec{r}, t)} d^3 r \quad 1.21$$

gdzie: $M_{\perp}(\vec{r})$ - funkcja zespolona magnetyzacji, $B_{\perp}(\vec{r})$ - funkcja zespolona indukcji magnetycznej, $\varphi(\vec{r}, t) = \gamma \int_0^t \vec{r} \vec{G}(t') dt'$ - faza sygnału. Wprowadzając wektor $\vec{k}(t)$:

$$\vec{k}(t) = \frac{\gamma}{2\pi} \int_0^t \vec{G}(t') dt' \quad 1.22$$

i podstawiając równanie 1.22 do równania 1.21 otrzymujemy:

$$S(t) = \int M_{\perp}(\vec{r}) B_{\perp}(\vec{r}) e^{-i2\pi\vec{k}(t)\vec{r}} d^3 r \quad 1.23$$

Można zauważyć, że sygnał $S(t)$ jest transformatą Fouriera funkcji $M_{\perp}(\vec{r}) B_{\perp}(\vec{r})$, natomiast wektor $\vec{k}(t)$ jest fourierowską zmienną sprzężoną do wektora położenia \vec{r} . Przestrzeń k zawierająca wektor $\vec{k}(t)$ jest macierzą w przestrzeni odwrotnej. Elementami przestrzeni k są dyskretne wartości sygnału $S(t)$ otrzymane z próbki w obecności gradientów [49]. Ruch wektora $\vec{k}(t)$ kreśli ślad w przestrzeni k , który nazywany jest trajekcją i określa sposób zapisu elementów macierzy. Ilością i położeniem punktów przestrzeni k można manipulować zmieniając czas trwania gradientu lub zmieniając siłę gradientu bez zmiany czasu jego trwania. Z danych zgromadzonych w przestrzeni k poddanych odwrotnej transformacie Fouriera uzyskuje się obraz MR. Poprawna rekonstrukcja obrazu zależy od sposobu wypełnienia macierzy k . Przyjmuje się, że optymalna długość kroku w przestrzeni k powinna być porównywalna do odwrotności pola widzenia (FOV, ang. *Field Of View*) [18].

W trakcie pojedynczego pomiaru po jednokrotnym wzbudzeniu warstwy zazwyczaj zapisywana jest jedna linia w osi OX macierzy k . Wybór tej linii jest zdefiniowany

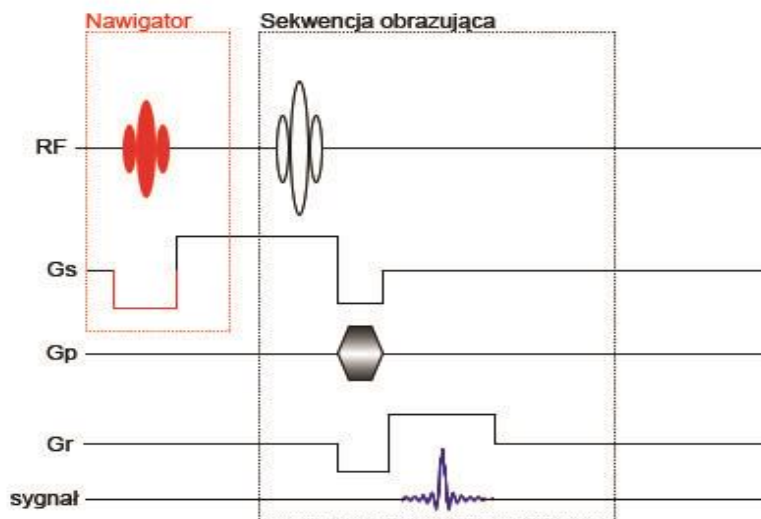
przez wcześniej użyty gradient G_p . W wierszach macierzy k (oś OX) kodowana jest informacja o częstościach, natomiast w kolumnach (oś OY) informacja o fazie sygnału. Elementy macierzy k otrzymane w trakcie działania gradientów o małych wartościach niosą informację o kontraście obrazu a także o stosunku sygnału do szumu [50]. Natomiast elementy uzyskane w trakcie trwania gradientu o wysokiej wartości niosą informacje o rozdzielczości, definiując detale obrazu takie jak krawędzie.

1.4. SZYBKE SEKWENCJE OBRAZOWANIA

1.4.1. FLASH

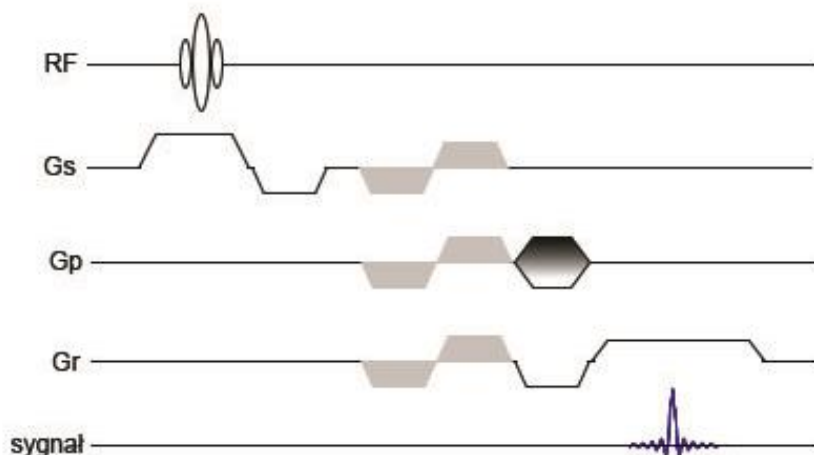
Sekwencja FLASH (*ang. Fast Low Angle SHot*) jest techniką echa gradientowego, w której resztkowa magnetyzacja pozostająca po pojedynczym wzbudzeniu jest usuwana [49]. Składa się z wielokrotnie powtarzanego modułu wzbudzenia – akwizycji charakterystycznego dla uzyskania FID z dodatkowymi gradientami kodującymi sygnał w przestrzeni. Czas TR pomiędzy impulsami RF w sekwencji FLASH jest znacznie krótszy od czasu relaksacji T_1 , co pozwala skrócić całkowity czas pomiaru. W układzie poddanym działaniu takich impulsów RF (ich ilość zależy od TR i kąta obrotu α) powstanie stanu równowagi dynamicznej (*ang. steady-state*). Oznacza to identyczne wartości wektora magnetyzacji w takich samych interwałach czasowych po każdym impulsie RF [45]. Do grupy sekwencji FLASH zaliczają się IntraGateFLASH™ i FLOWMAP stosowane w badaniach opisywanych w tej pracy.

Sekwencja IntraGateFLASH™ (Rysunek 1.3) była oryginalnie opracowana do badań serca. W tej pracy wykorzystano ją do dynamicznych pomiarów MR po podaniu kontrastu. Zewnętrzne bramkowanie nie jest wymagane, ponieważ sekwencja zapewnia bramkowanie poprzez zastosowanie dodatkowego sygnału – tzw. nawigatora. Informacja zebrana z nawigatora nie jest kodowana przestrzennie. Z Rysunek 1.3 widać, że impuls RF działa jedynie z gradientem wyboru warstwy w celu wybrania położenia nawigatora. Z czasowych zmian amplitudy sygnału zebranego z nawigatora można określić rytm pracy serca i rytm oddechowy [51]. Sekwencja umożliwia retrospektywną rekonstrukcję obrazów MR, podczas której poszczególne linie macierzy k mogą zostać przeorganizowane zgodnie z rytmem pracy serca i oddechem. Umożliwia to również późniejszą (po zakończonej akwizycji obrazu) edycję ilości klatek tzw. trybu *cine*. Konieczne jest jednak, aby ilość powtórzeń była znacznie większa od ilości rekonstruowanych klatek, ponieważ w trakcie reorganizacji macierzy k można stracić część zebranych danych.



Rysunek 1.3: Sekwencja IntraGateFLASH™. Sekwencja oparta o echo gradientowe poprzedzone impulsem wysycającym (nawigator). Nawigator kodowany jest jedynie gradientem G_s w celu wyboru warstwy.

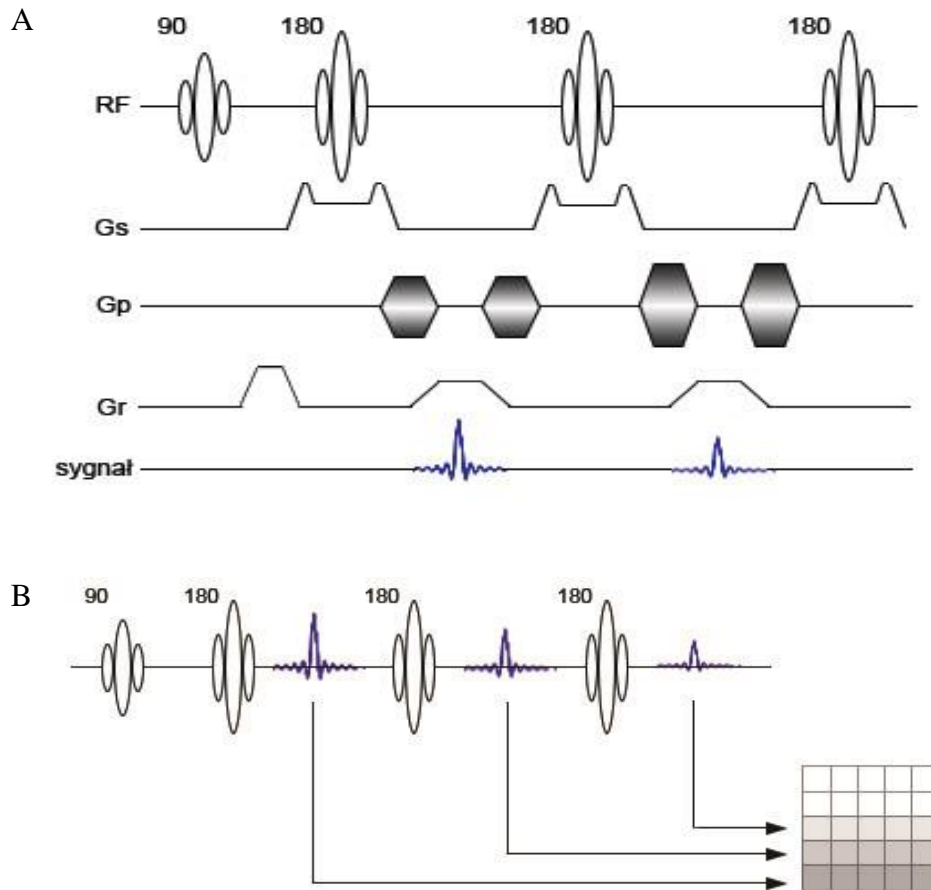
Sekwencja FLOWMAP (Rysunek 1.4) bazuje na echu gradientowym z kompensacją przepływu. Zmianę sygnału zależną od przepływu krwi uzyskuje się poprzez zastosowanie bipolarnych gradientów zmienianych pulsacyjnie podczas okresu kodowania. Możliwe jest przestrzenne kodowanie prędkości przez dodanie gradientów bipolarnych do wszystkich kierunków gradientów G_s , G_p i G_r lub kodowanie w jednym kierunku (np. w kierunku naczyń krwionośnych poprzez dodanie gradientu bipolarnego do gradientu wyboru warstwy). Obraz prędkości kodowany w jednym kierunku jest wyznaczany z różnicy faz obrazów zarchiwizowanych dla przeciwnych polarności gradientu. W przypadku przestrzennego kodowania składowe prędkości są wyznaczone według schematu Hadamarda [52]. Końcowy obraz jest przeskalowany w jednostkach prędkości [cm/s].



Rysunek 1.4: Sekwencja FLOWMAP oparta o echo gradientowe [50]. Bipolarne gradienty kodujące zaznaczono na szaro. Pokazano kodowanie prędkości przepływu krwi w trzech kierunkach.

1.4.2. RAREST

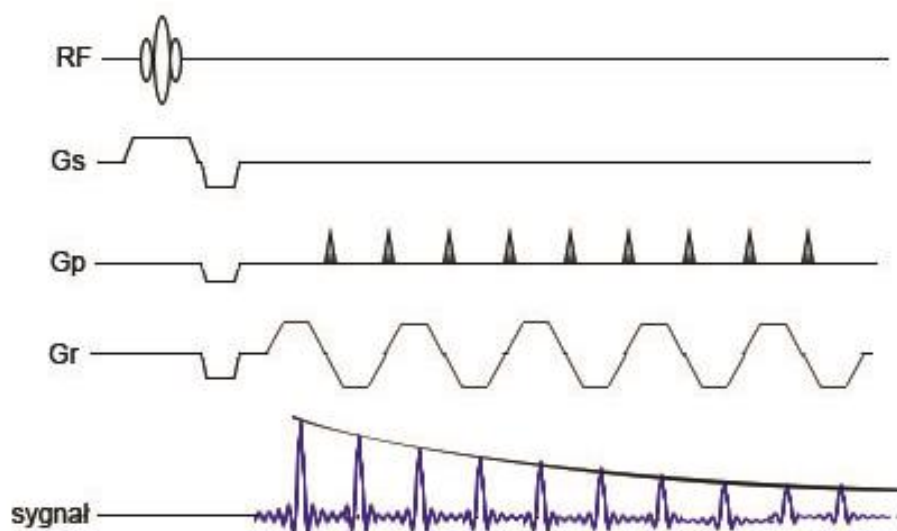
Sekwencji RAREst (*ang. Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement with short echo time*) [53] jest sekwencją bazującą na wielokrotnym pomiarze echa spinowego. W sekwencji wykorzystuje się kilka impulsów π w celu wygenerowania kolejnych echa spinowych (Rysunek 1.5A), które dzięki różnym kodowaniom gradientu G_p , wykorzystywane są do zapisu linii w przestrzeni k tego samego obrazu (Rysunek 1.5B). Takie postępowanie przyspiesza akwizycję obrazu, np. w przypadku zastosowania czterech impulsów π można zapisać cztery linie w przestrzeni k skracając akwizycję czterokrotnie w porównaniu do sekwencji wykorzystującej tylko jedno echo spinowe. Ilość możliwych do osiągnięcia echa spinowych jest określana mianem długości ciągu echa (ETL, *ang. Echo Train Length*) i zależy od czasu relaksacji poprzecznej T_2 badanej próbki oraz czasu, jaki upływa pomiędzy kolejnymi szczytami echa [18]. W związku z malejącą amplitudą sygnału pochodzącego od dalszych echa oraz rosnącym czasem echa, linie w przestrzeni k mają różne ważenie. Może być to wykorzystane w celu uzyskania odpowiedniego obrazu MR. W przypadku zapisu pierwszych echa, jako centralnych linii przestrzeni k można uzyskać obraz ważony czasem T_1 . Natomiast w przypadku zapisu ostatnich echa w centrum przestrzeni k otrzymany obraz będzie ważony czasem T_2 . Inne sposoby zapisu echa pozwolą na sterowanie właściwościami obrazu.



Rysunek 1.5: (A) Schemat sekwencji RAREst. Przed i po każdym gradiencie warstwy (G_s) używane są gradienty korekcyjne (*ang. crusher*) w celu zachowania kształtu echa. (B) Echa uzyskiwane po kolejnych impulsach π zapisywane są, jako linie przestrzeni k pojedynczego obrazu.

1.4.3. EPI

Wybrana do obrazowania sekwencja EPI (*ang. Echo Planar Imaging*) bazuje na echu gradientowym [18]. Sekwencja EPI pozwala na bardzo szybką akwizycję sygnału, w czasach krótszych od sekundy. Po każdym impulsie RF, zbierany jest ciąg ech generowany poprzez oscylacje gradientu G_r (Rysunek 1.6). Każde echo jest kodowane gradientem G_p , co pozwala na wypełnienie całej przestrzeni k. Możliwość uzyskania obrazu z pojedynczego sygnału FID skutkuje małą rozdzielczością przestrzenną obrazu. EPI jest sekwencją podatną na wystąpienie artefaktów [50].



Rysunek 1.6: Sekwencja EPI [50]. Po jednokrotnym wzbudzeniu magnetyzacji próbki, produkowane są echa ważone czasem relaksacji T_2^* . Sygnał uzyskiwany jest poprzez zastosowanie ciągu bipolarnych gradientów G_r . Kodowanie gradientem G_p pozwala zapisywać kolejne linie przestrzeni k.

1.5. TECHNIKI OBRAZOWANIA PERFUZJI I PRZEPŁYWU

1.5.1. POMIAR PERFUZJI

Pomiary perfuzji technikami obrazowania MR oparte są głównie o badania z zastosowaniem zewnętrznego (np. środek kontrastowy oparty o Gd) lub wewnętrznego kontrastowania (protony). Pośród pomiarów z wewnętrznym kontrastowaniem można wyróżnić metodę ASL opartą o znakowanie spinów krwi tętniczej napływającej do tkanki [15]. Znakowanie magnetyzacji krwi może być wykonane przez wysycanie lub odwracanie. Dodatkowo istnieją ciągłe i pulsacyjne metody ASL. Pulsacyjny ASL pozwala na skrócenie czasu pomiaru, ponieważ mierzy sygnał od pewnej objętości znakowanej krwi przechodzącej przez tkankę bez potrzeby wytworzenia stanu równowagi dynamicznej w tkance jak ma to miejsce w przypadku metod ciągłych [16, 18].

Podstawową definicją perfuzji (P , [mL/min/100g]) jest stosunek szybkości przepływu krwi (F , [mL/min]) do masy badanego narządu (W , [100g]) [18]:

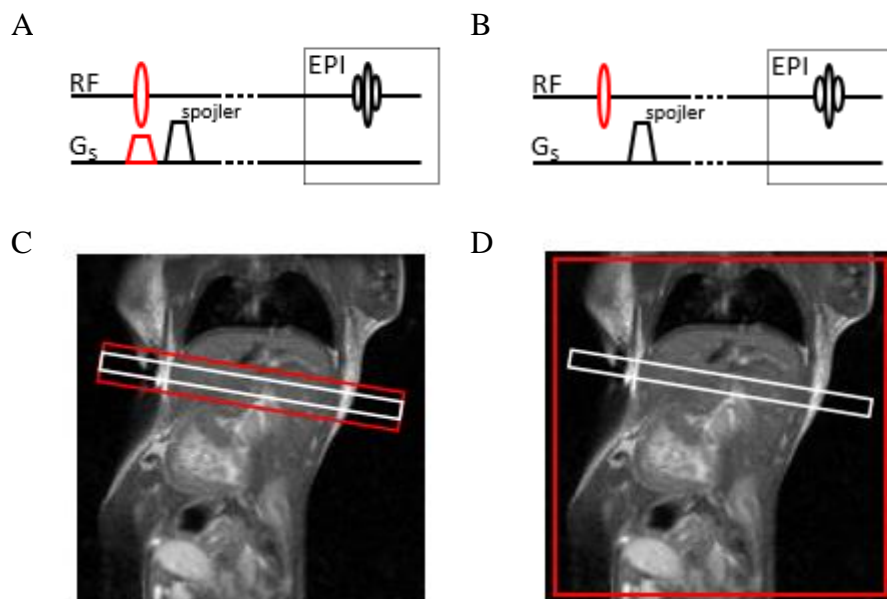
$$P = \frac{F}{W} \quad 1.24$$

Jednak w obrazowaniu MR stosuje się inną definicję:

$$f = \rho P \quad 1.25$$

gdzie: f – szybkość perfuzji [min^{-1}], ρ – gęstość tkanki [100g/mL]. Obie definicje używane są wymiennie.

W obrazowaniu MR badanie perfuzji sprowadza się do zbadania zmiany sygnału pomiędzy obrazem kontrolnym i obrazem znakowanym. Na Rysunek 1.7 przedstawiono jeden ze sposobów przeprowadzenia badania ASL z wykorzystaniem sekwencji FAIR-EPI (*ang. Flow-sensitive Alternating Inversion Recovery-EPI*) opartej o technikę odwrócenia i odrostu magnetyzacji (Rozdział 1.2.2) [54]. W tej metodzie uzyskiwane są dwa obrazy MR, pierwszy po zastosowaniu selektywnego impulsu RF a drugi po zastosowaniu nieselektywnego impulsu [18]. Warstwa znakowania pokrywa się z warstwą obrazującą a jej profil jest szerszy w celu zapewnienia jednorodnej inwersji (Rysunek 1.7C). Natomiast obraz kontrolny można uzyskać poprzez zastosowanie takiego samego impulsu RF jednak bez obecności gradientu wyboru warstwy, co skutkuje odwróceniem magnetyzacji w całej objętości cewki (Rysunek 1.7B, D). W odpowiednim czasie po sekwencji znakującej zbierany jest sygnał z wybranej warstwy.



Rysunek 1.7: Pomiar ASL, sekwencja FAIR-EPI. Tworzenie obrazu znakowanego i kontrolnego. Impuls RF odwracający magnetyzację (czerwony) wybierany jest w obecności gradientu warstwy G_s w przypadku obrazu selektywnego (A) oraz bez G_s w przypadku obrazu kontrolnego (B). (C) Obraz znakowany – warstwa obrazująca (biała) z selektywnym odwróceniem magnetyzacji (czerwona). (D) Obraz kontrolny – z globalnym odwróceniem magnetyzacji.

Zależność magnetyzacji podłużnej od czasu w obecności perfuzji, przy założeniach, że czas relaksacji T_1 krwi i tkanki są takie same oraz że efekty transferu magnetyzacji są skompensowane, można opisać zmodyfikowanym równaniem Blocha [15]:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{M_0 - M}{T_1} + fM_b - \frac{f}{\lambda}M \quad 1.26$$

gdzie: M – magnetyzacja podłużna w tkance, M_0 – wartość równowagowa magnetyzacji, M_b – magnetyzacja w krwi napływającej, f – perfuzja, λ – współczynnik zawartości wody w krwi i tkance. Z równania 1.26 widać, że czas relaksacji podłużnej tkanki powiększył się o czynnik f/λ :

$$\frac{1}{T_1'} = \frac{1}{T_1} + \frac{f}{\lambda} \quad 1.27$$

Posiadając mapy T_1 wykonane po zastosowaniu impulsów znakujących oraz mapy kontrolne można wyznaczyć perfuzję. Zmiana sygnału pomiędzy oboma obrazami jest niewielka, ok 1 – 2% [18].

1.5.2. DCE-MRI

Środki kontrastowe, skracające czas relaksacji badanej tkanki, znalazły szerokie zastosowanie w obrazowaniu MR [19, 55-57]. CA muszą charakteryzować się dużymi właściwościami magnetycznymi, brakiem skutków ubocznych oraz biodystrybucją pozwalającą na rozróżnienie tkanek. Częsteczka CA zazwyczaj zbudowana jest z rdzenia zawierającego atomy (molekuły) o właściwościach magnetycznych oraz otoczki, zapewniającej biozgodność.

CA mogą bazować na atomach gadolinu, cząsteczkach tlenku żelaza czy atomach manganu. CA, w zależności od swojej budowy, pozwalają na badanie właściwości różnych tkanek. W Tabeli 1-1 zebrano przykładowe CA używane w badaniach wątroby. CA bazujące na tlenku żelaza ((U)SPIO, *ang. (Ultrasmall) SuperParamagnetic Iron Oxide*) powodują zwiększenie kontrastu na obrazach T_2 -ważonych, natomiast CA bazujące na Gd – zwiększenie kontrastu na obrazach T_1 -ważonych.

Tabela 1-1: Przykładowe środki kontrastowe wykorzystywane w obrazowaniu MR wątroby, ich zastosowania i dominujący efekt, jaki wywołują. Feridex®, Teslascan® i Sinerem® zostały wycofane z użytku klinicznego. Źródła: [19, 55, 57-59], <http://www.mr->

tip.com/, <http://www.drugs.com/>, <http://www.magnetic-resonance.org/ch/13-01.html>,
dostęp 18/05/2016.

Nazwa (rdzeń)	Cel	Zastosowanie	Dominujący efekt
Primovist™ (Gd3+)	Hepatocyty	Funkcje hepatocytów, badanie dróg żółciowych,	Skrócenie T ₁
MultiHance® (Gd3+)	Hepatocyty, EES	Funkcje hepatocytów, zmiany nowotworowe, MRA	Skrócenie T ₁
Teslascan® (Mn2+)	Hepatocyty	Zmiany nowotworowe, funkcje hepatocytów, badanie dróg żółciowych	Skrócenie T ₁
Feridex® (Fe2+/Fe3+)	RES	RES, zmiany nowotworowe	Skrócenie T ₂ * i T ₂
Sinerem® (Fe3+/Fe2+)	RES	Węzły chłonne	Skrócenie T ₂ *, T ₂ i T ₁

Skróty: EES – przestrzeń międzykomórkowa-międzynaczyniowa, MRA – angiografia MR, RES – układ fagocytarny.

Atomy lub jony stanowiące rdzeń cząsteczek CA wymienionych w Tabeli 1-1 mają właściwości para-, superpara-, lub ferromagnetyczne. Oddziałują zazwyczaj na oba czasy relaksacji, jednak podawane w odpowiednich dawkach wywierają silniejszy wpływ na któryś z procesów relaksacji. Na ich orbitach znajdują się niesparowane elektrony, które powodują, że CA ma własny niezerowy moment magnetyczny, np. silnym paramagnetykiem jest atom gadolinu, który posiada 7 niesparowanych elektronów. Elektronowy moment magnetyczny jest większy od momentu jądrowego, dlatego CA może oddziaływać na otaczające go atomy wodoru podczas obrazowania MR [59]. Dzieje się tak, ponieważ CA wytwarza lokalne zmiany pola magnetycznego, na które reagują właśnie atomy wodoru [59]. Oddziaływanie to ma krótki zasięg (SPIO i USPIO mają większy zasięg od kontrastów bazujących na Gd), który jednak rozszerza się na skutek wymiany protonów w bezpośrednim otoczeniu CA [50].

Wpływ CA na czas relaksacji opisuje się wzorem [60]:

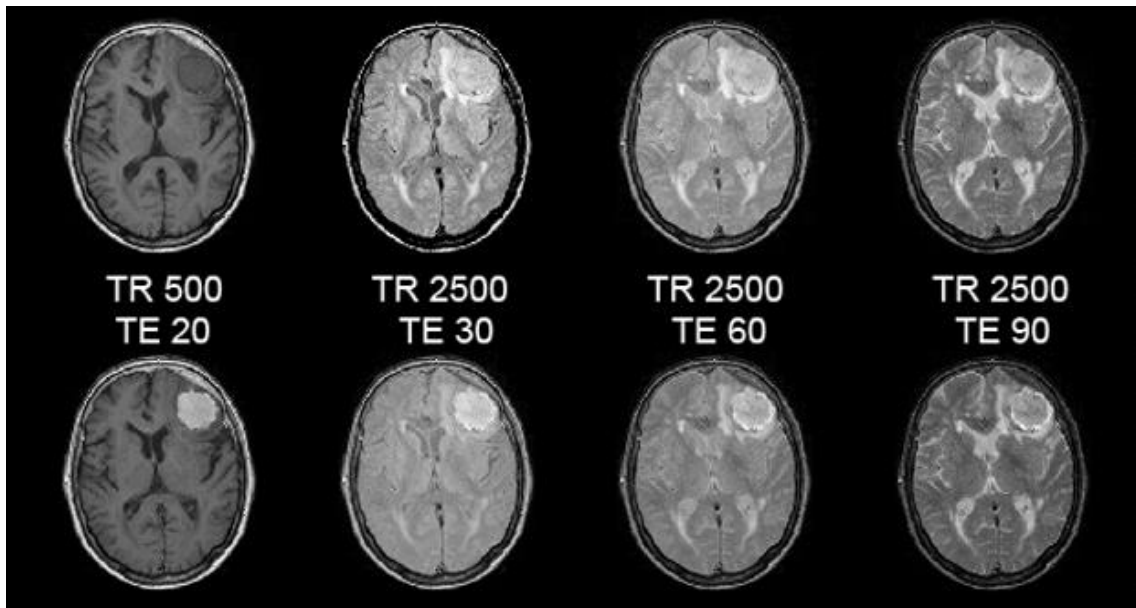
$$\frac{1}{T_i'} = \frac{1}{T_i} + r_i C \quad 1.28$$

gdzie: T_i' – czas relaksacji i po podaniu CA [ms], T_i – czas relaksacji tkanki [ms], r_i – relaksacyjność CA [mL/mmol/ms], C – stężenie CA [mmol/mL].

Sekwencje obrazujące stosowane w DCE-MRI muszą odzwierciedlać efekty wywołane przez CA w magnetyzacji badanej tkanki (Rysunek 1.8), np. obrazy echa

spinowego z krótkim TR i TE oraz obrazy echa gradientowego z krótkimi TR i wysokimi kątami obrotu magnetyzacji najlepiej pokażą efekty podania kontrastu gadolinowego.

Z kinetyki środka kontrastowego *in vivo* można wnioskować o parametrach takich jak perfuzja czy uszkodzenie tkanki [23, 29, 61]. Stąd istotnym aspektem sekwencji pomiarowej w badaniach dynamicznych, jest możliwość do uzyskania rozdzielczości czasowej i przestrzennej obrazów. Zwłaszcza rozdzielczość czasowa zebranych danych jest decydująca w pomiarach modeli zwierzęcych.

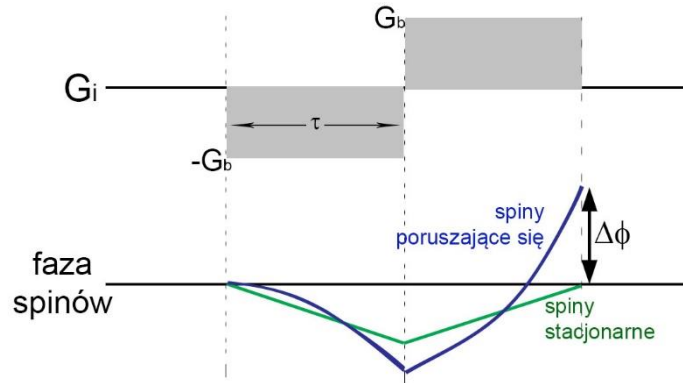


Rysunek 1.8: Obrazy mózgu z widoczną zmianą nowotworową (oponiak) wykonane sekwencją echa spinowego. Wyjściowe obrazy (górny rząd) i po podaniu kontrastu gadolinowego (dolny rząd). Widoczna zmiana kontrastowania w zależności od czasu repetycji (TR) i czasu echa (TE). Obrazy są ważone czasem T_1 (pierwsza kolumna), gęstością protonów (druga kolumna) oraz czasem T_2 (trzecia i czwarta kolumna). Źródło: [48].

1.5.3. POMIAR PRĘDKOŚCI METODĄ KONTRASTU FAZY

Pomiaru prędkości i przepływu krwi przez naczynie krwionośne można dokonać stosując technikę PC-MRI [18] oparta o pomiar echa gradientowego. PC-MRI wykorzystuje gradienty kodowania przepływu. Zazwyczaj są to gradienty bipolarne, składające się z dwóch części o identycznych polach powierzchni i przeciwnych polarnościach (Rysunek 1.4).

W metodzie PC-MRI obserwuje się różnicę fazy ($\Delta\varphi$) spinów w warstwie obrazowania (Rysunek 1.9). $\Delta\varphi$ jest proporcjonalna do prędkości spinów (v), dlatego obserwuje się ją tylko dla spinów poruszających się. Spiny stacjonarne nie odczuwają wpływu gradientów bipolarnych, ponieważ wpływy od obu polarności gradientu znoszą się.



Rysunek 1.9: Zastosowanie gradient bipolarnego o wartości G_b i czasie trwania τ (szare obszary) do zakodowania prędkości w kierunku gradientu G_i . Zmiana fazy widoczna jest tylko w przypadku spinów poruszających się.

Faza spinów poruszających się z prędkością v w kierunku gradientu G_i poddanych działaniu gradientu G_b wyniesie [49]:

$$\varphi_{vi\pm} = \mp \gamma G_b v_i \tau^2 \quad 1.29$$

Przy czym, faza φ_{vi} zmienia znak, jeśli negatywna polarność gradientu G_b występuje pierwsza. Równanie 1.29 pozwoliłoby na wyznaczenie prędkości przepływających spinów gdyby na ich fazy nie miały wpływu inne źródła (niejednorodności pola B_0 , wpływ impulsów RF). Wpływy te można usunąć poprzez wykonanie dwóch obrazów i ich odjęcie [49].

Maksymalna faza, którą można wykorzystać z obrazie MR jest równa π . Z tego względu, istnieje maksymalna prędkość ($VENC$), którą można zakodować dla gradientu G_b :

$$VENC = \frac{\pi}{\gamma G_b \tau^2} \quad 1.30$$

W przypadku wybrania za małej wartości $VENC$, fazy spinów poruszających się szybciej będą miały przypisane niewłaściwe wartości (nastąpi zawinięcie fazy). Dobór wartości $VENC$ wpływa na czułość pomiaru.

Mapy prędkości rekonstruuje się, wykorzystuje się różnice kontrastów fazowych pomiędzy dwoma zmierzonymi obrazami:

$$v = \frac{\Delta\varphi}{\pi} VENC \quad 1.31$$

Z map prędkości możliwe jest również zbadanie kierunku prędkości przepływu krwi, ponieważ zmiana fazy może przyjąć wartość ujemną lub dodatnią w zależności od kierunku prędkości.

PC-MRI pozwala na bardzo dobrą supresję sygnału pochodzącego od tkanek. Główną wadą tej metody jest dość długi czas pomiaru, zwłaszcza w przypadku zastosowania gradientów kodujących we wszystkich kierunkach.

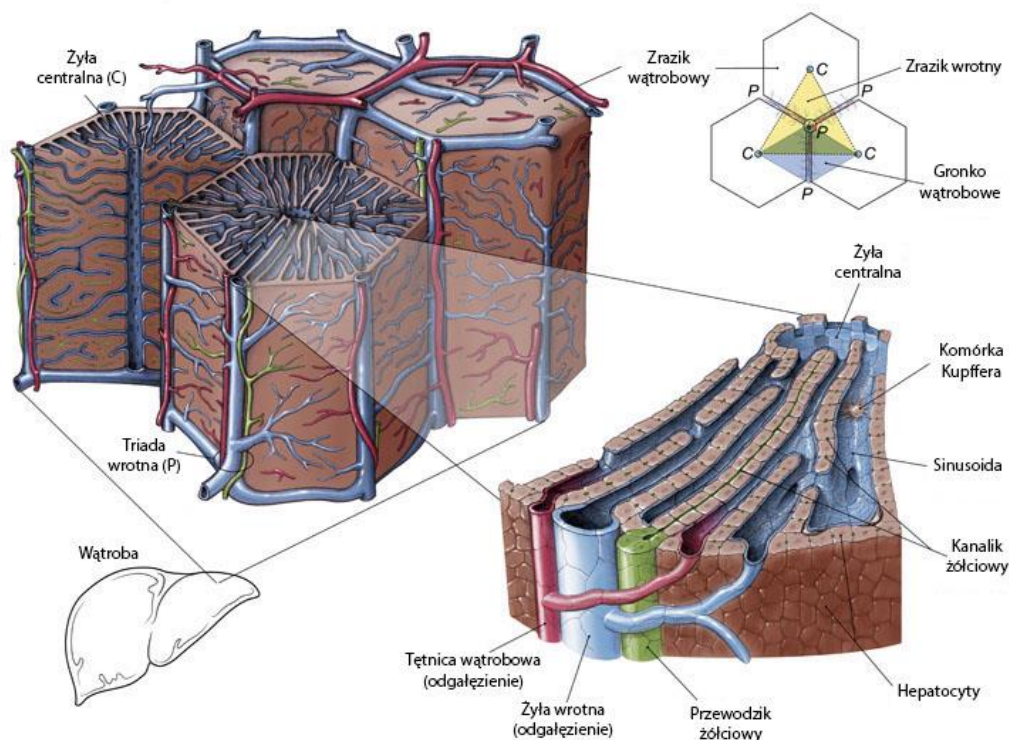
2. WĄTROBA

Wątroba jest największym organem wewnętrznym. Jej waga może stanowić do 2.5% wagi ciała dorosłego człowieka [11, 62].

2.1. BUDOWA I FUNKCJE

Budowę wątroby przedstawiono na Rysunek 2.1. Anatomicznie dzielona jest na 8 segmentów wyznaczonych przez rozgałęzienia żyły wrotnej. Żyłę wrotnej towarzyszą odgałęzienia tętnicy wątrobowej, przewodów żółciowych i naczyń limfatycznych, tworząc triady wątrobowe. Miąższ wątrobowy zbudowany jest z komórek wątrobowych – hepatocytów, które zorganizowane są w blaszki, a te z kolei w sześciokątne struktury będące podstawową jednostką anatomiczną wątroby – zraziki. Pomiedzy blaszkami znajdują się zatoki naczyń krwionośnych (sinusoidy), którymi krew przepływa od triad do żyły centralnej znajdującej się w środku zrazika. Pomiedzy zatokami a hepatocytami znajdują się przestrzenie Dissego, będące miejscem wymiany substancji pomiędzy komórkami wątroby a krwią.

Hepatocyty częścią powierzchni przylegają do siebie (strefa wydzielnicza) a częścią są otwarte na zatoki naczyń krwionośnych (strefą resorpcyjną). Oprócz hepatocytów w wątrobie obecne są: LSEC, komórki Browicza–Kupffera oraz gwiaździste komórki Ito [11, 63]. LSEC i komórki Kupffera należą do układu siateczkowo–śródbłonkowego (RES, *ang. ReticuloEndothelial System*).



Rysunek 2.1: Mikroskopowa budowa wątroby. W górnej części rysunku pokazane są zraziki wątrobowe – sześciokątne struktury z żyłą centralną w środkowej części zrazika i triadami wątrobowymi w kątach zrazika. W dolnej części rysunku, pokazano w powiększeniu blaszki zbudowane z hepatocytów z naczyniami zatokowymi (sinusoidami), którymi krew przepływa od triad wątrobowych do żyły centralnej, jednocześnie odżywiając komórki wątroby i będąc oczyszczaną z toksyn. Źródło: <http://illuminationstudios.com/archives/150/structure-of-a-hepatic-lobule>, data dostępu 2015/11, rysunek edytowany.

Wątroba pełni wiele funkcji w organizmie [64] do najważniejszych należą: wytwarzanie żółci, synteza cholesterolu, magazynowanie witamin i mikroelementów (głównie żelaza), filtracja toksyn, oraz gospodarka glukozowa.

Pęcherzyk żółciowy, gromadzący i zagęszczający żółć ma pojemność około 50 ml. Uwolnienie żółci następuje przez skurcze błony mięśniowej wywołane cholecystokiną [64].

2.2.KRAŻENIE

Całkowita objętość krwi przepływająca przez wątrobę dorosłego człowieka wynosi około 800 – 1200 mL/min [65]. Co stanowi 25 – 35 % pojemności minutowej serca

[11, 64]. Krew doprowadzana jest przez żyłę wrotną i tętnicę wątrobową a odprowadzana przez żyły centralne wpadające do żyły głównej dolnej.

2.2.1. MECHANIZMY REGULACJI PRZEPIYU KRWI

Przeptyw krwi w wątrobie jest regulowany na kilku poziomach [66]. Najbardziej ogólnym jest krążenie ogólnosystemowe i zmiany pracy mięśnia sercowego.

Żyła wrotna doprowadza do wątroby około 70% krwi. Jest to krew pochodząca z narządów trzewnych, w związku z czym jest bogata w mikroelementy i składniki odżywcze, natomiast uboga w tlen. Pozostałe 30 % doprowadzane jest tętnicą wątrobową. Krew w tętnicy jest bogata w tlen. Przyjmuje się jednak, że żyła wrotna jest głównym źródłem tlenu dla wątroby, ze względu na fakt, że dostarcza znacznie więcej krwi.

Drugim stopniem regulacji przepływu krwi w wątrobie jest system HABR (*ang. Hepatic Artery Buffer Response*), odpowiadający za stały poziom krwi napływającej do wątroby. Krążenie tętnicze jest dostosowywane do zaburzeń przepływu krwi wrotnej, w celu wyrównania przepływu do stałego poziomu [11, 67]. Krążenie tętnicze może skompensować 25 – 60 % krążenia wrotnego w przypadku jego zmniejszenia [65]. Głównym powodem istnienia HABR jest konieczność sprostanie zapotrzebowaniu wątroby na składniki odżywcze i tlen. Dodatkowo proces ten pomaga w kontroli funkcjonowania całego organizmu poprzez utrzymanie funkcji filtracyjnych wątroby na odpowiednim poziomie [11, 68]. HABR jest regulowany przez szereg czynników [65, 69]. Choroby jak i przeszczepy wątroby nie zaburzają istotnie jego funkcjonowania [65, 67, 68].

Trzecim poziomem regulacji perfuzji w wątrobie jest mikrokrażenie w naczyniach zatokowych. Na przepływ krwi w sinusoidach wątroby wpływ mają naczynioaktywne substancje odpowiedzialne za obkurczanie i rozszerzanie naczyń zatokowych [11, 66]. Za utrzymanie fizjologicznych poziomów tych substancji odpowiadają LSEC, komórki Kupffera i komórki Ito.

2.2.2. MIKROKRAŻENIE

Triady wątrobowe ulegają rozgałęzieniom na naczynia okołozrazikowe i zatokowe doprowadzając krew do zrazików i komórek wątrobowych. Końcowe naczynia okołozrazikowe mają średnicę 15–35 μm i długość 50–70 μm [17]. Arteriole zespolone z naczyniami wrotnymi, dają początek naczyniom zatokowym doprowadzając do nich wymieszaną tętniczo-żylną krew.

Struktura sinusoid zapewnia hepatocytom dostęp do krwi, która jest prowadzona od triad wątrobowych do żyły centralnej. Zatoki ulokowane są pomiędzy blaszkami zbudowanymi z hepatocytów (Rysunek 2.1). Czasami łączą się poprzez krótkie zatoki ułożone poprzecznie do blaszek. Typowo sinusoidy mają długość 250 μm i średnicę 7–15 μm [17].

Ściany naczyń zatokowych wyścielone są LSEC z charakterystycznymi fenestracjami, na które składa się od 10 do 50 porów. Rozmiar fenestracji waha się od 150 do 175 μm , zapewniając wysoką, ale selektywną przepuszczalność [11]. Fenestracje nie są stałym tworem śródbłonna [70]. Regulują przepuszczalność w sposób dynamiczny, ponieważ mogą być formowane w dowolnym miejscu sinusoidy. Mogą również zanikać. Większe fenestracje znajdują się w początkowych odcinkach sinusoid, mniejsze i liczniejsze w centralnej części zrazika. Dodatkowo na przepuszczalność fenestracji wpływ mają komórki krwi. Średnica ludzkiego erytrocytu to około 6 – 8 μm , limfocytu 6 – 15 μm , są to rozmiary porównywalne ze średnicą sinusoid. Podczas przepływu, komórki krwi mają tendencję do wciskania mikroelementów znajdujących się we krwi do przestrzeni Dissego [71].

2.3. OSTRY STAN ZAPALNY WĄTROBY

Ostry stan zapalny wątroby jest rzadką chorobą o gwałtownym przebiegu. Liczba zachorowań w krajach rozwiniętych notowana jest na 1 do 6 osób na milion [2]. ALF definiuje się, jako wieloorganowe zaburzenie, w którym obserwuje się martwicę hepatocytów oraz niewydolność pracy wątroby bez wcześniejszych przewlekłych chorób wątroby [1, 5, 72]. Może wystąpić encefalopatia. ALF rozwija się w ciągu 8 tygodni od wystąpienia czynnika chorobotwórczego [5].

Najczęstszymi przyczynami ALF są infekcja wirusowa (zapalenie wątroby typu A, B i E) oraz przedawkowanie leków (np. paracetamol). Do innych przyczyn zalicza się m.in.: zatrucie toksynami (np. grzybami), zaburzenia metaboliczne i niedokrwienne.

Objawy ALF są niespecyficzne, dlatego choroba jest trudna do zdiagnozowania i leczenia [2]. Działania podejmowane w trakcie leczenia są ukierunkowane na regenerację tkanki wątroby, przywrócenie jej funkcji oraz minimalizację komplikacji. Najskuteczniejszą i ostateczną formą terapii jest transplantacja wątroby [2].

2.3.1. ZMIANY STRUKTURALNE WĄTROBY

Rozwój ALF prowadzi do zmian strukturalnych wpływających na pogorszenie czynności wątroby i rozregulowanie pracy całego organizmu. W zapaleniu wirusowym o średnio ostrym przebiegu obserwuje się powiększenie wątroby i wzmożenie jej konsystencji. Dług tlenowy tkanki objętej procesem zapalnym prowadzi do nagromadzenia kwasów, zwiększenia ciśnienia osmotycznego i zatrzymania wody [73]. W mięszu pojawia się zlewna martwica hepatocytów lub martwica wielozrazikowa [74] jednak nasilenie zmian martwiczych nie musi być proporcjonalne do obrazu klinicznego. Widoczne są komórki balonowate oraz odczyny regeneracyjne [74]. Obserwuje się również nacieki granulocytów i limfocytów. Natomiast zmiany w ilości płytek krwi a także zmniejszenie syntezy czynników krzepnięcia i ich inhibitorów prowadzą do krwotoków [74]. Naczynia zatokowe są przepełnione krwią.

Znacznemu pogorszeniu ulega funkcja filtracji krwi z powodu utrudnionego wychwytu substancji rozpuszczonych w osoczu przez hepatocyty. Możliwe jest przekierowanie krwi wrotnej zawierającej toksyny do krążenia obwodowego przez połączenia żyłno-żyłne z pominięciem wątroby [74]. Dążenie do utrzymania funkcji na stałym poziomie przez zniszczoną wątrobę prowadzi do jej puchnięcia i uciskania na inne organy w jamie brzusznej.

2.3.2. ZMIANY PERFUZJI

Zaburzenia w wydzielaniu substancji odpowiedzialnych za obkurczanie naczyń krwionośnych są wskazywane, jako źródło zaburzeń perfuzji w ALF [3]. Pojawia się przekrwienie zapalne. Szybkość przepływu krwi spada, ponieważ naczynia krwionośne rozszerzają się. Zwiększa się przepuszczalność ściany naczyń, co z jednej strony jest korzystne (m.in. dostarczanie przeciwciał do terenu zapalenia, rozpuszczanie mas martwiczych) a z drugiej strony może być szkodliwe (m.in. zwężenia małych naczyń, rozsiew toksyn) [73]. Światło naczynia zatokowego może zostać zwężone przez puchnięcie komórek Ito.

2.3.3. AKTYWACJA LIMFOCYTÓW

W początkowej fazie wystąpienia ALF, wydzielane są mediatory prozapalne, które mają za zadanie spowodować aktywację LSEC i napływ limfocytów do miejsc zmienionych chorobowo. Mediatory (m.in. kachektyna (TNF α) i interleukiny (IL-1 α i β , IL-8)) doprowadzają do adhezji aktywnych limfocytów na powierzchni komórek śródbłonna. Dodatkowo powodują, że komórki limfocytów zwiększają swoją sztywność [75,

76] co skutkuje ich uwięzieniem w sinusoidach [11]. Do akumulacji limfocytów dochodzi również w naczyniach zebranych w triady wątrobowe. Jednak mechanizm powodujący ich gromadzenie jest inny od powyżej opisanego a polega głównie na mechanicznych interakcjach wspieranych przez specyficzne molekuly adhezji [11]. Zaktywowane limfocyty nie pozostają bez wpływu na pozostałe struktury wątroby, co powoduje powstanie błędnego koła oddziaływań pomiędzy komórkami.

Odpowiedź odpornościowa oraz niszczenie chorych komórek wątrobowych zachodzi dopiero po dodatkowym sygnale (często cytokiny CXCL) uwalnianym przez zdrowe, lecz sąsiadujące z chorymi, hepatocyty. Do automatycznej migracji leukocytów w głąb miąższu wątrobowego dochodzi tylko w nielicznych przypadkach [77].

2.4. ZWIERZĘCY MODEL OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY

Wybrany model ALF, indukowany podaniem ConA, jest modelem opartym o odpowiedź systemu odpornościowego. W szczególności w modelu aktywowane są limfocyty T [78], co odpowiada obrazowi klinicznemu w przypadku diagnozy tego schorzenia u człowieka [10].

ConA jest lektyną roślinną uzyskiwaną z fasoli *Canavalia ensiformis* stymulującą mitozę limfocytów T [9], aglutynację erytrocytów i komórek nowotworowych. ConA jest silnie wychwytywana przez receptory zawierające grupy cukrowe (głównie α -D-mannozowe i α -D-glukozowe) [8]. Takie receptory znajdują się m.in. na powierzchni LSEC. Zostało wykazane, że ConA jest wychwytywana przez komórki śródbłonka i makrofagi w warunkach *in vitro*, natomiast w warunkach *in vivo* tylko przez komórki śródbłonka [8].

ALF stymulowane podaniem ConA rozwija się dynamicznie. Pierwszym etapem jest napływ komórek odpornościowych do sinusoidów oraz uwolnienie do krwioobiegu cytokin prozapalnych. Trzy godziny po podaniu obserwuje się apoptozę komórek, a pierwsze obszary martwicze formowane są osiem godzin po podaniu lektyny [9].

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. APARATURA POMIAROWA I WYKORZYSTANE SUBSTANCJE

Obrazowanie MR przeprowadzono na magnecie wysokopolowym 9.4 T przeznaczonym do pomiarów małych zwierząt (BioSpec 94/20 USR, Bruker, Niemcy). Magnes wyposażono w system gradientowy BFG-113/60-S i objętościową nadawczo – odbiorczą cewkę wysokiej częstotliwości typu *birdcage* o średnicy 36 mm i długości 45 mm. Podczas obrazowania MR korzystano z oprogramowania ParaVision 5.1 (Bruker, Niemcy), podczas pomiaru relaksacyjności z oprogramowania TopSpin vs 2.0 PV (Bruker, Niemcy).

ALF wywołano podaniem ConA (Sigma-Aldrich, USA) rozpuszczonym w 1M jalowym roztworze soli zbuforowanej (PBS, *ang. Phosphate Buffered Saline*) zawierającym jony Ca^{2+} i Mg^{2+} (Pracownia Chemii Ogólnej, IITD PAN, Polska). Zwierzętom z grupy kontrolnej podano sól fizjologiczną (Polfarma, Polska).

W trakcie pomiarów monitorowano pracę serca (ECG), oddech i temperaturę zwierząt przy użyciu systemu monitorującego i bramkującego (Monitoring and Gating System, SA Inc., Stony Brook, USA). Temperaturę ciała zwierząt utrzymywano na poziomie 37°C używając łóżka wodnego (LAUDA DR. R. WOBSEER GMBH & CO. KG, Niemcy).

Zebrane próbki krwi wirowano używając wirówki Sigma 2-16PK (Sigma, Niemcy) w celu uzyskania osocza. Oznaczenia znaczników stanu zapalnego wykonano używając analizatora biochemicznego ABX Pentra 400 (Horiba Medical, Japonia) z zastosowaniem odczynników tego samego producenta oraz czytnika Synergy 4 (BioTek Instruments, Inc., USA) z użyciem testu ELISA (Invitrogen, USA). Pomiar enzymów AST, ALT, LDH wykonano metodą kalorymetryczną natomiast pomiar białek SAA metodą immunoenzymatyczną.

Preparaty histologiczne wykonano wykorzystując: stację do zatapiania w parafinie Thermo Scientific Microm EC 350-2 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), procesor tkankowy w systemie karuzelowym Leica TP1020 (Leica Biosystems, Germany), automatyczną stację do barwienia preparatów Leica Autostainer XL (Leica Biosystems, Germany). Próbki histologiczne po wybarwieniu badano pod mikroskopem Olympus BX51 (Olympus Corporation, Japonia) do skanowania i archiwizowania preparatów histologicznych w postaci obrazów o dużej rozdzielczości.

3.1.1. ŚRODEK KONTRASTOWY - PRIMOVIST™

W eksperymencie zastosowano specyficzny dla hepatocytów środek kontrastowy (Gd-EOB-DTPA, Primovist™, Bayer Schering Pharma AG, Niemcy) skracający czas relaksacji T_1 bazujący na atomach gadolinu (Gd^{3+}) z ligandem kwasu dwuetylenotrójaminopentaoctanowym (DTPA) i kowalentnie związaną grupą etoksybenzylową (EOB). Primovist™ jest komercyjnie dostępnym środkiem dopuszczonym do stosowania u ludzi. Waga molekularna cząsteczki środka kontrastowego wynosi 726 Da [79, 80]. Zalecana dawka środka dla osoby dorosłej wynosi 0.025 mmol/kg podane dożylnie [81]. Primovist™ jest wychwytywany z krwi tylko przez zdrowe komórki wątrobowe, ze względu na obecność pierścienia benzenowego w grupie EOB. Do hepatocytów dostaje się przy udziale polipeptydów transportujących OATPB1/B3 (*ang. Organic Anion Transporting Polypeptides B1/B3*) wychwytyjących pierścień benzenowy. OATPB1/B3 znajdują się na sorpcyjnej ścianie komórki [80]. Polipeptydy OATP stanowią kanały dwukierunkowe, dzięki czemu mogą umożliwić powrót CA do przestrzeni Dissego. Na sorpcyjnej ścianie hepatocytu znajdują się również proteiny MRP3/4 (*ang. Multidrug Resistance Protein 3,4*), które również mogą pośredniczyć w powrocie CA do przestrzeni Dissego [80]. Proteina MRP2 znajdująca się na wydzielniczej ścianie hepatocytu pośredniczy w usuwaniu CA do żółci [80]. Kontrast jest usuwany w równej mierze drogami żółciowymi do pęcherzyka żółciowego i poprzez nerki [79-81]. Czas potrzebny na usunięcie połowy podanego CA z osocza krwi u człowieka wynosi ok 56 min [80].

3.2. PROTOKOŁY EKSPERYMENTALNE

3.2.1. POMIAR RELAKSACYJNOŚCI ŚRODKA KONTRASTOWEGO

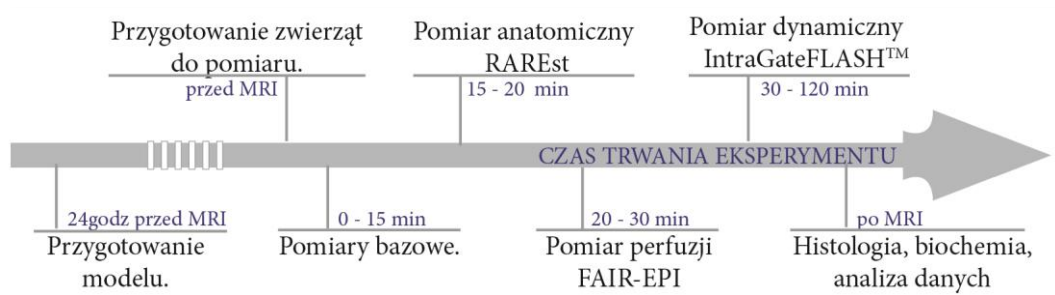
Relaksacyjność środka kontrastowego wyznaczono na podstawie czasów relaksacji podłużnej T_1 zbadanych dla czterech wartości rozcieńczeń roztworu kontrastu w polu 9.4T. Jako rozpuszczalnika użyto wody destylowanej. Oryginalnie, roztwór kontrastu miał stężenie 0.25 mmol/ml. Roztwory rozcieńczono 10-, 30-, 90- i 270-krotnie, co odpowiadało stężeniom 2.5×10^{-2} , 8.333×10^{-3} , 2.77×10^{-3} i 9.259×10^{-4} mmol/ml. Badano objętość ok 0.9 ml.

Po umieszczeniu próbki w głowicy, wykonano pomiar FID, przeprowadzono shimowanie oraz zmierzono częstość centralną piku, po czym przeprowadzono automatyczną sekwencję w celu zmierzenia impulsu 180st odwracającego magnetyzację. Następnie zmierzono czas relaksacji dla każdej próbki.

Pomiary czasów T_1 wykonano metodą odwrócenia i odrostu magnetyzacji (Rozdział 1.2.2). Użyto zmiennych czasów TI oraz zmiennych czasów pomiędzy kolejnymi impulsami odwracającymi magnetyzację (TD, *ang. Delay Time*). Dla roztworów kontrastu zmierzono 16 TI (od 0.5 ms do 1.2 s), natomiast dla wody 8 (200 ms do 12 s). Czasy TD wynosiły 0.5, 1, 2, 2 oraz 20 s, odpowiednio dla roztworu o rozcieńczeniu 10-, 30-, 90-, 270-krotnym oraz dla wody. Wykonano 4 powtórzenia pomiaru dla roztworów kontrastu i 1 dla wody. We wszystkich pomiarach wykorzystano impuls o szerokości 49.96 μ s i paśmie 20 kHz.

3.2.2. BADANIE PÓŹNYCH ZMIAN W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY

Eksperyment MR przeprowadzono na myszach ze szczepu BALB/c. Myszy w momencie przeprowadzania eksperymentu miały 3 miesiące. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: grupę kontrolną (kontrola, 7 zwierząt) i grupę chorą (ALF, 7 zwierząt). Myszy karmiono standardową dietą laboratoryjną. W zwierzętarni, w której znajdowały się zwierzęta utrzymywany był 12-godzinny cykl dzień/noc oraz temperatura 23°C. Wszystkie procedury zatwierdzone zostały przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach działającą przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.



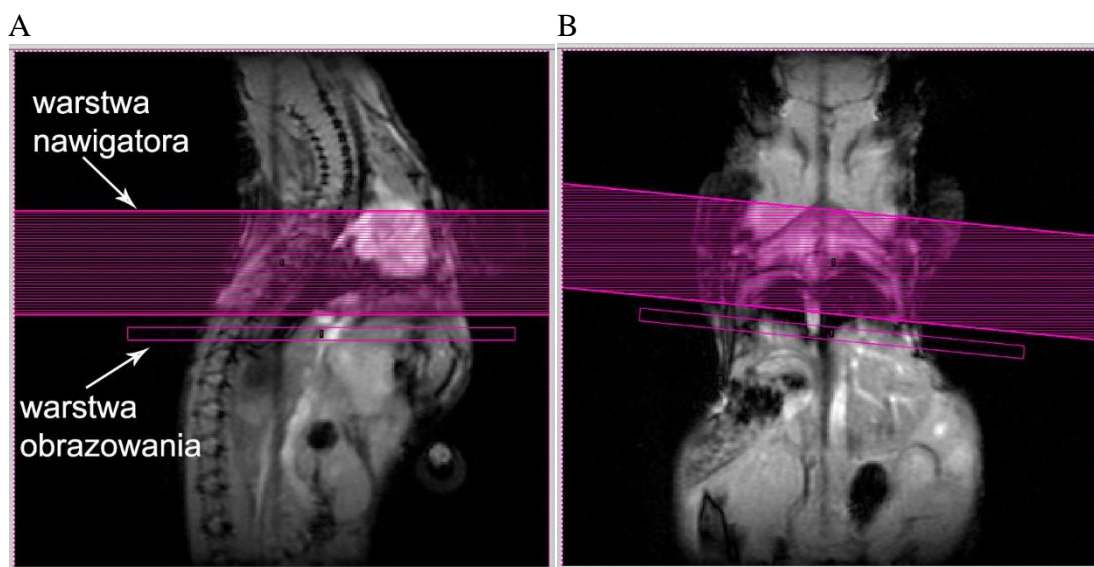
Rysunek 3.1: Przebieg eksperymentu badania późnych zmian w modelu ALF.

ALF wywołano u zwierząt z grupy chorej dożylnym podaniem ConA 24 godziny przed pomiarami MR w ilości 8 mg/kg b.w. Zwierzęta z grupy kontrolnej poddane zostały analogicznej procedurze, podczas której podano im odpowiednią objętość soli fizjologicznej.

Przed pomiarami MR wszystkim myszom podano dootrzewnowo 375 μ l soli fizjologicznej w celu zminimalizowania ewentualnych skutków odwodnienia. W żyłę ogonowej umieszczono cewnik o długości 70 cm i pojemności 100 μ l, przez który podano środek kontrastowy wymagany podczas ostatniego etapu badania. Taka długość cewnika pozwoliła na podanie kontrastu bez konieczności wysuwania zwierzęcia z magnesu.

Na czas obrazowania MR, zwierzęta poddano anestezji wziewnej 2% izofluranem w mieszaninie powietrza i tlenu. Podczas pomiarów monitorowano elektrokardiografię (ECG), oddech i temperaturę ciała zwierząt. Do utrzymania stabilnej ciepłoty ciała na poziomie 37°C wykorzystano łóżko wodne. Zwierzęta ułożone były w łóżeczku pomiarowym na brzuchu. Pojedynczy eksperyment trwał ok 2.5 godzin (Rysunek 3.1).

Płaszczyznę obrazowania wybrano w taki sposób, aby przecinała duże naczynia krwionośne (Rysunek 3.2). W przypadku zastosowania supresji sygnału od tłuszczu, stosowano impuls o odpowiedniej częstotliwości (1500 Hz) pozwalający na wysycenie tego sygnału. Używano impulsu o gaussowskim profilu i kącie odwracania 90st.



Rysunek 3.2: Wybór warstwy obrazowania i warstwy nawigatora. Przedstawione obrazy były obrazami pilotowymi wykonanymi w płaszczyźnie strzałkowej (A) i koronalnej (B). Wybrano taką samą warstwę obrazowania dla wszystkich sekwencji. Warstwę obrazowania o szerokości 1 mm, wybierano tak, aby zawierała główne naczynia krwionośne wątroby i aortę. Warstwę nawigatora, o szerokości 8 mm, wybierano w sekwencji Intra-GateFLASH™ tak, aby przekrywała serce badanego zwierzęcia.

Obrazy anatomiczne wykonano przy użyciu sekwencji RAREst (Rozdział 1.4.2, str. 24) z następującymi parametrami: czas echa (TE) 6.85 ms, czas repetycji (TR) 1000 ms, liczba uśrednień (NA) 4, ETL 4, pole widzenia (FOV) 30×30 mm², rozmiar obrazu 256×256 px, rozdzielczość przestrzenna (SR) 0.117×0.117 mm/px, grubość warstwy (ST) 1 mm, rozmiar danych (MTX) 256×256. Supresja sygnału od tłuszczu była włączona. Czas pomiaru obrazu anatomicznego wynosił ok 5 min.

ASL wykonano przy użyciu sekwencji FAIR-EPI (Rozdział 1.4.3 str. 25 oraz Rozdział 1.5.1 str. 26) z następującymi parametrami: TE 6.324 ms, TR 8000 ms, NA 4, FOV 45×30 mm², rozmiar obrazu 96×64 px, SR 0.469×0.469 mm/px, ST 1 mm, MTX 96×46. Zastosowano 10 czasów IR od 50 do 4500 ms. Supresja sygnału od tłuszczu była włączona. Czas pomiaru ASL wynosił około 10 min.

DCE-MRI przeprowadzono używając sekwencji IntraGateFLASHTM (Rozdział 1.4.1 str. 22) z następującymi parametrami: TE 0.838 ms, TR 4.212 ms, NA 1500 lub 200, kąt 18°, FOV 30×30 mm², rozmiar obrazu 128×128 px, SR 0.234×0.234 mm/px, ST 1 mm, MTX 96×96. Wybrano warstwę nawigującą z parametrami: grubość 8 mm, kąt 45°. Warstwa przekrywała serce (Rysunek 3.2). Całkowity czas pomiaru DCE-MRI wynosił 90 min. W drugiej minucie pomiaru podawano 0.0025 mmol/mL PrimovistTM przez cewnik w ilości 10 µl/1 g b.w. Obrazy MR zbierane były w następujący sposób: 1) w początkowej fazie podania kontrastu pomiar włączano trzykrotnie (każdy ok 10 min, 1500 NA, rekonstrukcja 150 obrazów) w celu zobrazowania wychwytu kontrastu z krwi do hepatocytów oraz aby zaobserwować maksymalne rozjaśnienie tkanki; 2) przez pozostałą godzinę pomiar włączano, co 10 min (każdy ok 2 min, 200 NA, 1 obraz) w celu zobrazowania usuwania kontrastu z tkanki wątroby.

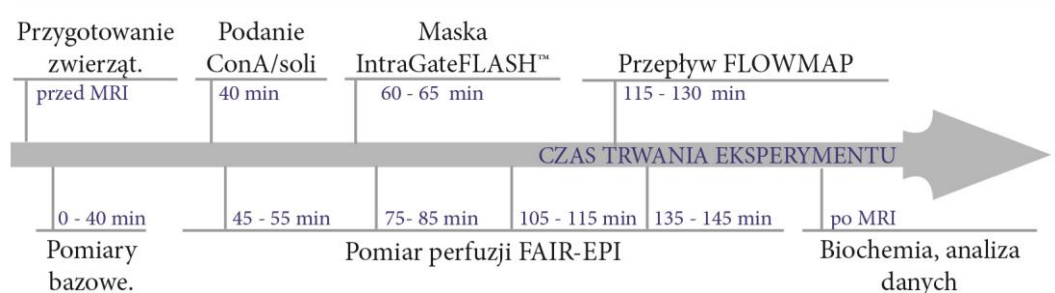
Podczas pomiarów anatomicznych i ASL używano bramkowania oddechem i tętnem. Sekwencja używana do pomiarów DCE-MRI jest sekwencją niewymagającą zewnętrznego wyzwalania dzięki pomiarom amplitudy sygnału w dodatkowej warstwie przekrywającej serce (warstwie nawigatora).

Natychmiast po eksperymencie zwierzęta usypiano w celu pobrania wątroby i krwi do dalszych badań. Próbki krwi pobierano z żyły nerkowej przy użyciu kwasu wersenowego (EDTA, *ang. EthyleneDiamineTetraacetic Acid*). Próbki wirowano przez 10 min przy 1000g w temperaturze 4°C. Zebrane osocze przechowywano w -80°C do czasu wykonania oznaczeń. Wątrobę pobierano po pobraniu krwi. Utrwalano ją w 4 % roztworze formaldehydu w PBS i przechowywano do czasu oceny histopatologicznej.

3.2.3. BADANIE WCZESNYCH ZMIAN W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY

Ekspierymnt przeprowadzono na myszach ze szczepu BALB/c. W momencie przeprowadzenia eksperymentu myszy miały 5 miesięcy. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: grupę kontrolną (kontrola, 6 zwierząt) i dwie grupy chore (ALF_8, 7 zwierząt i ALF_15, 5 zwierząt). W żyłę ogonowej umieszczono cewnik o długości 20 cm i pojemności 30 µl. Dwie grupy chore różniły się ilością podanej konkanawaliny. ConA podano

dożylnie w trakcie pomiarów MR w ilości 8 mg/kg lub 15 mg/kg b.w. Pojedynczy eksperyment trwał ok 2,5 godziny (Rysunek 3.3).



Rysunek 3.3: Przebieg eksperymentu badania wczesnych zmian w modelu ALF.

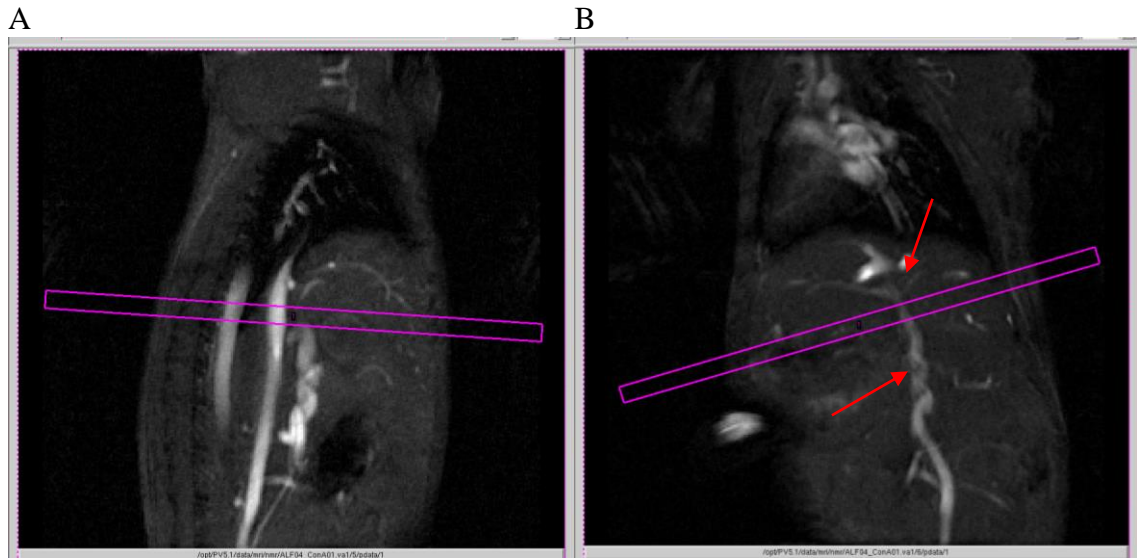
W pierwszej kolejności wykonano obrazy pilotowe w celu znalezienia odpowiedniej płaszczyzny do przeprowadzenia badań. Płaszczyznę obrazującą wybierano w osi krótkiej ciała, prostopadle do największych naczyń krwionośnych wątroby – aorty brzusznej, żyły wrotnej i żyły głównej dolnej.

Wykonano czterokrotny pomiar perfuzji krwi w tkance wątroby w odstępie 5, 35, 65 i 95 minut po podaniu ConA/soli fizjologicznej. ASL zbadano przy użyciu sekwencji FAIR-EPI (Rozdział 1.4.3 str. 25 oraz Rozdział 1.5.1 str. 26) z następującymi parametrami: TE 6.324 ms, TR 8000 ms, NA 4, FOV 30×20 mm, rozmiar obrazu 96×64, MTX 96×46, SR 0.3125×0.3125 mm/px, ST 1 mm. Zastosowano 10 czasów IR od 50 do 4500 ms. Supresja sygnału od tłuszczu była włączona. Czas pomiaru ASL wynosił około 10 min.

Pomiar prędkości przepływu krwi wykonano przy użyciu sekwencji FLOWMAP (Rozdział 1.4.1 str. 23) z następującymi parametrami: TE 2.74 ms, TR od 7.22 ms do 9.5 ms, NA 12, FOV 30×30 mm², rozmiar obrazu 128×128, MTX 128×128, SR 0.234×0.234 mm/px, ST 1 mm, VENC 100 cm/s. Supresja sygnału od tłuszczu była wyłączona. Pomiar prowadzony był w trybie *cine* z 16 klatkami na cykl pracy serca. Pomiar prędkości kodowano w jednym kierunku – kierunku przepływu krwi. Warstwę wybierano tak, aby widoczne były trzy główne naczynia krwionośne (aorta, żyła centralna i wrotna) (Rysunek 3.4). Czas pomiaru przepływu krwi wynosił ok 10 – 15 min.

Przeprowadzono również pomiar sekwencją IntraGateFLASH™ w celu wykonania obrazów anatomicznych, w celu użycia ich, jako masek przy wyborze światła naczyń krwionośnych w pomiarze prędkości przepływu krwi. Parametry sekwencji przedstawiają się następująco: TE 1.49 ms, TR 6.5 ms, NA 100, kąt 18°, FOV 30×30 mm², rozmiar obrazu 256×256 px, SR 0.117×0.117 mm/px, ST 1 mm, MTX 192×192, grubość

warstwy nawigującej 1 mm. Warstwę wybierano w tym samym położeniu, co warstwę do pomiaru prędkości. Pomiar trwał ok 3 min.



Rysunek 3.4: Ulokowanie warstwy do pomiaru prędkości przepływu krwi. (A) Warstwę wybrano tak, aby widoczne były aorta, żyła centralna i żyła wrotna. (B) Ważnym punktem odniesienia dla wyboru warstwy jest żyła wrotna. Warstwę obrazującą ułożono w górnej części żyły wrotnej pomiędzy skręceniem widocznym na żyłę a rozgałęzieniami (zaznaczone strzałkami). Obrazy są obrazami pilotowymi, sekwencja IntraGate-FLASH™.

Po eksperymencie zwierzęta usypiano w celu pobrania krwi do dalszych badań. Próbkę krwi pobierano z żyły nerkowej przy użyciu EDTA. Próbkę wirowano przez 10 min przy 1000g w temperaturze 4°C. Zebrane osocze przechowywano w -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

3.3. ANALIZY WYNIKÓW

Analizy obrazów MR prowadzono w wybranych obszarach tkanki (ROI, *ang. Region Of Interest*). Standardowo wybierano trzy ROI w mięszu wątrobowym z ominięciem widocznych naczyń krwionośnych. Wyniki uśredniano.

W przypadku innego wyboru jest to zaznaczone w opisie metody analizy.

3.3.1. RELAKSACYJNOŚĆ ŚRODKA KONTRASTOWEGO

W celu wyznaczenia czasu relaksacji podłużnej T_1 roztworów środka kontrastowego i wody do zebranych krzywych odrostu magnetyzacji dopasowano równanie:

$$y = y_0 - 2 * A * \exp(-TI/T_1) \quad 3.1$$

gdzie: y_0 – wartość bazowa sygnału, A – amplituda sygnału, TI – czas pomiędzy odwróceniem magnetyzacji a kolejnym pomiarem. Następnie korzystając ze wzoru:

$$\frac{1}{T_{1i}} = \frac{1}{T_{1W}} + r_1 \quad 3.2$$

gdzie: T_{1i} – czas relaksacji próbki i , T_{1W} – czas relaksacji wody, r_1 – relaksacyjność, wyznaczono zmianę czasu relaksacji dla poszczególnych próbek (ΔT):

$$\frac{1}{\Delta T} = \frac{1}{T_{1i}} - \frac{1}{T_{1W}} \quad 3.3$$

Zmianę mierzono w stosunku do wody, ponieważ roztwory kontrastu były robione w wodzie. Z zależności ΔT od stężenia kontrastu wyznaczono r_1 , jako współczynnik nachylenia prostej.

3.3.2. ANALIZA TEKSTUR

Analiza tekstur obejmuje analizę parametrów wyznaczonych na podstawie histogramów, macierzy współwystępowania (GLCM, *ang. Gray Level Co-occurrence Matrix*) oraz macierzy długości ciągów (RLVM, *ang. Run Length Vector Matrix*). Parametry histogramu są oparte na rozkładzie jasności pikseli w obrazie, natomiast parametry GLCM i RLVM pokazują wzajemne zależności i relacje pomiędzy pikselami [33, 34, 82, 83].

Wyznaczono trzy parametry histogramu: wartość średnią, skośność i kurtozę. Parametry obliczano w oparciu o momenty centralne:

$$m_n = \sum_{i=0}^{K-1} (i - \mu)^n h(i) \quad 3.4$$

gdzie: $h(i)$ – wartość i szarości pikseli w obrazie, μ – średnia wartość histogramu. Wartość średnia jest równa m_1 , skośność – m_3/σ^3 , kurtoza – $m_4/\sigma^4 - 3$, gdzie σ jest odchyleniem standardowym.

GLCM jest macierzą kwadratową skonstruowaną dla czterech wybranych kierunków (0° , 45° , 90° , 135°) i odległości pomiędzy parami pikselami (Rysunek 3.5). W pracy wyznaczano GLCM dla pikseli sąsiadujących ze sobą. Wiersze i kolumny macierzy GLC są indeksowane wartościami jasności pikseli, dlatego rozmiar macierzy zależy od skali szarości obrazu. W analizowanym obrazie zlicza się ilość identycznych par pikseli następnie ta ilość zapisywana jest, jako element macierzy GLC. Wyznaczono pięć parametrów GLCM: drugi moment kątowy (ASM, *ang. Angular Second Moment*), kontrast, korelację, odwrotny moment różnicowy (IDM, *ang. Inverse Difference Moment*)

i entropię [33]. ASM jest miarą jednorodności obrazu. Kontrast pokazuje lokalną zmienność jasności pikseli. Korelacje pokazują liniowe zależności tonu szarości pikseli. IDM, podobnie jak kontrast opisuje lokalną zmienność jasności pikseli, będąc odwrotnością kontrastu. Entropia jest miarą losowości jasności pikseli w obrazie. Parametry dane były równaniami:

$$ASM = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} c_{ij}^2 \quad 3.5$$

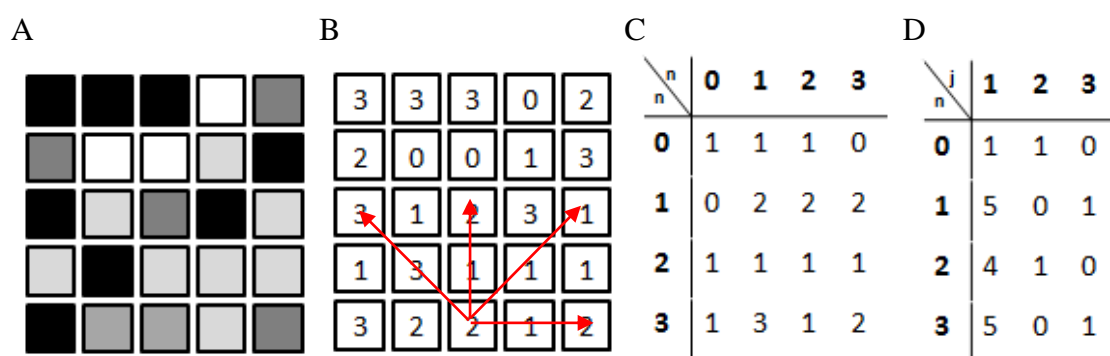
$$kontrast = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} (i-j)^2 c_{ij}^2 \quad 3.6$$

$$korelacje = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} \frac{(i-\mu_i)(j-\mu_j)c_{ij}}{\sigma_i\sigma_j} \quad 3.7$$

$$IDM = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} \frac{c_{ij}}{1+(i-j)^2} \quad 3.8$$

$$entropia = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{j=0}^{K-1} c_{ij} \log c_{ij} \quad 3.9$$

gdzie: c_{ij} – element ij macierzy GLC, i, j – jasności pikseli, K – najwyższa wartość jasności pikseli w obrazie, $\mu_{i,j}$ – średnia wartość jasności pikseli w obrazie, $\sigma_{i,j}$ – odchylenie standardowe wartości jasności pikseli w obrazie.



Rysunek 3.5: Metoda wyznaczania macierzy GLC i RLV. (A) Przykładowy obraz zawierający piksele o czterech jasnościach. (B) Przypisanie poszczególnym pikselom wartości liczbowej. Najjaśniejszym pikselom przyporządkowano najniższą wartość 0, natomiast najciemniejszym wartość najwyższą 3. Macierze wyznaczano dla czterech kierunków 0°, 45°, 90°, 135° (czerwone strzałki). (C) Macierz GLC wyznaczona dla kierunku 0° z obrazu B. Pod uwagę brano pary sąsiadujących ze sobą pikseli. W macierzy można zauważyć m.in., że w obrazie były trzy pary pikseli, w których piksel o wartości 3 sąsiedował

z pikselem o wartości 1. Natomiast przeciwną parę pikseli, w której piksel o wartość 1 sąsiadował z pikselem o wartości 3, zauważono dwukrotnie. (**D**) Macierz RLV obrazu **B** wyznaczona dla kierunku 0° . Najdłuższy ciąg w analizowanym obrazie liczył 3 piksele. Znalaziono dwa takie ciągi, jeden dla pikseli o wartości 1 i drugi dla wartości 3.

RLVM nie musi być macierzą kwadratową, ponieważ jej wiersze są indeksowane jasnością pikseli a kolumny – długością ciągów utworzonych z pikseli (Rysunek 3.5). Ciągami nazywamy zbiór sąsiadujących ze sobą pikseli o tej samej jasności. Długość ciągu może się wahać od 1 do rozmiaru ROI. RLVM wyznaczono dla tych samych kierunków, co GLCM. Obliczono wartości pięciu parametrów: wzmocnienie krótkich ciągów (SRE, *ang. Short Runs Emphasis*), wzmocnienie długich ciągów (LRE, *ang. Long Runs Emphasis*), niejednorodność poziomów szarości (GLN, *ang. Gray Level Nonuniformity*), niejednorodność długości ciągów (RLN, *ang. Runs Length Nonuniformity*) oraz frakcję obrazu w ciągach (FR, *ang. Fraction in Runs*). Znaczenie parametrów RLVM zawiera się w ich nazwie. Parametry wyznaczano ze wzorów:

$$SRE = \left(\sum_{i=0}^{K-1} \sum_{l=0}^L \frac{r_{il}}{l^2} \right) / cl \quad 3.10$$

$$LRE = \left(\sum_{i=0}^{K-1} \sum_{l=0}^L i^2 r_{il} \right) / cl \quad 3.11$$

$$GLN = \left(\sum_{i=0}^{K-1} \left(\sum_{l=0}^L r_{il} \right)^2 \right) / cl \quad 3.12$$

$$RLN = \left(\sum_{l=0}^L \left(\sum_{i=0}^{K-1} r_{il} \right)^2 \right) / cl \quad 3.13$$

$$FR = cl / \left(\sum_{i=0}^{K-1} \sum_{l=0}^L i r_{il} \right) \quad 3.14$$

gdzie: $cl = \sum_{i=0}^{K-1} \sum_{l=0}^L r_{il}$, r_{il} – element il RLVM, i – jasność piksela, l – długość ciągu, K – maksymalna jasność pikseli, L – maksymalna długość ciągu w obrazie.

Obrazy importowano do programu ImageJ (NIH, USA) w celu ich przygotowania do analizy. Dla każdego ROI wyznaczano wartość parametrów teksturalnych w czterech kierunkach. W celu zapewnienia niezmienności rotacyjnej wartości parametrów uśredniano [33].

3.3.3. ANALIZA FRAKTALNA

Wyznaczano wymiary fraktalne (D_f , *ang. fractal dimension*) i lakularności (L) anatomicznych obrazów MR. D_f jest wskaźnikiem skomplikowania struktury obrazu, podczas gdy L niesie informację o ilości „dziur” w obrazie, czyli obszarze, na którym nie można znaleźć pikseli obrazu.

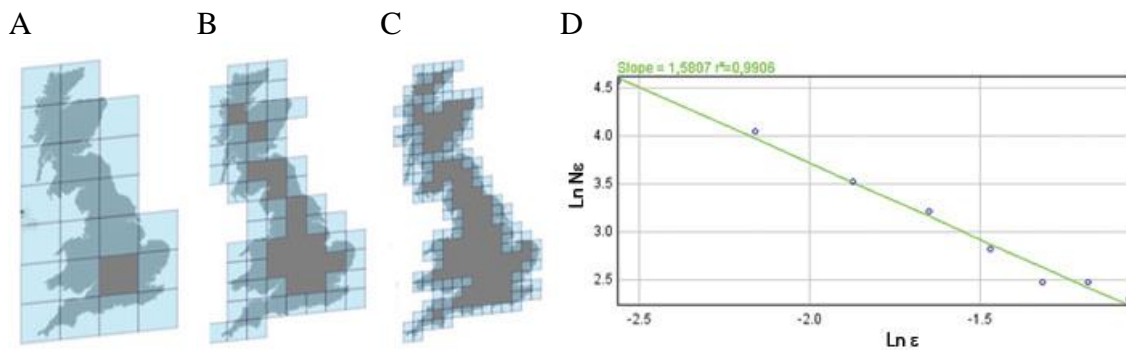
W analizie wykorzystano metodę pudełkową [84]. W tej metodzie na analizowany obraz nanosi się siatkę z oczkami o boku ε a następnie zlicza się oczka zawierające piksele obrazu (Rysunek 3.6). W kolejnym kroku zmniejsza się rozmiar oczek i ponawia się zliczanie. Procedura jest powtarzana kilkakrotnie. Następnie D_f wyznacza się zgodnie z formułą:

$$D_f = -\lim \log N_\varepsilon / \log \varepsilon \quad 3.15$$

gdzie: ε – długość boku oczka w siatce, N_ε – ilość oczek wypełnionych pikselami obrazu. Lakularność wyznaczano w oparciu o równanie:

$$L = \left(\frac{\sigma}{\mu}\right)^2 \quad 3.16$$

gdzie: μ - średnia ilość pikseli w oczku, σ – odchylenie standardowe ilości pikseli w oczku.

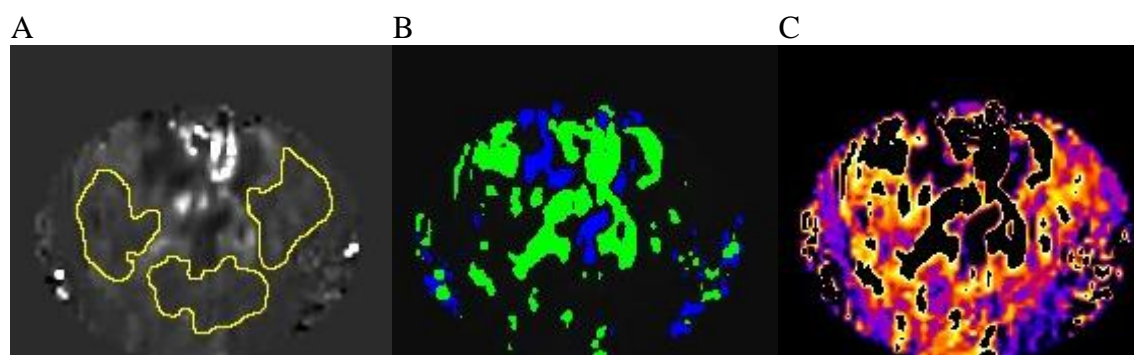


Rysunek 3.6: Wyznaczanie wymiaru fraktalnego metodą pudełkową. (A) Na obraz nanoszona jest siatka o określonej długości boku oczka. Zliczana jest liczba oczek wypełnionych pikselami obrazu. (B, C) W następnych krokach zmniejszany jest bok oczka i ponawiane jest zliczanie. (D) Wartości kreślone są na wykresie. D_f wyznacza się, jako nachylenie prostej dopasowanej do punktów pomiarowych.

Obrazy importowano do programu ImageJ w celu ich przygotowania do analizy. Obrazy binaryzowano po uprzednim zastosowaniu filtra wyostrzającego krawędzie a następnie analizowano.

3.3.4. WYZNACZANIE WARTOŚCI PERFUZJI I CZASU RELAKSACJI T_1

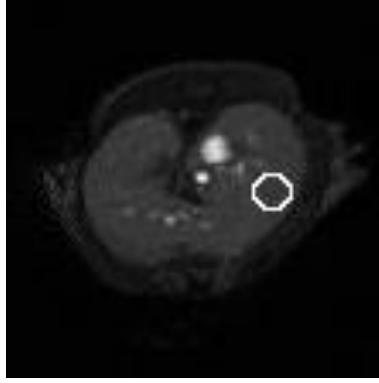
Mapy perfuzji oraz czasu relaksacji T_1 wyznaczono przy użyciu ASL Perfusion Macro (ParaVision 5.1, Bruker, Germany) z obrazów uzyskanych w obrazowaniu FAIR-EPI. Wartości czasów relaksacji zostały odczytane bezpośrednio z przygotowanych map w oprogramowaniu ASL Perfusion Macro. Wartości T_1 odczytywano w trzech losowych miejscach tkanki wątroby a następnie uśredniano. Mapy perfuzji wczytywano do programu ImageJ, w którym odcinano wartości negatywne lub większe niż 500 ml/min/100g. Wysokie wartości odcinano, aby usunąć z map perfuzyjnych obszary z dużymi naczyniami krwionośnymi, w których przepływy mają wyższe wartości niż w tkance. Natomiast ujemne odcinano, jako wartości нефизyczne (Rysunek 3.7).



Rysunek 3.7: Przygotowanie map perfuzji do analizy. (A) Oryginalna mapa perfuzji z naniesionymi ROI. (B) Zastosowany próg odcięcia: kolorem zielonym zaznaczono wartości większe od 500 ml/min/100g, natomiast kolorem niebieskim wartości ujemne. (C) Mapa perfuzji, którą analizowano i na których wybierano ROI. Przedstawienie przykładowych ROI na obrazie (A) ma na celu zapewnienie wyższej czytelności. Wszystkie obrazy są przeskalowane do 256×170 px.

3.3.5. EMPIRYCZNE MODELOWANIE MATEMATYCZNE (EMM)

Na każdym obrazie MR uzyskanym w wyniku obrazowania DCE-MRI wybierano ROI (Rysunek 3.8). Dla każdego ROI wyliczano średnie wartości intensywności sygnału. Uzyskane wartości posłużyły do wyznaczenia zależności pomiędzy intensywnością sygnału a czasem pomiaru. Wartości sygnału z obrazów zebranych przed podaniem kontrastu uśredniono i odjęto od całej krzywej w celu jej znormalizowania. Za czas $t_0 = 0$ min przyjęto moment podania kontrastu.



Rysunek 3.8: ROI do analizy EMM wybierano w tkance wątroby.

Do tak przygotowanych danych dopasowano model zaproponowany przez Fan et al. [39]:

$$C(t) = A \cdot (1 - e^{-\alpha t})^q \cdot e^{-\beta t} \cdot \frac{1 + e^{-\gamma t}}{2} \quad 3.17$$

gdzie: A – maksimum sygnału, α – szybkość wychwytu środka kontrastowego (1/min), β – szybkość usuwania środka kontrastowego (1/min), γ – początkowa szybkość usuwania kontrastu (1/min), q – parametr opisujący początkowe nachylenie zbocza narastającego oraz krzywiznę wierzchołka krzywej. Wyznaczono pięć dodatkowych parametrów: czas do wierzchołka intensywności sygnału (T_{peak} , [min]), nachylenie narastającego zbocza krzywej (ES, [1/min]), połowiczny czas usuwania kontrastu ($T_{1/2}$, [min]), pole powierzchni pod krzywą (AUC) oraz krzywiznę wierzchołka (κ_{peak}). Poglądowe przedstawienie parametrów znajduje się na Rysunek 3.9. T_{peak} wyznaczono na podstawie formuły:

$$T_{peak} \approx \frac{1}{\alpha} \ln \left(1 + \frac{q\alpha}{\beta + 0.5\gamma} \right) \quad 3.18$$

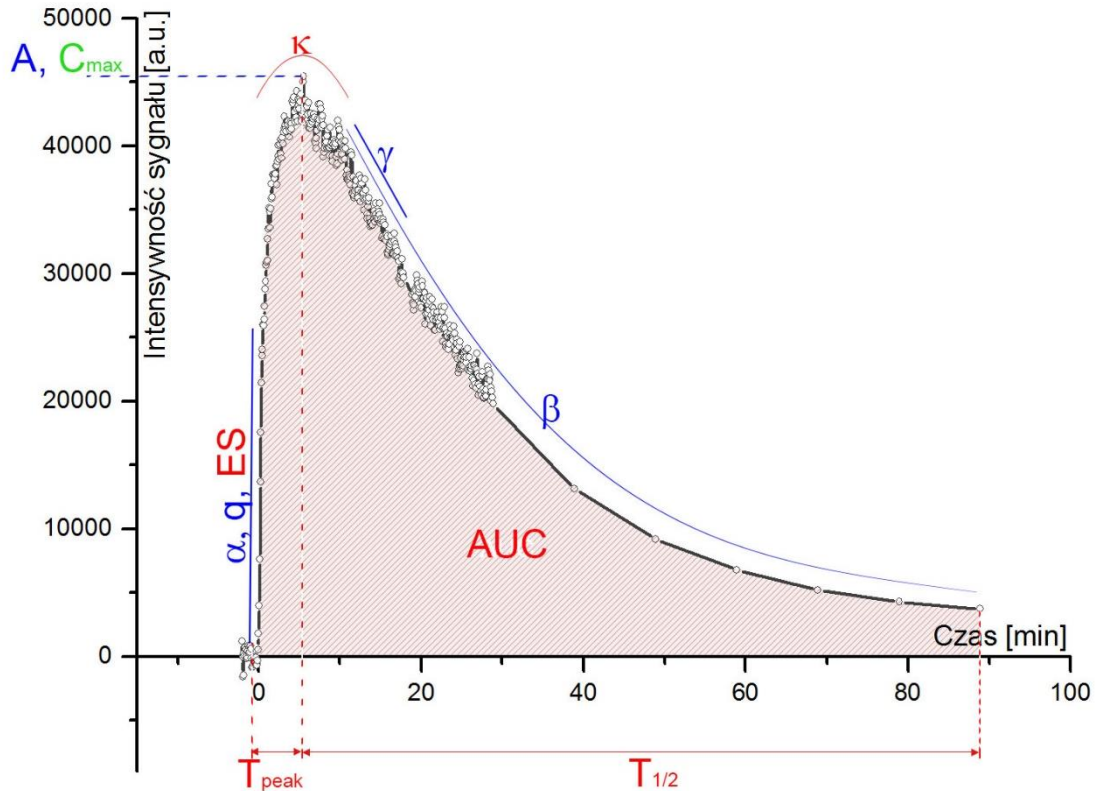
ES wyznaczono, jako stosunek C_{max}/T_{peak} , przy czym C_{max} to maksymalna wartość intensywności sygnału odczytana z wykresu. AUC wyliczono, jako pole pod całą krzywą od czasu t_0 do 90 minuty. $T_{1/2}$ wyznaczono poprzez dopasowanie krzywej eksponencjalnej do opadającego zbocza krzywej:

$$C(t) = A_1 \exp(-t/T_{1/2}) + C_0 \quad 3.19$$

gdzie: A_1 – amplituda sygnału, C_0 – podstawa sygnału. κ_{peak} wyznaczono z równania:

$$\kappa_{peak} \approx C_{max} \left| \alpha(\beta + 0.25\gamma) + \frac{(\beta + 0.5\gamma)^2}{q} - 0.25\gamma \right| \quad 3.20$$

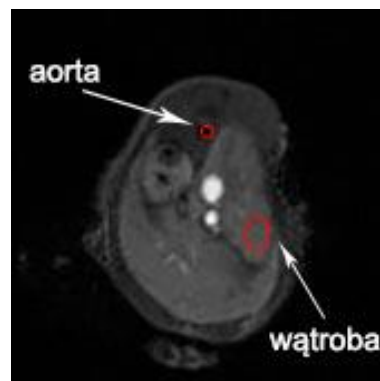
Obrazy analizowane były w programie ImageJ. Modelowanie przeprowadzono w programie Origin Pro 8.6.0 (OriginLab, USA).



Rysunek 3.9: Poglądowe przedstawienie parametrów EMM w odniesieniu do danych eksperymentalnych, do których dopasowywano model. Na niebiesko zaznaczono podstawowe parametry modelu, wyznaczone na podstawie równania 3.17. Na czerwono zaznaczono parametry dodatkowe, wyznaczone w większości w oparciu o parametry podstawowe modelu. Natomiast parametr C_{max} , zaznaczony na zielono, był odczytywany dla każdej krzywej wprost z wykresu.

3.3.6. MODELOWANIE KOMPARTMENTOWE (MK)

Modelowanie kompartmentowe przeprowadzono na obrazach uzyskanych z pomiarów DCE-MRI. Obszary ROI wybrano w aorcie i w mięszu wątrobowym (Rysunek 3.10).



Rysunek 3.10: ROI do analizy MK wybrano w aorcie i mięszu wątrobowym.

Obszar aorty jest zaciemniony ze względu na zastosowanie warstwy wysycającej o szerokości 8 mm pozwalającej na wysycenie krwi wypływającej z serca. Miało to na celu wyraźne zaobserwowanie piku w sygnale mierzonym w aorcie podczas przechodzenia kontrastu. Koncentrację kontrastu ($C(t)$) wyznaczono na podstawie wzoru [85]:

$$C(t) = \left(\frac{1}{T_1(t)} - \frac{1}{T_{10}} \right) / r_1 \quad 3.21$$

gdzie: $T_1(t)$ – czas relaksacji w kolejnych chwilach czasu (na kolejnych obrazach), T_{10} – czas relaksacji przed podaniem środka kontrastowego, r_1 – relaksacyjność środka kontrastowego. Czasy T_{10} w tkance i krwi wyznaczono na podstawie map T_1 zmierzonych sekwencją FAIR-EPI. Do wyznaczenia koncentracji kontrastu w krwi przyjęto $T_{10} = (2648 \pm 321)$ ms. Natomiast koncentrację CA w tkance wyznaczono w oparciu o indywidualne wartości T_{10} (wyniki dla grup badawczych na str. 66). Wartość relaksacyjności użytego kontrastu przyjęto, jako $r_1 = (5.831 \pm 0.013)$ mL/(mmol ms) na podstawie pomiaru (patrz str. 40 i 58). Wartość wyrażenia $1/T_1(t)$ obliczono korzystając z wyrażenia na wartość sygnału uzyskiwanego w sekwencji echa gradientowego [49] [85], przy założeniu że $TE < T_2^*$ [86] i można pominąć efekty związane z relaksacją poprzeczną:

$$S = S_0 \frac{\sin\alpha [1 - \exp(-TR/T_1)]}{1 - \cos\alpha \cdot \exp(-TR/T_1)} \quad 3.22$$

gdzie: S – wartość sygnału, S_0 – wartość sygnału w stanie równowagi, α – kąt odwracania magnetyzacji, TR – czas repetycji. Z porównania wyrażen na sygnał zebrany przed i po podaniu kontrastu wyznaczono równanie opisujące $1/T_1(t)$:

$$\frac{1}{T_1(t)} = -\frac{1}{TR} \ln \left[\frac{m - 1}{m \cos\alpha - 1} \right] \quad 3.23$$

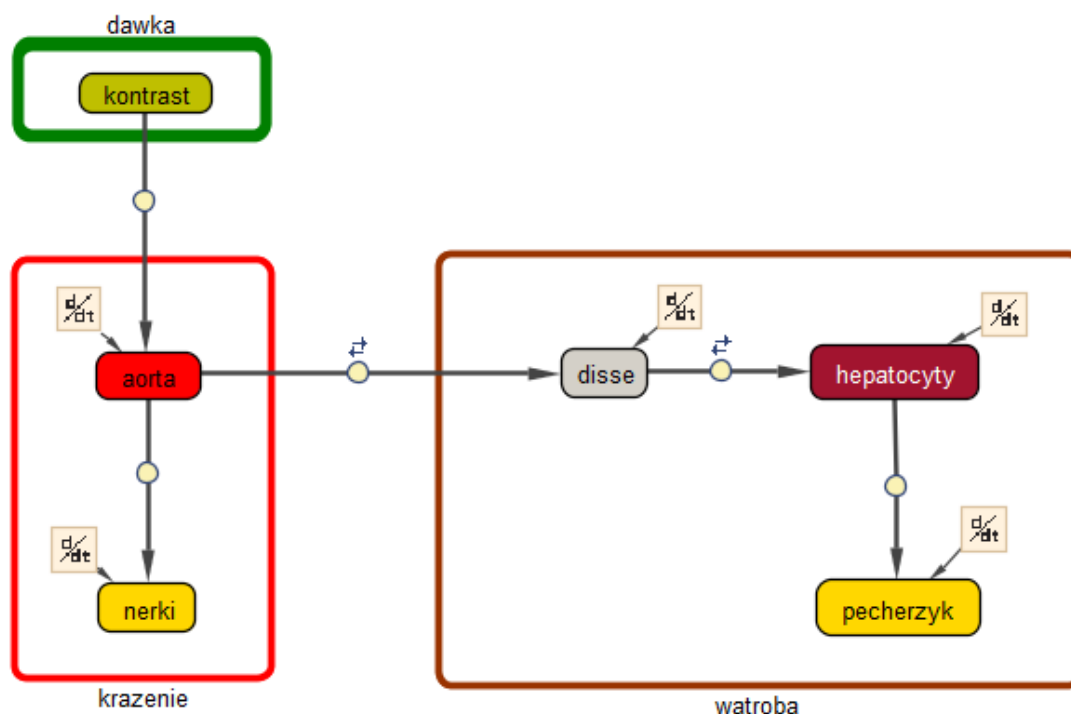
przy czym:

$$m = \frac{S_{post}}{S_{pre}} \frac{1 - \exp(-TR/T_{10})}{1 - \cos\alpha \cdot \exp(-TR/T_{10})} \quad 3.24$$

w równaniach 3.23 i 3.24 mamy: S_{post} – sygnał zmierzony w obrazie MR po podaniu kontrastu, S_{pre} – sygnał zmierzony w obrazie MR przed podaniem kontrastu, TR – czas repetycji. Po podstawieniu równania 3.23 do 3.21 otrzymano pełne wyrażenie na koncentrację kontrastu w badanych tkankach.

Model przedstawiono na Rysunek 3.11. Dawkę środka kontrastowego, którą podawano zwierzętom uznano za wielkość wejściową modelu. W modelowaniu za objętość dawki przyjęto 2 mL [87], odpowiadające średniej objętości krwi myszy w celu ujednoczenia układu. Sygnał zebrany z tkanki wątroby przypisano hepatocytom, ponieważ

użyty kontrast (Primovist™) jest środkiem wychwytywanym przez komórki wątrobowe. Zaproponowany model jest modelem uproszczonym transportu CA.



Rysunek 3.11: Model kompartmentowy zaproponowany i użyty w pracy. Model ma na celu opisać kinetykę CA w organizmie myszy. Kompartment ‘disse’ jest nazwą na przestrzeń Dissego, znajdującą się pomiędzy naczyniami zatokowymi a hepatocytami, natomiast ‘pecherzyk’ jest pęcherzykiem żółciowym, do którego odprowadzany jest CA z hepatocytów. Transfer pomiędzy aortą i przestrzenią Dissego oraz przestrzenią Dissego i hepatocytami jest dwustronny. Symbol d/dt oznacza przypisanie równania różniczkowego do danego elementu.

Model opisywany jest układem równań różniczkowych, z których każde jest sumą wpływów i wypływów z danego elementu:

$$\frac{d(aorta)}{dt} = k_a^k * kontrast + k_a^d * disse - k_n^a * aorta - k_d^a * aorta \quad 3.25$$

$$\frac{d(disse)}{dt} = k_d^a * aorta + k_d^h * hepatocyty - k_a^d * disse - k_h^d * disse \quad 3.26$$

$$\frac{d(hepatocyty)}{dt} = k_h^d * disse - k_h^h * heptocyty - k_p^h * heptocyty \quad 3.27$$

$$\frac{d(pecherzyk)}{dt} = k_p^h * hepatocyty \quad 3.28$$

$$\frac{d(nerki)}{dt} = k_n^a * aorta \quad 3.29$$

gdzie: k_m^i – stała czasowa transportu z kompartmentu i do kompartmentu m . indeksy stałych czasowych są pierwszymi literami kompartmentów. Kolejne indeksy oznaczają: k – kontrast, a – aorta, n – nerki, d – disse, h – hepatocyty, p – pęcherzyk. Równania różniczkowe obliczane były przy użyciu funkcji ode15s, natomiast wartości stałych czasowych k_m^i estymowano funkcją lsqnonlin. Modelowanie przeprowadzono w SimBiology® (MATLAB, The MathWorks Inc., USA).

Do sygnału zebranego w aorcie, zwyczajowo traktowanego w modelowaniu kompartmentowym, jako funkcję wejścia (AIF, *ang. Arterial Input Function*), dopasowano dwueksponencjalny model zaniku w celu uzyskania stałych czasowych niezbędnych w modelowaniu [60], [88]:

$$y = A_1 \exp(-x/t_1) + A_2 \exp(-x/t_2) \quad 3.30$$

gdzie: A_i – amplituda, t_i – czas zaniku. Dopasowanie przeprowadzono w programie Origin Pro 8.6.0. Parametry opisujące szybszy zanik sygnału ($i=1$) powiązane są z wychwytem kontrastu w komórkach wątroby, podczas gdy wolniejszy zanik ($i=2$) związany jest z usuwaniem kontrastu przez nerki [89]. W modelowaniu kompartmentowym wykorzystano stałe czasowe k [1/min] tych procesów:

$$k_i = \frac{1}{t_i} \quad 3.31$$

Stałą k_1 zaniku sygnału w aorcie przypisano do parametru k_d^a , natomiast stałą k_2 przypisano parametrowi k_n^a .

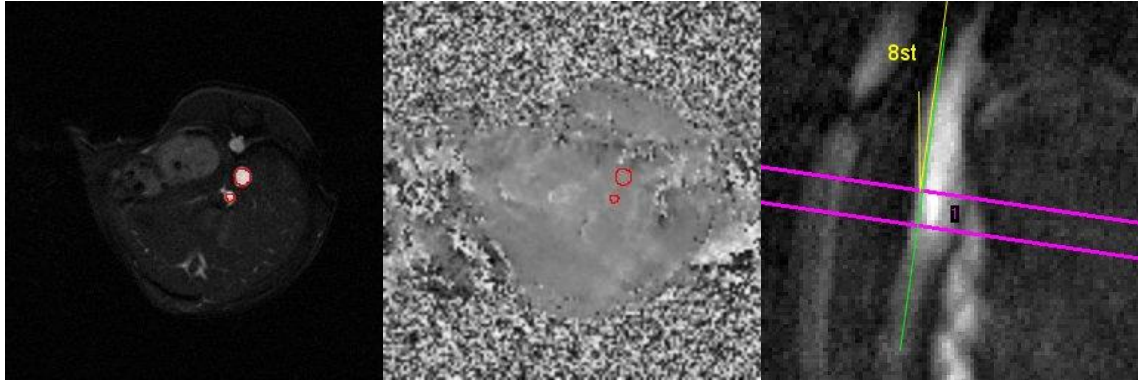
3.3.7. WYZNACZENIE PRĘDKOŚCI PRZEPEŁYWU KRWI

Obrazy anatomiczne IntraGateFLASH™ posłużyły do wyznaczenia obszarów ROI w naczyniach, w których mierzono prędkość przepływów krwi (Rysunek 3.12A). Następnie ROI naniesiono na obrazy FLOWMAP, których rozmiar zwiększono do 256×256 px (Rysunek 3.12B). W obrazach PC, w których było to konieczne, dokonano ręcznej korekcji położenia obszarów ROI, ze względu na przesunięcie obrazów względem obrazów anatomicznych. Dodatkowo na obrazach pilotowych, na których wyznaczano położenie warstwy obrazującej mierzono kąt odchylenia (kąt β) naczynia od kierunku prostopadłego do warstwy obrazującej (Rysunek 3.12C). Kąta β nie mierzono na drugim z obrazów pilotowych (Rysunek 3.4B), ponieważ warstwa ustawiana na nim była prostopadle do żyły wrotnej.

A

B

C



Rysunek 3.12: (A) Wybór obszarów ROI na obrazie anatomicznym wątroby. ROI umieszczano w naczyniach krwionośnych – żyłę głównę dolną i żyłę wrotną. (B) Naniesienie wybranych ROI na obrazy PC. (C) Wycinek z obrazu pilotowego pokazujący pomiar kąta β dla żyły głównej dolnej. Wybrana warstwa do obrazowania o grubości 1 mm zaznaczona jest na różowo. Kierunek prostopadły do warstwy wyznacza zielona linia. Kąt odchylenia w tym przypadku był równy 8st.

Przepływ wyznaczono z równania:

$$Q = v_{sr} \cdot S \cdot \frac{n \cdot TR}{0.9 \cdot RR} \cdot \cos\beta \quad 3.32$$

gdzie: v_{sr} – średnia prędkość przepływu krwi w naczyniu [cm/s], S – pole powierzchni naczynia [cm²], n – ilość klatek zmierzonych na cykl pracy serca, TR – czas repetycji [ms], RR – interwał RR cyklu pracy serca [ms], β – kąt odchylenia naczynia od kierunku prostopadłego w stosunku do warstwy. W mianowniku równania 3.32 uwzględniono czynnik 0.9 ponieważ podczas pomiarów MR długość czasu TR wyznaczano tak, aby możliwe było zmierzenie 16 klatek *cine* w czasie przypadającym na 0.9 interwału RR.

Średnia wartość prędkości w żyłę głównej dolnej i wrotnej również była wyznaczona z uwzględnieniem korekty pochodzącej od kąta β .

3.3.8. OCENA HISTOLOGICZNA I BIOCHEMICZNA

Wszystkie płaty wątrobowe zanurzano w parafinie i cięto na 5 μ m plasterki. Łącznie oceniano 6 plasterków, ciętych w 2 grupach po 3 plasterki (odległość pomiędzy grupami ok 100 μ m). Zastosowano trzy metody wybarwienia: hematoksyliną i eozyną (HE), trichromem Gomoriego (TRICHRM) oraz metodą pozwalającą wybarwić tkankę łączną (OMSB) (Aneks 7.1, str. 93). Wybarwione próbki histologiczne obserwowano pod mikroskopem. Wystąpienie zmian chorobowych poddawano ocenie jakościowej a wielkości tych zmian oszacowano na skali przedziałowej. Oceniano ilość, rodzaj zmian i wielkość obszaru tkanki objętego zmianami. Sprawdzano czy wystąpiły martwice krwotoczna

i skrzepowa, nacieki w ścianach naczyń i w mięszu, apoptoza i inne uszkodzenia hepatocytów oraz ogólny obraz tkanki w próbce. W przypadku obu rodzajów martwicy oraz ogólnych zmian tkanki posłużono się skalą procentową określając, jaki procent powierzchni tkanki obejmuje zmiana. W przypadku nacieków zapalnych posłużono się skalą czteroprzędziową (0-4), gdzie najwyższej wartości przypisywano najbardziej nasilone nacieki.

Z próbek osocza określono poziomy znaczników stanu zapalnego. Poziom białek ostrej fazy (SAA *ang. Serum Amyloid A*) zmierzono metodą immunoenzymatyczną. Poziomy aminotransferazy asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *ang. Lactate Dehydrogenase*) zmierzono metodą kalorymetryczną. Następnie porównano zawartość enzymów i białek ostrej fazy w osoczu krwi pobranej od zwierząt z ALF i od zwierząt kontrolnych.

3.3.9. TESTY STATYSTYCZNE

Testy statystyczne wszystkich parametrów uzyskanych w opisanych analizach wykonano w programie Statistica 8.0 (Stat Soft, USA). Parametry ilościowe prezentowane są jako (średnia \pm STD) natomiast parametry jakościowe jako mediany. Za wyniki istotne statystycznie uznawano te, dla których wartość *p* była niższa od 0.05. Do zbadania normalności rozkładów użyto testu Shapiro–Wilka. Parametry o normalnej dystrybucji analizowano testem *t*, natomiast parametry niewykazujące normalnego rozkładu testem U Manna–Whitney’a. Istotność w pomiarach powtarzanych testowano analizą wariancji dla powtarzanych pomiarów z testem HSD dla nierównych grup, jako testem post-hoc. W przypadku badania trzech grup (bez powtarzanych pomiarów) zastosowano ANOVĘ Kruskala–Wallisa z wielokrotnymi porównaniami, jako testem post-hoc. Wybór testu nieparametrycznego podyktowany był liczebnością grup. Korelacje pomiędzy danymi badano testem rang Spearmana, ponieważ część parametrów była jakościowa lub nie miała rozkładu normalnego.

4. WYNIKI

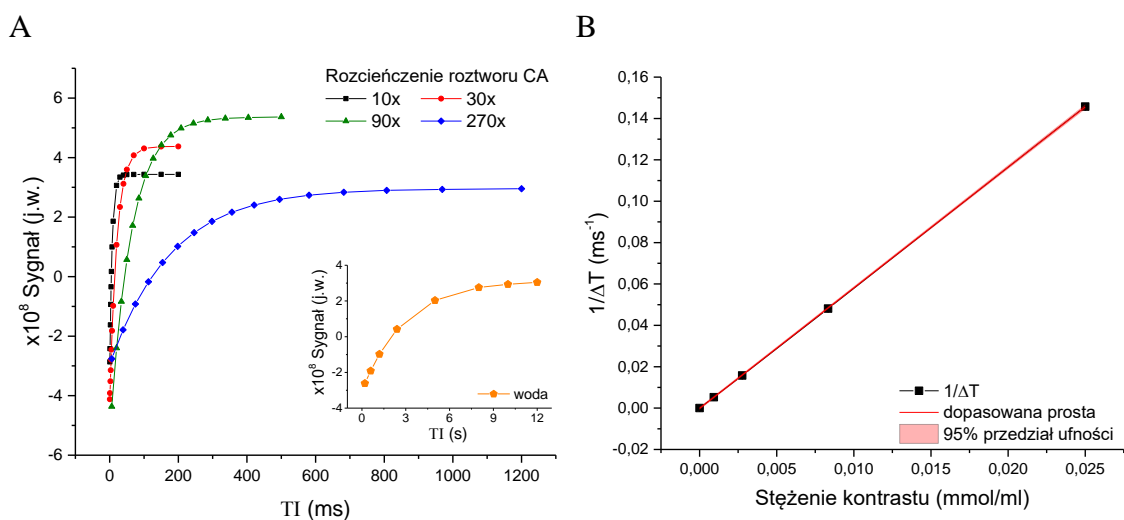
4.1. POMIAR RELAKSACYJNOŚCI ŚRODKA KONTRASTOWEGO

Wartości czasu relaksacji podłużnej T_1 zmierzono dla czterech wartości rozcieńczeń środka kontrastowego oraz dla wody. Do poszczególnych krzywych odrostu magnetyzacji (Rysunek 4.1A) dopasowano krzywą eksponencjalną opisaną równaniem 3.1. Następnie wyznaczono $1/\Delta T$ i wyliczono wartość relaksacyjności środka kontrastowego (Rysunek 4.1B). Wartości T_1 i $1/\Delta T$ zebrano w Tabeli 4-1.

Relaksacyjność r_1 środka kontrastowego użytego w późniejszych badaniach wyniosła (5.831 ± 0.013) ml/(mmol ms).

Tabela 4-1: Czas relaksacji podłużnej w roztworach środka kontrastowego oraz wartość parametru $1/\Delta T$.

	T_1 (ms)	$1/\Delta T$ (ms ⁻¹)
10×	6.846 ± 0.004	$0.14573 \pm 1.5E-6$
30×	20.654 ± 0.011	$0.04808 \pm 1.5E-6$
90×	62.191 ± 0.024	$0.01574 \pm 1.5E-6$
270×	177.71 ± 0.11	$0.00529 \pm 1.5E-6$
woda	2935 ± 27	$0 \pm 3E-6$

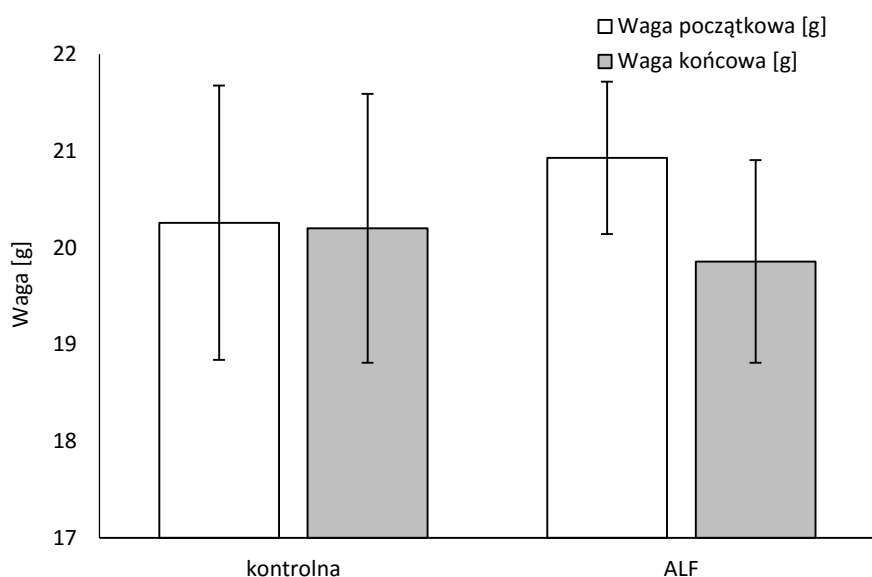


Rysunek 4.1: (A) Krzywe odrostu magnetyzacji zmierzone dla czterech wartości rozcieńczeń środka kontrastowego i dla wody (pokazana w miniaturze ze względu na długi czas relaksacji w porównaniu do roztworów CA). Wartości sygnału są mnożone przez czynnik 10^8 . (B) Zależność pomiędzy odwrotnością zmiany czasu relaksacji a stężeniem kontrastu w badanym roztworze. Z regresji liniowej wyznaczono wartość relaksacyjności r_1 .

4.2. PÓŹNE ZMIANY W MODELU OSTREGO ZAPALENIA WĄTROBY

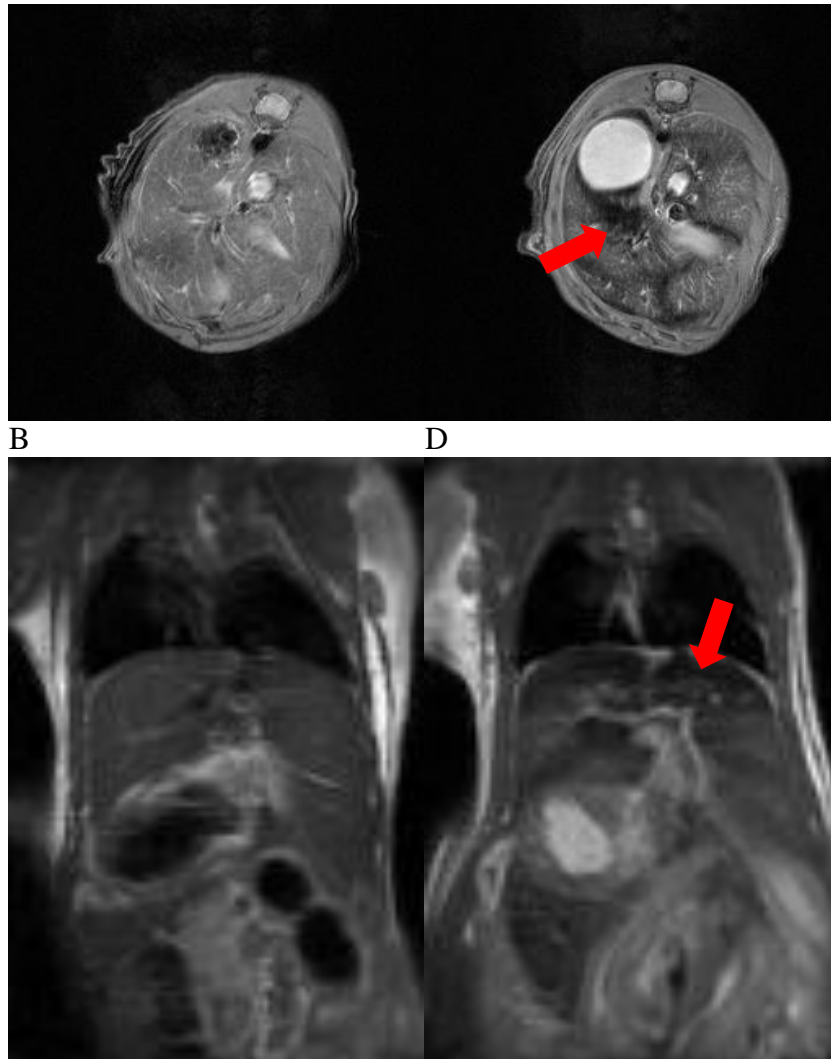
4.2.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZWIERZĄT, HISTOPATOLOGIA, BIOCHEMIA

Zwierzęta ważono przed rozpoczęciem eksperymentów (podanie ConA/soli fizjologicznej) oraz 24 godziny później, kiedy wykonywano obrazowanie MR. Waga zwierząt z grupy kontrolnej była stabilna: (20.1 ± 1.4) g na początku i (20 ± 1.4) g przed MR. Natomiast zwierzęta z grupy chorej w ciągu doby straciły na wadze z początkowych (20.9 ± 0.8) g do (19.9 ± 1.1) g. Różnice w wadze nie były jednak istotne statystycznie (Rysunek 4.2).



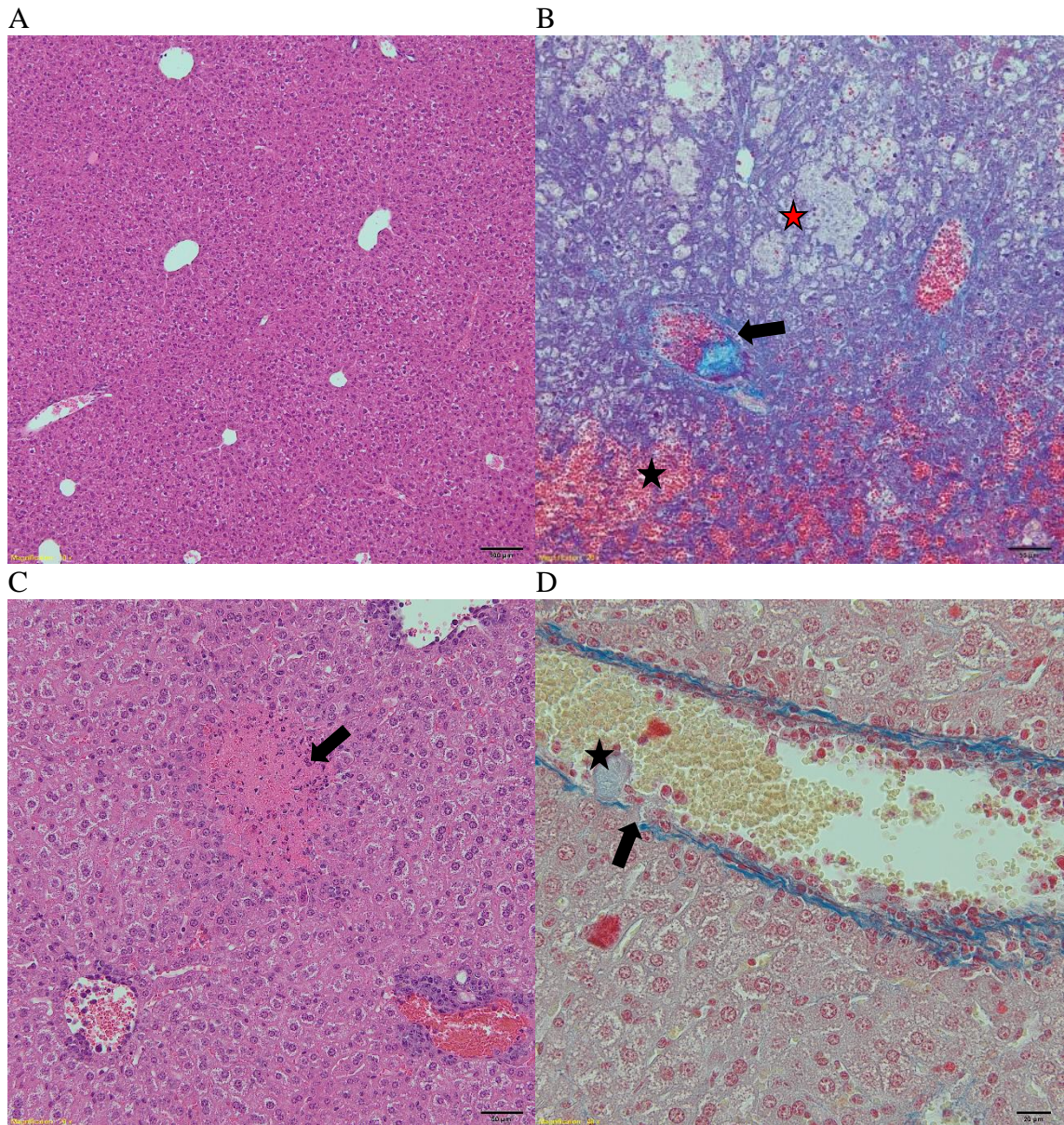
Rysunek 4.2: Waga zwierząt mierzona przed rozpoczęciem eksperymentów (podanie ConA/soli fizjologicznej) oraz 24 godziny później. Wagi zwierząt w grupie kontrolnej były stabilne. W grupie chorej średnia wartość wagi zmalała o 1g.

Zmiany w tkance wątroby wywołane ALF manifestowały się gorzej zdefiniowanym brzegiem wątroby, licznymi odbarwieniami tkanki i widocznymi przekrwieniami. Niektóre z nich zaobserwowano w obrazach MR (Rysunek 4.3). Zauważono różnicę koloru pobranego osocza krwi. Osocze z grupy ALF było zabarwione na różowo, podczas gdy osocze kontrolne było przejrzyste.



Rysunek 4.3: Obrazy MR wątroby myszy z grupy kontrolnej (**A**, **B**) i z grupy ALF (**C**, **D**). W tkance wątroby z grupy ALF zaobserwowano duże obszary ze zmniejszonym kontrastem (**C**, **D**, czerwona strzałka), które podczas pobrania wątroby zweryfikowano jako przekrwienia. Tkanka wątroby z grupy kontrolnej (**A**, **B**) jest jednorodna w całym obrazie. Przedstawiono obrazy są obrazami pilotowymi.

Barwienie histopatologiczne tkanki wątroby pochodzącej z grupy kontrolnej wykazało apoptozę pojedynczych hepatocytów. Ze względu na niewielkie ilości tych zmian uznano obraz tkanki kontrolnej za mieszczący się w granicach normy (Rysunek 4.4A). W próbkach pochodzących z grupy ConA stwierdzono liczne patologiczne zaburzenia struktury tkanki: wynaczynienie krwi, martwicę krwotoczną i skrzepową, nacieki zapalne w ścianach naczyń krwionośnych i w tkance, zatory w naczyniach krwionośnych, dezintegrację ściany naczyń i śródbłonna (Rysunek 4.4B, C, D). Dodatkowo zaobserwowano przedostanie się cytoplazmy komórkowej do światła naczynia w skutek przerwania ściany naczyń. Obserwowano liczne ogniska zapalne i obszary martwicze.



Rysunek 4.4: Wycinki histologiczne wątroby pobrane z (A) grupy kontrolnej (barwienie HE; powiększenie 100×); (B) grupy ConA (TRICHROM; 200×); (C) grupy ConA (HE; 200×); (D) grupy ConA (OMSB; 400×). Na wycinkach grupy ConA można zauważyć wynaczynienie krwi (B, czarna gwiazdka), martwicę krwotoczną (B, czerwona gwiazdka), martwicę skrzepową (C, strzałka) przerwanie integralności ściany naczyń (D, strzałka), cytoplazma hepatocytu wylana do światła naczyń (D, czarna gwiazdka) oraz zator (B, strzałka). Ponadto na obrazie (D) widoczne są: kolagen wokół naczyń krwionośnych (niebieski kolor), erytrocyty (żółty), cytoplazma komórek (różowy), elastyna w ścianie naczyń krwionośnych (purpura).

Cztery parametry histopatologiczne opisujące zmiany tkanki wątroby w warunkach ALF określono na skali przedziałowej. Parametry zbadano testem nieparametrycznym, który wykazał, że trzy z nich były istotnie różne pomiędzy grupami (Tabela 4-2).

Tabela 4-2: Histologiczna ocena wycinków wątroby pobranych ze zdrowej i chorej tkanki. Ocena wykazała, że obraz tkanki z grupy kontrolnej znajdował się w granicach normy. Dane uzyskane na skali jakościowej, analizowano testem U Manna–Witney’a. W tabeli podano wartości median oraz sum rang (w nawiasach). Parametry istotnie różnie zaznaczono (pogrubienie).

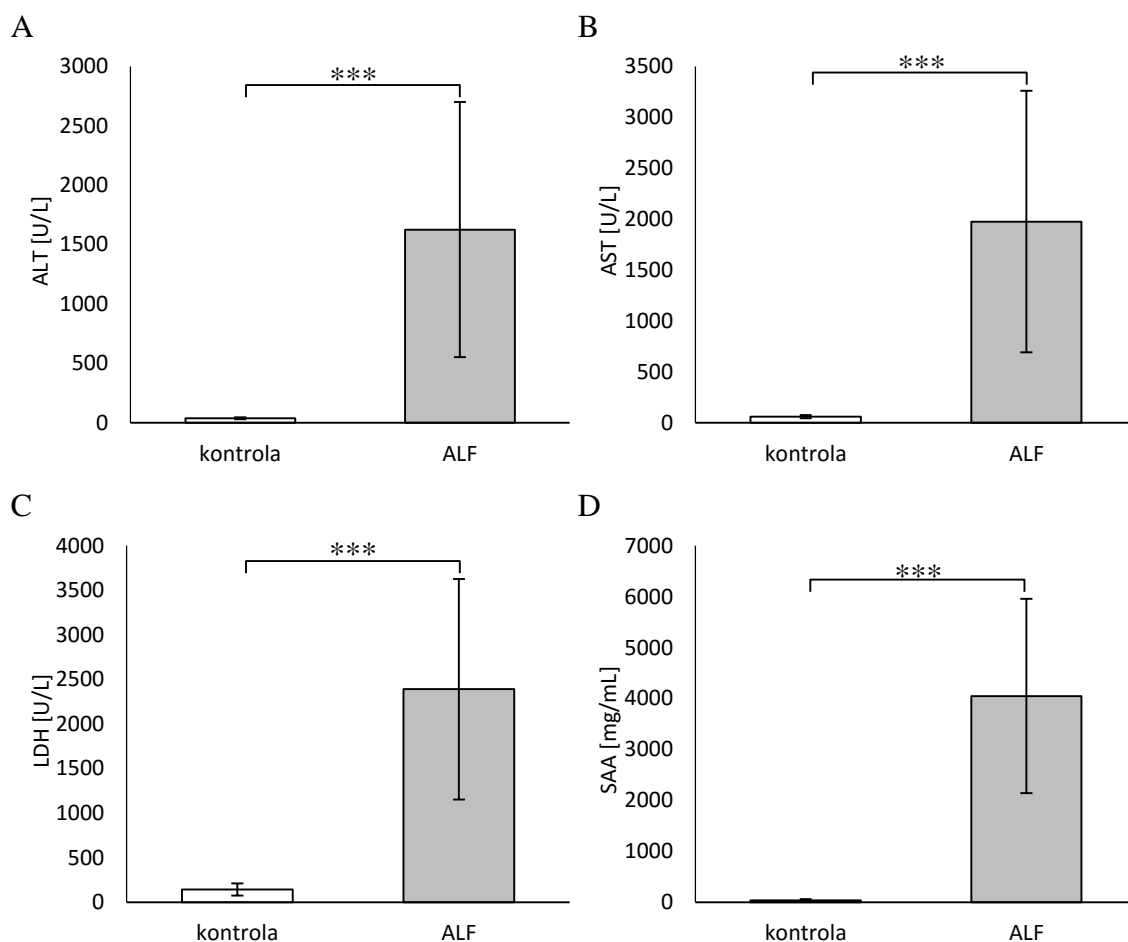
Parametr	Grupa kontrolna	Grupa ALF	Wartość p
Martwica krwotoczna [%]	0 (r.s. 42)	0 (r.s. 63)	0.2
Martwica skrzepowa [%]	0 (r.s. 32)	10 (r.s. 74)	0.009
Nacieki zapalne w ścianie naczyń [j.w.]	0 (r.s. 28)	2 (r.s. 77)	0.002
Ogólne zmiany tkanki [%]	0 (r.s. 28)	40 (r.s. 77)	0.002

Analiza biochemiczna wykazała podniesione poziomy znaczników zawartych w osoczu krwi pobranej od zwierząt z grupy ConA. Test U pokazał, że wszystkie markery istotnie rozróżniały obie grupy. Wartości p dla poszczególnych markerów wyniosły: ALT ($p < 0.001$), AST ($p < 0.001$), LDH ($p < 0.001$), SAA ($p < 0.001$). Dokładne wartości zebrano poniżej (Tabela 4-3, Rysunek 4.5).

Tabela 4-3: Wartości markerów stanu zapalnego oznaczanych z osocza krwi pobranej od zwierząt obu grup doświadczalnych. Parametry badano testem U. Wyniki istotne zaznaczono w tabeli (pogrubienie).

Parametr	Grupa kontrolna	Grupa ALF	Wartość p
ALT [U/L]	38 ± 7 (r.s. 28)	1627 ± 1075 (r.s. 77)	< 0.001
AST [U/L]	61 ± 15 (r.s. 28)	1977 ± 1285 (r.s. 77)	< 0.001
LDH [U/L]	143 ± 67 (r.s. 28)	2390 ± 1237 (r.s. 77)	< 0.001
SAA [mg/mL]	38 ± 24 (r.s. 28)	4049 ± 1910 (r.s. 77)	< 0.001

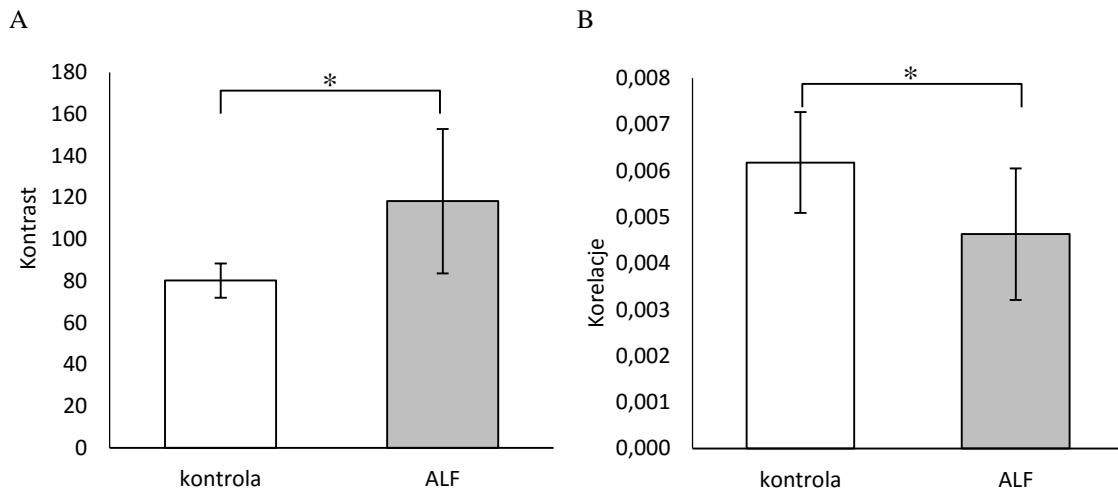
Skróty: ALT - aminotransferaza alaninowa, AST - aminotransferaza asparaginianowa, LDH - dehydrogenaza mleczanowa, SAA - białka ostrej fazy.



Rysunek 4.5: Wykresy znaczników stanów zapalnych zmierzonych w osoczu krwi zwierząt z grupy kontrolnej i grupy ALF: ALT, AST, LDH i SAA. Poziomy badanych znaczników wzrosły. Wszystkie zmiany były istotne statystycznie (***, test U, $p < 0.001$).

4.2.2. ANALIZA TEKSTUR

Dla każdego obrazu wyznaczono parametry oparte o histogram, macierz współwystępowania oraz macierz długości ciągów (Tabela 4-4). Rozkłady populacji sześciu parametrów w grupie ALF nie należały do rozkładów normalnych. Były to skośność, ASM, entropia SRE, LRE oraz FR. Pozostałe parametry charakteryzowały się rozkładem gaussowskim. Dla dwóch parametrów teksturalnych wyznaczonych na podstawie macierzy GLC stwierdzono istotność statystyczną. Pierwszym był kontrast (test t, $p = 0.015$) a drugim korelacje (test t, $p = 0.04$). Parametr kontrast osiągnął wartość (80.2 ± 8.2) w grupie kontrolnej, natomiast w grupie ALF jego wartość wzrosła do (118 ± 35) (Rysunek 4.6A). Parametr korelacje osiągnął wartość (0.0062 ± 0.0011) w grupie kontrolnej, natomiast w grupie ALF jego wartość spadła do (0.0046 ± 0.0014) (Rysunek 4.6B).



Rysunek 4.6: Na wykresach przedstawiono wartości parametrów kontrast (A) i korelacje (B), które były istotnymi parametrami teksturalnymi wskazującymi różnicę pomiędzy badanymi grupami (*, test t, $p = 0.04$).

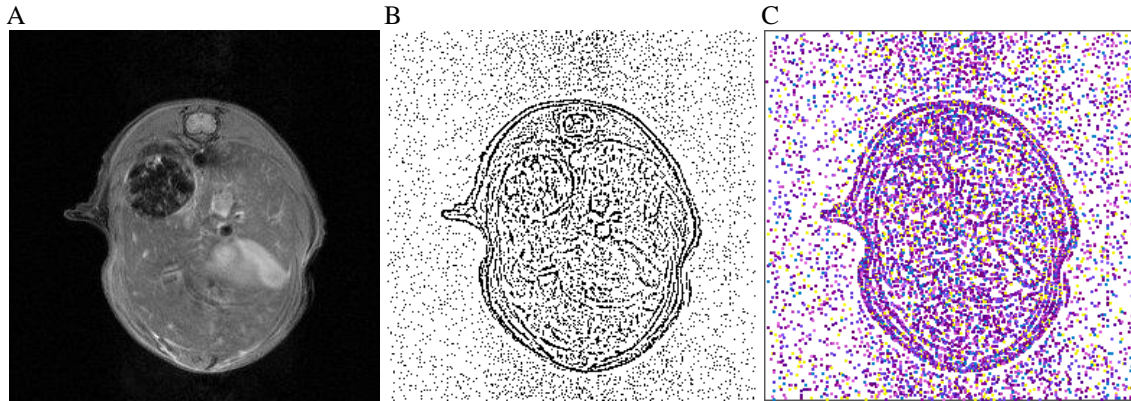
Tabela 4-4: Wartości średnie wszystkich parametrów teksturalnych wraz z ich odchyleniami standardowymi. Podano również wartości p przeprowadzonych testów statystycznych. Parametry o rozkładzie normalnym testowano testem t. Parametry o rozkładzie innym od normalnego – testem U Manna–Witney’a, sumy rang podano w nawiasach. Parametry istotne statystycznie oznaczono (pogrubienie).

Parametr	Grupa kontrolna	Grupa ALF	Wartość p
Średnia	118.8 ± 3.4	121.4 ± 2.1	0.11
Skośność	0.64 ± 0.26 (r.s. 51)	0.60 ± 0.35 (r.s. 54)	0.89
Kurtoza	0.81 ± 0.74	1.25 ± 0.53	0.23
ASM	0.0052 ± 0.0012 (r.s. 53)	0.0050 ± 0.0015 (r.s. 52)	1
Kontrast	80.2 ± 8.2	118 ± 35	0.015
Korelacje	0.0062 ± 0.0011	0.0046 ± 0.0014	0.04
IDM	0.148 ± 0.010	0.133 ± 0.017	0.07
Entropia	5.48 ± 0.19 (r.s. 54)	5.53 ± 0.21 (r.s. 56)	0.71
SRE	0.943 ± 0.010 (r.s. 52)	0.945 ± 0.010 (r.s. 53)	1
LRE	1.196 ± 0.046 (r.s. 54)	1.188 ± 0.045 (r.s. 51)	0.9
GLN	29028 ± 820	28249 ± 798	0.1
RLN	538 ± 56	530 ± 33	0.74
FR	0.942 ± 0.012 (r.s. 51)	0.944 ± 0.012 (r.s. 54)	0.89

Skróty: ASM - drugi moment kątowy, IDM - odwrotny moment różnicowy, SRE - wzmocnienie krótkich ciągów, LRE - wzmocnienie długich ciągów, GLN - niejednorodność poziomów szarości, RLN - niejednorodność długości ciągów, FR - frakcja obrazu w ciągach.

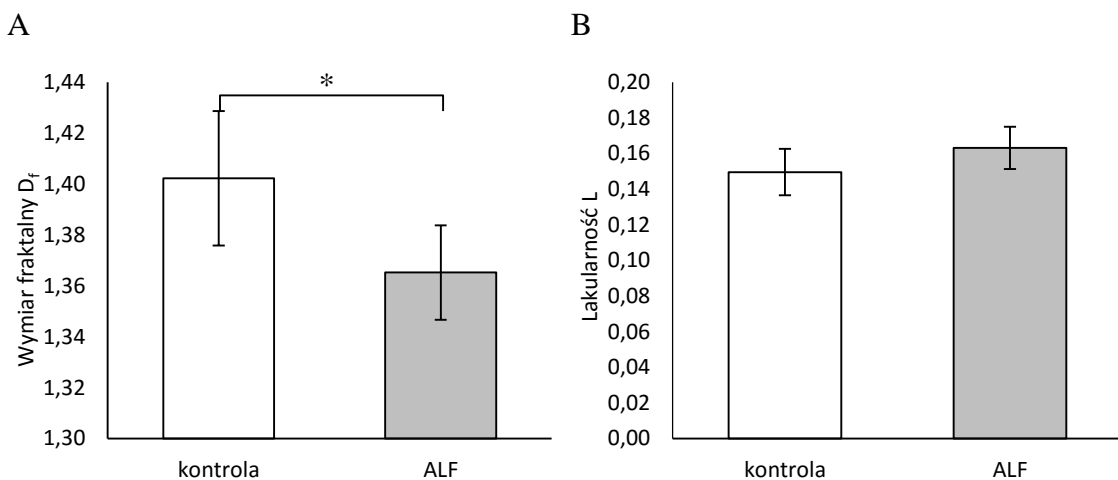
4.2.3. ANALIZA FRAKTALNA

Przykładowy obraz MR wątroby, jego binarną wersję oraz uzyskaną mapę fraktalną przedstawiono poniżej (Rysunek 4.7).



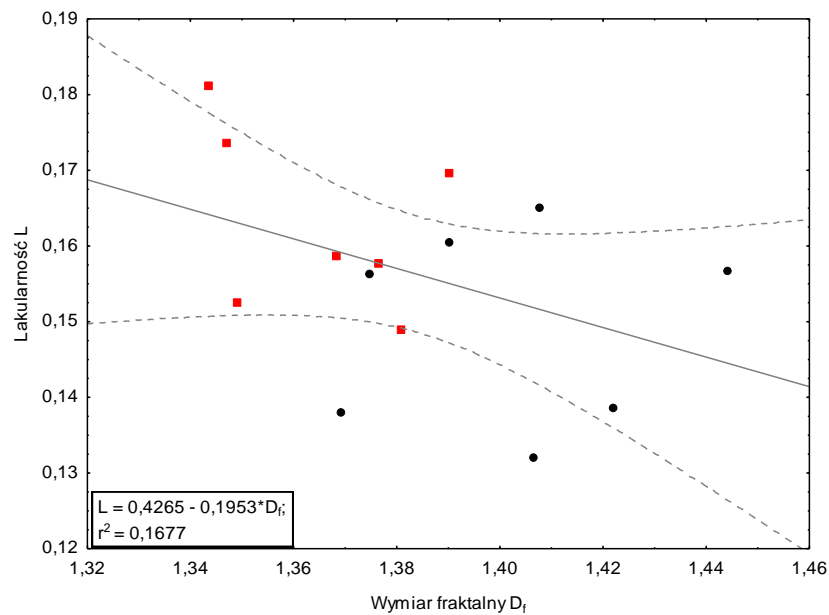
Rysunek 4.7: Proces wyznaczania wymiaru fraktalnego obrazu MR wątroby. (A) Obraz MR wątroby. (B) Obraz binarny powstały z obrazu A na który nałożono filtr wyostrażający. (C) Mapa wymiaru fraktalnego obrazu binarnego B.

Wyliczone wartości średnie wymiaru fraktalnego obrazu były niższe w grupie chorej, w której wynosiły (1.365 ± 0.019) (Rysunek 4.8A). Dla porównania w grupie kontrolnej D_f był równy (1.402 ± 0.026). Wartości średnie tego parametru były istotnie różne pomiędzy grupami (test t, $p = 0.01$). Drugi parametr lakularność był wyższy w obrazach MR tkanki chorej (Rysunek 4.8B). Lakularność wyniosła (0.149 ± 0.013) w grupie kontrolnej oraz (0.163 ± 0.012) w grupie ALF, jednak ten parametr nie osiągnął istotności statystycznej (test t, $p = 0.06$).



Rysunek 4.8: Wymiar fraktalny (**A**) i lakularność (**B**) wyznaczone na podstawie obrazów MR wątroby. Wartości średnie D_f były istotnie różne pomiędzy badanymi grupami (*, test t, $p = 0.01$).

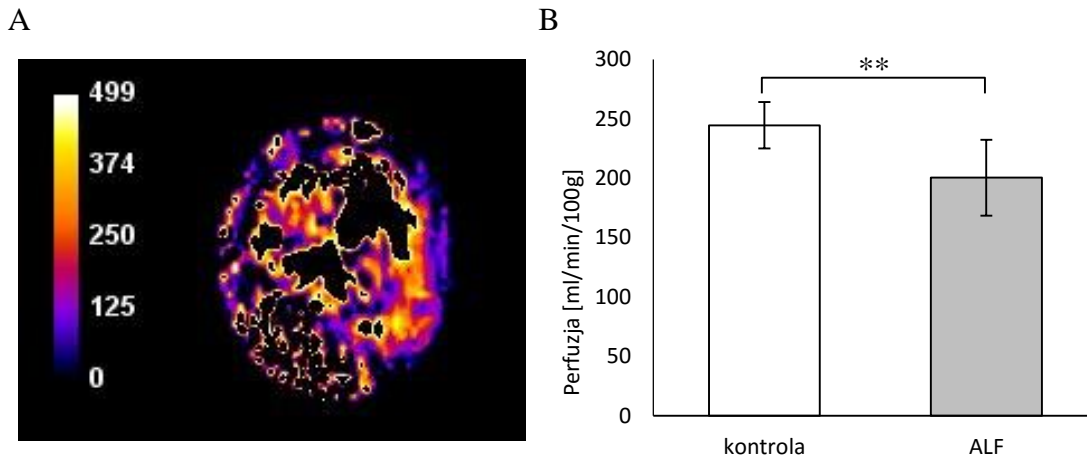
Wymiar fraktalny i lakularność są parametrami odwrotnie skorelowanymi (Rysunek 4.9). Brak wysokiego współczynnika korelacji liniowej ($R^2 = 0.17$) jest wynikiem braku istotności statystycznej dla zmiany wartości lakularności pomiędzy badanymi grupami.



Rysunek 4.9: Zależność pomiędzy wymiarem fraktalnym obrazu a lakularnością. Oznaczenia na wykresie: grupa kontrolna – czarne kropki, grupa ALF – czerwone kwadraty.

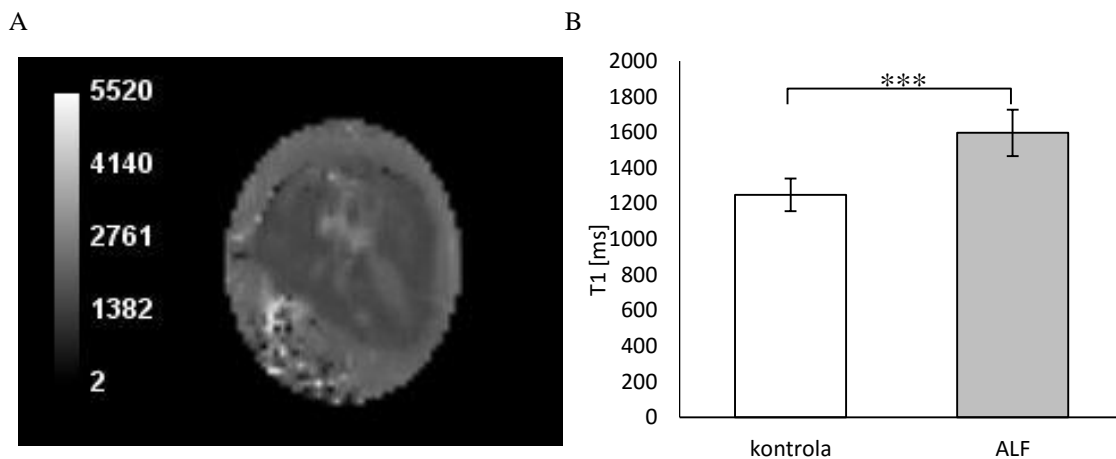
4.2.4. PERFUZJA I CZAS RELAKSACJI T_1

Przykładowa mapa perfuzji uzyskana w wyniku obrazowania MR przedstawiona została poniżej (Rysunek 4.10A). Usunięte zostały piksele znajdujące się w obszarze dużych naczyń krwionośnych oraz piksele o wartościach ujemnych. Perfuzja w tkance wątroby w grupie zdrowej wyniosła (245 ± 20) ml/min/100g, podczas gdy w grupie ALF wyniosła (200 ± 32) ml/min/100g (Rysunek 4.10B). Wartość perfuzji zmalała w grupie chorej o 18% w stosunku do grupy kontrolnej. Wynik był istotnie różny (test t, $p = 0.008$).



Rysunek 4.10: (A) Przykładowa mapa perfuzji uzyskana w wyniku obrazowania MR. Skala perfuzji ma rozpiętość 0 – 500 ml/min/100g tkanki. Obraz przeskalowano do 256×170 px. (B) Wartości perfuzji uzyskane w grupach kontrolnej i chorej. Wyniki uzyskane w obu grupach istotnie się różniły (**, test t, $p = 0.008$).

Poniżej zaprezentowano przykładową mapę czasu relaksacji T_1 wyznaczoną na podstawie danych uzyskanych w eksperymencie FAIR-EPI z wysyceniem nieselektywnym (Rysunek 4.11A). Wartość czasu T_1 w grupie kontrolnej była równa (1249 ± 91) ms, podczas gdy w grupie ConA zwiększyła się (1597 ± 130) ms (Rysunek 4.11B). Różnica była istotna statystycznie (test t, $p < 0.001$).



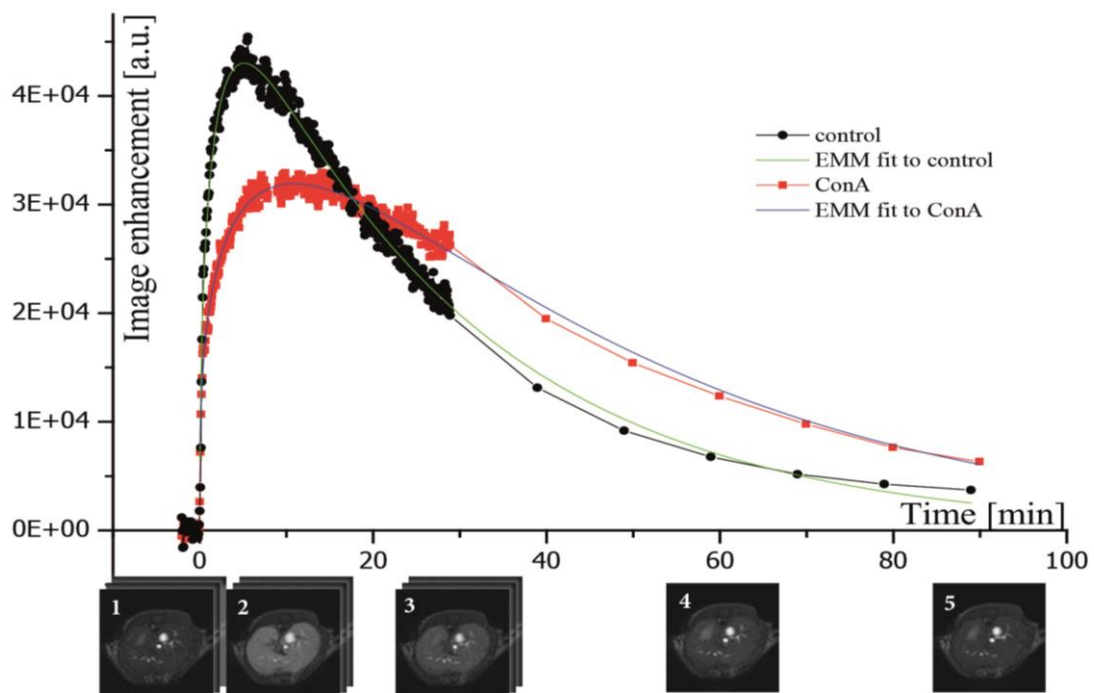
Rysunek 4.11: (A) Przykładowa mapa czasu relaksacji T_1 w ms uzyskana z eksperymentu FAIR-EPI z wysyceniem nieselektywnym. Obraz przeskalowano do 256×170 px. (B) Wartości czasu T_1 uzyskane w obu grupach pomiarowych istotnie się różniły (***, test t, $p < 0.001$).

Zbadano korelacje pomiędzy perfuzją i T_1 a wynikami oceny histologicznej i biochemicznej. Uzyskano istotną korelację pomiędzy perfuzją a naciekami zapalnymi

w ścianach naczyń (-0.77) oraz z LDH (-0.58). Natomiast czas relaksacji podłużnej tkanki korelował z naciekami zapalnymi w ścianach naczyń (0.69), ogólnymi zmianami tkanki (0.69), AST (0.53) oraz SAA (0.89).

4.2.5. EMPIRYCZNE MODELOWANIE MATEMATYCZNE (EMM)

Model empiryczny dopasowano do danych zebranych w dynamicznym obrazowaniu z użyciem hepatospecyficznego środka kontrastowego opartego o Gd-EOB-DTPA. Przykładowy przebieg kinetyki środka kontrastowego od momentu podania w zdrowej i chorej tkance przedstawiono na Rysunek 4.12. Można zauważyć, że kształty krzywych kinetyki środka kontrastowego w zdrowej i chorej tkance są różne. Główną różnicą jest kształt wierzchołka – łagodniejszy u chorych, a także przebieg fragmentu krzywej opisujący wypłukiwanie kontrastu (od wierzchołka do końca pomiaru) – u zwierząt chorych zbocze wypłukiwania ma łagodniejsze nachylenie. Dodatkowo wartość jasności obrazu zmierzonego w 90 minucie po podaniu kontrastu jest wyższa w grupie chorej.



Rysunek 4.12: Przykładowe krzywe jasności obrazu MR od czasu uzyskane dla zdrowej (czarna krzywa) i chorej tkanki (czerwona krzywa). Można zaobserwować różnicę w kształcie wierzchołków i nachyleniu zbocze wypłukiwania. Poniżej przykładowe obrazy MR: 1) obrazy bazowe uzyskane przed podaniem środka kontrastowego; 2) obrazy

o maksymalnym rozjaśnieniu uzyskane 6 min po podaniu kontrastu; **3**) obrazy uzyskane 30 min po podaniu kontrastu, rozpoczęty proces wypłukiwania środka kontrastowego z tkanki wątroby; **4**) obraz uzyskany po 60 min od podania kontrastu; **5**) obraz uzyskany 90 min po podaniu kontrastu – powrót do bazowej wartości jasności obrazu. W trakcie pierwszych 30 min wykonano trzy serie obrazów, z których każda zawierała 150 obrazów. Od 30 do 90 minuty wykonywano 1 obraz, co 10 minut.

Model EMM dopasowano do danych DCE-MRI z wysokim współczynnikiem determinacji ($R^2 > 0.98$). Wartości wszystkich parametrów EMM zebrano w Tabeli 4-5. Wszystkie parametry oprócz początkowej szybkości usuwania kontrastu (γ) charakteryzowały się rozkładem normalnym i zostały przetestowane testem t. Zdolność parametru γ do rozróżnienia grup pomiarowych testowano testem nieparametrycznym U Manna–Whitney’a. Sześć parametrów było istotnie różnych pomiędzy grupą zdrową i chorą: β ($p = 0.004$), T_{peak} ($p < 0.001$), κ_{peak} ($p = 0.001$), ES ($p = 0.006$), $T_{1/2}$ ($p < 0.001$) i AUC ($p = 0.003$).

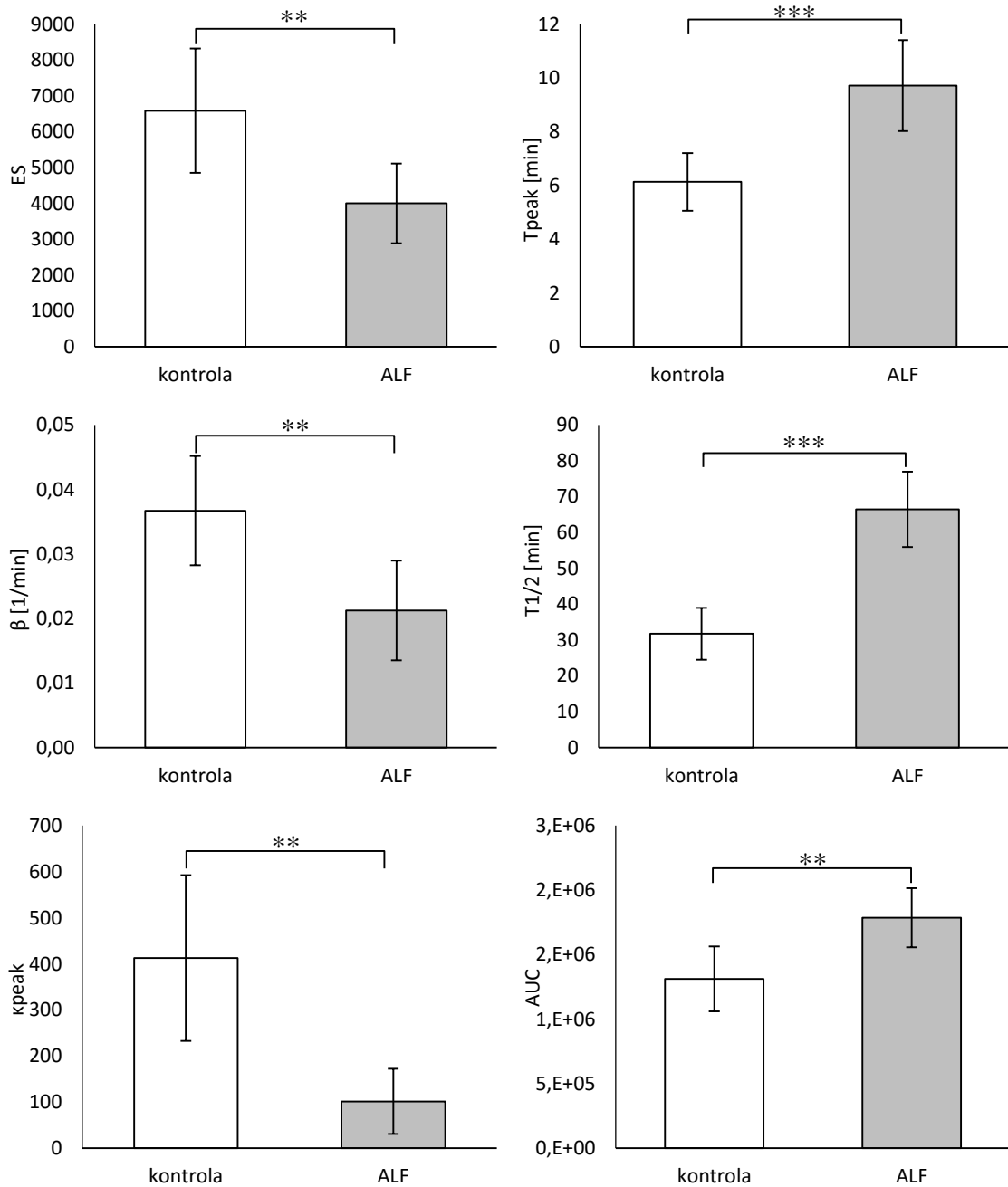
Tabela 4-5: Wartości parametrów EMM wyznaczone dla zwierząt z grupy kontrolnej i grupy ALF oraz wartości p wskazujące czy różnica średnich wartości parametrów jest istotna. Parametr γ badano testem U Manna–Whitney’a. W nawiasach przy wartościach średnich parametru γ podano sumę rang. Pozostałe parametry badano testem t.

Parametr	Grupa kontrolna	Grupa ALF	Wartość p
A	57100 ± 9669	67355 ± 31747	0.43
α [1/min]	0.20 ± 0.11	0.11 ± 0.08	0.1
q	0.432 ± 0.064	0.380 ± 0.064	0.15
β [1/min]	0.037 ± 0.008	0.021 ± 0.008	0.004
γ [1/min]	0.001 ± 0.002 (r.s. 43)	0.004 ± 0.007 (r.s. 62)	0.25
T_{peak} [min]	6.14 ± 1.07	9.72 ± 1.69	< 0.001
κ_{peak}	413 ± 180	102 ± 71	0.001
ES [1/min]	6587 ± 1731	4002 ± 1113	0.006
$T_{1/2}$ [min]	31.7 ± 7.3	66.5 ± 10.5	< 0.001
AUC	131 ± 25 × 10⁴	179 ± 23 × 10⁴	0.003

Skróty: A – maksimum sygnału, α – szybkość wychwytu środka kontrastowego, q – parametr opisujący początkowe nachylenie zbocza narastającego oraz krzywiznę wierzchołka krzywej, β – szybkość usuwania środka kontrastowego, γ – początkowa szybkość usuwania kontrastu, T_{peak} – czas do wierzchołka intensywności sygnału, κ_{peak} – krzywizna

wierzchołka, ES – nachylenie narastającego zbocza krzywej, $T_{1/2}$ – połowiczny czas usuwania kontrastu, AUC – pole powierzchni pod krzywą.

Istotnie statystycznie parametry pokazano na Rysunek 4.13. Wartości parametrów ES i T_{peak} wskazują na szybszy wychwyty kontrastu z krwi w grupie kontrolnej. Wartości parametrów β i $T_{1/2}$ wskazują na zwolnione wypłukiwanie kontrastu z hepatocytów w grupie ConA.



Rysunek 4.13: Parametry EMM, dla których uzyskano istotność statystyczną: ES - nachylenie narastającego zbocza krzywej, T_{peak} – czas do wierzchołka intensywności sygnału, β – szybkość usuwania środka kontrastowego, $T_{1/2}$ – połowiczny czas usuwania

kontrastu, κ_{peak} – krzywizna wierzchołka, AUC – pole powierzchni pod krzywą. Różnica wartości średnich obu grup była istotna statystycznie (test t, oznaczenia: ** dla $p < 0.01$, *** dla $p < 0.001$).

Sprawdzono korelacje pomiędzy parametrami uzyskanymi z modelowania EMM zastosowanego do danych uzyskanych z DCE-MRI a obserwacjami histologicznymi i biochemicznymi. Wyniki zamieszczono w Tabeli 4-6.

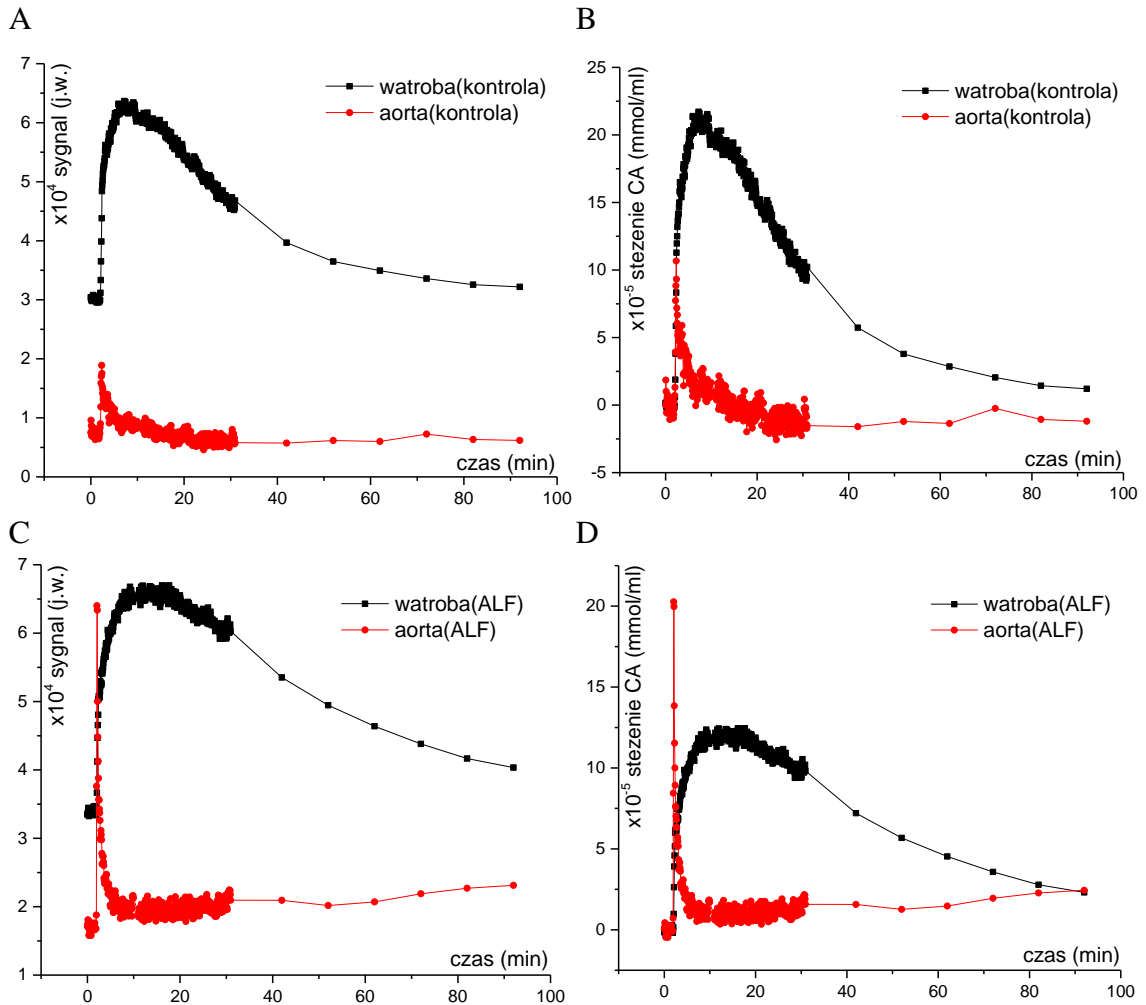
Tabela 4-6: Korelacje pomiędzy parametrami EMM a obserwacjami histologicznymi i biochemicznymi zbadano przy zastosowaniu testu rang Spearmana. W tabeli przedstawiono współczynnik korelacji. Za istotne uznano korelacje, dla których $p < 0.05$ (pogrubione w tabeli).

	T_{peak} [min]	A	α [1/min]	β [1/min]	γ [1/min]	q	$T_{1/2}$ [min]	κ_{peak}	ES	AUC
Martwica krwotoczna [%]	0.55	0.68	-0.56	-0.13	0.03	-0.40	0.46	-0.42	-0.52	0.18
Martwica skrzepowa [%]	0.81	0.35	-0.50	-0.50	0.05	-0.45	0.70	-0.62	-0.72	0.47
Nacieki zapalne w ścianie naczyń [j.w.]	0.63	0.23	-0.42	-0.64	0.62	-0.41	0.68	-0.73	-0.47	0.77
Ogólne zmiany tkanki [%]	0.88	0.31	-0.51	-0.61	0.08	-0.46	0.85	-0.70	-0.77	0.58
ALT [U/L]	0.91	0.25	-0.50	-0.64	0.16	-0.60	0.76	-0.69	-0.72	0.69
AST [U/L]	0.91	0.24	-0.49	-0.65	0.16	-0.60	0.77	-0.69	-0.72	0.71
LDH [U/L]	0.82	0.37	-0.52	-0.62	0.28	-0.53	0.75	-0.72	-0.69	0.65
SAA [mg/mL]	0.51	0.17	-0.30	-0.49	0.16	-0.13	0.75	-0.55	-0.49	0.47

Skróty: A – maksimum sygnału, α – szybkość wychwytu środka kontrastowego, q – parametr opisujący początkowe nachylenie zbocza narastającego oraz krzywiznę wierzchołka krzywej, β – szybkość usuwania środka kontrastowego, γ – początkowa szybkość usuwania kontrastu, T_{peak} – czas do wierzchołka intensywności sygnału, κ_{peak} – krzywizna wierzchołka, ES – nachylenie narastającego zbocza krzywej, $T_{1/2}$ – połowiczny czas usuwania kontrastu, AUC – pole powierzchni pod krzywą, ALT - aminotransferaza alaniowa, AST - aminotransferaza asparaginianowa, LDH - dehydrogenaza mleczanowa, SAA - białka ostrej fazy.

4.2.6. MODELOWANIE KOMPARTMENTOWE (MK)

Wszystkie krzywe dynamiczne przeliczono z wartości intensywności pikseli na stężenie CA. Maksymalne stężenia CA w tkance wątroby grupy kontrolnej były wyższe niż w grupie ALF. W przypadku aorty sytuacja była odwrotna – wyższe wartości stężenia CA w aorcie obserwowane były w grupie ALF (Rysunek 4.14).



Rysunek 4.14: Przykładowe krzywe DCE-MRI z grupy kontrolnej (A, B) i grupy ALF (C, D). Krzywe oryginalne zebrane z obrazów MR znajdują się w lewej kolumnie (A, C, wartości mnożone przez 10^4). Krzywe po przeliczeniu na stężenie CA w prawej kolumnie (B, D, wartości mnożone przez 10^{-5}).

ROI ulokowane w aorcie miało znacznie mniejszą powierzchnię niż ROI w tkance wątroby. Dlatego na potrzeby modelowania uśredniono krzywe AIF ze wszystkich zwierząt w grupie (dla zwierząt kontrolnych i chorych osobno). W grupie kontrolnej uśredniano sygnał z 7 zwierząt, a w grupie ALF z 6, ponieważ u jednego zwierzęcia z tej

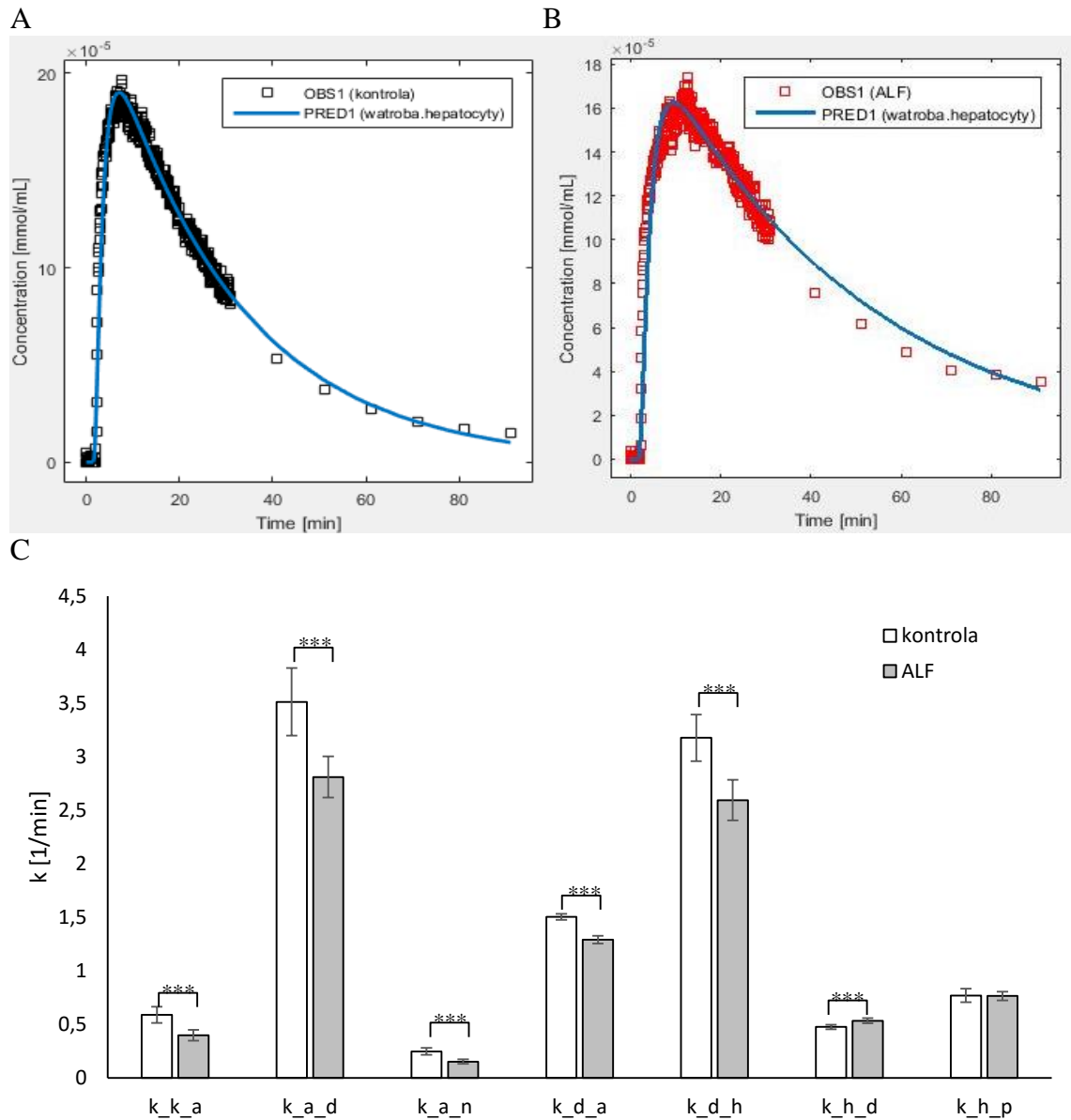
grupy nie było możliwe uzyskanie krzywej AIF. Dopasowanie dwueksponencjalnej funkcji zaniku do zbocza opadającego sygnału w aorcie (równanie 3.30) pozwoliło scharakteryzowanie kinetyki CA w naczyniach krwionośnych oraz na wyznaczenie stałych czasowych k_1 i k_2 . W grupie kontrolnej otrzymano: $k_1 = (1.63 \pm 0.07) \text{ min}^{-1}$, $k_2 = (0.07131 \pm 0.0035) \text{ min}^{-1}$. W grupie ALF otrzymano: $k_1 = (1.472 \pm 0.033) \text{ min}^{-1}$, $k_2 = (0.0582 \pm 0.0017) \text{ min}^{-1}$. Wszystkie parametry dopasowania podano w Tabeli 4-7.

Tabela 4-7: Parametry dopasowania dwueksponencjalnej krzywej zaniku do krzywych uzyskanych z uśrednienia sygnału DCE-MRI w dwóch grupach doświadczalnych. Dane nie były testowane statystycznie.

	Grupa kontrolna	Grupa ALF
A_1 [mmol/mL]	$30.9 \pm 5.7 \times 10^{-4}$	$34.3 \pm 2.8 \times 10^{-4}$
t_1 [min]	0.614 ± 0.026	0.679 ± 0.015
A_2 [mmol/mL]	$161.7 \pm 6.9 \times 10^{-7}$	$314 \pm 7.2 \times 10^{-7}$
t_2 [min]	14.02 ± 0.68	17.17 ± 0.49

Średnia dawka CA podana w grupie kontrolnej wyniosła $(50.7 \pm 3.7) \times 10^{-5}$ mmol, natomiast w grupie ALF $(49.6 \pm 2.2) \times 10^{-5}$ mmol. Dawki dostosowywano indywidualnie do masy ciała każdego zwierzęcia.

Wyznaczanie stałych transportu kontrastu w modelu kompartmentowym miało kilka etapów. Najpierw wykonano modelowanie populacji całej grupy, dla zwierząt kontrolnych i chorych oddzielnie. W tym modelowaniu użyto wartości stałych k_d^a i k_n^a wyznaczonych w aorcie. Uzyskane wartości stałych transportu z tego modelowania potraktowano, jako wartości wejściowe w indywidualnych dopasowaniach. Dopasowanie indywidualne przeprowadzono kilkakrotnie. Ostateczne wartości stałych charakteryzowały się rozkładami normalnymi. Test t wykazał znaczące różnice pomiędzy grupami (Tabela 4-8, Rysunek 4.15C). Przykładowe krzywe wraz z dopasowanym modelem znajdują się na Rysunek 4.15A, B. Wartości stałych k_d^a i k_n^a , którym przypisano wartości początkowe na podstawie krzywych AIF, wskutek modelowania kompartmentowego wzrosły w obu grupach.



Rysunek 4.15: Przykładowe dopasowanie krzywej przy użyciu modelu kompartmentowego: **(A)** grupa kontrolna, **(B)** grupa ALF. **(C)** Zestawienie wszystkich stałych transportu dla dwóch grup doświadczalnych wyznaczonych w trakcie modelowania. Uzyskano istotności statystyczne dla 6 parametrów (test t, $p < 0.001$, ***).

Tabela 4-8: Stałe transportu środka kontrastowego pomiędzy kompartmentami zaproponowanego modelu. Obliczenia wykonano dla 7 myszy kontrolnych i 7 chorych. Parametry, których średnie były istotnie różne pomiędzy grupami zaznaczono (pogrubienie).

	Grupa kontrolna	Grupa ALF	Wartość p
k_a^k [min ⁻¹]	0.589 ± 0.075	0.398 ± 0.050	< 0.001
k_d^a [min ⁻¹]	3.51 ± 0.32	2.81 ± 0.19	< 0.001
k_n^a [min ⁻¹]	0.247 ± 0.033	0.151 ± 0.021	< 0.001
k_a^d [min ⁻¹]	1.504 ± 0.027	1.290 ± 0.037	< 0.001
k_h^d [min ⁻¹]	3.18 ± 0.22	2.59 ± 0.19	< 0.001
k_d^h [min ⁻¹]	0.475 ± 0.021	0.534 ± 0.023	< 0.001
k_p^h [min ⁻¹]	0.770 ± 0.064	0.765 ± 0.040	0.88

Skróty (indeksy kompartmentów): k – dawka kontrastu, a – aorta, n – nerki, d – przestrzeń Disseo, h – hepatocyty, p – pęcherzyk żółciowy.

Podobnie jak w przypadku modelownia EMM sprawdzono korelacje z wynikami histologicznymi i biochemicznymi (Tabela 4-9). Zauważalne jest, że stałe kontrastu są w większości skorelowane negatywnie z wynikami obu ocen.

Tabela 4-9: Korelacje rang Spearmana pomiędzy stałymi czasowymi transportu CA wyznaczonymi w modelowaniu kompartmentowym a wynikami ocen histologicznej i biochemicznej. Tabela zawiera współczynniki korelacji. Za istotnie ważne uznano korelacje dla $p < 0.05$ (pogrubione).

	k_a^k [min ⁻¹]	k_d^a [min ⁻¹]	k_n^a [min ⁻¹]	k_a^d [min ⁻¹]	k_h^d [min ⁻¹]	k_d^h [min ⁻¹]	k_p^h [min ⁻¹]
Martwica krwotoczna [%]	-0.42	-0.30	-0.42	-0.44	-0.30	0.33	0.21
Martwica skrzepowa [%]	-0.35	-0.31	-0.38	-0.57	-0.38	0.29	0.38
Nacieki zapalne w ścianie naczyń [j.w.]	-0.71	-0.79	-0.62	-0.59	-0.81	0.71	-0.15
Ogólne zmiany tkanki [%]	-0.55	-0.53	-0.52	-0.62	-0.60	0.48	0.21
ALT [U/L]	-0.82	-0.75	-0.81	-0.87	-0.55	0.83	0.18
AST [U/L]	-0.85	-0.81	-0.82	-0.79	-0.61	0.85	0.07
LDH [U/L]	-0.79	-0.73	-0.82	-0.87	-0.57	0.76	0.17
SAA [U/L]	-0.76	-0.81	-0.72	-0.63	-0.82	0.75	-0.06

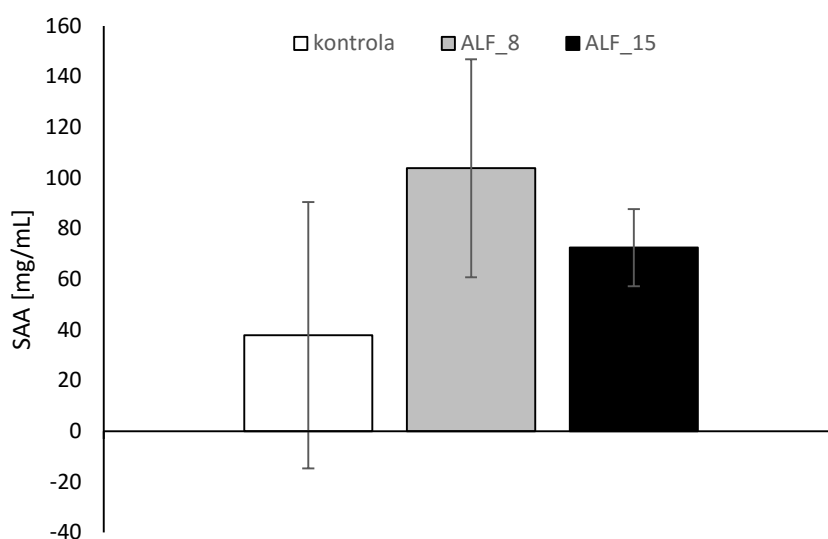
Skróty: ALT - aminotransferaza alaninowa, AST - aminotransferaza asparaginianowa, LDH - dehydrogenaza mleczanowa, SAA - białka ostrej fazy; (indeksy kompartmentów):

k – dawka kontrastu, a – aorta, n – nerki, d – przestrzeń Dissego, h – hepatocyty, p – pęcherzyk żółciowy.

4.3. Wczesne zmiany w modelu ostrego zapalenia wątroby

4.3.1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZWIERZĄT. BIOCHEMIA

Zwierzęta zważono przez pomiarami MR. Ich waga wyniosła średnio (19.5 ± 1.2) g. Nie zauważono zmian w tkance wątroby na obrazach MR. Zmiany w tkance wątroby nie były również widoczne w trakcie pobierania krwi z żyły nerkowej losowych zwierząt. Osocze odwirowanej krwi do oznaczeń biochemicznych w grupie kontrolnej było przezroczyste, natomiast w grupach chorych było zabarwione na różowo (podobnie jak w modelu późnych zmian), jednak oznaczenia nie wykazały podniesionych poziomów białek ostrej fazy (Rysunek 4.16). SAA zbadano dla 3 zwierząt z grupy kontrolnej, 6 z grupy ALF_8 i 5 z grupy ALF_15. Ilość SAA w osoczu krwi dla grup kontrolnej, ALF_8 i ALF_15 wyniosła odpowiednio (38 ± 53) mg/mL, (104 ± 43) mg/mL i (72 ± 15) mg/mL. Test nieparametryczny nie wykazał istotnych różnic pomiędzy grupami.



Rysunek 4.16: Wykres białek ostrej fazy dla losowych zwierząt z badanych grup. Wyniki nie były istotne statystycznie.

4.3.2. PERFUZJA I CZAS RELAKSACJI T₁

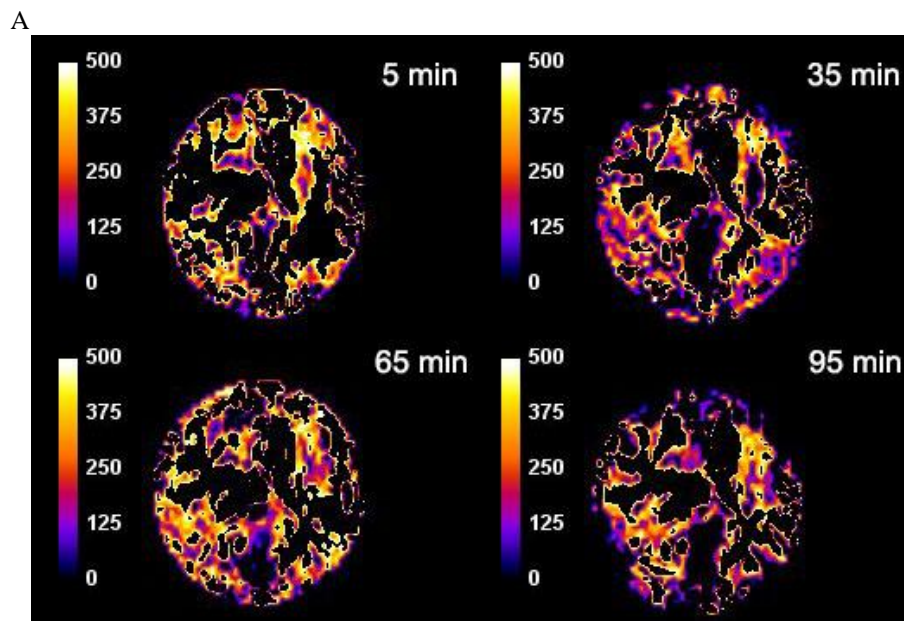
Reprezentatywne mapy perfuzji znajdują się na Rysunek 4.17A. Na wszystkich badanych mapach perfuzji wykonano odcięcie wartości ujemnych i przekraczających 500

ml/min/100g. Wartości perfuzji zmierzone podczas kolejnych pomiarów w grupach eksperymentalnych przedstawiono poniżej (Tabela 4-10, Rysunek 4.17B).

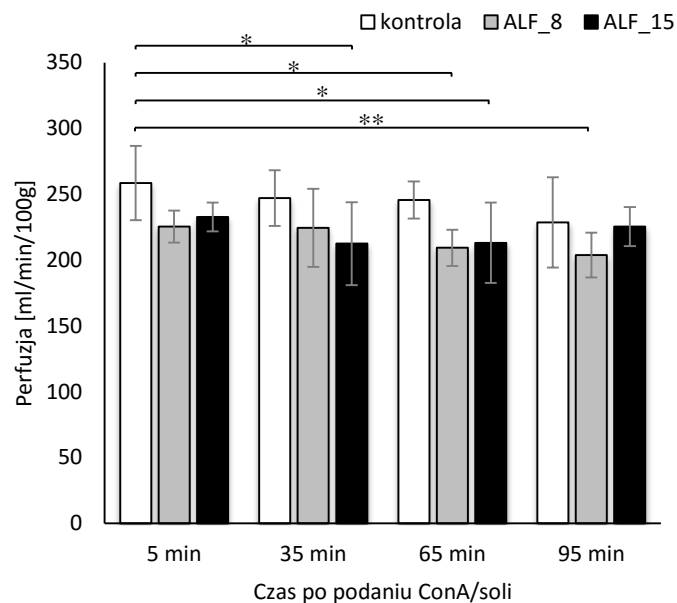
Tabela 4-10: Wartości perfuzji [ml/min/100g] zmierzone dla zwierząt kontrolnych i zwierząt z grup ALF we wczesnych zmianach chorobowych.

Grupa	Czas po podaniu ConA/soli fizjologicznej			
	5 min	35 min	65 min	95 min
Kontrolna	259 ± 26	247 ± 30	246 ± 13	229 ± 25
ALF_8	225 ± 12	225 ± 30	209 ± 14	204 ± 17
ALF_15	223 ± 25	207 ± 32	211 ± 28	225 ± 13

Wykazano różnicę pomiędzy pomiarem w grupie kontrolnej w 5 minucie a pomiarami w grupie ALF_8 w 65 minucie (test HSD, $p = 0.02$) i 95 minucie (test HSD, $p = 0.007$), oraz pomiędzy tym samym pomiarem grupy kontrolnej a pomiarem w grupie ALF_15 w 35 minucie (test HSD, $p = 0.01$) i 65 minucie (test HSD, $p = 0.03$). Różnice zaznaczono na wykresie (Rysunek 4.17B).



B

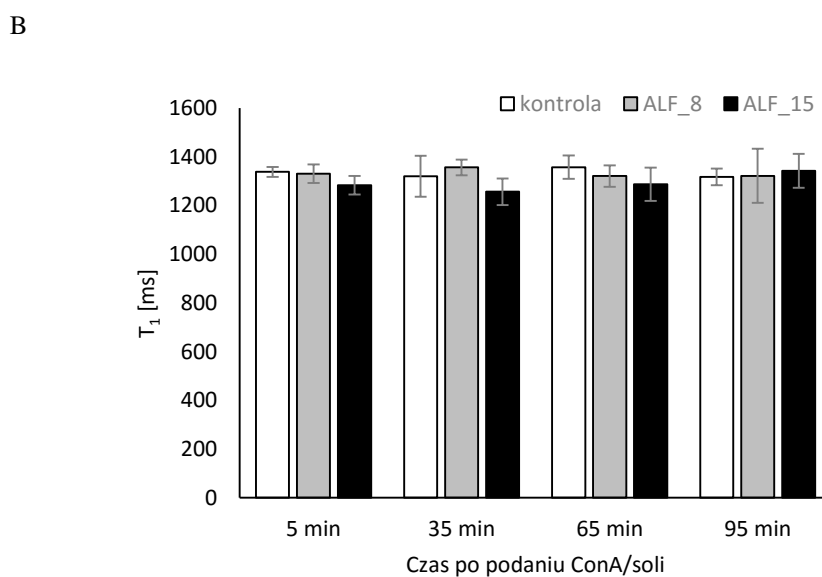
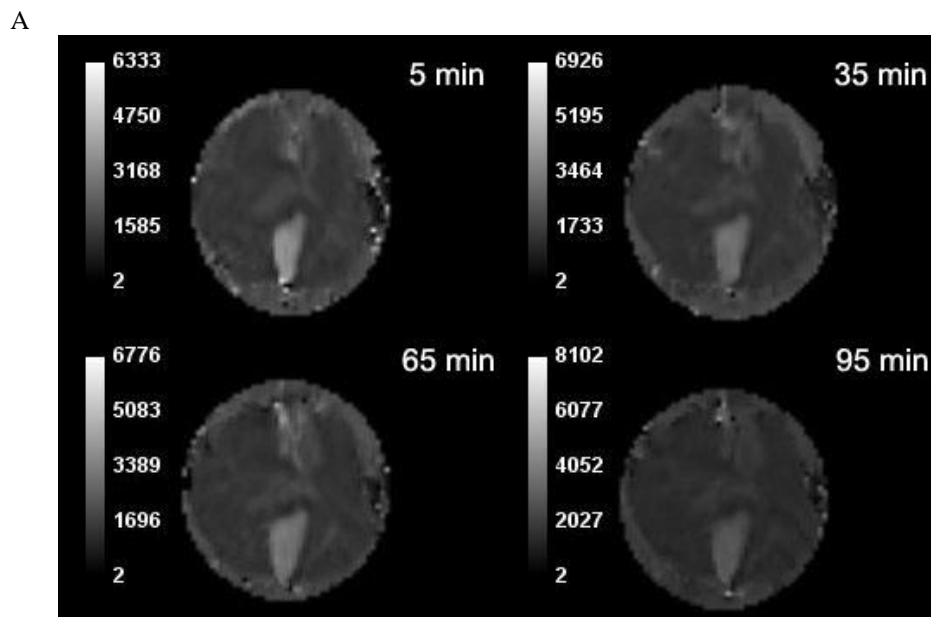


Rysunek 4.17: (A) Przykładowe mapy perfuzji uzyskane z obrazów MR. Skala perfuzji ma rozpiętość 0 – 500 ml/min/100g tkanki. Obrazy przeskalowano do wielkości 256×170 px. (B) Wartości perfuzji uzyskane w grupach kontrolnej, ALF_8 i ALF_15. Zaznaczono istotnie różne wartości perfuzji (test HSD, oznaczenia: * dla $p < 0.05$, ** dla $p < 0.001$).

Reprezentatywne mapy czasu T_1 znajdują się na Rysunek 4.18A. Czas relaksacji podłużnej w tkance wątroby w grupie kontrolnej oraz grupach ALF_8 i ALF_15 zamieszczono w Tabeli 4-11 oraz na Rysunek 4.18B. Analiza wariancji nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy pomiarami.

Tabela 4-11: Wartość czasu relaksacji podłużnej T_1 [ms] tkanki wątroby we wczesnych zmianach chorobowych w modelu ALF.

Grupa	Czas po podaniu ConA/soli fizjologicznej			
	5 min	35 min	65 min	95 min
Kontrola	1338 ± 27	1320 ± 62	1357 ± 45	1317 ± 35
ALF_8	1330 ± 38	1356 ± 33	1319 ± 43	1322 ± 111
ALF_15	1302 ± 57	1259 ± 49	1280 ± 63	1337 ± 63



Rysunek 4.18: (A) Przykładowe mapy czasu relaksacji T_1 [ms] uzyskana z eksperymentu FAIR-EPI z wysyceniem nieselektywnym. Obrazy przeskalowano do wielkości 256×170 px. (B) Wartości czasu T_1 uzyskane w trzech grupach pomiarowych. Nie zaobserwowano istotnych różnic statystycznych pomiędzy kolejnymi wartościami.

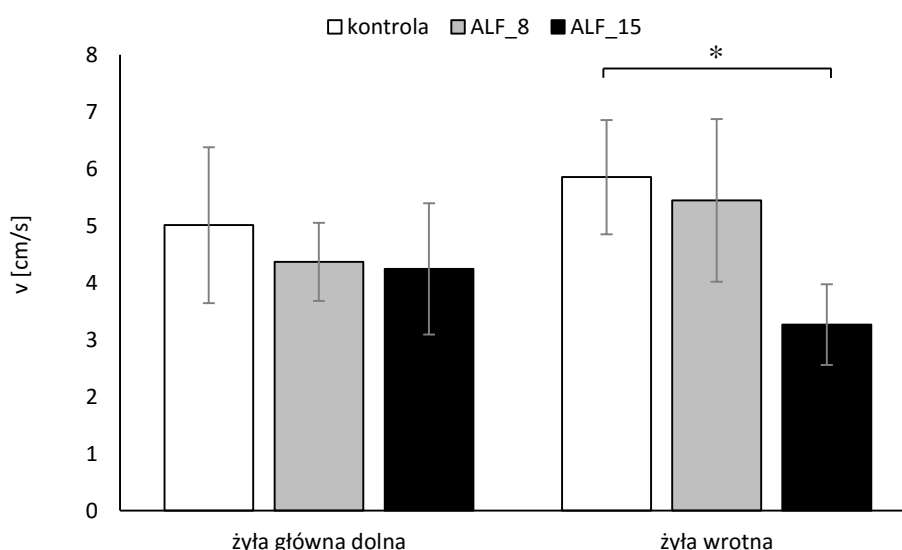
4.3.3. POMIAR PRĘDKOŚCI PRZEPLYWU KRWI

Prędkość przepływu krwi i wartość przepływu wyznaczano dla 4 zwierząt z grupy kontrolnej, 6 z grupy ALF_8 i 5 z grupy ALF_15. Pozostałe zwierzęta z grup badawczych wyeliminowano z tej analizy ze względu na wystąpienie takich komplikacji jak złe bramkowanie pomiaru, zmniejszone pole widzenia lub złe ulokowanie warstwy.

Wartość przepływu krwi przez powierzchnię naczyń krwionośnych oraz średnią prędkość przepływu wyznaczono dla żyły głównej dolnej i żyły wrotnej.

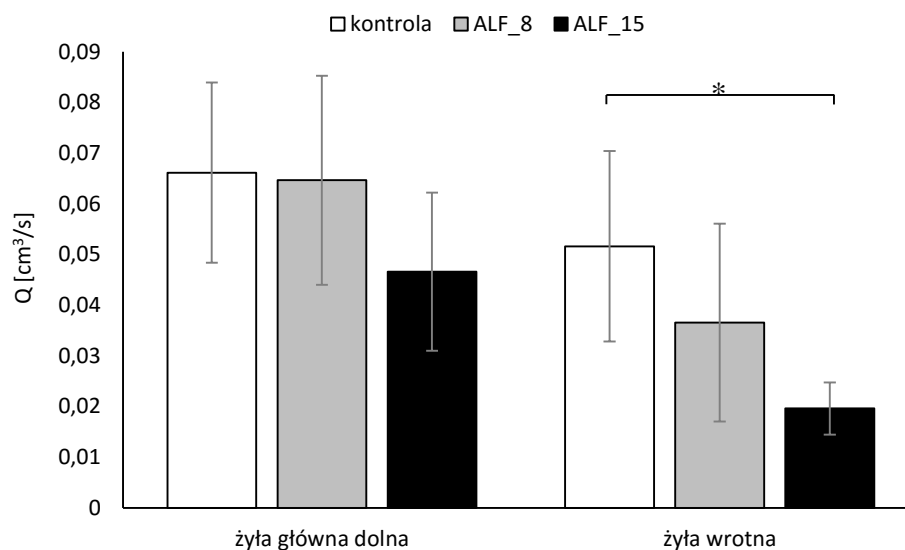
Wartości kątów odchylenia naczyń krwionośnych od kierunku prostopadłego do warstwy wahały się od 0 do 34 stopni.

Średnia prędkość przepływu krwi w żyłę główną dolną w grupie kontrolnej wyniosła (5.0 ± 1.4) cm/s, w grupie ALF_8 (4.37 ± 0.69) cm/s a w grupie ALF_15 (4.2 ± 1.2) cm/s. Średnia prędkość przepływu krwi w żyłę wrotną wyniosła (5.9 ± 1.0) cm/s, (5.4 ± 1.4) cm/s i (3.27 ± 0.71) cm/s, odpowiednio w grupie kontrolnej, ALF_8 i ALF_15. Spadek prędkości przepływu krwi w żyłę wrotną w grupie ALF_15 w stosunku do prędkości w grupie kontrolnej okazał się istotny (test wielokrotnych porównań, $p = 0.03$) (Rysunek 4.19).



Rysunek 4.19: Wartość prędkości przepływu krwi przez żyłę główną dolną i żyłę wrotną w trzech grupach badawczych. Istotnie ważną okazał się spadek prędkości przepływu w żyłę wrotną w grupie ALF_15 w stosunku do prędkości przepływu w grupie kontrolnej (*, test wielokrotnych porównań, $p = 0.03$).

Wartość przepływu w żyłę główną dolną wyniosła (0.066 ± 0.018) cm³/s w grupie kontrolnej, (0.065 ± 0.021) cm³/s w grupie ALF_8 i (0.046 ± 0.016) cm³/s w grupie ALF_15. Wartość przepływu w żyłę wrotną wyniosła (0.052 ± 0.018) cm³/s w grupie kontrolnej, (0.037 ± 0.020) cm³/s w grupie ALF_8 i (0.020 ± 0.005) cm³/s w grupie ALF_15. Zmiana wartości przepływu krwi przez żyłę wrotną pomiędzy grupami kontrolną i ALF_15 była statystycznie istotna (test wielokrotnych porównań, $p = 0.012$) (Rysunek 4.20).



Rysunek 4.20: Wartość przepływu krwi przez żyłę główną dolną i żyłę wrotną w trzech grupach badawczych. Istotnie ważna okazała się zmiana przepływu w żyłę wrotnej w grupie ALF_15 w stosunku do przepływu w grupie kontrolnej (*, test wielokrotnych porównań, $p = 0.012$).

5. Dyskusja

Celem pracy było zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu obrazowania MR pozwalającego na scharakteryzowanie wpływu stanu zapalnego na pracę układu krążenia na przykładzie ALF. Badania przeprowadzono na mysim modelu ostrego zapalenia wątroby wywołanego konkanawaliną A. Przeprowadzono eksperymenty, w których badano model wczesnych i późnych zmian.

Stan ostrego zapalenia wątroby indukowano przy pomocy dobranej dawki konkanawaliny A wychodząc od wartości spotykanych w literaturze 15 lub 20 mg/kg b.w. [7, 9, 10]. W trakcie badań okazało się, że wymagania eksperymentu *in vivo*, co do przeżywalności zwierząt wymagają zmodyfikowania tej dawki i została ona obniżona do wartości 8 mg/kg b.w. Możliwym czynnikiem konieczności zmniejszenia dawki ConA użytej w niniejszych badaniach był zastosowany rozpuszczalnik. Użyto 1M PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} w miejsce rozpuszczalnika bezjonowego. Aktywność oraz struktura cząsteczek ConA silnie zależy od parametrów rozpuszczalnika takich jak jego stężenie, pH oraz obecność jonów [90, 91]. Warto jednak zwrócić uwagę, że badania *in vivo* nakładają wyższe wymagania, co do stanu zwierząt gdyż samo badanie trwające ponad dwie godziny, ma wpływ na zwierzęta (anestezja).

Jak pokazały badania histopatologiczne i biochemiczne dawka ta pozwoliła na uzyskanie wystarczająco silnych zmian patologicznych w tkance przy dużo wyższej przeżywalności. Poprawie uległa również stabilność zwierzęcia podczas anestezji mająca duży wpływ na wykonywane pomiary, głównie poprzez zmiany rytmu oddechowego.

Ustalono różniące się protokoły eksperymentalne dla badań czynnościowych i strukturalnych zmian we wczesnym i późnym modelu ALF. W późnym modelu (24 godz. po podaniu ConA) spodziewane były zmiany stabilne, obejmujące duży obszar. W takim czasie po wywołaniu ALF, w tkance uformowane są obszary martwicze a w krwi obserwuje się obniżone poziomy znaczników prozapalnych [10, 92]. Dlatego protokół zawierał badanie ASL, pomiar DCE-MRI i dodatkowo został rozszerzony o pomiar anatomiczny. W modelu wczesnych zmian, skupiono uwagę na badaniu perfuzji (pomiar 4-krotny) oraz przepływu wrotnego, ponieważ oczekiwane zmiany były zmianami dynamicznymi. Na takim etapie nie można spodziewać się zmian martwiczych czy silnych uszkodzeń [7, 9]. Można jednak oczekiwać zmian w mikrokrażeniu spowodowanych formującą się odpowiedzią zapalną. Oba protokoły były relatywnie długie (pełny protokół

od indukcji anestezji trwał ok 2.5 godz.), dlatego uwzględnienie kolejnych pomiarów nie było praktycznie możliwe, pomimo że mogłoby to dostarczyć dodatkowych informacji.

W badaniach histopatologicznych późnego modelu potwierdzono naruszenie struktury tkanki wątroby przez rozwijający się stan zapalny. Widoczne zatory w naczyniach krwionośnych mogły być skutkiem zaburzeń w gospodarce płytkowej [3]. Nacieki i dezintegracja ściany naczyń zatokowych mogły być spowodowane akumulacją ConA w komórkach śródbłonna. Wykazano w [8, 9], że ConA jest w dużej mierze wychwytywana z krwi przez LSEC drogą endocytozy. Dalsze zniszczenia tkanki wątroby (w tym widoczne wynaczynienia krwi i obszary martwicze) są najprawdopodobniej zmianami wtórnymi powodowanymi przez zaktywowane komórki odpornościowe [9].

Wyniki badań biochemicznych późnego modelu potwierdziły zarówno duże zniszczenia hepatocytów (ALT, ASL, LDH) jak i toczące się procesy antyzapalne (SAA). Stosunek AST/ALT często pozwala na doprecyzowanie rodzaju uszkodzenia wątroby oraz etapu choroby. W tych badaniach stosunek AST/ALT był równy 1.2 co jest charakterystyczne w marskości wątroby, w początkach ostrego zapalenia czy uszkodzenia na skutek zamknięcia odpływu żółci. Uzyskane wartości ALT były porównywalne z wcześniejszymi danymi literaturowymi uzyskanymi po podaniu dawki 20 mg/kg ConA [10]. Poziom AST był niższy. LDH nie jest tak specyficznym wskaźnikiem wątrobowym, ponieważ znajduje się w wielu komórkach. Jest jednak uwalniany do krwi w momencie uszkodzenia komórek.

We wczesnym modelu zbadano poziomy SAA dla losowo wybranych zwierząt z każdej grupy. Badania nie pokazały, że w organizmach zwierząt z grup chorych rozpoczęła się faza ostrej odpowiedzi zapalnej. Uzyskany rezultat zgadza się z wynikami przedstawionymi w pracy Sternak et al. [92], w której wydzielanie SAA występowało w czasie późniejszym niż 2 godziny po podaniu ConA. W etapie tak wczesnym jak badany w niniejszej pracy, wydzielane są przede wszystkim cytokiny związane z początkującymi odpowiedzią zapalną limfocytami napływającymi do naczyń zatokowych [10, 93].

Jednym z założeń prowadzonych badań było zbadanie czy obrazowanie MR może uchwycić zmiany strukturalne zachodzące w tkance pod wpływem ALF. W modelu późnych zmian, w którym uzyskano duże zmiany chorobowe tkanki, wykonano obrazy przy użyciu sekwencji RAREst, które poddano dwóm analizom, opartym na intensywności pikseli danego obrazu – analizie fraktalnej i teksturalnej. Natomiast w obu eksperymentach zbadano czas relaksacji podłużnej tkanki wątroby.

Analiza tekstur, oprócz dwóch parametrów, nie wykazała istotnych różnic pomiędzy obrazami z grupy kontrolnej i ALF w modelu późnych zmian. Zmniejszenie wartości parametru korelacji w grupie ALF wskazuje, że w obrazach MR w tej grupie odcienie szarości pikseli obrazu są bardziej różnorodne. Może się tak dzieć wskutek zwiększenia niejednorodności tkanki, np. obecność obszarów martwiczych. Podobne podłoże może mieć wzrost parametru kontrast w grupie ALF w stosunku do grupy kontrolnej. Jednak, pamiętać należy, że nawet wysoka rozdzielczość przestrzenna (0.117×0.117 mm/px), z którą wykonywane były obrazy RAREst nie zapewnia bezpośredniej wizualizacji zmian w tkance. Duże obszary martwicze, zidentyfikowane w badaniu histologicznym mogą wciąż być mniejsze od pojedynczego piksela w obrazie MR. Sprawia to, że sygnał w każdym pikselu obrazu jest zawsze ważony stosunkiem powierzchni zdrowych i zmienionych chorobowo obszarów, które zawierają zarówno naczynia jak i hepatocyty. Znaleźć można literaturowe doniesienia na temat przydatności analizy tekstur w ocenie tkanki wątroby. Badano m.in. obrazy pojedynczych komórek wątrobowych myszy na różnych etapach zwłóknienia [94], obrazy MR marskości [95], zwłóknienia [96] i guzów [97] wątroby u ludzi, obrazy USG i CT stłuszczenia wątroby u ludzi [98]. Zarówno badania wykonane w tej pracy jak i w przytoczonych doniesieniach nie wykazały dużego potencjału parametrów teksturalnych do stania się znacznikami chorób wątroby. Analiza tekstur w badaniach u ludzi dawała lepsze wyniki niż w przypadku badań u zwierząt, ale nie można było wskazać jednoznacznego zbioru parametrów czułych na zmiany w obrazie.

Analiza fraktalna znajduje zastosowanie w analizie układów biologicznych, ponieważ układy te charakteryzują się strukturą i złożonością trudną do opisu geometrią euklidesową [38]. W pracy skupiono się na dwóch podstawowych parametrach analizy fraktalnej: wymiarze fraktalnym (D_f) i lakularności (L). Wykazano, że w obrazach tkanki objętej ALF wymiar fraktalny rośnie w stosunku do obrazu tkanki kontrolnej, natomiast lakularność maleje. Nie wykazano jednak ich silnej odwrotnej korelacji (Rysunek 4.9, str. 66). Mogło to być wynikiem braku istotności parametru L. Wymiar fraktalny znacznie częściej niż lakularność znajduje zastosowania w analizie obrazów morfologicznych uzyskanych za pomocą różnych technik [37, 99-101]. Przytoczone doniesienia literaturowe i wyniki uzyskane w tej pracy pozwalają wnioskować, że D_f anatomicznych obrazów MR jest parametrem czułym na istnienie obszarów o różnych strukturach w tkance wątroby. Na zmianę architektury tkanki, mogą wpływać procesy zapalne, obszary martwicze, czy

zmniejszony przepływ krwi spowodowany zatorami lub zapadnięciami naczyń krwionośnych. Wymiar fraktalny wydaje się też być bardziej odpornym niż wcześniej omówiona analiza tekstur na komplikacje związane z niejednorodnością źródeł sygnału w pojedynczym wokselu, co może być efektem założeń leżących u podstaw analizy fraktalnej a mianowicie samopodobieństwa analizowanego obrazu i jego niezmienności podczas przeskalowywania.

Kolejnym parametrem strukturalnym, wyznaczonym na podstawie pomiarów ASL, w których manipuluje się magnetyzacją w tkance odwracając ją lokalnie i globalnie, jest czas relaksacji podłużnej tkanki T_1 . W celu wyznaczenia czasu T_1 wykorzystano mapy po inwersji globalnej. Wyniki pokazały jednoznacznie wzrost czasu T_1 w wątrobach zwierząt z ALF w późnym modelu. Czas T_1 w tej grupie wyniósł 1597 ± 130 ms. W grupie kontrolnej w późnym modelu czas T_1 wyniósł 1249 ± 91 ms. Podobne wyniki do tych zaobserwowanych dla grupy kontrolnej uzyskano we wszystkich grupach w badaniu wczesnych zmian (Tabela 4-11, str. 78). Wyniki pokrywają się z danymi literaturowymi 1360 ± 60 ms uzyskanymi dla zdrowych zwierząt [102]. Wzrost czasu T_1 w grupie chorej w późnym modelu najprawdopodobniej powodowany jest tym, że woda w wynaczynionej krwi, znajduje się poza sinusoidami, a co za tym idzie poza wymuszającym jej ruch układem sercowo–naczyniowym. W grupach chorych we wczesnym modelu nie zauważono zmiany czasu T_1 w stosunku do grupy kontrolnej, jednak zauważono spadki perfuzji. Może to znaczyć, że jest to zbyt wczesny etap dla zaobserwowania zmian w strukturze tkanki w obrazach MR (np. brak krwiaków, wynaczynienia, martwicy) jednak możliwe jest już uchwycenie zmian w czynności naczyń.

Analiza czynnościowa naczyń krwionośnych była podstawowym założeniem pracy. Objęła ona badanie perfuzji tkankowej wykonanej w badaniach zarówno wczesnych jak i późnych zmian, badanie kinetyki środka kontrastowego w badaniu późnych zmian oraz badanie przepływów i prędkości krwi we wczesnych zmianach.

Badanie wpływu ALF na perfuzję krwi przez tkankę wątroby w późnym modelu wykazało pogorszone mikrokrazenie w grupie ALF. Spadło ono z 245 ± 20 ml/min/100g w grupie kontrolnej do 200 ± 32 ml/min/100g w grupie ALF. We wczesnym modelu zmierzono perfuzję czterokrotnie po podaniu ConA. Zmierzone wartości perfuzji były porównywalne ze zmierzonymi w późnym modelu (Tabela 4-10, str. 77). W grupach chorych ALF_8 i ALF_15 we wczesnym modelu zaobserwowano spadki wartości perfuzji w stosunku do badań grupy kontrolnej, potwierdzone przez analizę statystyczną. Wyniki

uzyskane w grupach myszy zdrowych pokrywają się z wcześniejszymi danymi literaturowymi mierzonymi metodami inwazyjnymi [103, 104]. Wyniki zaprezentowane w poniższej pracy zgadzają się także z danymi przedstawionymi przez Ramasawmy et al. [102] uzyskanymi w pomiarze FAIR z sekwencją Look–Locker użytą do odczytu (220 ± 30 ml/min/100g w grupie zwierząt kontrolnych).

Zaobserwowana zmiana perfuzji w tkance ALF może być skutkiem aktywacji leukocytów i ich napływem do naczyń krwionośnych wątroby (Rozdział 2.3.3, str. 37). Zaktywowane komórki odpornościowe mają tendencję do zwiększenia sztywności i lepkości, przez co mogą przylegać do ścian naczyń, ale również mogą ulec uwięzieniu w sinusoidach [75, 76, 105]. Wpływ na mikrokążenie może również wywierać zaburzenie w gospodarce krzepliwości krwi. Nadmiar aktywnych płytek krwi krążących w naczyniach krwionośnych może prowadzić do ich blokowania. Dodatkowo płytki te nie są odpowiednio szybko usuwane w chorobach wątroby [3, 11]. Kolejnym powodem do zwolnienia perfuzji krwi w ALF może być zaburzenie w wydzielaniu czynników regulujących pracę naczyń – ich rozszerzalność i kurczliwość [12].

W modelu wczesnych zmian ALF, badano również przepływ i prędkość przepływu krwi przez naczynia krwionośne metodą PC-MRI. Upośledzenie prędkości i przepływu zaobserwowano w żyłę wrotnej w grupie ALF_15 w stosunku do grupy kontrolnej. Może być ono związane z pierwszą fazą odpowiedzi zapalnej toczącej się w organizmie, którą jest napływ limfocytów do wątroby [7]. Niestety wyniku zaobserwowanego w żyłę wrotnej nie można porównać z krążeniem w tętnicy zaopatrującej wątrobę, ze względu na ulokowanie warstwy obrazującej. Na mapach PC (Rysunek 3.12, str. 56) widoczna jest aorta brzuszna, z której tylko część krwi dostarczana jest do wątroby. Nie można było także sprawdzić czy pojawia się kompensacja ze strony HABR, czyli zwiększenie przepływu w tętnicy w odpowiedzi na zmiany w żyłę wrotnej (Rozdział 2.2.1, str. 35).

Dane zebrane podczas obrazowania dynamicznego w późnym modelu analizowano stosując dwa podejścia: parametryczne – modelowanie kompartmentowe (MK) oraz nieparametryczne – empiryczne modelowanie matematyczne (EMM). Oba podejścia do analizy obrazów DCE-MRI mają swoje mocne i słabe strony [22]. EMM pozwala na szybkie wnioskowanie o dynamice środka kontrastowego z kształtu krzywej i jest łatwe w aplikacji. Parametry EMM zwykle korelują z fizjologią tkanki, dzięki czemu mogą wskazywać zmiany zachodzące na skutek choroby. Jednak EMM nie pozwala, w przeciwieństwie do MK, określać ilościowo zmian fizjologicznych tkanki. Wynikiem modelowania kompartmentowego mogą być informacje na temat przepuszczalności naczyń,

przepływu czy objętości przestrzeni poza komórkowej i poza naczyniowej. Trudnością jest jednak dobór odpowiedniego modelu MK.

Do badań wybrano model empiryczny zaproponowany przez Fan et al. [39] do analizy krzywych wychwytu kontrastu w raku prostaty oraz w raku piersi. Współczynnik determinacji dopasowania modelu miał wysoką wartość ($R^2 > 0.98$) u wszystkich obiektów. Pierwszy fragment krzywej DCE można utożsamić z informacjami o perfuzji w tkance [23, 24, 106]. Jest on częściej wykorzystywany w badaniach u ludzi niż na zwierzętach ze względu na szybkość zachodzących procesów. Nachylenie krzywej (α , ES) oraz czas do osiągnięcia maksymalnego rozjaśnienia obrazu tkanki (T_{peak}) informuje o szybkości, z jaką kontrast jest wychwytywany z krwi. W przeprowadzonych badaniach nie zanotowano różnicy istotnej statystycznie w parametrze szybkości wychwytu kontrastu (α) jednak już w dwóch pozostałych parametrach taka różnica była widoczna. Drugi fragment krzywej DCE można natomiast utożsamić z informacjami o uszkodzeniu hepatocytów [29]. Z tego fragmentu uzyskuje się przede wszystkim informację o szybkości wypłukiwania środka kontrastowego z tkanki, a pamiętając o zastosowanym hepatospetycznym środku kontrastowym, można wnioskować właśnie o stanie i zdrowiu hepatocytów. Zauważono zwolnione usuwanie kontrastu w grupie ALF (β , $T_{1/2}$), co korelowało z informacjami uzyskanymi z oceny histopatologicznej i biochemicznej, przy czym uszkodzenia struktury obserwowane bezpośrednio były większe niż uszkodzenia czynności, co jak wspomniano w Rozdziale 2.3.1 nie musi współgrać. Na uszkodzenie hepatocytów przez procesy zapalne mogą wskazywać również dodatkowe parametry κ_{peak} i AUC. Pierwszy opisuje zmianę kształtu piku maksymalnego rozjaśnienia tkanki, który w obiektach grupy ALF bardziej przypominał plateau wskazując na dłuższe zatrzymanie środka kontrastowego w tkance. AUC, istotnie większa w grupie ALF, również wskazywała na powolniejsze usuwanie kontrastu z hepatocytów. Podobny w założeniach eksperyment przeprowadzili Moriyama et al. [40], którzy badali ostre zapalenie wątroby u szczurów przy pomocy EMM (model był inny od prezentowanego w niniejszej pracy). Jakkolwiek, trudno dokonać bezpośredniego porównania wyników modelowania, warto napomnieć, że w obu pracach obserwowano podobieństwa w zmianie wyznaczanych wartości, potwierdzające wpływ uszkodzenia na czynności badanego układu. Potwierdza to skuteczność EMM, jako szybkiej metody analizy kinetyki CA.

W niniejszej pracy zaproponowano uproszczony model kompartmentowy dla wyznaczenia stałych transportu kontrastu pomiędzy kolejnymi elementami układu. Cyr-

kularność układu krążenia zapewniono tutaj poprzez uwzględnienie transportu bilinearnego pomiędzy przestrzenią Dissego a aortą, symbolizującą cały układ naczyniowy. Uproszczono również opis transportu CA z hepatocytów do przestrzeni Dissego, który może odbywać się dwoma drogami (OATP/MRP, Rozdział 3.1.1, str 40). Aby uwzględnić obie drogi transportu, potrzebne by były wstępne informacje o czasie przebywania CA w przestrzeni Dissego i o szybkości, z jaką pracują oba transportery.

W modelu kompartmentowym postanowiono uznać dawkę CA za wartość wejściową, z uwagi na uzyskane krzywe AIF. W grupie kontrolnej obserwowano wyższe wartości koncentracji kontrastu w tkance wątroby niż w aorcie, co stanowiło problem w trakcie modelowania. Krzywe AIF nawet w przypadku wyznaczania w lewej komorze serca mogą być obciążone błędami. Dlatego stosuje się różne metody poprawy tych krzywych. Jedną z nich jest stosowanie krzywej populacyjnej [107, 108]. Ze względu na trudności pomiarowe ten sposób został wybrany w celu uzyskaniu wartości wstępnych.

Uzyskane wyniki pokazały, że 5 stałych transportu zmniejszyło się w grupie chorej. Podwyższenie wartości zaobserwowano tylko w przypadku transportu z hepatocytów do przestrzeni Dissego (k_d^h). Natomiast szybkość transportu z hepatocytów do pęcherzyka żółciowego (k_p^h) nie uległa zmianie. Wynik taki może oznaczać, że zmniejszone wypłukiwanie CA w grupie ALF jest spowodowane dłuższym utrzymywaniem się tego kontrastu w krwi ze względu na uszkodzenie hepatocytów. Zdaje się to być potwierdzone przez korelacje uzyskane pomiędzy wynikami modelowania a oceną biochemiczną i histologiczną. Bardzo interesującą korelacją jest zależność pomiędzy stwierdzonym histologicznie uszkodzeniem ściany naczynia a stałymi transportu. k_d^a , k_a^d są skorelowane negatywnie z uszkodzeniem ściany naczynia. Dokumentuje to zależność pomiędzy stanem czynnościowym ściany naczynia (w tym przypadku toczącym się stanem zapalnym) a możliwością transportu składników. Zaobserwowano również, że k_d^h koreluje pozytywnie a k_h^d negatywnie z uszkodzeniem ściany naczynia. Również stwierdzono istotne negatywne korelacje pomiędzy znacznikami biochemicznymi, wskazującymi na uszkodzenie hepatocytów, a stałymi transportu.

Jak wspomniano w Rozdziale 4.2.6 (str.72) przeprowadzone modelowanie kompartmentowe było kilkietapowe. W pierwszej kolejności wykonano dopasowanie do populacji całej grupy, korzystając z wielkości wyznaczonych z krzywych AIF. Na tym etapie wartości te traktowane były, jako stałe. Następnie korzystając z wyznaczonych war-

tości transportu przeprowadzono modelowanie indywidualne. Na tym etapie modelowano wszystkie wielkości. Dla osiągnięcia dobrych dopasowań krzywych i stabilnych wartości parametrów wystarczały cztery iteracje modelu.

Jednym z celów pracy wykonywanej na trudnym dla wykonywania pomiarów obrazowania MR obszarze jamy brzusznej był dobór metodyki badania. Użyte protokoły badania perfuzji i mikrokrażenia opierają się głównie na szybkich sekwencjach obrazowania. Miało to na celu poprawę jakości uzyskiwanych obrazów MR w związku ze wspomnianymi już wcześniej zaburzeniami rytmu oddechowego i ogólną złą kondycją zwierząt badawczych (głównie w modelu późnych zmian).

Zoptymalizowanie metody ASL do badań wątroby jest związane z różnymi problemami, z których najważniejszym jest rozwiązanie artefaktów ruchowych. Zwłaszcza w obrazowaniu wątroby małych zwierząt stanowi to wyzwanie gdyż cała jama brzuszna porusza się w trakcie oddechu. W niniejszej pracy zaproponowano, jako rozwiązanie podwójne bramkowanie tętnem i oddechem, oraz sekwencję EPI, jako sekwencję odczytu pozwalającą na uzyskanie obrazu po pojedynczym impulsie RF. Uzyskiwane obrazy charakteryzowały się niską rozdzielczością przestrzenną (96×64 px). Jednak, dzięki szybkiej akwizycji danych w EPI, możliwe było uzyskanie obrazu MR w trakcie jednej bramki oddechowej a tym samym ograniczenie występowania artefaktów. W drugim eksperymencie zmniejszono FOV, przy zachowaniu tej samej rozdzielczości przestrzennej, co poskutkowało dokładniejszymi mapami.

Podczas analizy obrazów FAIR-EPI napotkano na problem z wartościami perfuzji przypisanymi do pikseli obrazów. Z obrazów usunięto piksele z wartościami większymi od 500 ml/min/100g , ponieważ były one związane z dużymi naczyniami krwionośnymi obecnymi w danym obszarze. Usunięto również piksele z wartościami ujemnymi, jako niefizyczne. Perfuzję wyznacza się z różnicy pomiędzy znakowanym i kontrolnym obrazem, przy czym różnica ta jest niewielka, na poziomie kilku procent [18]. Obraz kontrolny otrzymywany jest po inwersji magnetyzacji spinów w całej objętości cewki, jednak cewka nie obejmuje całego zwierzęcia. Możliwe jest, więc że magnetyzacja w obrazie kontrolnym zdąży odrosnąć powodując wzrost sygnału w pewnych obszarach obrazu tkanki. Inną kwestią wpływającą na badanie, jest mikroskopowa budowa wątroby, zwłaszcza jej układu naczyniowego. Woksele obrazu MR, nigdy nie będą obejmowały jednorodnego obszaru. Konstrukcja tkanki wątroby, może mieć lokalnie bardzo silnie zróżnicowane wartości czasu relaksacji dające przyczynki do tego samego elementu obrazu MR, co może objawić się w uzyskiwanych wartościach. Pozorny czas relaksacji

podłużnej może być nieprawidłowo określany w dopasowaniu krzywej odrostu magnetyzacji ze względu na zupełnie nieadekwatny zestaw mierzonych czasów inwersji. W szczególności może tak się dzieć w przypadku, gdy duży udział objętości woksela przypada na naczynie krwionośne.

Dotychczas, w bezpośrednich badaniach mikrokrążenia w wątrobie dominowały inwazyjne metody pomiarów. Nieinwazyjne metody zaczęto przystosowywać do tego obszaru badań dopiero w ostatnich czasach [102, 109]. Poniższa praca jest pierwszą prezentującą wyniki uzyskane metodą FAIR-EPI (wyniki opublikowano razem z wynikami z EMM).

W analizie przepływów krwi w naczyniach krwionośnych badanych metodą PC-MRI uwzględniono poprawkę wynikającą z kąta β odchylenia naczynia od kierunku prostopadłego w stosunku do warstwy obrazowania. Wpływ tych poprawek na wartość przepływu uznaje się za istotny w przypadku pomiaru, w którym β przekracza 30° (wtedy $\cos\beta > 0.87$) [18]. W przeprowadzonych pomiarach zaobserwowano takie odchylenie tylko u jednego zwierzęcia.

Metody PC-MRI są adaptowane na grunt badań małych zwierząt, jednak głównym obszarem zainteresowania badaczy jest pomiar prędkości krwi w aorcie [110, 111]. Brak jest doniesień o pomiarach prędkości krwi wrotnej tą metodą (wedle wiedzy Autorki).

Do obrazowania dynamicznego użyto sekwencji IntraGateFLASH™, która była oryginalnie przygotowana z myślą o badaniach serca. Jednak właściwości tej sekwencji, takie jak wspomniane bramkowanie retrospektywne (Rozdział 1.4.1, str. 22) spowodowały, że jest ona przenoszona na grunt badań dynamicznych m.in. związanych z wątrobą [112, 113]. Jest to rozwijające się i młode podejście do badań DCE-MRI. W badaniach w niniejszej pracy zdecydowano się na wykonanie trzech długich pomiarów (10 min, 1500 NA) w ciągu pierwszych 30 minut obrazowania i ich późniejszą rekonstrukcję (150 obrazów). Sekwencja ta nie wymaga zewnętrznego bramkowania sercem czy oddechem przy pomocy dodatkowych urządzeń. Wykorzystuje zastosowanie dodatkowej warstwy – nawigatora, umieszczonej w obszarze serca pozwalającego na śledzenie rytmu pracy serca [51]. Dodatkowo pomiar amplitudy sygnału z obszaru serca jest również podatny na ruchy związane z oddechem, dzięki temu zaburzenia danych przez te procesy fizjologiczne można usunąć na etapie przetwarzania końcowego danych (retrospektywna rekonstrukcja danych). To istotne zwłaszcza dla zwierząt z grupy ALF, dla których obserwowano m.in. duże wahania długości rytmu oddechowego, w tym nagłe przyspieszenia

oddechu i jego zaniki, spłyca oddechu prawie do granicy wykrywalności. Rekonstrukcja retrospektywna umożliwia również zmianę liczby klatek trybu *cine* np. w celu zapewnienia niezbędnej w badaniach dynamicznych wysokiej rozdzielczości czasowej. Rozdzielczość ta jest ona zwłaszcza istotna przy analizie fazy wychwytu kontrastu a z drugiej strony nie zawsze może być optymalnie dobrana przed pomiarem ze względu na różny stan zwierząt. W prezentowanej pracy uzyskano rozdzielczość na poziomie 4 sekund na obraz. Pozwoliło to uchwycić pik sygnału w aorcie podczas przepływu CA.

Podczas obrazowania z zastosowaniem sekwencji IntraGateFLASH™ celowo użyto szeroką warstwę nawigatora. Pozwoliło to na wysycenie sygnału w aorcie pochodzącego od spinów krwi, dzięki temu zaobserwowano wzmocnienie sygnału pochodzące tylko od CA. W przypadku niestosowania warstwy wysycającej konieczne jest dodatkowe uwzględnienie hematokrytu w obliczeniach koncentracji CA w naczyniu [85, 107]. Hematokryt krwi nie jest stałą wielkością. W literaturze podawane są wartości z zakresu 0.4 – 0.5 w dużych naczyniach krwionośnych [85, 88, 107, 114]. Z drugiej strony w przypadku niestosowania takiej warstwy, możliwy jest pomiar AIF w sercu [88, 107, 115, 116].

6. WNIOSKI

Wykazano możliwość diagnostyki zaimplementowanego mysiego modelu ostrego stanu zapalnego wątroby technikami obrazowania RM.

Opracowane protokoły oparte na technikach obrazowania MR pozwoliły na jakościowe i ilościowe zbadanie zaburzeń układu krążenia na poziomie dużych naczyń oraz na poziomie mikrokrążenia w odniesieniu do zmian strukturalnych tkanki. W efekcie uwidocznione zostały pierwsze zmiany w krążeniu już na tak wczesnym etapie jak w ciągu dwóch godzin od wywołania stanu zapalnego. Możliwe było również zbadanie dużych zaburzeń czynnościowych układu krążenia wątroby na etapie ustabilizowanych zmian badanych 24 godziny po wywołaniu stanu zapalnego.

Opracowanie całościowej i oryginalnej metodyki badania krążenia w stanie zapalnym wątroby, jako znaczącego markera stanu tego organu w przebiegu patologii pozwala na potencjalne jej użycie w przedklinicznych badaniach skuteczności terapii hepatoprotekcyjnych.

Cel pracy został osiągnięty.

7. ANEKS

7.1. BARWIENIE OMSB

W pracy zastosowano barwienie OMSB, opracowane w laboratoriach Jagiellońskiego Centrum Eksperymentalnej Terapii (JCET) w Krakowie, które jest kombinacją barwienia orceiną Unny (O) oraz barwienia Martius, Scarlet and Blue (MSB). Barwienie O stosowane było, jako pierwsze do podbarwienia elastyny i blaszek sprężystych w ocenianych preparatach. Następnie stosowano barwienie MSB, które pozwala na wybarwienie fibryny i pokazuje wykrzepienia. To barwienie składa się z następujących kroków:

1. Barwnik żółty *Martius yellow* (M) – wybarwienie czerwonych krwinek krwi, możliwe wybarwienie wczesnych fibryn;
2. Barwnik czerwony *Crystal scarlet* (S) – wybarwienie mięśni i dojrzałych fibryn;
3. Barwnik niebieski *Methyl blue* (B) – wybarwienie kolagenu i starych depozytów fibryny.

Cała ocena histologiczna prezentowana w tej pracy została wykonana przez Panią mgr Agnieszkę Jasztal. Natomiast ocena biochemiczna przez Panią mgr Barbarę Sitek.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernal, W. and J. Wendon, *Acute liver failure*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(26): p. 2525-2534.
2. Bernal, W., et al., *Acute liver failure*. The Lancet, 2010. **376**(9736): p. 190-201.
3. Hughes, R., J. Wendon, and A. Gimson, *Acute liver failure*. Gut, 1991. **32**(Suppl): p. S86-S91.
4. Sass, D.A. and A.O. Shakil, *Fulminant hepatic failure*. Liver Transplantation, 2005. **11**(6): p. 594-605.
5. O'Grady, J.G., *Acute liver failure*. Postgraduate medical journal, 2005. **81**(953): p. 148-154.
6. Lee, W.M., et al., *Acute liver failure: summary of a workshop*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1401-1415.
7. Tiegs, G., J. Hentschel, and A. Wendel, *AT cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A*. Journal of Clinical Investigation, 1992. **90**(1): p. 196.
8. Knolle, P.A., et al., *Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice*. Hepatology, 1996. **24**(4): p. 824-829.
9. Gantner, F., et al., *Concanavalin A—induced T-cell—mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor*. Hepatology, 1995. **21**(1): p. 190-198.
10. Sass, G., et al., *Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis*. Cytokine, 2002. **19**(3): p. 115-120.
11. Vollmar, B. and M.D. Menger, *The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair*. Physiological reviews, 2009. **89**(4): p. 1269-1339.
12. Trewby, P. and R. Williams, *Pathophysiology of hypotension in patients with fulminant hepatic failure*. Gut, 1977. **18**(12): p. 1021-1026.
13. Berry, P., et al., *Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis*. Liver International, 2010. **30**(5): p. 733-740.
14. Antoniadou, C.G., et al., *The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure*. Journal of hepatology, 2008. **49**(5): p. 845-861.
15. Detre, J.A., et al., *Perfusion imaging*. Magnetic Resonance in Medicine, 1992. **23**(1): p. 37-45.

16. Calamante, F., et al., *Measuring cerebral blood flow using magnetic resonance imaging techniques*. Journal of cerebral blood flow & metabolism, 1999. **19**(7): p. 701-735.
17. Vollmar, B., et al., *Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion*. The American journal of pathology, 1994. **145**(6): p. 1421.
18. Bernstein, M.A., K.F. King, and X.J. Zhou, *Handbook of MRI pulse sequences*. 2004: Elsevier.
19. Karabult, N. and N. Elmas, *Contrast agents used in MR imaging of the liver*. Diagnostic and Interventional Radiology, 2006. **12**(1): p. 22-30.
20. Weinmann, H.-J., et al., *Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent*. American Journal of Roentgenology, 1984. **142**(3): p. 619-624.
21. Fahlvik, A.K., J. Klaveness, and D.D. Stark, *Iron oxides as MR imaging contrast agents*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1993. **3**(1): p. 187-194.
22. Khalifa, F., et al., *Models and methods for analyzing DCE-MRI: A review*. Medical physics, 2014. **41**(12): p. 124301.
23. Positano, V., M.F. Santarelli, and L. Landini, *Automatic characterization of myocardial perfusion in contrast enhanced MRI*. EURASIP Journal on Applied Signal Processing, 2003. **2003**: p. 413-421.
24. Tarroni, G., et al., *Myocardial perfusion: near-automated evaluation from contrast-enhanced MR images obtained at rest and during vasodilator stress*. Radiology, 2012. **265**(2): p. 576-583.
25. Gatehouse, P.D., et al., *Applications of phase-contrast flow and velocity imaging in cardiovascular MRI*. European radiology, 2005. **15**(10): p. 2172-2184.
26. Morisaka, H., et al., *MR-based measurements of portal vein flow and liver stiffness for predicting gastroesophageal varices*. Magnetic Resonance in Medical Sciences, 2013. **12**(2): p. 77-86.
27. Gouya, H., et al., *Chronic Liver Disease: Systemic and Splanchnic Venous Flow Mapping with Optimized Cine Phase-Contrast MR Imaging Validated in a Phantom Model and Prospectively Evaluated in Patients*. Radiology, 2011. **261**(1): p. 144-155.
28. Tajima, T., et al., *Relationship between liver function and liver signal intensity in hepatobiliary phase of gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging*. Journal of computer assisted tomography, 2010. **34**(3): p. 362-366.
29. Verloh, N., et al., *Liver fibrosis and Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI: A histopathologic correlation*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 15408.

30. Brancatelli, G., et al., *Cirrhosis: CT and MR imaging evaluation*. European journal of radiology, 2007. **61**(1): p. 57-69.
31. Shuter, B., P. Tofts, and J. Pope, *The effect of sacrifice on image signal, T1, T2, and T2* in liver, kidney, and brain of the Wistar rat*. Magnetic resonance imaging, 1995. **13**(4): p. 563-574.
32. Chow, A.M., et al., *Measurement of liver T1 and T2 relaxation times in an experimental mouse model of liver fibrosis*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2012. **36**(1): p. 152-158.
33. Haralick, R.M., K. Shanmugam, and I.H. Dinstein, *Textural Features for Image Classification*. Ieee Transactions on Systems Man and Cybernetics, 1973. **Smc3**(6): p. 610-621.
34. Haralick, R.M., *Statistical and structural approaches to texture*. Proceedings of the IEEE, 1979. **67**(5): p. 786-804.
35. Lopes, R. and N. Betrouni, *Fractal and multifractal analysis: a review*. Medical image analysis, 2009. **13**(4): p. 634-649.
36. Peitgen, H.-O., H. Jürgens, and D. Saupe, *Chaos and fractals: new frontiers of science*. 2004: Springer.
37. Moal, F., et al., *Fractal dimension can distinguish models and pharmacologic changes in liver fibrosis in rats*. Hepatology, 2002. **36**(4): p. 840-849.
38. Cross, S.S., *Fractals in pathology*. The Journal of pathology, 1999. **182**(1): p. 1-8.
39. Fan, X., et al., *New model for analysis of dynamic contrast-enhanced MRI data distinguishes metastatic from nonmetastatic transplanted rodent prostate tumors*. Magnetic resonance in medicine, 2004. **51**(3): p. 487-494.
40. Moriyama, Y., et al., *Evaluation of Concanavalin A-induced Acute Liver Injury in Rats using an Empirical Mathematical Model and Dynamic Contrast-enhanced MR Imaging with Gd-EOB-DTPA*. Magnetic Resonance in Medical Sciences, 2012. **11**(1): p. 53-60.
41. Tofts, P.S., *Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1997. **7**(1): p. 91-101.
42. Tofts, P.S., et al., *Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T1-weighted MRI of a diffusable tracer: standardized quantities and symbols*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1999. **10**(3): p. 223-232.
43. Koh, T.S., et al., *Fundamentals of tracer kinetics for dynamic contrast-enhanced MRI*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2011. **34**(6): p. 1262-1276.
44. Sourbron, S. and D. Buckley, *Tracer kinetic modelling in MRI: estimating perfusion and capillary permeability*. Physics in medicine and biology, 2012. **57**(2): p. R1.

45. Liang, Z.-P. and P.C. Lauterbur, *Principles of magnetic resonance imaging: a signal processing perspective*. 2000: "The" Institute of Electrical and Electronics Engineers Press.
46. Hennel, J., *Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego. wyd. II*. Wydawnictwo Instytutu Fizyki Jądrowej w Krakowie, 1999.
47. Duyn, J.H., et al., *Inflow versus deoxyhemoglobin effects in BOLD functional MRI using gradient echoes at 1.5 T*. NMR in Biomedicine, 1994. **7**(1-2): p. 83-88.
48. Rinck, P.A., *Magnetic Resonance in Medicine*. 2003, ABW Wissenschaftsverlag GmbH: Germany.
49. Haacke, E.M., et al., *Magnetic Resonance Imaging. Physical Principles and sequence design*. 1999, Canada: Wiley-Liss. 914.
50. McRobbie, D.W., et al., *MRI from Picture to Proton*. 2007: Cambridge university press.
51. Hiba, B., et al., *Cardiac and respiratory self-gated cine MRI in the mouse: Comparison between radial and rectilinear techniques at 7T*. Magnetic resonance in medicine, 2007. **58**(4): p. 745-753.
52. Pelc, N.J., et al., *Encoding strategies for three-direction phase-contrast MR imaging of flow*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1991. **1**(4): p. 405-413.
53. Hennig, J., A. Nauerth, and H. Friedburg, *RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR*. Magnetic Resonance in Medicine, 1986. **3**(6): p. 823-833.
54. Kim, S.-G. and N.V. Tsekos, *Perfusion imaging by a flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique: application to functional brain imaging*. Magnetic Resonance in Medicine, 1997. **37**(3): p. 425-435.
55. Weinmann, H.-J., et al., *Tissue-specific MR contrast agents*. European journal of radiology, 2003. **46**(1): p. 33-44.
56. Runge, V.M., et al., *Paramagnetic agents for contrast-enhanced NMR imaging: a review*. American journal of roentgenology, 1983. **141**(6): p. 1209-1215.
57. Bellin, M., M. Vasile, and S. Morel-Precetti, *Currently used non-specific extracellular MR contrast media*. European radiology, 2003. **13**(12): p. 2688-2698.
58. Laing, A.D. and R.N. Gibson, *Invited MRI of the liver*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1998. **8**(2): p. 337-345.
59. Reimer, P., et al., *Enhancement characteristics of liver metastases, hepatocellular carcinomas, and hemangiomas with Gd-EOB-DTPA: preliminary results with dynamic MR imaging*. European radiology, 1997. **7**(2): p. 275-280.

60. Tofts, P.S. and A.G. Kermode, *Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. I. Fundamental concepts*. Magnetic Resonance in Medicine, 1991. **17**(2): p. 357-367.
61. Pandharipande, P.V., et al., *Perfusion imaging of the liver: current challenges and future goals I*. Radiology, 2005. **234**(3): p. 661-673.
62. Brock, R.W. and R.B. Dorman, *Obesity, insulin resistance and hepatic perfusion*. Microcirculation, 2007. **14**(4-5): p. 339-347.
63. Blomhoff, R. and K. Wake, *Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis*. The FASEB journal, 1991. **5**(3): p. 271-277.
64. Konturek, S., *Czynności wątroby*, in *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*, W. Traczyk and A. Trzebski, Editors., PZWL. p. 801-815.
65. Eipel, C., K. Abshagen, and B. Vollmar, *Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited*. World journal of gastroenterology: WJG, 2010. **16**(48): p. 6046.
66. Pannen, B.H., *New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion*. Anesthesia & Analgesia, 2002. **94**(6): p. 1448-1457.
67. Gülberg, V., et al., *Hepatic arterial buffer response in patients with advanced cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 630-634.
68. Richter, S., et al., *Impact of intrinsic blood flow regulation in cirrhosis: maintenance of hepatic arterial buffer response*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2000. **279**(2): p. G454-G462.
69. Bauer, C., et al., *Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation < i> in vivo</i>*. Journal of hepatology, 1997. **27**(6): p. 1089-1095.
70. Braet, F., et al., *Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions*. Microscopy research and technique, 2007. **70**(3): p. 230-242.
71. Smedsrød, B., et al., *Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells*. Gut, 1994. **35**(11): p. 1509-1516.
72. Lee, W.M. *Acute liver failure*. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2012.
73. Kruś, S., *Zapalenie*, in *Patologia. Podręcznik dla licencjackich studiów medycznych*. 2003, Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa. p. 113-140.
74. Konturek, S. and Z. Gonciarz, *Choroby wątroby i dróg żółciowych*, in *Nauka o chorobach wewnętrznych*, W. Orłowski, Editor. 1986, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich: Warszawa. p. 238-361.

75. Downey, G.P., et al., *Biophysical properties and microfilament assembly in neutrophils: modulation by cyclic AMP*. The Journal of cell biology, 1991. **114**(6): p. 1179-1190.
76. Frank, R.S., *Time-dependent alterations in the deformability of human neutrophils in response to chemotactic activation*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2606-2612.
77. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes and Infection, 2003. **5**(14): p. 1317-1327.
78. Manibur Rahman, T. and H.J.F. Hodgson, *Animal models of acute hepatic failure*. International journal of experimental pathology, 2001. **81**(2): p. 145-157.
79. Bellin, M.-F., et al., *Safety of MR liver specific contrast media*. European radiology, 2005. **15**(8): p. 1607-1614.
80. Van Beers, B.E., C.M. Pastor, and H.K. Hussain, *Primovist, Eovist: what to expect?* Journal of hepatology, 2012. **57**(2): p. 421-429.
81. Karabulut, N. and N. Elmas, *Contrast agents used in MR imaging of the liver*. Diagn Interv Radiol, 2006. **12**(1): p. 22-30.
82. Tuceryan, M. and A.K. Jain, *Texture Analysis*, in *The Handbook of Pattern Recognition and Computer Science*, L.F. Pau, C.H. Chen, and P.S.P. Wang, Editors. 1998, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Singapore. p. 207-248.
83. Castellano, G., et al., *Texture analysis of medical images*. Clin Radio, 2004. **59**: p. 1061-1069.
84. Karperien, A., *FracLac for ImageJ*. 2004, Charles Sturt University: Australia. p. 38.
85. Kim, J.H., et al., *Quantitative dynamic contrast-enhanced MRI for mouse models using automatic detection of the arterial input function*. NMR in biomedicine, 2012. **25**(4): p. 674-684.
86. Landis, C.S., et al., *Determination of the MRI contrast agent concentration time course in vivo following bolus injection: effect of equilibrium transcytolemmal water exchange*. Magnetic resonance in medicine, 2000. **44**(4): p. 563-574.
87. Riches, A., et al., *Blood volume determination in the mouse*. The Journal of physiology, 1973. **228**(2): p. 279-284.
88. Heilmann, M., et al., *Simultaneous dynamic T1 and T2* measurement for AIF assessment combined with DCE MRI in a mouse tumor model*. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, 2007. **20**(4): p. 193-203.
89. Walker-Samuel, S., M. Leach, and D. Collins, *Evaluation of response to treatment using DCE-MRI: the relationship between initial area under the gadolinium curve (IAUGC) and quantitative pharmacokinetic analysis*. Physics in medicine and biology, 2006. **51**(14): p. 3593.

90. Sumner, J.B. and S.F. Howell, *Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A*. Journal of Bacteriology, 1936. **32**(2): p. 227.
91. Agrawal, B. and I.J. Goldstein, *Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean* (*Canavalia ensiformis*). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1967. **133**(2): p. 376-379.
92. Sternak, M., et al., *Differential involvement of IL-6 in the early and late phase of 1-methylnicotinamide (MNA) release in Concanavalin A-induced hepatitis*. International immunopharmacology, 2015. **28**(1): p. 105-114.
93. Sternak, M., et al., *Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) and 1-methylnicotinamide (MNA) in experimental hepatitis induced by concanavalin A in the mouse*. Pharmacological Reports, 2010. **62**(3): p. 483-493.
94. Amin, A. and D. Mahmoud-Ghoneim, *Texture analysis of liver fibrosis microscopic images: a study on the effect of biomarkers*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2011. **43**(3): p. 193-203.
95. Jirak, D., et al., *Texture analysis of human liver*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2002. **15**(1): p. 68-74.
96. Kato, H., et al., *Computer-aided diagnosis of hepatic fibrosis: preliminary evaluation of MRI texture analysis using the finite difference method and an artificial neural network*. American Journal of Roentgenology, 2007. **189**(1): p. 117-122.
97. Mayerhoefer, M.E., et al., *Texture-Based Classification of Foca Liver Lesions on MRI at 3.0 Tesla: A feasibility Study in Cysts and Hemangiomas*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2010. **33**: p. 352-359.
98. Wang, Y., et al., *Studies on Tissue Characterization by Texture Analysis with Co-occurrence Matrix Method Using Ultrasonography and CT Imaging*. J Med Ultrasonics, 2002. **29**: p. 211-223.
99. Caldwell, C.B., et al., *Characterisation of mammographic parenchymal pattern by fractal dimension*. Physics in medicine and biology, 1990. **35**(2): p. 235.
100. Iftekharuddin, K.M., et al., *Fractal-based brain tumor detection in multimodal MRI*. Applied Mathematics and Computation, 2009. **207**(1): p. 23-41.
101. Free, S., et al., *Three-dimensional fractal analysis of the white matter surface from magnetic resonance images of the human brain*. Cerebral Cortex, 1996. **6**(6): p. 830-836.
102. Ramasawmy, R., et al., *Hepatic arterial spin labelling MRI: an initial evaluation in mice*. NMR in Biomedicine, 2015. **28**(2): p. 272-280.
103. Sarin, S., C. Sabba, and R. Groszmann, *Splanchnic and systemic hemodynamics in mice using a radioactive microsphere technique*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1990. **258**(3): p. G365-G369.

104. MCDEVITT, D.G. and A.S. NIES, *Simultaneous measurement of cardiac output and its distribution with microspheres in the rat*. Cardiovascular research, 1976. **10**(4): p. 494-498.
105. Bauer, M., et al., *Dose-related pattern of sinusoidal leukocyte adhesion in sublobular regions of the liver after systemic endotoxin challenge in the rat*. Shock, 1994. **1**(2): p. 135-140.
106. Schwitter, J., et al., *Assessment of myocardial perfusion in coronary artery disease by magnetic resonance a comparison with positron emission tomography and coronary angiography*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2230-2235.
107. Loveless, M.E., et al., *A quantitative comparison of the influence of individual versus population-derived vascular input functions on dynamic contrast enhanced-MRI in small animals*. Magnetic Resonance in Medicine, 2012. **67**(1): p. 226-236.
108. Parker, G.J., et al., *Experimentally-derived functional form for a population-averaged high-temporal-resolution arterial input function for dynamic contrast-enhanced MRI*. Magnetic Resonance in Medicine, 2006. **56**(5): p. 993-1000.
109. Johnson, S.P., et al., *Acute changes in liver tumour perfusion measured non-invasively with arterial spin labelling*. British journal of cancer, 2016.
110. Bovenkamp, P.R., et al., *Velocity mapping of the aortic flow at 9.4 T in healthy mice and mice with induced heart failure using time-resolved three-dimensional phase-contrast MRI (4D PC MRI)*. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, 2015. **28**(4): p. 315-327.
111. Van Doormaal, M., et al., *Inputs for subject-specific computational fluid dynamics simulation of blood flow in the mouse aorta*. Journal of biomechanical engineering, 2014. **136**(10): p. 101008.
112. Tabibian, J.H., et al., *Micro-computed tomography and nuclear magnetic resonance imaging for noninvasive, live-mouse cholangiography*. Laboratory Investigation, 2013. **93**(6): p. 733-743.
113. Ulloa, J.L., et al., *Assessment of gadoxetate DCE-MRI as a biomarker of hepatobiliary transporter inhibition*. NMR in Biomedicine, 2013.
114. Saito, K., et al., *Assessing liver function using dynamic Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI with a standard 5-phase imaging protocol*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2012.
115. Vautier, J., et al., *Radial multigradient-echo DCE-MRI for 3D Ktrans mapping with individual arterial input function measurement in mouse tumor models*. Magnetic Resonance in Medicine, 2012.
116. Zhou, R., et al., *Simultaneous measurement of arterial input function and tumor pharmacokinetics in mice by dynamic contrast enhanced imaging: effects of transcytolemmal water exchange*. Magnetic resonance in medicine, 2004. **52**(2): p. 248-257.