

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計 畫 *
* : 過動症大鼠之錳離子增強功能性磁振造影 *
* 名 稱 *
* ***** ***** *

執行計畫學生：張捷茵
學生計畫編號：MOST 104-2815-C-040-012-B
研究期間：104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授：翁駿程

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學影像暨放射科學系(所)

中華民國 105年03月01日

過動症大鼠之錳離子增強功能性磁振造影

Functional Brain Mapping in Rat Model of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder using Manganese-enhanced MRI

(一)前言

注意力不足過動症(Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)為一常見神經疾病，目前無藥物治療可根治，通常針對症狀做抑制和緩解，過動症主要的特徵為缺乏行為控制、活動量過多等。藉此，我們發展錳離子增強磁振造影(manganese-enhanced MRI, MEMRI)技術，透過直接注射錳離子顯影劑於大腦初級運動皮質區(primary motor cortex, M1)，利用錳離子可縮短T1的特性，作為顯影劑觀察腦內神經細胞活化程度的差異，當神經活化便產生錳離子的累積，在T1 權重影像下呈現亮訊號，並以自發性高血壓大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR)作為 ADHD 之動物實驗模型，將其與正常血壓之大鼠(Wistar-Kyoto, WKY)做 MRI 影像上的比較。

本研究希望利用 MEMRI 的技術，比較自發性高血壓大鼠(SHR)與正常血壓大鼠(WKY)的錳離子顯影情形，得到過動症腦內之神經傳導關係，藉由此實驗所得的數據，作為此病症診斷評估或將來觀察藥物治療的療效為何的依據，且證實 MEMRI 技術的可行性。

(二)研究目的

注意力不足過動症(ADHD)的患者逐年有增加的趨勢，為提供注意力不足過動症一個依據，希望實驗所得之過動症腦內神經傳導關係，可做為診斷評估或觀察藥物治療療效為何的證明，我們以 SHR 做為過動症的動物實驗模型，並比較 SHR 與 WKY 大鼠的錳離子顯影情形得到結果。

過去常使用非侵入式的功能性磁振造影(functional MRI, fMRI)做為動物腦功能造影的方法，利用血氧相依對比(Blood Oxygenation Level Dependent, BOLD)之原理觀察腦內神經活動，但此方法必須在造影的過程中給予麻醉和刺激，除可能破壞其正常生理活動之外，由於 BOLD fMRI 常搭配使用 EPI 的技術造影，因此影像解析度不高且容易有嚴重的假影產生。

為解決上述缺點，我們發展錳離子增強磁振造影技術(MEMRI)，配合直接注射錳離子顯影劑到運動皮質區，迴避血腦障壁的阻礙，且給予刺激和 MR 造影不需同時進行，不影響正常生理狀況，取像時也不需要使用 EPI 等快速造影技術，而改以傳統的 gradient echo 或 spin echo sequence 進行造影，除可提高影像解析度外也較不易產生假影，為神經活化造影的另一種選擇。

本實驗希望透過 MEMRI 技術，改善 BOLD fMRI 所帶來的缺點，利用錳離子具有順磁性可縮短 T1 使訊號增強的特性，觀察錳離子累積的情形，當錳離子累積越多，則訊號會增強呈現亮訊號。藉由比較自發性高血壓大鼠(SHR)與正常血壓大鼠(WKY)的錳離子顯影情形，了解過動症與正常大鼠腦內活化程度的差異，且證實 MEMRI 技術的可行性。

(三)文獻回顧與探討

3.1 注意力不足過動症

注意力不足過動症俗稱過動症，為兒童常見的心智疾病之一，根據美國疾病控制與預防中心的數據統計，顯示 1997 至 2006 平均每年有 3%人口被診斷出患有過動症，2003 至 2011 年則

增加至每年 5%，比例略顯上升，而現今國內比例約 7.5% 左右。注意力不足過動症的主要症狀可分為三個層面：注意力不集中、過動、行為衝動，除此之外，患病兒童在日常生活中可能會有入際關係障礙、學業成就低落、缺乏自信、憂鬱等問題產生。目前並無藥物能夠根治，僅能針對症狀做緩解。本實驗以 SHR 為實驗對象，Sagvolden 指出，基於行為、基因及神經生物學等因素，SHR 為一最適作為過動症研究的動物實驗模型[1]。

3.2 錳離子造影劑

MEMRI 以錳離子作為 T1 對比顯影劑，由於具有以下特質可做為神經連結的追蹤劑，其為順磁性離子可降低周圍氫原子的 T1 回復時間，除縮短 T1 之外，且由於錳離子與鈣離子性質相似，當神經活化時可經由鈣離子通道通過[2]。當某腦區域的活化增加，錳離子會累積於腦內，其在細胞內的累積速率會正比於鈣離子進入活化之神經細胞的速率，而累積處訊號會增強，造成此處在 T1 加權影像上由於 T1 縮短導致訊號增強，呈現亮訊號[3]。然而，少量錳離子雖有助於維持腦部正常運作及細胞功能，但由於錳離子具有神經毒性，因此過量的高濃度錳離子可能導致神經退化的風險，即錳中毒[4]。

3.3 MEMRI

過去常使用的動物腦功能造影方法為 BOLD fMRI，但 BOLD fMRI 的改變受到 CBF (cerebral blood flow), CBV(cerebral blood volume)及氧氣的消耗等等因素影響，進而影響對比的效果[5]，且此方法必須在造影的過程中給予麻醉和刺激，除可能破壞其正常生理活動之外，由於 BOLD fMRI 常搭配使用 EPI 的技術造影[6]，因此使用 BOLD fMRI 時取得的影像解析度通常不高。

相比較下，錳離子增強磁振造影技術為神經活化造影提供另一種選擇，由於錳離子和鈣離子兩者的離子半徑近似且具有相同的價電荷，因此錳離子可模仿鈣離子在生化環境中所扮演的角色[7]，錳離子可經由鈣離子通道進入神經細胞[2]，再者，神經系統因為不具有代謝錳離子之機制，因此錳離子會在神經細胞內做累積，錳離子具有順磁性，可降低周圍氫原子的 T1 回復時間，造成 T1 加權影像上神經細胞可以被突顯出來，而錳離子累積的多寡正比於細胞活化的程度，與 CBF, CBV 及氧氣的消耗等等因素的改變無關，所需考慮因素較少，更能直接反映神經細胞的活化程度及神經活化的位置[5]。當錳離子被注射於顱內後，MEMRI 可被當作一追蹤技術，對打藥位置周圍區域做功能腦區的連結，及觀察錳離子分布的差異[8]，此外，MEMRI 不須使用 EPI 等快速造影的技術，可改以傳統的 gradient echo 或 spin echo sequence 進行造影，除可提高影像解析度外也較不易產生假影。

MEMRI 已經在許多不同的注射方式上得到驗證，如透過鼻內注射[9, 10] 或腦內注射[11] 觀察啮齒動物嗅覺途徑，再者，MEMRI 也曾應用於其他疾病上，例如以 MEMRI 技術觀察大腦半球間及大腦半球內與基底核的連結關係，來做帕金森氏症(Parkinson's disease)的探討[12]；又利用老鼠為模型搭配 MEMRI 技術偵測軸突運輸的狀況，研究阿茲海默症(Alzheimer's disease)，證實錳離子可有效用來偵測神經的變化例如突觸功能障礙，甚至神經退化性疾病[13]，相較於功能性核磁共振顯影，錳離子增強磁振造影的信號較高，能提供一個直接追蹤神經活動的方法。

(四)研究方法及步驟

4.1 研究步驟(實驗步驟流程可參考 Table 1)

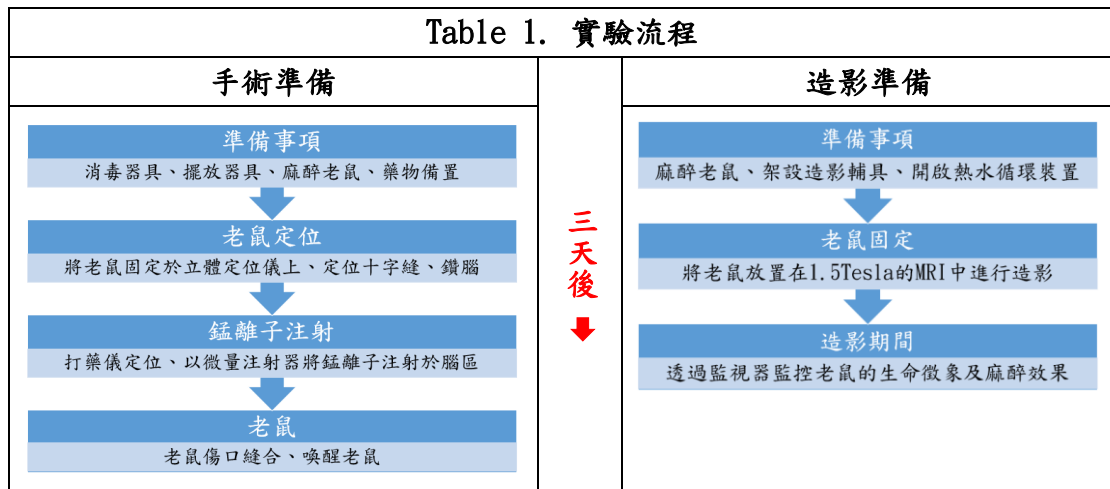
1. 準備數隻 SHR 與正常 WKY 大鼠。
2. 手術進行時，將錳離子直接進行腦注射。利用調配出濃度為 30mM 的錳離子水溶液，取 10 μ l 以每分鐘 0.16 μ l 的速率注射到 M1 腦區，觀察大鼠的生理狀況。
3. 利用熱水循環裝置保持大鼠體溫為 37.5 $^{\circ}$ C，配合立體定位儀定位及鑽腦，將藥物以一固定速率注射於大鼠左腦之 M1。
4. 在注射後須進行磁振造影，為取得最佳化錳離子顯影效果，在大鼠打藥過後置於籠內正常活動，於最適化的間隔時間 72 小時(3 天)後，帶至 MRI 室進行造影，觀察影像的顯影情形。
5. 造影時將大鼠放置於麻醉箱，利用氣體麻醉裝置進行預麻醉。
6. 隨後將大鼠放置在 1.5Tesla 的 MRI 中進行造影。
7. 造影期間使用熱水循環裝置及溫水加熱墊，做大鼠體溫的維持，防止大鼠在造影過程中失溫死亡。
8. 所得數據以 MATLAB、FSL(FMRIB Software Library)及 SPM(Statistical Parametric Mapping)進行影像分析，觀察錳離子顯影的情形。
9. 分析結果與研究討論。

4.2 研究方法

由於錳離子注射劑量過高可能會導致老鼠死亡，而劑量過低又會使影像顯影不佳，加上每隻大鼠自身的生理差異，導致所能接受之錳離子水溶液的濃度、劑量、打藥速率各有不同。因此為取得最佳化的濃度做注射，實驗初期我們將先調配 20mM、25mM、30mM、35mM 等數種不同濃度的錳離子水溶液，再經推算得到最佳打藥速率範圍約介於每分鐘 0.12 至 0.18 μ l，接著每種濃度將各取不同量 5 μ l、10 μ l、15 μ l，以每分鐘 0.12 至 0.18 μ l 的速率注射到 M1 腦區，而後觀察大鼠的生理狀況，在藥物注射後間隔 24、48、72、96、120 小時，各進行一次 MR 造影觀察錳離子在影像中的顯影情形，透過大鼠生理狀況、顯影情形的結果，最終評估決定最佳的錳離子注射劑量為 10 μ l(以每分鐘 0.16 μ l 的速率)、注射濃度 30mM 及最佳化錳離子顯影神經活化之時間為 3 天。

使用經評估後所得的錳離子注射劑量、注射濃度、注射速率及最佳化錳離子顯影神經活化之時間，我們會將 SHR 及 WKY 大鼠分別進行實驗，手術期間以溫水加熱墊維持大鼠體溫，利用三維的立體定位手術將錳離子直接注射進大鼠的 M1 腦區後縫合，之後確認大鼠術後是否清醒，其狀態是否足以恢復正常的生理機能，在放置籠內經過一段活動時間後，將進行 MR 造影，造影前先以氣麻系統將大鼠麻醉，隨後置於 1.5Tesla 的 MRI 中造影，造影期間同時以溫水加熱墊維持大鼠體溫，防止過程中因失溫而死亡，造影結束取得影像後，將以 MATLAB、FSL 及 SPM 進行影像分析，進行後續討論。

本實驗設定的造影參數如下，gradient echo T1WI 為 TR/TE = 17/7.57 ms, flip angle = 70 $^{\circ}$, resolution = 0.19x0.39x1.5 mm³; R1 mapping 為 TR=490~5000ms, TE=15ms, resolution = 0.39x0.78x1.5 mm³。



三天後
↓

4.3 實驗設備

機組：1.5 Tesla SIEMENS Sonata (Fig. 1A)

RF 線圈：loop 射頻線圈

使用裝置

1. 氣體麻醉裝置：壓縮氣鋼筒、壓力錶、減壓裝置、流量計、吸入麻醉藥汽化器

(1) 汽化器：用於氣體麻醉機的汽化器，確保蒸氣凝聚度不受氣流速度、溫度變化、使用時間、液體水平或回壓波動的影響，可隨時調整吸入麻醉濃度，維持所需麻醉深度。(Fig. 1B)

(2) 麻醉箱：麻醉時通常使用面罩進行，但由於清醒的動物很難直接安裝面罩，因此可以先將清醒的動物放入該箱進行預麻醉，麻醉箱上有一入口連接至麻醉氣體。(Fig. 1C)

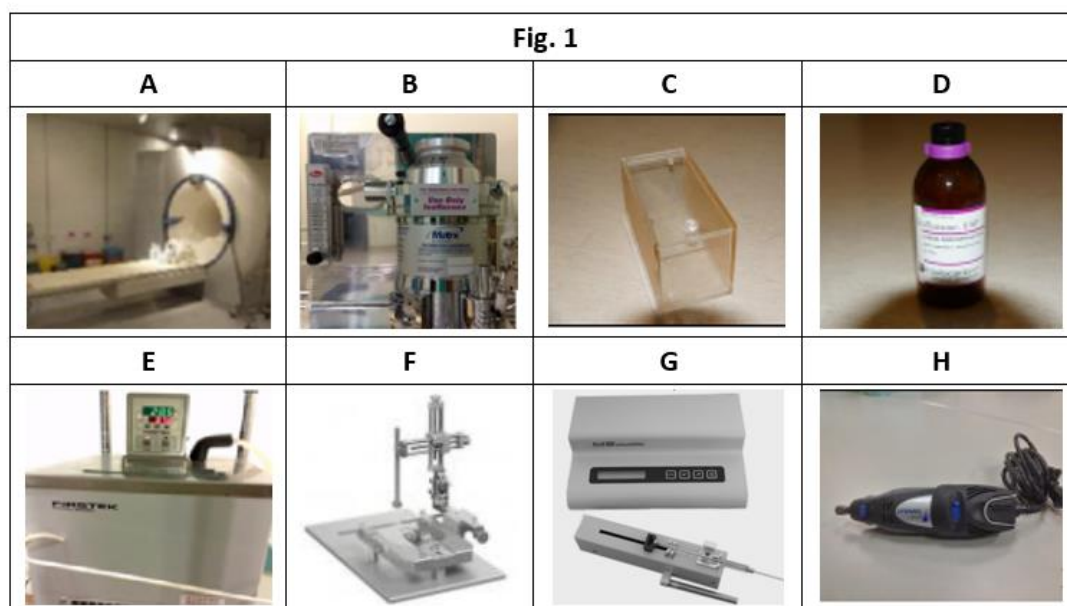
(3) 異氟醚 (Isoflurane)：誘導即恢復期快，肝毒性較小適合藥物代謝或毒理試驗時使用，對心血管抑制作用較小同樣具有呼吸抑制作用，其呼吸抑制作用比氟烷強。(Fig. 1D)

2. 熱水循環裝置(water bath temperature controller)：有自我調控溫度控制器，其主機裝置用於連接一水冷熱毯，且包括一水箱，在該水箱上裝置有連接水冷熱毯的進水快速接頭和出水快速接頭，用於形成水循環通道；除此之外，還包括一保溫箱，在該保溫箱與所述水箱之間隔離設置為一導熱板，並在該水箱中設置一加熱裝置，在所述水循環通道中有一水泵，用於驅動水流循環，當流動通過一單片基控制電路版，會使其加熱且控制水泵工作，此裝置為手術中及術後恢復做加熱保暖，防止動物失溫。(Fig. 1E)

3. 立體定位儀：立體定位儀可用於功能性立體定位手術。在本實驗中，立體定位儀用於立體定位手術結合腦定位開顱術並配合其他儀器使用。立體定位儀可將大鼠的頭顱固定，並依照儀器兩旁的刻度調整，將探針定位在運動皮質區。(Fig. 1F)

4. 微量注射器：由微型電動機來準確地控制推進和停止 hamilton 注射器，注射器可以方便地固定在腦立體定位儀上。可以通過平臺選擇注射器的型號，設定注射容量、注射速度。流速範圍：0.01 $\mu\text{l}/\text{min}$ 到 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。(Fig. 1G)

5. 鑽腦器：鑽腦器的轉速最低為每分鐘 5000 轉最高為每分鐘 35000 轉，可因應不同的手術情況調整速度。(Fig. 1H)



4.4 影像分析

取得 SHR 及正常 WKY 大鼠影像後，我們對影像做前處理，而後再進行 T1WI 與 R1 mapping 之群組分析。前處理的部分包括去腦殼及影像對位，在進行對位前，為增加影像對位的準確性，會以 MATLAB 去除腦區之外的肌肉層等，之後選定一隻老鼠做為 reference，使用 FSL 對腦影像進行對位。群組分析利用 MATLAB 將標準化之兩組影像個別進行相加平均影像、相減影像及統計上的分析，除此之外，亦使用 SPM 計算 t-test 之實驗結果。

(五) 結果與討論

5.1 結果

藉由平均影像(Fig. 2)所呈現的結果，我們可以觀察錳離子分布的情形。於正常 WKY 組大鼠的平均影像來看，我們可以發現錳離子主要落在左側初級運動皮質區，僅有少部分至左側的視丘區域。而於過動症 SHR 大鼠的平均影像，我們可以發現除了左側的初級運動皮質區有高濃度的錳離子外，左側視丘區域的錳離子濃度也較高。

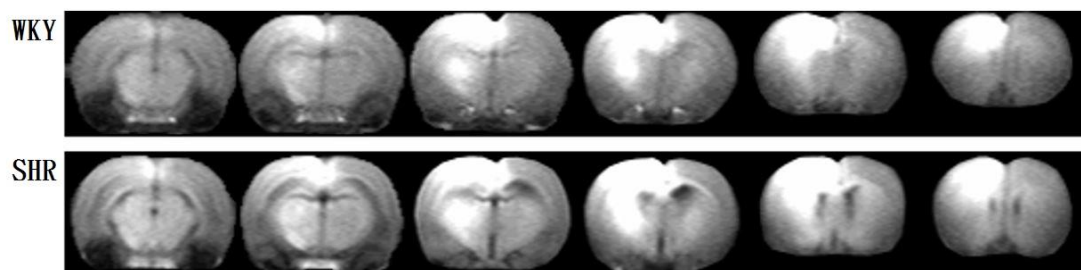


Fig. 2 WKY 與 SHR 大鼠之平均影像。

利用 R1 影像(Fig. 3)我們可以更清楚觀察錳離子分布的狀況。於正常 WKY 大鼠的 R1 影像來看，同樣可以發現錳離子主要位於左側的初級運動皮質區。於過動症 SHR 大鼠，除了在打藥側的 M1 有高濃度的錳離子且散步至同側視丘區域之外，錳離子也散布到右側初級運動皮質區。

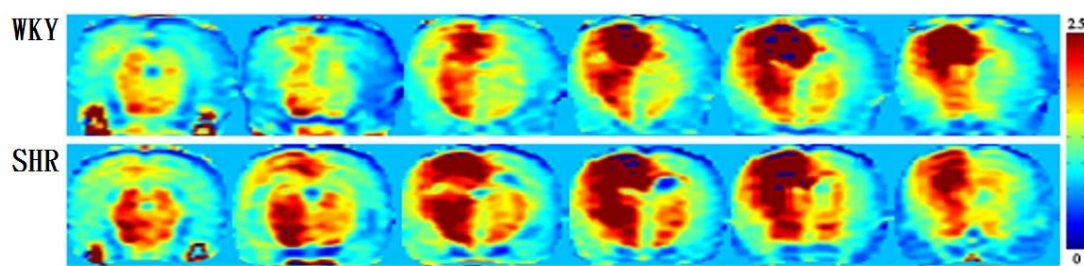


Fig. 3 WKY 與 SHR 大鼠之 R1 影像。

從過動症大鼠減正常大鼠的相減影像(Fig. 4a)，可以發現過動症大鼠於運動皮質及視丘區域的活化程度較高。且兩組所做出的 t value mapping(Fig. 4b) 及 p value mapping (Fig. 4c、Fig. 4d) 也同樣觀察到在過動症大鼠和正常大鼠的兩側的運動皮質及左側視丘區域是具有顯著差異的。

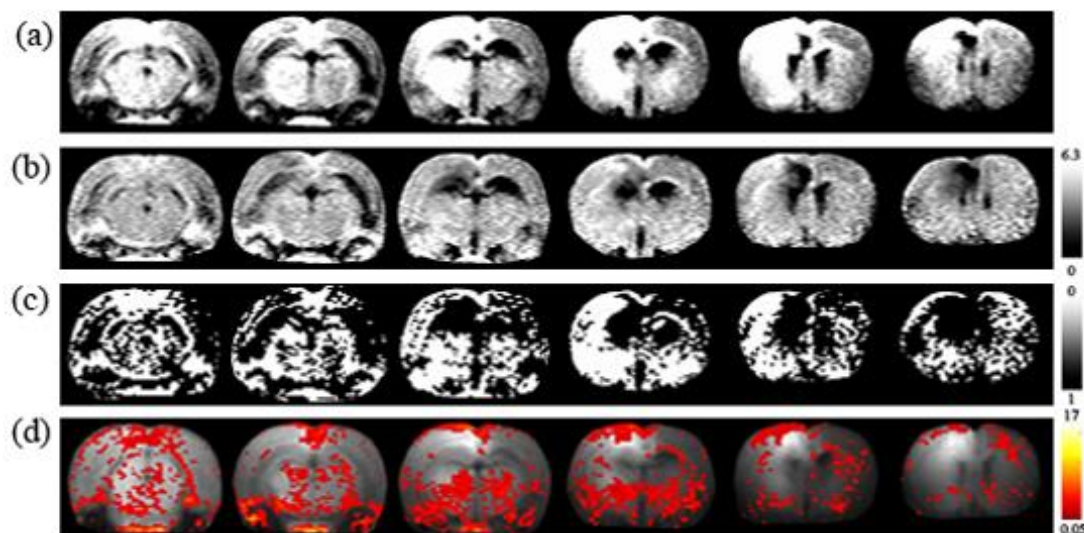


Fig. 4 兩組之間的 (a)相減影像, (b)voxel-based t-value mapping, (c)p-value mapping and (d)threshold t-value mapping。

綜合上述結果，在 WKY 大鼠組中，大部分的錳離子顯影位於左腦 M1 區，只有一些顯影擴散至左視丘區域。在 SHR 組中，顯影位置明顯由 M1 區擴散至左視丘區域。以 R1 mapping 可以更明顯的觀察出，與 WKY 大鼠組相較之下，SHR 組的錳離子顯影明顯擴散至右腦 M1 區與左視丘區域。在相減影像、voxel-based 的 t-value mapping 與 p-value mapping 顯示在實驗組與對照組之間，錳離子顯影的差異集中在左腦 M1 區與左視丘區域。

由於錳離子與鈣離子具有相似的性質，因此當神經活化後，錳離子會經由鈣離子通道進入活化的腦區中並累積，由於自發性高血壓大鼠為一種注意力不足過動症的動物模型，在實驗初期，我們推測在運動皮質區或與之連結的腦區，自發性高血壓大鼠相較於正常血壓大鼠可能有較高之活化程度，而上述結果與預測相符。

5.2 討論

影像分析中，除了平均、相減及群組分析之外，我們也利用 R1 影像來做結果的呈現，R1 影像能夠用來定量，可推算為錳離子濃度的大小。而實驗中我們將藥物直接進行腦注射，是由於我們懷疑初級運動皮質區在過動症大鼠及正常大鼠可能會有差異，因此直接將造影劑腦注射於此腦區。若是要觀察的腦區較多，便可利用靜脈注射的方式進行，效果會較佳。

由於過動症大鼠具有衝動、過動、注意力不集中的症狀，因此在運動皮質的區域神經活化程度較高，更多錳離子經由鈣離子通道通過，導致更多錳離子累積使影像變亮。錳離子散布至視丘區域的原因，我們推測為初級運動皮質及視丘區域具有腦腹外側核（ventrolateral thalamus）做聯繫所導致[14]，而錳離子散布至右側運動皮質的原因為兩腦之間具有胼胝體做連接。

(六)結論與建議

6.1 結論

我們成功使用 MEMRI 觀察大鼠功能活化的分佈，並且發現過動症大鼠與正常大鼠之間，主要於運動皮質與視丘區域具顯著功能活化程度的差異。由於目前注意力不足過動症的成因複雜，在精神疾病方面診斷不易，需藉由診斷標準、量表或身心理觀察等做多元鑑定，且治療方式僅針對症狀進行抑制或緩解，並藉由觀察得知療效。期盼此研究的實驗資料可作為過動症相關聯腦區的依據，為注意力不足過動症提供診斷或治療的線索方便做評估。此外，此研究亦證明了 MEMRI 的可行性，其可為另一種新的神經活化造影，有助於未來研究基因或手術操弄的大腦塑化現象。

6.2 建議

前段文章有提及少量錳離子雖有助於維持腦部正常運作及細胞功能，但錳離子具有神經毒性，因此過量的高濃度錳離子可能導致神經退化的風險，即錳中毒。我們的實驗以老鼠作為實驗模型做印證，若是想進一步進行人體試驗，困難度會提高許多，可行性需要再做更進一步的研究及確認或採以其他的實驗方法進行。

(七)感謝

本研究感謝科技部提供研究經費：大專學生研究計畫（NSC 104-2815-C-040-012-B）。

(八)參考文獻

- [1] Sagvolden T, Johansen EB. (2009). The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*, 57(7-8), 619-26.
- [2] Massaad CA, Pautler RG. (2011). Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Methods Mol Biol*, 711, 145-74.

- [3] Simanova, I., Canals, S., Eschenko, O., & Logothetis, N. K. (2008, July). Imaging of learning-associated brain activity in freely behaving rats using manganese-enhanced MRI (MEMRI). In *6th Forum of European Neuroscience (FENS 2008)*, Geneva, Switzerland.
- [4] Silva AC, Bock NA. (2008). Manganese-enhanced MRI: an exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophr Bull.* 34(4), 595-604.
- [5] Silva AC (2012). Using manganese-enhanced MRI to understand BOLD. *Neuroimage.* 62(2), 1009-13.
- [6] Glover GH, Law CS (2001). Spiral-in/out BOLD fMRI for increased SNR and reduced susceptibility artifacts. *Magn Reson Med.* 46(3), 515-22.
- [7] Obenaus AI, Jacobs RE (2007). Magnetic resonance imaging of functional anatomy: use for small animal epilepsy models. *Epilepsia.* 48 Suppl 4, 11-7.
- [8] Hsu YH, et al. (2008). Neuronal dysfunction of a long projecting multisynaptic pathway in response to methamphetamine using manganese-enhanced MRI. *Psychopharmacology (Berl).* 196(4), 543-53.
- [9] Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP (1998). In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 40(5), 740-8.
- [10] Cross DJ, Minoshima S, Anzai Y, Flexman JA, Keogh BP, Kim Y, et al. (2004). Statistical mapping of functional olfactory connections of the rat brain in vivo. *Neuroimage.* 23(4), 1326-35.
- [11] Chuang KH, Koretsky A. (2006). Improved neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging with fast T(1) mapping. *Magn Reson Med.* 55(3), 604-11.
- [12] Pelled G, et al. (2007). Manganese-enhanced MRI in a rat model of Parkinson's disease. *J Magn Reson Imaging.* 26(4), 863-70.
- [13] Smith KD, et al. (2007). In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage.* 35(4), 1401-8.

[14] Middleton FA, et al. (2000), Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Rev.* 31(2-3), 236-250.