

# Koponyatrauma hatására kialakuló fehérállományi mikrovérzések és a fehérállomány mikrostrukturális állapota közti összefüggések vizsgálata modern MRI módszerekkel



Doktori (PhD) értekezés

Dr. Környei Bálint Soma

PTE ÁOK Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola

Idegtudományi Képzés program

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Janszky József

Doktori Iskola programvezetője:

Prof. Dr. Bogner Péter

Témavezetők:

Dr. Tóth Arnold

Prof. Dr. Bogner Péter



NEMZETI  
LABORATÓRIUM



Új Nemzeti  
Kiválóság Program



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROGRAM

# Tartalomjegyzék

Rövidítések listája .....	5
1 Bevezetés .....	6
1.1 A koponya-agysérülés definíciója, epidemiológiája, általános jellemzői és a diffúz axonkárosodás .....	6
1.1.1 A koponya-agysérülés definíciója és epidemiológiája .....	6
1.1.2 Gazdasági terhek jóléti, fejlett államokban .....	9
1.1.3 Koponya-agysérülés következtében kialakuló patológiás elváltozások.....	10
1.2 Kutatócsoportunk korábbi eredményei .....	26
1.2.1 Az SWI-vel detektálható, DAI kapcsolt mikrovérzések morfológiai definiálásának nehézségei, a lineáris koregisztráció jelentősége kutatási (és klinikai) vizsgálatok során.....	26
1.2.2 A léziószám és elhelyezkedés összefüggései a fehérállományban mérhető diffúziós paraméterekkel .....	27
1.2.3 A traumás eredetű fehérállományi mikrovérzések SWI-n látható időbeli változásai[122]... 28	28
1.2.4 Fehérállományi mikrovérzések intenzitás dinamikájának vizsgálata SWI MRI-n in vivo patkány modellben .....	29
1.2.5 DTI MRI segítségével feltárható csoport szintű diffúziós paraméter változások koponyatraumában –előzetes eredmények.....	32
1.2.6 Tractus-szintű DTI elváltozások elemszám függésének vizsgálata –előzetes eredmények .. 33	33
1.2.7 Tractus-szintű elváltozások és neuropszichológiai eredmények korrelációja –előzetes eredmények: .....	33
1.3 Problémafelvetés, célkitűzés .....	35
1.3.1 Problémafelvetések .....	35
1.3.2 Célkitűzések.....	36
2 Módszerek.....	38
2.1 Módszerek I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban.....	38
2.1.1 Alanyok.....	38
2.1.2 Klinikai adatok és felvételi CT paraméterek.....	39
2.1.3 MRI képképzés.....	40
2.1.4 Vérzéses és nem vérzéses MRI léziók értékelése.....	41
2.1.5 Statisztikai elemzés .....	44
2.2 Módszerek II.: A periléziós fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül.....	45
2.2.1 Alanyok:.....	45

2.2.2	Képalkotó protokoll.....	45
2.2.3	MRI felvételek kiértékelése.....	46
2.2.4	Statisztikai módszerek.....	49
2.3	Módszerek III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése .....	50
2.3.1	Alanyok.....	50
2.3.2	Statisztikai elemzés .....	51
3	Eredmények .....	53
3.1	Eredmények I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban.....	53
3.2	Eredmények II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül .....	58
3.3	Eredmények III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése .....	62
4	Diszkusszió .....	69
4.1	Diszkusszió I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban.....	69
4.2	Diszkusszió II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül.....	71
4.3	Diszkusszió III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése .....	74
5	Konklúzió.....	77
5.1	Konklúzió I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban.....	77
5.2	Konklúzió II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül .....	77
5.3	Konklúzió III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése .....	78
6	Irodalomjegyzék.....	79
7	A disszertáció alapjául szolgáló eredeti közlemények, tudományos közlemények és kongresszusi összefoglalók jegyzéke, témavezetői, egyéb tudományos teljesítmény .....	86
8	Köszönetnyilvánítás .....	91
9	A disszertáció alapjául szolgáló eredeti közlemények .....	92

## Rövidítések listája

DAI- diffúz axonsérülés/károsodás (diffuse axonal injury)

DTI MRI- diffúziós tenzor mágneses rezonancia képalkotás (diffusion tensor MRI)

FLAIR MRI- fluid-attenuated inversion recovery MRI

GCS- Glasgow Coma Scale

GRE- gradient recall echo

HE- hematoxin-eozin

KIR- központi idegrendszer

MPT- mitochondriális tranzíciós permeabilitási pórus (mitochondrial permeability transition pore)

MRI- mágneses rezonancia képalkotás (magnetic resonance imaging)

nTMB- nem traumás eredetű (fehérállományi) mikrovérzés (non-traumatic microbleed)

PD- proton denzitás

PTA- poszttraumás amnézia

RF- rádiófrekvenciás (hullámok)

ROI- region of interest

SWI MRI- szuszceptibilitás súlyozott mágneses rezonancia képalkotás

TBI- traumás agy sérülés (traumatic brain injury)

TE- echo idő (echo time)

TMB- traumás eredetű (fehérállományi) mikrovérzés (traumatic microbleed)

TR- repetíciós idő (repetition time)

# 1 Bevezetés

## 1.1 A koponya-agysérülés definíciója, epidemiológiája, általános jellemzői és a diffúz axonkárosodás

### 1.1.1 A koponya-agysérülés definíciója és epidemiológiája

#### 1.1.1.1 Világviszonylat

Napjainkban a koponya-agysérülés epidemiológiai jelentőségére, szocio-ökonómiai hatásaira szinte lehetetlen elegendő figyelmet fordítani. Definíció szerint a traumás agysérülés (traumatic brain injury –TBI) külső erőbehatás következtében kialakuló agyi funkciózavar, vagy bizonyított patológiás agyi elváltozás[1, 2].

A TBI minden trauma forma közül a legtöbb maradandó egészségkárosodást vagy halált okozza[3-5]. Minden más trauma típushoz viszonyítva az éven belüli halálozása 7-szeres, a 7 éven belüli halálozás pedig 5,3 szoros[6, 7]. Világviszonylatban a különböző súlyosságú TBI megoszlása enyhe : közép súlyos : súlyos nagyjából 70%:20%:10%-nak adódik[8, 9].

Jelenleg évente világszere több mint 10 millió embert érint, súlyos TBI tekintetében még a legfejlettebb, kifejezetten a súlyos TBI ellátására specializálódott trauma centrumokban is közel 50%-os a mortalitás. Sajnálatos módon a TBI-ban elhunytak közül 68%-a még azelőtt exitál, hogy kórházi ellátást kaphatna[5, 10, 11].

Világviszonylatban 60%-ban a koponya-agysérülések háttérében közlekedési baleset, 20–30%-ban különböző esések, 10%-ban erőszakos cselekmény, 10%-ban pedig egyéb ok, az előbbiektől kombinációja, munkahelyi balesetek és profi (küzdő és vagy kontakt) sport áll[8, 12-14]. A koponya-agysérülés életkor szerint két csúcspontot mutat, incidenciája a 0-4 éves (806,3/100000) és a 75 év feletti (440,2/100000) korosztályokban a leggyakoribb[13-15]. A közlekedési balesetek okozta koponya-agysérülés (különösen a motorbalesetek) legjobban a 15-19 és a 20-24 éves korosztályt sújtja (194,9/100000) [15]. Közép súlyos vagy súlyos koponya-agysérülés önállóan ritkán, legtöbbször polytrauma komponenseként fordul elő, ami szintén több okból nehezíti ezek önálló vizsgálatát. A különböző közlekedési balesetek és esések a koponya-

agysérülés leggyakoribb okai, ezek aránya, mint oki tényező Ázsiában a legmagasabb. Európában az esések, Észak-Amerikában pedig – Dr. Bennet Omalu munkássága által feltárt- sportolás (legfőképpen az amerikai futball) közben elszenvedett koponya-agysérülések a leggyakoribbak[16-20].

A „néma epidémiaként” is emlegetett kórkép mind a magas, mind az alacsony jövedelmű népeiséget és gyakorlatilag minden korosztályt érinti. A „néma” utal arra, hogy a TBI következményei nem mind jelentkeznek azonnal, későbbi hatásaikat prognosztizálni nehéz, statisztikailag pedig sok esetben alulreprezentált. Incidenciájának és prevalenciájának felmérését sok tényező akadályozza, az egyik ok a TBI intézményenként sokszor eltérő, nem egységes definiálásában is keresendő. Enyhe TBI esetén pedig (mely a leggyakoribb forma), a traumát szenvedettek legtöbbször nem igényelnek egészségügyi ellátást, sokszor egyéb sérülések mellett a koponya-agysérülés nem kerül rögzítésre, az ittasan sürgősségi osztályokra kerülő sérültek TBI-ra utaló tudat-/beszéd-/mozgászavarát pedig az intoxikáció maszkírozhatja[21, 22].

Wagner és munkatársai által 2000-ben készített tanulmány szerint az Egyesült Államokban minden 21. másodpercben koponya-agysérülést szenvedett valaki[23]. Évente mintegy 1,4 millió koponya-agysérülés hatására bekövetkező halálesetet, hospitalizációt, sürgősségi osztályokon történő ellátást dokumentálnak. Mortalitását tekintve hozzávetőlegesen 52000 amerikai hal meg évente TBI következtében, ami az összes trauma által okozott halálozás 30,5%-a. Közel 250000 eset igényel osztályos felvételt, azaz definitív idegsebészeti ellátást, további 1,1 millió beteg távozik otthonába sürgősségi ellátást követően. Ezenfelül nagyjából 80-90000 ember szenved maradandó egészségkárosodást[23]. (A fenti számadatok megközelítik a vietnámi háború amerikai veszteségeit! <https://www.archives.gov/research/military/vietnam-war/casualty-statistics>)

### *1.1.1.2 Európa*

Egy nemrégiben a Journal of Neurotrauma szaklapban közölt áttekintő tanulmány szerint (melyhez országos szintű adatokat 22, regionális adatokat Európa-szerte 44 tanulmány szolgáltatott) az összes korcsoport és TBI súlyosság tekintetében az incidencia 47,3 és 694 között változott 100 000 lakosra vonatkoztatva évente (országos tanulmányok), és 83,3 és 849 között 100 000 lakosra vonatkoztatva évente (regionális tanulmányok). A mortalitási ráta 9 és 28,10 között változott 100 000 lakosra vonatkoztatva évente (országos tanulmányok), és 3,3 és 24,4 között 100 000 lakosra vonatkoztatva évente (regionális tanulmányok). A leggyakoribb sérülési mechanizmusok a közlekedési balesetek és az esések voltak[24].

### *1.1.1.3 Magyarország*

A Magyar Neurotraumatológiai Társaság által 69 intézmény bevonásával végzett átfogó tanulmány szerint egy év alatt országosan mintegy 35000 koponya-agysérülés feltételezhető, melyek megoszlása 71,3%-ban enyhe, 19,4%-ban közép súlyos és 9,3%-ban súlyos. A sérültek 67%-a férfi, 33%-a nő, 78%-át 60 év alattinak, 36%-át 40 éves kor alattiak teszik ki[11, 25].

Nemzetközi összehasonlításban kiemelkedően magas mortalitásról számolt be a tanulmány, melynek legfőbb okaiként többek között súlyos szervezési problémákat állapítottak meg a prehospitális és hospitális ellátás során. A kórházi felvételkor súlyos koponya-agysérülteknek mindössze 75%-a részesült intenzív ellátásban benntartózkodásának első hetében, továbbá a második hétre ez az arány 21%-ra csökkent. A 69, koponya-agy sérülteket rutinszerűen ellátó intézményből csupán 15 esetben áll rendelkezésre 24 órán belül idegsebészeti ügyelet, intracranialis nyomás monitorozás mindössze 9 helyen történt rutinszerűen, további 26 helyen egyedi elbírálás alapján. A 24 órás intézményen belüli CT hozzáférés 58%, a súlyos koponya-agysérültek kórházon belüli mortalitása pedig 33%. A súlyos koponyatraumát túlélők mindössze 54%-a részesül valamilyen rehabilitációs ellátásban[11, 25].



#### 1.1.1.4 Későbbi következmények

Az amerikai National Center for Injury Prevention and Control kutatásai szerint még az enyhe TBI-nak is vannak akár évekkel a trauma után is kimutatható jelei, sőt akár életre szóló fogyatékossgot is okozhat. Az USA-ban gyermekek és fiatalok körében a TBI a leggyakoribb oka a maradandó egészségkárosodásoknak, rokkantságnak[5, 13, 14, 26-28]. Zaloshnja és munkatársa által végzett longitudinális vizsgálat szerint 2005-ben 3,17 millió amerikai állampolgár szenvedett TBI okozta súlyos fogyatékossgtól, ami a populáció 1,1%-a. A TBI a maradandó egészségkárosodás –beszéd, memória, mozgászavarok, paralysis, depresszió, a szellemi teljesítőképesség csökkenés és a szerzett epilepsziás megbetegedések vezető oka az USA-ban[29]. Már 1999-es adatok szerint is a koponyatrauma okozta maradandó egészségkárosodás prevalenciája 2,5- 6,5 millió volt csak az USA-ban ami azóta is folyamatos növekedést mutat[29, 30].

#### 1.1.2 Gazdasági terhek jóléti, fejlett államokban

A koponya-agysérülések és későbbi következményeik közvetlenül a sérülte rött pszicho-szocio-fizikális és ökonómiai terheken túl, a gazdasági veszteség két komponense, a direkt veszteség (ami a koponyatraumát szenvedett ellátásának költségeit jelenti) és a produktivásban jelentkező veszteség, ami a sérült, és azon családtagok, akik a sérültet ápolni, gondozni kényszerülnek munkaerő piacról való kiesését jelenti, hatalmas terhet ró minden érintett társadalomra. Csak az Egyesült Államokban évente mintegy 60,43 milliárd (!) dollárt emésztenek fel a TBI negatív gazdasági következményei[31-35].

## 1.1.3 Koponya-agysérülés következtében kialakuló patológiás elváltozások

### 1.1.3.1 A koponya-agysérülések osztályozása

#### 1.1.3.1.1 A koponya-agysérülések súlyosság szerinti beosztása

Klasszikusan a koponya-agysérülések súlyosságát a Glasgow Coma Scale (GCS) alapján határozták meg. A GCS három paramétert vizsgál a beteg állapotának felmérésére, melyet az 1. táblázat tartalmaz[36, 37].

1. táblázat: a Glasgow Coma Scale

		Pontszám
Szemválasz	Szemeit spontán nyitja	4
	Felszólításra szemeit spontán nyitja	3
	Fájdalmas stimulusra szemeit nyitja	2
	Szemeit nem nyitja	1
Verbális válasz	Tájékozott és normális párbeszéd	5
	Dezorientált, zavart beszéd	4
	Nem megfelelő szavak használata	3
	Érthetetlen hangok kiadása	2
	Nincs verbális válasz	1
Motoros válasz	Utasítást végrehajt	6
	Lokalizálja a fájdalmas stimulust	5
	Elhúzódik a fájdalmas stimulustól	4
	Felső végtagon hajlítás, alsó végtagon nyújtás fájdalmas stimulusra	3
	Összes végtagját nyújtja fájdalmas stimulusra	2
	Nincs motoros válasz	1
Összpontszám		<b>3-15</b>

A GCS alapján a koponya-agysérülés enyhének minősül 13-15; középsúlyosnak 9-12 és súlyosnak 3-8 összesített értéknél.

Alkalmazásának azonban sok tényező szabhat határt (úgy, mint a beteg intoxikációja, vagy polytrauma során alkalmazott anesztézia, intubáció).

A GCS-en felül több paramétert is figyelembe vevő, pontosabb állapotbecslést lehetővé tevő rendszerek is elérhetők. Az egyik ilyen a Rochesteri (MN, US) Mayo Klinikán kifejlesztett „Mayo Classification System for Traumatic Brain Injury”[38] melyet a 2. táblázat tartalmaz.

2. táblázat: Mayo Classification System for Traumatic Brain Injury

A koponyatraumák súlyosságának Mayo klasszifikációja	
Súlyosság	Kritériumok
Középsúlyos-súlyos (definitív sérülés)	Halál
	30 percél hosszabb eszméletvesztés
	24 óránál hosszabb anterográd amnézia
	GCS<13 az első 24 órában
	Intracerebrális, szubdurális, epidurális vagy szubarachnoideális vérzés; contusio, áthatoló koponya-agysérülés, agytörzsi károsodás
Enyhe (valószínű sérülés)	30 percél nem hosszabb eszméletvesztés
	anterográd amnézia <2-4 óra
	zárt koponyatrauma
Szimptomatikus (lehetséges sérülés)	Egyik sem áll fent a fenti kritériumok közül
	Egy vagy több fennáll az alábbiak közül: homályos látás, zavarodottság, szédülés, fejfájás, hányás, hányinger, neurológiai göctünetek

#### 1.1.3.1.2 A koponya-agysérülés pathomechanismusa

A koponya-agysérülést okozó erőbehatás lehet statikus (igen ritka), illetve dinamikus, ami tovább osztható impulzív (az egész testet érintő, akcelerációs- decelerációs erők által sértő) és impakt (közvetlenül a koponyát érő, nekicsapódásos) formákra.

Patobiológiai szempontból a sérült a trauma pillanatában szenved el az ún. elsődleges koponya-agysérülést, melynek mértékét és jellegét a baleset körülményei, a prevenció eszközök (nyak, gerincvédők, bukósisak stb.), a sérült alkata és helyzete határozza meg.

A sérülés pillanatától azonnal megkezdődik az ún. másodlagos károsodások kialakulása, melyek elsősorban az agyi hypoxiában és hypoperfúzióban, illetve az eredeti károsodás kiterjedésének növekedésében nyilvánulnak meg. Szakirodalmi bizonyítékok alapján tudjuk, hogy a hypoxaemia vagy hypotenzió szignifikánsan rontja a kimenetelt [39, 40].

A külső erőbehatásra kialakult koponya-agysérüléseket osztályozhatjuk továbbá a koponyaúri fertőzés veszélye, a liquor tér megnyílása, és a sérülés kiterjedése alapján. Eszerint beszélhetünk nyílt (ha a koponyaúr, a liquor tér közlekedik a külvilággal) vagy zárt; valamint fokális vagy diffúz koponya-agysérülésekről.

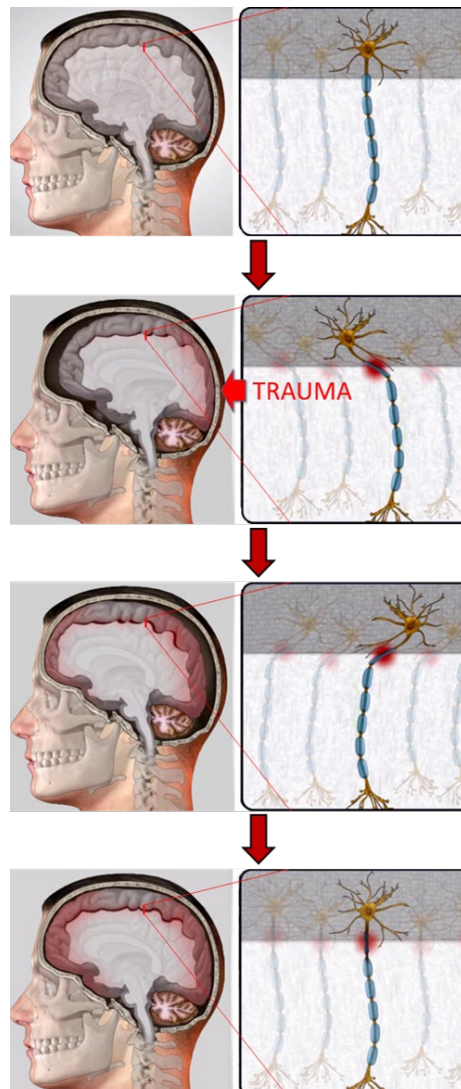
A fokális sérülések főbb típusai az epidurális vérzés, a szubdurális vérzés, a contusió állományi vérzés, és a traumás subarachnoideális vérzés. Diffúz kórképeken belül alapvetően öt entitást különböztethetünk meg: a diffúz neuron károsodást, a hypoxiás agykárosodást, az agyduzzadást, a jelenleg még kevésbé ismert klinikai jelentőségű diffúz vascularis sérülést és a diffúz axonális károsodást (diffuse axonal injury- DAI).

#### 1.1.3.1.3 A diffúz axonkárosodás

A szakirodalom szerint a koponya-agysérülés hatására kialakuló diffúz agyi elváltozások közül a DAI tartható a legjelentősebbnek. Okozhatja impakt és impulzív koponya-agysérülés is, melyek hatására létrejövő akcelerációs és decelerációs erők az agy különböző konzisztenciájú –így eltérő mozgási energiájú- állományainak (szürke-fehérállomány, törzsdúcok, agytörzs) egymáshoz viszonyított elmozdulása során fellépő nyíróerők által okoz sértést. A koponya-agy trauma során

fellépő szögsebesség változások legjobban a szürke-fehérállomány határán és az agytörzsben, míg a különböző sűrűségből, tömegből adódó mozgási energia különbségek a törzdúcokban érvényesülnek, így ezek a kialakuló DAI predilekciós helyei (a sérülés mechanizmusát a 1. ábra szemlélteti). Ezeken a területeken a fehérállományban futó kapillárisok diffúz (microvascularis) sérülései miatt mikroszkopikus méretű vérzések alakulhatnak ki, melyek egyben diagnosztikus értékkel is bírnak (ld. később).

1. ábra: A DAI kialakulásának mechanizmusa



Típusosan nagy sebességű járművek utasainak tompa fejsérülésekor alakul ki, de felmerül a kórkép szerepe küzdősportolók sorozatosan elszenvedett enyhe, repetitív traumáiban illetve igazságügyi orvostani jelentőséggel bírhat „shaken baby syndrome”-ban [41].

#### 1.1.3.1.4 A diffúz axonkárosodás kórétana

A XX. század közepén a DAI-t a klasszikus nézet szerint, egy, a trauma pillanatában bekövetkező, mechanikus hatásra létrejövő axonszakadásnak tartották. A névadó Adams szerint a baleset során fellépő erőhatásokra az axon elszakad, proximális szegmentuma visszahúzódik, ennek hatására mechanikai okkal magyarázhatóan egy axoplazma-labdácska („axonal retraction ball”) képződik, míg a distalis szakasz Waller-féle degenerációt szenved[42, 43].

Klasszikusan patológiailag ezen „retractió ballon” kimutatása jelentette a DAI biztos diagnózisát szövettani vizsgálatok során. Povlishock és munkatársai az 1980-as években macska motoros idegrendszerén végzett kísérleteken keresztül bebizonyították, hogy ún. anterográd tracerek röviddel a koponyatrauma után az axonokban fokális felhalmozódást mutatnak, a folyamat végeredményeként pedig 3 és 12 óra közti posttraumás idő elteltével ezeken a helyeken az axonok elszakadnak, így bizonyítva, hogy a trauma hatására elpusztuló axonok döntően nem a trauma pillanatában szakadnak el, hanem egy hosszabb folyamat eredményeképpen. E felfedezés azért óriási jelentőségű, mert terápiás lehetőségeket vet fel[44-46].

Humán szövetmintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok szerint emberben is hasonló folyamatok zajlanak. Ennek hatására egyes kutatók bevezették a késleltetett axonszakadás „delayed axotomy” fogalmát, a trauma pillanatában kialakuló axonszakadástól való elkülönítés céljából. A jelenleg legszélesebb körben elfogadott pathomechanizmus négy lépése a következő:

A trauma során az axont nyíróerők érik, melyek axolemmális permeabilitási zavart eredményeznek. Ezen „mechanoporáció” hatására a membrán átteresztővé válik bizonyos anyagok, például a kalcium számára. Ezen permeabilitási zavar teszi lehetővé, hogy az extracelluláris és axolemmális terek közt fennálló kalcium-koncentráció gradiens kiegyenlítődjön, vagyis nagy mennyiségű kalcium áramoljon a citoplazmába.

A mechanoporáció következtében beáramló kalcium az axoplazmában aktiválja a calpain nevű proteolyticus enzimet, mely képes a spektrinnek, az axoplazmatikus citoskeleton egyik fő alkotórészének bontására. Szakirodalmi adatok szerint valószínűleg ez a diffúz axonális károsodás egyik fő lépése.

Szintén a mechanoporáció eredményének tudható be a mitochondriumok károsodása: a nagy mértékben megnövekedett intracitoplazmatikus kalcium akkumulálódik a károsodás környezetében lévő mitochondriumokban, ennek hatására a mitochondriális transzmembrán potenciál összeomlik, ami az úgynevezett mitochondriális tranzíciós permeabilitási pórus (mitochondrial permeability transition pore, MPT) kinyílásához vezet. Ezen keresztül víz áramlik a mitochondrium belsejébe, az megduzzad, végül szétreped, az idegsejt energiaellátásának zavarát, leállítását okozva. Ráadásul a szétesett mitochondriumokból cytochrom C szabadul fel, ami képes a caspase aktiválására, így apoptózis előidézésére.

A mikrotubulusok számbeli csökkenésének hátterében a beáramló kalcium hatására történő strukturális dezintegrálódás áll. Sejt (axon) szinten ezek a folyamatok a károsodás helyén, az axoplazmatikus transzport zavarát eredményezik, ami az axon progresszív duzzadásához, majd – mintegy 3-6 óra alatt – annak kettészakadásához vezet[47-53].

#### 1.1.3.1.5 A diffúz axonkárosodás Adams szerinti osztályozása

A DAI lokalizációja szerinti első osztályozását Adams hajtotta végre 1989-ben szövettani vizsgálatok alapján, mely besorolás szoros összefüggésben van a kimenetellel is[54].

**Grade I:** Csak a szürke-fehérállomány átmenet érintett, léziók leggyakrabban a frontális lebeny parasagittális régióiban és a temporális lebeny periventrikuláris régióiban figyelhetők meg. Kevésbé gyakran a parietális és occipitális lebenyekben, a capsula interna és externában és a cerebellumban. A léziók gyakran észrevehetetlenek hagyományos képalkotó eljárásokkal.

**Grade II:** Lézió(k) figyelhető(k) meg a corpus callosumban a grade 1 léziókon felül. Ez nagyjából a betegek 20%-ában figyelhető meg, SWI-n (susceptibility weighted MRI- alább részletezésre kerül) leggyakrabban a corpus hátsó része, a splenium corporis callosi érintettsége látszik

**Grade III:** a grade I és grade II léziókon felül az agytörzsben is kialakulnak léziók, leggyakrabban a mesencephalon rostralis részén, a pedunculus cerebellarisok felső részén, a lemniscus medialis és a tractus corticospinalisban.

DAI-ban két patológiai komponens, a haemorrhagiás (microvascularis) és ödémás léziók, gócok fordulnak elő, melyek fokális lézióként MRI képalkotással megfigyelhetők lehetnek (ld. később; FLAIR, SWI). Haemorrhagiás elváltozások alatt az axonok közt lefutó kapillárisok trauma hatására bekövetkező szakadásából származó „mikrovérzések”, ödémás („nem vérzéses”) léziók alatt pedig az axonsérüléssel együtt kialakuló kis méretű fokális ödémák értendők. A tényleges axonkárosodás az axonok duzzadása, dezintegrációja, - végső soron vízterei megváltozása révén válhat kimutathatóvá (ld. DTI). A késői szakban főleg a generalizált atrophia utalhat a károsodásra[42, 54, 55].

#### 1.1.3.1.6 A diffúz axonkárosodás kezelése, későbbi következményei

A koponya-agy trauma során bekövetkező elsődleges sérülés legjobb és egyetlen kezelési módja a megelőzés.

A DAI kezelése során sebészi kezelés nem jön szóba és sajnos jelenleg nem áll rendelkezésünkre megfelelő gyógyszeres terápia a DAI során végbemenő patofiziológiai-patobiokémiai folyamatok megállítására. Ahogy egyre bővül a tudásunk a DAI során végbemenő folyamatokról, úgy válik egyre világosabbá, hogy a DAI másodlagos károsodásának megakadályozása érdekében a korai poszt-traumás biokémiai folyamatok befolyásolását, megállítását lehetővé tevő hatóanyagok fogják a legpotensebb terápiás eszközt jelenteni a DAI kezelésében.

Jelenleg gyógyszeres kezelés egyedül a DAI későbbi neuropszichológiai hatásainak (depresszió, szorongás, agitáció, impulzív viselkedés stb.) kezelésében áll rendelkezésünkre, mivel azonban a DAI a klasszikus neuropszichológiai kórképekhez képest természeténél fogva lényegesen kiszámíthatatlanabb lefolyású, hosszútávú gyógyszerelése az ilyen betegeknek különös körültekintést igényel[5, 13, 14, 27, 28, 56-58].

Mára az is világos, hogy a rehabilitáció időben megkezdve a leghatásosabb, ezen okból is fontos a TBI mértékének korai, pontos diagnózisa[59].



#### 1.1.3.1.7 A diffúz axonkárosodás prognózisa

A DAI –t egyre szélesebb körben spektrum-betegségként értelmezik, beleértve a fehérállomány reverzibilis és irreverzibilis eltéréseit is. Tünetmentességtől vagy egészen enyhe tünetektől kezdve, későbbi neuropszichológiai eltéréseken keresztül, súlyos, vegetatív állapotért is felelős lehet.

A súlyos DAI-t szenvedett betegek 90%-a perzisztens vegetatív állapotba kerül, ami akár évtizedekig is eltarthat. Ha a vegetatív állapotból fel is épülnek, az ilyen betegeknél -igen ritka kivétellel- végleges és súlyos kognitív, motoros és neuropszichológiai deficit marad vissza. A legtöbb esetben –ha elérhető- javulás komplex rehabilitáció, terápia hatására az a traumától számított 12-24. hónapban várható[60, 61].

Általánosságban elmondható, hogy a GCS 8 vagy az alatti értékkel járó DAI prognózisa a legrosszabb, ezzel egyenlő vagy rosszabb érték a későbbi súlyos neurológiai-neuropszichológiai deficitek szinte biztos kialakulását prognosztizálja[62].

Simon Fleminger 2010-ben írt tanulmánya szerint megbízható prognosztikai faktor lehet a poszttraumás amnézia (PTA) DAI-ban: az egy hetet nem meghaladó PTA meglehetősen jó prognosztikus jel[63]. Az egy hónapot elérő vagy meghaladó PTA azonban szignifikánsan rosszabb prognózissal jár, a sérült nagy valószínűséggel soha nem lesz képes újra munkába állni. Lényeges prognosztikai faktor az életkor is, a legjobb prognosztikai jel a 20 év vagy az alatti életkor, az ennél magasabb mind negatívabb prognosztikai jelként szerepel a szakirodalomban[64-66].

#### 1.1.3.2 A DAI diagnosztikai nehézségei, Klinikai képalkotó vizsgálatok helye a DAI diagnosztikájában.

A DAI diagnosztizálása mikroszkopikus volta miatt nehéz, napjainkban is legtöbbször csak kizárásos diagnózis. Jelenleg nincs a kezünkben a DAI-ra specifikus biomarker, sem súlyosságának felmérésére egy, a korábbiakban ismertettekhez hasonló rendszer vagy algoritmus, valamint a konvencionális képalkotó eljárások számára is „láthatatlan”.

A rohamosan fejlődő képalkotó diagnosztikának hála egyre újabb MRI modalitások kapcsán igazolják, megbízhatóan alkalmazhatóak DAI kimutatására. Ilyenek például az úgynevezett

diffúzió súlyozott -diffusion weighted imaging (DWI)-, diffúziós tenzor- diffusion tensor imaging (DTI), a FLAIR –fluid attenuated inversion recovery és a szuszceptibilitás súlyozott -susceptibility weighted imaging (SWI) szekvenciák. Az MRI előnye, hogy a Röntgen és CT vizsgálatokkal szemben nem alkalmaz ionizáló sugárzást, káros biológiai hatása jelenleg nem ismert, így a kutatási célból elvégzett mérések elméletben bármikor megismételhetők[67-73].

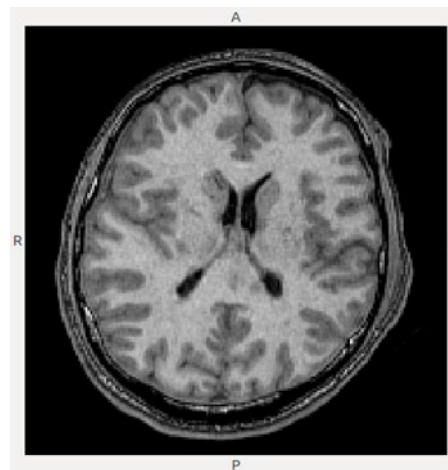
#### 1.1.3.2.1 Kutatásaink során alkalmazott, koponyatrauma diagnosztikában bevethető MRI módszerek általános jellemzői

Kutatásaink során a Pécsi Diagnosztikai Központ (PDK) Siemens Tim Trio és MAGNETOM PrismaFit 3T MR berendezésével készült nagy felbontású T1 és T2 súlyozott, szuszceptibilitás súlyozott MRI, fluid attenuation inversion recovery (FLAIR), és diffúziós tenzor MRI (diffusion tensor imaging-DTI MRI) modalitásokat alkalmaztuk.

##### 1.1.3.2.1.1 A T1 súlyozott felvételek

A T1 súlyozott felvételek jellemzői az akár milliméternél vékonyabb szeletvastagság, a nagy felbontóképesség és a jó szöveti kontraszt. Ezen tulajdonságai alkalmassá teszik az agy anatómiai szerkezetének pontos vizsgálatára, ahogy az a 2. ábrán is jól látszik. A DAI vizsgálata szempontjából hátránya azonban, hogy a DAI, vagy annak pathológiai komponenseinek megjelenítésére nem kifejezetten érzékeny. Más modalitásokkal kombinálva mégis nagyon hasznos diagnosztikus eszköz hiszen általa a léziók lényegesen pontosabban lokalizálhatók.

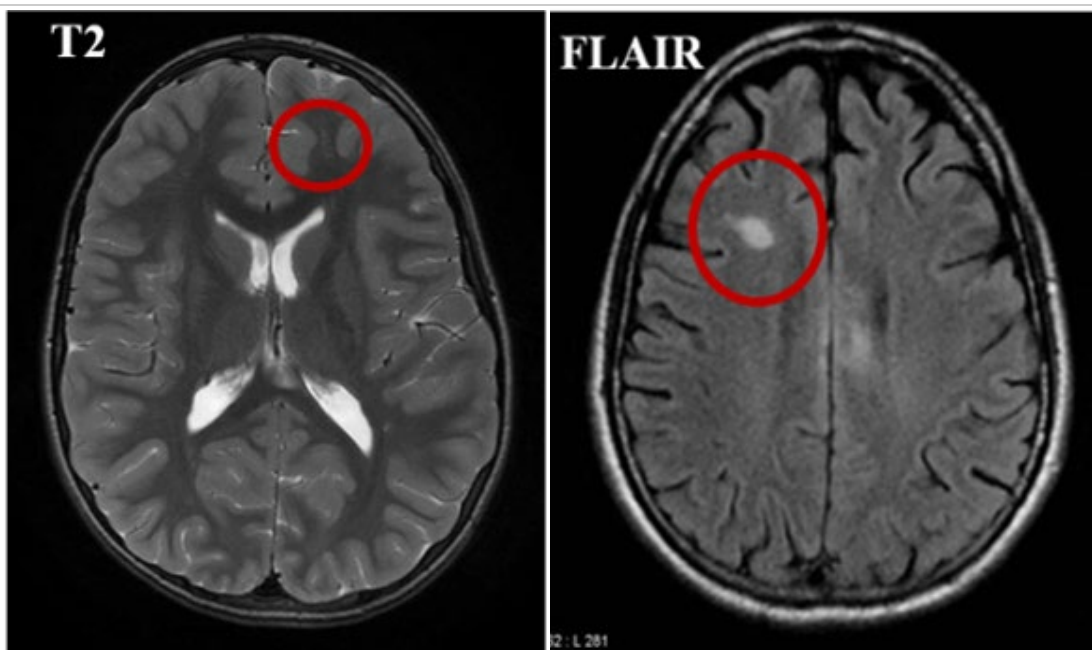
2. ábra: T1 súlyozott MPRAGE koponyafelvétel (PTE KK Orvosi Képkalkotó Klinika)



### 1.1.3.2.1.2 A T2 súlyozott, DWI és FLAIR modalitások

A bevezetőben említett kisméretű, az axonális károsodás helyén kialakuló és azzal összefüggésbe hozható „nem vérzéses léziók”, fokális ödémák kimutatására a rendelkezésünkre álló legérzékenyebb MR képalkotó eljárások a T2 súlyozott, DWI és FLAIR szekvenciák, melyek a fokális ödémákat szabálytalan, a környezetüktől jól elkülöníthető „fehér” léziók, hiperintenzitások formájában jelenítik meg, melyekre reprezentatív példákat a 3. ábra tartalmaz. A felsorolt eljárások képesek a DAI következtében, vagy azzal párhuzamosan kialakuló fokális eltérések megjelenítésére, de nem reprezentálják megbízhatóan a DAI-t.

3. ábra: DAI kapcsolt fokális ödémák (hiperintenzitások) T2 súlyozott és FLAIR felvételeken (Pécsi Diagnosztikai Központ)



#### 1.1.3.2.1.3 A szuszceptibilitás súlyozott MR képalkotás (susceptibility weighted MRI- SWI MRI)

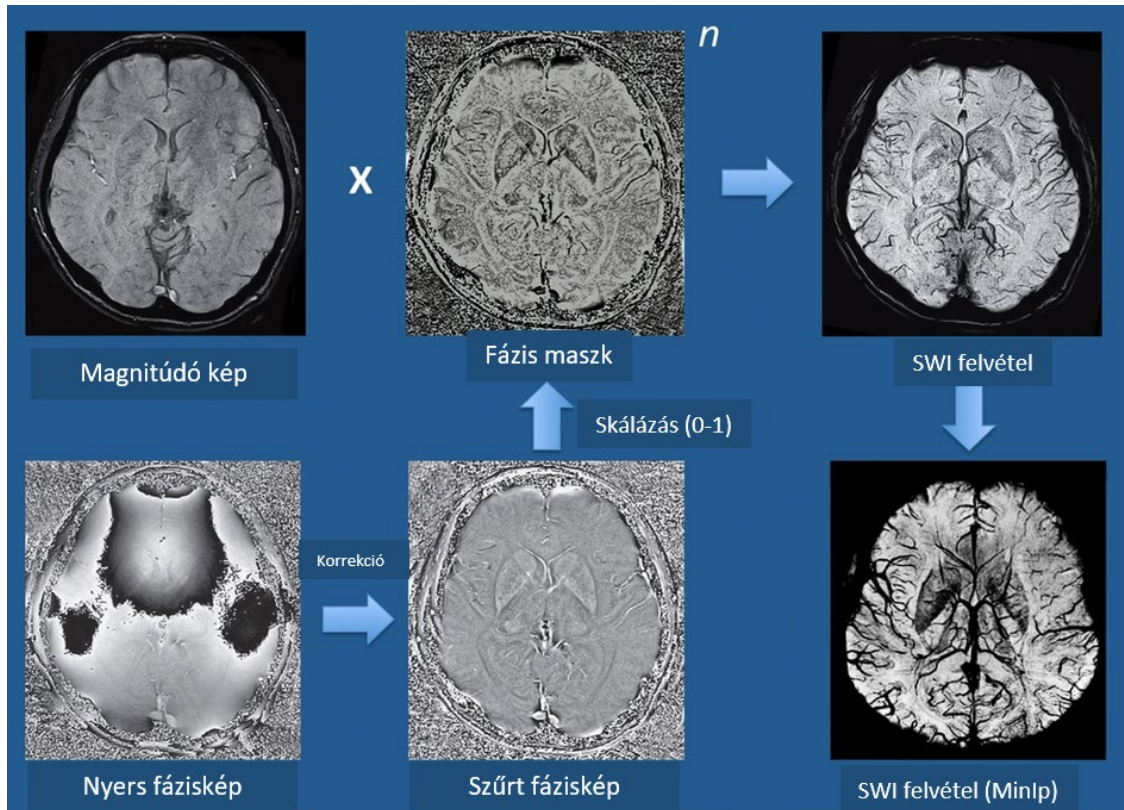
A vizsgálataink gerincét adó szuszceptibilitás súlyozott MR képalkotás lehetővé teszi különböző anyagok mágneses tulajdonságaik alapján való megkülönböztetését, paramágneses anyagok MRI-n való láthatóvá tételét. A szuszceptibilitás jelen kontextusban az inhomogenitás szinonimája.

Az SWI egy úgynevezett gradiens echó (gradient recall echo- GR) 3D szekvencia, melyben az inhomogenitás nem kerül korrigálásra a képalkotás során. A 3D arra utal, hogy a mérés során nem egy szelet, hanem egy teljes térfogat kerül gerjesztésre (ilyenkor két fáziskódoló irányt alkalmazunk). A K-tér transzformációja során keletkező úgynevezett magnitúdó (voxel jelintenzitásokat mutató) és fáziskép (mely a fázis adatokat tartalmazza) egyaránt felhasználásra kerül.

A „nyers fázis felvételek” -en (raw phase image) dominánsan nagy, önmagukon belül intenzitás tekintetében lassan változó, „makró” szuszceptibilitás gradienseket tartalmazó területek láthatók, amit legtöbbször a koponya üregeinek levegőtartalma okoz. Magas frekvenciát áteresztő szűrő (high-pass filter) segítségével ezek a nagy tereket érintő fázisváltozások eltávolíthatók és a diagnosztikus célokra is felhasználható „szűrt fázis kép” (filtered phase image) – nyerhető melyen már csak a kis térfogategységen belül megnyilvánuló fáziseltérések vannak jelen.

Az úgynevezett fázis maszk (phase mask) készül el a következő lépésben, amin a szűrt fáziskép kerül binarizációra, azaz valamennyi voxel vagy 0, vagy 1 értéket kap, jellemzően olyan módon, hogy a bizonyos mértéket meghaladó fázis-eltolódások kapjanak „0” értéket. Ezután a magnitúdó kép digitálisan összeszorzásra kerül a fázis maszkkal, mely maga a SWI kép. A „szuszceptibilitás súlyozás” e szorzás eredményeként jön létre, hiszen az inhomogenitásokra két lehetséges megközelítésből is súlyozunk: a magnitúdó képen a T2\* hatás révén kapunk jelcsökkenést, a fázis maszk képen pedig a fáziseltolódás révén nyilvánul meg az inhomogenitás, szintén jelcsökkenéssé alakítva[74-78]. Az SWI felvételek előállítását reprezentatív felvételek segítségével a 4. ábra foglalja össze.

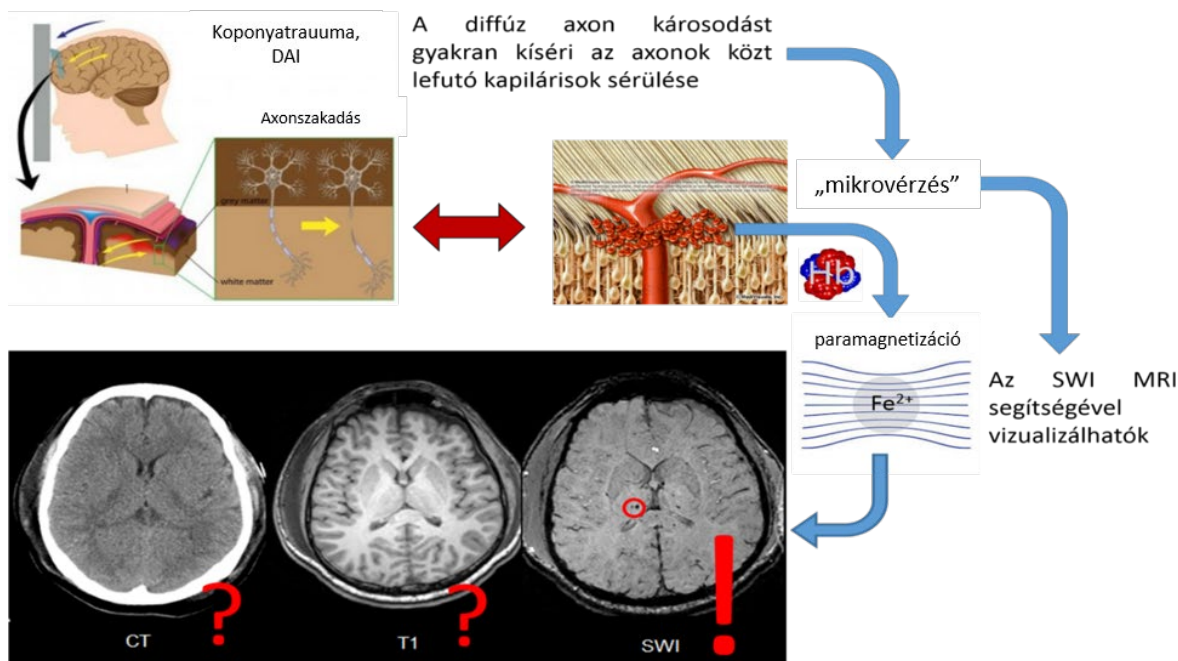
4. ábra: Az SWI felvételek előállítása. (Allen D. Elster, MRIquestions.com jóvoltából)



Az SWI így a lehető legérzékenyebben jeleníti meg a szövetek közt megjelenő paramágneses anyagokat (mint például a DAI microvascularis komponensét, a fehérállományi mikrovérvzéseket) viszont szöveti kontrasztja gyenge lesz.

A kutatásaink tárgyát képező DAI klinikai képalkotó diagnosztika szempontjából legnagyobb gyakorlati jelentőséggel bírónak tartott jele, az axonok közt lefutó kapillárisokból származó traumás eredetű mikroszkopikus vérzés (traumatic microbleed –TMB)[74, 79-89]. A TMB-k SWI képalkotásának fizikai alapjait az 5. ábra foglalja össze.

5. ábra: Az SWI és a mikrovérzések megjelenítése elméleti hátterének összefoglalása.



Jelenleg az SWI MRI a rendelkezésünkre álló egyik legérzékenyebb módszer a mikrovérzések detektálására, melyek akár évekkel később is megtalálhatók a feltételezett axonsérülés helyén, így nem csak az akut fázisban, hanem akár évekkel később is jelei lehetnek az axonkárosodásnak. Ezek a TMB okozta hypointenzitások a szakirodalomban található definíció szerint legtöbbször 2-10 mm átmérőjű, lekerekített, ovoid, vagy görbe vonalú, hypointenzitásként jelennek meg.

#### 1.1.3.2.1.4 A diffúziós tenzor képalkotás –diffusion tensor imaging (DTI MRI)

Azon hiányosságát a fenti modalitásoknak, miszerint a DAI direkt vizsgálatára nem alkalmasak, együttes alkalmazásuk során a az úgynevezett diffúziós tenzor képalkotás (diffusion tensor imaging- DTI) egészíti ki, mely alkalmas az axonok integritásának diffúziós paramétereken keresztüli közvetlenebb mérésére.

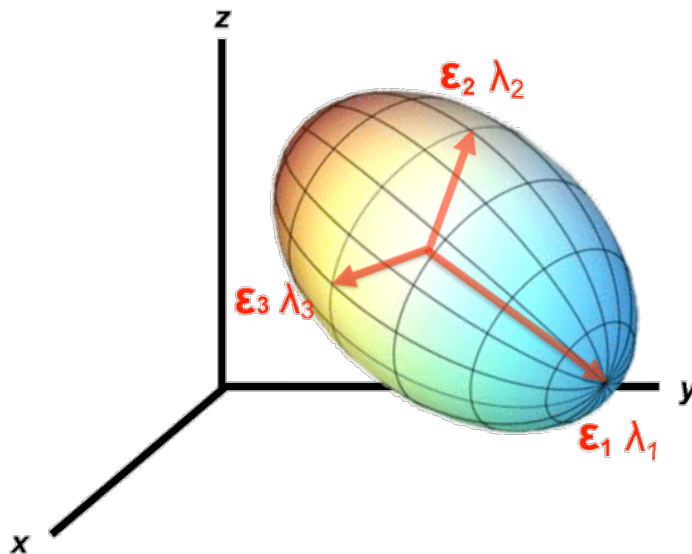
A DTI MRI az emberi szervezet szövettanilag „rendezett” szerveinek, struktúráinak (pl. fehérállomány, vese, szívizom) vizsgálatára alkalmas, érzékeny modern képalkotó modalitás. A szöveti rendezettséget leíró származtatott, a kutatási gyakorlatban is alkalmazott, vizsgált

paraméterek, melyekkel a diffúzió nagysága, iránya egy háromdimenziós ellipszoidon megadható- a következők:

Sajátértékek:  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_3$ ,

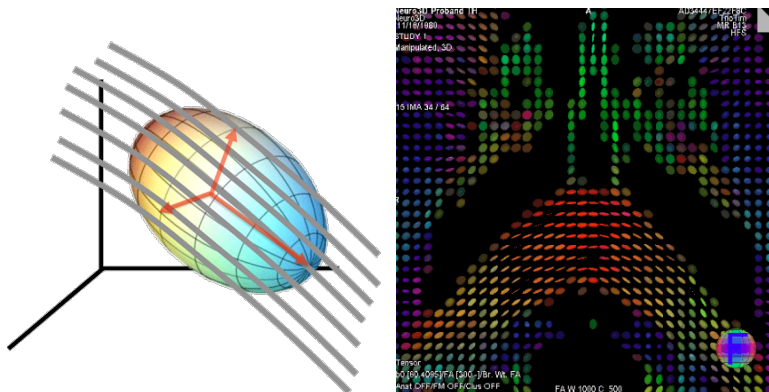
Sajátvektorok:  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$  ( $\lambda_1$  a leghosszabbnak mért, „hosszanti” diffúzió vektor –„tengely”,  $\lambda_2, \lambda_3$ - egymásra és  $\lambda_1$ -re merőleges horizontális vektorok. ). Lásd 6. ábra.

6. Ábra: A diffúzió adott térfogategységben és azt azt meghatározó sajátértékek és



A diffúzió leírható a 3D térben saját értékekkel és iránnyal rendelkező vektorok segítségével. Az egyes térfogategységekhez tartozó diffúziós vektorok „összefűzésével” előállítható az úgynevezett diffúziós tenzor, mely így a fehérállományi pályák lefutásának vizsgálatát is lehetővé teszi a 7. ábrán látható módon.

7. ábra: Adott térfogategységben a diffúzió irányultsága (FA) és ezen legjellemzőbb diffúziós irányok adott méretű térfogategységekben való megjelenítése. Az ábra alapján érthető, hogy a voxelekben mérhető „diffúzió irányultságok” összefűzése révén rekonstruálhatók az egyes agypályák.



A később részletezésre kerülő postprocessing és matematikai, statisztikai módszerek segítségével az egyes funkcionális anatómiai szempontból egységes agyi fehérállományi axonkötegek a központi idegrendszerben (KIR) –tractusok- integritása, mikrostrukturális állapota származtatott diffúziós paraméterek segítségével leírhatók.

Ezen diffúziós paraméterek a következők:

- FA- frakcionális anizotrópia: térfogategységen belül, a diffúzió anizotrópiájának mérőszáma
- MD- a térfogategység átlag (mean diffusivity) diffúziós sebessége.
- AD- (axial diffusivity)  $\lambda_1$ -el egyezik meg
- RD- (radial diffusivity)  $\lambda_2, \lambda_3$  vektoriális átlaga

A fenti paraméterek segítségével kvantitatívan leírható az adott fehérállományi térfogategységre jellemző diffúzió. Az egyes diffúziós paraméterek úgynevezett „diffúziós térképeken” rögzíthetők ezek képi értékelése önmagukban azonban a klinikai rutinban, a radiológus számára szinte lehetetlen.

A diffúziós paraméterek változásainak iránya többé-kevésbé ismert különböző kórképekben:

- Amiotrófiás lateralsclerosisban (ALS),
- Sclerosis multiplexben (SM),
- Parkinson kórban,
- Alzheimer kórban,



- Különböző epilepsziák esetén,
- Ischémiás stroke-ban,
- Koponya-agysérülésben
- Diffúz axonális sérülésben
- Gerincvelő sérülésekben,
- Depresszióban[12, 90-119]

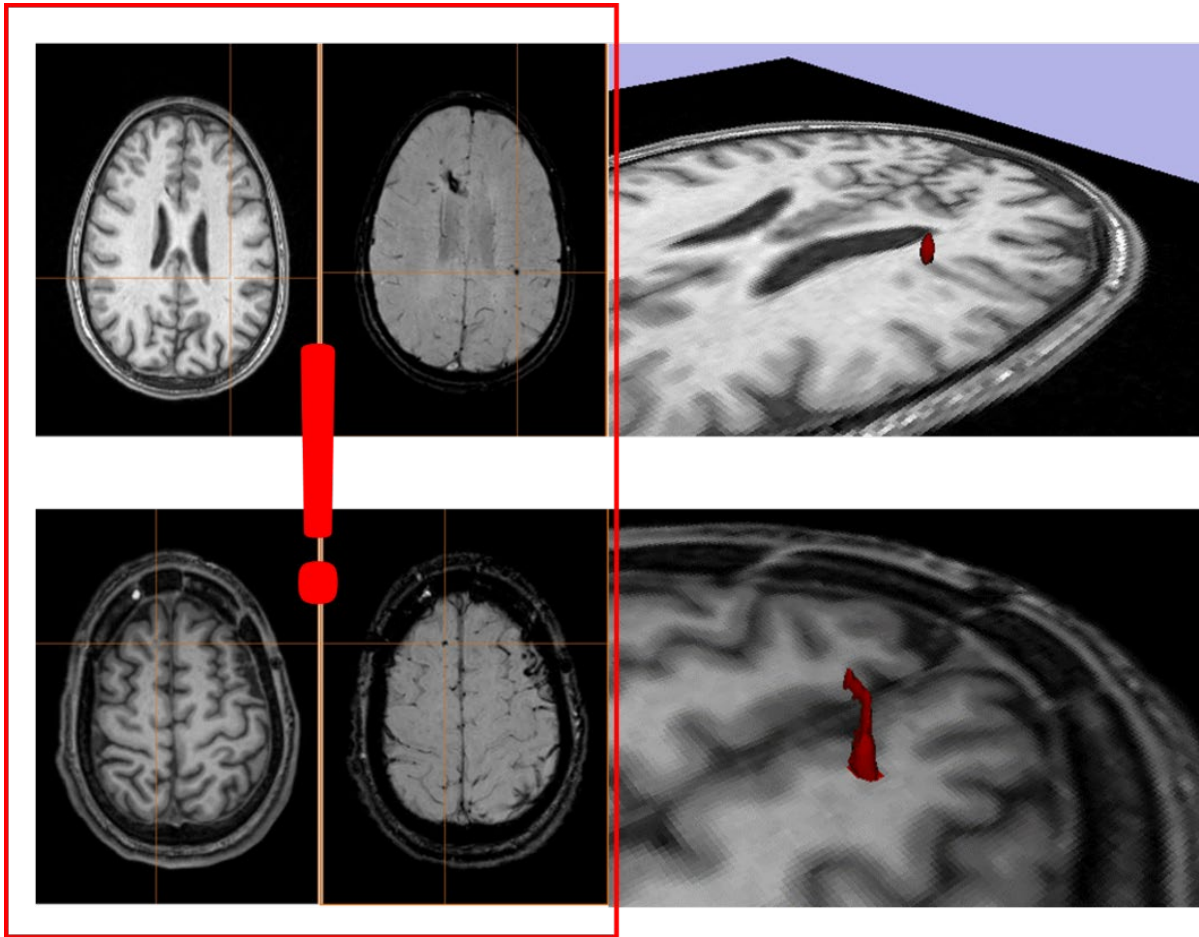
## 1.2 Kutatócsoportunk korábbi eredményei

### 1.2.1 Az SWI-vel detektálható, DAI kapcsolt mikrovérzések morfológiai definiálásának nehézségei, a lineáris koregisztráció jelentősége kutatási (és klinikai) vizsgálatok során

Kutatásaink elején a léziók kategorizálása során a szakirodalmi definícióknak nem tökéletesen megfeleltethető morfológiájú hypointenzitásokat találtunk. Vizsgálataink során közép súlyos és súlyos koponyatraumát szenvedett betegek SWI felvételein vizsgáltuk a DAI kapcsolt mikrovérzéseket. Ennek legprecízebb végrehajtása érdekében az SWI és T1 felvételek úgynevezett lineáris koregisztrációját hajtottuk végre (FSL FMRIB), ami a különböző jelmenetű felvételek egymással fedésbe hozásával az általuk prezentált információ összeadása révén a léziók pontosabb vizsgálatát teszi lehetővé. Ezt a módszert a későbbiekben a különböző képalkotó technikák tulajdonságainak ötvözése érdekében csaknem minden kutatásunkban alkalmaztuk.

Az így pontosan definiálhatóvá és morfológiájukat tekintve precízen vizsgálhatóvá tett hypointenzitásokat három dimenzióban rekonstruáltuk (3D Slicer). A 3D ábrázolás segítségével betegeink 32%-ában atípusos megjelenésű hypointenzitásokat fedeztünk fel, melyek morfológiájukat tekintve bevérzett Virchow-Robin tereknek voltak megfeleltethetők. Az egyes lézió típusokra reprezentatív példákat a 8. ábra tartalmaz. Klinikai jelentőségük minden bizonnyal eltér a „klasszikus”, axonális sérülésből fakadó fehérállományi léziókéétől DAI esetében. Megállapítottuk, hogy az SWI korrekt értékelése érdekében elengedhetetlen annak coronalis, sagittalis és axialis síkú értékelése, az SWI és T1 súlyozott felvételek együttes értékelése.

8. ábra: A felfedezett atípusos lézióforma 3D rekonstrukciója és megtévesztő megjelenése axiális felvételeken. (PTE KK Orvosi Képzőképző Klinikája)



### 1.2.2 A léziószám és elhelyezkedés összefüggései a fehérállományban mérhető diffúziós paraméterekkel[120, 121]

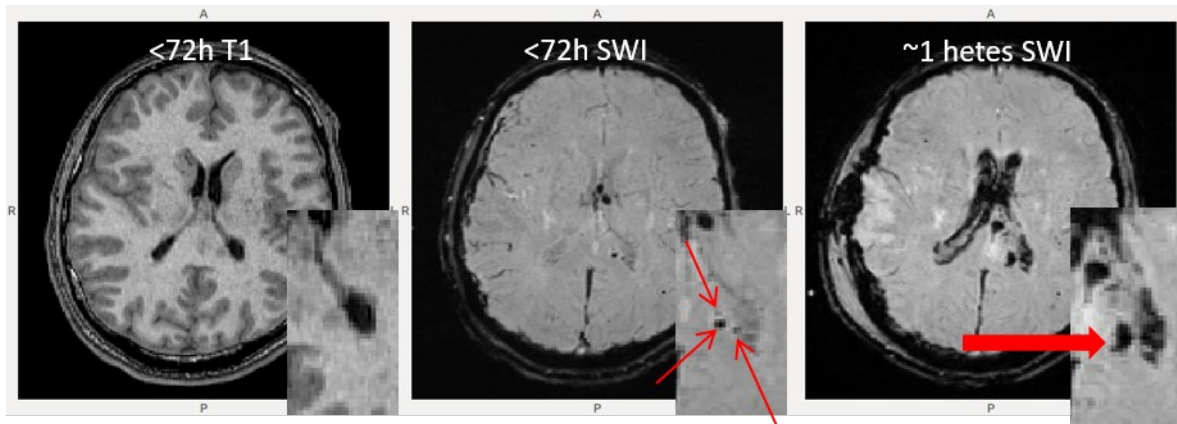
A különböző jelmenetű felvételek (T1, T2, FLAIR, SWI) precíz vizsgálata érdekében, azok fent említett koregisztrációját hajtottuk végre, majd alanyainkat „vérzéses”, „nem-vérzéses” léziós és MR negatív csoportokba soroltuk. Valamennyi csoportban, beleértve a kontrollcsoportot, meghatároztuk az átlagos diffúziós (DTI) paramétereket (FA, MD) az agytörzsben, a corpus callosumban és a corona radiatában, majd Spearman korreláció segítségével vizsgáltuk a léziószám és a diffúziós paraméterek közti összefüggést.

Ezen vizsgálatunk során bizonyítottuk, hogy az SWI-n látható mikrovérzések és a hagyományos (T1, T2, FLAIR) felvételeken látható nem-vérzéses traumás léziók jelenléte súlyosabb fokú axonális károsodással társul akár épnek tűnő fehérállományi területeken is, valamint, hogy az axonális károsodás fokának legérzékenyebb becslése valamennyi modalitás együttes értékelése alapján lehetséges. Megállapítottuk továbbá, hogy mind a „vérzéses” és a „nem-vérzéses” léziókhöz tartozó corona radiata DTI értékei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) eltértek az MRI negatív TBI és egészséges kontrollcsoportokétól, miközben a legjobb korrelációt a corona radiata DTI paraméterekkel a vérzéses és nem vérzéses léziószám összege, és a törzsdúci SWI léziók kialakulása, száma adta. Eredményeink felhívják a figyelmet a léziók lokalizációjának diagnosztikai szerepére, valamint azzal a reménnyel kecsegtetnek, hogy a DTI hordozta információ az egyén szinten is jól alkalmazható SWI-vel legalábbis részben, helyettesíthető.

### 1.2.3 A traumás eredetű fehérállományi mikrovérzések SWI-n látható időbeli változásai[122]

Egy harmadik vizsgálatunkban 6 alany akut követését (első mérés 72 órán, második 1 héten belül) és másik 9 alany hosszú távú követését (első mérés egy héten belül, második, ill. többedik mérés hónapokkal, évekkel később) hajtottuk végre, minden alkalommal nagy felbontású T1 súlyozott és SWI felvételek készültek. Megfigyeltük, hogy az akut-szubakut periódusban a 72 órán belüli méréshez képest az egyhetes követésen a csoportosan elhelyezkedő léziók „összeolvadtak” - ösztérfogatuk emelkedett, a hosszútávú követés során pedig megfigyeltük, hogy a léziók minden alanyban a többéves követéskor is fellelhetőek voltak. Ezen intenzitás dinamikát a 9. ábra mutatja be.

9. ábra: Az SWI léziók –mikrovérzések- változásainak megfigyelt dinamikája. (PTE KK Orvosi Képző Klinikája)



A léziók időbeli dinamikájának feltárása felhívja a figyelmet arra, hogy a mikroszkopikus vérzések megjelenése nem feltétlenül állandó, az akut időszakban progressziót mutathat, ami alapján a SWI megítéléséhez fontos figyelembe venni a trauma óta eltelt időt. A progresszió jelenléte, mértéke összefügghet a beteg állapotával, prognózisával, de fakadhat a vér biofizikai tulajdonságainak megváltozásából is, klinikumtól függetlenül.

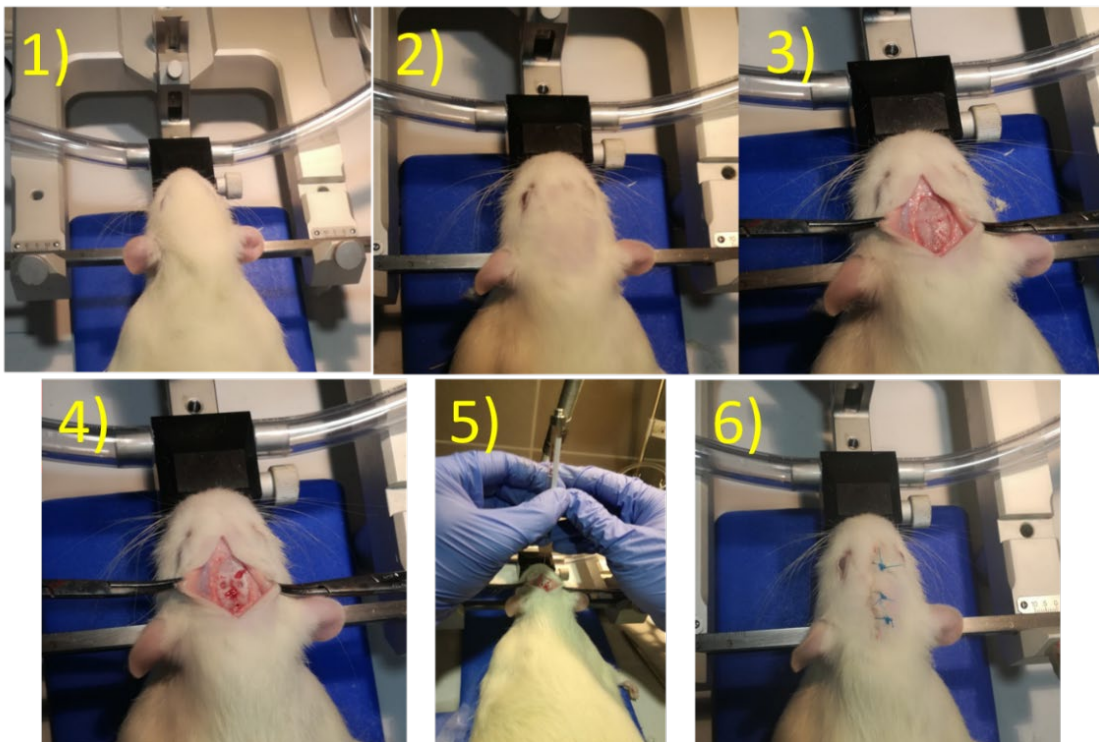
#### 1.2.4 Fehérállományi mikrovérzések intenzitás dinamikájának vizsgálata SWI MRI-n *in vivo* patkány modellben[123]

Korábbi megfigyelésünkre alapozva miszerint a TMBk morfológiája időbeli változást mutat SWI-n, célzott követéses kisállat és *in vitro* vizsgálatot terveztünk a fehérállományi mikrovérzések megjelenésének időbeli változásai feltárására.

Ahogy a 10 ábrán látható, Isofluran altatásban a koponyán bilaterálisan ejtett parasagittális furatokon keresztül 159  $\mu\text{m}$  és 474  $\mu\text{m}$  átmérőjű tűkkel 4 mm mély vertikális szúrásokat ejtettünk 19 hím Sprague Dawley patkány agyán. A kialakult mikrovérzéseket 4,7 T Bruker Biospec kisállat MRI-vel készült 3D FcFLASH SWI szekvenciával akután, 24 és 96 órával a sértést követően vizsgáltuk. A léziók térfogatát az egyes időpontokban coronalis síkú minimal intensity projection-minIP (ParaVision Acquisition 6.0.1) felvételeken határoztuk meg (ImageJ 1.51k), a vérzések

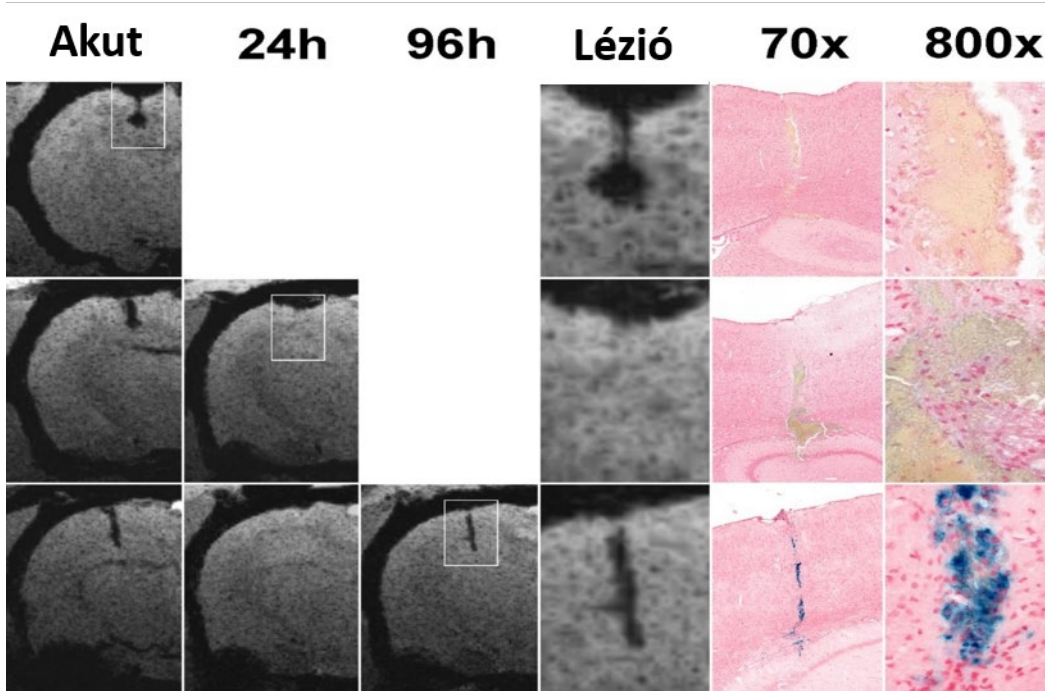
jelenlétét szövettanilag igazoltuk. A térfogatváltozás statisztikai megállapítása a különböző időpontokban mért léziótérfogatok összehasonlításán keresztül, Bonferroni korrekcióval kiegészített ismételt mérés ANOVA segítségével történt (Medcalc ver. 13.0.0.0).

10. ábra: A mikrovérzések létrehozását célzó műtét.

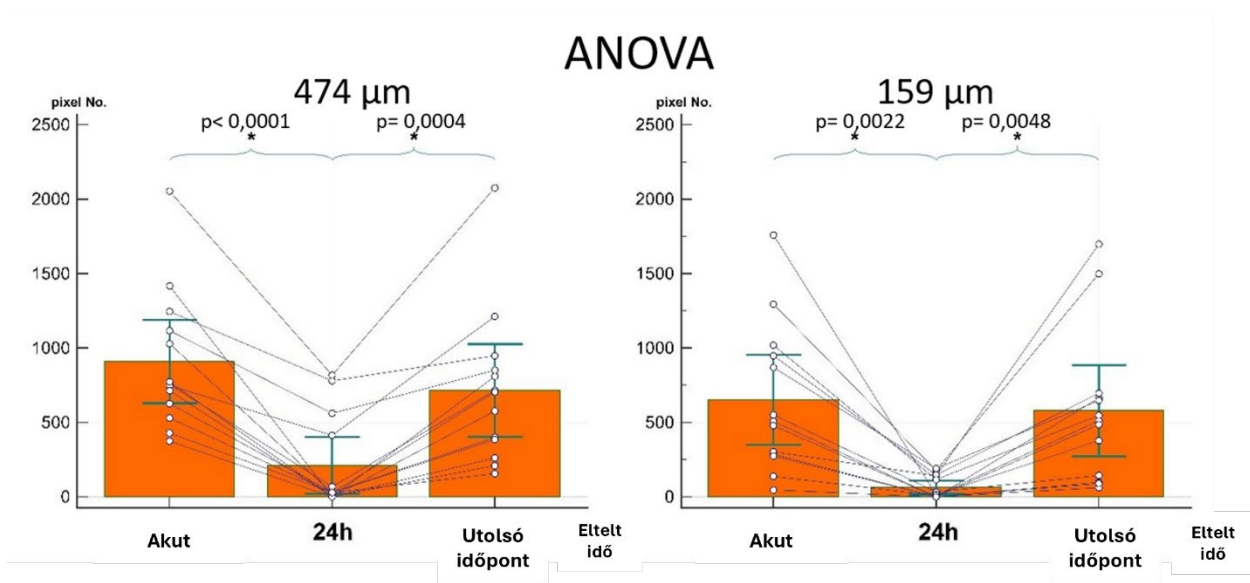


A mikrovérzések térfogatai mindkét oldali sértés esetén szignifikánsan kisebbek voltak a sértést követő 24 órás képeken, mint a megelőző akut ( $p < 0,0001$  bal,  $p = 0,0022$  jobb), vagy azt követő 96 órás képeken ( $p = 0,0004$  bal,  $p = 0,0048$  jobb). Vizuálisan értékelve, a léziók 24 óra után az állatok 69%-ában teljesen láthatatlanná váltak, 96 óra után azonban e léziók is újra elkülöníthetők voltak, szövettani vizsgálattal mindegyik időpontban kimutathatók voltak a mikrovérzések (lásd 11. és 12. ábra).

11. ábra: A mikrovérzések intenzitás változásai és a mikrovérzés mindhárom időpontbeli jelenlétének szövettani igazolása (hematoxylin-eosin-berlini kék festés) három állat esetében



12. ábra: A mikrovérzéseknek megfelelő intenzitású pixelek számbeli változásai az egyes időpontokban (SWI alapú, szummált minIP).



A fentiek alapján elmondhatjuk, hogy ezen tanulmányunkban sikerült kifejlesztenünk egy, a fehérállományi mikrovérzések MRI vizsgálatát megbízhatóan lehetővé tevő kisállat modellt, és bizonyítékokkal szolgáltunk a mikrovérzések SWI-vel való detektálhatóságának csökkenésére vagy akár eltűnésére a szubakut időszakban. A mikrovérzések okozta SWI hypointenzitások (léziók) morfológiájának ezen felfedezett időbeli dinamikája, akár a humán képképző vizsgálat nem megfelelően választott időpontja miatt fals-negatív eredményre vezethet, aminek komoly klinikai következményei lehetnek.

### 1.2.5 DTI MRI segítségével feltárható csoport szintű diffúziós paraméter változások koponyatraumában –előzetes eredmények

Tanulmányunkban hatvanhárom, negatív neurológiai, pszichiátriai és neurotraumatológiai anamnézissel rendelkező akut koponya-agysérülést szenvedett, 7 krónikus kis ér beteg (CSVD) és 61 egészséges kontroll alany, DTI alapján rekonstruált 42 fehérállományi pályáinak diffúziós paraméterekben mérhető különbségeit vizsgáltuk. 35 TBI beteg 79 fehérállományi pályájában 100 traumás mikrovérzést (TMB) detektáltunk SWI-n, 7 CSVD beteg 39 fehérállományi pályájában 68 nem traumás eredetű mikrovérzést (nTMB) találtunk. TMB pozitív, nTMB pozitív, ezek épnek tűnő contralateralis párjai, valamint kontroll identikus tractusok és ellenoldali párjuk diffúziós paraméterei közti eltéréseket Bonferroni korrigált Friedman teszt segítségével vizsgáltuk.

Szignifikáns MD ( $p < 0,001$ ), AD ( $p = 0,025$ ), RD ( $p = 0,001$ ) emelkedéseket figyeltünk meg TMB pozitív tractusokban és ellenoldali identikus, épnek tűnő tractusokban kontrollpárjaikhoz képest, míg TMB pozitív és saját ellenoldali identikus pályáik között nem találtunk szignifikáns eltérést. Az nTMB pozitív pályák kontroll párjaikhoz képest nem tértek el, viszont a saját, ellenoldali tractusokhoz viszonyítva szignifikáns ( $p < 0,05$ ) MD és RD növekedést mértünk. Vizsgálatunk konklúziójaként elmondhatjuk, hogy koponyatraumában mind a TMB pozitív tractusok, mind ellenoldali, épnek tűnő párjuk szignifikáns DTI eltéréseket mutattak kontrollokhoz képest, amely kétoldali eltérés nTMB pozitív esetekben nem volt megfigyelhető. Eredményeink felhívják a figyelmet a különböző etiológiájú fehérállományi mikrovérzések differenciálásának lehetőségére, valamint, hogy koponyatraumában az épnek tűnő pályák is sérülést szenvedhetnek.



### 1.2.6 Tractus-szintű DTI elváltozások elemszám függésének vizsgálata –előzetes eredmények

Előtanulmányunkban meghatározni terveztük koponyatraumában azt a minimális beteg-kontroll alany számot mely minimum szükséges a statisztikailag megbízható eredmények eléréséhez, ami alapján következtetni tudunk az egyéni szintű kiértékelésekhez szükséges kontroll alany számra. Harmincnolc MAYO középsúlyos-súlyos akut-szubakut TBI-t szenvedett (átlag életkor 47 év (21-88 év) SD=15,8; 32 férfi, 6 nő), negatív neurológiai, pszichiátriai és megelőző neurotraumatológiai anamnézissel rendelkező beteg és 38 korra (+3 év) -nemre egyeztetett kontroll alany 27 fehérállományi tractusa került probabilsztikus modell szerinti rekonstrukcióra, átlagos FA, MD, AD, RD értékeik egyénenként, tractusonként rögzítésre. Normalitás tesztet követően (Shapiro-Wilk) a heteroszkedaszticitást is figyelembe véve (Levene teszt) megfelelő T-próba vagy Mann-Whitney teszt segítségével vizsgáltuk a két csoport közti tractus szintű különbségeket. Benjamini-hochberg FDR korrekciót alkalmaztunk a fals-pozitív eredmények csökkentésére. Az  $1-\beta \geq 0,95$  statisztikai erő eléréséhez minimum szükséges alanyok/ tractusok számának meghatározása post-hoc power analízissel (GPower v3.1) történt.

Az  $1-B \geq 0.95$  statisztikai erő eléréséhez 21 tractusra volt szükség (medián= 21; min=1, max=88, IQR=16,5-35) csoportonként

Ezen előtanulmányunk eredményei felhívták a figyelmet –TBI esetén- hogy felállítható egy racionális nagyságú, korra-nemre egyeztetett kontroll állomány, melyhez mérve elméletileg megoldható lehet a DTI egyéni, klinikai alkalmazása.

### 1.2.7 Tractus-szintű elváltozások és neuropszichológiai eredmények korrelációja –előzetes eredmények:

Előtanulmányban célunk volt olyan tractusok sérüléseinek kimutatása melyek korábbi, neuropszichológiai vizsgálatok (Faux Pas és Rey Auditory Verbal Learning Test (RAVLT)) által feltárt deficitekért (mentalizációs és munkamemória) felelős funkciókkal bírnak. Repetitív, enyhe koponyatraumát szenvedett negatív neurológiai és pszichiátriai anamnézissű, más MRI és konvencionális neuroradiológiai képalkotó modalitásokkal negatív leletű sportolóknak (futball játékosokban, n=5), mentalizációs és munkamemória deficit volt kimutatható korra és nemre

egyeztetett kontrollokhoz képest. 42 fehérállományi tractus került DTI alapján rekonstrukcióra, átlagos FA, MD, AD, RD értékeik egyénenként és csoportonként rögzítésre kerültek. Bonferroni korrigált Kruskal-Wallis teszt segítségével vizsgáltuk a csoportok közti átlagos DTI paraméter eltéréseket. Az fenti funkciókban szakirodalmi adatok alapján részt vevő fasciculus uncinatus és a radiatio thalami anterior enyhe sérülése (szignifikáns AD emelkedés) igazolódott csoport szinten (4. táblázat).

Eredményeink felhívják a figyelmet módszerünk robusztusságára és megbízhatóságára, valamint arra engednek következtetni, hogy a fasciculus uncinatus s a radiatio thalami anterior predilekciós helyei lehetnek repetitív koponyatrauma okozta DAI-nak.

4. táblázat: Tractus szintű elváltozások mTBI betegcsoportban. Az egyes cellákban az összehasonlítások p értékei láthatók. Szignifikáns AD emelkedés volt megfigyelhető a *fasciculus uncinatusban*, valamint a *radiatio thalami anteriorban*, tendenciózus eltérések (FA és AD) mutatkoztak a *fasciculus uncinatusban* és a *radiatio thalami posteriorban*

Tractus	FA		MD		AD		RD	
	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb
Fasciculus arcuatus	0,488	0,817	0,530	0,337	0,806	0,374	0,366	0,449
Radiatio thalami anterior	0,122	0,261	0,575	0,318	0,017	0,017	0,964	0,909
Cingulum, pars gyri cinguli	0,618	0,919	0,904	0,593	0,761	0,977	0,827	0,836
Cingulum, pars parayppocampalis	0,246	0,882	0,743	0,318	0,908	0,121	0,510	0,668
Tractus corticospinalis	0,548	0,886	0,668	0,380	254	0,428	0,674	0,817
Forceps major	0,7		0,562		0,606		0,615	
Forceps minor	0,131		0,270		0,286		0,161	
Fasciculus frontooccipitalis inferior	0,981	0,179	0,472	0,254	0,384	0,107	0,415	0,244
Fasciculus longitudinalis inferior	0,179	0,845	0,733	0,970	0,637	0,678	0,525	0,987
Pedunculus cerebellaris	0,240		0,615		0,426		0,602	
Lemniscus medialis	0,754	0,366	0,692	0,467	0,985	0,260	0,393	0,787
Radiatio thalami posterior	0,504	0,241	0,552	0,233	0,737	0,075	0,382	0,152
Fasciculus longitudinalis superior	0,914	0,472	0,680	0,365	0,856	0,624	0,731	0,336
Radiatio thalami superior	0,822	0,778	0,212	0,164	0,170	0,170	0,601	0,646
Fasciculus uncinatus	0,073	0,161	0,374	0,341	0,043	0,073	0,174	0,176

## 1.3 Problémafelvetés, célkitűzés

### 1.3.1 Problémafelvetések

Kutatócsoportunk fent részletezett, korábban publikált eredményei, valamint a szakirodalomban elérhető publikációk heterogén eredményei alapján elmondható, hogy a szinte endémiának számító TBI során bekövetkező DAI képi markerének tartott TMBk pontos klinikai jelentősége további pontosításra szorul:

- a. Detektálhatóságukat humán vizsgálatokban is nagyban befolyásolhatja az SWI elvégzésének koponyatraumától számított ideje.
- b. Lokálisan jelenleg nem bizonyított, hogy társulnának DAI-val.

A DTI egyéni felhasználása jelenleg nem megoldott, holott véleményünk szerint áttörést hozhatna pl. a DAI és sok egyéb más KIR elváltozás diagnosztikájában, prognózis becslésben, javítani lehetne a rehabilitáció tervezést, adekvát alkalmazását, a normális életbe, munkába, sportolók esetén szezonba, rendvédelmi, katonai szolgálatot teljesítők esetén pedig a szolgálatba való visszatérést gyorsíthatná, segíthetné elő.

Jelenleg a DTI egyéni szintű, klinikai rutin felhasználásának gátjai a következők:

- c. Bonyolult és időigényes DTI postprocessing[124-127]:
  - i. A DTI nagyon érzékeny a mozgásos, úgynevezett, szuszceptibilitás, „Eddy current”, off-resonance field okozta torzításokra, a tractus szintű elemzést nagyban nehezítik az egy voxelen keresztülmenő keresztező rostok (crossing fibers)-ek; ezek meghatározása bonyolult, nagy számítási kapacitást követel meg, időigényes. (Valójában a crossing és kissing rostok feloldására a DTI modell alkalmatlan, arra fejlettebb eljárásokat alkalmazunk, azonban ezek használata a klinikai környezetben még kevésbé lehetséges, mint a DTI esetén. A DTI nem tudja modellezni ezen konfigurációkat, a kutatásaink során alkalmazott algoritmus (FSL-BEDPOSTX) nem feloldja ezeket, hanem az ilyen voxeleket jellemző bizonytalansági értékeket propagálja, amelyeket a probabilisztikus

traktográfia felhasználásának pontos tárgyalásáért azonban túlmutat jelen dolgozat keretein.)

- d. Ezen problémák matematikai, számítástechnikai megoldása jelenleg csak kutatási környezetben, a legcsekélyebb mértékben sem felhasználóbarát módon elérhetők.
- e. A diffúziós paraméterek nagy szórást mutatnak egyéni szinten is és egy adott agyon, fehérállományon belül is, rendkívül nehéz a pontos, számszerű értékelés, mint pl. egy vércukorszint mérés esetén, a statisztikai kiértékelés rendkívül nehezített.
- f. A fehérállományi diffúziós paramétereket számos biológiai, klinikai, szociológiai faktor befolyásolja: pl. életkor, nem, traumás előzmények, neurológiai betegségek, alkohol-dohány fogyasztási szokások vagy akár exsiccatio.
- g. A diffúziós térképek, a DTI vizsgálat eredményei önmagukban nehezen értékelhetők, rutin diagnosztikában a radiológus számára jelenleg szinte értékelhetetlenek

### 1.3.2 Célkitűzések

A fentiek alapján, jelen dolgozatban célul tűztük ki:

Ad 1) Humán SWI-n vizsgálni az állatkísérletesen bizonyított TMB intenzitás emelkedést, „láthatatlanná válást”, a lézió eltűnés-megjelenés időbeli dinamikájának feltárását, az SWI elvégzése legoptimálisabb idejének meghatározását.

Ad 2) Annak vizsgálatát, hogy a TMB koloklaizált-e axonális károsodással, így lehet-e kialakulásuk helyének a diagnózis, prognózis szempontjából stratégiai jelentősége?

Ad 3) A DAI lokalizálása érdekében, korábbi tractus szintű eredményeinkre alapozva, kutatócsoportunk az NKFIH által meghirdetett Kooperatív Doktori Program keretében célul tűzte ki egy DTI alapú, egyéni, tractus szintű diagnosztikát lehetővé tévő neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztését melynek tervezett lépései az alábbiak voltak:

- 1) Pontos elemszám becslő kontroll csoport felállításának előkészítése

- 2) első lépésben a PDK Siemens MAGNETOM PrismaFit MRI berendezésen mérve, a különböző agyterületek lehető legpontosabb (lehető legkisebb, még racionális méretű), normális diffúziós paramétereinek leírása
- 3) Egyéni, tractus szintű összehasonlítások lehetővé tétele
- 4) Jól értelmezhető, egyén szinten értékelhető DTI eredmények létrehozása, interpretációja (eRAD, Medview rendszerekben)
- 5) Kiértékelés sebességének növelése, postprocessing kezelhetőségének javítása, a DTI kiértékelés „felhasználói élményének” javítása

Alcélok:

- a. Egy DTI kontrollcsoport meghatározása és felállítása nemre és korcsoportokra bontva.
- b. Automatizált módon lehetővé tervezzük tenni a nyers DTI adatokból egy tractusok szerint szegmentált kép létrehozását, melyben a tractusok átlag diffúziós paramétereinek meghatározásra kerülnek.
- c. Szintén automatizált módon tervezzük betegeket, tractusonkénti diffúziós paramétereinek összehasonlításának lehetővé tételét a kontrollcsoportunk előre beprogramozott értékeivel. Automatikusan kijelzésre kerüljön, ha szignifikáns különbség van a beteg és kontroll érték között. Szakirodalmi adatok alapján rögzítjük a DTI-vel legjobban vizsgálható neurológiai kórképekben jellemző diffúziós paraméter változás irányokat, az ezekkel való tractus szintű automatikus összehasonlítást.
- d. A könnyebb átláthatóság, leletezhetőség érdekében tervezzük megoldani, hogy a normál tartománytól eltérő átlag diffúziós paraméterekkel rendelkező pályák szinkódolva jelenjenek meg.

## 2 Módszerek

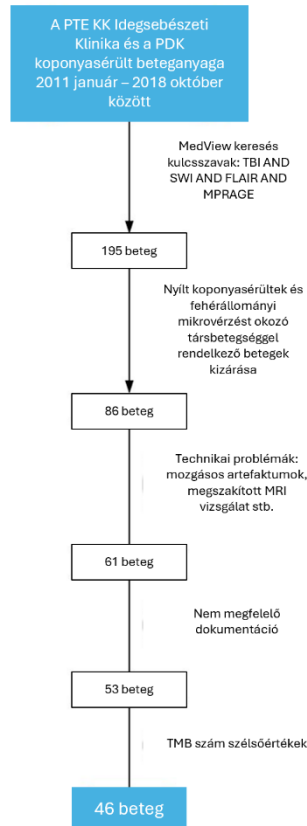
### 2.1 Módszerek I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban

#### 2.1.1 Alanyok

A Pécsi Diagnosztikai Központban 2011 január 01. és 2018 október 01. között SWI MRI-n átesett, korábbi, neurológiai, pszichiátriai és korábban neurotraumatológiai szempontból negatív anamnézisű, zárt koponyatraumát szenvedett 18-60 év közti 195 beteg került első lépésben bevonásra. Döntő kritérium volt a TBI pontos időbeli dokumentálása, ezen kívül a felvétel, a CT és az MRI mérés pontos időpontját is rögzítettük. Kizáró kritérium volt minden olyan társbetegség diagnózisa, amely képes mikrovérzést okozni (pl. zsírembólia, krónikus magas vérnyomás, agyi amiloid angiopátia, cavernosus malformációk, epilepszia, Alzheimer-kór, demencia, migrén, agydaganat vagy agyi metasztázis). Grubbs-tesztet végeztünk a kiugró TMB-számú betegek kizárására. A 13. ábra mutatja beválogatási algoritmusunkat, beválogatási és kizárási kritériumainkat.

A betegek végső számát 46 esetre szűkítettük, MAYO klasszifikáció szerint 6 tünetmentes, 8 enyhe és 32 súlyos TBI-t szenvedett 37 férfi- és 9 nőbeteg kerül végül beválogatásra. A vizsgálatokat a Helsinkai Nyilatkozat szabályainak megfelelően végeztük, és a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottság jóváhagyását kaptuk (4525. sz.). A vizsgálatban használt MRI-vizsgálatokhoz valamennyi résztvevőtől vagy törvényesen meghatalmazott képviselőjüktől írásbeli, adekvát tájékoztatást követően a vizsgálatokba beleegyezést kértünk.

### 13. Ábra: Beválogatási algoritmus



#### 2.1.2 Klinikai adatok és felvételi CT paraméterek

A TBI súlyosságát egyénileg határoztuk meg MAYO klasszifikáció szerint. A trauma időpontjában betöltött életkort, a nemet, a Rotterdam és Marshall CT-pontszámot (a felvételi CT-n értékelve), az MRI térerősséget (1,5 vagy 3 T) és minden, a szakirodalom szerint a TMB-k számát, detektálhatóságát befolyásolni képes paramétert, a FLAIR-léziók számát és a makroszkópos sérüléseket rögzítettük. Ezen túlmenően a felvételi CT-k (MedView™) segítségével rögzítettük a kontúziók hozzávetőleges térfogatát a Rashumi U. Kothari és munkatársai által kidolgozott alábbi képlet szerint (5-7. táblázat):

$$\text{Contusio térfogata} = \frac{\text{leghosszabb egymásra merőleges átmérők} \times \text{szeletek száma} \times \text{amin a contusio jelen van} \times \text{szeletvastagság}}{2}$$

5. táblázat: Alanyaink életkora, a TBI okai és tünetei. \*: Ismeretlen, részegség, epilepszia, sport stb. \*\*: Pl. homályos vagy kettős látás, zsidbadás, halláskárosodás stb. \*\*\*: Deorientáció, nyugtalanság, görcsrohamok, és PTSD fordult elő.

Esetszám		Csoportok					
		Σ	0-24h	24-48h	48-72h	72h<	
		46	11	14	11	10	
Az összes alany medián, az egyes csoportok átlag életkora		50 (IQR 27-67)	34.45 (SD=25,72)	52 (SD=25,45)	53.91 (SD=18,65)	42 (SD=24,59)	
Koponyatrauma oka	esés	21	2	9	5	5	
	közlekedési baleset	15	6	2	3	4	
	erőszak	3	1	0	2	0	
	egyéb*	7	2	3	1	1	
Tünetek	fizikális tünetek	hányás, hányinger	11	2	2	4	3
		amnézia	9	1	2	5	1
		fejfájás	7	2	0	3	2
		eszméletvesztés	6	1	1	3	1
		aluszékonyosság	2	1	0	0	1
		szédülés	2	1	0	1	0
	szensoros tünetek **		2	1	0	1	0
	anamnézis nem volt nyerhető		12	3	3	3	3
	egyéb ***		7	3	1	1	2
	aszimptomatikus		6	0	5	0	1

### 2.1.3 MRI képalkotás

SWI, T1-súlyozott MPRAGE és FLAIR felvételek kerültek kiértékelésre. Koponya MRI vizsgálatokat Siemens 1,5T (Avanto/AvantoFit) és 3T (Magnetom Trio/Prisma Fit) MR-szkennerekkel végeztük:

3D MP-RAGE (1.): TI=900 ms; TR= 1400 ms; TE= 3 ms; szeletvastagság=1,0 mm; látómező (field of view- FOV) = 192 mm\*256 mm; mátrixméret = 192\*256). A 3D és 2D FLAIR (1.) felvételek paramtéerei a következők voltak: TI= 1888,1-2713,4 ms; TR= 5000-8910 ms; szeletvastagság= 4,0 mm; FOV= 192-225 mm\*225-256 mm; mátrixméret= 187-384\*256-512, a 3D SWI felvételeké pedig: TR=46-49 ms; TE= 40 ms; szeletvastagság=2,0-3,0 mm; FOV= 158-201mm\*230 mm; mátrixméret= 137-177\*192-256. (3D) MP-RAGE (2.) szekvencia: (TI=900 vagy 1100 ms; TR= 1380 vagy 2530 ms; TE= 2,2 vagy 3,4 ms; szeletvastagság=1,0 vagy 1,1 mm; FOV= 211 vagy 256 mm \* 211 vagy 256 mm; mátrixméret = 192 vagy 256 \* 192 vagy 256 mm.



3D és 2D FLAIR (2.): TI= 1800-2500 ms; TR= 5000-9000 ms; szeletvastagság= 0,9-4,0 mm; FOV= 193-230 mm\*220 vagy 230 mm; mátrixméret= 192-512\*256 vagy 512, 3D SWI mérések: TR= 27 ms; TE= 20 ms; szeletvastagság= 1,5 mm; FOV= 158-199 mm\*220 vagy 230 mm; mátrixméret= 167-223\*256.

A trauma és a legközelebbi SWI-képpalkotás között eltelt időt órákban kifejezve, a trauma időpontját az Országos Mentőszolgálat vagy a PTE KK Sürgősségi Orvostani Tanszék által rögzített felvételi dokumentáció alapján, a vizsgálatok pontos időpontját pedig az MRI-vizsgálatok DICOM adatai alapján rögzítettük.

#### 2.1.4 Vérzéses és nem vérzéses MRI léziók értékelése

Az anonimizált CT- és MRI vizsgálatok leletezését, értékelését kutatócsoportunk neuroradiológiában, neuroradiológiai kutatásokban több éves tapasztalattal rendelkező tagjai a klinikai és a felvételek időpontjára vonatkozó adatokra vakon végezték. A végleges léziószámokat a léziók morfológiájára vonatkozó konszenzus szerint írták le.

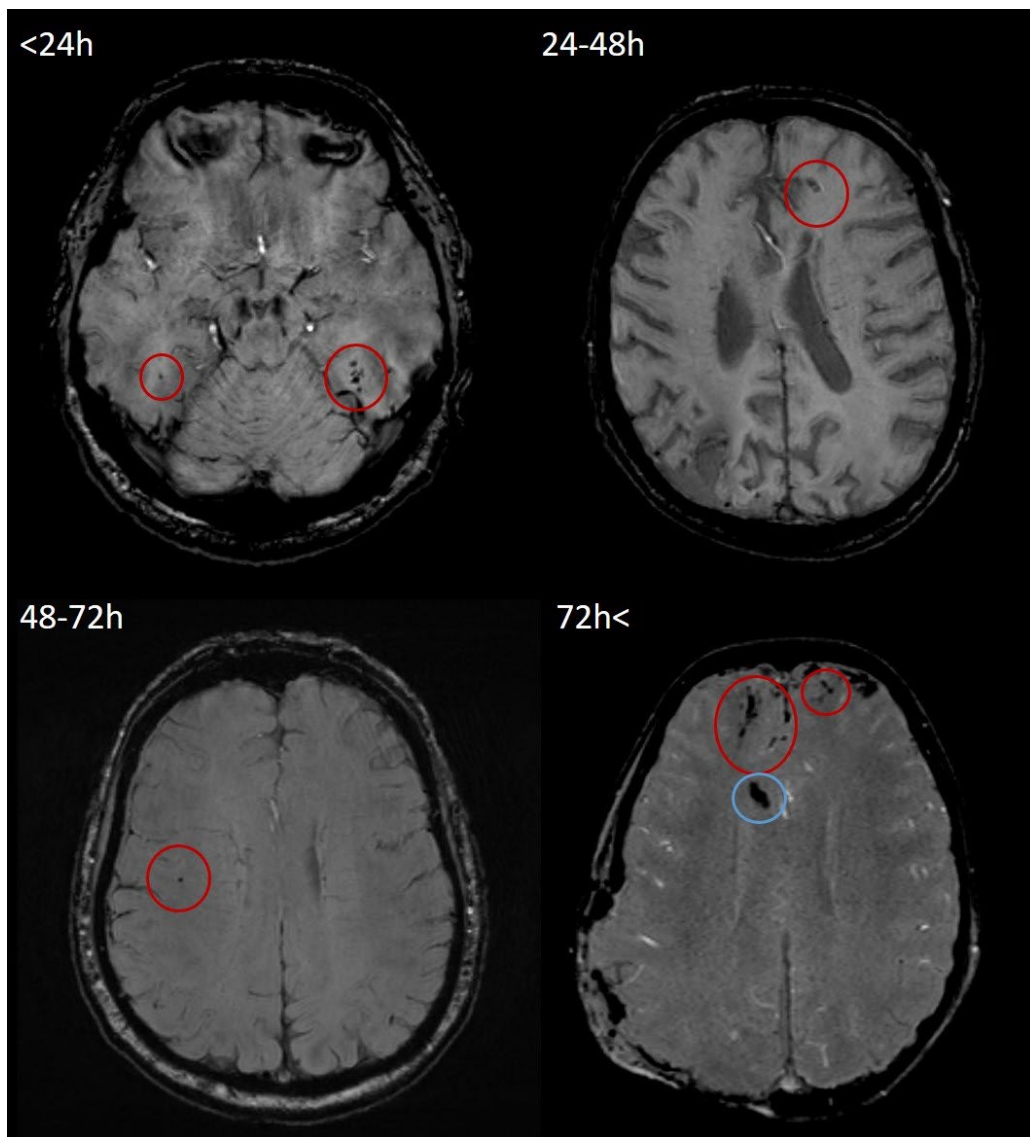
Az SWI TMB-eket a fehérállományban lokalizált, ellipszoid vagy lekerekített-elnyúlt 1-10 mm átmérőjű hipointenzitásokként definiálták, melyek főként a fehér-szürkeállomány átmenetben, az agytörzsben vagy a corpus callosumban és a bazális ganglionok területén voltak megfigyelhetők. A TMB pontos azonosításához ki kellett zárni a TMB-hez nagyon hasonlító, SWI MRI-n „mimetikumokként” viselkedő egyéb hipointenzitások (véna átmetszetek, sulcusokban felgyűlt kis mennyiségű vér, mészlerakódások, levegő-szövet határfelületek okozta artefaktumok vagy pl. intraventricularis drain által okozott makroszkópos vérzés). Ezért az SWI felvételek nagy felbontású T1-súlyozott felvételekkel való úgy nevezett ko-regisztrációját hajtottuk végre az FSL (Oxford-FMRIB) szoftvercsomag lineáris képregisztrációs eszközének (FSL Linear Registration Tool- FLIRT) segítségével, amely lehetővé tette a TMB-k multimodális és anatómiailag pontos értékelését.

A kontúziókkal, intraventricularis vérzéssel vagy csont-levegő határfelületi artefaktokkal (pl. a processus mastoideus közelében) vagy kamrai drainnel szomszédos elváltozásokat kizártuk. Az Adams klasszifikáció szerinti teljes TMB-számot és lokalizációt egyénileg rögzítettük.

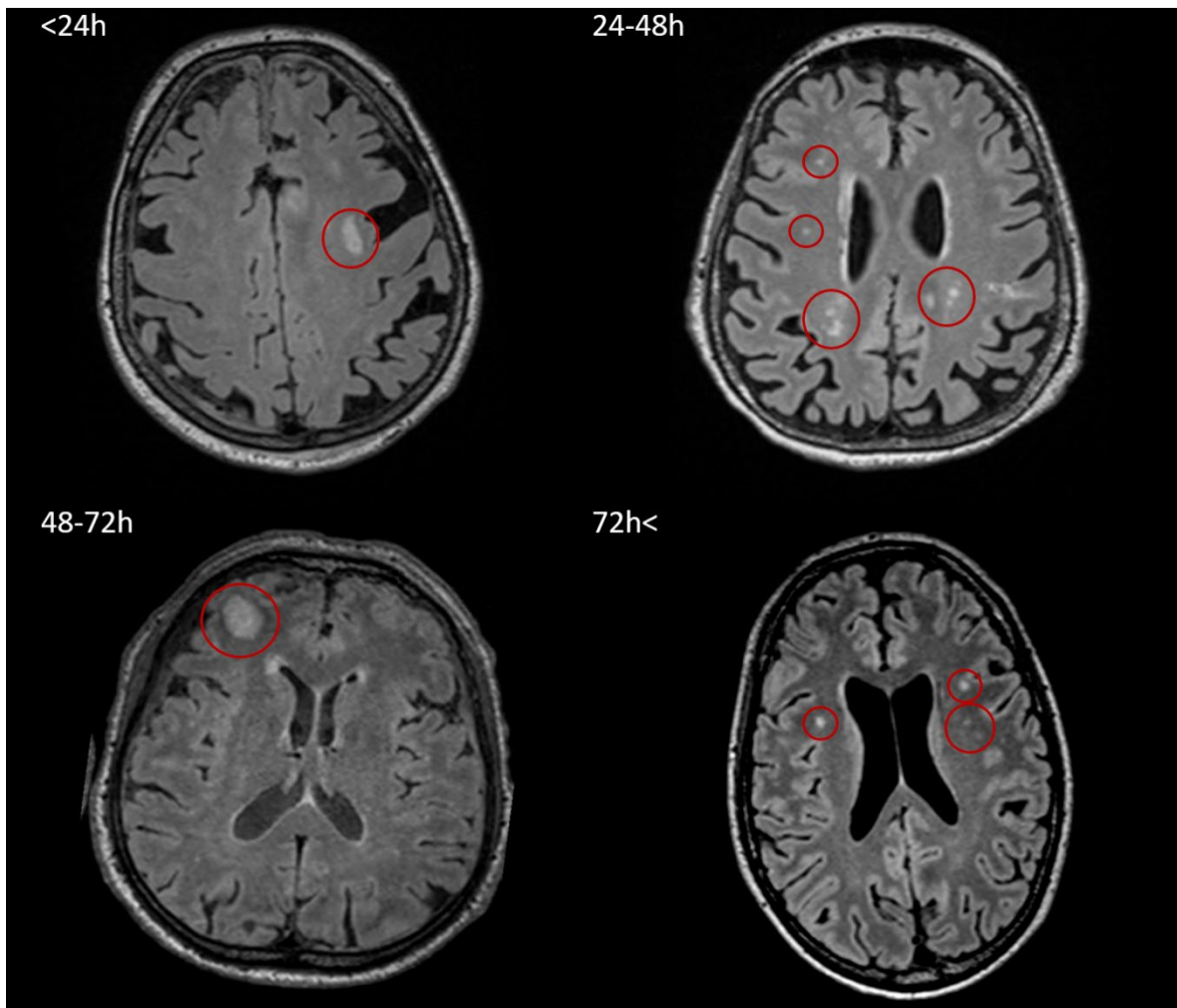
A FLAIR-léziókat fokális, kerek vagy tojásdad, szigorúan a fehérállományon belüli lokalizációjú hiperintenzitásokként definiáltuk.

A 11. és 12.. ábrán példák láthatók a különböző időpontokban észlelt SWI- és FLAIR-léziókra.

11. ábra. Reprezentatív TMB példák a <24h, 24-48h, 48-72h és 72h< csoportok SWI-felvételein. Mind a négy SWI-mérést 3T Siemens Magnetom Prisma MRI-berendezésen végeztük. A MAYO osztályozás szerint mind a négy eset (balra fent 21 éves férfi, jobbra fent 50 éves férfi, balra lent 64 éves férfi és jobbra lent 60 éves férfi) súlyos TBI-nek minősült, a TMB-ket piros körök jelzik. A jobb alsó képen kézzel karikázva egy intraventricularis drain átmetszete okozta hipointenzitás látható.



12. ábra: A nem vérzéses/ FLAIR elváltozások reprezentatív példái a <24h, 24-48h, 48-72h és 72h< csoportokban. Mind a négy FLAIR-mérést 3T Siemens Magnetom Prisma MRI-berendezésen végeztük. A MAYO osztályozás szerint a betegek közül kettő (jobbra fent 77 éves nő, balra lent 31 éves férfi) „symptomatic” TBI-t szenvedett, kettő (balra fent 75 éves nő, jobbra lent 27 éves férfi) súlyos TBI-nek minősült, az elváltozásokat piros körök jelzik.



### 2.1.5 Statisztikai elemzés

Statisztikai számításainkat a MedCalc for Windows, 19.1.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) segítségével végeztük, kivéve a Fisher exact teszteket, amelyeket az IBM SPSS Statistics for Windows, 27.0. verzió (Armonk, NY: IBM Corp.) segítségével hajtottuk végre. A klinikai, CT- és MRI-adatok összegzésére leíró statisztikákat alkalmaztunk. Nem normális eloszlású adatok esetén a medián és az interkvartilis tartomány, normális eloszlású adatok esetén az átlag és az SD került rögzítésre, eredményeinket a 3. táblázat foglalja össze.

Az elváltozások időbeli trendjeinek modellezéséhez lineáris, exponenciális és másodfokú polinomiális trendvonalakat illesztettünk a TMB-k és FLAIR hiperintenzitások számához a TBI-t követő eltelt idő függvényében, illetve Grubbs tesztet alkalmaztunk a kiugró értékek kizárására. A további elemzéshez a legjobban illeszkedő trendvonalat (a legnagyobb  $R^2$ -értékkel rendelkező vonalat) választottuk ki. Mind a TMB-k, mind a FLAIR-elváltozások esetében a másodrendű polinomiális trendvonal illeszkedett a legjobban ( $R^2=0,20$ ). E trendvonal egyenletének az átlagos TMB-számra vonatkozó megoldása meghatározta azt a pontos időintervallumot, amelyben a TMB-számok az átlag alatt voltak. Az így meghatározott időkeretet a klinikai és gyakorlati alkalmazhatóságot figyelembe véve kiigazítottuk, így négy csoportot hoztunk létre a trauma és a legkorábbi MRI között eltelt idő alapján: 0-24h (n=11); 24-48h (n=14); 48-72h (n=11) 72h< (n=10). Sapiro-Wilk normalitásvizsgálatot alkalmaztunk a TMB és FLAIR léziók számának, alanyaink életkorának, a kontúziók számának és össztérfogatunk eloszlásának vizsgálatára. Fisher egzakt tesztet alkalmaztunk az elváltozások számát esetlegesen befolyásoló kategorikus változók, mint például a nem, a MAYO osztályozás, a Rotterdam- és Marshall-pontszámok, a TMB-lokalizáció, a szeptevastagság és a szkanner térerősség csoportok közötti előfordulási különbségeinek tisztázására. Kruskal-Wallis H-tesztet alkalmaztunk Conover post-hoc teszttel a csoportok közötti átlagos TMB és FLAIR léziószám, kontúziószám és térfogat különbségek értékelésére, az összehasonlítások statisztikai erejét az R statisztikai szoftver MultNonParamkwpower csomagjával (3.6.0. verzió; R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) számoltuk ki.

## 2.2 Módszerek II.: A perilezióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül

### 2.2.1 Alanyok:

Kutatásainkba a PTE KK Idegsebészeti Klinika neurológiai, pszichiátriai, korábbi neurotraumatológia tekintetben negatív anamnézissel rendelkező 61 középsúlyos-súlyos koponyatraumát szenvedett (45 férfi, 16 nő, 21-88 év; átlag=56 év, SD=17,6 év) és 61 egészséges alany (27 férfi, 37 nő, 22-85 év, medián=36 év, IQR=22,5-52,5 év) került beválogatásra. Belső kontrollként, annak kizárására, hogy a vizsgálatok során vizsgálni tervezett diffúziós eltéréseket maguk a fehérállományi mikrovérzések okozzák, huszonnyolc, korábbi SWI felvételen incidenciálisan leírt nem traumás eredetű fehérállományi mikrovérzéssel rendelkező (non traumatic microbleed- nTMB) beteg (8 férfi, 20 nő; medián=64,5 év IQR= 52.25-66.5 év), került beválogatásra. A kezdeti TBI, nTBI és kontroll alanyinkból a DTI szakirodalmi javaslatoknak, gyakorlatoknak megfelelően +3 évre egyeztetett „tripleteket hozunk létre”, végeztük csoport szintű analízisüket.

### 2.2.2 Képképző protokoll

Minden alanyunkat a PDK 3 T térerősségű Siemens MAGNETOM Prisma MRI készülékkel, kifejezetten koponyatrauma során kialakuló patológiák klinikai és kutatási szintű feltárására, vizsgálatára tervezett MRI protokollunk szerint vizsgáltuk. Képképző protokollunk a bevezetőben ismertetett modalitásokból állt, melyek paraméterei a következők voltak:

MPRAGE: szeletvastagság= 1 mm, voxel méret= 1 mm \* 1 mm\* 1 mm, TR=2530 ms, TE= 3,37 ms, FoV= 256 mm

T2: szeletvastagság= 4,0 mm, voxel méret= 0,7 mm \* 0,7 mm\* 4 mm, TR=5500 ms, TE= 106 ms, FoV= 220 mm

FLAIR: szeletvastagság= 0,9 mm, voxel méret= 0,4 mm \* 0,4 mm\* 0,9 mm, TR=5000 ms, TE= 387 ms, FoV= 230 mm

DTI: szeletvastagság= 2 mm, voxel méret= 2 mm \* 2 mm\* 2 mm, TR=7700 ms, TE= 68,0 ms, FoV= 256 mm PA és AP irányban; Sávszélesség 1562 Hz/Px.

SWI: szeletvastagság= 1,5 mm, voxel méret= 0,9 mm \* 0,9 mm\* 1,5 mm, TR=27 ms, TE= 20 ms, FoV= 220 mm

A vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozat szabályainak megfelelően végeztük, és azokra a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottság jóváhagyását megkaptuk (4525. sz.). A vizsgálatban használt MRI-vizsgálatokhoz valamennyi résztvevőtől vagy törvényesen meghatalmazott képviselőjüktől, szóbeli és írásbeli adekvát tájékoztatást követően a vizsgálatokba beleegyezést kértünk.

### 2.2.3 MRI felvételek kiértékelése

Rögzítésre került egyéenként az SWI-n feltárt TMBk és nTMBk száma, morfológiája és pontos elhelyezkedése (x, y és z koordináták), valamint a koponyatrauma során gyakran kialakuló fokális ödémák körüli fehérállomány vizsgálata érdekében a FLAIR-en leírt fokális hiperintenzitások száma és pontos lokalizációik. A mikrovérzések és fokális ödémák pontos definiálása érdekében az SWI, FLAIR és T1 súlyozott felvételek úgy nevezett koregisztrációját hajtottuk végre (FMRIB's Linear Image Registration Tool- FLIRT).

A különböző etiológiájú fehérállományi mikrovérzések (TMB és nTMB) és fokális ödémák perilezióáris diffúziós paramétereit az alábbiak szerint vizsgáltuk:

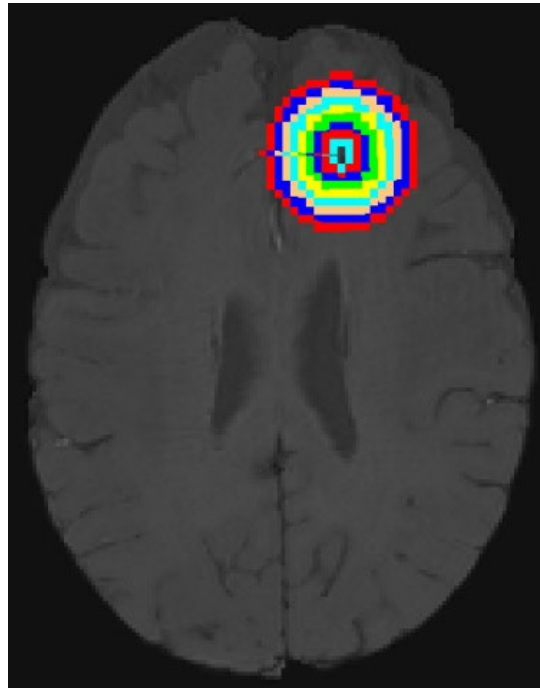
1. A nyers DTI felvételek FSL- FDT szerinti korrekciója, processzálása, diffúziós térképek –melyek az egész agy 2\*2\*2 mm-es voxelenkénti FA, MD, AD, RD értékeit tartalmazza- kiszámítása.
2. Az FSL XTRACT moduljának segítségével, probablisztikus modell alapján a fehérállományt alkotó agypályák rekonstrukciója, összefűzése és binarizálása, melynek eredménye egy, a fehérállományt pontosan lefedő 3D „maszk”, mely alatt az egyes diffúziós paraméterek meghatározhatók.
3. A mikrovérzések által, a mágneses térben okozott, a DTI-t potenciálisan befolyásoló torzítások hatásának minimalizálása: az SWI felvételekből kivonásra kerültek az 1 SD-n kívül eső intenzitású voxelek (fslstats, fslmaths). Az így kapott

felvétel binarizálása után a (nagy valószínűséggel) torzítás mentes voxeleket reprezentáló 3D maszkot állítottunk elő.

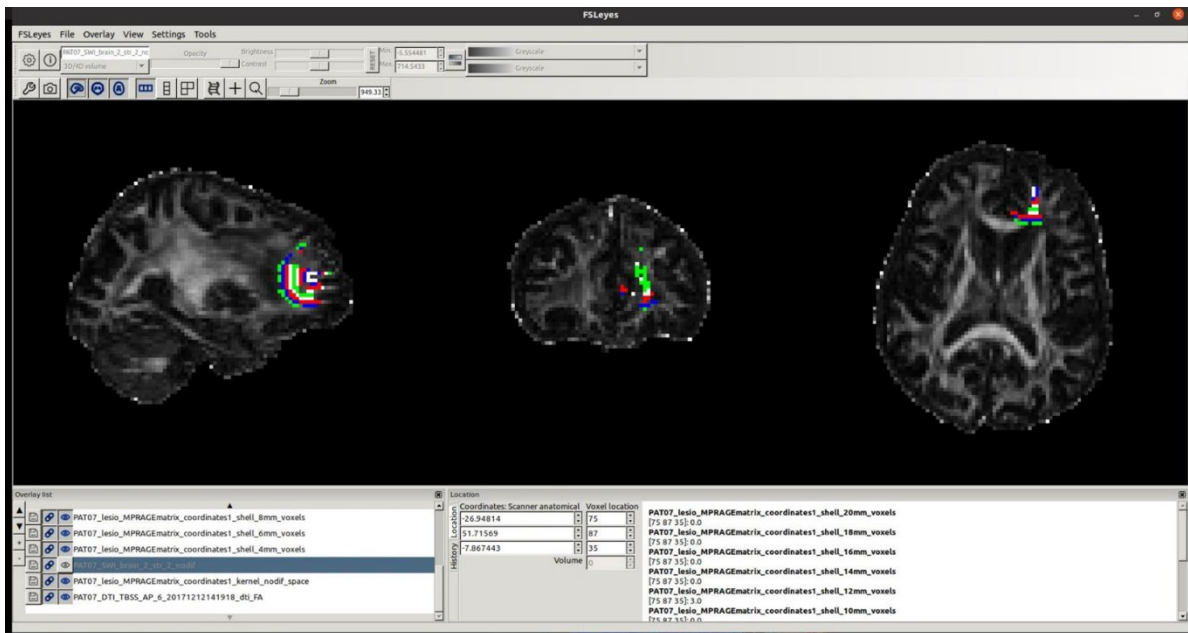
4. 1) és 2) regisztrációja: FSL FLIRT
5. nTMB vagy TMB középponti koordinátájának rögzítése T1 súlyozott felvételhez regisztrált, eredeti SWI felvételen
6. Ezen középponti voxel átvitele DTI felvételekre (FSL FLIRT).
7. Az fslmaths modul segítségével eköré a voxel köré, a DTI felbontásának megfelelően 2 mm-enként koncentrikus 3D gömbhéjak, maszkok meghatározása.
8. Az 1), 2) és 6) lépésekben előállított maszkok fúziója (fslmaths).
9. A fenti algoritmus eredménye: a mikrovérzés középpontjától 2 mm-enként távolodó, biztosan fehérállományi, torzítás mentes voxeleket tartalmazó 3D maszkok, melyeket diffúziós térképekre vetítve pontosan meghatározható a mikrovérségek körüli fehérállományban mérhető FA, MD, AD és RD értékek.
10. A könnyebb kezelhetőség érdekében a fenti algoritmust automatizáltuk.
11. A fenti kiértékelést betegenként a mikrovérségekkel identikus lokalizációjú kontralaterális, egészséges(nek tűnő) fehérállományban is elvégeztük.
12. A peri-SWI lézionáris és ellenoldali központi voxeleket egészséges kontroll alanyokra transzlokálva a fenti kiértékelést megismételtük, a mérési eredményeket rögzítettük.
13. Gömbhéjanként vizsgáltuk az nTMB, TMB és kontrollcsoportok, valamint minden esetben az ellenoldal közti FA, MD, AD és RD eltéréseket.
14. Minden betegünkből maximum három, Simple Random Sampling (SPSS v27) segítségével kiválasztott lézió került kiértékelésre, statisztikai elemzésre.

A fenti lépéseket a 13-15. ábrák foglalják össze.

13. Ábra: 2 mm vastag, a mikrovérzés központjától koncentrikusan távolodó „gömbhéjak”

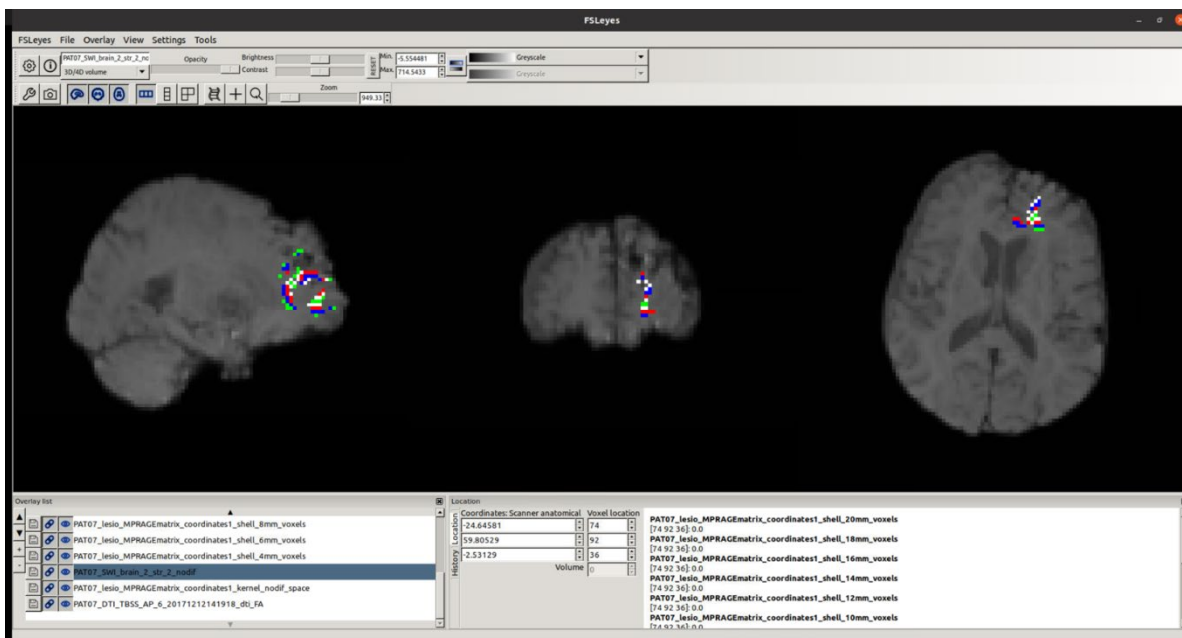


14. Ábra: perilezionáris koncentrikus, fehérállományi, torzítás mentes maszkok FA térképen. Jól látható, hogy precíz kiértékelési algoritmusunknak köszönhetően tökéletesen fedi a fehérállományt, milliméteres nagyságrendű kiértékelést tesz lehetővé.





15. Ábra: a perilezionáris koncentrikus, fehérállományi, torzítás mentes maszkok SWI felvételen. Jól látható, hogy a mikrovérzést, makroszkópos elváltozásokat jelző illetve egyéb hipointenz voxelek nem kerültek kiértékelésre.



## 2.2.4 Statisztikai módszerek

Statisztikai analízisünket az RStudio (Posit Software, PBC 2023.06.0 Build 421) statisztikai szofvercsomag segítségével végeztük az alábbi, a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet munkatársai segítségével és validálása mellett fejlesztett automatikus algoritmus/ scripttel végeztük. A kiértékelés lépései a következők voltak

- 1) Minimum 1 de maximum 3 lézió betegenkénti kiválasztása
- 2) FA, MD, AD, RD értékek csoportonként, gömbhéjankénti normalitás vizsgálata
- 3) Normalitás függvényében a DTI paraméterek gömbhéjankénti csoport szintű összehasonlítása, az eredmények rögzítése
- 4) „Bootstrapping” eljárás segítségével az összes beválogatható lézió kombinációban, de maximum 1000 iteráció után a legjellemzőbb eredmények százalékos arányának rögzítése, a könnyebb értelmezhetőség érdekében oszlopdiagramon majd összesítő táblázatban való rögzítése történt.

## 2.3 Módszerek III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése

### 2.3.1 Alanyok

A bevezetésben összefoglalt, a tractus-szintű vizsgálatok megfelelő statisztikai erő eléréséhez szükséges alany/ elemszám meghatározását célzó vizsgálatok kiegészítését, bővítését (így az egyéni szintű DTI vizsgálatok lehetővé tételének statisztikai alapjainak meghatározását) az alábbiak szerint végeztük:

Korábbi OTKA és NAP finanszírozott kutatások keretén belül a PDK-ban vizsgált enyhe, közepes súlyos vagy súlyos TBI-t szenvedett betegek és egészséges, neurotraumatológiai, neurológiai, pszichiátriai megbetegedéstől mentes kontroll alanyok (összesen 61 kontroll alany és 99 TBI páciens) DTI, MPRAGE, SWI, T2 súlyozott és FLAIR felvételeinek GDPR-nak megfelelő anonimizálás utáni kigyűjtése az algoritmus összeállításához, kezdeti teszteléséhez (engedélyszám: 4525 (PTE KK Regionális Kutatásetikai Bizottság)).

Képkalkotó protokollunk megegyezett a „Módszerek II.: A perilezióneris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása fokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül” fejezetben részletezettel.

Az egyéni kértékelés lépései a következők:

DTI:

1.1. DTI vizsgálatok (70 axiális szelet, izotropikus 2x2mm felbontás, 30 irány)

1.2. DTI postprocessing:

1.2.1. A jelenleg elérhető, a szakirodalomban legelfogadottabb algoritmus, munkamenet a következő:

1.2.1.1. FMRIB FSL szoftvercsomag FDT toolbox: „Javító algoritmusok”:

1.2.1.1.1. TOPUP: A mozgásos műtermékek és az ún. Eddy currentek, különböző szövetek eltérő mágneses szuszceptibilitása okozta torzításokat határozza meg.

1.2.1.1.2. EDDY: TOPUP által meghatározott javítások elvégzése.

1.2.1.1.3. DTIFIT: diffúziós tenzort illeszt, kiszámolja a FA, MD, AD, RD térképeket

### 1.3. Tractographia, kiértékelési algoritmus:

#### 1.3.1. Tractusok pontos meghatározása:

1.3.1.1. BEDPOSTX: Keresztező rostok meghatározása a fehérállományt alkotó minden voxelben.

1.3.1.2. PROBTRACKX: Voxelenként kettő rostot feltételez, azok lehetséges lefutásait ezres nagyságrendben modellezi. Az egymás melletti voxelekben meghatározott „legjellemzőbb” rostlefutások valószínűségi hisztogramjai megfelelően megválasztott küszöbérték mellett megjelenítve fogják meghatározni a probabilisztikus modell alapján rekonstruált tractust.

1.3.1.3. Az egyes tractusokhoz tartozó átlagos diffúziós paraméterek kiszámítása, szöveg file-okban történő rögzítése.

1.3.1.4. Az érintett tractusok a könnyebb leletezhetőség kedvéért jó szöveti kontrasztú, magas térbeli felbontású T1 súlyozott struktúr felvétellel történő fúziója (FSL FLIRT és FNIRT).

A fenti kértékelési algoritmus (CUDA kompatibilis GPU használatával), klinikai környezetben is elfogadható gyorsasággal, betegenként nagyjából 1,5 óra alatt fut le.

### 2.3.2 Statisztikai elemzés

Az egyes tractusok átlag diffúziós paraméterei egyéenként rögzítésre kerültek. Mérési eredményeinket a következő statisztikai kiértékelésnek vetettük alá:

- 1) Kiugró értékek kizárása Grubbs teszt segítségével,
- 2) az egészséges és a traumát szenvedett csoportban tractusonként meghatároztuk a mért diffúziós paraméter átlagértékek eloszlását (Shapiro-Wilk teszt),

- 3) a normál eloszlást mutató tractusok variancia homogenitását Levens' teszt segítségével állapítottuk meg (homoscedasticus vagy heteroscedasticus),
- 4) meghatározásra kerültek csoportonként a normál eloszlást mutató tractusok és fehérállományi régiók átlag; a nem normál eloszlásúak medián diffúziós paraméterei,
- 5) a nem normál eloszlást mutató tractusok medián diffúziós paramétereinek csoportok közti összehasonlítását Mann-Whitney,
- 6) a normál eloszlásúak átlag értékeinek összehasonlítását kétszélű, Levens' teszt által meghatározott variancia alapján megválasztott típusú Student-féle T-próba segítségével hasonlítottuk össze.

A diffúziós paramétereket bizonyítottan befolyásoló klinikai paraméterek megoszlását- Chi<sup>2</sup> próba segítségével vizsgáltuk a kontroll és beteg csoport között. Rögzítésre és összehasonlításra került a két csoport között az:

– életkor

- nemek megoszlása

- felvételi GCS

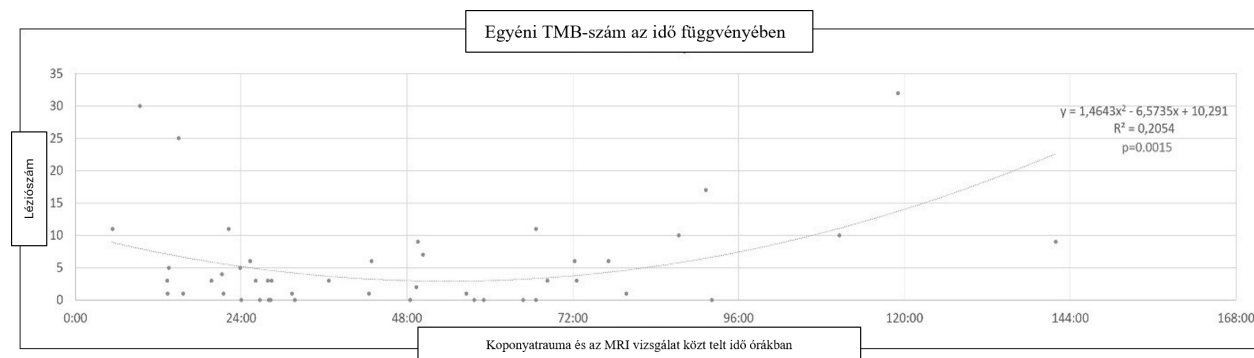
- minden, a szakirodalom szerint a DTI képződést befolyásolni képes klinikai paraméter (melyek leírása és statisztikai elemzésük ismertetése meghaladná e beszámoló kereteit)

### 3 Eredmények

#### 3.1 Eredmények I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban

MAYO klasszifikáció szerint a 46 betegből álló csoportban a súlyosság 6 tünetmentes, 8 enyhe és 32 közepesen súlyosnak adódott. Az életkor eloszlása a teljes betegcsoportban nem volt normális eloszlású ( $p=0,02$ ), az átlagéletkor a trauma idején 46,09 (SD=24,39) év volt. Összesen 248 TMB-t (131-et 3T és 117-et 1,5T szkenneren) és 220 hiperintenz fokális FLAIR elváltozást azonosítottunk a 46 betegben. Az akut CT felvételeken 9 betegünkönél 16 kontúzió volt kimutatható. A részletes demográfiai és felvételi klinikai adatokat az 1-3. táblázat tartalmazza. Az egyes TMB-számok időbeli alakulására másodrendű polinomiális trendvonal volt illeszthető legmagasabb  $R^2$  értékkel ( $R^2=0,2$ ;  $p=0,002$ ;  $y=3,0206X^2-13,065X+15,04$ ), melyet a 16. ábra szemléltet.

16. Ábra: egyéni TMB-szám az idő függvényében és a legnagyobb  $R^2$  értékkel illeszthető 2. rendű polinomiális trendvonal.



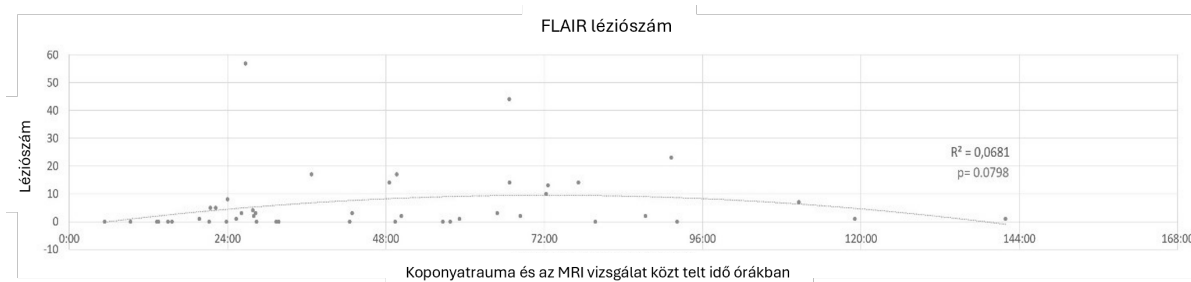
A TMB-szám átlaga a teljes populációra vonatkoztatva 5,4 volt. Ezt az értéket behelyettesítve a másodfokú egyenletek megoldóképletébe:

$$x_{1;2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$X_1=85h\ 55min$ , és  $X_2=21h\ 50min$  volt. Betegcsoportunkban az ezekhez az eredményekhez legközelebbi két felvétel a traumát követő  $21h11min$  és  $79h45min$  volt. A fokális FLAIR

hiperintenzitásokat az idő függvényében ábrázolva nem lehetett egy egyértelmű trendvonalat meghatározni, a legjobb közelítést itt is az 5. ábrán látható polinomiális trendvonal adta ( $R^2=0,07$   $p=0,08$ , 17. ábra).

17. Ábra: egyéni FLAIR-eltérések száma az idő függvényében és az illesztett trend vonal.



A Sapiro-Wilk normalitás teszt kimutatta, hogy mind a TMB (0-24h:  $p=0,003$ ; 24-48h:  $p=0,005$ ; 48-72h:  $p=0,003$ ; 72h<:  $p=0,04$ ), mind a FLAIR-léziók száma szignifikánsan eltért a normális eloszlástól minden csoportban (0-24h:  $p=0,003$ ; 24-48h:  $p=0,004$ ; 48-72h:  $p=0,003$ ; 72h<:  $p=0,04$ ) és a teljes populációban is ( $p<0,001$  mind a TMB, mind a FLAIR léziók száma esetében). A kontúziószám nem mutatott normális eloszlást ( $p<0,001$  minden csoportban), a kontúziók térfogata mint folytonos változó szintén nem mutatott normális eloszlást, a medián kontúzió térfogat 0-24h=842,00 (IQR 539,29-1316,00) mm<sup>3</sup>; 24-48h= 331,50 (IQR 0,00-1642,25) mm<sup>3</sup>; 48-72h=214,00 (IQR 143,28-9480,25) mm<sup>3</sup>; 72h< = 129,60 mm<sup>3</sup> volt. A betegek életkora az egyes csoportokban nem különbözött szignifikánsan a normális eloszlástól: 0-24:  $p=0,12$ ; 24-48h:  $p=0,16$ ; 48-72h=  $p=0,28$ ; 72h<  $p=0,14$ . A klinikai és CT adatok összehasonlításának eredményei a csoportok között a következők voltak: az átlagéletkor években kifejezve: 0-24h=34,45 (SD=25,72); 24-48h=52,00 (SD=25,45); 48-72h=53,91 (SD=18,65); 72h< =42,00 (SD=24,59). Az egyutas ANOVA kimutatta, hogy az életkor tekintetében nem volt szignifikáns különbség a csoportok között ( $p=0,19$ ) (6. táblázat). A Fisher-féle egzakt teszt nem mutatott szignifikáns különbségeket a MAYO klasszifikáció ( $p=0,11$ ), a Rotterdam ( $p=0,09$ ) és Marshall ( $p=0,73$ ) pontszámok, az SWI térerősség ( $p=0,77$ ) és a szeptevastagság ( $p=0,59$ ), a makroszkópos patológiák eloszlása ( $p=0,79$ ) vagy betegeink neme ( $p=0,72$ ) tekintetében. (6. táblázat). A TMB-szám mediánja az egyes csoportokban a következő képpen alakult: 0-24h=4,0 (IQR 1,50-11,00); 24-48h=1,0 (IQR 0,00-3,00); 48-72h=1,0 (IQR 0,00-6,00); >72h=7,5 (IQR 3,00-10,00), míg a

medián FLAIR-léziók száma 0-24h=0,00 (IQR 0,00-1,75); 24-48h=0,50 (IQR 0,00-14,00); 48-72h=3,00 (IQR 1,00-4,00); >72h=5,00 (IQR 1,00-14,00) volt (3. táblázat). A Kruskal-Wallis-teszt a TMB-k tekintetében szignifikáns különbségeket mutatott ( $p=0,01$ ) a csoportok között, de nem mutatott szignifikáns eltérést a FLAIR-léziók ( $p=0,18$ ), a kontúziók száma ( $p=0,66$ ) vagy az átlagos kontúziós térfogat ( $p=0,69$ ) tekintetében, amint az az 5-7. táblázatokban és a 18. ábrán látható. A statisztikai erő  $1-\beta > 0,9$  volt a TMB, a FLAIR-léziók számának és a kontúziók térfogatának összehasonlításakor. A TMB-lokalizáció nem mutatott különbséget a csoportok között ( $p=0,68$ ).

6. Táblázat: A TMB-szám befolyásoló tényezői: életkor, TBI súlyossága és releváns SWI képző adatok, a csoportok közötti különbségek szignifikanciaszintje. Az egyutas ANOVA (\*) és a Fisher-féle egzakt teszt (\*\*\*) eredményei.

Esetszám		Csoportok					Szignifikancia
		$\Sigma$	0-24	24-48	48-72	72<	
Az összes alany medián, az egyes csoportok átlag életkora években		46	11	14	11	10	p=0,19
		(IQR 27-67)	(SD=25,72)	(SD=25,45)	(SD=18,65)	(SD=24,59)	
Nem***	Férfi	37	10	10	9	8	p=0,72
	Nő	9	1	4	2	2	
Súlyosság (MAYO)***	szimptomatikus	6	0	3	3	0	p=0,11
	enyhe	8	3	0	3	2	
	középsúlyos-súlyos	32	8	11	5	8	
MARSHALL score***	I.	13	4	5	2	2	p=0,73
	II.	8	2	2	1	3	
	III.	8	2	1	4	1	
	IV.	0	0	0	0	0	
	V.	0	0	0	0	0	
	VI.	17	3	6	4	4	
Rotterdam score***	1	27	6	12	4	5	p=0,09
	2	14	3	1	7	3	
	3	2	1	0	0	1	
	4	2	1	0	0	1	
	5	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	
SWI térerősség***	1,5 T	11 (23,91%)	4 (36,36%)	3 (21,43%)	2 (18,18%)	2 (20,00%)	p=0,77
	3 T	35	7	11	9	8	
	1,15	1	1	0	0	0	
SWI szeletvastagság (mm)***	1,2	1	1	0	0	0	p=0,59
	1,5	32	5	10	9	8	
	2	8	2	2	2	2	
	3	3	2	1	0	0	

7. táblázat. TMB-szám és lokalizáció, makroszkópos kórképek, FLAIR-eltérések száma, kontúziók száma és térfogata, valamint a csoportok közötti különbségek szignifikanciaszintje. A Kruskal-Wallis és Conover post hoc teszt (\*\*) és a Fisher-féle pontos teszt (\*\*\*) eredményei.

Esetszám		Csoportok					Szignifikancia
		Σ	0-24	24-48	48-72	72<	
TMB szám**	összesen	248	95	26	33	94	p=0,011
	medián	3,00 (IQR 0,00-7,00)	4,00 (IQR 1,50-11,00)	1,00 (IQR 0,00-3,00)	1,00 (IQR 0,00-6,00)	7,50 (IQR 3,00-10,00)	
TMB lokalizáció**	subcorticalis	220	85	25	27	83	p=0,68
	corpus callosum	19	7	1	3	8	
	agytörzs	9	3	0	3	3	
FLAIR léziószám**	összesen	277	20	124	32	101	p=0,18
	medián	2,00 (IQR 0,00-7,25)	0,00 (IQR 0,00-1,75)	0,50 (IQR 0,00-14,00)	3,00 (IQR 1,00-4,00)	5,00 (IQR 1,00-14,00)	
Contusio szám**	összesen	16	7	3	5	1	P=0,66
	medián	0,00 (IQR 0,00-0,75)	0,00 (IQR 0,00-1,50)	0,00 (IQR 0,00-0,00)	0,00 (IQR 0,00-1,00)	0,00 (IQR 0,00-0,00)	
Contusio térfogat**	összesen	19837,8	2741	4064,5	12902,7	129,6	p=0,69
	medián	378,25 (IQR 124,65-1446,00)	842 (IQR 539,29-1316,00)	331,5 (IQR 0,00-1642,25)	214 (IQR 143,28-9480,25)	129,6	
Makroszkópos eltérések	intraventricularis hematoma	2	1	0	0	1	p=0,79
	koptyacsont törés	13	5	5	5	3	
	epiduralis haematoma	3	3	0	0	0	
	subduralis haematoma	7	1	3	3	3	
	subarachnoidealis haematoma	7	2	4	4	1	
	atrophia	4	1	3	3	0	



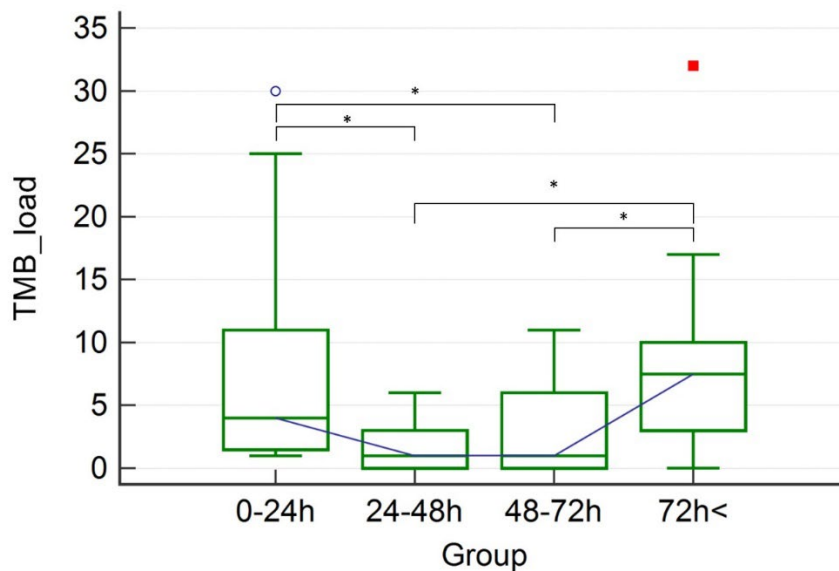
18. ábra. Kruskal-Wallis Conover post hoc teszttel: a TMB-számbeli különbségek eredményei. A "\*" a TMB-szám szignifikáns ( $p < 0,05$ ) különbségeit jelzi, a kék kör és a piros négyzet a két legmagasabb TMB-számú beteget jelöli.

#### Kruskal-Wallis test

Test statistic	10,8710
Corrected for ties Ht	11,1757
Degrees of Freedom (DF)	3
Significance level	P = 0,010813

#### Post-hoc analysis (Conover)

Factor	n	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0-24H	11	29,73	(2)(3)
(2) 24-48H	14	16,71	(1)(4)
(3) 48-72H	11	18,68	(1)(4)
(4) 72H<	10	31,45	(2)(3)



### 3.2 Eredmények II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül

Kezdeti TBI, nTBI és kontrol alanyállományunkból életkorra nézve maximum  $\pm 3$  éves eltérést megengedve, három 20 fős csoportot lehetett kialakítani melyek demográfiai adatait az 8. táblázat tartalmazza. A TBI csoportban összesen 99 TMB-t és 137 fokális ödémát, az nTMB csoportban összesen 104 nTMB-t és 143 fokális ödémát detektáltunk. Kontroll alanyainkban -a beválogatási kriteériumoknak megfelelően- egyik vizsgált lézió típus sem volt azonosítható. Önállóan (környezetében semmilyen más patológiás elváltozás nem volt megfigyelhető semelyik alkalmazott képpalkotó módszerrel) 67 TMB és 89 nTMB, 137 fokális ödéma a TBI, 143 fokális ödéma az nTMB csoportban volt felfedezhető FLAIR-en. Az egyes kiértékelésekbe, egyénekenkénti megoszlásuk miatt, környező patológiákat figyelmen kívül hagyva maximum 44 TMB és 43 nTMB, önállóan 37 TMB és 36 nTMB, 52 traumás eredetű fokális ödéma és 45 nem traumás eredetű fokális ödéma került beválogatásra. Szignifikánsnak fogadtunk el egy elváltozást, ha a bootstrapping lépések legalább 80%-ában FDR korrekció után  $p < 0,05$  átlag diffúziós paraméter változás (emelkedés vagy csökkenés) volt kimutatható csoport szinten az egyes gömbhéjakon:

Környező patológiáktól mentes TMB-k környezetében szignifikáns FA csökkenés, MD, RD emelkedés volt megfigyelhető mind a peri-TMB, mind a contralateralis identikus fehérállomány és kontrollcsoport között: TMB vs kontrol FA csökkenés 5,6,9. héjakon, MD emelkedés a 3.;8. és 9. héjakon, RD emelkedés az 4.; 7-9. héjakon. TMB identikus contralateralis fehérállomány vs kontrol FA csökkenés a 6. héjon, MD emelkedés a 6.; 7- 9. héjakon, RD emelkedés a 6.; 7- 9. héjakon.

Önálló nTMB-k környezetében sem kontrollhoz sem az ellenoldalhoz viszonyítva nem volt kimutatható eltérés.

Környező patológiáktól mentes traumás eredetű fokális ödémák peri-lézióáris fehérállományában szignifikáns FA csökkenés, MD, RD emelkedés volt megfigyelhető mind a peri-lézióáris, mind a contralateralis identikus fehérállomány és kontrollcsoport között: traumás eredetű fokális ödéma vs kontroll FA csökkenés 7,9. héjakon, MD emelkedés a 7-9. héjakon, RD emelkedés az 4-9. héjakon. Traumás eredetű fokális ödéma épnek tűnő ellenoldal vs kontroll FA csökkenés a 9. héjon, MD emelkedés a 7-9. héjakon, RD emelkedés az 4-9. héjakon.

Nem traumás eredetű fehérállományi fokális ödémák esetén sem a perilézióáris fehérállományban sem az azzal identikus, ellenoldali lokalizációjú fehérállományban nem volt kimutatható DTI eltérés a kontrollcsoporthoz képest. Eredményeinket a 9. táblázat foglalja össze.

8. Táblázat: a perilezionáris kiértékeléshez beválogatott tripletek

Control	Nem	Életkor	Akut SWI pozitív TBI	Nem	Életkor	nTMB pozitív	Nem	Életkor
CON06	nő	31	PAT19	férfi	31	NONTRAUMACON7	nő	31
NAP_CONTROL03	nő	33	PAT24	nő	34	NONTRAUMACON11	ffi	n
CON38	ffi	36	PAT53	férfi	35	NONTRAUMACON10	ffi	38
NAP_CONTROL15	ffi	41	PAT52	férfi	42	NONTRAUMACON26	nő	43
NAP_NC02	férfi	43	PAT28	Férfi	45	NONTRAUMACON24	nő	45
CON16	nő	49	PAT40	férfi	49	NONTRAUMACON17	nő	51
CON24	ffi	50	PAT17	férfi	50	NONTRAUMACON18	ffi	48
CON27	ffi	50	PAT46	férfi	50	NONTRAUMACON23	ffi	50
CON36	nő	52	PAT35	férfi	51	NONTRAUMACON19	ffi	51
CON37	ffi	53	PAT25	férfi	52	NONTRAUMACON22	nő	54
CON13	nő	56	PAT61	ffi	53	NONTRAUMACON21	nő	54
NAP_NC06	nő	57	PAT04	férfi	54	NONTRAUMACON14	nő	56
CON05	nő	58	PAT10	férfi	56	NONTRAUMACON16	nő	58
CON17	ffi	60	PAT21	férfi	60	NONTRAUMACON25	nő	61
CON29	ffi	60	PAT38	férfi	60	NONTRAUMACON28	NŐ	62
CON33	nő	61	PAT42	férfi	61	NONTRAUMACON5	nő	62
CON18	nő	67	PAT08	férfi	65	NONTRAUMACON1	ffi	65
CON23	ffi	68	PAT18	férfi	67	NONTRAUMACON12	ffi	65
CON22	nő	75	PAT02	nő	74	NONTRAUMACON6	nő	74
CON35	ffi	85	PAT31	férfi	85	NONTRAUMACON20	nő	82

9. Táblázat: A perilezionáris kiértékelés bootstrapping utáni eredményeinek összefoglalója.

		Csökkenés		<50%		50-60%		60-70%		70-80%		80-90%		90-100%			
		Emelkedés		<50%		50-60%		60-70%		70-80%		80-90%		90-100%			
<b>Lézió típus</b>		<b>TMB (n=67)</b>															
Perilezionáris DTI vs contralateralis locus / perilezionáris DTI vs kontroll		TMB vs contralateralis locus				TMB vs kontroll				TMB contralateralis locus vs control contralateralis locus							
Öömbhéj/ DTI paraméterei		FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD
1. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	71.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	95.5	—	77.5	—	—	—	—	—	—	—	—
4. gömbhéj (2-4mm)		58.5	—	—	78.1	67.7	71	—	98.6	—	—	—	—	—	—	—	—
5. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	95.4	—	—	—	67.8	80.2	—	84.1	—	—	—	—
6. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	97.9	—	—	74.1	98.9	95.4	—	100	—	—	—	—
7. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	71.2	73.5	—	91.9	74.8	—	—	52.5	—	—	—	—
8. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	70	100	—	100	59.3	100	—	100	—	—	—	—
9. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	98.5	100	—	100	—	91	—	97.1	—	—	—	—
<b>Lézió típus</b>		<b>nTMB (n=89)</b>															
Perilezionáris DTI vs contralateralis locus / perilezionáris DTI vs kontroll		nTMB vs contralateralis locus				nTMB vs kontroll				nTMB contralateralis locus vs control contralateralis locus							
Öömbhéj/ DTI paraméterei		FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD
1. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>Lézió típus</b>		<b>TBI FLAIR focalis lézió (n=137)</b>															
Perilezionáris DTI vs contralateralis locus / perilezionáris DTI vs kontroll		TBI FLAIR focalis lézió vs contralateralis locus				TBI FLAIR focalis lézió vs control				TBI FLAIR focalis lézió -contralateralis locus vs control contralateralis locus							
Öömbhéj/ DTI paraméterei		FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD
1. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	69.1	—	—	—	—	—	—	—	—
4. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	65.4	79.6	—	98.1	—	81.1	—	92.1	—	—	—	—
5. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	65.3	63.5	—	96.6	61	77.4	—	97.1	—	—	—	—
6. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	61.3	68.3	—	94.7	58.6	74.7	—	96.5	—	—	—	—
7. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	81.9	91.2	—	99.5	68.7	92.5	—	100	—	—	—	—
8. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	69.1	97.4	—	99.4	53.6	97.3	—	99.5	—	—	—	—
9. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	87.8	99.1	—	100	81.8	99.6	—	100	—	—	—	—
<b>Lézió típus</b>		<b>nTBI FLAIR focalis lézió (n=143)</b>															
Perilezionáris DTI vs contralateralis locus / perilezionáris DTI vs kontroll		nTBI FLAIR focalis lézió vs contralateralis locus				nTBI FLAIR focalis lézió vs control				nTBI FLAIR focalis lézió -contralateralis locus vs control contralateralis locus							
Öömbhéj/ DTI paraméterei		FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD	FA	MD	AD	RD
1. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. gömbhéj (2-4mm)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

### 3.3 Eredmények III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése

Betegeink átlag életkora 48,9 év, kontrollcsoportunké 40,95 év volt, melyek eloszlása egyik csoportban sem mutatott normál eloszlást ( $p < 0,05$ ), Mann-Whitney próba alapján szignifikáns eltérés a két csoport között nem volt kimutatható ( $p = 0,9681$ ). A DTI képalkotást befolyásoló klinikai paraméterek között nem volt megfigyelhető szignifikáns eltérés a nemek megoszlásában, a Chi2 próba nem mutatott különbséget.

Koponyatraumát szenvedett betegeink vizsgált tractusai közül a forceps major FA, bal radiatio thalami anterior, jobb radiatio thalami anterior, bal oldali gyrus parahippocampalis, forceps major, jobb oldali fasciculus fronto-occipitalis inferior, jobb oldali fasciculus longitudinalis superior, mindkét oldali radiatio thalami superior, jobb oldali fasciculus uncinatus MD, a bal oldali tractus corticospinalis és jobb oldali radiatio thalami posterior AD, valamint a bal oldali gyrus parahippocampalis és pedunculus cerebellaris medius RD értékei nem, minden más tractus átlag diffúziós értékei normál eloszlást mutattak.

Kontrollcsoportunkban nem mutatott normál eloszlást a bal oldali gyrus parahippocampalis, pedunculus cerebellaris medius MD, a jobb oldali lemniscus medialis és a bal oldali fasciculus longitudinalis superior AD, az bal oldali radiatio acustica, bal oldali gyrus parahippocampalis, forceps major, bal oldali fasciculus longitudinalis superior, jobb oldali fasciculus uncinatus RD, valamint a mély fehérállomány FA értékei. Minden más tractus és fehérállományi régió minden más diffúziós átlagértékei normál eloszlást mutattak

Student's T-teszt segítségével a következő eredményeket rögzíthettük betegeink és kontrollcsoport között:

Szignifikáns FA csökkenést találtunk: jobb oldali tractus corticospinalis, mindkét oldali fasciculus fronto-occipitalis inferior, bal oldali fasciculus longitudinalis inferior, pedunculus cerebellaris medius, bal oldali fasciculus uncinatusban.

Szignifikáns MD növekedést találtunk: mindkét oldali radiatio acustica, mindkét oldali gyrus cinguli, jobb oldali gyrus parahippocampalis, mindkét oldali tractus corticospinalis, bal oldali fasciculus fronto-occipitalis inferior, mindkét oldali fasciculus longitudinalis inferior, jobb oldali

radiatio thalami posterior, bal fasciculus longitudinalis superior, bal oldali fasciculus uncinatusban.

Szignifikáns AD emelkedést találtunk: mindkét radiatio thalami anterior, jobb oldali gyrus parahippocampalis, jobb fasciculus longitudinalis inferior, jobb oldali radiatio thalami posterior, mindkét fasciculus longitudinalis superior, jobb oldali radiatio thalami superior, mindkét oldali fasciculus uncinatusban.

Szignifikáns RD emelkedést találtunk: mindkét oldali radiatio acustica, mindkét oldali radiatio thalami anterior, mindkét gyrus cinguli, bal oldali tractus corticospinalis, mindkét oldali fasciculus fronto-occipitalis inferior, mindkét oldali fasciculus longitudinalis inferior, mindkét oldali fasciculus longitudinalis superior, mindkét oldali radiatio thalami superior, mindkét oldali fasciculus uncinatusban.

Mann-Whitney teszt segítségével szignifikáns FA csökkenést találtunk a forceps major; MD növekedést mindkét oldali radiatio thalami anterior, bal oldali gyrus parahippocampalis, forceps major, jobb oldali fasciculus fronto-occipitalis inferior, jobb oldali fasciculus longitudinalis superior, mindkét oldali radiatio thalami superior, jobb oldali fasciculus uncinatus és AD emelkedést találtunk bal oldali tractus corticospinalis, jobb oldali radiatio thalami posterior, bal oldali gyrus parahippocampalis, pedunculus cerebellaris medius agypályákban

Szignifikáns RD emelkedést tapasztaltunk a bal oldali gyrus parahippocampalis, pedunculus cerebellaris mediusban.

A továbbiakban, mivel a szakirodalomban a PDK SIEMENS Magnetom PrismaFit MRI berendezés adott mérési paraméterekkel rendelkező DTI-vel mért átlag diffúziós paraméterekre nem elérhető elfogadott normál érték, posthoc power analízist végeztünk a GPower 3.1 szoftver segítségével, mely eredményeként a szignifikáns különbség ( $1-\beta > 0,95$ ) kimutatásához szükséges elemszám tractusonként átlagosan 42 fő TBI és 42 fő kontrollnak adódott.

Az egyéni, tractus-szintű DTI vizsgálatokat lehetővé tévő szoftver fejlesztés eredményei:

Az FSL alaprendszerre egy felhasználóbarát web-based rendszer került kiépítésre, mely a Linux host-on, egy http serveren keresztül köti össze a felhasználót a kiértékelővel. Miután beérkeznek a serverre a GDPR-nak megfelelően anonimizált, NIfTI formátumba konvertált mérések

(felvételek), megtörténik az egyéni szintű postprocessing a fent leírt algoritmus szerint, a mérési eredményekről regiszter készül, ami a későbbiekben lehetővé teszi az egyéni szintű értékelést és ami alapján a felhasználó könnyedén tudja listázni, módosítani, vagy törölni az adatokat. A könnyebb értelmezhetőség érdekében egy egyszerű, „labor-szerű” jelentés (tractus szinten diffúziós paraméter nő/csökken) és egy „fúziós felvétel” készül, melyen nagy felbontású T1 súlyozott –MPRAGE- felvételen kerülnek megjelenítésre a sérült tractusok. A PHP-bash execution segítségével a web server tudja irányítani a kiértékelő scriptet (indítás, megszakítás, beállítások stb.), feltöltött mérésekkel ellátni, illetve rendszerezve archiválni.

A web applikáció egy natív PHP alapú oldal, ami egy MVC rendszerben van kialakítva. Az így elkészített rendszer nem csupán stabilabb, mint a framework-based oldalak, de időtállóbb a frissítésekkel szemben, illetve később is könnyebben módosítható, karbantartható.

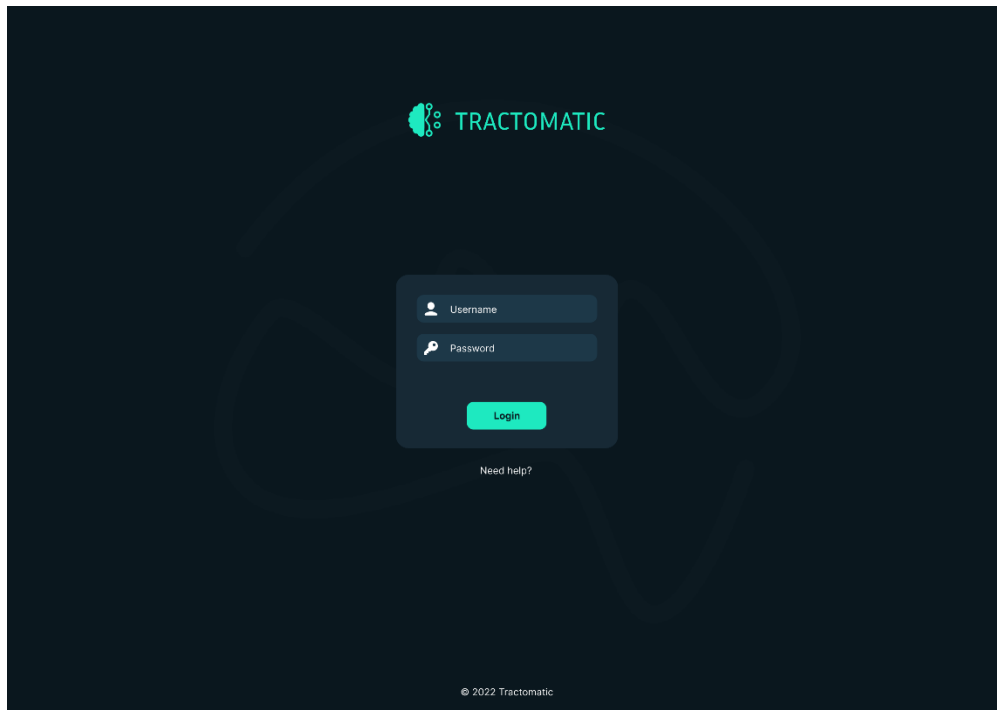
A „Tractomatic” nevet viselő rendszer főbb screenjei az alábbi ábrákon (19-24.) láthatók:



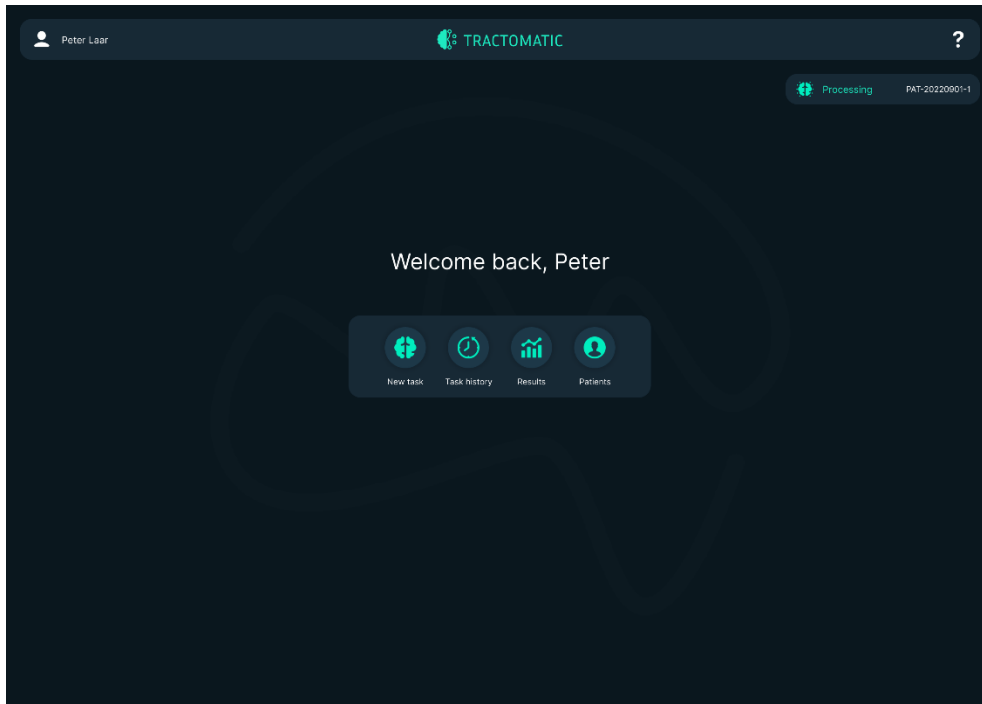
19. Ábra: A rendszer nyitó képernyője \*\*



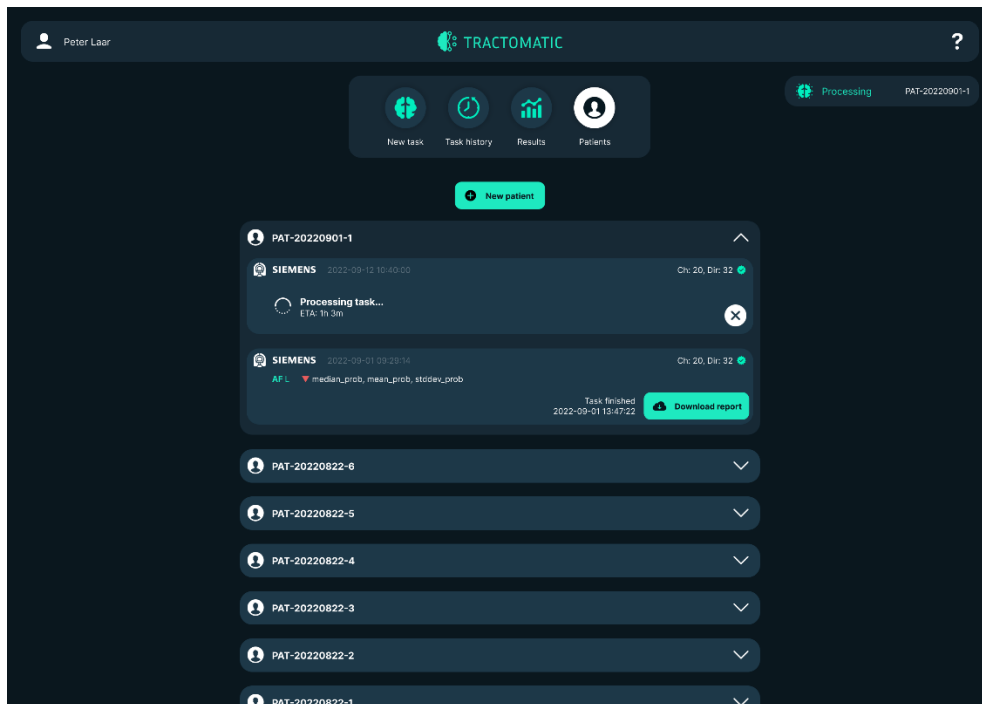
20. Ábra: Bejelentkezés a rendszerbe \*\*



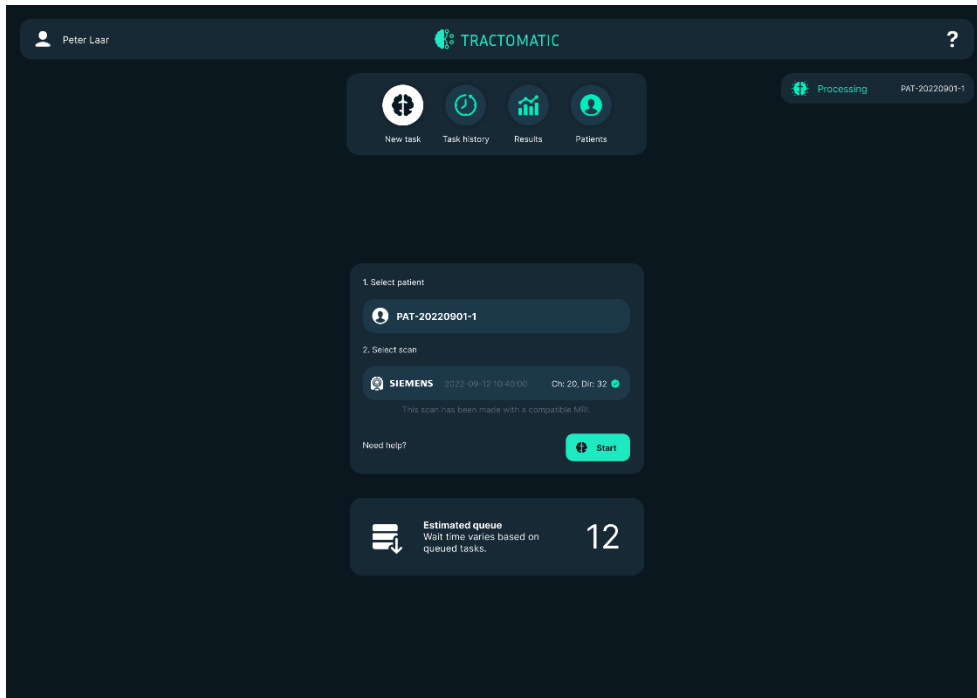
## 21. Ábra: A Tractomatic főmenüje \*\*



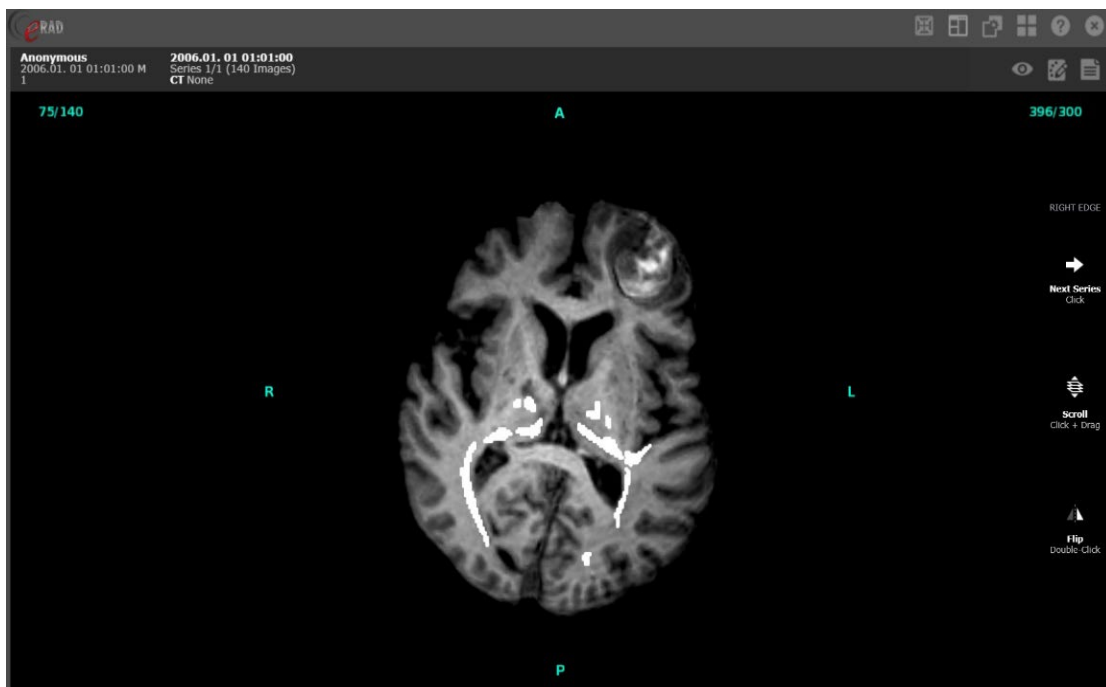
## 22. Ábra: A Tractomatic feladatlistája \*\*



## 23. Ábra: Aktív feladat \*\*



24. Ábra: az eRAD rendszerbe feltöltött DTI-MPRAGE fúziós felvétel melyen egy súlyos TBI betegünk, korra-nemre egyeztetett, megfelelő statisztikai erőt biztosító elemszámú (42) kontroll poolhoz képest  $\pm 2SD$ -t meghaladó FA és/vagy MD és/vagy AD és/vagy RD emelkedést vagy csökkenést mutató tractusok kerülnek megjelenítésre.



Jelenleg az egyéni, tractus szintű értékelés alapját képző –folyamatosan a megfelelő statisztikai erő eléréséig bővülő- adatbázisok:

1. Siemens MAGNETOM Prisma 20 csatornás tekercs, 30 irányos DTI (70 egészséges alany)
2. Siemens MAGNETOM Prisma 64 csatornás fej-nyak tekercs, 64 irányos DTI (eddig 27 alany)
3. Tervezzük továbbá az ingyenesen elérhető DTI adatbázisok (pl. UK Biobank) különböző MRI készülékeivel és szekvenciáival mért egészséges alanyok DTI kiértékelését, azokból minél több készülékre felállított adatbázisok létrehozását a készülő nyílt forráskódú szoftver minél szélesebb körű felhasználhatóságának érdekében.<sup>1</sup>

---

\*\* : Laár Péter, orvostanhallgató, programozó munkái

## 4 Diszkusszió

### 4.1 Diszkusszió I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban

Ez a keresztmetszeti, multimodális képalkotó vizsgálatokon alapuló retrospektív tanulmány lehetővé tette az általános átmeneti TMB láthatóságcsökkenés jelenségének közvetett validálását emberi SWI-vizsgálatokban. Az egyéni TMB-számot reprezentáló trendvonal a traumát követő körülbelül 21-80 óra között mutatta ki a detektálhatóság mélypontját. Gyakorlati megfontolások alapján ezeket az időpontokat a további elemzéshez 24 és 72 órára módosítottuk. A vizsgálat keresztmetszeti jellege miatt alapvető fontosságú volt az eredményeinket potenciálisan torzító tényezők jelenlétének ellenőrzése, kizárása. Sem a TBI súlyossága (mind a MAYO klasszifikáció, mind a Marshall-pontszám szerint), sem a makroszkópos patológiák eloszlása, az MRI készülék térerőssége, az életkor, a nemek eloszlása vagy bármely befolyásoló tényező nem különbözött szignifikánsan a vizsgált csoportok között, így ezek a csoportok ideálisnak bizonyultak a TBI és az SWI között eltelt idő TMB láthatóságra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A 24-72 órás időszakban a TMB-szám mediánja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a hiperakut (0-24 óra) vagy mint a 72< óra időszakban. Bár a TMB kialakulás a szakirodalom szerint szignifikánsan gyakoribb az idősebb betegek körében[128], alacsonyabb medián TMB-számot tapasztaltunk azokban a csoportokban, amelyekben az átlagéletkor magasabb volt.

Vizsgálatunk belső kontrolljaként a DAI mellett kialakuló ödéma markereiként fokális FLAIR hiperintenzitások előfordulását vizsgáltuk az idő múlásával, melyek száma nem különbözött szignifikánsan a vizsgált időszakban, ami arra utal, hogy TMB-specifikus jelenséggel állunk szemben. A FLAIR-léziókat szintén a DAI és a sérülés súlyosságának markereinek tekintik, és az akut és szubakut fázisban stabilabbak lehetnek, azonban korábbi tanulmányok szerint nem olyan specifikusak és nem kapcsolódnak egyértelműen a tényleges DAI mértékéhez és a prognózishoz mint a TMB-k[129, 130].

E vizsgálat eredményei egybevágóak korábbi eredményeinkkel: patkány modellünkben a TMB-k jelentős időbeli láthatóságcsökkenést mutattak SWI-n, gyakran teljesen láthatatlanná váltak a 24h-96h időszakban, miközben a mikrovérzések konzisztens jelenléte szövettanilag bizonyított volt.

Ezen korábbi tanulmányunk eredményei, vagyis a TMB akut időszakbeli legvalószínűbb magyarázata az alvadás során bekövetkező alvadék retrakció okozta voxel-szintű mágneses mező „újrahomogenizálódás” lehet, amely jelerősödést eredményez. A mikrovérzések újbóli megjelenése a hemoglobin késői bomlástermékeinek, mint a hemosiderin és a ferritin kialakulásával magyarázható, amelyekről ismert, hogy szuperparamágnesesek így erősebb jelkiesést okoznak[123].

Eredményeink alátámasztják a TMB-k morfológiai változásairól beszámoló korábbi esettanulmányokat SWI-n, továbbá egybeesnek Watanabe és munkatársai megfigyeléseivel melyek szerint a TMB láthatatlanná válása nagyjából a kialakulást követő 24 óra és hét nap között következhet be[131]. Továbbá egy tanulmányban, amely az agyi véráramlás változásaira összpontosított egy kísérleti zárt TBI patkánymodellben, a szerzők kiegészítőleg beszámoltak néhány olyan esetről, amelyekben a TMB-kkel egyező hipointenz fókuszok eltűntek, majd később újra megjelentek[132].

Ezen eredmények fő gyakorlati következménye, hogy az SWI a sérülést követő 24 és 72 óra között fals negatív lehet a TMB-k tekintetében. Betegeink felét (46-ból 23-at) ebben az időszakban vizsgáltuk. Ez a tény arra hívja fel a figyelmet, hogy legalábbis a mi intézményünkben jelentős az esélye annak, hogy a betegek MRI-vizsgálata a "csökkent TMB láthatóság" időszakában történik. Feltételezzük, hogy ez általános probléma lehet, mivel az MRI-t szinte mindig elektív módon, másodlagosan végzik a felvételi CT vizsgálatok, gyakran a TBI páciensek klinikai stabilizálódása után. Emellett megállapításunk nemcsak a TMB-kkel kapcsolatban, hanem minden olyan patológia akut vizsgálatára alkalmazható, amely képes fehérállományi mikrovérzéseket okozni. Bár a 1,5 T és a 3 T térerősségű felvételek aránya meglehetősen egyenletesen oszlott meg az időpontok között, az összes léziószámot figyelembe véve a 3 T valamivel több léziót detektált (131), mint a 1,5 T (117), ami alátámasztja azt a tényt, hogy a 3 T a képalkotás időzítésétől függetlenül nagyobb érzékenységgel rendelkezik a TMB-k detektálására.

E tanulmány fő korlátai az alacsony elemszám, amely a szigorú beválogatási kritériumainkból adódik, valamint az a kényszerű metodikai kompromisszum mi szerint TMB-k időbeli változásaira keresztmetszeti vizsgálatban voltunk kénytelenek következtetni. A TMB-k időbeli detektálhatóságbeli változásainak közvetlen vizsgálata csak egy longitudinális vizsgálat révén lett volna lehetséges. Sajnos a több időpontban végzett követéses MRI-vizsgálatok elvégzése TBI-ban,

különösen a súlyosan sérült betegek bevonásával szinte lehetetlen: bár maga az MRI biztonságos képalkotó technikának tekinthető, a viszonylag hosszú akvizíciós idő minimum kényelmetlen lehet a TBI-betegek számára, vagy akár kockázatot is jelenthet a súlyosan sérült betegek esetében a beteg és az aneszteziológiai/intenzív terápiás felszerelés szállítása miatt. Azonban a részletezett rendkívül szigorú beválogatási kritériumok és a képalkotást befolyásoló tényezők csoportok közti homogenitását bizonyító statisztikai vizsgálatok, melyek eredményeként az eltelt idő kivételével minden, a képalkotást befolyásolni képes tényezőt kizártunk, biztosítékai lehetnek eredményeink megbízhatóságának.

#### 4.2 Diszkusszió II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül

Keresztmetszeti, multimodális MRI vizsgálatunk a koponyatrauma hatására kialakuló mikrovérzések perilézióáris fehérállományának mikrostrukturális eltérései feltárását célozta. Képalkotó protokollunk nagy felbontású MPRAGE, FLAIR, SWI és DTI MRI modalitásokat tartalmazott. Három betegcsoport került vizsgálatra: TBI betegeink beválogatási kritériumai a negatív neurológiai, neuropszichológiai/ pszichiátriai és megelőző koponyatraumára nézve negatív anamnézis voltak. Korábban koponyatraumát nem szenvedett, azonban más indikációból SWI MRI-n átesett betegcsoportunkra, illetve kontroll alanyainkra szintén ezen beválogatási kritériumok teljesültek. A DTI szakirodalomban elfogadott  $\pm 3$  év életkorra egyeztetett három, egyenként 20 fős csoportot tudtunk kialakítani. Szakirodalmi adatok alapján korban azonos, férfi és nő alanyok csoportjai között, fehérállományi diffúziós paraméterek tekintetében megfigyelhető dimorfizmus a corpus callosum, a cingulum és a thalamus egyes területein, így ezeket a régiókat nem vizsgálatuk, a csoportokat csak korra egyeztettük [133, 134]. A TMB-k, nTMB-k és fokális FLAIR hiperintenzitások precíz definiálása érdekében, a felvételek nagy felbontású, jó szöveti kontraszttal rendelkező MPRAGE felvételekhez való úgy nevezett koregisztrációját hajtottuk végre. Az egyes léziók pontos elhelyezkedése, központi voxelük koordinátái, egyénekenkénti számuk és morfológiájuk rögzítésre került. A DTI felvételek postprocesszingsjét az FSL FDT moduljának segítségével, probabilisztikus modell alapján hajtottuk végre. Házi fejlesztésű FSL alapú programunk ezután rekonstruálta az előre beprogramozott azon fehérállományi pályákat melyek között eddig férfi és nő alanyokban nem mutattak ki különbséget, ezekből a teljes

fehérállományt rekonstruálta. A vérzéses és nem vérzéses fokális léziók kitakarásra kerültek, a perilezionáris fehérállomány FA, MD, AD és RD héjankénti átlagértékei egyénenként rögzítésre kerültek. Statisztikai elemzéshez egyénenként maximum három olyan fokális lézió került random beválogatásra egyénenként melyek ellenoldali identikus fehérállományi régióikban, illetve ugyanezen helyeken kontroll párjukban sem volt semmilyen elváltozás megfigyelhető, a fehérállomány minden felhasznált modalitás alapján egészségesnek tűnt. Normalitás teszt eredménye alapján a héjankénti, csoportok közti összehasonlítást ANOVA segítségével vizsgáltuk, a többszörös összehasonlítások véletlen szignifikáns eredményeit Benjamini-Hochberg FDR korrekció segítségével csökkentettük. Ezt a statisztikai kiértékelést a léziók minden variációjú beválogathatóságának megfelelően, de legalább 1000 iterációval megismételtük, a csoport szintű szignifikáns eltérések kontrollcsoporthoz viszonyított irányát, diffúziós paraméterenként, héjanként százalékosan rögzítettük.

TMB-k, ellenoldali identikus fehérállományi régióik és a kontrollcsoport között szignifikáns ( $\geq 90\%$  emelkedés vagy csökkenés), DAI-ra jellemző eltérések (FA csökkenés, MD, RD emelkedés) volt kimutatható a 3. héjtól (vagyis minimum 6mm-re a vizsgált fokális lézió középpontjától) míg a perilezionáris és ellenoldali fehérállományi régiók között nem találtunk szignifikáns eltérést. Traumás eredetű fokális ödémák esetén nagyarányú ( $\geq 90\%$ ) FA csökkenést nem, MD, RD emelkedést a 4. héjtól szintén megfigyeltünk. nTMB-k és nem traumás eredetű fokális ödémák körüli fehérállományban ilyen eltéréseket nem tudtunk feltárni. Ezen eredményeink a TBI hatására kialakuló axonális sérülés valóban diffúz jellegét hangsúlyozzák, fokális léziók körül nem, azoktól távolodva (az értékelésbe bevont voxelek számának növekedésével, a vizsgált terület volumenének növelésével) volt kimutatható markáns DTI eltérés.

Eredményeink összhangban vannak Rostowsky és munkatársai eredményeivel, melyek szerint a enyhe koponyatrauma hatására kialakult TMB-k körüli tractusokban voltak kimutatható DTI eltérések melyek a traumától számított hat hónap elteltével is megfigyelhetők voltak[135].

A TMB-k klinikai relevanciájával kapcsolatban a szakirodalom meglehetősen heterogén. Egyes tanulmányok a léziók számával, mások a morfológiával hozták összefüggésbe a DAI súlyosságát, a bevezetőben említett korábbi tanulmányunkban kutatócsoportunk is az agytörzsben elhelyezkedő TMB-k száma és a corona radiata csoport szinten kimutatható sérülése között mutatott ki összefüggést[82, 85, 129, 136]. Eredeti hipotézisünket azonban, miszerint a TMB-k



közvetlen közelében minden más fehérállományi területhez képest markánsabban mutatható ki DAI, az inkább a lézió középpontjától távolabb kimutatott mikrostrukturális eltérések, valamint az ellenoldali identikus, épnék tűnő fehérállomány DAI-ra utaló szignifikáns DTI eltérései miatt elvetettük. Ezen eredményeink alapján a TMB-k „stratégiai” jelentőségét, elhelyezkedésüknek, mint a szakirodalomban fellelhető eredmények heterogenitásának okát kizárhatjuk.

Az épnék tűnő fehérállomány konvencionális és SWI MRI modalitásokkal detektálhatatlan sérülésének okai a kutatócsoportunk által kisállat modellben feltárt, humán mérésekben is bizonyított TMB „eltűnés” jelensége, valamint a különböző képalkotó módszerek limitációiból fakadóan a nagyon kisméretű mikrovérzések detektálhatatlansága is lehetnek. Haller és munkatársai által a Radiology-ban publikált adatok szerint a postmortem hisztopatológiai vizsgálatok eredményeihez képest premortem képalkotás során a fehérállományi mikrovérzések csak mintegy fele kerül detektálásra[83].

Incidenciálisan felfedezett fehérállományi mikrovérzésekre pozitív, de korábbi TBI-t nem szenvedett kontrollcsoportunkban a peri nTMB-lézionáris és ellenoldali identikus lokalizációjú fehérállomány kontrollal szinte megegyező perifokális DTI paraméterei az nTMB-k szintén axonális károsodással nem társuló, tisztán microvascularis (mikrodisszekció, mikroaneurizma, mikrokalcifikáció) eredetét hangsúlyozzák.

Tanulmányunk egyik limitációja a szigorú beválogatási kritériumok, és az nTMB-k alacsony incidenciája okozta relatíve alacsony csoportonkénti alanyszám, azonban az alkalmazott bootstrapping algoritmusnak köszönhetően csoportjaink között így is megfelelő statisztikai erejű összehasonlításokat tudtunk végezni. Ezen túl a szakirodalomban fellelhető tanulmányok bevont alanyainak száma -a DTI postprocessingjének összetettsége és időigénye miatt- a 20 főt kevés esetben haladják meg. Másik fontos limitáció az inkább globális fehérállományi vizsgálatokra tervezett, alkalmazott DTI (20 csatornás fej-nyak tekercs, 32 irány) melynél pontosabb tractographiát, fehérállomány rekonstrukciót lehetővé tévő szekvenciák is elérhetők, azonban a robosztus fehérállomány rekonstrukció egyetlen lépése volt csupán kiértékelési algoritmusunknak, a perilézionáris DTI paraméterek vizsgálatára így is alkalmasnak bizonyult. Tanulmányunk limitációja továbbá, hogy TBI betegekben felfedezett TMB-k csak feltehetőleg TMB-k és lehetnek nTMB-k is, hiszen a vizsgálat keresztmetszeti volt. Ez ugyan így igaz az nTMB-re is. Ezen betegek

esetén is lehet, hogy az nTMB-k egy része korábbi minor traumák eredménye, amire az egyes alanyok akár nem is emlékeztek.

#### 4.3 Diszkusszió III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése

A diffúziós tenzor képalkotás az elmúlt két évtizedben számos érdekes megfigyelést hozott a különböző cerebrális patológiákban, ugyanakkor az eddigi feldolgozási ill. kiértékelési módszerek a napi gyakorlatban nehezen alkalmazhatók és kevésbé konkluzívak voltak. A fenti problémák egyik oka lehet, hogy az analitikai módszerek elnagyoltak és ezáltal a kimutatott patológiás elváltozások részletesen nem jellemezhetők.

Az NKFIH által kitűzött, Kooperatív Doktori Program keretein belül tehát azt a célt tűztük ki, hogy a klinikai idegtudományi képalkotó kutatásban rendkívül nagy szereppel bíró diffúziós tenzor képalkotás (DTI) végre az orvosi radiológiai gyakorlatban, rutinszerűen alkalmazhatóvá válhasson.

Ez korábban számos ok miatt nem volt elképzelhető, ezek közül kiemelendő a DTI nagy egyének közti variabilitása (mely ugyan a kellően homogenizált csoportok közötti statisztikai összehasonlítást és ez által fontos összefüggések feltárását lehetővé teszi, de az egyén szintjén való rutin értékelést ellehetetleníti) és a DTI kiértékelés dedikált szoftver-, hardver- és humán erőforrás igénye.

A fenti probléma áthidalására egy több lépcsőből álló tervet dolgoztunk ki. Ennek legfontosabb elemei: 1) A jelenleg rendelkezésre álló, kutatási környezetben DTI kiértékelésre használt legnaprakészebb szoftverek különböző moduljainak összefűzése-szinkronizálása-paraméterezése olyan módon, hogy a nyers DTI adatból automatikusan (akár asztali számítógépen futtatva „egy kattintással”) meg lehessen kapni, hogy melyik agypálya ill. fehérállományi anatómiai régió milyen DTI paraméterekkel bír. 2) ezzel a megközelítéssel egy nagy számú kontroll csoport kiértékelése, melyen belül alcsoportok képezhetők agyi DTI paramétereket ismertén jelentősen befolyásoló szempontok alapján (pl. életkor, nem, társbetegségek), majd ez alcsoportokra jellemző, az említett fehérállományi régiónkénti különböző DTI paraméterek átlagának és

eloszlásának meghatározása. 3) A fehérállományi régiókénti DTI paramétereket automatikusan meghatározó programunk továbbfejlesztése olyan módon, hogy a program nemcsak meghatározza a DTI paramétereket a rutin diagnosztikába érkező beteg számára, de össze is hasonlítja a korban nemben, társbetegségben legjobban illeszkedő „kontroll” csoporttal (ld. b pont) és vizuálisan könnyen értékelhető módon (rutin radiológiai leletezésbe illeszthetően) jelzi, ahol jelentős eltérés áll fenn. Sőt, a program azt is jelezné egyszerű vizuális módon (pl. régiókénti színekkel), hogy a fennálló különböző DTI paraméter eltérések együttesen értékelve (a szakirodalom alapján) milyen fehérállományi betegségekre jellemzőek. 4) a végső cél az volt, hogy a program egy adott intézmény képkezelő és leletező rendszerébe integrálásra kerüljön, olyan módon, hogy a kóros DTI értékeket fehérállományi régióként vizualizáló képsorozat a „hagyományos” MR képekkel együtt azonos felületen megtekinthető legyen.

A fenti célok elérése érdekében egy minél szélesebb életkort átfogó kontroll adatbázis felállítására volt szükségünk, továbbá szükséges volt a tractusonkénti minimum elemszám megbecslésére a megfelelő statisztikai erő eléréséhez: Korábbi OTKA és NAP keretein belül folytatott vizsgálatok során a PDK-ban ugyanazon (MPRAGE, DTI, FLAIR és SWI-t tartalmazó) protokoll szerinti MRI-n átesett 61 egészséges kontroll és 99 enyhe-középsúlyos-súlyos koponyatraumát szenvedett beteg probabilisztikus modell alapján rekonstruált 42 tractus FA, MD, AD és RD átlagértékei kerültek egyénenként meghatározásra (FSL- FMRIB Xtract és Xtractstats moduljai) és rögzítésre, a csoportok közti eltéréseket normalitás teszt alapján Mann-Whitney vagy Student's T-test segítségével vizsgáltuk. Az többszörös összehasonlításokból eredő fals-positív eredmények kiszűrése érdekében Benjamini-Hochber FDR korrekciót alkalmaztunk. Posthoc power analízis segítségével sikerült meghatároznunk a megfelelő statisztikai erő ( $1-\beta > 0,95$ ) eléréséhez szükséges elemszámot mely tractusonként átlagosan 42 fő TBI és 42 fő kontrollnak adódott.

Ezután a DTI felvételek postprocesszingsjét végző összetett algoritmus, az alkalmazott DTI-nek megfelelő paraméterezése, egyéni szintű automatikus lefutását biztosító program írása következett. A számítások lefutásának akár klinikumban is elfogadható sebessége elérése érdekében az FSL NVIDIA GPU-k CUDA core-okat is használni képes nyílt forráskódú moduljait sikerült a kiértékelés algoritmusába beépítenünk. Kontroll alanyaink tractus szintű átlag diffúziós paraméterei egy adatbázisban kerültek rögzítésre melyhez a továbbiakban +3 év életkor kereten belül egy adott vizsgálni kívánt beteg tractusainak átlagértékeit hasonlítani tudjuk. „Sérültnek”

értékeljük -a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet munkatársai javaslatára- a  $\pm 2SD$ -n kívül eső DTI paraméterekkel rendelkező tractusokat, mely DTI paraméter eltérések egy labor-szerű összefoglalóban és MPRAGE felvételre visszavetítve, fúziós formában is kijelzésre, megjelenítésre kerülnek. A fenti folyamatot a „Tractomatic” névre keresztelt, „drag-and-drop” egyszerűséggel működő, egyéni, tractus szintű DTI kiértékelést lehetővé tevő szoftverünk teszi lehetővé.

Tanulmányunk, szoftverfejlesztési projektünk jelenlegi limitációi a következők: Előtanulmányunkban nem a tractographianak legmegfelelőbb DTI-t alkalmaztuk azonban az Oxfordi Egyetem FMRIB (mely kutatócsoport a projektünk során felhasznált nyílt forráskódú MRI kiértékelő szofvercsomag, az FSL fejlesztői) és a PDK tudományos munkatársaival történt egyeztetés után meghatározásra került egy, a PDK Siemens MAGNETOM Prisma 3T MRI készülékével mérhető, céljainkhoz legoptimálisabb DTI szekvencia mellyel mért új kontrollcsoportunk felállítása jelenleg is zajlik. Továbbá előtanulmányunk korlátozott számú kontroll alany bevonását tette lehetővé, ennek megfelelően az összehasonlításokhoz nem minden „életkor ablak” -ban érhető el megfelelő statisztikai erőt biztosító alanyszám. Továbbá előtanulmányunkban átlagos tractus számot és az alapján szükséges kontroll alany számot állapítottunk meg, holott helyesebb lenne az egyes tractusok sérülékenységét is figyelembe venni és az alapján meghatározni a szükséges kontroll alany számot. Ez azonban már csak azért sem lehetséges mert, az előtanulmányban felhasznált TBI betegállományban sem tudjuk pontosan kimutatni melyik tractus milyen mértékben volt sérült (tekintve, hogy nem álltak rendelkezésünkre a traumát megelőző, alanyonkénti DTI mérések), könnyen belátható, hogy minél nagyobb mértékben sérült az adott tractus, annál alacsonyabb elemszám volt elegendő a megfelelő statisztikai erő eléréséhez), így még mindig a  $\pm 2 SD$  tűnik jelenleg az alkalmazható legjobb megoldásnak.

## 5 Konklúzió

### 5.1 Konklúzió I: TBI hatására kialakuló TMB-k jelintenzitás dinamikájának vizsgálata humán SWI vizsgálatokban

TMB-k időbeli MRI jelintenzitás változásainak vizsgálatát célzó retrospektív vizsgálatunk közvetve alátámasztja, hogy a rövid távú átmeneti TMB láthatóságcsökkenés nemcsak rágcsálókánál, hanem embernél is jelen van. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a TMB láthatóság csökkenése a TBI-t követő 24 és 72 óra között jelentkezik. A TMB-k kimutatására szolgáló MRI ebben az időszakban fals-negatív leleteket eredményezhet, ami a sérülés súlyosságának aluldiagnosztizálásához és a prognózis téves becsléséhez vezethet.

### 5.2 Konklúzió II.: A perilézióáris fehérállomány mikrostrukturális állapotának feltárása lokális DTI paraméter eltérések vizsgálatán keresztül

Eredményeink és szakirodalmi adatok alapján elmondhatjuk, hogy a TMB-k nem kolokalizálnak szorosan DAI-val, pontos klinikai relevanciájuk tisztázására további vizsgálatok szükségesek. A mikrovérzések hiánya nem feltétlenül jelenti az épnék tűnő fehérállomány valódi, mikrostrukturális sértetlenségét koponyatraumában. Eredményeink értelmezését megfordítva: feltehetőleg mind a traumás, mind a nem traumás eredetű mikrovérzések kialakulása szorosabb összefüggésben van a mikrovasculatura állapotával, sérülékenységgel, mint az axonok vulnerabilitásával, az axonsérülés mértékével. Ez, korábbi eredményeinkkel együtt tovább hangsúlyozza koponyatraumában az épnék tűnő fehérállomány vizsgálatának fontosságát akár egyéni, tractus szinten is, valamint, hogy a korábban a DAI fontos képző markérének tartott TMBk valójában inkább önálló microvascularis károsodások lehetnek, DAI-val nem kolokalizálnak, kialakulásuk és a DAI súlyossága közti pontos összefüggések feltárására további vizsgálatok szükségesek (vagy ezen hipotézis elvetendő)

### 5.3 Konklúzió III.: Egyéni, tractus szintű DTI alapú neuroradiológiai döntéstámogató szoftver fejlesztése

Az eredeti kutatási tervnek megfelelően sikerült egy automatikus DTI kiértékelést lehetővé tevő rendszert létrehoznunk melyet továbbfejlesztve alkalmassá válhat egyéni szintű DTI vizsgálatok elvégzésére.

## 6 Irodalomjegyzék

1. Capizzi, A., J. Woo, and M. Verduzco-Gutierrez, *Traumatic Brain Injury*. Medical Clinics of North America, 2020. **104**(2): p. 213-238.
2. Menon, D.K., et al., *Position statement: Definition of traumatic brain injury*, in *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2010, W.B. Saunders. p. 1637-1640.
3. Cheng, P.-L., et al., *Higher mortality rates among the elderly with mild traumatic brain injury: a nationwide cohort study*. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine, 2014.
4. Lu, J., et al., *Mortality from traumatic brain injury*. Acta neurochirurgica. Supplement, 2005. **95**: p. 281-5.
5. Susman, M., et al., *Traumatic brain injury in the elderly: increased mortality and worse functional outcome at discharge despite lower injury severity*. The Journal of trauma, 2002. **53**(2): p. 219-4.
6. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS medicine, 2006. **3**(11): p. e442-e442.
7. Selassie, A.W., et al., *Risk of posthospitalization mortality among persons with traumatic brain injury, South Carolina 1999-2001*. The Journal of head trauma rehabilitation. **20**(3): p. 257-69.
8. Langlois, J.A., W. Rutland-Brown, and M.M. Wald, *The epidemiology and impact of traumatic brain injury: A brief overview*, in *Journal of Head Trauma Rehabilitation*. 2006, Lippincott Williams and Wilkins. p. 375-378.
9. Langlois, J.A., W. Rutland-Brown, and M.M. Wald, *The Epidemiology and Impact of Traumatic Brain Injury*. Journal of Head Trauma Rehabilitation, 2006. **21**(5): p. 375-378.
10. Dutton, R.P., et al., *Trauma mortality in mature trauma systems: are we doing better? An analysis of trauma mortality patterns, 1997-2008*. The Journal of trauma, 2010. **69**(3): p. 620-6.
11. Csepregi, G., et al., *Management of patients with severe head injury in Hungary, in 2002*. Orvosi Hetilap, 2007. **148**(17): p. 771-777.
12. Cubon, V.A., et al., *A diffusion tensor imaging study on the white matter skeleton in individuals with sports-related concussion*. Journal of Neurotrauma, 2011. **28**(2): p. 189-201.
13. Keenan, H.T. and S.L. Bratton, *Epidemiology and outcomes of pediatric traumatic brain injury*. Developmental neuroscience, 2006. **28**(4-5): p. 256-63.
14. Thompson, H.J., W.C. McCormick, and S.H. Kagan, *Traumatic brain injury in older adults: epidemiology, outcomes, and future implications*. Journal of the American Geriatrics Society, 2006. **54**(10): p. 1590-5.
15. Roozenbeek, B., A.I.R. Maas, and D.K. Menon, *Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury*. Nature reviews. Neurology, 2013. **9**(4): p. 231-6.
16. Omalu, B., et al., *Postmortem Autopsy-Confirmation of Antemortem [F-18]FDG-PET Scans in a Football Player With Chronic Traumatic Encephalopathy*. Neurosurgery, 2018. **82**(2): p. 237-246.
17. Omalu, B.I., *Diagnosis of traumatic diffuse axonal injury*. Am J Forensic Med Pathol, 2004. **25**(3): p. 270; author reply 270-1.
18. Omalu, B.I., et al., *Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player*. Neurosurgery, 2005. **57**(1): p. 128-34; discussion 128-34.
19. Omalu, B.I., et al., *Chronic traumatic encephalopathy in a professional American wrestler*. J Forensic Nurs, 2010. **6**(3): p. 130-6.
20. Omalu, B.I., et al., *Chronic traumatic encephalopathy (CTE) in a National Football League Player: Case report and emerging medicolegal practice questions*. J Forensic Nurs, 2010. **6**(1): p. 40-6.

21. Lowenfels, A.B. and T.T. Miller, *Alcohol and trauma*. Annals of emergency medicine, 1984. **13**(11): p. 1056-60.
22. Shandro, J.R., et al., *Alcohol and risk of mortality in patients with traumatic brain injury*. The Journal of trauma, 2009. **66**(6): p. 1584-90.
23. Wagner, A.K., et al., *Intentional traumatic brain injury: epidemiology, risk factors, and associations with injury severity and mortality*. J Trauma, 2000. **49**(3): p. 404-10.
24. Brazinova, A., et al., *Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review*. Journal of Neurotrauma, 2021-04-27. **38**(10).
25. *Súlyos koponya-agy sérültek ellátása Magyarországon, 2002-ben = Management of patients with severe head injury in Hungary, in 2002 - REAL - az MTA Könyvtárának Repozitóriuma*.
26. Claus-W. Wallesch, N.C.S., *Outcome after mild-to-moderate blunt head injury: effects of focal lesions and diffuse axonal injury*. Brain Injury, 2001. **15**(5): p. 401-412.
27. Fleminger, S. and J. Pondsford, *Long term outcome after traumatic brain injury*. Br Med J, 2005.
28. I.L. H., et al., *Assessment of post traumatic confusion and outcome one year post injury*, in *Brain Injury*. 2012.
29. Zaloshnja, E., et al., *Prevalence of long-term disability from traumatic brain injury in the civilian population of the United States, 2005*. J Head Trauma Rehabil, 2008. **23**(6): p. 394-400.
30. Brown, A.W., et al., *Long-term survival after traumatic brain injury: a population-based analysis*. NeuroRehabilitation, 2004. **19**(1): p. 37-43.
31. Scholten, A.C., et al., *Traumatic brain injury in the netherlands: Incidence, costs and disability-adjusted life years*. PLoS ONE, 2014.
32. Berg, J., F. Tagliaferri, and F. Servadei, *Cost of trauma in Europe*. European journal of neurology, 2005. **12 Suppl 1**: p. 85-90.
33. Gustavsson, A., et al., *Cost of disorders of the brain in Europe 2010*. European Neuropsychopharmacology, 2011.
34. Hyder, A.A., et al., *The impact of traumatic brain injuries: A global perspective*. NeuroRehabilitation, 2007.
35. Gooch, C.L., E. Pracht, and A.R. Borenstein, *The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action*, in *Annals of Neurology*. 2017.
36. Graham, T. and J. Bryan, *Glasgow Coma Scale*. Lancet, 1974.
37. Sternbach, G.L., *The Glasgow Coma Scale*. The Journal of Emergency Medicine, 2000.
38. Malec, J.F., et al., *The mayo classification system for traumatic brain injury severity*. Journal of Neurotrauma, 2007. **24**(9): p. 1417-1424.
39. Ashton-Cleary, D.T. and M.R. Duffy, *Prone ventilation for refractory hypoxaemia in a patient with severe chest wall disruption and traumatic brain injury*. Br J Anaesth, 2011. **107**(6): p. 1009-10.
40. Stassen, W. and T. Welzel, *The prevalence of hypotension and hypoxaemia in blunt traumatic brain injury in the prehospital setting of Johannesburg, South Africa: A retrospective chart review*. S Afr Med J, 2014. **104**(6): p. 424-7.
41. Shannon, P., et al., *Axonal injury and the neuropathology of shaken baby syndrome*. Acta neuropathologica, 1998. **95**(6): p. 625-31.
42. Adams, J.H., et al., *Microscopic diffuse axonal injury in cases of head injury*. Medicine, science, and the law, 1985. **25**(4): p. 265-9.
43. Adams, J.H., et al., *The neuropathology of the vegetative state after head injury*. Journal of clinical pathology, 1999. **52**(11): p. 804-6.
44. Okonkwo, D.O. and J.T. Povlishock, *An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1999. **19**(4): p. 443-51.



45. Pettus, E.H. and J.T. Povlishock, *Characterization of a distinct set of intra-axonal ultrastructural changes associated with traumatically induced alteration in axolemmal permeability*. Brain Research, 1996.
46. Povlishock, J.T., et al., *Axonal change in minor head injury*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1983. **42**(3): p. 225-42.
47. Büki, A., et al., *Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury*. Journal of Neuroscience, 2000. **20**(8): p. 2825-2834.
48. Hawkins, A.S., et al., *Bax/VDAC binding occurs in relation to mitochondrial cytochrome C release and caspase-3 activation in traumatic axonal injury*. Journal of Neurotrauma, 2004. **21**(9): p. 1311-1311.
49. Stone, J.R., et al., *Use of fluorescent resonance energy transfer (FRET) microscopy to explore relationship of BAD/Bcl-xL interaction to cytochrome-c release and caspase-3 activation in traumatic axonal injury (TAI)*. Journal of Neurotrauma, 2003. **20**(10): p. 1065-1065.
50. Zanetti, N.C., D.R. Mitchell, and F.D. Warner, *Effects of Divalent-Cations on Dynein Cross Bridging and Ciliary Microtubule Sliding*. Journal of Cell Biology, 1979. **80**(3): p. 573-588.
51. Büki, A., et al., *The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 1999.
52. Czeiter, E., et al., *Calpain inhibition reduces axolemmal leakage in traumatic axonal injury*. Molecules, 2009.
53. Büki, A., et al., *The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 1999. **58**(4): p. 365-375.
54. Adams, J.H., et al., *Diffuse axonal injury in head injury: Definition, diagnosis and grading*. Histopathology, 1989. **15**(1): p. 49-59.
55. Gennarelli, T.A., J.H. Adams, and D.I. Graham, *Diffuse Axonal Injury — A New Conceptual Approach to an Old Problem*, in *Mechanisms of Secondary Brain Damage*. 1986, Springer US. p. 15-28.
56. Ding, K., et al., *Cerebral atrophy after traumatic white matter injury: Correlation with acute neuroimaging and outcome*. Journal of Neurotrauma, 2008. **25**(12): p. 1433-1440.
57. Mosenthal, A.C., et al., *Isolated traumatic brain injury: age is an independent predictor of mortality and early outcome*. The Journal of trauma, 2002. **52**(5): p. 907-11.
58. Paterakis, K., et al., *Outcome of patients with diffuse axonal injury: The significance and prognostic value of MRI in the acute phase*. Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care, 2000. **49**(6): p. 1071-1075.
59. Khan, F., I.J. Baguley, and I.D. Cameron, *4: Rehabilitation after traumatic brain injury*, in *Medical Journal of Australia*. 2003.
60. Javeed, F., et al., *Outcome of diffuse axonal injury in moderate and severe traumatic brain injury*. Surgical Neurology International, 2021. **12**.
61. Humble, S.S., et al., *Prognosis of diffuse axonal injury with traumatic brain injury*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, July 2018. **85**(1).
62. *Traumatic axonal injury, a clinical-pathological correlation*. Journal of Forensic and Legal Medicine, 2017/05/01. **48**.
63. Fleminger, S., *Neuropsychiatric Effects of Traumatic Brain Injury*. 2010: Psychiatric Times.
64. Carroll, L., et al., *Prognosis for mild traumatic brain injury: results of the who collaborating centre task force on mild traumatic brain injury*. Journal of Rehabilitation Medicine, 2004.
65. Jiang, J.-Y., et al., *Early indicators of prognosis in 846 cases of severe traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2002. **19**(7): p. 869-74.

66. van Eijck, M.M., et al., *Diffuse axonal injury after traumatic brain injury is a prognostic factor for functional outcome: a systematic review and meta-analysis*, in *Brain Injury*. 2018, Taylor and Francis Ltd. p. 395-402.
67. Abu Hamdeh, S., et al., *Extended Anatomical Grading in Diffuse Axonal Injury Using MRI: Hemorrhagic Lesions in the Substantia Nigra and Mesencephalic Tegmentum Indicate Poor Long-Term Outcome*. *Journal of Neurotrauma*, 2017.
68. Beauchamp, M.H., et al., *Detecting traumatic brain lesions in children: CT versus MRI versus susceptibility weighted imaging (SWI)*. *Journal of Neurotrauma*, 2011.
69. Benson, R.R., et al., *Detection of hemorrhagic and axonal pathology in mild traumatic brain injury using advanced MRI: Implications for neurorehabilitation*. *NeuroRehabilitation*, 2012. **31**(3): p. 261-279.
70. Hajnal, J.V., et al., *Use of fluid attenuated inversion recovery (Flair) pulse sequences in mri of the brain*. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 1992.
71. Mannion, R.J., et al., *Mechanism-based MRI classification of traumatic brainstem injury and its relationship to outcome*. *Journal of neurotrauma*, 2007. **24**(1): p. 128-35.
72. Moen, K.G., et al., *A longitudinal MRI study of traumatic axonal injury in patients with moderate and severe traumatic brain injury*. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 2012. **83**(12): p. 1193-200.
73. Moenninghoff, C., et al., *Diffuse axonal injury at ultra-high field MRI*. *PLoS ONE*, 2015. **10**(3).
74. Cheng, A.L., et al., *Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2\*-weighted gradient-recalled echo mri for detecting microbleeds*. *Stroke*, 2013.
75. Haacke, E.M., et al., *Susceptibility-weighted imaging: Technical aspects and clinical applications, part 1*, in *American Journal of Neuroradiology*. 2009.
76. Hsu, C.C.T., et al., *The T1 shine through effect on susceptibility weighted imaging: an under recognized phenomenon*, in *Neuroradiology*. 2018.
77. Huang, Y.-L., et al., *Susceptibility-weighted MRI in mild traumatic brain injury*. *Neurology*, 2015.
78. Liu, S., et al., *Susceptibility-weighted imaging: current status and future directions*. *NMR in Biomedicine*, 2017.
79. Fazekas, F., et al., *Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo T2\*- weighted MR images in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Evidence of microangiopathy-related microbleeds*. *American Journal of Neuroradiology*, 1999.
80. Goos, J.D.C., et al., *Clinical relevance of improved microbleed detection by susceptibility-weighted magnetic resonance imaging*. *Stroke*, 2011.
81. Greenberg, S.M., et al., *Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation*, in *The Lancet Neurology*. 2009.
82. Griffin, A.D., et al., *Traumatic microbleeds suggest vascular injury and predict disability in traumatic brain injury*. *Brain : a journal of neurology*, 2019.
83. Haller, S., et al., *Cerebral microbleeds: Imaging and clinical significance*, in *Radiology*. 2018, Radiological Society of North America Inc. p. 11-28.
84. Kim, B.J. and S.-H. Lee, *Cerebral Microbleeds: Their Associated Factors, Radiologic Findings, and Clinical Implications*. *Journal of Stroke*, 2013.
85. Lawrence, T.P., et al., *Early detection of cerebral microbleeds following traumatic brain injury using MRI in the hyper-acute phase*. *Neuroscience Letters*, 2017.
86. Liu, J., Z.F. Kou, and Y.Q. Tian, *Diffuse axonal injury after traumatic cerebral microbleeds: An evaluation of imaging techniques*, in *Neural Regeneration Research*. 2014.
87. Shams, S., et al., *SWI or T2\*: Which MRI sequence to use in the detection of cerebral microbleeds? The Karolinska Imaging Dementia Study*. *American Journal of Neuroradiology*, 2015.

88. Shams, S., et al., *Cerebral microbleeds: Different prevalence, topography, and risk factors depending on dementia diagnosis-the Karolinska imaging dementia study*. American Journal of Neuroradiology, 2015.
89. Vernooij, M.W., et al., *Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: The Rotterdam Scan Study*. Neurology, 2008.
90. Assaf, Y. and O. Pasternak, *Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: A review*, in *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008. p. 51-61.
91. Chen, J., et al., *Magnetic resonance diffusion tensor imaging for occult lesion detection in multiple sclerosis*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017. **13**(1): p. 91-96.
92. Chianca, V., et al., *Diffusion tensor imaging in the musculoskeletal and peripheral nerve systems: from experimental to clinical applications*, in *European Radiology Experimental*. 2017, Springer.
93. Cochrane, C.J. and K.P. Ebmeier, *Diffusion tensor imaging in parkinsonian syndromes: A systematic review and meta-analysis*, in *Neurology*. 2013, American Academy of Neurology. p. 857-864.
94. Ellingson, B.M., et al., *Diffusion tensor MR imaging in chronic spinal cord injury*. American Journal of Neuroradiology, 2008. **29**(10): p. 1976-1982.
95. Foerster, B.R., et al., *Diagnostic accuracy of diffusion tensor imaging in amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and individual patient data meta-analysis*. Academic Radiology, 2013. **20**(9): p. 1099-1106.
96. Gross, D.W., *Diffusion tensor imaging in temporal lobe epilepsy*. Epilepsia, 2011. **52**(SUPPL. 4): p. 32-34.
97. Hagmann, P., et al., *Understanding Diffusion MR Imaging Techniques: From Scalar Diffusion-weighted Imaging to Diffusion Tensor Imaging and Beyond*. RadioGraphics, 2006.
98. Jang, S.H., *A review of diffusion tensor imaging studies on motor recovery mechanisms in stroke patients*, in *NeuroRehabilitation*. 2011, NeuroRehabilitation. p. 345-352.
99. Jang, S.H., *Diffusion tensor imaging studies on arcuate fasciculus in stroke patients: A review*, in *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013, Frontiers Media S. A.
100. Jang, S.H., et al., *Corticospinal tract injury in patients with diffuse axonal injury: a diffusion tensor imaging study*. NeuroRehabilitation, 2009. **25**(4): p. 229-33.
101. Kolbe, S.C., et al., *Serial Diffusion Tensor Imaging of the Optic Radiations after Acute Optic Neuritis*. Journal of Ophthalmology, 2016. **2016**.
102. Le Bihan, D., et al., *Diffusion tensor imaging: Concepts and applications*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2001. **13**(4): p. 534-546.
103. Li, J.P., et al., *A meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in amyotrophic lateral sclerosis*, in *Neurobiology of Aging*. 2012, Neurobiol Aging. p. 1833-1838.
104. Liao, Y., et al., *Is depression a disconnection syndrome? Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in patients with MDD*. Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2013. **38**(1): p. 49-56.
105. Müller, H.P., et al., *A large-scale multicentre cerebral diffusion tensor imaging study in amyotrophic lateral sclerosis*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 2016. **87**(6): p. 570-579.
106. O'Donnell, L.J. and C.F. Westin, *An introduction to diffusion tensor image analysis*, in *Neurosurgery Clinics of North America*. 2011, NIH Public Access. p. 185-196.
107. Otte, W.M., et al., *A meta-analysis of white matter changes in temporal lobe epilepsy as studied with diffusion tensor imaging*. Epilepsia, 2012. **53**(4): p. 659-667.
108. Papanikolaou, N., et al., *Fractional anisotropy and mean diffusivity measurements on normal human brain: comparison between low-and high-resolution diffusion tensor imaging sequences*. European radiology, 2006.

109. Rovaris, M., et al., *Diffusion Tensor MR Imaging*, in *Neuroimaging Clinics of North America*. 2009. p. 37-43.
110. Rovaris, M. and M. Filippi, *Diffusion tensor MRI in multiple sclerosis*. *Journal of Neuroimaging*, 2007. **17**(SUPPL. 1).
111. Singh, M., et al., *Novel diffusion tensor imaging methodology to detect and quantify injured regions and affected brain pathways in traumatic brain injury*. *Magnetic Resonance Imaging*, 2010. **28**(1): p. 22-40.
112. Soares, J.M., et al., *A hitchhiker's guide to diffusion tensor imaging*. *Frontiers in Neuroscience*, 2013.
113. Stebbins, G.T. and C.M. Murphy, *Diffusion tensor imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment*. *Behavioural Neurology*, 2009. **21**(1-2): p. 39-49.
114. Stieltjes, B., et al., *Diffusion tensor imaging and axonal tracking in the human brainstem*. *NeuroImage*, 2001. **14**(3): p. 723-735.
115. Stoeter, P., P.R. Dellani, and G. Vucurevic, *Diffusion tensor imaging of cerebral white matter*, in *Clinical Neuroradiology*. 2008. p. 155-162.
116. Strauss, S., et al., *Current clinical applications and future potential of diffusion tensor imaging in traumatic brain injury*, in *Topics in Magnetic Resonance Imaging*. 2015, Lippincott Williams and Wilkins. p. 353-362.
117. Teipel, S.J., et al., *Diffusion tensor imaging in Alzheimer's disease and affective disorders*. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 2014. **264**(6): p. 467-483.
118. Wang, J.Y., et al., *Diffusion tensor tractography of traumatic diffuse axonal injury*. *Archives of Neurology*, 2008. **65**(5): p. 619-626.
119. Xu, J., et al., *Diffuse axonal injury in severe traumatic brain injury visualized using high-resolution diffusion tensor imaging*. *Journal of Neurotrauma*, 2007. **24**(5): p. 753-765.
120. Toth, A., et al., *Both hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic MRI lesions are associated with the microstructural damage of the normal appearing white matter*. *Behavioural Brain Research*, 2018. **340**: p. 106-116.
121. Toth, A., et al., *Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: Can we see the difference?* *Journal of Neurotrauma*, 2013. **30**(1): p. 2-10.
122. Toth, A., et al., *Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury*. *Neuroscience Letters*, 2016. **617**.
123. Tóth, A., et al., *Cerebral Microbleeds Temporarily Become Less Visible or Invisible in Acute Susceptibility Weighted Magnetic Resonance Imaging: A Rat Study*. *Journal of Neurotrauma*, 2019. **36**(10): p. 1670-1677.
124. M, H., et al., *Accelerating fibre orientation estimation from diffusion weighted magnetic resonance imaging using GPUs*. *PloS one*, 2013. **8**(4).
125. M, H.-F., et al., *Using GPUs to accelerate computational diffusion MRI: From microstructure estimation to tractography and connectomes*. *NeuroImage*, 2019. **188**: p. 598-615.
126. Jbabdi, S., et al., *Model-based analysis of multishell diffusion MR data for tractography: How to get over fitting problems*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2012. **68**(6): p. 1846-1855.
127. Hernandez-Fernandez, M., et al., *Using GPUs to accelerate computational diffusion MRI: From microstructure estimation to tractography and connectomes*. *NeuroImage*, 2019. **188**: p. 598-615.
128. Toth, L., et al., *Traumatic brain injury-induced cerebral microbleeds in the elderly*. *GeroScience*, 2020.
129. Trifan, G., et al., *MR imaging findings in mild traumatic brain injury with persistent neurological impairment*. *Magnetic Resonance Imaging*, 2017.

130. Spitz, G., et al., *Detecting lesions after traumatic brain injury using susceptibility weighted imaging: A comparison with fluid-attenuated inversion recovery and correlation with clinical outcome*. Journal of Neurotrauma, 2013.
131. Watanabe, J., et al., *Transient disappearance of microbleeds in the subacute period based on T2\*-weighted gradient echo imaging in traumatic brain injury*. Acta Neurochirurgica, 2016.
132. Kallakuri, S., et al., *Traumatic Brain Injury by a Closed Head Injury Device Induces Cerebral Blood Flow Changes and Microhemorrhages*. Journal of clinical imaging science, 2015.
133. T, V., et al., *Sex matters: association between callous-unemotional traits and uncinate fasciculus microstructure in youths with conduct disorder*. Brain Imaging and Behavior, 2022. **16**(1).
134. S, B., et al., *Sex differences in adolescent white matter architecture*. Brain Research, 2011. **1375**.
135. *Macroscale White Matter Alterations Due to Traumatic Cerebral Microhemorrhages Are Revealed by Diffusion Tensor Imaging - PubMed*. Frontiers in neurology, 11/13/2018. **9**.
136. Raizman, R., et al., *Traumatic Brain Injury Severity in a Network Perspective: A Diffusion MRI Based Connectome Study*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1-12.

## 7 A disszertáció alapjául szolgáló eredeti közlemények, tudományos közlemények és kongresszusi összefoglalók jegyzéke, témavezetői, egyéb tudományos teljesítmény

### **Publikációk:**

MTMT azonosító: 10074097

Összes eredeti közlemények száma: 6

Össz **IF=27,4**, független idézetek száma **69** (összes idézetek száma: 77), H-index: **4**

### **A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények:**

Környei, Bálint S. ✉ ; Szabó, Viktor ; Perlaki, Gábor ; Balogh, Bendegúz ; Szabó Steigerwald, Dorottya K. ; Nagy, Szilvia A. ; Tóth, Luca ; Büki, András ; Dóczi, Tamás ; Bogner, Péter et al.  
Cerebral Microbleeds May Be Less Detectable by Susceptibility Weighted Imaging MRI From 24 to 72 Hours After Traumatic Brain Injury

FRONTIERS IN NEUROSCIENCE 15 Paper: 711074 , 13 p. (2021)

Toth, Arnold ✉ ; Berente, Zoltán ; Bogner, Péter ; Környei, Bálint ; Balogh, Bendegúz ; Czeiter, Endre ; Amrein, Krisztina ; Dóczi, Tamás ; Buki, Andras ; Schwarcz, Attila  
Cerebral microbleeds temporarily become less visible or invisible in acute susceptibility weighted magnetic resonance imaging : a rat study

JOURNAL OF NEUROTRAUMA 36 : 10 pp. 1670-1677. , 8 p. (2019)

Toth, A ✉ ; Környei, B ; Kovacs, N ; Rostas, T ; Buki, A ; Doczi, T ; Bogner, P ; Schwarcz, A  
Both hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic MRI lesions are associated with the microstructural damage of the normal appearing white matter.

BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH 340 pp. 106-116. , 11 p. (2018)

Toth, Arnold ✉ ; Kovacs, Noemi ; Tamas, Viktoria ; Környei, Balint ; Nagy, Mate ; Horvath, Andrea ; Rostas, Tamas ; Bogner, Peter ; Janszky, Jozsef ; Doczi, Tamas et al.

Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury

NEUROSCIENCE LETTERS 617 pp. 207-212. , 6 p. (2016)

A dolgozatban szereplő szoftvert a PTE Innovációs Bizottsága **1/2024.02.14.** számú határozatában **know-howként** befogadta, és a PTE szellemi termék portfóliójába történő beillesztését határozta el.

### **A dolgozat témájához köthető előadások:**

#### Fontosabb szakmai konferenciák:

##### **Hazai:**

Magyar Radiológus Társaság XXX. Kongresszusa- elsőszerzős előadás: A fehérállományi mikrovérzések és a fehérállomány mikrostrukturális állapota közti összefüggések vizsgálata koponyatraumában

Magyar Neuroradiológiai Társaság Kongresszusa, Mátraháza 2019- elsőszerzős előadás

Magyar Radiológusok Társasága XXIX. Kongresszusa, Pécs 2018- elsőszerzős előadás

Pécsi Intervenciós Radiológiai Szimpózium 2019- elsőszerzős előadás

Magyar Neuroradiológiai Társaság Kongresszusa, Hajdúszoboszló 2014- társszerzőség előadásban

Magyar Neuroradiológiai Társaság Kongresszusa, Eger 2016- társszerzőség előadásban

##### **Külföldi**

International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) Conference, Honolulu, HI, USA 2017- társszerzőség poszterben

12th Slovenian- Croatian-Hungarian-Slovakian Radiological Symposium- Ragaska Slatina

7th Pannonian Symposium on CNS Injury, Pécs 2017- társszerzőség poszterben

International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) Conference, Párizs 2018- társszerzőség poszterben

European Congress of Radiology, Bécs 2018- társszerzőség poszterben

European Congress of Radiology, Bécs 2022- elsőszerzős poszter

European Congress of Radiology, Bécs 2022- társszerzőség poszterben

European Congress of Radiology, Bécs 2023 -utolsó szerző poszterben

**Tudományos, szakmai elismerések, díjak, ösztöndíjak:**

-PTE ÁOK Kiváló Szerző 2022

-Pro Scientia Aranyérem 2019

-PTE ÁOK Mestyán Gyula Díj

-European Congress of Radiology- European Society for Hybrid, Molecular and Translational Imaging: Best of Subspeciality Poster

-Astellas Pharma Kft. Astellas Ifjú Kutató Program- „Astellas Díj” – 2016

-Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj 2020-2023

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2023/24-es tanév

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2021/22-es tanév

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2020/21-es tanév

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2019/20-as tanév

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2018/19-as tanév

-Új Nemzeti Kiválóság Program- Nemzeti Felsőoktatási Kiválóság Ösztöndíj 2017/18-as tanév



## **TDK témavezetői tevékenység:**

4 TDK téma (3 magyar, egy angol nyelvű) témavezetése

összesen 9 (2023-ban párhuzamosan 6) TDK hallgató témavezetése

5 szakdolgozat témavezetése (ebből 1 a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemen),

2 a PTE ÁOK-n Dékáni Pályamunkaként is beadásra került

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Tudományos Diákköri Konferencia 2021-

Magos Zsolt 1. helyezés

PTE ÁOK és GyTK Házi TDK Konferencia 2022: Laith Musharbash II. helyezés

HMAA Füred 2022 Congress: Petneházy Zalán -Excellence in Radiology Award, Ivan Krisztinicz

Award (szekció és abszolút első helyezés)

PTE ÁOK és GyTK Házi TDK Konferencia 2023: Bognár Dávid 2. helyezés

PTE ÁOK és GyTK Házi TDK Konferencia 2023: Bognár Dávid 3. helyezés

PTE ÁOK és GyTK Házi TDK Konferencia 2023: Laár Péter 1. helyezés

PTE ÁOK és GyTK Házi TDK Konferencia 2023: Petneházy Zalán 2. helyezés

36. Országos Tudományos Diákköri Konferenciát, melyen az Orvos- és Egészségtudományi

Szekció: Laár Péter 2. helyezés

36. Országos Tudományos Diákköri Konferenciát, melyen az Orvos- és Egészségtudományi

Szekció: Bognár dávid 1. helyezés

36. Országos Tudományos Diákköri Konferenciát, melyen az Orvos- és Egészségtudományi

Szekció:

Petneházy Zalán 1. helyezés

PTE Kriszbacher Ildikó Ösztöndíj 2022-2023-as tanév - Bognár Dávid

PTE ÁOK MD-PhD programba felvételt nyert hallgatók (Bognár Dávid, Petneházy Zalán)

témavezetése

### **Egyéb tudományos tevékenység:**

Felkért bíráló:

European Radiology (D1, IF=4.01), American Journal of Neuroradiology (Q1, IF= 3,653),  
Neuroradiology (Q1, IF=2.8), Acta Neurologica Scandinavica (Q2, IF=3,9) Ideggyógyászati  
Szemle (Q4 IF=0,4)

### **Tudományos-közösségi tevékenység a PhD képzés alatt:**

- PTE KK Orvosi Képző Klinikai TDK felelős 2020-
- Amerikai Magyar Orvosszövetség (HMAA)- hallgatói kapcsolattartó 2014-től, konferencia koordinátor 2016-2018, Tanácsadó Testületi tag: 2023-
- PTE ÁOK Romhányi György Szakkollégium -tag 2021-2023, konferencia főszervező 2022.

## 8 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani TDK és PhD témavezetőimnek, Dr. Tóth Arnoldnak, Prof. Dr. Bogner Péternek és Prof. Dr. Schwarcz Attilának. Külön köszönettel tartozom támogatásáért, útmutatásáért Dóczi Tamás Professzor Úrnak és a Transzlációs Idegtudományi Nemzeti Laboratóriumnak amiért lehetőséget kaptam, kaptunk kutatásaink, szoftverfejlesztési projektünk folytatására, kiterjesztésére. Köszönettel tartozom továbbá munkatársaimnak, mentoraimnak, Dr. Nagy Szilviának, Dr. Orsi Gergőnek, Dr. Perlaki Gábornak, Dr. Czeiter Endrének, Amrein Krisztinának és Dr. Balogh Bendegúznak valamint a PDK minden dolgozójának aki segítette kutatásainkat. Kiemelt köszönettel tartozom témavezetettjeim közül Dr. Bognár Dávidnak, Laár Péternek, Petneházy Zalánnak, Dr. Magos Zsoltnak és Dr. Laith Musharbashnak kimagasló munkabírárukért, teljesítményükért és eredményeikért. Köszönet illeti az Új Nemzeti Kiválóság Programot és a Kooperatív Doktori Programot, megtisztelő volt ösztöndíjasként részt venni bennük.

Végül de nem utolsó sorban a legnagyobb köszönet természetesen családomat illeti, Dr. Szabó Steigerwald Dorottya páromként és munkatársamként is mindig támogattott. Szeretném megköszönni a támogatást családomnak, Édesapámnak és Édesanyámnak, nagyszüleimnek és testvéreimnek, akik nélkül e dolgozat sosem készült volna el.

## 9 A disszertáció alapjául szolgáló eredeti közlemények



# Cerebral Microbleeds May Be Less Detectable by Susceptibility Weighted Imaging MRI From 24 to 72 Hours After Traumatic Brain Injury

Bálint S. Környei<sup>1\*</sup>, Viktor Szabó<sup>2</sup>, Gábor Perlaki<sup>2,3</sup>, Bendegúz Balogh<sup>1</sup>, Dorottya K. Szabó Steigerwald<sup>1</sup>, Szilvia A. Nagy<sup>3,4,5</sup>, Luca Tóth<sup>2</sup>, András Büki<sup>2</sup>, Tamás Dóczy<sup>2</sup>, Péter Bogner<sup>1</sup>, Attila Schwarcz<sup>2†</sup> and Arnold Tóth<sup>1,6†</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Imaging, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Department of Neurosurgery, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Pécs Diagnostic Center, Pécs, Hungary, <sup>4</sup> Neurobiology of Stress Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>5</sup> Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>6</sup> MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Pécs, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Xiao Liu,  
The Pennsylvania State University  
(PSU), United States

### Reviewed by:

Xinyuan Miao,  
Johns Hopkins University,  
United States  
Adil Bashir,  
Auburn University, United States

### \*Correspondence:

Bálint S. Környei  
balint.kornyei@gmail.com

† These authors share last authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Brain Imaging Methods,  
a section of the journal  
Frontiers in Neuroscience

Received: 17 May 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 30 September 2021

### Citation:

Környei BS, Szabó V, Perlaki G, Balogh B, Szabó Steigerwald DK, Nagy SA, Tóth L, Büki A, Dóczy T, Bogner P, Schwarcz A and Tóth A (2021) Cerebral Microbleeds May Be Less Detectable by Susceptibility Weighted Imaging MRI From 24 to 72 Hours After Traumatic Brain Injury. *Front. Neurosci.* 15:711074. doi: 10.3389/fnins.2021.711074

**Purpose:** A former rodent study showed that cerebral traumatic microbleeds (TMBs) may temporarily become invisible shortly after injury when detected by susceptibility weighted imaging (SWI). The present study aims to validate this phenomenon in human SWI.

**Methods:** In this retrospective study, 46 traumatic brain injury (TBI) patients in various forms of severity were included and willingly complied with our strict selection criteria. Clinical parameters potentially affecting TMB count, Rotterdam and Marshall CT score, Mayo Clinic Classification, contusion number, and total volume were registered. The precise time between trauma and MRI [5 h 19 min to 141 h 54 min, including SWI and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR)] was individually recorded; TMB and FLAIR lesion counts were assessed. Four groups were created based on elapsed time between the trauma and MRI: 0–24, 24–48, 48–72, and >72 h. Kruskal–Wallis, ANOVA, Chi-square, and Fisher's exact tests were used to reveal differences among the groups within clinical and imaging parameters; statistical power was calculated retrospectively for each comparison.

**Results:** The Kruskal–Wallis ANOVA with Conover *post hoc* analysis showed significant ( $p = 0.01$ ;  $1 - \beta > 0.9$ ) median TMB number differences in the subacute period: 0–24 h = 4.00 ( $n = 11$ ); 24–48 h = 1 ( $n = 14$ ); 48–72 h = 1 ( $n = 11$ ); and 72 h  $\leq 7.5$  ( $n = 10$ ). Neither clinical parameters nor FLAIR lesions depicted significant differences among the groups.

**Conclusion:** Our results demonstrate that TMBs on SWI MRI may temporarily become less detectable at 24–72 h following TBI.

**Keywords:** SWI MRI, traumatic brain injury, diffuse axonal injury, white matter, microbleeds, SWI, TMB

**Abbreviations:** DAI, diffuse axonal injury; FA, fractional anisotropy; FA-SPM, fractional anisotropy images analyzed by statistical parametric mapping; FLIRT, FMRIB's Linear Image Registration Tool; TBI, traumatic brain injury; TMB, traumatic microbleed; UP MS, University of Pécs, Medical School.

## INTRODUCTION

Traumatic brain injury (TBI) has become a devastating health problem in developed countries (Cole, 2004; Keenan and Bratton, 2006; Mathers and Loncar, 2006; Thompson et al., 2006; Chiu et al., 2007). TBI affects healthy, young, and often employed individuals, resulting in a heavy burden placed on society in both sociological and economic context (Berg et al., 2005; Lu et al., 2005; Keenan and Bratton, 2006; Tagliaferri et al., 2006; Thompson et al., 2006). Diffuse axonal injury (DAI) caused by shear forces due to acceleration and deceleration of brain compartments of different consistency during an accident is a common pathological factor regarding TBI (Moeninghoff et al., 2015; McGinn and Povlishock, 2016). DAI has been found in all severities of TBI and is referenced as an important determining factor regarding severity and outcome (Tang et al., 2012; Blennow et al., 2016). DAI encompasses a vast spectrum, dependent upon the severity and extent of injury, which can acutely manifest as immediate loss of consciousness or confusion resulting in a coma and/or cognitive dysfunction, or in other circumstances leads to reversible impairments to full axonal disruption (Gennarelli et al., 1986). A specific imaging marker regarding DAI will likely contribute to (1) early diagnosis and severity assessment, (2) timely onset of rehabilitation, (3) estimation of return to normal activity, (4) improved patient management, and (5) effectively following up on the patients' condition and assuring the efficacy of the applied therapy (Paterakis et al., 2000; Wallesch et al., 2001). Currently, DAI is considered an exclusionary diagnosis; conventional imaging techniques are considered not to be sensitive enough to fully visualize it (Gennarelli et al., 1986). Certain modern MRI techniques however are capable of detecting pathological components regarding DAI (Blitstein and Tung, 2007; Sharma et al., 2018).

Functional MRI, diffusion tensor imaging (DTI), or MR spectroscopy promises a comprehensive understanding of DAI; however, these methods are mostly applicable in the form of statistical group analysis. To date, their individual routine clinical application is not entirely clarified (Kumar et al., 2009; Asano et al., 2012; Toth et al., 2013). T2 × MRI techniques—sensitive in visualizing magnetic susceptibility—are capable of visualizing microscopic bleeding; among them, susceptibility weighted imaging (SWI) is reported to be the most sensitive (Haacke et al., 2009; Mittal et al., 2009; Cheng et al., 2013).

By definition, traumatic microbleeds (TMBs) in SWI appear as ovoid or curvilinear hypointensities localized in the white matter (WM), mostly at the WM–gray matter (WM-GM) junction, in the brainstem, or in the corpus callosum and the region of the basal ganglia. Imaging of TMBs is indeed challenging: their visibility and number are influenced by numerous clinical and technical factors (e.g., age, SWI field strength, SWI slice thickness, TBI severity, and neurological comorbidities) (Parizel et al., 2001; Ripoll et al., 2003; Greenberg et al., 2009).

Although TMBs are reportedly potential markers of DAI (Di Ieva et al., 2015), there is a lack of consensus regarding how DAI exactly relates to hemorrhagic lesions. A DTI study implies that DAI may develop without focal MRI lesions in TBI (Kumar et al., 2009) and that DTI is also capable of revealing minute lesions of

the WM and deep brain structures, which may not be visualized on T2 × GRE or fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images (Asano et al., 2012; Spitz et al., 2013). According to an increasing number of studies, hemorrhagic lesion localization seemingly is more important than the overall number associated with DAI severity assessment (Toth et al., 2018; Andreasen et al., 2019). Based on histological analysis of one patient, a very recent study suggests DAI does not co-localize with TMBs (Griffin et al., 2019). Nevertheless, nearly all studies concur that a certain number, form, or localization of TMBs are associated with more severe injuries and less favorable outcomes; therefore, their detection is of clinical importance (Beauchamp et al., 2013; Kim and Lee, 2013; Yuh et al., 2013; Akoudad et al., 2016; de Haan et al., 2017; van der Horn et al., 2018). Interestingly, some human case studies reported significant temporal changes regarding TMB morphology in the acute to subacute phase following injury, yet it was unclear if these changes mean only changes in appearance, or true biophysical–biochemical changes in reference to the hemorrhages (Ezaki et al., 2006; Kallakuri et al., 2015; Toth et al., 2016; Watanabe et al., 2016; Lawrence et al., 2017).

In our recent study, we managed to better understand this phenomenon based on a rodent cerebral microbleed model: surgically created artificial microscopic WM bleedings showed a significant and transient intensity increase (i.e., decrease in visibility) between 24 and 96 h following surgery. Additionally, 69% of the lesions became “invisible,” i.e., isointense to the WM, which was followed by a reappearance. Histology confirmed that microbleeds were present at every time point when MRI measurements were made; therefore, we regarded this phenomenon to be due to changes in biophysical properties of microbleeds. We concluded that the timing of SWI may be critical to avoid false-negative results (Tóth et al., 2019). Additionally, the relative inconsistency in previous studies regarding the clinical applicability of SWI MRI in TBI may be explained by our findings. In the present study, we aimed to reveal if such transient reduction in TMB visibility occurs in humans as well, and we aimed to define the typical time frame of this phenomenon.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

A total of 195 adults with closed TBI, compliant to our MRI protocol, were initially included retrospectively from a prospectively collected observational cohort at UP Clinical Center Department of Neurosurgery and Pécs Diagnostic Center. A crucial criterion was precise TBI time documentation. Additionally, the exact time of admission, and CT and MRI acquisition were also recorded. Exclusion criteria included any diagnoses of comorbidities capable of causing WM TMBs [e.g., fat embolism, chronic hypertension, cerebral amyloid angiopathy, cavernous malformations, epilepsy, Alzheimer's disease, dementia or migraine, brain tumor, or cerebral metastasis (Susman et al., 2002; Nakata-Kudo et al., 2006; Brain Trauma Foundation et al., 2007; Haacke et al., 2007; Oh et al., 2008; Ayaz et al., 2010; Beauchamp et al., 2013; Kim and Lee, 2013;

Nakagami et al., 2014; Shams et al., 2015; Yamauchi et al., 2016; Trifan et al., 2017)] based on patient medical records. Grubbs' test was applied to exclude patients with outlier TMB numbers. **Figure 1** shows our algorithm and criteria of inclusion and exclusion.

The final number of patients eventually was narrowed to 46 cases who were eligible for the study [37 male and nine female; 6 symptomatic, eight mild, and 32 severe according to the Mayo Clinic Classification of Traumatic Brain Injury (Malec et al., 2007)]. Investigations were carried out compliant to the rules of the Declaration of Helsinki, and ethical approval was granted from the Institutional Review Board of the University of Pécs (No. 4525). Written informed consent was obtained from all the participants or their legally authorized representatives regarding the MRI scans used in the study.

### Clinical Data and Admission CT Parameters

Traumatic brain injury severity was individually defined according to the Mayo Clinic Classification of Traumatic Brain Injury (symptomatic, mild, and moderate–severe) (Malec et al., 2007). Age at the time of trauma, gender, Rotterdam (Maas et al., 2005) and Marshall CT scores (Marshall et al., 1992) (assessed on admission CT), MRI field strength (1.5 or 3 T), FLAIR lesion number, and macroscopic injuries were recorded. Furthermore, the total approximate volume of contusions was recorded on admission, through individual CTs (MedView™) in accordance to the following formula developed by Kothari et al. (1996; **Tables 1–3**):

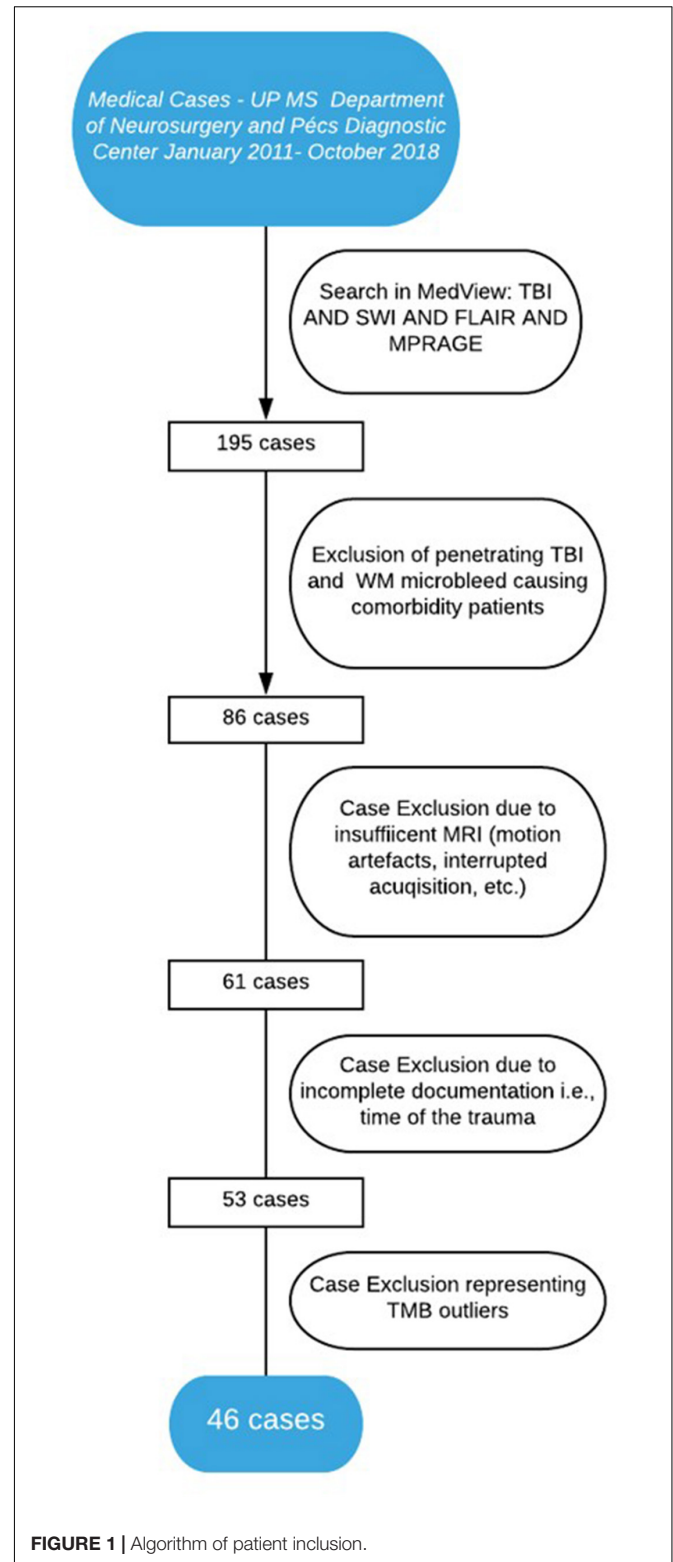
$$CV = \frac{LPD \times NSL \times SL}{2}$$

where CV is the contusion volume, LPD is the product of the longest perpendicular diagonals of the contusion appearing on admission CT, NSL is the number of slices on which the contusion is present, and SL is slice thickness.

### MRI Acquisition

Susceptibility weighted imaging, T1-weighted MPRAGE and FLAIR images were assessed. Brain MRI was performed using 1.5T (Avanto/Avantofit) and 3T (Magnetom Trio/Prisma Fit) Siemens (Munich, Germany) MR scanners; and, in the case of SWI, special attention was given to the evaluation of MRI images with higher field strength and thinner slices in the estimated time frame of TMB disappearance (24–72 h) as shown in **Table 2**.

T1-weighted high-resolution images were obtained using a three-dimensional (3D) magnetization-prepared rapid gradient-echo (MP-RAGE) sequence [inversion time (TI) = 900 ms; repetition time (TR) = 1,400 ms; echo time (TE) = 3 ms; slice thickness = 1.0 mm; field of view (FOV) = 192 mm × 256 mm; matrix size = 192 × 256. 3D and 2D FLAIR images were acquired using the following: TI = 1,888.1–2,713.4 ms; TR = 5,000–8,910 ms; slice thickness = 4.0 mm; FOV = 192–225 mm × 225–256 mm; matrix size = 187–384 × 256–512. 3D SWI images were acquired as follows: TR = 46–49 ms; TE = 40 ms; slice thickness = 2.0–3.0 mm; FOV = 158–01 mm × 230 mm; matrix size = 137–177 × 192–256, with no inter-slice gap for 1.5 T and



**FIGURE 1** | Algorithm of patient inclusion.

(3D) MP-RAGE sequence (TI = 900 or 1,100 ms; TR = 1,380 or 2,530 ms; TE = 2.2 or 3.4 ms; slice thickness = 1.0 or 1.1 mm; FOV = 211 or 256 mm × 211 or 256 mm; matrix size = 192 or 256 × 192 or 256. 3D and 2D FLAIR images were acquired

**TABLE 1** | Age, causes, and symptoms of TBI according to admission data.

		$\Sigma$	Groups			
			0–24 h	24–48 h	48–72 h	72 h <
<b>Number of patients</b>		46	11	14	11	10
<b>Median age for whole set of patients, mean for groups in years</b>		50 (IQR 27–67)	34.45 (SD = 25.72)	52.00 (SD = 25.45)	53.91 (SD = 18.65)	42.00 (SD = 24.59)
Causes of TBI	Falls	21	2	9	5	5
	Traffic accident	15	6	2	3	4
	Violence	3	1	0	2	0
	Other*	7	2	3	1	1
Symptoms of tBI	<i>Physical symptoms</i>					
	Nausea/vomiting	11	2	2	4	3
	Amnesia	9	1	2	5	1
	Headache	7	2	0	3	2
	Loss of consciousness	6	1	1	3	1
	Somnolence	2	1	0	0	1
	Dizziness	2	1	0	1	0
	<i>Sensory symptoms**</i>	2	1	0	1	0
	History could not be obtained	12	3	3	3	3
	Other***	7	3	1	1	2
Asymptomatic	6	0	5	0	1	

TBI, traumatic brain injury; PTSD, post-traumatic stress disorder.

\*Unknown, intoxicated, GM, sports, etc.

\*\*For example, blurred or double vision, numbness, hearing impairment, etc.

\*\*\*Disorientation, agitation, seizures, PTSD, and thoracic emphysema all occurred.

using the following: TI = 1,800–2,500 ms; TR = 5,000–9,000 ms; slice thickness = 0.9–4.0 mm; FOV = 193–230 mm × 220 or 230 mm; matrix size = 192–512 × 256 or 512. 3D SWI images were acquired as follows: TR = 27 ms; TE = 20 ms; slice thickness = 1.5 mm; FOV = 158–199 mm × 220 or 230 mm; matrix size = 167–223 × 256, with no inter-slice gap for 3T measurements (**Supplementary Table 1**).

Elapsed time expressed as hours between the trauma and the nearest SWI imaging was recorded as follows: time of the trauma was registered according to admission documentation, recorded by the National Ambulance Service or the Emergency Department of UP MS, and the exact time of scans was documented from the MRI scans' DICOM data.

## Hemorrhagic and Nonhemorrhagic MRI Lesion Detection

Anonymized CT and MRI scans were read by AT and BK, with both authors having more than 6 years of experience in human

brain CT and MRI data processing, blinded to clinical and time-to-scan data. Final lesion counts were described as per agreement. Lesion parameters were validated by PB, who specializes in neuroradiology with more than 10 years of experience.

Susceptibility weighted imaging TMBs were defined as ovoid or curvilinear hypointensities localized in the WM, mostly at the WM-GM junction, in the brainstem, or in the corpus callosum and the region of the basal ganglia. For precise TMB identification, exclusion of SWI lesion mimics (intersects of veins, bottom of sulci, calcium deposits, artifacts caused by air-tissue interfaces, or macroscopic bleeding caused by, e.g., an intraventricular drain) had to be performed. Therefore, SWI images were registered with high-resolution T1-weighted images using FMRIB's Linear Image Registration Tool (FLIRT), which allowed a multimodal and anatomically accurate assessment of TMBs (Jenkinson and Smith, 2001; Jenkinson et al., 2002; Greve and Fischl, 2009).

Lesions adjacent to contusions, intraventricular hemorrhage, or bone-air interface artifacts (e.g., near mastoid process) or an external ventricular drain were excluded. The overall TMB



**TABLE 2** | Influential factors of TMB count: age, TBI severity, and relevant SWI imaging data, level of significance of differences between groups.

		$\Sigma$	<b>Groups</b>				<b>Significance</b>
			<b>0–24 h</b>	<b>24–48 h</b>	<b>48–72 h</b>	<b>72 h &lt;</b>	
<b>Number of patients</b>		46	11	14	11	10	
<b>Median age for whole set of patients, mean for groups in years*</b>		50 (IQR 27–67)	34.45 (SD = 25.72)	52.00 (SD = 25.45)	53.91 (SD = 18.65)	42.00 (SD = 24.59)	$p = 0.19$
Gender***	Male	37	10	10	9	8	$p = 0.72$
	Female	9	1	4	2	2	
TBI severity (MAYO)***	Symptomatic	6	0	3	3	0	$p = 0.11$
	Mild	8	3	0	3	2	
	Moderate-severe	32	8	11	5	8	
MARSHALL score***	I	13	4	5	2	2	$p = 0.73$
	II	8	2	2	1	3	
	III	8	2	1	4	1	
	IV	0	0	0	0	0	
	V	0	0	0	0	0	
	VI	17	3	6	4	4	
Rotterdam score***	1	27	6	12	4	5	$p = 0.09$
	2	14	3	1	7	3	
	3	2	1	0	0	1	
	4	2	1	0	0	1	
	5	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	
SWI field strength***	1.5 T	11 (23.91%)	4 (36.36%)	3 (21.43%)	2 (18.18%)	2 (20.00%)	$p = 0.77$
	3 T	35	7	11	9	8	
SWI slice thickness (mm)***	1.15	1	1	0	0	0	$p = 0.59$
	1.2	1	1	0	0	0	
	1.5	32	5	10	9	8	
	2	8	2	2	2	2	
	3	3	2	1	0	0	

Results of one-way ANOVA (\*) and Fisher's exact test (\*\*\*).

TMB, traumatic microbleed; TBI, traumatic brain injury; SWI, susceptibility weighted imaging.

**TABLE 3 |** Traumatic microbleeds count and localization, macroscopic pathologies, FLAIR lesion counts, contusion number, and volume and the level of significance of differences between groups.

Number of patients		$\Sigma$	Groups				Significance
			0–24 h	24–48 h	48–72 h	72 h <	
		46	11	14	11	10	
TMB load**	Total	248	95	26	33	94	<b><math>p = 0.011</math></b>
	Median	3.00 (IQR 0.00–7.00)	4.00 (IQR 1.50– 11.00)	1.00 (IQR 0.00–3.00)	1.00 (IQR 0.00–6.00)	7.50 (IQR 3.00– 10.00)	
TMB localization***	Subcortical	220	85	25	27	83	$p = 0.68$
	Corpus callosum	19	7	1	3	8	
	Brainstem	9	3	0	3	3	
FLAIR lesion Number**	Total	277	20	124	32	101	$p = 0.18$
	Median	2.00 (IQR 0.00–7.25)	0.00 (IQR 0.00–1.75)	0.50 (IQR 0.00– 14.00)	3.00 (IQR 1.00–4.00)	5.00 (IQR 1.00– 14.00)	
Contusion Number**	Total	16	7	3	5	1	$p = 0.66$
	Median	0.00 (IQR 0.00–0.75)	0.00 (IQR 0.00–1.50)	0.00 (IQR 0.00–0.00)	0.00 (IQR 0.00–1.00)	0.00 (IQR 0.00–0.00)	
Contusion volume**	Total	19837.8	2741.00	4064.50	12902.7	129.60	$p = 0.69$
	Median	378.25 (IQR 124.65– 1446.00)	842.00 (IQR 539.29– 1316.00)	331.50 (IQR 0.00– 1642.25)	214.00 (IQR 143.28– 9480.25)	129.60	
Macroscopic pathologies***	Intraventricular hematoma	2	1	0		1	$p = 0.79$
	Skull fracture	13	5	5		3	
	Epidural hematoma	3	3	0		0	
	Subdural hematoma	7	1	3		3	
	Subarachnoideal hematoma	7	2	4		1	
	Atrophy	4	1	3		0	

Results of the Kruskal–Wallis with Conover post hoc test (\*\*) and Fisher's exact test (\*\*\*).  
TMB, traumatic microbleed; FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery.

number and localization according to Adams et al. (1989) was individually recorded.

Fluid-attenuated inversion recovery lesions were defined as focal, round to ovoid hyperintensities and strictly localized within the WM.

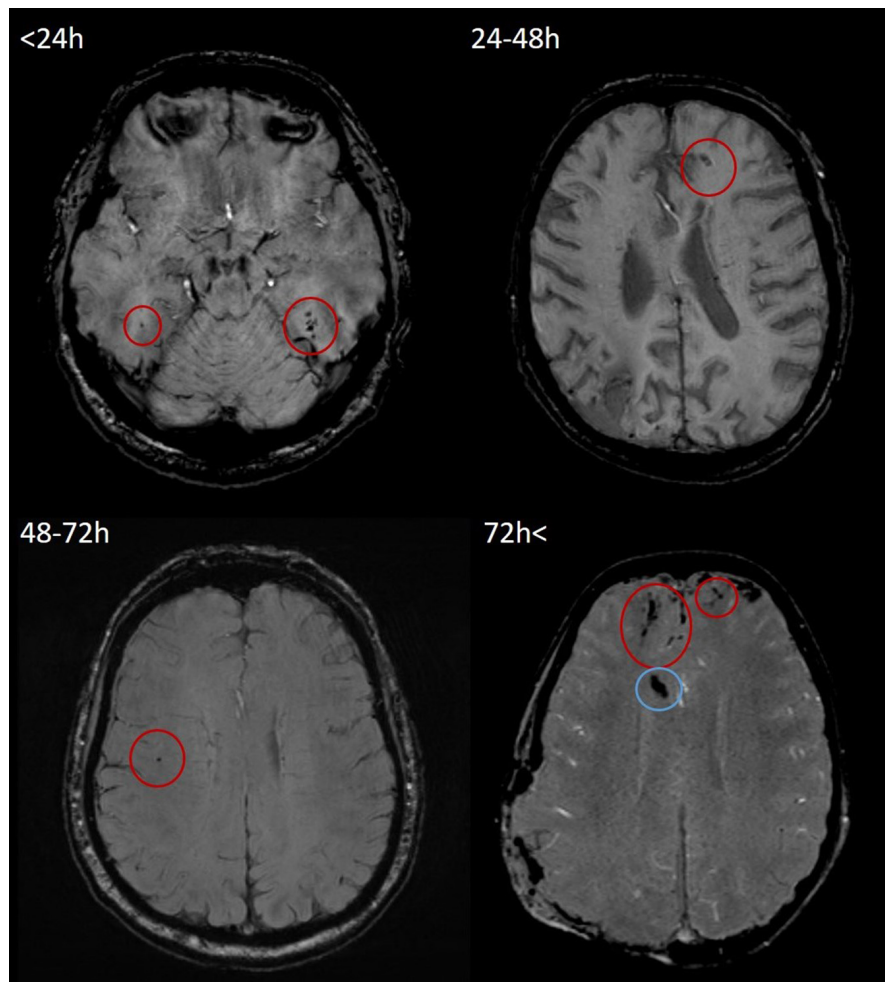
Examples of SWI and FLAIR lesions at different time points are shown in Figures 2, 3.

## Statistical Analysis

MedCalc for Windows, version 19.1.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) was used regarding all statistical analyses on

the anonymized data except for Fisher's exact test, which was processed using the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, United States). Descriptive statistics were applied to summarize clinical, CT, and MRI data. In cases of non-normal distributed data median and the interquartile range, and in cases of normally distributed data, mean and SD are depicted in Table 2.

To model temporal trends of lesions, linear, exponential, and second-degree polynomial trend lines were aligned to the number of SWI TMBs and FLAIR hyperintensities in function of elapsed time following TBI; Grubbs' test was



**FIGURE 2** | Representative examples of TMBs in SWI images in <24, 24–48, 48–72, and 72 h < groups. All four SWI measurements were performed on a 3T Siemens Magnetom Prisma MRI scanner. According to Mayo Clinic Classification, both cases (top left, 21-year-old male; top right, 50-year-old male; bottom left, 64-year-old male; and bottom right, 60-year-old male) were classified as severe TBI. TMBs are indicated by red circles. In the bottom left image, hypointensity caused by the intraventricular drain is indicated by a blue circle. TMB, traumatic microbleed; SWI, susceptibility weighted imaging; TBI, traumatic brain injury.

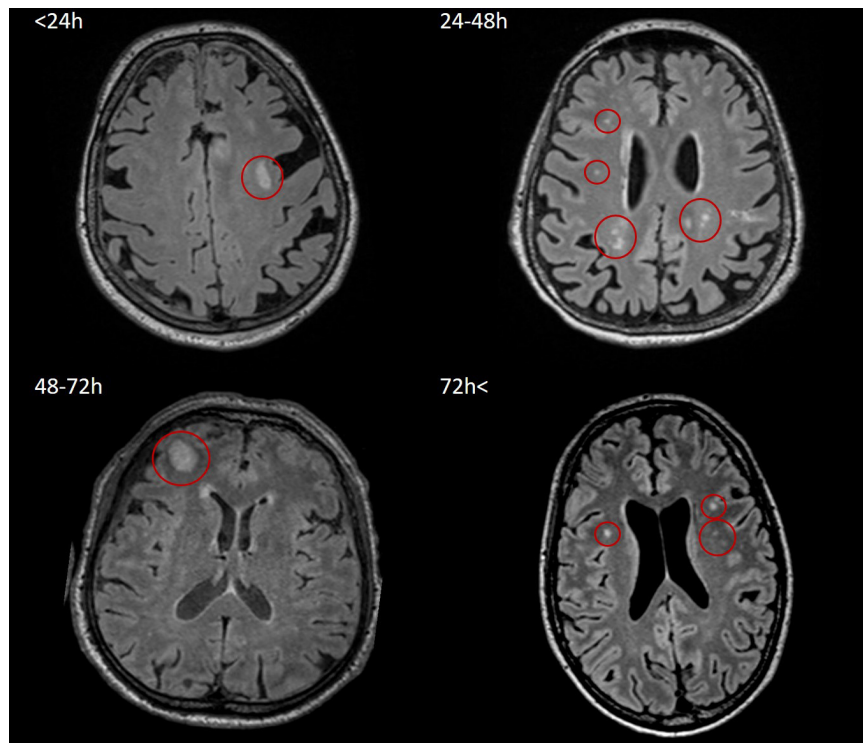
applied to exclude outliers. For further analysis, the best-fitting trend line (the one with the highest  $R^2$  value) was selected. For both TMBs and FLAIR lesions, a second-order polynomial trend line aligned the best ( $R^2 = 0.20$ ). The solution of this trend line's equation regarding the average TMB count defined the exact time frame in which TMB numbers were below average.

The commonly referred defined time frame was adapted considering clinical and practical applicability; thus, four groups were created based on the elapsed time between the trauma and the earliest MRI: 0–24 h ( $n = 11$ ); 24–48 h ( $n = 14$ ); 48–72 h ( $n = 11$ ); and 72 h < ( $n = 10$ ). The Shapiro–Wilk normality test was applied to test the distribution of TMB, and FLAIR lesion numbers, age, contusion number, and total volume. Fisher's exact test with continuity correction was used to elucidate differences in occurrence of categorical variables between the groups, possibly affecting lesion count such as gender, Mayo Clinic TBI classification, Rotterdam and Marshall scores, TMB

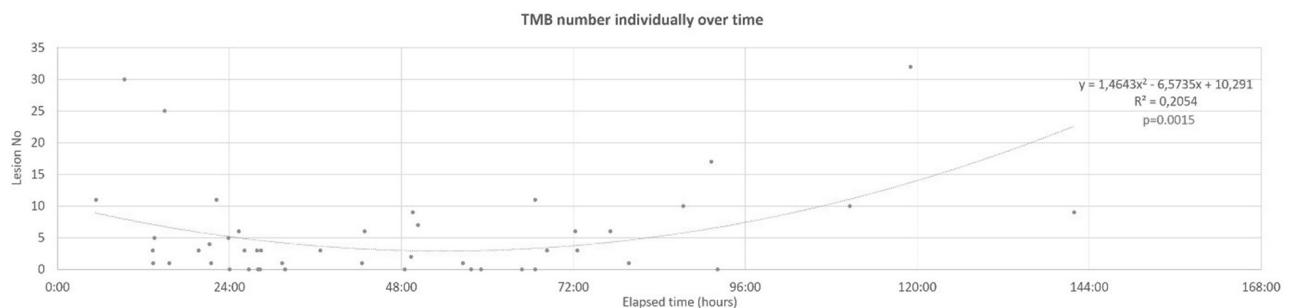
localization, slice thickness, and scanner field strength. The Kruskal–Wallis ANOVA with Conover *post hoc* test was applied to assess the average TMB and FLAIR lesion count, contusion number, and volume differences between the groups; statistical power of the comparisons was calculated with R Statistical Software's MultNonParam-kwpower package (version 3.6.0.; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## RESULTS

According to the Mayo Clinic Classification System regarding TBI, severity distributed was as 6 = symptomatic, 8 = mild, and 32 = moderate–severe in the set of 46 patients. The distribution of age in our entire set of patients was not normally distributed ( $p = 0.02$ ); mean age in time of the trauma was 46.09 (SD = 24.39) years. A total of 248 TMBs (131 on 3-T and 117 on 1.5-T scanners) and 220 hyperintense focal lesions



**FIGURE 3** | Representative images of nonhemorrhagic/FLAIR lesions in <24, 24–48, 48–72, and 72 h < groups. All four FLAIR measurements were performed on a 3T Siemens Magnetom Prisma MRI scanner. According to Mayo Clinic Classification, two of the four patients (top right, 77-year-old female; bottom left, 31-year-old male) suffered symptomatic TBI, and two of them (top left, 75-year-old female; bottom right, 27-year-old male) were classified as severe TBI; lesions are indicated by red circles. FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery; TBI, traumatic brain injury.



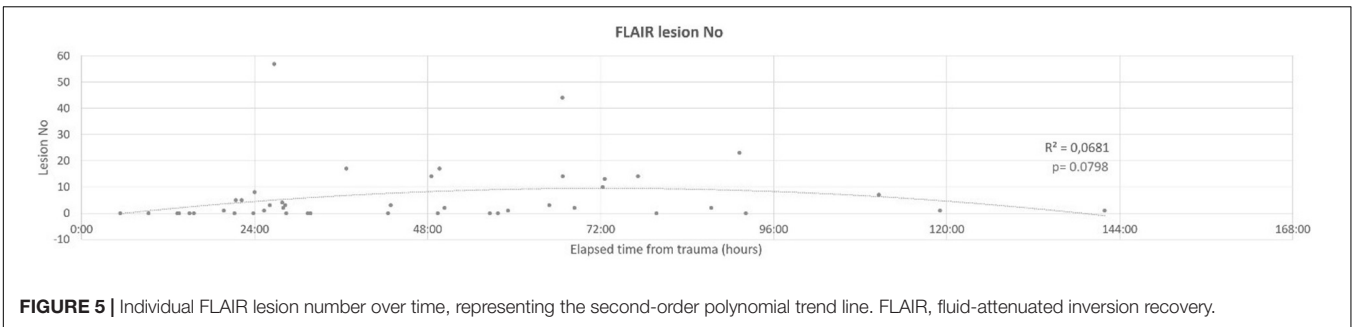
**FIGURE 4** | Individual TMB number over time, fitted second-order polynomial trend line. TMB, traumatic microbleed.

in FLAIR were identified among 46 patients. In reference to acute CTs, 16 contusions were detectable in nine of our patients. Detailed demographic and admission clinical data are presented in **Tables 1–3**. A second-order polynomial trend line is depicted regarding the individual TMB number over time with the highest  $R^2$  value. In reference to the TMB number  $R^2 = 0.2$ ,  $p = 0.002$ ,  $y = 3.0206X^2 - 13.065X + 15.04$  values were yielded (**Figure 4**). The average TMB number with respect to the entire population was 5.4. Substituting this value in the quadratic formula:

$$x_{1;2} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$X_1 = 85$  h 55 min and  $X_2 = 21$  h 50 min were yielded. The nearest two acquisitions in our set of patients to these results were 21 h 11 min and 79 h 45 min following trauma. This result supported a strong tendency regarding the further division of our data into the groups described in methods [0–24 h ( $n = 11$ ); 24–48 h ( $n = 14$ ); 48–72 h ( $n = 11$ ) 72 h < ( $n = 10$ )]. Additionally, a polynomial tendency line was represented with the highest  $R^2$  value for FLAIR lesion numbers ( $R^2 = 0.07$ ,  $p = 0.08$ , **Figure 5**).

The Shapiro–Wilk normality test revealed that both TMB (0–24 h,  $p = 0.003$ ; 24–48 h,  $p = 0.005$ ; 48–72 h,  $p = 0.003$ ; and 72 h <,  $p = 0.04$ ) and FLAIR lesion count significantly differed



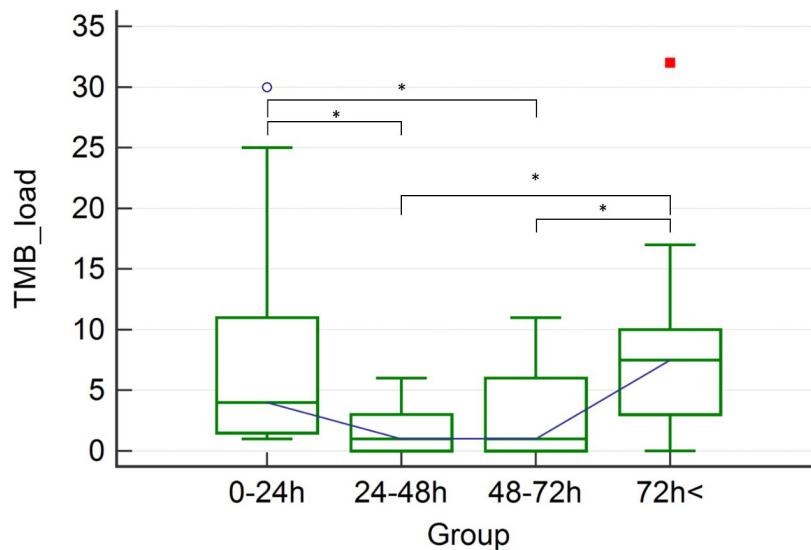
**FIGURE 5 |** Individual FLAIR lesion number over time, representing the second-order polynomial trend line. FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery.

**Kruskal-Wallis test**

Test statistic	10,8710
Corrected for ties Ht	11,1757
Degrees of Freedom (DF)	3
Significance level	P = 0,010813

**Post-hoc analysis (Conover)**

Factor	n	Average Rank	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 0-24H	11	29,73	(2)(3)
(2) 24-48H	14	16,71	(1)(4)
(3) 48-72H	11	18,68	(1)(4)
(4) 72H<	10	31,45	(2)(3)



**FIGURE 6 |** Kruskal–Wallis with Conover *post hoc* test: results for TMB number differences. The symbol “\*” represents significant ( $p < 0.05$ ) differences of TMB count; the blue circle and the red square stand for the two patients with the highest TMB count. TMB, traumatic microbleed. \* represents significant ( $p < 0.05$ ) differences of TMB count.

from normal distribution in every group (0–24 h,  $p = 0.003$ ; 24–48 h,  $p = 0.004$ ; 48–72 h,  $p = 0.003$ ; and 72 h <,  $p = 0.04$ ) and in the entire population, as well ( $p < 0.001$  for both TMB and FLAIR lesion count). Contusion numbers did not show normal distribution ( $p < 0.001$  in every group); contusion volumes as continuous variables also failed to show normal distribution;

median contusion volumes were 0–24 h = 842.00 (IQR 539.29–1,316.00) mm<sup>3</sup>; 24–48 h = 331.50 (IQR 0.00–1,642.25) mm<sup>3</sup>; 48–72 h = 214.00 (IQR 143.28–9,480.25) mm<sup>3</sup>; 72 h ≤ 129.60 mm<sup>3</sup>. Patients’ age in each group did not significantly differ from that which is normally distributed: 0–24,  $p = 0.12$ ; 24–48 h,  $p = 0.16$ ; 48–72 h,  $p = 0.28$ ; and 72 h <,  $p = 0.14$ . Results

for comparison of clinical and CT data among groups were as follows: mean age in years were 0–24 h = 34.45 (SD = 25.72); 24–48 h = 52.00 (SD = 25.45); 48–72 h = 53.91 (SD = 18.65); and 72 h  $\leq$  42.00 (SD = 24.59). One-way ANOVA revealed that there were no significant differences in relation to age,  $p = 0.19$  (Table 2). Fisher's exact test did not reveal significant differences with respect to the Mayo Clinic TBI classification ( $p = 0.11$ ), Rotterdam ( $p = 0.09$ ) and Marshall ( $p = 0.73$ ) scores, SWI field strength ( $p = 0.77$ ), and slice thickness ( $p = 0.59$ ), in the distribution of macroscopic pathologies ( $p = 0.79$ ) or the gender of our patients ( $p = 0.72$ ) (Table 2). Median TMB count in each group was as follows: 0–24 h = 4.0 (IQR 1.50–11.00); 24–48 h = 1.0 (IQR 0.00–3.00); 48–72 h = 1.0 (IQR 0.00–6.00); and >72 h = 7.5 (IQR 3.00–10.00). Median FLAIR lesion count was 0–24 h = 0.00 (IQR 0.00–1.75); 24–48 h = 0.50 (IQR 0.00–14.00); 48–72 h = 3.00 (IQR 1.00–4.00); and >72 h = 5.00 (IQR 1.00–14.00) (Table 3). The Kruskal–Wallis test for TMBs revealed significant differences ( $p = 0.01$ ) between the groups but showed no significant correlations with respect to FLAIR lesions ( $p = 0.18$ ) and number of contusions ( $p = 0.66$ ) or in respect to the average contusion volume ( $p = 0.69$ ), as it is shown in Table 3 and Figure 6. Statistical power was  $1 - \beta > 0.9$  for TMB, FLAIR lesion count, and contusion volume comparisons. TMB localization did not show differences among the groups ( $p = 0.68$ ).

## DISCUSSION

This retrospective study on cross-sectional imaging data enabled an indirect validation of the phenomenon of general transient TMB visibility decrease in human SWI scans. A trend line representing the individual TMB count revealed a nadir between approximately 21 and 80 h following trauma. According to practical considerations, these time points were adjusted to 24 and 72 h for further analysis. Due to the cross-sectional nature of the study, it was crucial to check the presence regarding factors potentially posing as a bias. TBI severity (according to Mayo Clinic Classification and Marshall score), distribution of macroscopic pathologies, SWI field strength, age, gender distribution, or any of the influential factors among the time groups significantly did not differ. Thus, these time groups proved ideally suitable to examine the influence of elapsed time between TBI and SWI on TMB visibility. Median TMB count in the 24–72 h period was significantly lower than in the hyperacute (0–24 h) period or than in the 72 h < period. Although TMB formation is reported to be significantly more frequent among older patients, we experienced lower median TMB numbers in groups in which the average age was higher.

As an internal control of our study, we examined the occurrence of FLAIR lesions, as markers of edema developing along with DAI, over time. Distinctly, FLAIR lesion count did not significantly differ in the examined time period, which suggests that we are confronting a phenomenon specific for TMBs. FLAIR lesions are also regarded as markers of DAI and injury severity and may be more stable over the acute to subacute phase; however, previous studies suggest that they are not so specific and clearly related to the extent of actual DAI and prognosis (Marquez

De La Plata et al., 2007; Ding et al., 2008; Bigler et al., 2013; Amyot et al., 2015) as TMBs (Tong et al., 2003).

The findings of this study are congruent with our former results: in our rat model, TMBs showed significant temporal visibility reduction in SWI; they often became completely invisible in the 24–96 h period, while microbleeds' consistent presence was histologically proven. Reappearance was demonstrated after 96 h. In this article, the authors expressed that the most possible explanation regarding acute TMB disappearance may be clot retraction caused by voxel level homogenization resulting in signal gain. The authors also suspected the possible role of methemoglobin formation and consequential T1 shine through. The reappearance of microbleeds could be explained by the development of late breakdown products of hemoglobin as hemosiderin and ferritin, known to be superparamagnetic (Bradley, 1993; Tóth et al., 2019).

Our findings support former case studies reporting TMBs' morphological changes in SWI, which, moreover coincide with case observations by Watanabe et al. that TMB invisibility may occur roughly between 24 h and 7 days after formation (Watanabe et al., 2016). Furthermore, in a study focusing on cerebral blood flow changes in an experimental closed head injury rat model, the authors reported some ancillary cases in which hypointense foci congruent with TMBs disappeared and later reappeared (Kallakuri et al., 2015).

The main practical consequence of these results implies that SWI may be false-negative for TMBs between 24 and 72 h following injury. Half of our patients (23 of 46) were examined in this time period. This demonstrates at least in our institution that there is a considerable chance for patients being MRI scanned within the “decreased TMB visibility” period. We assume that this may be a general problem, since MRI is almost always electively, secondarily performed to admission CTs, often after clinical stabilization. Additionally, our finding may be applicable in relation to not only TMBs but also the acute examination of every pathology capable of causing WM TMBs. Although 1.5T and 3T field strength acquisition rates were rather evenly distributed among time points, considering overall lesion counts, 3T detected somewhat more lesions (131) than 1.5T (117), supporting the fact that 3T has a higher sensitivity for TMBs irrespective of imaging timing.

The main limitations of this study are the limited sample size, as a result of our strict inclusion criteria; and temporal features of TMBs were indirectly investigated based on cross-sectional data. Also, according to the assumed nature of temporal changes of TMB visibility, there could be an uncertainty of TMB development in patients examined between 24 and 72 h. Direct investigation of the temporal visibility changes of TMBs would have been only possible by a longitudinal study. Unfortunately, the implementation of multiple time point follow-up MRI studies in TBI, especially when including severely injured patients, is almost impossible: although MRI itself can be regarded as a safe imaging technique, the relatively long acquisition time can be inconvenient for TBI patients or may even pose risk for severely injured patients due to patient and anesthesiological/intensive

care gear transportation. However, very strict patient selection criteria were applied, and factors most possibly affecting TMB presence were considered to minimize biased results.

## CONCLUSION

This retrospective study indirectly substantiates that short-term temporary TMB visibility decrease is generally present not only in rodents but in humans as well. Based on our results, TMB visibility decrease seems to occur from 24 to 72 h following TBI. MRI for detecting TMBs in this period may result in false-negative findings, leading to an under-diagnosis of injury severity and false prognosis estimation.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board of the University of Pécs (No. 4525). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

BK: study conception and design, data acquisition, analysis and interpretation of the data, drafting, and final approval. VS: study design, data acquisition, draft revision, and final approval. GP, SN, AS and AT: study conception and design, analysis and interpretation of the data, draft revision, and final approval. BB and DS: analysis and interpretation of the data, draft revision, and final approval. LT: data acquisition, draft revision, and final approval. AB, TD, and PB: conception and design, draft revision, and final approval. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

## FUNDING

BK was supported by the ÚNKP-20-3-I-PTE-552 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology, and the manuscript was also prepared with the

professional support of the doctoral student scholarship program of the Co-operative Doctoral Program of the Ministry of Innovation and Technology financed from the National Research, Development and Innovation Fund KDP-2020-986041. AT was supported by the ÚNKP-20-5-PTE-794 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology. AT was supported by the Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Science. SN was supported by the ÚNKP-20-5-PTE-715 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology and János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and PTE ÁOK-KA-2020-08. GP was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences and the Institutional Excellence Program for the Higher Education II within the framework of the 5th thematic program. This study was funded by the Hungarian Scientific Research Fund Grant No. OTKA/K-120356. Additionally, the study was also funded by EFOP-3.6.2-16-2017-00008 “The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics” and supported by the ÚNKP-20-3-I-PTE-552, ÚNKP-20-5-PTE-794, and ÚNKP-20-5-PTE-715 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology. This work was financially supported by Hungarian Brain Research Program (KTIA\_NAP\_13-2-2014-0019 and 2017-1.2.1-NKP-2017-00002).

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratitude to Farkas Kornélia Borbásné, MD, Ph.D., senior lecturer of the Institute of Bioanalysis UP MS, for her professional assistance in biostatistics; and John Eugene Marquette for his professional linguistic assistance.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.711074/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | TMB count as a function of time in patients scanned by 1.5T ( $n = 11$ ) or 3T ( $n = 35$ ) scanners ( $y$ -axis: TMB count;  $x$ -axis: elapsed time between trauma and MRI scan individually). A 2nd order polynomial trend line could be fitted with the highest  $R^2$  value [ $R^2 = 0,1318$  (1.5T) and  $R^2 = 0,2261$  (3T)] on individual TMB count in the same manner as when patients scanned with two different field strength were examined combined.

**Supplementary Figure 2** | In our final 46 patients included, there were only two cases -of which one is shown in this figure- when a TMB (indicated by red arrow) and a non haemorrhagic FLAIR lesion (indicated by blue arrows) were co-localised.

**Supplementary Table 1** | MRI measurement parameters for each applied protocols.

## REFERENCES

Adams, J. H., Doyle, D., Ford, I., Gennarelli, T. A., Graham, D. I., and McLellan, D. R. (1989). Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis

and grading. *Histopathology* 15, 49–59. doi: 10.1111/j.1365-2559.1989.tb03040.x

Akoudad, S., Wolters, F. J., Viswanathan, A., De Bruijn, R. F., Van Der Lugt, A., Hofman, A., et al. (2016). Association of cerebral microbleeds with cognitive

- decline and dementia. *JAMA Neurol.* 73, 934–943. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.1017
- Amyot, F., Arciniegas, D. B., Brazaitis, M. P., Curley, K. C., Diaz-Arrastia, R., Gandjbakhche, A., et al. (2015). A review of the effectiveness of neuroimaging modalities for the detection of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 32, 1693–1721. doi: 10.1089/neu.2013.3306
- Andreasen, S. H., Andersen, K. W., Conde, V., Dyrby, T. B., Puonti, O. T., Kammersgaard, L. P., et al. (2019). Limited co-localization of microbleeds and microstructural changes after severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 37, 581–592. doi: 10.1089/neu.2019.6608
- Asano, Y., Shinoda, J., Okumura, A., Aki, T., Takenaka, S., Miwa, K., et al. (2012). Utility of fractional anisotropy imaging analyzed by statistical parametric mapping for detecting minute brain lesions in chronic-stage patients who had mild or moderate traumatic brain injury. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 52, 31–40. doi: 10.2176/nmc.52.31
- Ayaz, M., Boikov, A. S., Haacke, E. M., Kido, D. K., and Kirsch, W. M. (2010). Imaging cerebral microbleeds using susceptibility weighted imaging: one step toward detecting vascular dementia. *J. Magn. Reson. Imaging* 31, 142–148. doi: 10.1002/jmri.22001
- Beauchamp, M. H., Beare, R., Ditchfield, M., Coleman, L., Babl, F. E., Kean, M., et al. (2013). Susceptibility weighted imaging and its relationship to outcome after pediatric traumatic brain injury. *Cortex* 49, 591–598. doi: 10.1016/j.cortex.2012.08.015
- Berg, J., Tagliaferri, F., and Servadei, F. (2005). Cost of trauma in Europe. *Eur. J. Neurol.* 12(Suppl. 1), 85–90. doi: 10.1111/j.1468-1331.2005.01200.x
- Bigler, E. D., Abildskov, T. J., Petrie, J. A., Farrer, T. J., Dennis, M., Simic, N., et al. (2013). Heterogeneity of brain lesions in pediatric traumatic brain injury. *Neuropsychology* 27, 438–451. doi: 10.1037/a0032837
- Blennow, K., Brody, D. L., Kochanek, P. M., Levin, H., McKee, A., Ribbers, G. M., et al. (2016). Traumatic brain injuries. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2:16084. doi: 10.1038/nrdp.2016.84
- Blitstein, M. K., and Tung, G. A. (2007). MRI of cerebral microhemorrhages. *Am. J. Roentgenol.* 189, 720–725. doi: 10.2214/AJR.07.2249
- Bradley, W. G. (1993). MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology* 189, 15–26. doi: 10.1148/radiology.189.1.8372185
- Brain Trauma Foundation et al., S. L., and Chestnut, R. M. (2007). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. I. blood pressure and oxygenation. *J. Neurotrauma* 24(Suppl. 1), S7–S13. doi: 10.1089/neu.2007.9995
- Cheng, A. L., Batool, S., McCreary, C. R., Lauzon, M. L., Frayne, R., Goyal, M., et al. (2013). Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2\*-weighted gradient-recalled echo mri for detecting microbleeds. *Stroke* 44, 2782–2786. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002267
- Chiu, W.-T., Huang, S.-J., Tsai, S.-H., Lin, J.-W., Tsai, M.-D., Lin, T.-J., et al. (2007). The impact of time, legislation, and geography on the epidemiology of traumatic brain injury. *J. Clin. Neurosci.* 14, 930–935. doi: 10.1016/j.jocn.2006.08.004
- Cole, T. B. (2004). Global road safety crisis remedy sought: 1.2 million killed, 50 million injured annually. *JAMA* 291, 2531–2532. doi: 10.1001/jama.291.21.2531
- de Haan, S., de Groot, J. C., Jacobs, B., and van der Naalt, J. (2017). The association between microhaemorrhages and post-traumatic functional outcome in the chronic phase after mild traumatic brain injury. *Neuroradiology* 59, 963–969. doi: 10.1007/s00234-017-1898-1898
- Di Ieva, A., Lam, T., Alcaide-Leon, P., Bharatha, A., Montanera, W., and Cusimano, M. D. (2015). Magnetic resonance susceptibility weighted imaging in neurosurgery: current applications and future perspectives. *J. Neurosurg.* 123, 1463–1475. doi: 10.3171/2015.1.JNS142349
- Ding, K., De La Plata, C. M., Wang, J. Y., Mumphy, M., Moore, C., Harper, C., et al. (2008). Cerebral atrophy after traumatic white matter injury: correlation with acute neuroimaging and outcome. *J. Neurotrauma* 25, 1433–1440. doi: 10.1089/neu.2008.0683
- Ezaki, Y., Tsutsumi, K., Morikawa, M., and Nagata, I. (2006). Lesions identified on T2\*-weighted gradient echo images in two patients with suspected diffuse axonal injury that resolved in less than ten days. *Acta Neurochir. (Wien)* 148, 547–550. doi: 10.1007/s00701-005-0692-692
- Gennarelli, T. A., Adams, J. H., and Graham, D. I. (1986). “Diffuse axonal injury — a new conceptual approach to an old problem,” in *Mechanisms of Secondary Brain Damage*. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences), Vol. 115, eds A. Baethmann, K. G. Go, and A. Unterberg (Boston, MA: Springer), doi: 10.1007/978-1-4684-5203-7\_2
- Greenberg, S. M., Vernooij, M. W., Cordonnier, C., Viswanathan, A., Al-Shahi Salman, R., Warach, S., et al. (2009). Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol.* 8, 165–174. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70013-70014
- Greve, D. N., and Fischl, B. (2009). Accurate and robust brain image alignment using boundary-based registration. *Neuroimage* 48, 63–72. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.06.060
- Griffin, A. D., Turtzo, L. C., Parikh, G. Y., Tolpygo, A., Lodato, Z., Moses, A. D., et al. (2019). Traumatic microbleeds suggest vascular injury and predict disability in traumatic brain injury. *Brain* 142, 3550–3564. doi: 10.1093/brain/awz290
- Haacke, E. M., DelProposto, Z. S., Chaturvedi, S., Sehgal, V., Tenzer, M., Neelavalli, J., et al. (2007). Imaging cerebral amyloid angiopathy with susceptibility-weighted imaging. *Am. J. Neuroradiol.* 28, 316–317.
- Haacke, E. M., Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Cheng, Y. C. N. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1. *Am. J. Neuroradiol.* 30, 19–30. doi: 10.3174/ajnr.A1400
- Jenkinson, M., Bannister, P., Brady, M., and Smith, S. (2002). Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *Neuroimage* 17, 825–841. doi: 10.1016/S1053-8119(02)91132-91138
- Jenkinson, M., and Smith, S. (2001). A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med. Image Anal.* 5, 143–156. doi: 10.1016/S1361-8415(01)00036-6
- Kallakuri, S., Bandaru, S., Zakaria, N., Shen, Y., Kou, Z., Zhang, L., et al. (2015). Traumatic brain injury by a closed head injury device induces cerebral blood flow changes and microhemorrhages. *J. Clin. Imaging Sci.* 5:52. doi: 10.4103/2156-7514.166354
- Keenan, H. T., and Bratton, S. L. (2006). Epidemiology and outcomes of pediatric traumatic brain injury. *Dev. Neurosci.* 28, 256–263. doi: 10.1159/000094152
- Kim, B. J., and Lee, S.-H. (2013). Cerebral microbleeds: their associated factors, radiologic findings, and clinical implications. *J. Stroke* 15, 153–163. doi: 10.5853/jos.2013.15.3.153
- Kothari, R. U., Brott, T., Broderick, J. P., Barsan, W. G., Sauerbeck, L. R., Zuccarello, M., et al. (1996). The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 27, 1304–1305. doi: 10.1161/01.STR.27.8.1304
- Kumar, R., Husain, M., Gupta, R. K., Hasan, K. M., Haris, M., Agarwal, A. K., et al. (2009). Serial changes in the white matter diffusion tensor imaging metrics in moderate traumatic brain injury and correlation with neuro-cognitive function. *J. Neurotrauma* 26, 481–495. doi: 10.1089/neu.2008.0461
- Lawrence, T. P., Pretorius, P. M., Ezra, M., Cadoux-Hudson, T., and Voets, N. L. (2017). Early detection of cerebral microbleeds following traumatic brain injury using MRI in the hyper-acute phase. *Neurosci. Lett.* 655, 143–150. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.046
- Lu, J., Marmarou, A., Choi, S., Maas, A., Murray, G., and Steyerberg, E. W. (2005). Impact and abc study group, mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochir. Suppl.* 95, 281–285.
- Maas, A. I. R., Hukkelhoven, C. W. P. M., Marshall, L. F., and Steyerberg, E. W. (2005). Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery* 57, 1173–1181. doi: 10.1227/01.NEU.0000186013.63046.6B
- Malec, J. F., Brown, A. W., Leibson, C. L., Flaada, J. T., Mandrekar, J. N., Diehl, N. N., et al. (2007). The mayo classification system for traumatic brain injury severity. *J. Neurotrauma* 24, 1417–1424. doi: 10.1089/neu.2006.0245
- Marquez De La Plata, C., Ardelean, A., Koovakkattu, D., Srinivasan, P., Miller, A., et al. (2007). Magnetic resonance imaging of diffuse axonal injury: quantitative assessment of white matter lesion volume. *J. Neurotrauma* 24, 591–598. doi: 10.1089/neu.2006.0214
- Marshall, L. F., Marshall, S. B., Klauber, M. R., Van Berkum Clark, M., Eisenberg, H., Jane, J. A., et al. (1992). The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J. Neurotrauma* 9(Suppl. 1), S287–S292.
- Mathers, C. D., and Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3:e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442



- McGinn, M. J., and Povlishock, J. T. (2016). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 27, 397–407. doi: 10.1016/j.nec.2016.06.002
- Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Haacke, E. M. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2. *Am. J. Neuroradiol.* 30, 232–252. doi: 10.3174/ajnr.A1461
- Moenninghoff, C., Kraff, O., Maderwald, S., Umutlu, L., Theysohn, J. M., Ringelstein, A., et al. (2015). Diffuse axonal injury at ultra-high field MRI. *PLoS One* 10:e0122329. doi: 10.1371/journal.pone.0122329
- Nakagami, Y., Sugihara, G., Uemura, K., Jingami, N., Ueda, K., Takahashi, R., et al. (2014). Rapidly progressive cognitive disturbances due to nonconvulsive status epilepticus associated with a cerebral microbleed: clinical application of FDG-PET. *Epilepsy Seizure* 7, 23–29. doi: 10.3805/eands.7.23
- Nakata-Kudo, Y., Mizuno, T., Yamada, K., Shiga, K., Yoshikawa, K., Mori, S., et al. (2006). Microbleeds in Alzheimer disease are more related to cerebral amyloid angiopathy than cerebrovascular disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 22, 8–14. doi: 10.1159/000092958
- Oh, J. H., Lee, J. S., Kang, S. Y., Kang, J. H., and Choi, J. C. (2008). Aspirin-associated intracerebral hemorrhage in a patient with CADASIL. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 110, 384–386. doi: 10.1016/j.clineuro.2007.12.001
- Parizel, P. M., Makkat, S., Van Miert, E., Van Goethem, J. W., Van den Hauwe, L., and De Schepper, A. M. (2001). Intracranial hemorrhage: principles of CT and MRI interpretation. *Eur. Radiol.* 11, 1770–1783. doi: 10.1007/s003300000800
- Paterakis, K., Karantanas, A. H., Komnos, A., and Volikas, Z. (2000). Outcome of patients with diffuse axonal injury: the significance and prognostic value of MRI in the acute phase. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* 49, 1071–1075. doi: 10.1097/00005373-200012000-200012016
- Ripoll, M. A., Siösteen, B., Hartman, M., and Raininko, R. (2003). MR detectability and appearance of small experimental intracranial hematomas at 1.5 T and 0.5 T. A 6-7-month follow-up study. *Acta Radiol.* 44, 199–205. doi: 10.1034/j.1600-0455.2003.00038.x
- Shams, S., Martola, J., Granberg, T., Li, X., Shams, M., Fereshtehnejad, S. M., et al. (2015). Cerebral microbleeds: different prevalence, topography, and risk factors depending on dementia diagnosis—the Karolinska imaging dementia study. *Am. J. Neuroradiol.* 36, 661–666. doi: 10.3174/ajnr.A4176
- Sharma, R., Dearaugo, S., Infeld, B., O'Sullivan, R., and Gerraty, R. P. (2018). Cerebral amyloid angiopathy: review of clinico-radiological features and mimics. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* 62, 451–463. doi: 10.1111/1754-9485.12726
- Spitz, G., Maller, J. J., Ng, A., O'Sullivan, R., Ferris, N. J., and Ponsford, J. L. (2013). Detecting lesions after traumatic brain injury using susceptibility weighted imaging: a comparison with fluid-attenuated inversion recovery and correlation with clinical outcome. *J. Neurotrauma* 30, 2038–2050. doi: 10.1089/neu.2013.3021
- Susman, M., DiRusso, S. M., Sullivan, T., Risucci, D., Nealon, P., Cuff, S., et al. (2002). Traumatic brain injury in the elderly: increased mortality and worse functional outcome at discharge despite lower injury severity. *J. Trauma* 53, 219–223.
- Tagliaferri, F., Compagnone, C., Korsic, M., Servadei, F., and Kraus, J. (2006). A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien)* 148, 255–268. doi: 10.1007/s00701-005-0651-y
- Tang, C. Y., Eaves, E., Dams-O'Connor, K., Ho, L., Leung, E., Wong, E., et al. (2012). Diffuse disconnectivity in traumatic brain injury: a resting state fMRI and DTI study. *Transl. Neurosci.* 3, 9–14. doi: 10.2478/s13380-012-0003-3
- Thompson, H. J., McCormick, W. C., and Kagan, S. H. (2006). Traumatic brain injury in older adults: epidemiology, outcomes, and future implications. *J. Am. Geriatr. Soc.* 54, 1590–1595. doi: 10.1111/j.1532-5415.2006.00894.x
- Tong, K. A., Ashwal, S., Holshouser, B. A., Shutter, L. A., Herigault, G., Haacke, E. M., et al. (2003). Hemorrhagic shearing lesions in children and adolescents with posttraumatic diffuse axonal injury: improved detection and initial results. *Radiology* 227, 332–339. doi: 10.1148/radiol.2272020176
- Tóth, A., Berente, Z., Bogner, P., Környei, B., Balogh, B., Czeiter, E., et al. (2019). Cerebral microbleeds temporarily become less visible or invisible in acute susceptibility weighted magnetic resonance imaging: a rat study. *J. Neurotrauma* 36, 1670–1677. doi: 10.1089/neu.2018.6004
- Toth, A., Környei, B., Kovacs, N., Rostas, T., Buki, A., Doczi, T., et al. (2018). Both hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic MRI lesions are associated with the microstructural damage of the normal appearing white matter. *Behav. Brain Res.* 340, 106–116. doi: 10.1016/j.bbr.2017.02.039
- Toth, A., Kovacs, N., Perlaki, G., Orsi, G., Aradi, M., Komaromy, H., et al. (2013). Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? *J. Neurotrauma* 30, 2–10. doi: 10.1089/neu.2012.2486
- Toth, A., Kovacs, N., Tamas, V., Környei, B., Nagy, M., Horvath, A., et al. (2016). Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* 617, 207–212. doi: 10.1016/j.neulet.2016.02.028
- Trifan, G., Gattu, R., Haacke, E. M., Kou, Z., and Benson, R. R. (2017). MR imaging findings in mild traumatic brain injury with persistent neurological impairment. *Magn. Reson. Imaging* 37, 243–251. doi: 10.1016/j.mri.2016.12.009
- van der Horn, H. J., de Haan, S., Spikman, J. M., de Groot, J. C., and van der Naalt, J. (2018). Clinical relevance of microhemorrhagic lesions in subacute mild traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav.* 12, 912–916. doi: 10.1007/s11682-017-9743-9746
- Wallesch, C. W., Curio, N., Kutz, S., Jost, S., Bartels, C., and Synowitz, H. (2001). Outcome after mild-to-moderate blunt head injury: effects of focal lesions and diffuse axonal injury. *Brain Inj.* 15, 401–412. doi: 10.1080/02699050116886
- Watanabe, J., Maruya, J., Kanemaru, Y., Miyauchi, T., and Nishimaki, K. (2016). Transient disappearance of microbleeds in the subacute period based on T2\*-weighted gradient echo imaging in traumatic brain injury. *Acta Neurochir. (Wien)* 158, 1247–1250. doi: 10.1007/s00701-016-2805-2805
- Yamauchi, Y., Kanzaki, Y., Wada, Y., Shima, H., and Ishizaka, N. (2016). Cerebral microbleeds are associated with high systolic arterial blood pressure, but not arterial stiffness in patients with cardiovascular disease. *Circulation* 134:A15580.
- Yuh, E. L., Mukherjee, P., Lingsma, H. F., Yue, J. K., Ferguson, A. R., Gordon, W. A., et al. (2013). Magnetic resonance imaging improves 3-month outcome prediction in mild traumatic brain injury. *Ann. Neurol.* 73, 224–235. doi: 10.1002/ana.23783

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Környei, Szabó, Perlaki, Balogh, Szabó Steigerwald, Nagy, Tóth, Búki, Dóczi, Bogner, Schwarcz and Tóth. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Cerebral Microbleeds Temporarily Become Less Visible or Invisible in Acute Susceptibility Weighted Magnetic Resonance Imaging: A Rat Study

Arnold Tóth,<sup>1–3,\*</sup> Zoltán Berente,<sup>4–6</sup> Péter Bogner,<sup>2</sup> Bálint Környei,<sup>1</sup> Bendegúz Balogh,<sup>2</sup> Endre Czeiter,<sup>1,3,5</sup> Krisztina Amrein,<sup>1,5</sup> Tamás Dóczi,<sup>1,3,7</sup> András Büki,<sup>1,5</sup> and Attila Schwarcz<sup>1</sup>

## Abstract

Previously, we reported human traumatic brain injury cases demonstrating acute to subacute microbleed appearance changes in susceptibility-weighted imaging (SWI—magnetic resonance imaging [MRI]). This study aims to confirm and characterize such temporal microbleed appearance alterations in an experimental model. To elicit microbleed formation, brains of male Sprague Dawley rats were pierced in a depth of 4 mm, in a parasagittal position bilaterally using 159  $\mu\text{m}$  and 474  $\mu\text{m}$  needles, without the injection of autologous blood or any agent. Rats underwent 4.7 T MRI immediately, then at multiple time points until 125 h. Volumes of hypointensities consistent with microbleeds in SWI were measured using an intensity threshold-based approach. Microbleed volumes across time points were compared using repeated measures analysis of variance. Microbleeds were assessed by Prussian blue histology at different time points. Hypointensity volumes referring to microbleeds were significantly decreased (corrected  $p < 0.05$ ) at 24 h compared with the immediate or the 125 h time points. By visual inspection, microbleeds were similarly detectable at the immediate and 125 h imaging but were decreased in extent or completely absent at 24 h or 48 h. Histology confirmed the presence of microbleeds at all time points and in all animals. This study confirmed a general temporary reduction in visibility of microbleeds in the acute phase in SWI. Such short-term appearance dynamics of microbleeds should be considered when using SWI as a diagnostic tool for microbleeds in traumatic brain injury and various diseases.

**Keywords:** brain trauma; microbleed; MRI; rat; susceptibility weighted imaging (SWI)

## Introduction

**T**HE TERM CEREBRAL MICROBLEED (or microhemorrhage) refers to small extravascular collections of blood or blood products in the brain that are visible as signal voids in magnetic susceptibility sensitive magnetic resonance imaging (MRI) techniques.<sup>1,2</sup> Such techniques include T2\* gradient echo (T2\* GRE) and most sensitively susceptibility-weighted imaging (SWI).<sup>3</sup> Since the improvements of these tools, microbleeds have been recognized increasingly in various cerebral diseases.

In acute traumatic brain injury, microbleed detection may aid the diagnosis, severity, and prognosis assessment of hemorrhagic dif-

fuse axonal injury.<sup>4–12</sup> Unfortunately, results are heterogeneous, which detains clinical feasibility.<sup>13,14</sup> A potential confounding factor may be the inconsistent MRI appearance of microbleeds over time, as a result of the different possible biophysical states of blood.

Such temporal MRI features of large volume bleedings (i.e., hematomas) have been characterized widely based on both human investigations and experimental studies, encompassing hyperacute to chronic stages.<sup>15–23</sup> The T1, T2, and magnetic susceptibility properties are affected substantially by the form of hemoglobin, the presence of hemoglobin breakdown products, red blood cell membrane integrity, or clot formation.<sup>15</sup> Because peripheral and central parts of hematomas are prone to different biochemical

Departments of <sup>1</sup>Neurosurgery and <sup>2</sup>Radiology, Pécs Medical School, Pécs, Hungary.

<sup>3</sup>MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Pécs, Hungary.

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Pécs Medical School, Pécs, Hungary.

<sup>5</sup>János Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary.

<sup>6</sup>Research Group for Experimental Diagnostic Imaging, Pécs Medical School, Pécs, Hungary.

<sup>7</sup>Diagnostic Center of Pécs, Pécs, Hungary.

environments, at certain stages, these hemorrhage compartments show marked MRI signal differences.<sup>15,19,24–26</sup>

Based on these studies, however, microbleed MRI dynamics cannot be understood fully: the size of a microbleed may be indeed in a microscopic range<sup>2,27,28</sup>; consequently, the relative surface (surface area to volume ratio) of a microbleed is vast compared with macroscopic hemorrhages. Therefore, both the active and passive biochemical alterations of blood components in a microbleed may differ significantly.

Observations on possible short-term temporal MRI appearance changes of microbleeds are yet scarce.<sup>29</sup> Previously, we reported human traumatic brain injury case series demonstrating acute to subacute expansion of traumatic microbleeds in SWI.<sup>30</sup> Other case reports presented that traumatic microbleeds in MRI may become reduced in number or volume,<sup>5</sup> disappear,<sup>31</sup> or transiently disappear<sup>32</sup> early after injury. In a study focusing on cerebral blood flow changes in an experimental rat closed head injury model, authors ancillary reported some cases when hypointense foci congruent with microbleeds disappeared and later reappeared.<sup>33</sup>

Based on these case reports, it is uncertain whether acute microbleed appearance changes are because of changes in blood presence (full degradation for disappearance, re-bleeding/progression for re-appearance and expansion), or because of change in MR visibility over time. Therefore, we aimed to develop an experimental microbleed model suitable for the confirmation and characterization of short-term microbleed MRI appearance alterations. Histological processing was also performed to examine microbleed presence.

## Methods

### *Rat microbleed model*

Nineteen male Sprague Dawley rats weighing 350 g–450 g (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) were used. The animals were maintained on a standard rodent diet with free access to water. All animals were previously healthy. All of the experiments and the general handling of the animals were approved by the National (Hungarian) Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation (Number of permission: BA02/2000-69/2017 - valid for five years). All the procedures fully complied with national and international standards especially with Decree No. 40/2013 (II. 14.) of the Hungarian Government and EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

Anesthesia was induced in a bell jar for 5 min under 4% isoflurane (Forane, Abbott, Abbott Park, IL) and a 7:3 mixture of N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub>, and maintained using isoflurane decreased to 1–3% delivered through a nasal mask. Rectal temperature was measured with a rectal probe (RET-4, Physitemp Instruments, Clifton, NJ) and thermometer (BAT-12, Physitemp Instruments, Clifton, NJ). The animal temperature was held at 36–38°C using a silicon tube, shaped to form a cylinder around the animal, connected to a hot/cold water circulator device (Scanvac heat safe SHC 2000, Labogene, Lyngø, Denmark).

The rat was placed in a laboratory standard stereotactic frame (Stoelting Co., Wood Dale, IL). A midline scalp incision was made, and the skull was exposed with blunt dissection. A burr hole was placed 2 mm lateral to midline, 5 mm posterior to bregma, on both sides. To elicit microbleed formation, the brain was pierced vertically in a depth of 4 mm from the dura, using a stainless steel needle (Hamilton, Reno, NV) with a diameter of 159  $\mu$ m (34 G) on the right side and 474  $\mu$ m (26s G) on the left side. No blood or material was injected. The burr hole was sealed with bone wax, the wound was closed, and the rat was immediately transferred to the MR scanner. The entire surgical procedure took approximately 30 min.

### *MRI*

Animals were anesthetized during MRI as well, with 1–3% isoflurane and a 7:3 mixture of N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> administered through a nose cone animal holder. The animal temperature was held at 36–38°C degrees using a digital circulator device (Thermo Scientific Haake SC100, Waltham, MA). Imaging was performed on a Bruker (Bruker) 4.7 T Biospec 47/16 scanner with a receive-only 2×2 surface array coil for rat brain (Bruker). After obtaining a three-plane gross scout imaging, high resolution T2 weighted imaging was performed also in three planes to localize injury sites precisely (RARE sequence repetition time/echo time [TR/TE]=2428/36 msec, RARE factor=8, echo spacing=12 msec, number of averages=2, image matrix=256×256 FOV=35×35 mm<sup>2</sup>). Previous to acquiring SWI, map shimming was performed covering the brain with an ellipsoid volume. The SWI slice volume was adjusted centered to lesion sites based on the T2 images. The SWI was performed using the following parameters: three-dimensional (3D) acquisition type FcFLASH sequence, TR/TE=29/11 msec, number of averages=2, image matrix=192×192×48, FOV=32×32×8 mm<sup>3</sup>, flip angle=12 degrees, mask weighting=4 with gauss broad=0.33 mm). Filtered phase data were stored.

As a pilot, three animals underwent imaging at five time points (immediate, 12 h, 24 h, 48 h, 125 h after injury). Based on the findings of these images and adhering to scanner availability, three imaging time points were set as immediate, 24 h, and 125 h for the further 16 animals. Of these 16 animals, 10 completed the three time points and were euthanized under anesthesia for histopathological evaluation. Three animals were euthanized after the immediate, and another three after the 24 h imaging.

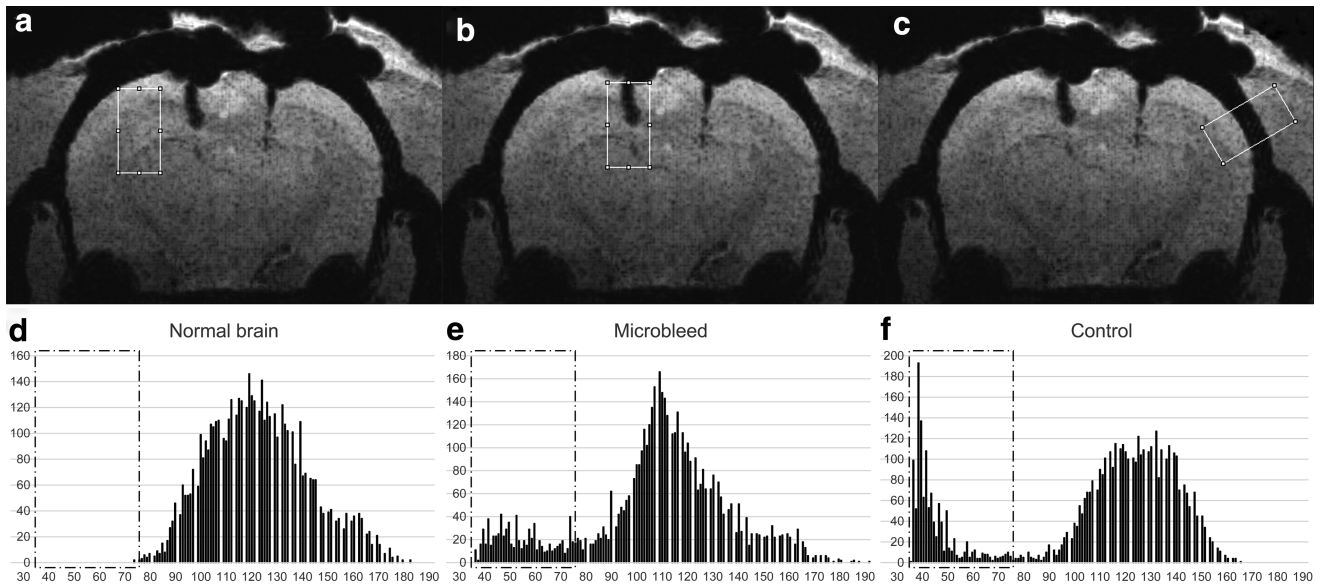
### *MRI data analysis*

To visualize hypointense lesions without partial volume effects or dependence on slice orientation, ParaVision Acquisition 6.0.1 software (Bruker) was used to create coronal plane minimum intensity projection (minIP) images of 0.2 mm thick sections of the 3D SWI volumes. These sections were placed on the site of injury based on the signs of the skull burr holes and anatomy. The sections were checked to include all hypointensities related to the injury site. The minIP images were exported upsampled to a matrix of 768×768. To visualize 3D filtered phase data, the same steps were performed except using maximal instead of minimal intensity projection.

Quantitative analysis of hypointense lesion extent referring to microbleeds was performed using ImageJ software version 1.51k (Wayne Rasband, National Institutes of Health).<sup>34</sup> A stack was built from all animals all time point SWI minIP images. First, voxel hypointensity was defined: in immediate time point minIP images, a rectangle shaped region of interest (ROI) of 50 voxels width (=2.1 mm) and 100 voxels height (=4.2 mm) was drawn and fitted over the normal appearing brain parenchyma (next to but excluding lesion sites, also excluding large vessels) in all animals (Fig. 1a). Using such ROIs, histogram analyses were applied to find the lowest included intensities (Fig. 1d). The average value of these lowest intensities was found to be 76; therefore, voxels with an intensity of  $\leq 75$  were defined as hypointense.

This ROI at identical sites and histogram analysis were also applied to the 24 h and 125 h minIP images to calculate average intensities. Based on these intensities, 24 h and 125 h image intensities were normalized to the immediate image intensity for each animal. Then, another rectangle shaped ROI of 50 voxels width (=0.2 mm) and 100 voxels height (=0.42 mm) was created. This ROI was placed over the injury sites (Fig. 1b), based on burr holes if the microbleed not visible, blinded to imaging time points, to extract the number of hypointense ( $\leq 5$ ) voxels referring to microbleeds (Fig. 1e). Ventricular hemorrhage was included, if present.

Bone was used as a control structure, because bone appears hypointense in SWI but can be assumed to not undergo any volume



**FIG. 1.** Illustration of the applied regions of interests (ROIs, overlaid on an immediate time point minimal intensity projection image) and their histograms with dash-dot lined boxes indicating “hypointense voxel” range. **(a, d)** Normal brain ROI and histogram, used to define hypointensity: the average value of the lowest intensities over normal brain (including all animals’ immediate time point images, not only the presented one) was found to be 76; therefore, voxels with an intensity of  $\leq 75$  were defined as hypointense. **(b, e)** Microbleed ROI and histogram, used to calculate the number of hypointense voxels at injury sites corresponding to microbleed volumes (applied at all time points). The presented microbleed ROI included 791 hypointense voxels (see box in histogram). **(c, f)** Control ROI and histogram, for calculating the hypointense voxel number (applied at all time points) of the hypointense structure parietal bone assumed not to undergo volume changes over time. The presented control ROI included 1,202 such hypointense voxels (see box in histogram).

changes over the 125 h investigation period. Therefore, a control ROI with identical dimensions as lesion ROI was placed over the lateral part of the parietal bone at the same level as the injury site and was rotated perpendicular to the bone (Fig. 1c). The number of hypointense voxels of the bone under the control ROI was extracted using the same intensity threshold value of 75 (Fig. 1f).

The number of hypointense voxels over both side lesion sites (i.e., microbleed extents) and parietal bone (control) across the immediate, 24 h, and 125 h time points were compared using repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction using Medcalc ver. 13.0.0.0 (MedCalc Software byba, Ostend, Belgium).<sup>35</sup> Such corrected  $p$  value less than 0.05 was considered statistically significant. Thirteen animals were available with the necessary three imaging time points for this analysis (the other six animals of the overall 19 animals were euthanized at earlier time points).

### Histology

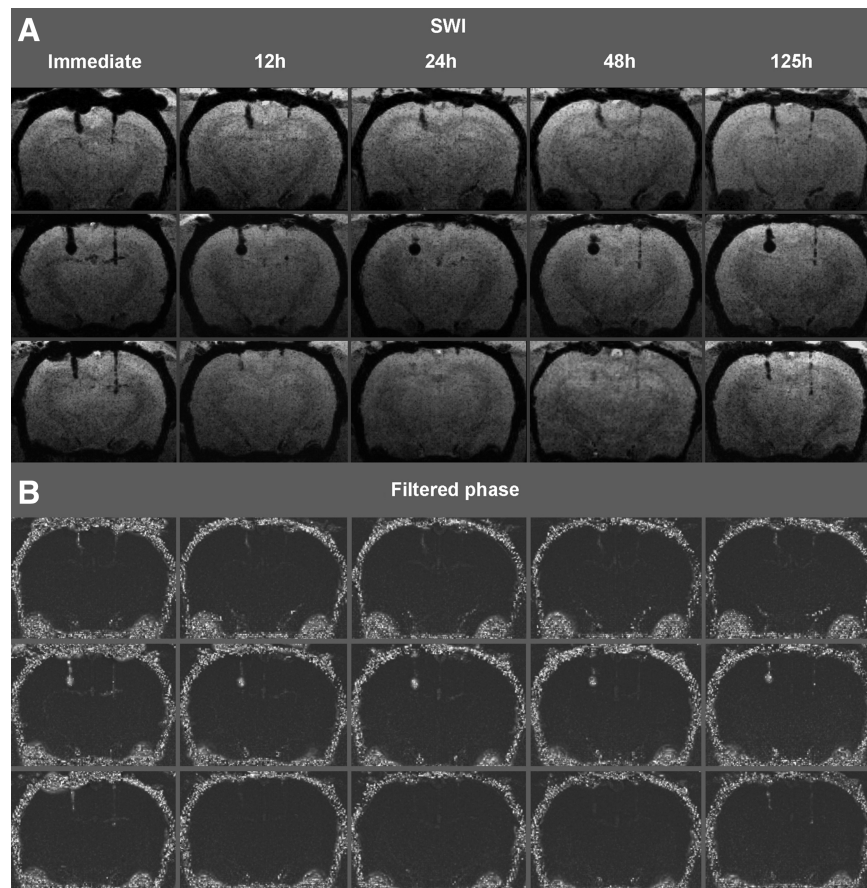
After euthanasia, transcardial perfusion was performed with isotonic saline followed by 4% paraformaldehyde. That was performed in three cases after the immediate MRI acquisition, in another three cases after the 24 h acquisition, and after the 125 h imaging time point for the rest of the animals. The formalin fixation of the heads was continued for at least two weeks. Then, the brains were removed from the skull and were embedded in paraffin. If lesion sites were visible on the surface of the brain, the surrounding region was cut into  $6\ \mu\text{m}$  thick coronal sections and stained using Prussian blue. When lesion sites were not visible, the coronal sections were cut from the region supposed to contain lesions based on anatomy, and only every 10th section was first stained with Prussian blue to identify sections including the bleedings in the largest volume. Second, the adjacent sections were also stained to capture the entire bleeding. Bleedings were defined as extravasated red blood cells, or hemosiderin reaction at the lesion sites.

### Results

Hypointensities referring to microbleeds along both the left and right brain parenchymal injury sites were present in the immediate minIP images of all animals (Fig. 2A, 3). According to the lesser (right side) and greater (left side) gauge injury, the right side hypointensities appeared generally smaller than the left side ones. Occasionally, small amounts of blood entering the ventricles were observed. In the first set of animals that underwent five imaging time points, the hypointensities became smaller or completely absent in the 12 h, 24 h, and 48 h acquisitions (Fig. 2A). In the 125 h acquisitions, the hypointensities were again present of similar shape, extent, and intensity as in the immediate time point. The further 10 animals that underwent three time point imaging presented the same temporal characteristics: Hypointensities were present in the immediate imaging, decreased in extent or completely disappeared at the 24 h time point, and appeared the same as in the immediate imaging at the last (125 h) acquisition (Fig. 3).

Complete lesion disappearance occurred in nine of 13 animals at the lesser gauge injury site, and in five of 13 animals at the larger gauge injury site. In three animals (second in Fig. 2A, first and ninth in Fig. 3) at the larger gauge injury track, relatively large hypointensities referring to relatively large (macroscopic) circumscribed blood collections were formed showing no noticeable change over time.

Average hypointensity extents were significantly (corrected  $p < 0.05$ ) smaller at the 24 h time point compared with the immediate and the 125 h acquisitions (Fig. 4A, 4B). Repeated measures ANOVA of the average hypointensity extents of the control parietal bone region did not show any significant (corrected  $p < 0.05$ ) difference among the time points. The results of the ANOVA tests are presented in Table 1.

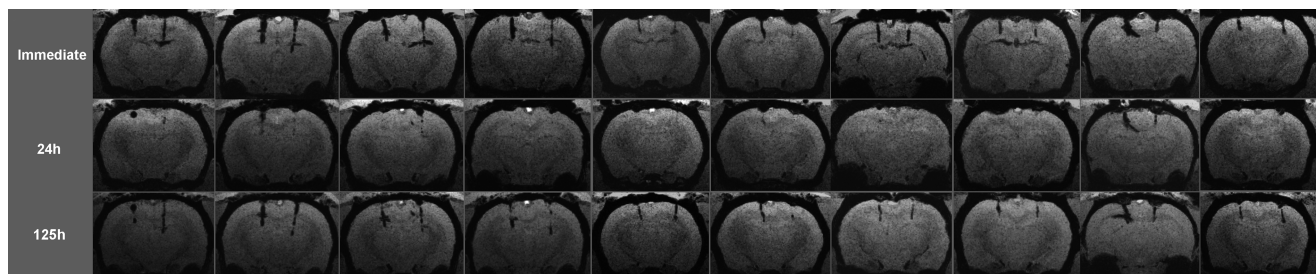


**FIG. 2.** (A) Coronal susceptibility-weighted imaging (SWI) minimum intensity projection images of three rats that underwent five imaging time points (each row represents different animals). Hypointensities along both the left and right side brain parenchymal injury sites were present in the immediate acquisition. The hypointensities became smaller or completely absent in the 12 h, 24 h, and 48 h acquisitions. In the 125 h acquisitions, the hypointensities were again present in a similar shape, extent, and intensity as at the immediate time point. In the second animal, at the larger gauge injury track (left), a relatively large circumscribed blood collection was formed showing no noticeable change over time. (B) Coronal maximum intensity projection images of the same rats' filtered phase images. Hyperintensities consistent with phase alteration at lesion sites are more pronounced at the immediate and 125 h imaging time point than at the 12 h, 24 h, or 48 h time points.

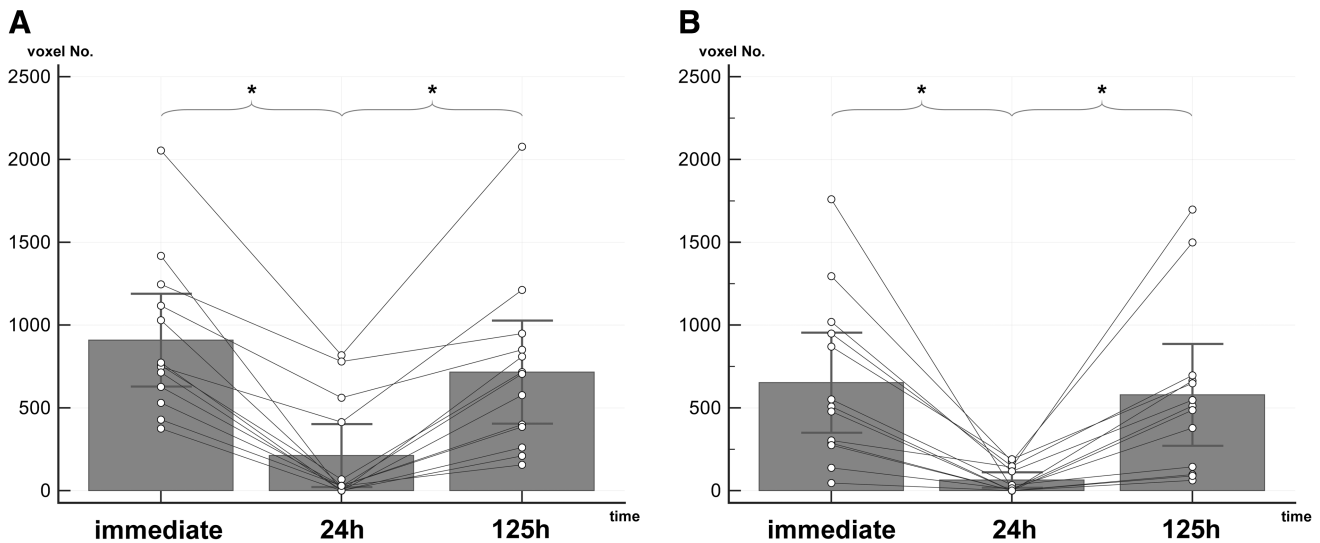
Filtered phase images presented a similar temporal pattern based on visual inspection—i.e., pronounced phase alterations in forms of hyperintensities at lesion sites were present at the immediate and last imaging (125 h) that were less apparent at the 12 h, 24 h, or 48 h time points. Figure 2B shows filtered phase images of the three animals that underwent five imaging time points.

#### Histology

Bleedings were present in all animals at the lesion sites regardless of the time point of euthanasia. In the vast majority of cases, bleedings were macroscopically not visible in the slides, and their diameter (width) was measured to be typically 60–100  $\mu\text{m}$ ; at



**FIG. 3.** Coronal susceptibility-weighted imaging minimum intensity projection images of 10 rats that underwent three imaging time points (each column represents different animals). Hypointensities along both the left and right side brain parenchymal injury sites were present in the immediate acquisition. The hypointensities became smaller or completely absent at the 24 h time point and were again present at the 125 h time point, with a similar shape, extent, and intensity as at the immediate time point. In the first and ninth animals, at the larger gauge injury track (left), relatively large circumscribed blood collections were formed showing no noticeable change over time.



**FIG. 4.** Average temporal susceptibility-weighted imaging hypointensity extent changes at the injury sites in 13 animals. **(A)** Left side (larger gauge injury). **(B)** right side (lesser gauge injury). Asterisks refer to analysis of variance pairwise comparisons between time points resulting in a Bonferroni corrected  $p$  value of  $<0.05$ .

a few sites maximal diameters reached  $200\ \mu\text{m}$ . The relatively large circumscribed hypointensities in SWI that were accidentally formed in three animals (second in Fig. 2A, first and ninth in Fig. 3), however, were macroscopically visible in both the paraffin tissue blocks and the slides, measuring  $500\text{--}900\ \mu\text{m}$  diameters. In animals that were euthanized at 24 h after injury, bleeds were still present as expected based on the immediate imaging, despite the decrease or disappearance of corresponding hypointensities at 24 h imaging. Only by the last (125 h) time point, the presence of hemosiderin was shown by Prussian blue staining. Corresponding representative findings are shown in Figure 5.

## Discussion

We developed an experimental model in which histologically proven brain parenchymal microbleeds were produced and reliably detected by SWI. Microbleeds significantly decreased in extent and often completely became invisible between the immediate and the 24 h acquisition time point. Until the last (125 h) imaging time point, a significant re-increase—i.e., re-appearance—was present.

TABLE 1. RESULTS OF HYPPOINTENSITY EXTENTS REPEATED MEASURES ANALYSIS OF VARIANCE

		Left (larger gauge injury)	Right (lesser gauge injury)	Control (parietal bone)
Extent <sup>a</sup>	Immediate	908	652	1958
	24 h	212	64	2134
	125 h	716	578	2286
$p$ value <sup>b</sup>	24 h vs. Immediate	$< 0.0001$	0.0022	1
	24 h vs. 125 h	0.0004	0.0048	1
	Immediate vs. 125 h	0.317	1	0.46

<sup>a</sup>Number of hypointense voxels in the minimum intensity projection images.

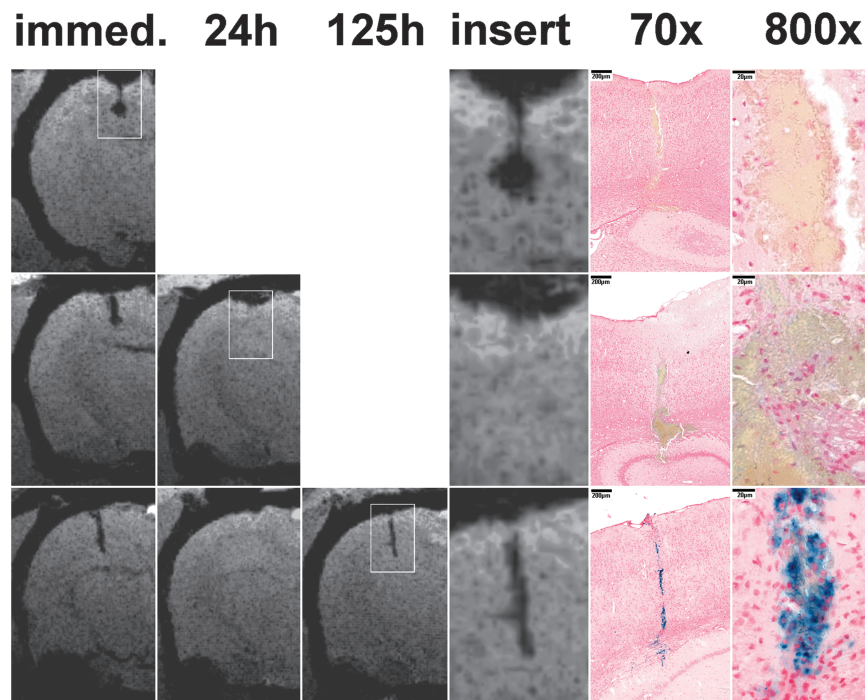
<sup>b</sup> $p$  values from pairwise comparisons, Bonferroni corrected.

Complete invisibility at 24 h occurred commonly. Histopathological findings confirmed that microbleeds did not actually vanish, because microbleeds were present in all time points of animal euthanasia. These findings highly explain the observations of previous human case reports and an experimental case report on microbleeds appearance changes,<sup>5,30–33</sup> and at the same time indicate that short-term microbleed change is a general phenomenon, because of MR visibility change over time. In humans, the timing of the temporary disappearance might be somewhat slower. Based on the case observations by Watanabe and coworkers,<sup>32</sup> microbleed invisibility might take place roughly between 24 h and seven days after formation.

Accidentally, larger blood collections resembling hematomas instead of microbleeds occurred at the injury sites, probably because of an injury of a relatively large vessel. These hematoma-like lesions did not disappear or show obvious changes over time. This implied that the phenomenon of temporary invisibility is dependent on bleeding size.

The explanation of the phenomenon of temporary microbleed invisibility is challenging. Based on the macroscopic hemorrhage literature, a possible reason is the development of methemoglobin that markedly decreases T1 relaxation time because of dipole-dipole interactions.<sup>15,36</sup> Consequently, T1 shine-through may occur in SWI or T2\* GRE images.<sup>18,19,32</sup> In the present study, however, some arguments can be made against the development of methemoglobin as the explanation for microbleed signal void cessation. First, apparent microbleed signal increase was found as early as 12 h, while methemoglobin is expected to form earliest at 24 h in rats.<sup>18,37</sup> Second, no T1 shine through or hyperintensity was detected over the lesions. Third, phase effects appeared to be diminished at 24 h, implying the weakening of paramagnetism. That is in contrast with the supposed effect of methemoglobin; methemoglobin is regarded to be just as paramagnetic as deoxyhemoglobin, because of its five unpaired electrons.<sup>15,36,38</sup>

Unlike deoxyhemoglobin, oxyhemoglobin is known to not cause signal void in SWI; therefore, a theoretical explanation for the development of microbleed invisibility might be blood oxygenation. The passive oxygenation of microbleeds in the brain, however,



**FIG. 5.** Correlations of susceptibility-weighted imaging (SWI) and histology of microbleeds. First, second, and third lines show rats that were euthanized after the immediate, 24 h, or 125 h imaging, respectively. The available coronal SWI minimum intensity projection images of microbleeds of interest are presented, with inserts indicating the corresponding histological (Prussian blue staining, 70x and 800x) images. Blood products are apparent in the animal euthanized at 24 h and 125 h as well, despite the absence of hypointensities in the 24 h SWIs. Prussian blue staining indicates the presence of hemosiderin at 125 h.

can be excluded, because normal brain tissue  $O_2$  tension is known to be not higher than venous blood  $O_2$  tension either in humans or rats.<sup>39,40</sup> In fact, bleedings of even an arterial source should become and remain deoxygenated.<sup>15</sup>

Another important mechanism possibly affecting MRI appearance in the hyperacute phase is the increase of red blood cell ratio because of clot retraction.<sup>15,22</sup> An elevation in hematocrit to approximately 90% occurs when extravasated blood settles and subsequently forms a retracted clot.<sup>41</sup>

Some studies presented parabolic correlations between T2 relaxation time and deoxygenated red blood cell concentration, so that shortest T2 times occurred at hematocrits of 50%.<sup>23,42</sup> It has been postulated that local field inhomogeneity in extracellular water caused by deoxyhemoglobin containing red blood cells results in selective T2 relaxation enhancement (T2 time decrease).<sup>23</sup> If the blood is concentrated by clotting or settling, the removal of the extracellular water will greatly reduce the effects of T2 proton relaxation enhancement<sup>23,43</sup>; that explains T2 time lengthening at higher hematocrits.

Such hematocrit and local field inhomogeneity dependent T2 relaxation effect is very likely to be linked to the T2\* effect as well. Clot inhomogeneity at voxel level is regarded to cause signal loss in GRE.<sup>21,43</sup> In contrast, full retracted clots despite containing red blood cells with deoxygenized hemoglobin have been shown to increase signal in GRE.<sup>21</sup> Such samples may paradoxically not cause a marked signal void in SWI either. This is in contrast with the findings of Barnes and associates<sup>44</sup> who have shown that *in vivo* blood sedimentation because of stasis in veins is related to phase shift and signal decrease in SWI.

In this study, however, the hypointense settled blood fell into macroscopic range and, lacking microscopic analysis, no infor-

mation could be obtained regarding voxel level inhomogeneity. Therefore, it still can be postulated that homogeneous clot formation caused signal gain at the microscopic level might be the primary reason for the temporary invisibility of microbleeds. Macroscopic hematomas, in turn, are regarded to be composed of partial retracted clots with small plasma pools<sup>20,21,26,45</sup> maintaining signal void in susceptibility sensitive MRI probably as a result of voxel level inhomogeneity.<sup>21</sup>

The re-appearance of microbleeds from the 24 h to last imaging time points can be explained by the development of late breakdown products of hemoglobin as hemosiderin and ferritin, known to be superparamagnetic.<sup>2,15</sup>

For the MR investigation of microbleeds, this model had some advantages compared with other injury and hemorrhage models, such as the weight drop/fluid percussion trauma models,<sup>46,47</sup> or autologous blood, collagenase injection,<sup>48</sup> and lipopolysaccharide<sup>49</sup> hemorrhage models. Instead of macroscopic hematomas, our model produced true microbleeds, in controlled locations, without unnecessary burdening of the animals—none of the animals were lost or showed any signs of significant morbidity during the examination period.

Still, this study has certain limitations. Because we performed the examination using single hardware and set of parameters, it cannot be excluded that changes in specific parameters would affect the characteristics of this phenomenon. At the same time, the fact that different, 1.5 T and 3 T systems were applied in previous human case reports leading to comparable findings<sup>30,33</sup> strongly suggests that the phenomenon is not scanner dependent. The mechanism of microbleed formation because of direct vessel injury in the present model is obviously different from the expected more indirect vessel injury mechanisms in traumatic brain injury. The actual circumstances of microbleed formation, however, are very

unlikely to substantially influence the later biochemical sequelae of the extravasated blood products.

The phenomenon of short-term temporary microbleed visibility decrease in MRI may have direct clinical and scientific implications. An inadequate timing of MRI for detecting microbleeds may result in false negative findings. In follow-up imaging, microbleed disappearance should not be interpreted as real regression, while appearance should not be misdiagnosed as re-bleeding or hemorrhagic transformation. The latter, however, cannot be certainly excluded when missing hyperacute imaging. The detection of both the disappearance and re-appearance of a microbleed may be the only way to differentiate new microbleeds from chronic ones.

## Conclusion

We developed a reliable experimental model for temporal microbleed MRI examinations and confirmed general temporary reduction in visibility of microbleeds in the acute phase in SWI. Although the exact explanation of this phenomenon remains elusive, our findings prove that imaging timing is important when using SWI acutely as a diagnostic tool for microbleeds.

## Acknowledgments

This study was funded by the Hungarian Scientific Research Fund Grant No. OTKA/K-120356. The Hungarian Brain Research Program 2.0 – Grant No. 2017-1.2.1-NKP-2017-00002; EFOP-3.6.2.-16-2017-00008 “The role of neuro-inflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics” and the Hungarian Economic Development and Innovation Operational Programme grant numbers GINOP-2.3.2-15-2016-00048, GINOP-2.3.2-15-2016-00049 and GINOP-2.3.3-15-2016-00032 also supported the present work.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

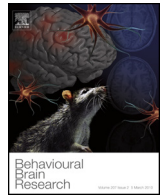
## References

- Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Haacke, E.M. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 30, 232–252.
- Greenberg, S.M., Vernooij, M.W., Cordonnier, C., Viswanathan, A., Al-Shahi Salman, R., Warach, S., Launer, L.J., Van Buchem, M.A., Breteler, M.M.; and Microbleed Study Group. (2009). Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation. *Lancet Neurol.* 8, 165–174.
- Haacke, E.M., Mittal, S., Wu, Z., Neelavalli, J., and Cheng, Y.C. (2009). Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 30, 19–30.
- de Haan, S., de Groot, J.C., Jacobs, B., and van der Naalt, J. (2017). The association between microhaemorrhages and post-traumatic functional outcome in the chronic phase after mild traumatic brain injury. *Neuroradiology* 59, 963–969.
- Lawrence, T.P., Pretorius, P.M., Ezra, M., Cadoux-Hudson, T., and Voets, N.L. (2017). Early detection of cerebral microbleeds following traumatic brain injury using MRI in the hyper-acute phase. *Neurosci. Lett.* 655, 143–150.
- Toth, A., Kornyei, B., Kovacs, N., Rostas, T., Buki, A., Doczi, T., Bogner, P., and Schwarcz, A. (2018). Both hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic MRI lesions are associated with the microstructural damage of the normal appearing white matter. *Behav. Brain Res.* 340, 106–116.
- Trifan, G., Gattu, R., Haacke, E.M., Kou, Z., and Benson, R.R. (2017). MR imaging findings in mild traumatic brain injury with persistent neurological impairment. *Magn. Reson. Imaging* 37, 243–251.
- Ritzenthaler, T., Chamard, L., and Dailler, F. (2016). Teaching Neuroimages: usefulness of susceptibility-weighted sequences after traumatic brain injury. *Neurology* 87, e83–e84.
- Abu Hamdeh, S., Marklund, N., Lannsjö, M., Howells, T., Raininko, R., Wikström, J., and Enblad, P. (2017). Extended anatomical grading in diffuse axonal injury using MRI: hemorrhagic lesions in the substantia nigra and mesencephalic tegmentum indicate poor long-term outcome. *J. Neurotrauma* 34, 341–352.
- Huang, Y.L., Kuo, Y.S., Tseng, Y.C., Chen, D.Y., Chiu, W.T., and Chen, C.J. (2015). Susceptibility-weighted MRI in mild traumatic brain injury. *Neurology* 84, 580–585.
- Beauchamp, M.H., Beare, R., Ditchfield, M., Coleman, L., Babl, F.E., Kean, M., Crossley, L., Catroppa, C., Yeates, K.O., and Anderson, V. (2013). Susceptibility weighted imaging and its relationship to outcome after pediatric traumatic brain injury. *Cortex* 49, 591–598.
- Spitz, G., Maller, J.J., Ng, A., O’Sullivan, R., Ferris, N.J., and Ponsford, J.L. (2013). Detecting lesions after traumatic brain injury using susceptibility weighted imaging: a comparison with fluid-attenuated inversion recovery and correlation with clinical outcome. *J. Neurotrauma* 30, 2038–2050.
- Kim, B.J., and Lee, S.H. (2013). Cerebral microbleeds: their associated factors, radiologic findings, and clinical implications. *J. Stroke* 15, 153–163.
- van der Horn, H.J., de Haan, S., Spikman, J.M., de Groot, J.C., and van der Naalt, J. (2018). Clinical relevance of microhemorrhagic lesions in subacute mild traumatic brain injury. *Brain Imaging Behav.* 12, 912–916.
- Bradley, W.G., Jr. (1993). MR appearance of hemorrhage in the brain. *Radiology* 189, 15–26.
- Parizel, P.M., Makkat, S., Van Miert, E., Van Goethem, J.W., van den Hauwe, L., and De Schepper, A.M. (2001). Intracranial hemorrhage: principles of CT and MRI interpretation. *Eur. Radiol.* 11, 1770–1783.
- Ripoll, M.A., Siosteen, B., Hartman, M., and Raininko, R. (2003). MR detectability and appearance of small experimental intracranial hematomas at 1.5 T and 0.5 T. A 6-7-month follow-up study. *Acta Radiol.* 44, 199–205.
- Belayev, L., Obenaus, A., Zhao, W., Saul, I., Busto, R., Wu, C., Vigdorichik, A., Lin, B., and Ginsberg, M.D. (2007). Experimental intracerebral hematoma in the rat: characterization by sequential magnetic resonance imaging, behavior, and histopathology. Effect of albumin therapy. *Brain Res.* 1157, 146–155.
- Knight, R.A., Han, Y., Nagaraja, T.N., Whittin, P., Ding, J., Chopp, M., and Seyfried, D.M. (2008). Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 39, 2596–2602.
- Del Bigio, M.R., Yan, H.J., Buist, R., and Peeling, J. (1996). Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke* 27, 2312–2319.
- Taber, K.H., Hayman, L.A., Herrick, R.C., and Kirkpatrick, J.B. (1996). Importance of clot structure in gradient-echo magnetic resonance imaging of hematoma. *J. Magn. Reson. Imaging* 6, 878–883.
- Clark, R.A., Watanabe, A.T., Bradley, W.G., Jr., and Roberts, J.D. (1990). Acute hematomas: effects of deoxygenation, hematocrit, and fibrin-clot formation and retraction on T2 shortening. *Radiology* 175, 201–206.
- Thulborn, K.R., Waterton, J.C., Matthews, P.M., and Radda, G.K. (1982). Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field. *Biochim. Biophys. Acta* 714, 265–270.
- Linfañte, I., Llinas, R.H., Caplan, L.R., and Warach, S. (1999). MRI features of intracerebral hemorrhage within 2 hours from symptom onset. *Stroke* 30, 2263–2267.
- Patel, M.R., Edelman, R.R., and Warach, S. (1996). Detection of hyperacute primary intraparenchymal hemorrhage by magnetic resonance imaging. *Stroke* 27, 2321–2324.
- Brown, M.S., Kornfeld, M., Mun-Bryce, S., Sibbitt, R.R., and Rosenberg, G.A. (1995). Comparison of magnetic resonance imaging and histology in collagenase-induced hemorrhage in the rat. *J. Neuroimaging* 5, 23–33.
- Fazekas, F., Kleinert, R., Roob, G., Kleinert, G., Kapeller, P., Schmidt, R., and Hartung, H.P. (1999). Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo T2\*-weighted MR images in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: evidence of microangiopathy-related microbleeds. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 20, 637–642.
- Tatsumi, S., Shinohara, M., and Yamamoto, T. (2008). Direct comparison of histology of microbleeds with postmortem MR images: a case report. *Cerebrovasc. Dis.* 26, 142–146.
- Haller, S., Vernooij, M.W., Kuijper, J.P., Larsson, E.M., Jäger, H.R., and Barkhof, F. (2018). Cerebral microbleeds: imaging and clinical significance. *Radiology* 287, 11–28.



30. Toth, A., Kovacs, N., Tamas, V., Kornyei, B., Nagy, M., Horvath, A., Rostas, T., Bogner, P., Janszky, J., Doczi, T., Buki, A., and Schwarcz, A. (2016). Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* 617, 207–212.
31. Ezaki, Y., Tsutsumi, K., Morikawa, M., and Nagata, I. (2006). Lesions identified on T2\*-weighted gradient echo images in two patients with suspected diffuse axonal injury that resolved in less than ten days. *Acta Neurochir. (Wien)* 148, 547–550.
32. Watanabe, J., Maruya, J., Kanemaru, Y., Miyauchi, T., and Nishimaki, K. (2016). Transient disappearance of microbleeds in the subacute period based on T2\*-weighted gradient echo imaging in traumatic brain injury. *Acta Neurochir. (Wien)* 158, 1247–1250.
33. Kallakuri, S., Bandaru, S., Zakaria, N., Shen, Y., Kou, Z., Zhang, L., Haacke, E.M., and Cavanaugh, J.M. (2015). Traumatic brain injury by a closed head injury device induces cerebral blood flow changes and microhemorrhages. *J. Clin. Imaging Sci.* 5, 52.
34. Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
35. Schoonjans, F., Zalata, A., Depuydt, C.E., and Comhaire, F.H. (1995). MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed.* 48, 257–262.
36. Bradley, W.G., Jr., and Schmidt, P.G. (1985). Effect of methemoglobin formation on the MR appearance of subarachnoid hemorrhage. *Radiology* 156, 99–103.
37. MacLellan, C.L., Silasi, G., Poon, C.C., Edmundson, C.L., Buist, R., Peeling, J., and Colbourne, F. (2008). Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 516–525.
38. Chang, S., Zhang, J., Liu, T., Tsiouris, A.J., Shou, J., Nguyen, T., Leifer, D., Wang, Y. and Kovanlikaya, I. (2016). Quantitative susceptibility mapping of intracerebral hemorrhages at various stages. *J. Magn. Reson. Imaging* 44, 420–425.
39. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. and Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell Mol. Med.* 15, 1239–1253.
40. Vovenko, E. (1999). Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflugers Arch.* 437, 617–623.
41. Hayman, L.A., Ford, J.J., Taber, K.H., Saleem, A., Round, M.E., and Bryan, R.N. (1988). T2 effect of hemoglobin concentration: assessment with in vitro MR spectroscopy. *Radiology* 168, 489–491.
42. Janick, P.A., Hackney, D.B., Grossman, R.I., and Asakura, T. (1991). MR imaging of various oxidation states of intracellular and extracellular hemoglobin. *AJNR Am J Neuroradiol* 12, 891–897.
43. Hayman, L.A., Taber, K.H., Ford, J.J., and Bryan, R.N. (1991). Mechanisms of MR signal alteration by acute intracerebral blood: old concepts and new theories. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 12, 899–907.
44. Barnes, S., and Haacke, E.M. (2009). Settling properties of venous blood demonstrated in the peripheral vasculature using susceptibility-weighted imaging (SWI). *J. Magn. Reson. Imaging* 29, 1465–1470.
45. Enzmann, D.R., Britt, R.H., Lyons, B.E., Buxton, J.L., and Wilson, D.A. (1981). Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2, 517–526.
46. Kalish, B.T., and Whalen, M.J. (2016). Weight drop models in traumatic brain injury. *Methods Mol. Biol.* 1462, 193–209.
47. Kabadi, S.V., Hilton, G.D., Stoica, B.A., Zapple, D.N., and Faden, A.I. (2010). Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. *Nat. Protoc.* 5, 1552–1563.
48. Kirkman, M.A., Allan, S.M., and Parry-Jones, A.R. (2011). Experimental intracerebral hemorrhage: avoiding pitfalls in translational research. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 31, 2135–2151.
49. Sumbria, R.K., Grigoryan, M.M., Vasilevko, V., Krasieva, T.B., Scadeng, M., Dvornikova, A.K., Paganini-Hill, A., Kim, R., Cribbs, D.H., and Fisher, M.J. (2016). A murine model of inflammation-induced cerebral microbleeds. *J. Neuroinflammation* 13, 218.

Address correspondence to:  
*Arnold Tóth, MD, PhD*  
*Department of Neurosurgery*  
*Pécs Medical School*  
*H-7623, Rét. u. 2.*  
*Pécs, Baranya*  
*Hungary*  
 E-mail: prsarn@gmail.com



## Research report

# Both hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic MRI lesions are associated with the microstructural damage of the normal appearing white matter



Arnold Toth<sup>a,b,\*</sup>, Balint Kornyei<sup>a</sup>, Noemi Kovacs<sup>a</sup>, Tamas Rostas<sup>b</sup>, Andras Buki<sup>a,d</sup>,  
Tamas Doczi<sup>a,c,d</sup>, Peter Bogner<sup>a,b</sup>, Attila Schwarcz<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurosurgery, Pécs Medical School, Rét. u. 2, H-7623 Pécs, Hungary

<sup>b</sup> Department of Radiology, Pécs Medical School, Ifjuság str. 13, H-7624 Pécs, Hungary

<sup>c</sup> Diagnostic Center of Pécs, Rét. u. 2, H-7623 Pécs, Hungary

<sup>d</sup> MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Hungary

## HIGHLIGHTS

- Non-hemorrhagic lesion presence is related to decreased microstructural integrity.
- Basal ganglia area microbleeds are related to decreased microstructural integrity.
- Focal MRI pathology evaluation may substitute quantitative diffusion tensor imaging.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 June 2016

Received in revised form 11 October 2016

Accepted 22 February 2017

Available online 27 February 2017

## Keywords:

MRI

Traumatic brain injury

Susceptibility weighted imaging

Diffusion tensor imaging

Traumatic microbleeds

Diffuse axonal injury

## ABSTRACT

Traumatic microbleeds (TMBs) and non-hemorrhagic lesions (NHLs) on MRI are regarded as surrogate markers of diffuse axonal injury. However, the actual relation between lesional and diffuse pathology remained unclear, since lesions were related to clinical parameters, largely influenced by extracranial factors.

The aim of this study is to directly compare TMBs, NHLs and their regional features with the co-existing diffuse injury of the normal appearing white matter (NAWM) as measured by diffusion tensor imaging (DTI).

Thirty-eight adults with a closed traumatic brain injury (12 mild, 4 moderate and 22 severe) who underwent susceptibility weighted imaging (SWI), T1-, T2 weighted and FLAIR MRI and routine CT were included in the study. TMB (on SWI) and NHL (on T1-, T2 weighted and FLAIR images) features and Rotterdam scores were evaluated. DTI metrics such as fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity (MD) were measured over different NAWM regions. Clinical parameters including age; Glasgow Coma Scale; Rotterdam score; TMB and NHL features were correlated to regional NAWM diffusivity using multiple regression.

Overall NHL presence and basal ganglia area TMB load were significantly, negatively correlated with the subcortical NAWM FA values (partial  $r = -0.37$  and  $-0.36$ ;  $p = 0.006$  and  $0.025$ , respectively).

The presence of any NHL, or TMBs located in the basal ganglia area indicates diffuse NAWM damage even after adjusting for clinical and CT parameters. To estimate DAI, a conventional lesional MRI pathology evaluation might at least in part substitute the use of quantitative DTI, which is yet not widely feasible in a clinical setting.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** AD, axial diffusivity; DAI, diffuse axonal injury; FA, fractional anisotropy; FLAIR, fluid attenuated inversion recovery; GCS, Glasgow Coma Scale; GRE, gradient recalled echo; MD, mean diffusivity; NAWM, normal appearing white matter; NHL, non-hemorrhagic lesion; RD, radial diffusivity; SWI, susceptibility weighted imaging; TBI, traumatic brain injury; TE, echo time; TI, inversion time; TMB, traumatic microbleed; TR, repetition time.

\* Corresponding author at: Department of Neurosurgery, Rét. u. 2, H-7623 Pécs, Hungary.

E-mail address: [prsarn@gmail.com](mailto:prsarn@gmail.com) (A. Toth).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.02.039>

0166-4328/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) constitutes a public health problem worldwide [1]. Diffuse axonal injury (DAI) is a substantial pathological component of brain injury, and is highly related to outcome [2]. DAI (or traumatic axonal injury) can occur both in severe and mild TBI [2] at a certain extent. However, in consequence of its microscopic range, it is basically “invisible” to standard TBI imaging protocols.

Interest in the application of susceptibility weighted imaging (SWI) [3] in TBI has recently been increasing rapidly, since it has been shown to be a very sensitive imaging method for the detection of the possible DAI-associated hemorrhagic foci, also known as traumatic microbleeds (TMBs) [4]. SWI is a fully velocity-compensated, high-resolution 3D gradient echo sequence that uses magnitude and filtered-phase information, both separately and in combination, and is therefore able to create a strong contrast for the susceptibility effects of microbleeds [3]. Other imaging methods, such as CT, T2- and T2\*-weighted MRI or FLAIR are also able to depict punctual DAI-related lesions, though less reliably than SWI [5–8]. SWI allows patients with a DAI to be dichotomized as hemorrhagic or non-hemorrhagic, and this has been proposed to be of clinical relevance [9,10]. Moreover, the number, localization, type and volume of TMBs have been linked to the severity of clinical state as well as the outcome [7,8,11–19].

Another advanced MRI method, diffusion tensor imaging (DTI), has been proposed to sensitively detect white matter damage itself by a very extensive body of literature [20]. DTI does not only detect Brownian diffusion extent, but also diffusion directionality (anisotropy) and direction [21,22]. Data suggest that the different DTI parameters, such as fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD) and radial diffusivity (RD) may reflect the damage of the white matter [20]. Though the detected actual traumatic DTI parameter alterations vary largely across studies, in the relatively late phases of TBI, studies mostly agree that FA is decreased, while MD is increased due to axonal pathology. However, to date DTI assessment of axonal injury has been based almost exclusively on group analyses, with the use of post-processing computation and statistics [20]. The main reasons limiting the interpretation of the DTI data at a subject level are the high inter-subject variations (even within the healthy population), and the relatively low specificity of DTI to axonal injury.

In contrast to DTI, SWI might be easily applied at an individual level. A conventional, qualitative morphological assessment might define TMB load, extent and anatomical distribution per patient. Therefore, SWI appears to be the most feasible advanced MRI method for the indirect evaluation of axonal damage in a clinical environment, because group analysis and statistics are not necessary for its interpretation.

However, thus far no consensus has been reached concerning the optimal clinical use of SWI, T2\*GRE or other MRI modalities including the ones depicting non-hemorrhagic lesional pathology (NHL), in TBI. Studies largely agree that TMBs are related to the clinical severity or outcome, but they are heterogeneous in the aspects of the investigated population size, injury severity, image acquisition method, outcome assessment method, as well as the detection and definition of TMB [7,8,11–19]. Though TMBs are accepted as surrogate markers of DAI, it is of note that they are rather due to microvascular injury, than axonal injury, and these two are not necessarily strictly related. The clinical state of the patient, however is probably rather dependent on the diffuse axonal-, and not microvascular injury.

The main problem in understanding the role of SWI in TBI can be summarized as: SWI data were related to clinical parameters that are largely influenced by extracranial factors and not directly to the actual axonal pathology. For example, Glasgow Coma Scale (GCS)

may be influenced by alcohol or drug intoxication and accompanying neurological and psychiatric diseases, outcome scores as the Glasgow Outcome Score [23] may be influenced by the presence of extra-cranial injuries, the therapy and rehabilitation process, and the adherence of the patient, etc. As a consequence, it is still unclear if TMBs, or NHLs, and which lesion parameters (number, volume or localization) are indicating the higher rate of axonal damage.

Theoretically, these issues might be resolved when TMB and NHL parameters are correlated with the simultaneously acquired DTI data, since DTI has been widely accepted to sensitively indicate microstructural damage [20], however, because of its technical features and necessary group analyses, up to now it has been not widely used in a clinical setting.

The purpose of this study is to directly compare the diffuse microstructural injury of the normal appearing white matter as measured by DTI with the clinically readable hemorrhagic and non-hemorrhagic traumatic lesion features in TBI patients, to better understand the association between diffuse axonal injury and lesional pathologies.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

This retrospective study was conducted on a database consisting of 66 adults with a closed TBI who underwent the MR imaging protocol (see Section 2.2) from the trauma center at the University of Pécs. Exclusion criteria included a previous documented TBI, any known neurological (including migraine) or psychiatric disease, uncontrolled hypertension, a history of anticoagulant therapy or coagulopathy, or a severe mass lesion or brain distortion precluding reliable DTI analysis. These criteria allowed the inclusion of 38 patients, for clinical and demographic details see Table 1.

20 age- and sex-matched healthy volunteers following the same exclusion criteria were recruited as a control group in the study (see Table 1).

Ethical approval was received from the Institutional Review Board (IRB). Written informed consent was obtained from all the participants (or their legally authorized representatives) in the study.

### 2.2. Imaging protocol

An acute (<24h) CT scan was performed for all TBI patients according to the institutional TBI CT protocol. CT scan was not performed for the healthy control group.

MRI data were acquired in the chronic phase after the injury (min. 1 month, average 2 years  $\pm$  15 months after the injury). MRI was performed on a Magnetom® TIM Trio® 3 Tesla scanner (Siemens, Erlangen, Germany) with a 12 channel standard head coil. The control group underwent the same MRI protocol as the TBI patients:

The sequences consisted of a high-resolution T1-weighted scan (MP-RAGE), T2-weighted scan, FLAIR, DTI and SWI. After the localizer scanning for proper orientation, shimming was carried out to maximize field homogeneity.

T1-weighted high-resolution images were obtained using a three-dimensional (3D) MP-RAGE sequence (TR/TI/TE = 1900/900/3.41 ms; flip angle = 9°; 160 axial slices; slice thickness = 0.94 mm; no inter-slice gap; field of view [FOV] = 210 mm  $\times$  240 mm; matrix size = 224  $\times$  256; receiver bandwidth = 180 Hz/pixel).

T2-weighted images were acquired using a turbo spin echo sequence (TR/TE = 6000/93 ms; flip angle = 120°; 30 axial slices; slice thickness = 4 mm; no inter-slice gap;

**Table 1**  
Demographic data of patients and controls.

Data	Patients (n = 38)	Controls (n = 20)	p
Age (y, SD, min–max)			
Men	35 (13.6) 18–68	38.4 (16.2) 19–72	0.6 <sup>a</sup>
Women	48 (22.1) 20–83	45.4 (14.2) 24–60	0.77 <sup>a</sup>
Total	39.7 (17.4) 18–83	40.9 (15.58) 19–72	0.79 <sup>a</sup>
No. of women	12	7	0.78 <sup>b</sup>
Severity (mild/moderate/severe)	13/4/21		

<sup>a</sup> Two-tailed *t*-test.

<sup>b</sup> Chi-square test.

FOV = 193 mm × 220 mm; matrix size = 280 × 320; receiver bandwidth = 220 Hz/pixel.

FLAIR images were acquired using: TR/TI/TE = 15,700/2750/105 ms; flip angle = 120; 100 axial slices; slice thickness = 1.5 mm; no inter-slice gap; field of view [FOV] = 220 mm × 220 mm; matrix size = 192 × 192; receiver bandwidth = 400 Hz/pixel.

DTI was performed using a two dimensional single-shot diffusion-weighted, spin-echo, echo-planar imaging (EPI) sequence. DTI was achieved using 20 optimum non-collinear encoding directions with a diffusion weighting of  $b = 700 \text{ s/mm}^2$ , and a single volume was collected with no diffusion gradients applied (TR/TE = 8500/90 ms; 60 axial slices, slice thickness = 2 mm; FOV = 208 mm × 256 mm; matrix size = 208 × 256; receiver bandwidth = 1563 Hz/pixel; 4 averages. The total acquisition time was 12 min). Advanced shimming was performed before the DTI acquisition to optimize the homogeneity of the magnetic field across the brain and to minimize EPI distortions.

The 3D gradient echo SWI sequence was run with the following parameters: (TR/TE = 27/20 ms; 72 axial slices; slice thickness = 1.5 mm; flip angle = 15; matrix size = 182 × 256; FOV = 173 mm × 230 mm; receiver bandwidth = 120 Hz/pixel).

Subjects were positioned supine in the scanner. Foam cushioning was used to immobilize the head within the coil to minimize motion degradation.

### 2.3. Image analyses – focal pathology

TMBs were identified on the SWI scans by two independent raters (A.T. and a board certified neuroradiologist T.R.), blinded to the clinical data. TMBs were defined as punctuate, ovoid or curvilinear hypointensities located in the white matter or white-gray matter border that are clearly not consistent with blood vessels or artifacts. To aid such exclusion of mimicking hypointensities and a more precise anatomical localization, both the high resolution T1 weighted- and the T2 images were registered to the SWI images using the FMRIB's Linear Image Registration Tool (FLIRT) [24], which allowed a multi-modal assessment of TMB sites. TMBs associated with T1 or T2 signal alteration were not excluded. TMBs adjacent to contusions, intraventricular hemorrhage or bone-air interface artifacts (e.g. near mastoid process) and external ventricular drain were excluded. The following TMB features were recorded: TMB presence; number of TMBs in the brainstem; "basal ganglia area" (including the caudate nucleus, thalamus, putamen, pallidum, subthalamic nucleus, and all white matter located in this region); corpus callosum; and "subcortical white matter" (including the corona radiata and centrum semiovale); and overall TMB number. Afterwards, TMBs identified by both raters were automatically included in the final registry of TMBs per scan. As a second step, for TMBs detected only by one rater, raters took a second look and decided in mutual consent to include or not in the final TMB registry. FSL "mask" tool (FSL [25], FMRIB's Software Library, [www.fmrib.ox.ac.uk/fsl](http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl), Oxford) and manual tracing was used to create a

TMB map for each patient, this was used to exclude TMB sites from DTI analyses (see Section 2.4).

The detection, recording and masking of the non-hemorrhagic DAI associated lesions (NHL) on T1-, T2-weighted and FLAIR images were performed in the same way as of the TMBs except the lesion definitions. NHLs were defined as lesions of mixed intensity on T1 weighted images, and hyperintense lesions on T2 and FLAIR images. The raters made a cautious effort using the multi-modal approach (as mentioned above) to exclude non-specific scars, lacunes, chronic hypertensive or ischemic microvascular lesions, enlarged Virchow-Robin spaces, etc.

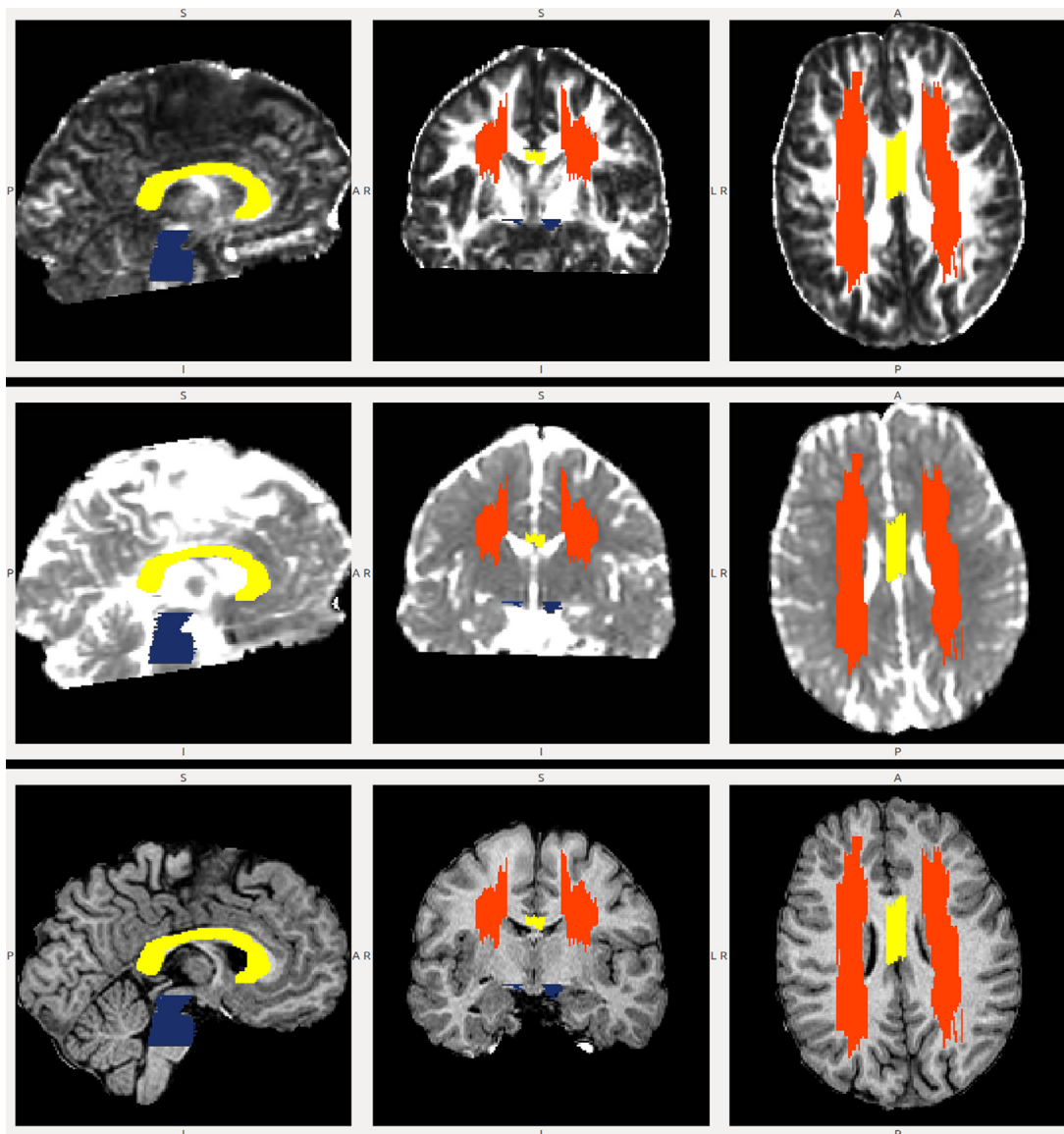
Inter-rater reliability of the first-step TMB and NHL measurement was determined using Intraclass Correlation Coefficient [26]. Two-way model, absolute agreement type was applied, single measurement reliability was calculated.

The standard acute CT scans were read by a board certified neuroradiologist (T.R.) to assess the Rotterdam score [27] for each patient.

### 2.4. Image analysis – DTI

Initial diffusion image processing was performed to generate fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD = L1) and radial diffusivity (RD = (L2 + L3)/2) maps using the FDT (FMRIB's Diffusion Toolbox) tool [25]. The steps included eddy current correction and motion correction using a 12-parameter affine registration to a reference volume (i.e. non-diffusion weighted data,  $b = 0 \text{ s/mm}^2$ ), averaging of the four sets of 20 diffusion directions, and automated brain extraction with brain extraction tool [28], which was manually supervised to avoid incorrect brain extraction. Diffusion data were then fed into DTIFit [25] to calculate the diffusion tensor model for each brain voxel and subsequently compute FA, MD, AD and RD values from the tensor's three eigenvalues [29].

To assess regional mean FA values, FA maps were registered to the high-resolution T1 weighted MPRAGE images (using FLIRT [24]) and then, blinded to clinical data, masks were created in all possible slices by manual tracing (B.K., FSL tools [25]) based on anatomical borders ending up in a 3D mask for the brainstem, corpus callosum, and the subcortical white matter (including the corona radiata and the centrum semiovale) (see Fig. 1). These masks were overlaid on the co-registered T1 images presenting a clearer gray matter–white matter interface and anatomical substrates, and were corrected in the axial, sagittal and coronal image planes. To exclude lesion sites, the TMB and NHL maps (see focal pathology image analyses) were then subtracted from this mask in the MPRAGE space using co-registration if necessary (i.e. for SWI, FLAIR and T2 based lesion maps). The so created mask was then overlaid on the native space FA, MD, AD and RD maps, to calculate the corresponding DTI parameter averages (also see Fig. 1). All co-registration steps were manually controlled.



**Fig. 1.** Illustration of the region of interests for the measurement of regional DTI parameters. Masks: red = subcortical white matter; yellow = corpus callosum; blue = brainstem. Rows: 1. = masks overlaid on FA maps; 2. = masks overlaid on MD maps; 3. = masks overlaid on MPRAGE. Columns: 1. = sagittal plane; 2. = coronal plane; 3. = axial plane. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

### 2.5. Statistical analyses

MedCalc 15.4 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) [30] was used for descriptive and analytical statistics. Multiple regression model (stepwise method, variable entered if  $p < 0.05$ , variable removed if  $p > 0.1$ ) was applied as follows: independent factors (potentially associated with white matter damage and DTI parameters): acute Glasgow Coma Scale – GCS, age, presence or absence of TMBs and NHLs, number of TMBs and NHLs in the brainstem, area of basal ganglia, corpus callosum, subcortical white matter, and Rotterdam scores. Dependent variables: regional (subcortical white matter, corpus callosum and brain stem) DTI parameter (FA, MD, AD, RD) averages.

To check if TBI induced the suspected DTI alterations, the healthy control DTI data were compared to the TBI DTI data.

In order to reveal relations between the CT findings, MRI and clinical variables, Rotterdam scores were also related to age, GCS, TMB and NHL data.

Beyond checking the effect of age on DTI parameters (see above), relationship between age and GCS, and lesion parameters were checked, to exclude possible interactions and to reveal if lesion occurrence is related to age. NHL and TMB data were compared and correlated. GCS was also related to NHL and TMB data, to assess the relationship between acute clinical severity and lesion occurrence.

Student's *t*-test was used for normal distributed data comparisons. Spearman's rank correlation was used to test association when ordinal variables were included. Chi-square test was used for categorical variables. A *p*-value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Lesion load

Out of the 38 patients, TMBs on SWI were found in 14 cases (in 1 out of 13 (7.7%) mild (GCS = 14–15), in 1 out of 4 (25%) moderate (GCS = 9–13), and in 12 out of 21 (57.1%) severe (GCS 3–8)

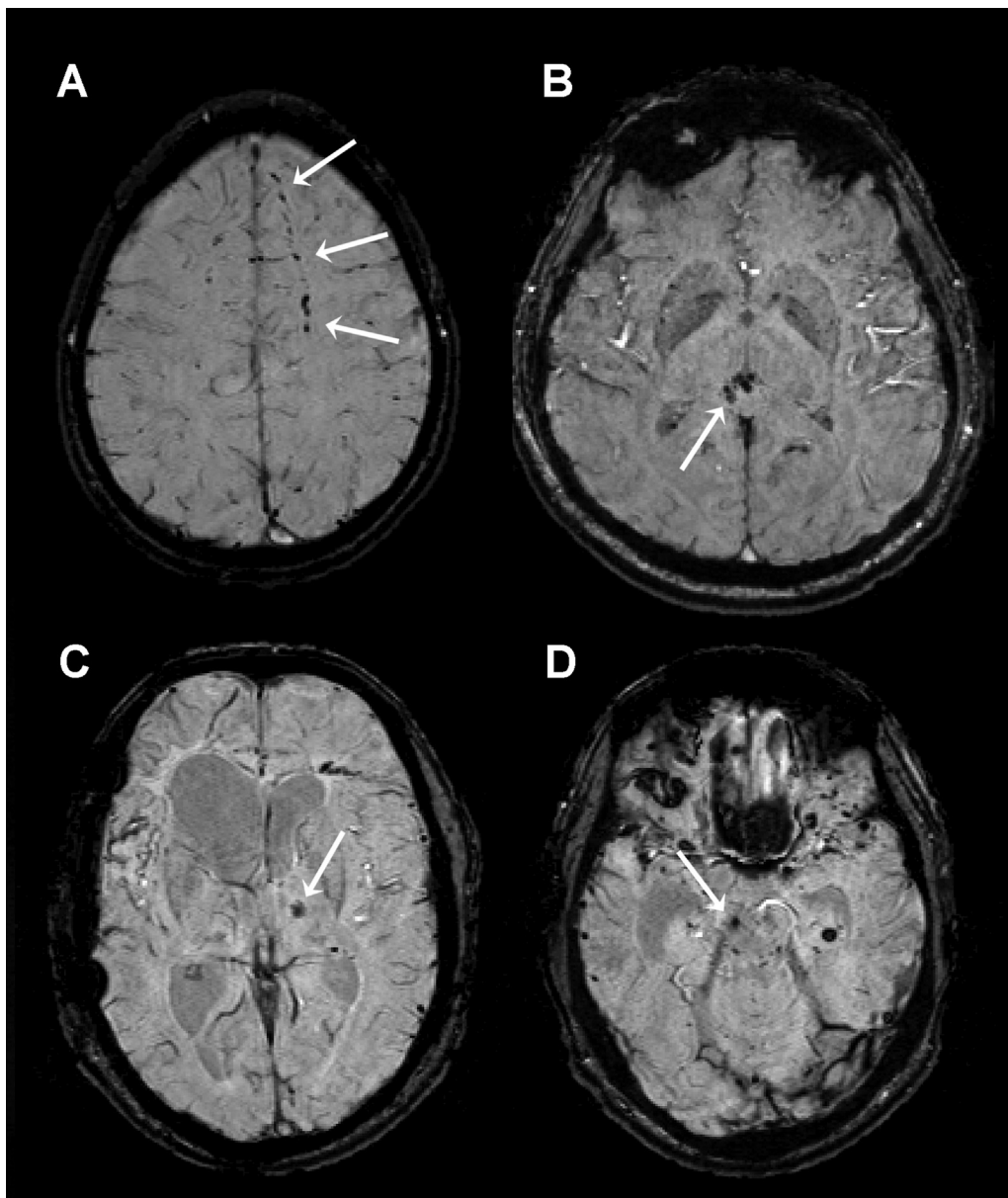
**Table 2**  
TMB<sup>a</sup> and NHL<sup>b</sup> distribution over regions.

	Subcortical WM	Corpus callosum	Basal ganglia area	Brainstem	Overall
TMB number (SWI)					
Mild (1/13) <sup>c</sup>	1	0	0	0	1
Moderate (1/4)	3	1	0	0	4
Severe (12/21)	80	21	24	8	133
Overall (14/38)	84	22	24	8	138
NHL number (T1, T2 and FLAIR)					
Mild (2/13)	1	0	0	0	1
Moderate (1/4)	7	0	0	0	7
Severe (11/21)	20	2	3	1	26
Overall (14/38)	28	2	3	1	34

<sup>a</sup> Traumatic microbleed.

<sup>b</sup> Non-hemorrhagic lesion.

<sup>c</sup> (Affected/all).



**Fig. 2.** Illustration of TMBs revealed by SWI in the investigated regions. TMBs (indicated by white arrows) can be seen in (A) subcortical white matter, (B) corpus callosum, (C) basal ganglia area, (D) brainstem.

TBI patients), see Table 2. TMB count range per patient was 1–43 (mean = 13, SD = 14.58). Out of all patients, overall 138 TMBs were

found, in 10 cases in the subcortical white matter (sum 84 TMBs), in 8 cases (sum 22 TMBs) in the corpus callosum, in 8 cases in the area

of basal ganglia (sum 24 TMBs) and in 4 cases in the brainstem (sum 8 TMBs), often combined, see Table 2. Fig. 2 shows TMB examples in the different regions. No TMBs were found in the healthy controls.

Out of the 38 patients, NHLs on T1, T2 weighted and FLAIR images together were found in 14 cases as well (in 2 out of 13 (15.4%) mild, in 1 out of 4 (25%) moderate, and in 11 out of 21 (52.4%) severe TBI patients), see Table 2. NHL count range per patient was 1–7 (mean = 2.78, SD = 2.12). Overall 34 NHLs were found, in 12 cases in the subcortical white matter (sum 28 NHLs), in 1 case (sum 2 NHLs) in the corpus callosum, in 3 cases in the area of basal ganglia (sum 3 NHLs) and in 1 case in the brainstem (sum 1 NHL), often combined, see Table 2. No NHLs were found in the healthy controls.

Overall TMB and NHL number per patient showed a significant positive correlation ( $\rho = 0.54$ ,  $p = 0.004$ ). Fig. 3 shows NHL examples in the different regions.

Neither TMB nor NHL parameters were significantly related to age.

The rate of lesions detected by only one rater in the first step, and debated in a second step by both raters whether including them or not in the final lesion registry was 14% of all detections for rater 1, and 8% of all detections for rater 2. The intraclass correlation coefficient between the two raters for the first step of detections was 0.983. Discrepancies mainly arise in case of adjacent lesions, as regarding them one large or two separate smaller lesions.

### 3.2. DTI parameters

In the TBI patients, the following regional DTI parameter averages were measured (see Table 3): FA: subcortical white matter = 0.41203 (SD = 0.0367), corpus callosum = 0.5666 (SD = 0.1027), brainstem = 0.3768 (SD = 0.0499); MD: subcortical white matter =  $0.847 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.06597), corpus callosum =  $1.116 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.251), brainstem =  $1.164 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.206), AD: subcortical white matter =  $1.2357 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.086), corpus callosum =  $1.8654 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2384), brainstem =  $1.6764 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2311); RD: subcortical white matter =  $0.6578 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.0705), corpus callosum =  $0.8339 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2111), brainstem =  $1.012 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2133).

In the age and sex matched healthy controls, the following regional DTI parameter averages were measured (see Table 3): FA: subcortical white matter = 0.4676 (SD = 0.0353), corpus callosum = 0.7049 (SD = 0.0357), brainstem = 0.4189 (SD = 0.0458); MD: subcortical white matter =  $0.7638 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.0306), corpus callosum =  $0.8986 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.1478), brainstem =  $1.0366 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2389). AD: subcortical white matter =  $1.1899 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.2223), corpus callosum =  $1.7379 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.044), brainstem =  $1.5857 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.1295); RD: subcortical white matter =  $0.6113 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.05601), corpus callosum =  $0.6915 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.0558), brainstem =  $0.8985 \times 10^{-3}$  mm<sup>2</sup>/s (SD = 0.1312).

Two-tailed Student's *t*-test yielded significant differences between TBI patients and controls both in FA and MD values in all regions, see Table 3 (*p* values were the following for FA: subcortical white matter < 0.0001, corpus callosum < 0.0001, brainstem = 0.001; for MD: subcortical white matter = 0.001, corpus callosum = 0.0004, brainstem = 0.02). Regarding AD and RD, significant difference between TBI patients and controls was only found in the corpus callosum RD averages (*p* values were the following for AD: subcortical white matter = 0.3, corpus callosum = 0.10, brainstem = 0.24; for RD: subcortical white matter = 0.059, corpus callosum = 0.04, brainstem = 0.12).

### 3.3. Multiple regression analysis of clinical, imaging parameters and DTI data

Age, NHL presence, and basal ganglia area TMB load was significantly, negatively related to the subcortical white matter FA values (partial  $r = -0.45$ ,  $-0.38$ ,  $-0.36$ ;  $p = 0.007$ , 0.03, 0.03, respectively, coefficient of determination  $R^2 = 0.4$ ).

GCS was significantly, positively correlated to corpus callosum FA values (partial  $r = 0.57$ ,  $p = 0.0002$ , coefficient of determination  $R^2 = 0.33$ ), and negatively correlated to corpus callosum RD values (partial  $r = -0.42$ ,  $p = 0.0092$ , coefficient of determination  $R^2 = 0.3$ ).

Age was significantly, positively correlated to both subcortical white matter and corpus callosum MD values (partial  $r = 0.64$ , 0.58, respectively;  $p < 0.0001$  for both, coefficient of determination  $R^2 = 0.45$  and 0.34, respectively). Age was also significantly, positively correlated to both subcortical white matter and corpus callosum AD values (partial  $r = 0.58$  and 0.73, respectively,  $p = 0.0002$  and  $p < 0.0001$ , respectively, coefficient of determination  $R^2 = 0.33$  and 0.53, respectively), and to both subcortical white matter and corpus callosum RD values (partial  $r = 0.49$  and 0.35;  $p$  values = 0.002 and 0.036; coefficient of determination  $R^2 = 0.23$  and 0.3, respectively).

No other significant correlations were found between clinical, imaging variables and DTI values.

For details, see Table 4.

### 3.4. Rotterdam score

Rotterdam score was not independently related to any DTI parameters (see Section 3.3). Rotterdam score was significantly, negatively related to GCS ( $\rho = -0.615$ ,  $p < 0.0001$ ) and positively to TMB presence ( $\rho = 0.361$ ,  $p = 0.026$ ), but not NHLs, nor age.

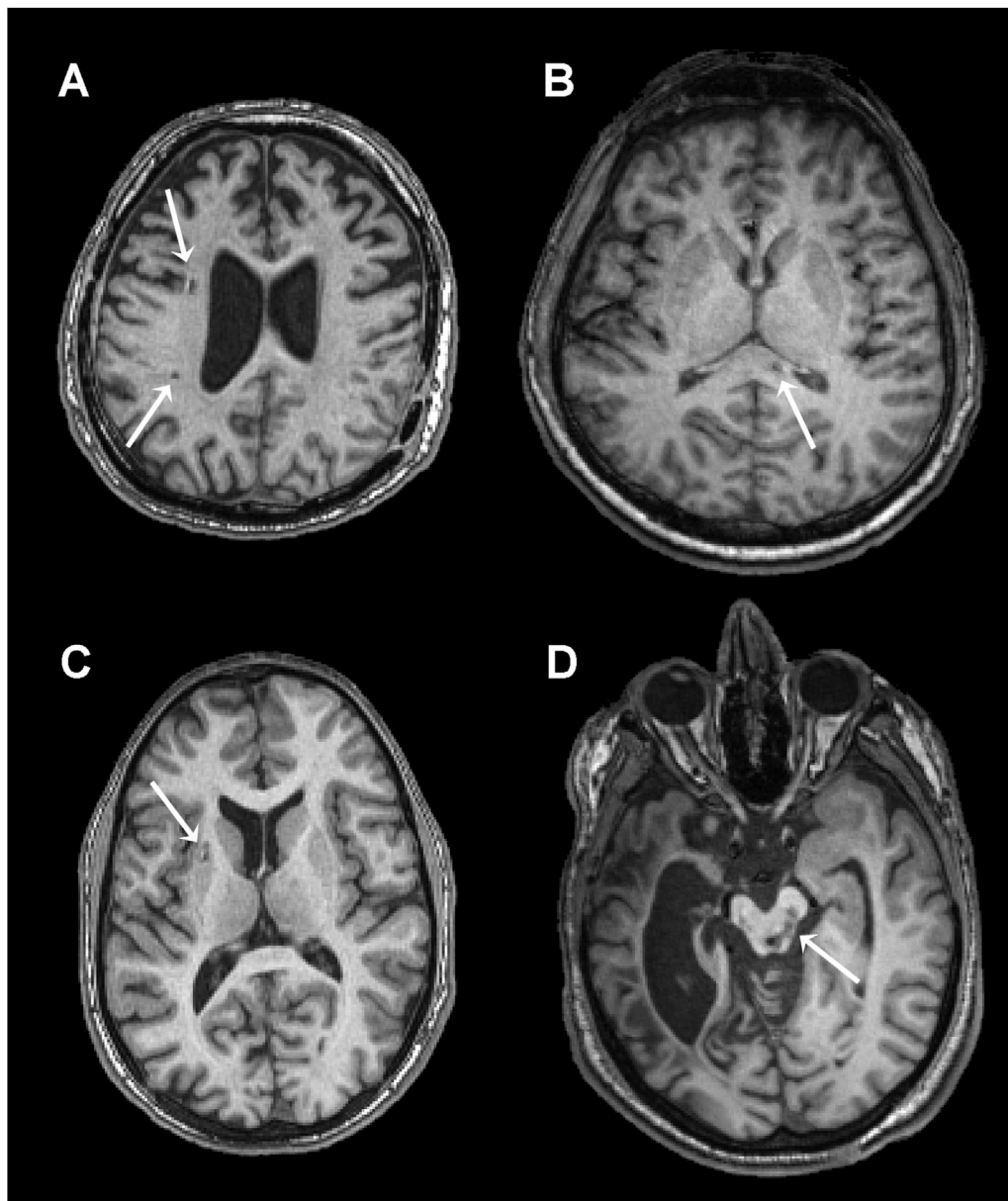
### 3.5. GCS

GCS was an independent factor significantly associated with corpus callosum FA (see Section 3.3, and Table 4). GCS was also significantly, negatively related to the presence of TMBs and NHLs (TMBs:  $\rho = -0.43$ ,  $p = 0.006$ ; NHLs:  $\rho = -0.423$ ,  $p = 0.0081$ ). No significant relation was found between GCS and age.

## 4. Discussion

This study aimed to reveal the significance of TMBs seen on SWI and NHLs seen on conventional MRI in TBI by directly comparing them to the normal appearing white matter damage rate, i.e. the DTI alterations. Such direct comparison might help understanding the relationship between the microvascular injury linked TMBs and the co-existing diffuse axonal damage. An attempt was made to assess regional features, and to adjust for potential clinical influencing factors as GCS and age, and CT factor defined by the Rotterdam score.

DTI is regarded to be one of the most sensitive MRI methods in detecting axonal damage [20]. The DTI derived metric FA has been shown by the vast majority of DTI studies to be decreased, while MD to be increased after various severities and timespans after brain injury, that has been explained as an effect of axonal/myelin disintegration [10,20,31–40]. This is in line with our present finding of the significantly decreased FA and increased MD in TBI patients over all regions when compared to age and sex matched healthy controls. By a somewhat lower number of studies investigating RD as well, RD was found to be increased after injury [41–44], that was also supported by our finding of the significantly increased RD values of the corpus callosum, and near-significantly increased RD values of the subcortical white matter of the TBI patients compared to healthy controls. Relying on these data, in the present study,



**Fig. 3.** Illustration of NHLs revealed by MPRAGE in the investigated regions. NHLs (indicated by white arrows) can be seen in (A) subcortical white matter, (B) corpus callosum, (C) basal ganglia area, (D) brainstem.

**Table 3**

DTI<sup>a</sup> parameter averages over regions in TBI<sup>b</sup> patients and controls.

	Subcortical WM <sup>c</sup>			Corpus callosum			Brainstem		
	TBI	Control	<i>p</i> <sup>i</sup>	TBI	Control	<i>p</i>	TBI	Control	<i>p</i>
FA <sup>d</sup>	0.41203 (0.0367) <sup>h</sup>	0.4676 (0.0353)	<0.0001	0.5666 (0.1027)	0.7049 (0.0357)	<0.0001	0.3768 (0.0499)	0.4189 (0.0458)	0.001
MD <sup>e</sup>	0.847 (0.06597)	0.7638 (0.0306)	0.001	1.116 (0.251)	0.8986 (0.1478)	0.0004	1.164 (0.206)	1.0366 (0.2389)	0.02
AD <sup>f</sup>	1.2357 (0.086)	1.1899 (0.2223)	0.3	1.8654 (0.2384)	1.7379 (0.044)	0.1	1.6764 (0.2311)	1.5857 (0.1295)	0.24
RD <sup>g</sup>	0.6578 (0.0705)	0.6113 (0.05601)	0.059	0.8339 (0.2111)	0.6915 (0.0558)	0.04	1.012 (0.2133)	0.8985 (0.1312)	0.12

<sup>a</sup> Diffusion tensor imaging.

<sup>b</sup> Traumatic brain injury.

<sup>c</sup> White matter.

<sup>d</sup> Fractional anisotropy.

<sup>e</sup> Mean diffusivity.

<sup>f</sup> Axial diffusivity.

<sup>g</sup> Radial diffusivity.

<sup>h</sup> Numbers in parentheses indicate standard deviations.

<sup>i</sup> Two-tailed Student's *t*-test, MD values: 10<sup>-5</sup> mm<sup>2</sup>/s, AD and RD values: 10<sup>-3</sup> mm<sup>2</sup>/s.



**Table 4**  
Factors related to regional DTI parameters in multiple regression model.

	Independent variables	Coefficient of determination R <sup>2</sup>	Std. error	r <sub>partial</sub>	t	p	
FA	Corona radiata/centrum semiovale	Age	0.405	0.0002834	−0.4509	−2.902	0.0066
		NHL presence		0.01149	−0.3762	−2.332	0.0259
		TMB load in basal ganglia area		0.004058	−0.3607	−2.221	0.0333
	Corpus callosum	GCS	0.327	0.002988	0.5715	4.178	0.0002
MD	Corona radiata/centrum semiovale	Age	0.451	4.763 × 10 <sup>−7</sup>	0.6382	4.904	<0.0001
	Corpus callosum	Age	0.343	1.312 × 10 <sup>−6</sup>	0.5854	4.332	<0.0001
AD	Corona radiata/centrum semiovale	Age	0.33	5.128 × 10 <sup>−7</sup>	0.57	4.237	0.0002
	Corpus callosum	Age	0.53	1.562 × 10 <sup>−6</sup>	0.727	6.36	<0.0001
RD	Corona radiata/centrum semiovale	Age	0.24	1.191 × 10 <sup>−6</sup>	0.49	3.35	0.0019
	Corpus callosum	GCS	0.3	1.24 × 10 <sup>−5</sup>	−0.42	−2.755	0.0092
		Age		3.35 × 10 <sup>−6</sup>	0.35	2.18	0.036

FA, fractional anisotropy; MD, mean diffusivity; AD, axial diffusivity; RD, radial diffusivity; NHL, non-hemorrhagic lesion; TMB, traumatic microbleed; GCS, Glasgow Coma Scale.

decreased FA, increased MD and RD are accepted as indicators of axonal damage rate. The fact that AD showed no relations either to TBI severity measures or imaging markers, moreover showed no significant difference when compared to healthy controls in our study, is congruent with several previous studies that found AD to be unaffected by TBI, or get normalized in the chronic phase of TBI [41,42,45].

Both the presence of NHLs at any region (in T1-, T2-weighted and FLAIR images), and the TMB lesion load at the basal ganglia area (on SWI) were independently, significantly related to low subcortical white matter FA values, i.e. to a diffuse white matter damage of this region. Overall TMB presence, or overall TMB count itself was not independently related. This implies that TMB formation at other sites (e.g. subcortical white matter) might be rather dependent on the patients' individual microvascular susceptibility to shears, and not to the actual axonal damage, while TMB development in the basal ganglia area might be due to a certain type and rate of mechanic stress that is associated with a diffuse injury of the white matter of higher regions. Or, TMBs at other sites, though might be prominently present at a high number and overall volume, are highly inter-related with other factors as e.g. GCS, and alone do not further discriminate the FA values. These findings are somewhat contradictive to studies in which SWI (or T2\* GRE) lesion number or volume, irrespective from localization, has been shown to be associated with outcomes, and therefore probably with axonal injury [7,8,11,13,15,46]. However, most of these studies were conducted on children and did not focus on brain regions. A study investigating multi-modal MRI TBI outcome prediction has shown that besides T2 weighted imaging and FLAIR, SWI alone did not discriminate by outcome [47]. Studies focusing on regional aspects of TMBs have underscored that TMBs in deeper brain regions are predicting poorer outcomes, or are associated with a poorer actual clinical state/injury severity [12,16,48]. Keeping the Adams' localization based DAI grading in mind, this is not surprising [49]. When adjusting for age, GCS, Rotterdam scores, as performed in this study, subcortical white matter and corpus callosum TMBs, though they occur at a much higher rate than NHLs do (as presented in this study as well), do not seem to be able to further discriminate the underlying microstructural damage of the normal appearing white matter. Age was not correlated with TMBs in our study, which supports that the recorded TMBs were not significantly biased by cerebral microbleeds of other pathological origin (aging/small vessel disease). This was important since small vessel disease related cerebral microbleeds themselves are known to be associated with a diffuse poorer microstructural integrity [50].

The linkage between the presence of NHL (even if a single NHL is present on T1-, T2-weighted or FLAIR images) and the lower FA of the subcortical white matter suggests that the appearance of NHLs might be more directly related to white matter dam-

age than the TMBs', and though they occur less frequently, their presence is prominently indicative of an underlying diffuse axonal pathology beyond the actual focal injury. This might explain the previous studies finding a relationship between focal parenchymal MRI abnormalities and injury severity and outcome [11,47,51–53]. It has to be kept in mind though, that in the present study the NHLs were assessed by combining three modalities (T1-, T2-weighted and FLAIR images), so it is not a single modality that catches up with similar information provided by SWI. No attempt was made to assess these modalities separately. One reason for this was to keep the study robust, other that the evaluation of the NHLs seemed to be most reliable when adding up the information from the co-registered images of the different modalities. Such co-registration can not only be performed in a research environment, it is available in most current MRI workstations, therefore can be achieved in a clinical setting as well. The fact that age did not correlate with NHLs supports that NHL raters were reliably able to discriminate non-specific aging scars from true NHLs. Still, though observing NHLs was presented to be just as important as the TMBs in the basal ganglia area, the reading of the single modality SWI to evaluate TMBs is apparently simpler than a multi-modal assessment of NHLs.

It might be raised that because of the relatively late (chronic) imaging performed in this study, some TMBs or NHLs could have been missed. Concerning TMBs, this is very unlikely. Though TMBs were shown to possibly change (expand) in the very acute phase after the injury [54], in the chronic phase, apart from a possible slight attenuation, they were mostly shown to be constant in their appearance even through years [55–57]. Regarding NHLs, we are not aware of long-term studies investigating lesion progression or cessation, we cannot exclude that some lesions disappeared till the imaging time point. A similar study performed in the acute phase might help further refinement of the relationship between NHLs and diffuse axonal damage.

Of the investigated parameters, GCS was independently positively correlated with FA and negatively with RD values of the corpus callosum. GCS was recorded in the acute phase, and the FA and RD values were measured in the chronic, thus the damage of the commissural white matter associated to the altered levels of consciousness appears to be a long-term consequence. The association between the damage of the corpus callosum, consciousness and neurocognitive impairment, and the long-term FA reduction and RD increase of the corpus callosum in TBI patients is supported by several papers [32,39–41,43,58–63]. The most interesting additional finding of this study is that neither corpus callosum TMBs or NHLs were independently, specifically associated with the clinically important microstructural disruption at this region. Thus, one might expect a clinically significant microstructural injury of the corpus callosum even despite of apparent macroscopic focal pathol-

ogy including any MRI modality, a finding also reported previously [64].

This study found a significant correlation between age and low subcortical white matter FA, increased subcortical white matter MD, AD, RD and increased corpus callosum MD, AD and RD. Except for subcortical white matter FA and corpus callosum RD, age was the only related independent factor. The strong association between normal aging and diffusivity alteration (FA decline, MD, AD and RD increase) as seen in the present work, has been widely characterized by previous studies [65–69]. Unfortunately, TBI is regarded to cause mostly the same directions in diffusivity changes, which makes the differentiation between the two effects challenging. In case of the subcortical white matter FA, both trauma related TMBs and NHLs, as well as age were yielded as independent factors. It is highly possible, that white matter aging is triggered by TBI. A set of previous studies shown that FA is not only acutely decreased after TBI over certain brain regions, but FA further decreases over years in the affected regions [40]. However, MD and AD increase was specifically linked to aging in our study. One explanation might be that MD alteration in the chronic phase is less specific for TBI, i.e. MD change due to the injury melts into the more pronounced effect of aging. A more detailed regional analysis might help in distinguishing these effects, since both normal aging and TBI is characterized by typical spatial patterns of diffusivity alteration [70–72].

We aimed to check if one of the most powerful CT prognostic scores, the Rotterdam score is able to predict white matter microstructure damage, compared to the MRI techniques. Rotterdam scores were very strongly correlated with GCS, and after adjusting for GCS, Rotterdam scores were not able to further explain any diffusivity differences in the TBI population. By these means, MRI detection of TMBs and NHLs outperformed CT.

The most limiting circumstance in this study was the relatively late (chronic) image acquisition. Because of this, raters might have missed NHLs, and diffusivity alteration might have been affected by non-specific factors (aging, neuro-rehabilitation, etc.). At the same time, the long term follow-up data are valuable since outcome prediction is a major aim of TBI imaging. Other limiting factor was the use of manual tracing and region-of-interest technique for the calculation of regional DTI metrics. Unfortunately, because of the prominent structural differences between the patients, inter-subject co-registration was unreliable and often impossible, that made voxel-wise techniques useless. By overcoming these issues, probably a more precise understanding of focal lesion-diffuse injury association would become achievable.

#### 4.1. Conclusion

Both hemorrhagic (TMBs on SWI), and non-hemorrhagic (NHLs on T1-, T2 weighted and FLAIR images) features of DAI are associated with widespread chronic diffusivity alterations in the normal appearing white matter even after adjusting for age, GCS and Rotterdam scores. The presence of NHLs, even when only a single NHL is present, indicates a diffuse microstructural disintegration. Surprisingly, though SWI typically detects a higher number of parenchymal lesions in DAI than other modalities due to its high sensitivity, not overall lesion presence, -count or -volume, but only TMB load of the basal ganglia area was independently related with decreased normal appearing white matter FA levels. One explanation might be that TMBs of higher level white matter regions (corpus callosum, subcortical white matter) are rather dependent of an individual microvascular vulnerability than of the linked axonal damage.

This finding also indicates that regional heterogeneity of injury could significantly affect the natural history as well as the effect of therapeutic interventions emphasizing the need for individualized diagnostic scores and treatment approaches.

Based on the better understanding of the relation between macroscopic focal- and microscopic diffuse pathology, in order to estimate DAI in a clinical environment, a conventional lesional MRI pathology evaluation might at least in part substitute the use of quantitative DTI.

#### Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

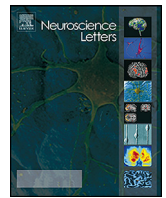
This study was funded by Hungarian Brain Research Program – Grant No. KTIA\_13\_NAP-A-II/8, Grant No. KTIA\_13\_NAP-A-II/9, SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0017 and Hungarian Scientific Research Fund Grant No. OTKA/K-120356.

#### References

- [1] J. Bruns Jr., W.A. Hauser, The epidemiology of traumatic brain injury: a review, *Epilepsia* 44 (Suppl. 10) (2003) 2–10.
- [2] V.E. Johnson, W. Stewart, D.H. Smith, Axonal pathology in traumatic brain injury, *Exp. Neurol.* 246 (2013) 35–43.
- [3] S. Mittal, Z. Wu, J. Neelavalli, E.M. Haacke, Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2, *Am. J. Neuroradiol.* 30 (2) (2009) 232–252.
- [4] D.J. Sharp, T.E. Ham, Investigating white matter injury after mild traumatic brain injury, *Curr. Opin. Neurol.* 24 (6) (2011) 558–563.
- [5] M.H. Beauchamp, M. Ditchfield, F.E. Babl, M. Kean, C. Catroppa, K.O. Yeates, V. Anderson, Detecting traumatic brain lesions in children: CT versus MRI versus susceptibility weighted imaging (SWI), *J. Neurotrauma* 28 (6) (2011) 915–927.
- [6] A.L. Cheng, S. Batool, C.R. McCreary, M.L. Lauzon, R. Frayne, M. Goyal, E.E. Smith, Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2\*-weighted gradient-recalled echo MRI for detecting microbleeds, *Stroke* 44 (10) (2013) 2782–2786.
- [7] B.H. Geurts, T.M. Andriessen, B.M. Goraj, P.E. Vos, The reliability of magnetic resonance imaging in traumatic brain injury lesion detection, *Brain Inj.* 26 (12) (2012) 1439–1450.
- [8] G. Spitz, J.J. Maller, A. Ng, R. O'Sullivan, N.J. Ferris, J.L. Ponsford, Detecting lesions after traumatic brain injury using susceptibility weighted imaging: a comparison with fluid-attenuated inversion recovery and correlation with clinical outcome, *J. Neurotrauma* 30 (24) (2013) 2038–2050.
- [9] A. Di Ieva, T. Lam, P. Alcaide-Leon, A. Bharatha, W. Montanera, M.D. Cusimano, Magnetic resonance susceptibility weighted imaging in neurosurgery: current applications and future perspectives, *J. Neurosurg.* (2015) 1–13.
- [10] A. Toth, N. Kovacs, G. Perlaki, G. Orsi, M. Aradi, H. Komaromy, E. Ezer, P. Bukovics, O. Farkas, J. Janszky, T. Doczi, A. Buki, A. Schwarcz, Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? *J. Neurotrauma* 30 (1) (2013) 2–10.
- [11] E.L. Yuh, P. Mukherjee, H.F. Lingsma, J.K. Yue, A.R. Ferguson, W.A. Gordon, A.B. Valadka, D.M. Schnyer, D.O. Okonkwo, A.I. Maas, G.T. Manley, T.-T. Investigators, Magnetic resonance imaging improves 3-month outcome prediction in mild traumatic brain injury, *Ann. Neurol.* 73 (2) (2013) 224–235.
- [12] A. Iwamura, T. Taoka, A. Fukusumi, M. Sakamoto, T. Miyasaka, T. Ochi, T. Akashi, K. Okuchi, K. Kichikawa, Diffuse vascular injury: convergent-type hemorrhage in the supratentorial white matter on susceptibility-weighted image in cases of severe traumatic brain damage, *Neuroradiology* 54 (4) (2012) 335–343.
- [13] M.H. Beauchamp, R. Beare, M. Ditchfield, L. Coleman, F.E. Babl, M. Kean, L. Crossley, C. Catroppa, K.O. Yeates, V. Anderson, Susceptibility weighted imaging and its relationship to outcome after pediatric traumatic brain injury, *Cortex* 49 (2) (2013) 591–598.
- [14] J. Liu, Z. Kou, Y. Tian, Diffuse axonal injury after traumatic cerebral microbleeds: an evaluation of imaging techniques, *Neural Regen. Res.* 9 (12) (2014) 1222–1230.
- [15] C.A. Colbert, B.A. Holshouser, G.S. Aaen, C. Sheridan, U. Oyoyo, D. Kido, S. Ashwal, Value of cerebral microhemorrhages detected with susceptibility-weighted MR imaging for prediction of long-term outcome in children with nonaccidental trauma, *Radiology* 256 (3) (2010) 898–905.
- [16] T. Babikian, M.C. Freier, K.A. Tong, J.P. Nickerson, C.J. Wall, B.A. Holshouser, T. Burley, M.L. Riggs, S. Ashwal, Susceptibility weighted imaging: neuropsychologic outcome and pediatric head injury, *Pediatr. Neurol.* 33 (3) (2005) 184–194.
- [17] K.A. Tong, S. Ashwal, B.A. Holshouser, J.P. Nickerson, C.J. Wall, L.A. Shutter, R.J. Osterdock, E.M. Haacke, D. Kido, Diffuse axonal injury in children: clinical correlation with hemorrhagic lesions, *Ann. Neurol.* 56 (1) (2004) 36–50.
- [18] R.J. Mannion, J. Cross, P. Bradley, J.P. Coles, D. Chatfield, A. Carpenter, J.D. Pickard, D.K. Menon, P.J. Hutchinson, Mechanism-based MRI classification of

- traumatic brainstem injury and its relationship to outcome, *J. Neurotrauma* 24 (1) (2007) 128–135.
- [19] K.G. Moen, V. Brezova, T. Skandsen, A.K. Haberg, M. Folvik, A. Vik, Traumatic axonal injury: the prognostic value of lesion load in corpus callosum, brain stem, and thalamus in different magnetic resonance imaging sequences, *J. Neurotrauma* 31 (17) (2014) 1486–1496.
- [20] M.B. Hulkower, D.B. Poliak, S.B. Rosenbaum, M.E. Zimmerman, M.L. Lipton, A decade of DTI in traumatic brain injury: 10 years and 100 articles later, *Am. J. Neuroradiol.* 34 (11) (2013) 2064–2074.
- [21] C. Pierpaoli, P. Jezzard, P.J. Basser, A. Barnett, G. Di Chiro, Diffusion tensor MR imaging of the human brain, *Radiology* 201 (3) (1996) 637–648.
- [22] C. Pierpaoli, P.J. Basser, Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy, *Magn. Reson. Med.* 36 (6) (1996) 893–906.
- [23] J.T. Wilson, L.E. Pettigrew, G.M. Teasdale, Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use, *J. Neurotrauma* 15 (8) (1998) 573–585.
- [24] M. Jenkinson, P. Bannister, M. Brady, S. Smith, Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images, *Neuroimage* 17 (2) (2002) 825–841.
- [25] S.M. Smith, M. Jenkinson, M.W. Woolrich, C.F. Beckmann, T.E. Behrens, H. Johansen-Berg, P.R. Bannister, M. De Luca, I. Drobnjak, D.E. Flitney, R.K. Niazy, J. Saunders, J. Vickers, Y. Zhang, N. De Stefano, J.M. Brady, P.M. Matthews, Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL, *Neuroimage* 23 (Suppl. 1) (2004) S208–S219.
- [26] P.E. Shrout, J.L. Fleiss, Intra-class correlations: uses in assessing rater reliability, *Psychol. Bull.* 86 (2) (1979) 420–428.
- [27] A.I. Maas, C.W. Hukkelhoven, L.F. Marshall, E.W. Steyerberg, Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors, *Neurosurgery* 57 (6) (2005) 1173–1182 (discussion 1173–82).
- [28] S.M. Smith, Fast robust automated brain extraction, *Hum. Brain Mapp.* 17 (3) (2002) 143–155.
- [29] P.J. Basser, J. Mattiello, D. LeBihan, Estimation of the effective self-diffusion tensor from the NMR spin echo, *J. Magn. Reson. B* 103 (3) (1994) 247–254.
- [30] F. Schoonjans, A. Zalata, C.E. Depuydt, F.H. Comhaire, MedCalc: a new computer program for medical statistics, *Comput. Methods Programs Biomed.* 48 (3) (1995) 257–262.
- [31] K. Arfanakis, V.M. Houghton, J.D. Carew, B.P. Rogers, R.J. Dempsey, M.E. Meyerand, Diffusion tensor MR imaging in diffuse axonal injury, *Am. J. Neuroradiol.* 23 (5) (2002) 794–802.
- [32] M. Inglese, S. Makani, G. Johnson, B.A. Cohen, J.A. Silver, O. Gonen, R.I. Grossman, Diffuse axonal injury in mild traumatic brain injury: a diffusion tensor imaging study, *J. Neurosurg.* 103 (2) (2005) 298–303.
- [33] J.Y. Wang, K. Bakhadirov, H. Abdi, M.D. Devous Sr., C.D. Marquez de la Plata, C. Moore, C.J. Madden, R. Diaz-Arrastia, Longitudinal changes of structural connectivity in traumatic axonal injury, *Neurology* 77 (9) (2011) 818–826.
- [34] J.J. Bazarian, J. Zhong, B. Blyth, T. Zhu, V. Kavcic, D. Peterson, Diffusion tensor imaging detects clinically important axonal damage after mild traumatic brain injury: a pilot study, *J. Neurotrauma* 24 (9) (2007) 1447–1459.
- [35] R. Kumar, R.K. Gupta, M. Husain, C. Chaudhry, A. Srivastava, S. Saksena, R.K. Rathore, Comparative evaluation of corpus callosum DTI metrics in acute mild and moderate traumatic brain injury: its correlation with neuropsychometric tests, *Brain Inj.* 23 (7) (2009) 675–685.
- [36] R. Yallampalli, E.A. Wilde, E.D. Bigler, S.R. McCauley, G. Hanten, M. Troyanskaya, J.V. Hunter, Z. Chu, X. Li, H.S. Levin, Acute white matter differences in the fornix following mild traumatic brain injury using diffusion tensor imaging, *J. Neuroimaging* 23 (2) (2013) 224–227.
- [37] K. Caeyenberghs, A. Leemans, M. Geurts, T. Taymans, C.V. Linden, B.C. Smits-Engelsman, S. Sunaert, S.P. Swinnen, Brain-behavior relationships in young traumatic brain injury patients: DTI metrics are highly correlated with postural control, *Hum. Brain Mapp.* 31 (7) (2010) 992–1002.
- [38] J. Lungqvist, D. Nilsson, M. Ljungberg, A. Sorbo, E. Esbjornsson, C. Eriksson-Ritzen, T. Skoglund, Longitudinal study of the diffusion tensor imaging properties of the corpus callosum in acute and chronic diffuse axonal injury, *Brain Inj.* 25 (4) (2011) 370–378.
- [39] T.C. Wu, E.A. Wilde, E.D. Bigler, X. Li, T.L. Merkley, R. Yallampalli, S.R. McCauley, K.P. Schnelle, A.C. Vasquez, Z. Chu, G. Hanten, J.V. Hunter, H.S. Levin, Longitudinal changes in the corpus callosum following pediatric traumatic brain injury, *Dev. Neurosci.* 32 (5–6) (2010) 361–373.
- [40] J. Dinkel, A. Drier, O. Khalilzadeh, V. Perlberg, V. Czernecki, R. Gupta, F. Gomas, P. Sanchez, D. Dormont, D. Galanaud, R.D. Stevens, L. Puybasset, for NICR, Long-term white matter changes after severe traumatic brain injury: a 5-year prospective cohort, *Am. J. Neuroradiol.* 35 (1) (2014) 23–29.
- [41] A. Sidaras, A.W. Engberg, K. Sidaras, M.G. Liptrot, M. Herring, P. Petersen, O.B. Paulson, T.L. Jernigan, E. Rostrup, Diffusion tensor imaging during recovery from severe traumatic brain injury and relation to clinical outcome: a longitudinal study, *Brain* 131 (Pt 2) (2008) 559–572.
- [42] V.F. Newcombe, G.B. Williams, D. Scöffings, J. Cross, T.A. Carpenter, J.D. Pickard, D.K. Menon, Aetiological differences in neuroanatomy of the vegetative state: insights from diffusion tensor imaging and functional implications, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81 (5) (2010) 552–561.
- [43] R.C. Tasker, A.G. Westland, D.K. White, G.B. Williams, Corpus callosum and inferior forebrain white matter microstructure are related to functional outcome from raised intracranial pressure in child traumatic brain injury, *Dev. Neurosci.* 32 (5–6) (2010) 374–384.
- [44] M.B. Oni, E.A. Wilde, E.D. Bigler, S.R. McCauley, T.C. Wu, R. Yallampalli, Z. Chu, X. Li, J.V. Hunter, A.C. Vasquez, H.S. Levin, Diffusion tensor imaging analysis of frontal lobes in pediatric traumatic brain injury, *J. Child Neurol.* 25 (8) (2010) 976–984.
- [45] A. Messe, S. Caplain, G. Paradot, D. Garrigue, J.F. Mineo, G. Soto Ares, D. Ducreux, F. Vignaud, G. Rozec, H. Desal, M. Pelegrini-Issac, M. Montreuil, H. Benali, S. Lehericy, Diffusion tensor imaging and white matter lesions at the subacute stage in mild traumatic brain injury with persistent neurobehavioral impairment, *Hum. Brain Mapp.* 32 (6) (2011) 999–1011.
- [46] S. Ashwal, T. Babikian, J. Gardner-Nichols, M.C. Freier, K.A. Tong, B.A. Holshouser, Susceptibility-weighted imaging and proton magnetic resonance spectroscopy in assessment of outcome after pediatric traumatic brain injury, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 87 (12 Suppl. 2) (2006) S50–S58.
- [47] C.A. Chastain, U.E. Oyoyo, M. Zipperman, E. Joo, S. Ashwal, L.A. Shutter, K.A. Tong, Predicting outcomes of traumatic brain injury by imaging modality and injury distribution, *J. Neurotrauma* 26 (8) (2009) 1183–1196.
- [48] J.H. Park, S.W. Park, S.H. Kang, T.K. Nam, B.K. Min, S.N. Hwang, Detection of traumatic cerebral microbleeds by susceptibility-weighted image of MRI, *J. Korean Neurosurg. Soc.* 46 (4) (2009) 365–369.
- [49] J.H. Adams, D. Doyle, I. Ford, T.A. Gennarelli, D.I. Graham, D.R. McLellan, Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading, *Histopathology* 15 (1) (1989) 49–59.
- [50] S. Akoudad, M. de Groot, P.J. Koudstaal, A. van der Lugt, W.J. Niessen, A. Hofman, M.A. Ikram, M.W. Vernooij, Cerebral microbleeds are related to loss of white matter structural integrity, *Neurology* 81 (22) (2013) 1930–1937.
- [51] J. van der Naalt, J.M. Hew, A.H. van Zomeren, W.J. Sluiter, J.M. Minderhoud, Computed tomography and magnetic resonance imaging in mild to moderate head injury: early and late imaging related to outcome, *Ann. Neurol.* 46 (1) (1999) 70–78.
- [52] A. Jenkins, G. Teasdale, M.D. Hadley, P. Macpherson, J.O. Rowan, Brain lesions detected by magnetic resonance imaging in mild and severe head injuries, *Lancet* 2 (8504) (1986) 445–446.
- [53] H.S. Levin, E. Amparo, H.M. Eisenberg, D.H. Williams, W.M. High Jr., C.B. McArdle, R.L. Weiner, Magnetic resonance imaging and computerized tomography in relation to the neurobehavioral sequelae of mild and moderate head injuries, *J. Neurosurg.* 66 (5) (1987) 706–713.
- [54] A. Toth, N. Kovacs, V. Tamas, B. Kornyei, M. Nagy, A. Horvath, T. Rostas, P. Bogner, J. Janszky, T. Doczi, A. Buki, A. Schwarcz, Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury, *Neurosci. Lett.* 617 (2016) 207–212.
- [55] A. Messori, G. Polonara, C. Mabiglia, U. Salvolini, Is haemosiderin visible indefinitely on gradient-echo MRI following traumatic intracerebral haemorrhage? *Neuroradiology* 45 (12) (2003) 881–886.
- [56] K.G. Moen, T. Skandsen, M. Folvik, V. Brezova, K.A. Kvistad, J. Rydland, G.T. Manley, A. Vik, A longitudinal MRI study of traumatic axonal injury in patients with moderate and severe traumatic brain injury, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83 (12) (2012) 1193–1200.
- [57] B.H. Geurts, T.M. Andriessen, B.M. Goraj, P.E. Vos, The reliability of magnetic resonance imaging in traumatic brain injury lesion detection, *Brain Inj.* (2012).
- [58] M.C. Chang, S.H. Jang, Corpus callosum injury in patients with diffuse axonal injury: a diffusion tensor imaging study, *NeuroRehabilitation* 26 (4) (2010) 339–345.
- [59] L. Ewing-Cobbs, M.R. Prasad, P. Swank, L. Kramer, C.S. Cox Jr., J.M. Fletcher, M. Barnes, X. Zhang, K.M. Hasan, Arrested development and disrupted callosal microstructure following pediatric traumatic brain injury: relation to neurobehavioral outcomes, *Neuroimage* 42 (4) (2008) 1305–1315.
- [60] M.R. Kennedy, J.R. Wozniak, R.L. Muetzel, B.A. Mueller, H.H. Chiou, K. Pantekoek, K.O. Lim, White matter and neurocognitive changes in adults with chronic traumatic brain injury, *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 15 (1) (2009) 130–136.
- [61] W. Yuan, S.K. Holland, V.J. Schmithorst, N.C. Walz, K.M. Cecil, B.V. Jones, P. Karunanayaka, L. Michaud, S.L. Wade, Diffusion tensor MR imaging reveals persistent white matter alteration after traumatic brain injury experienced during early childhood, *Am. J. Neuroradiol.* 28 (10) (2007) 1919–1925.
- [62] J. Xu, I.A. Rasmussen, J. Lagopoulos, A. Haberg, Diffuse axonal injury in severe traumatic brain injury visualized using high-resolution diffusion tensor imaging, *J. Neurotrauma* 24 (5) (2007) 753–765.
- [63] R. Kumar, M. Husain, R.K. Gupta, K.M. Hasan, M. Harris, A.K. Agarwal, C.M. Pandey, P.A. Narayana, Serial changes in the white matter diffusion tensor imaging metrics in moderate traumatic brain injury and correlation with neuro-cognitive function, *J. Neurotrauma* 26 (4) (2009) 481–495.
- [64] N. Nakayama, A. Okumura, J. Shinoda, Y.T. Yasokawa, K. Miwa, S.I. Yoshimura, T. Iwama, Evidence for white matter disruption in traumatic brain injury without macroscopic lesions, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77 (7) (2006) 850–855.
- [65] E.V. Sullivan, A. Pfefferbaum, Neuroradiological characterization of normal adult ageing, *Br. J. Radiol.* 80 Spec No 2 (2007) S99–S108.
- [66] S.T. Engelter, J.M. Provenzale, J.R. Petrella, D.M. DeLong, J.R. MacFall, The effect of aging on the apparent diffusion coefficient of normal-appearing white matter, *Am. J. Roentgenol.* 175 (2) (2000) 425–430.
- [67] E.V. Sullivan, E. Adalsteinsson, M. Hedehus, C. Ju, M. Moseley, K.O. Lim, A. Pfefferbaum, Equivalent disruption of regional white matter microstructure in ageing healthy men and women, *Neuroreport* 12 (1) (2001) 99–104.
- [68] I.J. Bennett, D.J. Madden, C.J. Vaidya, D.V. Howard, J.H. Howard Jr., Age-related differences in multiple measures of white matter integrity: a diffusion tensor imaging study of healthy aging, *Hum. Brain Mapp.* 31 (3) (2010) 378–390.

- [69] R. Kumar, A.S. Chavez, P.M. Macey, M.A. Woo, R.M. Harper, Brain axial and radial diffusivity changes with age and gender in healthy adults, *Brain Res.* 1512 (2013) 22–36.
- [70] A. Pfefferbaum, E. Adalsteinsson, E.V. Sullivan, Frontal circuitry degradation marks healthy adult aging: evidence from diffusion tensor imaging, *Neuroimage* 26 (3) (2005) 891–899.
- [71] A. Stadlbauer, E. Salomonowitz, G. Strunk, T. Hammen, O. Ganslandt, Age-related degradation in the central nervous system: assessment with diffusion-tensor imaging and quantitative fiber tracking, *Radiology* 247 (1) (2008) 179–188.
- [72] A. Pfefferbaum, E.V. Sullivan, Increased brain white matter diffusivity in normal adult aging: relationship to anisotropy and partial voluming, *Magn. Reson. Med.* 49 (5) (2003) 953–961.



## Research paper

## Microbleeds may expand acutely after traumatic brain injury



Arnold Toth<sup>a,\*</sup>, Noemi Kovacs<sup>a,1</sup>, Viktoria Tamas<sup>a,1</sup>, Balint Kornyei<sup>a,1</sup>, Mate Nagy<sup>a,1</sup>,  
 Andrea Horvath<sup>a,b,1</sup>, Tamas Rostas<sup>c,2</sup>, Peter Bogner<sup>a,c,1,2</sup>, Jozsef Janszky<sup>d,e,2</sup>,  
 Tamas Doczi<sup>a,b,e,1,2</sup>, Andras Buki<sup>a,e,1,2</sup>, Attila Schwarcz<sup>a,e,1,2</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurosurgery, Pécs Medical School, H-7623, Rét. u. 2., Pécs, Hungary

<sup>b</sup> Diagnostic Center of Pécs, H-7623, Rét. u. 2., Pécs, Hungary

<sup>c</sup> Department of Radiology, Pécs Medical School, H-7624, Ifjusag str. 13., Pécs, Hungary

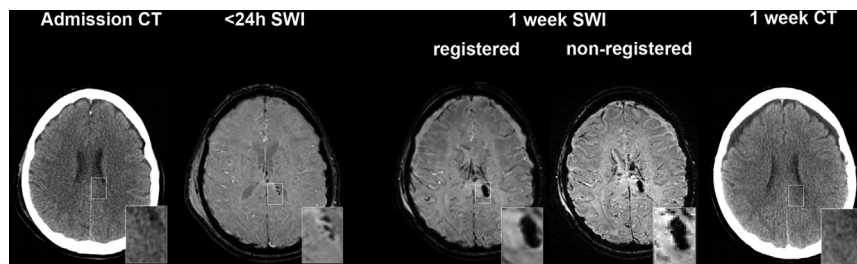
<sup>d</sup> Department of Neurology, Pécs Medical School, H-7623, Rét. u. 2., Pécs, Hungary

<sup>e</sup> MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group, Hungary

## HIGHLIGHTS

- A certain portion of the traumatic microbleeds changed within a week after the injury.
- This change occurred in forms of microbleed expansion and confluence.
- Due to this, both the overall microbleed count and volume was altered.
- Imaging timing may be relevant for optimizing the prognostic utility of this biomarker.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 December 2015

Received in revised form 14 February 2016

Accepted 15 February 2016

Available online 18 February 2016

## Keywords:

Susceptibility weighted imaging

Traumatic brain injury

Diffuse axonal injury

Microbleed

Microhemorrhage

Magnetic resonance imaging

## ABSTRACT

**Background and purpose:** Susceptibility weighted imaging (SWI) is a very sensitive tool for the detection of microbleeds in traumatic brain injury (TBI). The number and extent of such traumatic microbleeds (TMBs) have been shown to correlate with the severity of the injury and the clinical outcome. However, the acute dynamics of TMBs have not been revealed so far. Since TBI is known to constitute dynamic pathological processes, we hypothesized that TMBs are not constant in their appearance, but may progress acutely after injury.

**Materials and methods:** We present here five closed moderate/severe (Glasgow coma scale  $\leq 13$ ) TBI patients who underwent SWI very early (average = 23.4 h), and once again a week (average = 185.8 h) after the injury. The TMBs were mapped at both time points by a conventional radiological approach and their numbers and volumes were measured with manual tracing tools by two observers. TMB counts and extents were compared between time points.

**Results:** TMBs were detected in four patients, three of them displaying an apparent TMB change. In these patients, TMB confluence and apparent growth were detected in the corpus callosum, coronal radiation or subcortical white matter, while unchanged TMBs were also present. These changes caused a decrease in the TMB count associated with an increase in the overall TMB volume over time.

\* Corresponding author at: Department of Neurosurgery, H-7623, Rét. u. 2 Pécs, Pécs, Hungary.

E-mail addresses: [prsarn@gmail.com](mailto:prsarn@gmail.com) (A. Toth), [noemi.kovacs5@gmail.com](mailto:noemi.kovacs5@gmail.com) (N. Kovacs), [tamas.viktoria@pte.hu](mailto:tamas.viktoria@pte.hu) (V. Tamas), [kornyei.balint@windowslive.com](mailto:kornyei.balint@windowslive.com) (B. Kornyei), [nagy.mate@pte.hu](mailto:nagy.mate@pte.hu) (M. Nagy), [andrhovath@gmail.com](mailto:andrhovath@gmail.com) (A. Horvath), [rostas.tamas@pte.hu](mailto:rostas.tamas@pte.hu) (T. Rostas), [peter.bogner@gmail.com](mailto:peter.bogner@gmail.com) (P. Bogner), [jozsef.janszky@gmail.com](mailto:jozsef.janszky@gmail.com) (J. Janszky), [doczi.tamas@pte.hu](mailto:doczi.tamas@pte.hu) (T. Doczi), [2satur@pte.hu](mailto:2satur@pte.hu) (A. Buki), [schwarcz.attila@pte.hu](mailto:schwarcz.attila@pte.hu) (A. Schwarcz).

<sup>1</sup> Fax: 72/535931.

<sup>2</sup> Fax: +36 72/536 199.

**Conclusion:** We have found a compelling evidence that diffuse axonal injury-related microbleed development is not limited strictly to the moment of injury: the TMBs might expand in the acute phase of TBI. The timing of SWI acquisition may be relevant for optimizing the prognostic utility of this imaging biomarker.  
© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) constitutes a public health problem worldwide [5]. Diffuse axonal injury (DAI) is a substantial pathological component of brain injury, and is highly related to the patient outcome [16]. However, in consequence of its microscopic range, it is basically “invisible” to standard TBI imaging protocols.

Interest in the application of susceptibility weighted imaging (SWI) [21] in TBI has recently been increasing rapidly, since it has been shown to be a very sensitive imaging method for the detection of the possible hemorrhagic components of DAI, traumatic microbleeds (TMBs) [28]. SWI is a fully velocity-compensated, high-resolution 3D gradient echo sequence that uses magnitude and filtered-phase information, both separately and in combination, and is therefore able to create a strong contrast for the susceptibility effects of microbleeds [21]. Other imaging methods, such as CT, T2- and T2\*-weighted MRI or FLAIR are also able to depict punctual DAI-related lesions, though less reliably so than SWI [3,7,10,30]. SWI allows patients with a DAI to be dichotomized as hemorrhagic or nonhemorrhagic, and this has been proposed to be of clinical relevance [9,31]. Moreover, the number, localization, type and volume of TMBs have been linked to the severity of injury and the clinical outcome [1,2,8,10,14,18,30,33].

Other advanced MRI methods, and primarily diffusion tensor imaging, are also sensitive in the detection of axonal injury, but to date these results have been based on group analyses, generally with the use of post-processing computation and statistics [13].

In contrast, SWI might be easily applied at an individual level too. A conventional morphological assessment might define TMB number, extent and anatomical distribution per patient.

However, no consensus has yet been reached as concerns the optimal clinical use of SWI (or T2\*GRE) in TBI. Whereas studies largely agree that TMBs are related to the injury severity or outcome, they differ from the aspects of the investigated population size, the injury severity, the image acquisition method, the outcome assessment method, the TMB detection and even the definition of TMB, features that may explain their heterogeneous results.

Another important factor might be the interval between injury and imaging. This has varied widely across and within the published studies (from days to years [10,30]). If microbleeds are not static, but change (in number, extent, etc.) over time, the timing of imaging should be a crucial aspect as concerns the drawing of correct relations with the clinical features. We are aware of only two studies that have longitudinally investigated microbleeds in TBI; they concentrated on the long-term (several months to years) microbleed changes and revealed a slight attenuation in the microbleed visibility, probably due to hemosiderin absorption [20]. However, since acute TBI constitutes dynamic pathological processes, a microbleed status change in the acute phase is also highly possible.

We hypothesized that the microbleed parameters might change in the acute phase of TBI and we present here a follow-up SWI investigation of five TBI patients within the acute period.

## 2. Subjects and methods

Adults with a severe or moderate closed TBI (Glasgow Coma Scale, GCS < 14), but lacking major intracranial bleeding on the

acute CT scans, were recruited prospectively from the trauma center at the University of Pécs in 2015. Exclusion criteria included an age above 50 years, a previously documented TBI, any known neurological or psychiatric disease, uncontrolled hypertension, diabetes, a history of smoking, a history of anticoagulant therapy, any contraindication of acute MRI, or a refusal to provide informed consent (by patient or legally authorized representative). These criteria allowed the inclusion of five patients (for the clinical details, see Table 1). The severe TBI patients received low-molecular-weight-heparin as prophylactic antithrombotic therapy within 24 h after the injury, in accord with the general neuroanesthetic protocols [26]. The clinical outcome was assessed by a neuropsychologist (V.T.) at 6 months after the injury with the use of the Extended Glasgow Outcome Score (GOS-E) [32].

MRI was performed within 24 h after the injury and once again a week later with the same equipment and protocol, which included T1-, T2- and SWI (for technical details, see Table 2).

The TMBs were identified on the SWI scans at both time points by two independent raters (A.T. and a board-certified neuroradiologist T.R.), blinded to the clinical data. The TMBs were defined as punctuate, ovoid or curvilinear hypointensities located in the white matter or white-gray matter border that were clearly not consistent with blood vessels or artefacts. To aid such exclusion of mimicking hypointensities and a more precise anatomical localization, both the high-resolution T1-weighted and the T2 images were registered to the SWI images by using the FMRIB's Linear Image Registration Tool (FLIRT, FSL, FMRIB's Software Library, [www.fmrib.ox.ac.uk/fsl](http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl), Oxford, UK) [15], which allowed a multi-modal assessment of the TMB sites. The TMBs associated with a T1 or T2 signal alteration were not excluded. The TMBs adjacent to contusions or bone-air interface artefacts (e.g. near the mastoid process) were excluded. Only the TMBs identified by both raters were included in the overall number of TMBs per scan.

The overall TMB volume was then measured with manual tracing tools (FSL [29], FMRIB's Software Library, [www.fmrib.ox.ac.uk/fsl](http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl), Oxford, UK) by both raters; the averages of the measured data were regarded as the final overall microbleed volume per scan. In order to check on the rating reliability, the raters assessed the overall microbleed volumes twice and the intra- and inter-rater intraclass correlation coefficients were calculated, using the two-way model, absolute agreement mode (MedCalc statistical software version 15.4, Ostend, Belgium) [27].

To allow TMB comparison in the same image orientation and slice position, the SWI scans from different timepoints were co-registered by using FLIRT. On the basis of the image coordinates, the TMBs were tracked on the registered follow-up images, and any possible obvious change (shrinkage, growth, confluence, fragmentation or disappearance) that was found in agreement by both investigators, was recorded. New TMBs (not existing in the initial scan) were searched for on the follow-up images. A similar lesion follow-up approach was performed both on the T1- and T2-weighted images and in the clinical CT scans, but no co-registration was performed for the CT scans.

Approval for the performance of this study was granted by the Institutional Review Board (IRB). Written informed consent was obtained from all the study participants (or their legally authorized representatives).

**Table 1**  
Epidemiological, clinical and microbleed parameters.

Patient no.	Age (y)	Gender	GCS <sup>1</sup>	6-month GOS-E	Accompanying non-cranial trauma	EVD <sup>2</sup>	Craniectomy	MRI timing		TMB <sup>3</sup> count		TMB volume (voxel)	
								Initial	Second	Initial	Second	Initial	Second ( <sup>4</sup> )
1	33	M	6	5	pulmonary contusion	day 1	–	23 h	day 7	26	21	458	684 (×1.49)
2	36	F	11	7	spinal fracture	–	–	6 h	day 7	14	11	392	1184 (×3.02)
3	20	M	3	4	sacral fracture multiple maxillofacial fracture	day 1	day 3	20 h	day 8	55	55	4355	4580 (×1.051)
4	37	M	13	8	pulmonary contusion	–	–	18 h	day 8	5	5	176	160 (×0.909)
5	49	M	8	8	multiple maxillofacial fracture	day 1	–	6 h	day 9	0	0	0	0

<sup>1</sup> GCS at admission.<sup>2</sup> External ventricular drain.<sup>3</sup> Traumatic microbleed.<sup>4</sup> volume change ratio between initial and second time point.**Table 2**  
MRI protocol technical details.

MRI scanner	Magnetom TIM Trio 3 Tesla (Siemens, Erlangen, Germany)		
Coil	12-channel standard head coil		
Sequence	3D gradient echo SWI <sup>5</sup>	T1 3D MPRAGE <sup>6</sup>	T2 turbo spin echo
TR <sup>1</sup> /TE <sup>2</sup> (ms)	27/20	1900/3,41	6000/93
TI <sup>3</sup> (ms)	n.a.	900	n.a.
Slice number	72	160	30
Slice plane	Axial	Axial	Sagittal
Slice thickness (mm)	1.5	0.94	4
Flip angle (degrees)	15	9	120
Matrix size	182 × 256	224 × 256	280 × 320
FOV <sup>4</sup> (mm <sup>2</sup> )	173 × 230	210 × 240	193 × 220
Receiver bandwidth (Hz/pixel)	120	180	220

<sup>1</sup> Repetition time.<sup>2</sup> Echo time.<sup>3</sup> Inversion time.<sup>4</sup> Field of view.<sup>5</sup> Susceptibility weighted imaging.<sup>6</sup> Magnetization-prepared rapid gradient-echo.

### 3. Results

TMBs were found in 4 of the 5 patients (patients 1–4). Obvious TMB growth and/or confluence between the two imaging time-points were observed in three patients (patients 1–3, see Fig. 1). These were found in the splenium of the corpus callosum, the coronal radiation, or the subcortical white matter. Novel TMB formation (the appearance of a TMB at a previously unaffected site) or the disappearance of a TMB was not detected between the imaging time points. TMBs without any apparent change were also seen in all four patients who displayed TMBs (see Fig. 2).

The overall TMB number was unchanged (patients 3, 4 and 5) or decreased due to confluence (patients 1 and 2) over time. The overall TMB volume increased substantially in patients 1 and 2 (1.5 and 3-fold increase, respectively), while it changed only slightly in patients 3 and 4 (1.05 and 0.9-fold change, respectively). The overall TMB counts and volumes are shown in Table 1.

Although some TMBs were associated with slight T1 or T2 signal intensity alterations, the comparison of the different time-point T1- or T2-weighted scans did not reveal lesion changes. Similarly, small hemorrhagic lesions (if present at all) on the clinical CT scans did not show progression over time.

The intra- and the inter-rater intraclass correlation coefficients for both the single and the average measurements of the overall TMB volumes exceeded 0.98.

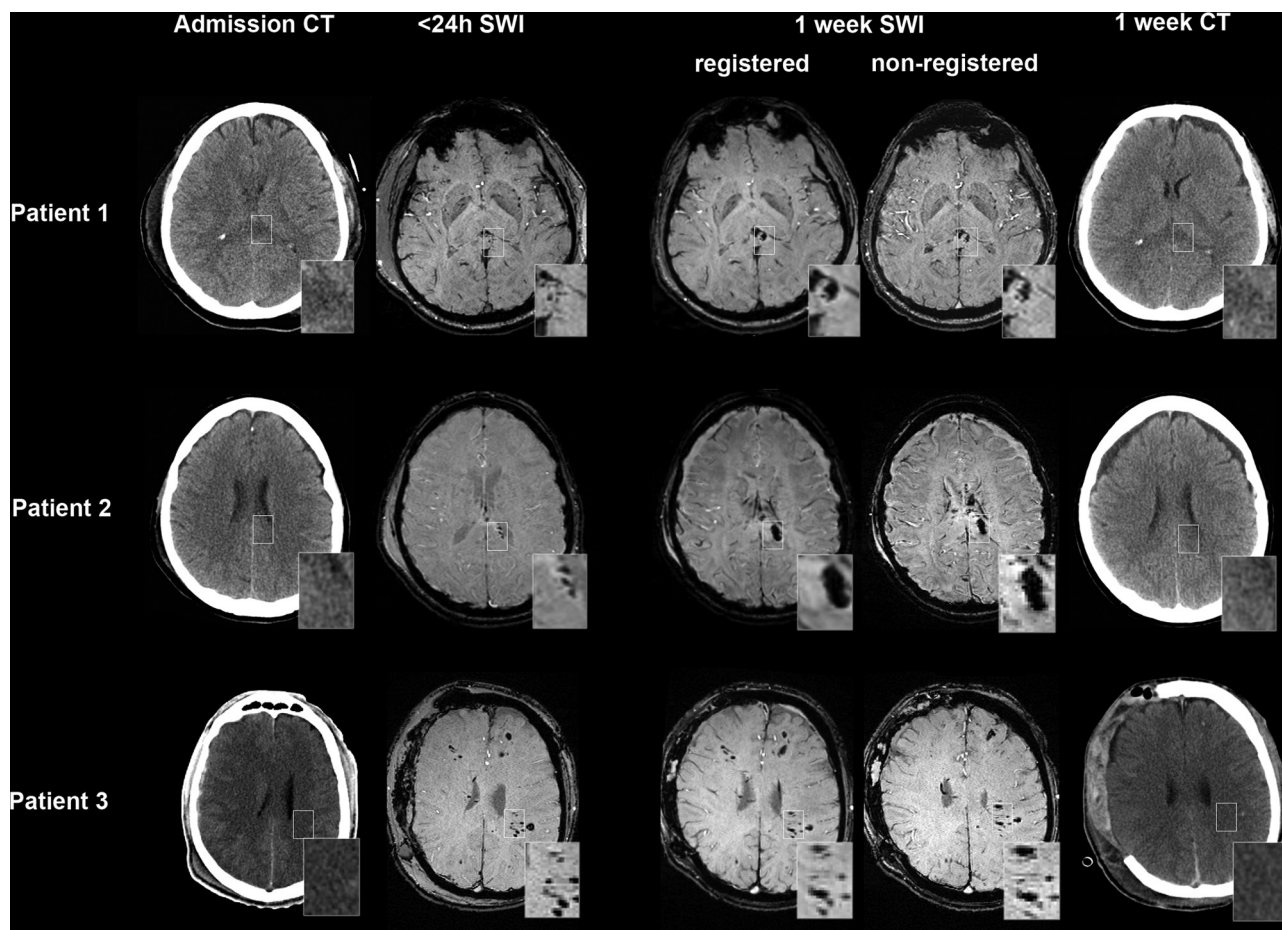
### 4. Discussion

The findings reported here demonstrate that the SWI TMB appearance may change in the acute phase after injury. The TMBs did not appear or disappear over time, but a proportion of the ini-

tially existing ones underwent an apparent expansion. This was manifested in considerable changes in both the overall TMB count and volume. CT, T1 and T2 MRI failed to detect this expansion. Although it is yet not possible to estimate the rate of occurrence of the TMB expansion in TBI because of the small sample size, the phenomenon itself has both important scientific and practical implications.

The most important practical implication is that scan timing may be a substantial factor when the severity or outcome of DAI is assessed on the basis of TMB parameters such as overall count and volume. In two of the four patients with TMBs, the follow-up imaging showed fewer TMBs, but their overall volume had become obviously higher (1.5 and 3-fold increase) due to the expansion and confluence. Neither the number nor the volume of the TMBs can therefore be regarded as a constant marker in the acute phase after TBI. Either the optimal imaging time point should be described, i.e. the time after injury when the possibility of TMB alteration drops significantly, or SWI should be used as a tool for follow-up. Whereas recent studies have shown impressive relations between the single SWI findings taken at inconsistent time points and the clinical factors [2,25,33], it is quite likely that these results would have been improved if consistent multi-time point imaging protocols had been applied. We agree with the conclusion of previous investigations of long-term microbleed changes [20,22] that imaging in TBI should not be performed too late because TMBs may undergo an attenuation. However, too early single time point imaging might also be disadvantageous if a TMB expansion is then missed.

An explanation of the pathological background might be that microvascular damage underlying DAI-related microbleeds is not complete in the very initial period after injury –similar to DAI itself, which is known to constitute a complex degradation process reaching its maximum in a delayed fashion after injury [6].



**Fig. 1.** TMB growth and confluence examples in the first week after TBI.

This figure shows the initial (<24 h) and the follow-up (1 week) CT and SWI scans of patients 1–3. The inserts show identical anatomical locations in the co-registered initial and follow-up SWI scans, and the possible closest anatomical slice in the CTs and non-registered follow-up SWI scans per patient.

In patient 1, multiple TMBs can be seen in the left side of the splenium of the corpus callosum which underwent growth and confluence (has become one larger TMB on follow-up SWI).

Patient 2 presents a very similar TMB change in the left side of the splenium.

In patient 3, the growth of two TMBs in the left posterior coronal radiation can be seen. The hypointensity that appeared in the anterior left hemisphere in the follow up SWI scan is a result of the insertion of an external ventricular drain, following the initial imaging time point.

These microbleeds and changes are not detectable in the admission or follow-up CT scans either.

An argument against this is that microbleed expansion was not general in our patients, but was limited to certain foci. It is possible that these locations were prone to minor shear-strain effects linked to inter-compartmental brain shifts caused by brain edema progression/regression. These forces seem to be large enough to cause recurrent bleeding in the already damaged capillaries.

A long-term follow-up study on stroke patients related blood pressure variability to microbleed progression [19]. Although the investigated time-span and the background pathology were very different, blood pressure variations might play a role in the post-traumatic acute microbleed expansion too. A further theoretical explanation for the focal microbleed expansion might be possible variations in perfusion rate in the different brain regions [12]. Further studies in which MR perfusion techniques are combined with SWI might reveal such mechanisms.

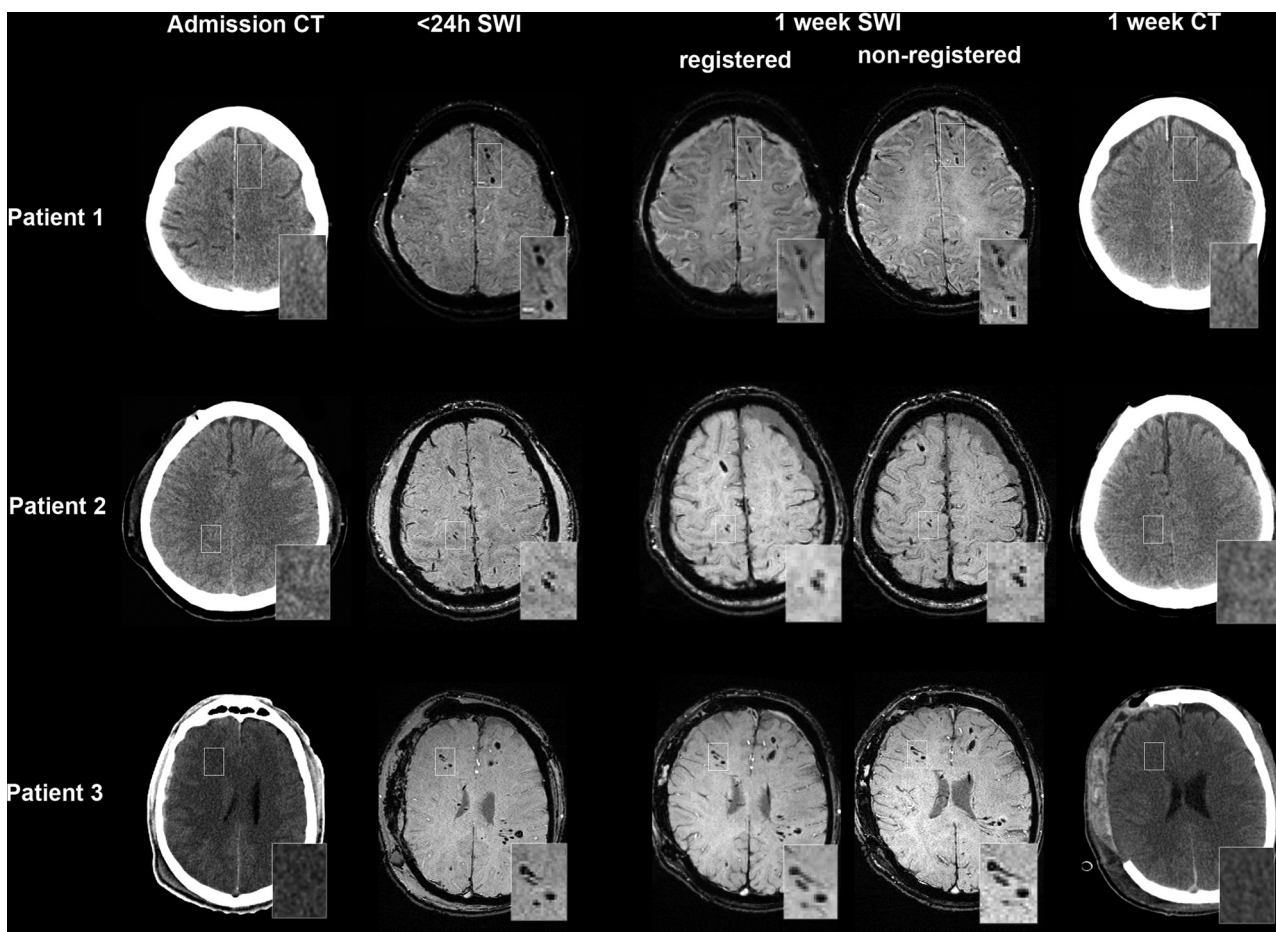
None of the patients received anticoagulant therapy prior to trauma, though due to general neuroanesthetic protocols [26], the severe TBI patients (patients 1, 3 and 5) received preventive-dose low-molecular-weight-heparin within 24 h after injury. Theoretically, this might have facilitated microbleed evolution, but it is definitely not strictly linked to it, since one low-molecular-weight-heparin receiver (patient 5) did not display TMB evolution at all, while non-anticoagulated patient 2 presented an apparent TMB

expansion. If post-traumatic anticoagulant therapy is related to microbleed expansion at any rate, follow-up SWI should be proposed as a potential tool to assess patient safety besides the currently used CT protocols.

Since other imaging methods are less sensitive in detecting microbleeds [3,7], and histological investigations do not allow intra-subject follow-up, SWI appears to be the best tool for investigation of the pathomechanism of TMB progression.

Hemoglobin degradation products are well known to have substantially different T1 or T2 contrasts [23]. Moreover, it must be borne in mind that because of the blooming (susceptibility) effect, the microbleeds are actually considerably smaller than appears on the T2\* or SWI images [11]. In theory, therefore, hemoglobin degradation could result in an altered susceptibility effect that might cause a pseudo-change in the size of the microbleeds, i.e. not their true size, but their susceptibility effect could change due to hemoglobin degradation. The literature regarding this question is surprisingly scarce. Two previous studies have investigated the acute evolution (from hours to weeks) of an experimental intracerebral hemorrhage in rats, in which not only T1- or T2-weighted imaging, but also SWI was applied [4,17]. The overall diameter of the intracerebral hematoma gradually decreased over time in both studies. However, again in both studies, the signal intensity





**Fig. 2.** Non-changing TMBs from the same patients (patient 1–3) in the first week after TBI.

This figure shows the initial (<24 h) and the follow-up (1 week) CT and SWI scans of patients 1–3. The inserts show identical anatomical locations in the co-registered initial and the follow-up SWI scans, and the possible closest anatomical location in the CTs and non-registered follow-up SWI scans per patient.

reversed (it became hyperintense) in the core area of the intracranial hematoma after 24 h. The volume of this central hyperintensity then decreased, but was still visible at 1–2 weeks. The authors suggested that this hyperintensity was due to the presence of extracellular methemoglobin [17]. These studies therefore support the view that hemoglobin degradation indeed affects the susceptibility effect. Theoretically, the reappearance of susceptibility during the cessation of hyperintensity could result in a false impression of microbleed expansion. However, this mechanism is very unlikely to explain the demonstrated microbleed changes in the present study if the following points are considered: A. The overall diameter of the expanding lesions increased over time even when all the pre-confluence microbleeds were taken into account. B. A slight hyperintensity, if present at all, is located not centrally, but “rim-like”, related to the hypointensities, and is visible at the 1-week acquisition rather than at 24 h. C. In humans, extracellular methemoglobin is known to appear first only after 7 days and thus the related hyperintensity would cause a false appearance of shrinkage, and not expansion, between 24 h and 7 days. D. Non-changing TMBs beside the expanding ones within the same patients indicate that lesion expansion is not general, as it should be if it were caused by hemoglobin degradation.

Unfortunately, the data available at present are insufficient to assess the clinical significance of microbleed expansion: though clinical variables such as GCS and GOS-E score were recorded, the statistical testing of their correlations with microbleed expansion would have required a larger sample size, especially if corrections for epidemiological factors had been performed. Following a non-

statistical evaluation of the data, the initial GCS does not appear to be strictly correlated with microbleed progression, since it occurred in patients with GCS levels of 3 and 11. However, we hypothesize that microbleed expansion is related to clinical deterioration, especially when eloquent brain areas or associated tracts are affected. This may only be recognized as a poorer final outcome in the comatose or anesthetized patients.

In the present study, we adhered to very strict inclusion and exclusion criteria in order to rule out as much as possible the potential disturbing effects of non-traumatic microbleeds. Non-traumatic microbleeds are associated with aging [24], vascular diseases (including diabetes, smoking and uncontrolled hypertension) and several central nervous system disorders [11,21]. This resulted in a high number of excluded patients. Patient movement in the post-traumatic phase is often unsafe, making noncompulsory study MRIs impossible. A very early MRI in moderate to severe TBI has especially high infrastructural and personnel requirements. These factors together explain the small sample size of this study. However, this study is intended to present a previously unrecognized phenomenon, the possible expansion of TMBs. Further studies based on larger samples should reveal the epidemiological background or the clinical correlations of acute TMB expansion.

## 5. Conclusion

In conclusion, this study has shown that the development of microbleeds is not limited to the moment of injury, but a proportion of them may undergo an apparent expansion in the subsequent

days. This affects both the overall microbleed count and volume. Scan timing may therefore be a crucial factor when the severity or outcome of DAI is assessed on the basis of SWI-detected TMB parameters.

### Acknowledgments

This study was funded by Hungarian Brain Research Program Grant No. KTIA\_13\_NAP-A-II/8, Grant No. KTIA\_13\_NAP-A-II/9, SROP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0017 and Hungarian Scientific Research Fund Grant No. OTKA/109132.

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs.

### References

- [1] T. Babikian, M.C. Freier, K.A. Tong, J.P. Nickerson, C.J. Wall, B.A. Holshouser, T. Burley, M.L. Riggs, S. Ashwal, Susceptibility weighted imaging: neuropsychologic outcome and pediatric head injury, *Pediatr. Neurol.* 33 (2005) 184–194.
- [2] M.H. Beauchamp, R. Beare, M. Ditchfield, L. Coleman, F.E. Babl, M. Kean, L. Crossley, C. Catroppa, K.O. Yeates, V. Anderson, Susceptibility weighted imaging and its relationship to outcome after pediatric traumatic brain injury, *Cortex* 49 (2013) 591–598.
- [3] M.H. Beauchamp, M. Ditchfield, F.E. Babl, M. Kean, C. Catroppa, K.O. Yeates, V. Anderson, Detecting traumatic brain lesions in children: cT versus MRI versus susceptibility weighted imaging (SWI), *J. Neurotrauma* 28 (2011) 915–927.
- [4] L. Belayev, A. Obenaus, W. Zhao, I. Saul, R. Busto, C. Wu, A. Vigdorichik, B. Lin, M.D. Ginsberg, Experimental intracerebral hematoma in the rat: characterization by sequential magnetic resonance imaging, behavior, and histopathology. Effect of albumin therapy, *Brain Res.* 1157 (2007) 146–155.
- [5] J. Bruns Jr., W.A. Hauser, The epidemiology of traumatic brain injury: a review, *Epilepsia* 44 (Suppl. 10) (2003) 2–10.
- [6] A. Buki, J.T. Povlishock, All roads lead to disconnection?? Traumatic axonal injury revisited, *Acta Neurochir. (Wien)* 148 (2006) 181–193 (discussion 193–184).
- [7] A.L. Cheng, S. Batool, C.R. McCreary, M.L. Lauzon, R. Frayne, M. Goyal, E.E. Smith, Susceptibility-weighted imaging is more reliable than T2\*-weighted gradient-recalled echo MRI for detecting microbleeds, *Stroke* 44 (2013) 2782–2786.
- [8] C.A. Colbert, B.A. Holshouser, G.S. Aaen, C. Sheridan, U. Oyoyo, D. Kido, S. Ashwal, Value of cerebral microhemorrhages detected with susceptibility-weighted MR Imaging for prediction of long-term outcome in children with nonaccidental trauma, *Radiology* 256 (2010) 898–905.
- [9] A. Di Ieva, T. Lam, P. Alcaide-Leon, A. Bharatha, W. Montanera, M.D. Cusimano, Magnetic resonance susceptibility weighted imaging in neurosurgery: current applications and future perspectives, *J. Neurosurg.* (2015) 1–13.
- [10] B.H. Geurts, T.M. Andriessen, B.M. Goraj, P.E. Vos, The reliability of magnetic resonance imaging in traumatic brain injury lesion detection, *Brain Inj.* 26 (2012) 1439–1450.
- [11] S.M. Greenberg, M.W. Vernooij, C. Cordonnier, A. Viswanathan, R. Al-Shahi Salman, S. Warach, L.J. Launer, M.A. Van Buchem, M.M. Breteler, G. Microbleed Study, Cerebral microbleeds: a guide to detection and interpretation, *Lancet Neurol.* 8 (2009) 165–174.
- [12] N.M. Gregg, A.E. Kim, M.E. Gurol, O.L. Lopez, H.J. Aizenstein, J.C. Price, C.A. Mathis, J.A. James, B.E. Snitz, A.D. Cohen, M.I. Kamboh, D. Minhas, L.A. Weissfeld, E.L. Tamburo, W.E. Klunk, Incidental cerebral microbleeds and cerebral blood flow in elderly individuals, *JAMA Neurol.* 72 (2015) 1021–1028.
- [13] M.B. Hulskower, D.B. Poliak, S.B. Rosenbaum, M.E. Zimmerman, M.L. Lipton, A decade of DTI in traumatic brain injury: 10 years and 100 articles later, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 34 (2013) 2064–2074.
- [14] A. Iwamura, T. Taoka, A. Fukusumi, M. Sakamoto, T. Miyasaka, T. Ochi, T. Akashi, K. Okuchi, K. Kichikawa, Diffuse vascular injury: convergent-type hemorrhage in the supratentorial white matter on susceptibility-weighted image in cases of severe traumatic brain damage, *Neuroradiology* 54 (2012) 335–343.
- [15] M. Jenkinson, P. Bannister, M. Brady, S. Smith, Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images, *Neuroimage* 17 (2002) 825–841.
- [16] V.E. Johnson, W. Stewart, D.H. Smith, Axonal pathology in traumatic brain injury, *Exp. Neurol.* 246 (2013) 35–43.
- [17] R.A. Knight, Y. Han, T.N. Nagaraja, P. Whitton, J. Ding, M. Chopp, D.M. Seyfried, Temporal MRI assessment of intracerebral hemorrhage in rats, *Stroke* 39 (2008) 2596–2602.
- [18] J. Liu, Z. Kou, Y. Tian, Diffuse axonal injury after traumatic cerebral microbleeds: an evaluation of imaging techniques, *Neural Regen. Res.* 9 (2014) 1222–1230.
- [19] W. Liu, R. Liu, W. Sun, Q. Peng, W. Zhang, E. Xu, Y. Cheng, M. Ding, Y. Li, Z. Hong, J. Wu, J. Zeng, C. Yao, Y. Huang, C.S. Group, Different impacts of blood pressure variability on the progression of cerebral microbleeds and white matter lesions, *Stroke* 43 (2012) 2916–2922.
- [20] A. Messori, G. Polonara, C. Mabiglia, U. Salvolini, Is haemosiderin visible indefinitely on gradient-echo MRI following traumatic intracerebral haemorrhage? *Neuroradiology* 45 (2003) 881–886.
- [21] S. Mittal, Z. Wu, J. Neelavalli, E.M. Haacke, Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 2, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 30 (2009) 232–252.
- [22] K.G. Moen, T. Skandsen, M. Folvik, V. Brezova, K.A. Kvistad, J. Rydland, G.T. Manley, A. Vik, A longitudinal MRI study of traumatic axonal injury in patients with moderate and severe traumatic brain injury, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83 (2012) 1193–1200.
- [23] P.M. Parizel, S. Makkat, E. Van Miert, J.W. Van Goethem, L. van den Hauwe, A.M. De Schepper, Intracranial hemorrhage: principles of CT and MRI interpretation, *Eur. Radiol.* 11 (2001) 1770–1783.
- [24] M.M. Poels, M.W. Vernooij, M.A. Ikram, A. Hofman, G.P. Krestin, A. van der Lugt, M.M. Breteler, Prevalence and risk factors of cerebral microbleeds: an update of the Rotterdam scan study, *Stroke* 41 (2010) S103–106.
- [25] N.P. Ryan, C. Catroppa, J.M. Cooper, R. Beare, M. Ditchfield, L. Coleman, T. Silk, L. Crossley, M.H. Beauchamp, V.A. Anderson, The emergence of age-dependent social cognitive deficits after generalized insult to the developing brain: a longitudinal prospective analysis using susceptibility-weighted imaging, *Hum. Brain Mapp.* (2014).
- [26] E.V. Schaible, S.C. Thal, Anticoagulation in patients with traumatic brain injury Current opinion in anaesthesiology, 2013.
- [27] F. Schoonjans, A. Zalata, C.E. Depuydt, F.H. Comhaire, MedCalc: a new Computer program for medical statistics, *Comput. Methods Programs Biomed.* 48 (1995) 257–262.
- [28] D.J. Sharp, T.E. Ham, Investigating white matter injury after mild traumatic brain injury, *Curr. Opin. Neurol.* 24 (2011) 558–563.
- [29] S.M. Smith, M. Jenkinson, M.W. Woolrich, C.F. Beckmann, T.E. Behrens, H. Johansen-Berg, P.R. Bannister, M. De Luca, I. Drobnjak, D.E. Flitney, R.K. Niazay, J. Saunders, J. Vickers, Y. Zhang, N. De Stefano, J.M. Brady, P.M. Matthews, Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL, *Neuroimage* 23 (Suppl. 1) (2004) S208–219.
- [30] G. Spitz, J.J. Maller, A. Ng, R. O'Sullivan, N.J. Ferris, J.L. Ponsford, Detecting lesions after traumatic brain injury using susceptibility weighted imaging: a comparison with fluid-attenuated inversion recovery and correlation with clinical outcome, *J. Neurotrauma* 30 (2013) 2038–2050.
- [31] A. Toth, N. Kovacs, G. Perlaki, G. Orsi, M. Aradi, H. Komaromy, E. Ezer, P. Bukovics, O. Farkas, J. Janszky, T. Doczi, A. Buki, A. Schwarcz, Multi-modal magnetic resonance imaging in the acute and sub-acute phase of mild traumatic brain injury: can we see the difference? *J. Neurotrauma* 30 (2013) 2–10.
- [32] J.T. Wilson, L.E. Pettigrew, G.M. Teasdale, Structured interviews for the Glasgow Outcome Scale and the extended Glasgow Outcome Scale: guidelines for their use, *J. Neurotrauma* 15 (1998) 573–585.
- [33] E.L. Yuh, P. Mukherjee, H.F. Lingsma, J.K. Yue, A.R. Ferguson, W.A. Gordon, A.B. Valadka, D.M. Schnyer, D.O. Okonkwo, A.I. Maas, G.T. Manley, T.-T. Investigators, Magnetic resonance imaging improves 3-month outcome prediction in mild traumatic brain injury, *Ann. Neurol.* 73 (2013) 224–235.