

DISS. ETH Nr. 21170

Quantitative and Reproducible Measurement of Brain Glucose Metabolism and its Changes in Hypoglycemia

Dissertation
Submitted to ETH ZURICH
For the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
MALTE FREDERICK ALF
Master of Science (M.Sc.), Georg-August-Universität Göttingen

Born October 9, 1985
German citizen

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Roger Schibli, examiner
Prof. Dr. Rolf Gruetter, PD Dr. Stefanie D. Krämer, Prof. Dr. Simon Ametamey, co-examiners

2013

Summary

Contrary to other organs, the brain has a constant and relatively high energy demand to maintain not only cellular integrity but also signaling functions. Glucose is the main energy substrate for the brain, and thus the understanding of its transport and metabolism is of the essence in the investigation of metabolic diseases and degenerative diseases with a metabolic footprint.

As known to at least 347 million people worldwide (the diabetic population in September 2012, according to the WHO), there is no cheap, easy to use non-invasive and precise procedure for the measurement of glucose concentration or its turnover in blood or tissue. There are currently two methods for this purpose used in both clinics and research: ^1H and ^{13}C magnetic resonance (MR) spectroscopy and positron emission tomography with ^{11}C -glucose and ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG).

Although FDG is the most widely used tracer in PET imaging, it is usually used in a semi-quantitative fashion and the results of attempts at real quantification have varied too much to speak of a methodological consensus in the field. The aim of this thesis was therefore to set a new standard in the reliable quantification of glucose uptake and consumption by the brain, particularly in the mouse for future studies of disease models in this animal.

Experimentally, the first step towards this standard was to establish a good method for the measurement of arterial input functions, a task made difficult by the very small blood volume in mice. For this purpose, a method previously used in rats was further miniaturized. As presented in Chapter 3, a flow-through coincidence counter is used on an extracorporeal shunt volume in this method. With this technique, we could successfully establish a precise, real-time arterial input function with the microsurgical procedure being the only remaining, manageable challenge. As many previous efforts have aimed to establish ways to derive input functions directly from the PET images themselves, one state-of-the-art method of this type (blood-pool separation with blind source separation by ensemble-learning independent component analysis) was chosen for comparison with our experimental approach. The performance of the experimental approach in kinetic modeling was clearly superior. Our further studies therefore relied on this method.

In a second study, we addressed a further point of debate in the use of glucose metabolic PET. Previous studies have claimed FDG-PET kinetic modeling results to be largely independent of the glycemic state of the investigated organism, and usually report group averages for the rate constants describing the transport and metabolic processes. While this may be accurate in a narrow range, it

has clearly been demonstrated by the pioneers in this field of research, that quantification of the metabolic rate does in fact depend on glycemia, in particular under hypoglycemia.

With the aim to extend the study to disease models (GLUT2 knockout mice) in the future, we used insulin to induce hypoglycemia in wild type mice and evaluated the observed changes in tracer uptake. Glucose transport across the blood-brain barrier and the subsequent phosphorylation step were enhanced under acute hypoglycemia without preceding history of hypoglycemic events. As a result, the apparent rate of metabolic trapping was increased and could sustain cerebral glucose consumption at a normal level at plasma glucose concentrations higher than approximately 2.5 mmol/L. At hypoglycemia below this level, the metabolic rate of glucose was impaired in all brain regions. Notably, the hypothalamus showed a particular response to hypoglycemia in that the increase in the rate constant describing glucose transport into the tissue and the rate of metabolic trapping was significantly weaker than in the rest of the brain. We hypothesize that this finding is a correlate of the activity of the transporter GLUT2, known for its role in cerebral glucose sensing and homeostasis. This hypothesis should be corroborated through PET imaging of a brain-specific GLUT2 knock-out mouse model.

The quantification of the metabolic rate of glucose from FDG PET imaging is complicated by the different affinities of FDG for the transporters and hexokinases compared to glucose. These affinity differences are relatively well known for the transport across the blood-brain barrier, but not so well for the hexokinases. They are corrected for by a lumped constant that can be derived with a relatively challenging experimental paradigm that still requires a set of assumptions that are not fully supported by the available data.

As a further step towards true quantification, we designed a novel approach to derive the lumped constant more directly, while only relying on the well-determined literature values for the affinity differences for transport. Our approach exploits the capacities of both ^1H MR spectroscopic imaging (MRSI) and FDG PET. Due to the intrinsic challenges of MRSI, we used rats in this study, as the smaller mouse brain is harder to shim and offers less volume to be mapped. MRSI was used to create maps of tissue glucose concentrations at different levels of glucose in the blood plasma. These maps were used to derive the ratio of the maximum rate of transport over the metabolic rate, $\frac{T_{max}}{CMR_{glc}}$, with a nominal resolution of 1.4 μL . FDG PET was performed in a set of rats with a narrow, normal range of plasma glucose. Transport can be assumed to be saturated at this plasma glucose concentration. Therefore, region-specific values for T_{max} could be determined as $K_1 \times C_p \times \Delta a$, with K_1 denominating the transport rate constant, C_p the arterial plasma glucose concentration and Δa the ratio of the transporter's affinities for glucose and FDG. Combining the results from MRSI and PET, a region-specific CMR_{glc} could be calculated, independent of a lumped constant. It was

then possible to directly infer a value for the lumped constant from these results. We determined it as ranging between 0.33 in retrosplenial cortex and 0.44 in hippocampus under isoflurane anesthesia, which is smaller than previously reported in the literature. This could explain the discrepancy between the values for CMR_{glc} recently determined with ^1H MR spectroscopy, which are higher than most of those obtained with FDG PET. In our study, we find CMR_{glc} to be on the order of $0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ under isoflurane.

Finally, simulations were made to assess how much our results could have been influenced by factors such as the assumed fraction of blood contributing to the investigated tissue volumes or data smoothing. Among other findings, we realized that even small blood sample timing errors in the arterial input function lead to large errors in the single rate constants. This is another strong reason to prefer automated sampling methods as discussed in Chapter 3. The results of these simulations were condensed into a short cookbook of which we hope that it will help in creating new, more rigorous experimental and methodological standards for FDG PET studies.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu anderen Organen hat das Gehirn einen konstanten und relativ hohen Energiebedarf, um sowohl den normalen Stoffwechsel der Zellen, als auch ihre Signalfunktionen am Laufen zu halten. Glukose ist die wichtigste Energiequelle des Gehirns, daher ist es essentiell den Transport und Stoffwechsel von Glukose zu verstehen, um Stoffwechselkrankheiten und degenerative Krankheiten mit metabolischem „footprint“ zu erforschen.

Mindestens die derzeit knapp 350 Millionen Menschen umfassende diabetische Bevölkerung (Daten der WHO, September 2012) weiss, dass es keine günstige, einfach zu bedienende, nicht-invasive und präzise Methode zur Messung von Glukosekonzentration oder Glukosemetabolismus im Blut oder Gewebe gibt. Zwei Methoden für diesen Zweck finden in Klinik und Forschung Anwendung: ^1H und ^{13}C Magnetresonanzspektroskopie (MRS) und Positronemissionstomographie (PET) mit ^{11}C -Glukose und ^{18}F -Fluorodeoxyglukose (FDG).

Obwohl FDG der am weitesten verbreitete und meistgenutzte Tracer in der Positronemissionstomographie ist, wird diese Methode fast immer nur semi-quantitativ verwendet und die Ergebnisse der verschiedenen Versuche echter Quantifizierung variieren so stark, dass von einem Konsens bezüglich der Methode auf diesem Gebiet nicht die Rede sein kann. Das Ziel dieser Arbeit ist daher, einen neuen Standard für die zuverlässige Quantifizierung von Glukoseaufnahme und -verbrauch des Gehirns zu schaffen, insbesondere im Mausmodell für zukünftige Studien mit Krankheitsmodellen, die nur in der Maus verfügbar sind.

Der erste Schritt in Richtung dieses Ziels war ein experimenteller: Die Etablierung einer guten Methode für die Messung der arteriellen Inputfunktion, eine Aufgabe, die durch das sehr kleine Blutvolumen der Maus erschwert ist. Zu diesem Zweck wurde eine zuvor bereits in Ratten verwendete Methode weiter miniaturisiert. Wie in Kapitel 3 näher beschrieben wird ein Durchfluss-Koinzidenzzähler verwendet, durch den ein sich ausserhalb des Körpers der Maus befindendes Shunt-Volumen geleitet wird. Mit dieser Technik konnte erfolgreich eine präzise Methode etabliert werden, um in Echtzeit arterielle Inputfunktionen zu messen. Die einzige verbleibende Schwierigkeit besteht in der mikrochirurgischen Implantierung des Shunts.

Da zahlreiche Publikationen darauf abzielen die Inputfunktion direkt aus den PET-Bildern selbst zu berechnen, wurde eine dem aktuellen Stand der Forschung entsprechende Methode dieser Art gewählt (Blutvolumen-Trennung mittels „blind source separation by ensemble-learning independent component analysis“) um die so erzielbaren Ergebnisse mit der experimentellen Herangehensweise

zu vergleichen. Die Qualität der Ergebnisse mit der experimentell gemessenen Inputfunktion war eindeutig besser, weshalb diese Methode für unsere weiteren Studien verwendet wurde.

In einer zweiten Studie ging es um einen weiteren umstrittenen Punkt in der Anwendung von PET zur Erforschung von Glukosemetabolismus. Frühere Berichte behaupten, dass kinetische Modellierung von FDG-PET-Daten weitestgehend unabhängig vom glykämischen Zustand des untersuchten Organismus sei und präsentieren üblicher Weise Gruppenmittelwerte der „rate constants“, die Transport und metabolische Prozesse beschreiben. Das mag zwar in einem engen Rahmen zutreffen, es wurde jedoch bereits früh und eindeutig gezeigt, dass die Quantifizierung der metabolischen Rate durchaus vom glykämischen Status abhängt, insbesondere unter Hypoglykämie. Wir verwendeten daher Insulin um Hypoglykämie in Wildtyp-Mäusen zu erzeugen und erforschten die sich ergebenden Veränderungen bei der Aufnahme des Tracers. Ursprünglich bestand zusätzlich das Ziel, diese Studie in Zukunft auf Krankheitsmodelle (GLUT2-Knockout-Mäuse) auszuweiten.

Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke und die darauffolgende Phosphorylierung waren in akuter Hypoglykämie erhöht. Infolgedessen war die beobachtete Aufnahme rate höher. So konnte der Glukoseverbrauch des Gehirns auf normalem Niveau stabil gehalten werden, solange die Glukosekonzentration im Plasma nicht niedriger als etwa 2.5 mmol/L war. Bei Hypoglykämie unterhalb dieser Konzentration war die metabolische Rate von Glukose in allen Hirnregionen beeinträchtigt. Insbesondere der Hypothalamus zeigte eine spezifische Reaktion auf die Hypoglykämie. Der Anstieg der Aufnahme rate war hier signifikant schwächer als im Rest des Gehirns. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser Befund ein Korrelat der Aktivität des Transporters GLUT2 sein könnte, welcher für seine Rolle im Gehirn bei der Regelung der Glukose-Homöostase bekannt ist. Die Hypothese sollte durch PET-Studien von hirnspezifischen GLUT2-Knockout-Mäusen belegt werden.

Die Quantifizierung der metabolischen Rate von Glukose mittels FDG-PET ist weiterhin dadurch erschwert, dass Transporter und Hexokinasen unterschiedliche Affinitäten für FDG und Glukose besitzen. Diese Affinitätsunterschiede sind für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke relativ genau bekannt, weniger genau für die Hexokinasen. In der kinetischen Modellierung werden die Unterschiede durch die sogenannte „lumped constant“ korrigiert, welche mit einem ziemlich anspruchsvollen experimentellen Paradigma bestimmt werden kann, welches jedoch selbst auf einer Reihe von Annahmen beruht, die von den vorhandenen Daten nur teilweise unterstützt werden.

Als weiterer Schritt zur echten Quantifizierung wurde ein neuer Ansatz zur Ableitung der lumped constant entwickelt, der direkter ist und nur auf wenige, gut bestimmte Literaturwerte für die Transportaffinität zurückgreift. Unsere Herangehensweise nutzt und kombiniert die Vorteile von bildgebender ^1H MRS (MRSI) und FDG-PET. Aufgrund der technischen Limitierungen von MRSI

wurden Ratten für diese Studie verwendet, da es schwieriger ist im kleineren Mausgehirn eine ausreichende Magnetfeldhomogenität zu erzielen und das zu vermessende Volumen kleiner ist (schlechteres Verhältnis von Signal zu Rauschen). Mit MRSI wurden Karten der Glukosekonzentration im Hirngewebe bei verschiedenen Glukosekonzentrationen im Blutplasma erstellt. Mittels dieser Karten wurde das Verhältnis von maximaler Transportrate zu metabolischer Rate, $\frac{T_{max}}{CMR_{glc}}$, bestimmt, mit einer nominellen räumlichen Auflösung von $1.4\mu\text{L}$. FDG-PET-Scans wurden mit einer weiteren Gruppe von Ratten durchgeführt, deren Plasmaglukosekonzentration in einem eng definierten Fenster innerhalb des normalen Bereichs lag. Bei dieser Glukosekonzentration ist der Transportprozess gesättigt. Es können also Hirnregion-spezifische Werte für T_{max} mit der Formel $K_1 \times C_p \times \Delta a$, bestimmt werden, wobei K_1 die Transportrate beschreibt, C_p die arterielle Glukosekonzentration im Blutplasma und Δa das Verhältnis der Affinitäten der Transporter für Glukose und FDG.

Durch Kombination der Ergebnisse von MRSI und PET konnte ein regionsspezifischer, von der lumped constant unabhängiger Wert für die metabolische Rate CMR_{glc} berechnet werden. Dadurch konnte direct ein Wert für die lumped constant abgeleitet werden. Dieser lag zwischen 0.33 im retrosplenialen Kortex und 0.44 im Hippocampus unter Isoflurananästhesie. Diese Werte sind kleiner als die bislang in der Literatur berichteten und könnten somit die Diskrepanz zwischen den vor Kurzem mit ^1H -MRS bestimmten Werten für CMR_{glc} und den davon abweichenden, mit FDG-PET bestimmten Werten erklären. In der hier beschriebenen Studie finden wir einen Wert von etwa $0.6\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ für den Glukoseverbrauch im Gehirn unter Isofluran.

Abschliessend wurden Simulationen durchgeführt, um zu untersuchen, wie sehr unsere verschiedenen Ergebnisse von Faktoren wie dem relativen Blutvolumen im Gehirn oder Datenglättung abhängig sind. Die Ergebnisse sind in einer Art Kochbuch in Kapitel 1 den anderen vorangestellt. Unter anderem zeigte es sich, dass selbst kleine Fehler in der Bestimmung des Messzeitpunkts von Blutproben zu grossen Fehlern in den rate constants führen können. Dies ist ein weiterer guter Grund für die Verwendung automatischer Methoden, wie der in Kapitel 3 beschriebenen. Wir hoffen, dass die Zusammenfassung der Simulationsergebnisse dazu beiträgt, einen neuen und strengeren experimentellen und methodischen Standard für FDG-PET-Studien zu setzen.