

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ имени П. Н. ЛЕБЕДЕВА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

**КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ
ПО ФИЗИКЕ**

3

Москва — 2017

Информация

Страница журнала “Краткие сообщения по физике ФИАН” в интернете:

<http://ksf.lebedev.ru>

Издательство ALLERTON PRESS, INC., 18 WEST 27-th STR. NEW YORK,
N.Y. 10011 USA издает на английском языке полный перевод журнала “КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ ПО ФИЗИКЕ” под названием Bulletin of the Lebedev Physics Institute
(Russian Academy of Sciences), volume 44 (2017).

РЕДКОЛЛЕГИЯ

Н. Н. Колачевский – главный редактор
О. Н. Крохин – зам. главного редактора
В. П. Силин – зам. главного редактора
Л. Л. Чайков – ответственный секретарь
П. И. Арсеев – член редколлегии
И. Г. Зубарев – член редколлегии
В. К. Конюхов – член редколлегии
Ю. А. Михайлов – член редколлегии
А. И. Никишов – член редколлегии
Н. Г. Полухина – член редколлегии
А. А. Рухадзе – член редколлегии
В. Н. Сорокин – член редколлегии

УДК 537.635

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АСПАРТАТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА *IN VIVO* МЕТОДОМ ПРОТОННОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

П. Е. Меньщиков^{1,2}, Т. А. Ахадов², Н. А. Семенова^{1,2,3}

¹H МРС – уникальный метод, позволяющий *in vivo* наблюдать концентрации протонсодержащих химических соединений в тканях и органах человека. Основной проблемой данной методики является перекрывание сигналов, вызванное сходством структурных фрагментов различных метаболитов. Для разделения перекрывающихся сигналов может использоваться методика *J*-модулированного редактирования спектров, основанная на спин-спиновом взаимодействии. В данной работе впервые разработан метод прямого наблюдения прижизненной концентрации аспартата в локальных зонах головного мозга человека на основе импульсной последовательности MEGA-PRESS.

Ключевые слова: ¹H МРС, редактирование ¹H МРС спектров, *J*-модуляция, аспартат, MEGA-PRESS.

Введение. Локализованная протонная магнитно-резонансная спектроскопия (¹H МРС) – уникальный метод, позволяющий *in vivo* в динамике метаболических процессов наблюдать концентрации протонсодержащих химических соединений – участников обмена веществ в тканях и органах человека и лабораторных животных. Локализация зоны интереса (чувствительного объема, VOI) осуществляется с помощью

¹ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119334 Россия, Москва, ул. Косыгина, д. 4; e-mail: peeterem@gmail.com.

² Научно-исследовательский институт Неотложной Детской Хирургии и Травматологии, 119180 Россия, Москва, ул. Большая Полянка, д. 22.

³ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, 119334 Россия, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

ставших уже рутинными импульсных последовательностей (ИП) PRESS или STEAM [1]. Выделение VOI осуществляется срез-селектирующими градиентами, применяющимися одновременно с возбуждающим (90°) и рефокусирующим (180°) радиочастотными (РЧ) импульсами. Использование трех РЧ импульсов, возбуждающих ядерные спины в трех взаимно-перпендикулярных срезах, выделяет на их пересечении объем, в котором регистрируется сигнал спинового эха [1]. После преобразования Фурье получается спектр, в котором интегральная интенсивность сигналов пропорциональна числу резонирующих ядер и отражает концентрацию низкомолекулярных соединений в ткани.

Исследование выполняется на стандартных диагностических РЧ катушках. Привлекательность ^1H МРС обусловлена тем, что протоны являются наиболее распространенными в биологических системах “магнитными” ядрами, они входят в структурные фрагменты практически всех органических соединений, что создает возможность наблюдать за важнейшими метаболическими процессами. В поле с максимальной разрешенной в медицине напряженностью 3Т в ^1H МР спектрах на фоне шума удастся разрешить сигналы метаболитов с концентрациями не ниже 1–2 мМ/л [2]. Серьезным ограничением является и перекрывание сигналов, вызванное сходством структурных фрагментов различных метаболитов, что сильно осложняет количественную обработку спектров. Особенно перекрывание мешает при анализе содержания нейромедиаторов в структурах мозга.

Для отделения сигналов перекрытых метаболитов может использоваться разностная методика J -модулированного редактирования спектров, которая реализуется в виде ИП MEGA-PRESS [3]. Работа данной последовательности основана на спин-спиновом (J) взаимодействии, а именно, на возможности модуляции J -эволюции мультиплетов, с помощью воздействия на протоны, из-за которых происходит расщепление сигнала в мультиплет после воздействия РЧ импульса. В ^1H МР спектре J -эволюция проявляется как набег фазы компонент мультиплетов (структура сигнала, которая образуется вследствие спин-спинового взаимодействия) с ростом времени эха (TE) [4]. ИП MEGA-PRESS получена встраиванием двух 180° частотно-селективных (ЧСИ) РЧ импульсов в стандартную последовательность PRESS. При этом накапливают две серии спектров – ON и OFF [5]. В ON серии частота ЧСИ выбирается таким образом, чтобы ЧСИ воздействовал на спины протонов, связанных спин-спиновым взаимодействием с протонами, дающими наблюдаемый сигнал. Такое воздействие вызывает частичную или полную инверсию J -эволюции наблюдаемого сигнала. В OFF серии частота ЧСИ не воздействует

на спиновую систему, и J -эволюция наблюдаемого сигнала протекает без изменений. Вычитание ON серии из OFF дает результирующий сигнал в DIFF серии [5]. Сигналы, не подверженные влиянию ЧСИ ни в ON, ни в OFF сериях, в DIFF серии полностью вычитаются. Впервые MEGA-PRESS была использована для наблюдения сигнала γ -аминоасляной кислоты (ГАМК) с $\delta = 3.02$ ppm, перекрываемого интенсивным сигналом метиламино-группы креатина (Cr) и креатинфосфата (PCr) [3]. В дальнейшем использование ИП MEGA-PRESS позволило расширить ряд наблюдаемых метаболитов за счет таких соединений, как N-ацетил аспартил глутамат (NAAG) [6], глутатион (GSH) [7].

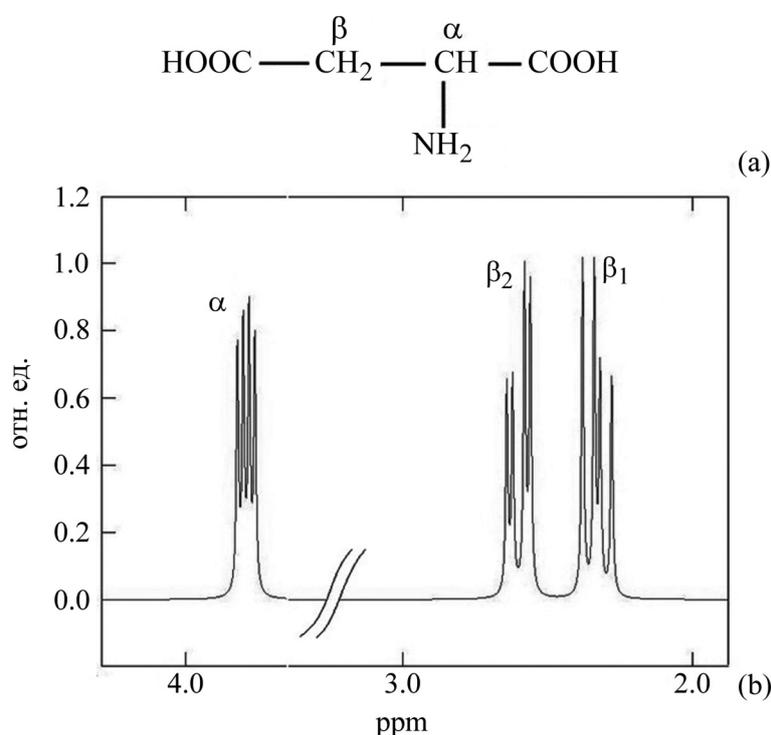


Рис. 1: (a) Структурная химическая формула Asp (аспарагиновой кислоты); (b) ЯМР спектр молекулы Asp.

Аспарат (Asp) в центральной нервной системе (ЦНС) выполняет роль возбуждающего нейромедиатора; в головном мозге в норме содержится в концентрациях 1–2 мМ/л [8]. Структура Asp представляет собой слабосвязанную спиновую систему АМХ, поэтому ^1H ЯМР-спектр Asp содержит три дублета дублетов (ДД) с $\delta = 2.66$ м.д., $\delta = 2.80$ м.д. и $\delta = 3.89$ м.д. Прямое наблюдение всех трех сигналов сильно осложнено J -эволюцией и перекрыванием сигналами других метаболитов. В данной работе

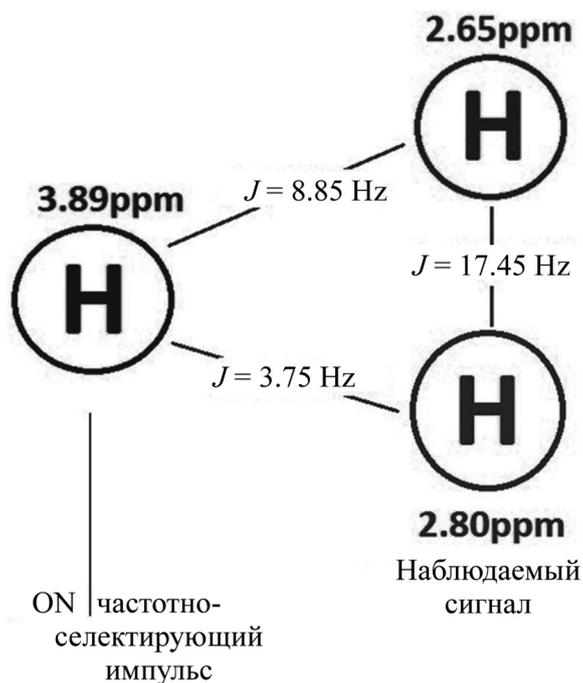


Рис. 2: Схема J -взаимодействия протонов α -CH и β -CH₂ групп с указанием частоты ЧСИ в ON серии.

исследуется применение и оптимизация параметров ИП MEGA-PRESS с предварительным моделированием для выделения сигнала Asp в *in vivo* спектрах головного мозга человека.

Методы.

Оптимизация параметров ИП MEGA-PRESS. Основными параметрами ИП MEGA-PRESS для ¹H MPC, характеризующими выделяемый сигнал в разностном спектре, являются частоты встроенных ЧСИ в ON и OFF сериях и общее время эхо (TE). В ON серии ЧСИ позволяет осуществить инверсию J -эволюции, его частота выбирается на основе ЯМР спектра рассматриваемой молекулы, констант спин-спинового взаимодействия протонов различных групп. ¹H ЯМР спектр аспартата (Asp) и его структурная формула представлены на рис. 1 [8]. В ON серии для выделения Asp ЧСИ применяли на $\delta = 3.89 \text{ ppm}$, что позволяет наблюдать сразу два сигнала неэквивалентных протонов β -CH₂ группы с $\delta = 2.65 \text{ ppm}$ и $\delta = 2.80 \text{ ppm}$. Схема J -взаимодействия протонов α -CH и β -CH₂ групп с указанием спектральной области влияния ЧСИ в ON серии представлена на рис. 2. ЧСИ в OFF серии согласно [9] применяли на $\delta = 5.21 \text{ ppm}$, т.е. симметрично (относительно пика воды, $\delta = 4.67 \text{ ppm}$) ЧСИ для ON серии.

TE определяет фазу компонент мультиплетов выделяемого сигнала и, как следствие, его итоговую интенсивность в DIFF серии. Для определения оптимального времени TE в программе VESPA был смоделирован вид сигналов Asp $C_{\beta 1}$ ($\delta = 2.65$ ppm) и $C_{\beta 2}$ ($\delta = 2.80$ ppm) в DIFF серии для TE в промежутке от 75 до 135 мс без учета уменьшения интенсивности вследствие T1 и T2 релаксации.

Экспериментальная часть. Все спектры и изображения получены на МР томографе Phillips 3.0 T Achieva TX (Philips Healthcare, Best, the Netherlands) с использованием головной 8-канальной приемной катушки SENSE-Head-8. Спектры с оптимальными параметрами ИП MEGA-PRESS для прямого наблюдения Asp (размер вокселя $VOI = 15 \times 15 \times 15$ мм³, $TE = 115$ мс (ЧСИ длительностью 40 мс), и $TE = 90$ мс (ЧСИ длительностью 25 мс), время повторения $TR = 1600$ мс, число усреднений сигнала (NSA) = 8, 60 повторений, время получения спектра – 15 минут) получали на двух специально изготовленных водных фантомах (концентрации метаболитов указаны на рис. 4), а затем регистрировали *in vivo* спектры в лобных долях ГМ 3-х здоровых по данным диагностической МРТ волонтеров. Все волонтеры подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

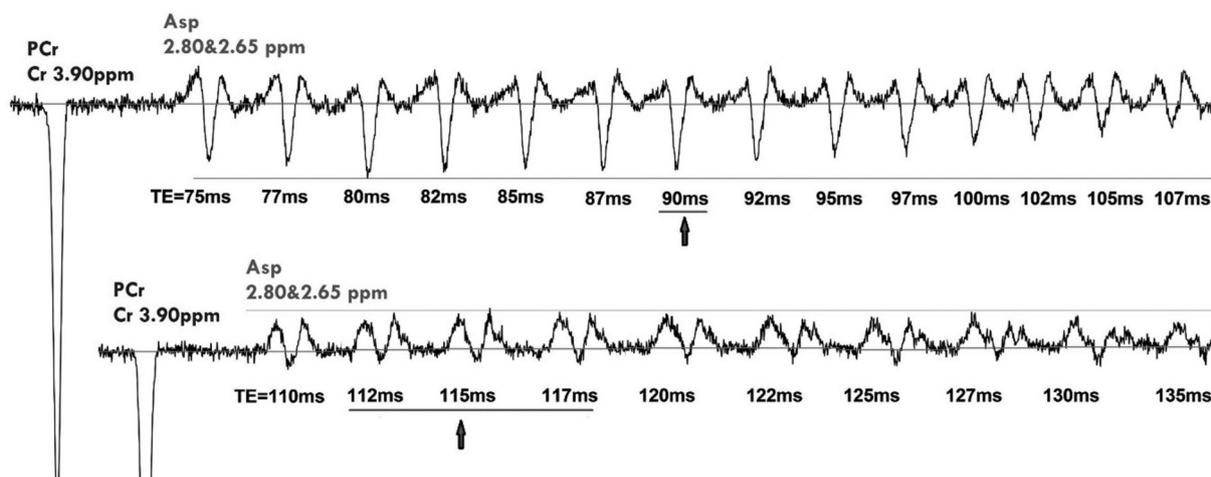


Рис. 3: Результат моделирования сигналов Asp с $\delta = 2.65$ ppm и $\delta = 2.80$ в DIFF-серии в зависимости от времени TE. Стрелками обозначены выбранные промежутки оптимального TE.

Обработка спектров. Обработку спектров проводили в программе jMRUi (ver.5.2), предназначенной для количественного анализа данных ЯМР *in vivo* [10]. Использовали алгоритм AMARES [12]. В DIFF спектре оба пика Asp моделировали как гауссианы (фаза 0°) после подбора начального приближения центральной частоты и ширины на

полувысоте этих пиков. Сигналы Cr2 (синглет Cr, $\delta = 3.9$ ppm) и суммарный сигнал Glu и Gln (Glx) с $\delta = 2.13$ ppm моделировали как инвертированные лоренцианы с фазой 180° и 0° , соответственно. Базовая линия вычислялась автоматически [12]. По полученным значениям амплитуд рассчитывали отношения Asp/Cr2 и Glx/Cr2.

Результаты и обсуждение. Результат моделирования сигналов Asp $C_{\beta 1}$ ($\delta = 2.65$ ppm) и $C_{\beta 2}$ ($\delta = 2.80$ ppm) и сигналов Cr и PCr в DIFF серии в зависимости от TE показан на рис. 3. Согласно результатам моделирования были выбраны $TE = 90$ мс и промежуток от 112 до 117 мс. Времена TE менее 90 мс не обеспечивают достаточную селективность ЧСИ (длительность 25 мс, $FWHM \sim 25$ Гц (или 0.2 ppm)), и как следствие моделированный сигнал NAA ($\delta = 2.70$ ppm) перекрывает в DIFF серии сигналы Asp.

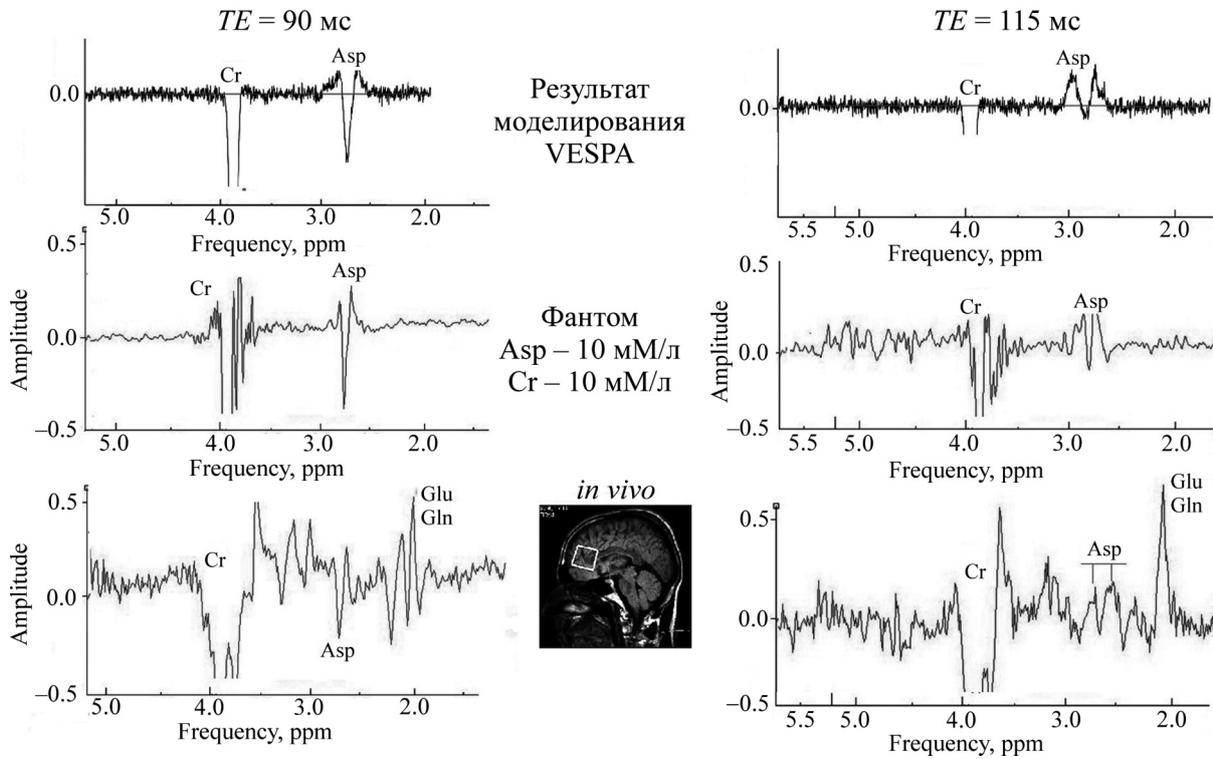


Рис. 4: Результат моделирования сигналов Asp с $\delta = 2.65$ ppm и $\delta = 2.80$ в DIFF серии для $TE = 115$ и 90 мс и соответствующие экспериментальные спектры MEGA-PRESS на фантоме и *in vivo* с $TE = 115$ и 90 мс.

На рис. 4 представлены результаты моделирования сигнала Asp для DIFF серии, экспериментальные данные, полученные на фантоме, и *in vivo* данные, полученные на волонтере, для времен $TE = 115$ мс и $TE = 90$ мс. Для обоих времен TE сигнал Asp в экспериментально полученных спектрах соответствует ранее предложенной модели,

что свидетельствует о правильности подобранных параметров и возможности их использования для расчета [Asp]. Рассчитанные значения Asp/Cr2 и Glx/Cr2 с указанием абсолютной ошибки аппроксимации ($jMrui$) для *in vivo* спектров представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

№ волонтера	Asp/Cr2	Δ (Asp/Cr2)	GLX/Cr2	Δ (GLX/Cr2)
1	0.089	0.010	0.31	0.04
2	0.111	0.012	0.33	0.05
3	0.095	0.011	0.29	0.03

Проведенный глубокий анализ влияния ЧСИ на спиновые системы метаболитов в полученных нами DIFF сериях 1H МРС спектров с $TE = 90$ мс и 115 мс показал: 1) оба сигнала Asp в DIFF спектрах не перекрываются сигналами других метаболитов; 2) в спектре также представлены неперекрывающиеся пики – Cr2, $\delta = 3.90$ ppm, и интенсивный пик Glx, $\delta = 2.13$ ppm. Последний хорошо отражает концентрацию Glu, выполняющего, наряду с Asp, роль основного возбуждающего нейромедиатора в ЦНС человека. Следовательно, использование обеих методик позволяет определять концентрации Asp, однако методически более эффективно оказывается использование $TE = 115$ мс, так как: 1) большая селективность ЧСИ обнаруживает меньшее количество сигналов в DIFF спектре, что облегчает количественную обработку; 2) количественная обработка сигнала Glu оказывается более простой и эффективной для данного TE и как следствие расширяет исследовательские возможности данного метода.

Ряд церебральных метаболитов, наблюдаемых 1H МРС при использовании разрешенных в медицине напряженностей постоянного магнитного поля (≤ 3 Тл), достаточно мал (порядка 10), и расширение этого ряда даже на одно вещество является крупным достижением и открывает широкие возможности для фундаментальных исследований мозга и новые перспективы для прикладной медицины. Основная ценность измерения прижизненных концентраций веществ, участвующих в известных метаболических процессах, заключается в возможности подойти к исследованию важнейшей проблемы связи метаболизма и функции. Цели и задачи исследования функции Asp как нейромедиатора были отмечены ранее. Как метаболит, Asp является основным исходным веществом в синтезе нейронального маркера *N*-ацетил аспартата (НАА), который образуется в митохондриях нейронов посредством ацетилирования Asp ацетилкоэнзимом (acetylCoA) в присутствии фермента *N*-ацетилтрансферазы (NAT) [13]. Измерения [НАА] доступны с помощью традиционных ИП PRESS и STEAM. Несмотря на большое количество

опубликованных работ по определению [NAA] в норме и различных патологических состояниях, механизмы изменений [NAA] остаются неизвестными. Измерения Asp с помощью предложенной методики помогут разрешить эту проблему. Благодаря разработке методики измерения [Asp] в случае одновременного измерения Asp, NAA, Glu и NAAG впервые становится возможным *in vivo* проследить самую длинную цепочку биохимических превращений.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] D. McRobbie, E. Moore, M. Graves and M. Graves, *From Picture to Proton* (Cambridge University Press, United Kingdom, 2006).
- [2] P. Barker, A. Bizzi, N. Stefano, et al., *Clinical MR Spectroscopy* (Cambridge University Press, United Kingdom, 2009).
- [3] M. Mescher, H. Merkle, et al., *NMR Biomed.* **11**, 266 (1998).
- [4] M. Levitt, *Spin Dynamics. Basics of Nuclear Magnetic Resonance* (The University of Southampton, United Kingdom, 2008).
- [5] P. Mullins, D. McGonigle, et al., *Neuroimage* **86**, 43 (2013).
- [6] R. Edden, M. Pomper, et al., *Magn. Res. Med.* **57**, 977 (2007).
- [7] M. Terpstra, P. Henry, et al., *Magn. Res. Med.* **50**, 19 (2003).
- [8] V. Govndaraju, K. Young, et al., *NMR Biomed.* **13**, 129 (2000).
- [9] A. Marsman, C. Reno, et al., *Neuroimage: Clinical* **6**, 398 (2014).
- [10] D. Stefan, O. Strabak, et al., *Meas. Sci. Technol.* **20**, 1 (2009).
- [11] L. Vanhamme, S. Huffel, et al., *J. Magn. Reson.* **129**, 35 (1997).
- [12] П. Е. Меньшиков, Н. А. Семенова и др., *Известия Академии Наук. Серия химическая*, **9**, 2238 (2015).
- [13] M. Baslow and D. Guilfoyle, *N-acetylaspartate: a Unique Neuronal Molecule in the Central Nervous System* (Springer Science, New York, 2006).

Поступила в редакцию 28 июня 2016 г.

По материалам V Международной молодежной научной школы-конференции “Современные проблемы физики и технологий”.