

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

БАКЛАВРСКАЯ РАБОТА

**«Исследование влияния легкой черепно-мозговой травмы на концентрации
важнейших церебральных метаболитов и кислотность внутриклеточной
среды методами МР-спектроскопии»**

Выполнил студент
440 группы
Буланов Петр Алексеевич

Научный руководитель:
д. б. н.
Семенова Наталия Александровна

Допущена к защите

Зав. кафедрой _____

Москва

2021

Оглавление

1. Введение.....	2
2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и метод МР-спектроскопии	3
2.1. Общая схема ЯМР.....	3
2.2. Резонанс отдельного ядра во внешнем поле	4
2.3. Резонанс макроскопической намагниченности	5
2.4. Релаксационные эффекты.....	7
2.5. Спектроскопия.....	8
2.5.1. Химический сдвиг	10
2.5.2. Спин-спиновое взаимодействие.	11
3. Локализационные методики в МРТ и спектроскопии. Построение изображений.....	13
3.1. Срез-кодирующий градиент – G_z	13
3.2. Фазокодирующий градиент – G_y	15
3.3. Частотно-кодирующий градиент – G_x	16
3.4. Математическое представление процесса кодирования. К-пространство.	17
4. Последовательности, используемые в МР-спектроскопии.....	19
4.1. Последовательность PRESS – Point-RESolved Spectroscopy	19
4.2. Последовательность TE-averaged PRESS.....	21
4.3. Последовательность MEGA-PRESS	22
5. Определение pH методами ^1H МРС	25
5.1. Актуальность определения pH	25
5.2. Определение pH методами $^3\text{1P}$ –МРС.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.3. Определение pH методами ^1H –МРС	26
6. Цель и задачи исследования	30
7. Материалы и методы.....	30
7.1. Протокол МР-сканирования.....	31
7.2. Предварительная обработка	32
7.3. Количественная обработка	33
7.4. Статистическая обработка	34
8. Результаты.....	34
8.1. Результаты PRESS и TE-averaged PRESS	36
8.2. Результаты MEGA-PRESS	Ошибка! Закладка не определена.
8.3. Результаты измерения pH.....	38
9. Обсуждение.....	40
10. Заключение	44
11. Список литературы.....	45

1. Введение

Магнитно-резонансная томография (МРТ) на сегодняшний день является одним из наиболее актуальных, качественных и обсуждаемых методов визуализации органов и тканей. В основе используемых в МРТ физических процессов, лежит явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Стоит отметить, что наиболее распространенное применение МРТ – получение изображений - не исчерпывает всего спектра задач, которые могут быть решены с помощью МР-томографа. Данная работа посвящена магнитно-резонансной спектроскопии (МРС), которая предшествовала появлению МРТ и использовалась для изучения химической структуры молекул. В настоящее время на современных томографах широкое распространение получила МРС мозга, с помощью которой возможно изучение процессов возбуждения и торможения в центральной нервной системе человека (ЦНС), изменения концентраций важнейших церебральных метаболитов, активации и ингибирования различных метаболических путей и даже неинвазивного измерения кислотности (pH) внутриклеточной среды. Все это недоступно для обычной МР-томографии, что делает МРС незаменимым инструментом в изучении биохимических процессов *in vivo* в ЦНС человека.

В настоящем исследовании проводилось комплексное и разностороннее изучение мозга больных в остром состоянии после сотрясения (легкой черепно-мозговой травмы (лЧМТ)), методами МРС. В первую очередь, была проведена проверка на изменение концентраций важнейших церебральных метаболитов, доступных для изучения методами МРС [1]: N-ацеталаспартат + N-ацетиласпаргилглутамат (NAA + NAAG), холин содержащие соединения (Cho), креатин+креатинфосфат (Cr), миоинозитол (mI), глутамат + глутамин (Glx), отдельно глутамат (Glu) и глутамин (Gln), гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). С изменениями концентраций различных метаболитов и нейромедиаторов связаны такие заболевания, как: атаксия, припадки, торможение развития, гипотония, чрезмерный рост, спастическая параплегия, задержка умственного развития и т.д.

Также проводилось измерение значений pH внутриклеточной среды. Значения pH могут значительно влиять на метаболизм клеток за счет активации и ингибирования различных ферментов [2]. Стоит отметить, что использование протонной МРС для измерения pH является наиболее актуальным на данный момент, так как не требует особых технических требований, в отличие от фосфатной МРС.

Актуальность данного исследования обусловлена тем, что при сотрясении мозга не обнаруживаются видимых изменений на стандартной МР-томографии или компьютерной

томографии (КТ). Однако, нередко в результате сотрясения мозга возникают такие долгосрочные последствия, как: головные боли, потеря внимания, проблемы со сном, повышенная раздражительность и утомляемость и т.д. [3] Таким образом, МРС является единственной методикой, позволяющих определить те биохимические изменения, которые могут приводить к перечисленным последствиям.

2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и метод МР-спектроскопии

2.1. Общая схема ЯМР

Физические основы ЯМР определяют магнитные свойства ядер и их взаимодействие с внешним магнитным полем. Как известно, нуклоны обладают *спином* $\pm\frac{1}{2}$, таким образом, ядро, состоящее из нуклонов, обладает *собственным магнитным моментом* μ , равным сумме не скомпенсированных спинов протонов и нейтронов. Следовательно, магнитным моментом обладают все ядра кроме четно-четных. Как известно, во внешнем магнитном поле B_0 уровни энергии такого ядра расщепляются на $\Delta E = 2\mu_z B_0$. При этом ширина расщепления будет зависеть от химического окружения данного ядра. Таким образом, воздействуя на них электромагнитным излучением с частотой, соответствующей разности энергетических уровней и регистрируя поглощение энергии, можно получить информацию о локальном окружении данного ядра, т.е. химическом строении исследуемого вещества. В этом и заключается суть данного метода. Основным ядром, используемым в МРС и МРТ является водород. Он выбран по нескольким причинам: его много в органических соединениях, в человеческом теле, в воде. И, кроме того, он обладает большим *гиромагнитным отношением*, роль которого будет продемонстрирована ниже.

Изотоп	Обозначение	Спин	Гиромагнитное отношение (МГц/Т)	Распространенность в природе, %
Водород	H^1	1/2	42.6	99.985
Углерод	C^{13}	1/2	10.7	1.107
Кислород	O^{17}	5/2	5.8	0.037
Фтор	F^{19}	1/2	40.0	100
Натрий	Na^{23}	3/2	11.3	100
Магний	Mg^{25}	5/2	2.6	10

Фосфор	P^{31}	1/2	17.2	100
Сера	S^{33}	3/2	3.3	0.75
Железо	Fe^{57}	1/2	1.4	2.2

Таблица 1. Целевые для ЯМР вещества и их характеристики [1]

2.2. Резонанс отдельного ядра во внешнем поле

Получим подробную математическую и физическую основу вышеизложенных процессов.

Рассмотрим протон во внешнем магнитном поле в модели магнитного диполя. Частота, с которой будет прецессировать вектор магнитного момента протона μ во внешнем поле B_0 , является *частотой Лармора* (рис.1.а):

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

здесь γ – гиромагнитный множитель.

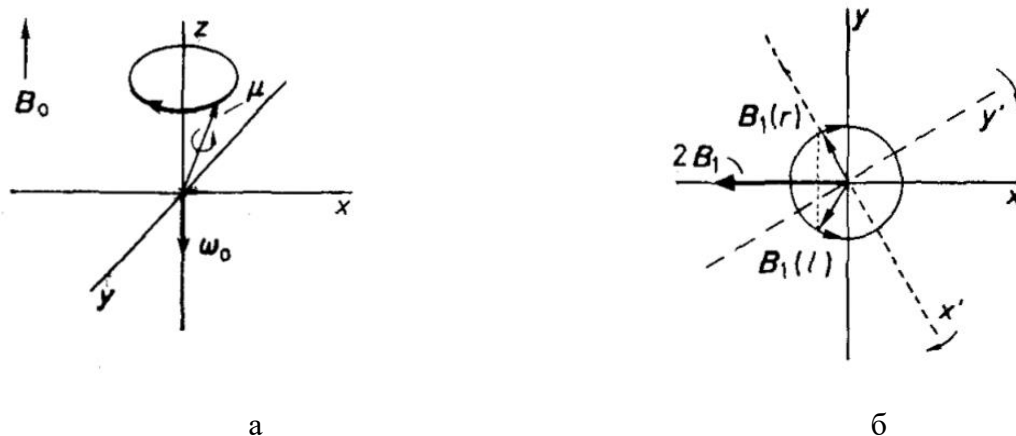


Рис.1. а) прецессия вектора μ вокруг вектора B_0 , б) разложение переменного вектора магнитной индукции с амплитудой $2B_1$ на два вектора, вращающихся в противоположных направлениях в плоскости x-y [4].

Добавим в рассматриваемую систему электромагнитное излучение с частотой ω , поляризованное вдоль оси x (рис.1.б), с амплитудой магнитной индукции, равной $2B_1$. Этот переменный вектор можно разложить на два, вращающихся в противоположных

направлениях, при этом одним из них можно пренебречь при взаимодействии с μ во вращающейся системе отсчета (рис.2.а).

Получим значение для *эффективного вектора магнитной индукции* (рис.2.б) во вращающейся с частотой ω системе отсчета, в которой B_1 неподвижен вдоль x' :

$$B_{eff} = B_0 + \frac{\omega}{\gamma} + B_1 = B_0(1 - \frac{\omega}{\omega_0}) + B_1$$

Таким образом, при $\omega = \omega_0$, $B_{eff} = B_1$ и вектор μ будет прецессировать вокруг направления B_1 (рис.2.в).

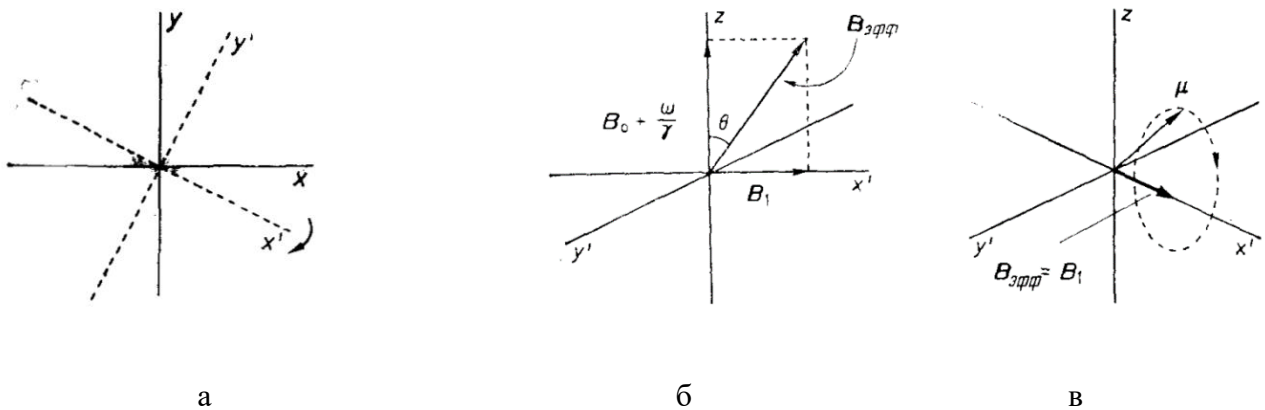


Рис.2. а) Вращающаяся система отсчета, б) эффективный вектор магнитной индукции во вращающейся системе отсчета, в) прецессия вектора μ вокруг вектора B_1 [4]

Наблюдается явление *резонанса*, причем инверсия вектора μ соответствует возбужденному состоянию протона.

2.3. Резонанс макроскопической намагниченности

Рассмотрим взаимодействие с внешним полем суммарной намагниченности, возникающей в следствие *распределения Больцмана* протонов по энергиям так, что $N_1 > N_2$, где N_1 – количество протонов с минимальным уровнем энергии, т.е со спином параллельным B_0 , и N_2 – количество протонов в возбужденном состоянии, т.е. антипараллельных B_0 .

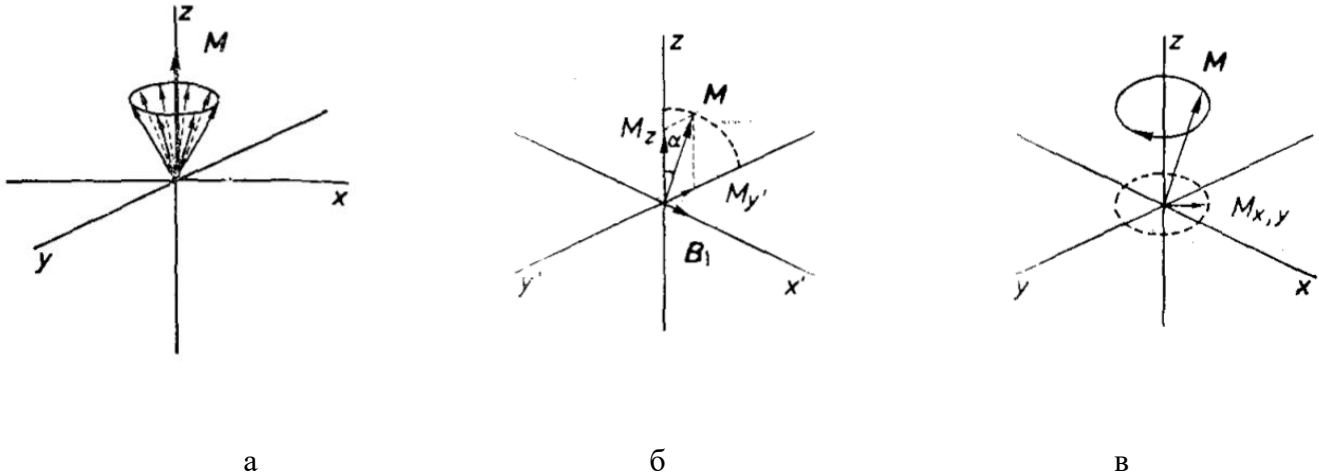


Рис.3. а) суммарная намагниченность, распределенная по конусу прецессии, б) вывод из равновесия M_z под действием B_1 – появление поперечной намагниченности $M_{y'}$, в) прецессия вектора M вокруг оси z [4]

Т.к. все частичные μ_i направлены произвольно вдоль конуса прецессии (рис.3.а), по причине того, что имеют различную фазу вращения, то суммарная намагниченность имеет компоненту только в направлении z M_z и имеет нулевую компоненту в плоскости x - y . При добавлении поля B_1 , направленного вдоль x' возникает поперечная намагниченность по оси y' (т.к. $\frac{dM}{dt} = [-\gamma B_1 \times M_z]$) (рис3.б). Таким образом, вектор M начинает прецессировать вокруг оси z , а значит и его компонента в плоскости x - y также начинает вращаться (рис.3.в) и ее можно зарегистрировать с помощью приемной катушки, т.к. ток в катушке согласно закону Фарадея будет пропорционален $\frac{dM_y}{dt}$.

Стоит отметить, что в результате того, что не все атомы имеют одну Лармову частоту, вектор M будет прецессировать вокруг z во вращающейся системе отсчета и компонента в плоскости x - y будет смешанной M_{xy} .

2.4. Релаксационные эффекты

Релаксация суммарной намагниченности происходит в продольном и поперечном направлениях. В продольном z направлении изменение вектора M_z описывается уравнением: $\frac{dM_z}{dt} = (M_0 - M_z)/T_1$. В данном случае происходит обмен энергией спиновой системы с окружающим ее веществом – решетки, поэтому такая релаксация называется *спин-решеточной*, а время T_1 – *временем продольной (спин-решеточной) релаксации* (рис.4.а).

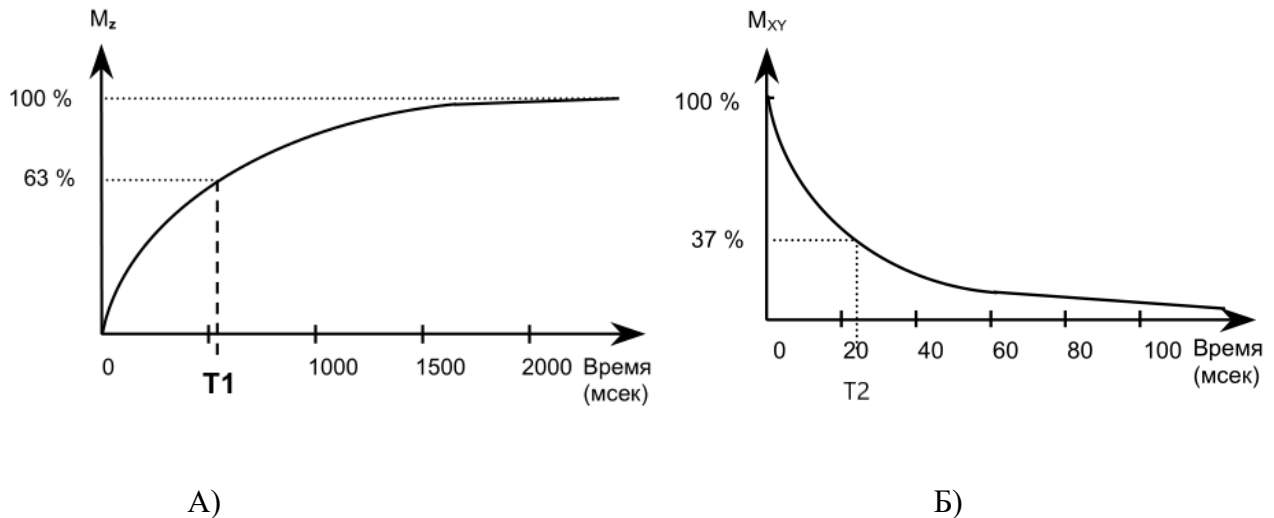


Рис.4. а) Кривая продольной(спин-решеточной), б) кривая поперечной (спин-спиновой) релаксации. (для различных тканей кривые имеют различный вид)[5]

Стоит отметить, что время T_1 различно для различных ядер в зависимости от их окружения – сильнее связанные ядра имеют более короткую спин-решеточную релаксацию.

Кроме продольной, существует *поперечная релаксация*. Поперечная компонента M_{xy} является макроскопической суммой магнитных индукций ядер, вращающихся с одной частотой и равной фазой. Но вследствие разницы в локальных полях (T_2^*) и спин-спинового взаимодействия(T_2), Ларморовы частоты для отдельных ядер будут различаться, вследствие чего вектора будут расходиться по фазе и суммарный вектор M_{xy} будет уменьшаться и значит сигнал на приемной катушке, зависящий от его модуля, также будет уменьшаться. Таким образом данный тип релаксации зависит от спин-спинового взаимодействия и потому называется *спин-спиновой релаксацией*. Для нее также можно ввести характерное время T_2 – *время спин-спиновой (поперечной) релаксации* (рис.4.б). Важным замечанием является то, что данные два типа релаксации никаким образом не связаны друг с другом и характеризуют

различные физические процессы, при этом, как правило, время спин-спиновой релаксации T_2 гораздо короче спин-решеточной T_1 .

Таким образом, сигнал на приемной катушке, ориентированной плоскости x-y так, что она улавливает сигнал от поперечной компоненты намагниченности будет иметь характер затухания – *спад свободной индукции* (рис.5). (ориентация катушки вдоль оси z приведет к тому, что сигнал от большого по величине поля B_0 подавит слабый сигнал в радио частотном диапазоне, который необходимо зарегистрировать).

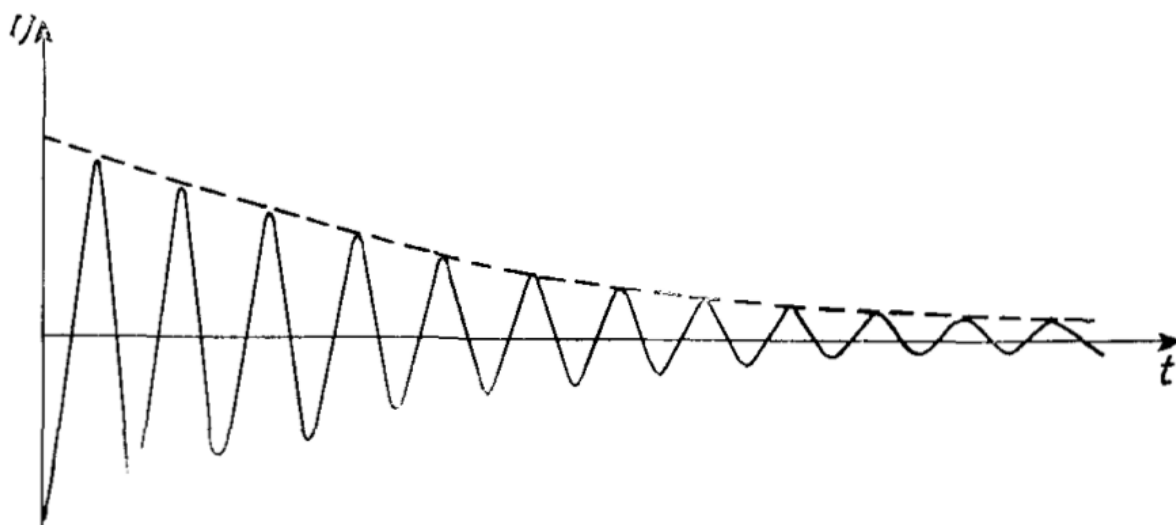


Рис.5. Сигнал на приемной катушке - спад свободной индукции. (Free induction decay (FID)) [4]

2.5. Спектроскопия

Теперь, рассмотрев то, как происходит резонанс магнитных моментов ядер во внешнем поле при определенной частоте излучения и как данное явление регистрируется, можно обратиться к вопросу о применении данной методики для исследования структуры веществ в которых содержатся целевые ядра.

Как было отмечено ранее, частота Лармора, с которой прецессируют магнитные моменты ядер, является их резонансной частотой и зависит от локального поля в области его расположения и химического окружения. Поэтому, зондируя образец в постоянном магнитном поле электромагнитным излучением с разверткой по частоте можно получить спектр резонанса различных протонов в соединении. Типичный спектр вещества, состоящего из сложных молекул представлен на рис.6.

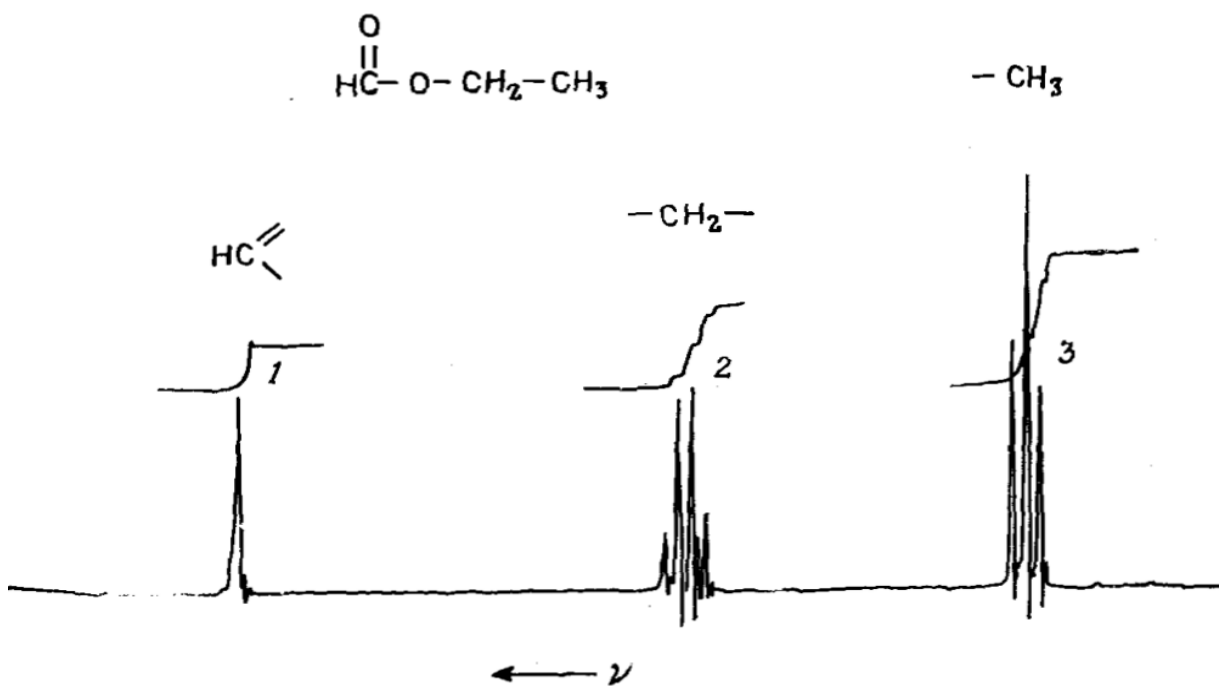


Рис.6. Типичный спектр протонного ЯМР этилформиата[6]

Как видно из приведенного спектра, различным протонам в соединении отвечают различные пики. Различия в общем можно разделить на два типа: разница частот для разных протонов, определяемая *химическим сдвигом* и мультиплетность пика, определяемая *спиновым взаимодействием*. При этом площадь под каждым пиком характеризует количество протонов данного типа. Отдельно отметим частотный диапазон ЯМР – радиоволновый. Остановимся подробнее на каждом из наблюдаемых эффектов.

2.5.1. Химический сдвиг

Пики на спектре разделены химическим сдвигом, который характеризует изменение локального поля в области нахождения ядра. В простейшем приближении данный эффект можно описать возникновением токов в электронном облаке, окружающем ядро, причем таких, которые будут уменьшать внешнее магнитное поле – экранировать ядро: $B_{\text{лок}} = B_0(1 - \sigma)$, где σ – константа экранирования (рис.7).

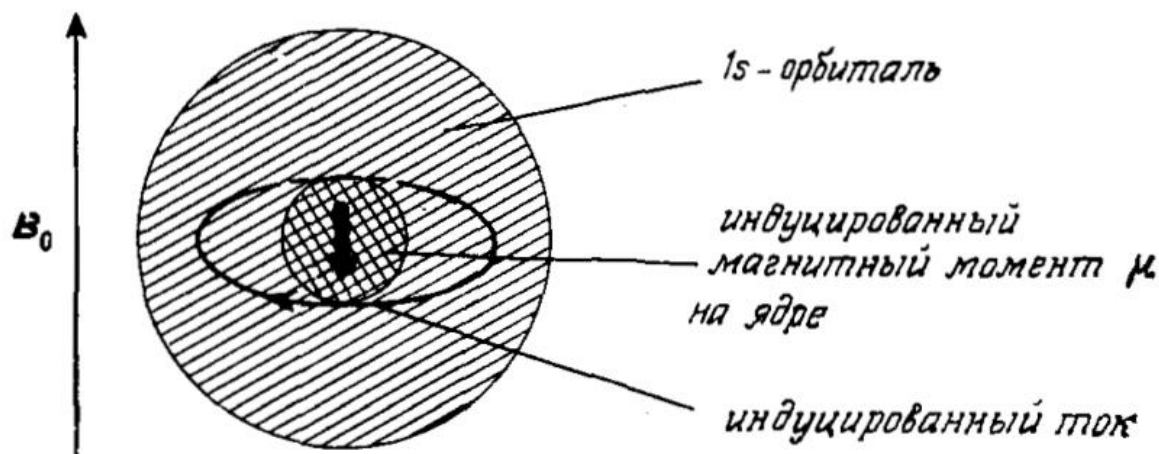


Рис.7. Экранирование ядра индуцированными токами[6]

В молекулах ситуация усложняется: приходится учитывать перераспределение электронного облака и экранирование от других атомов в молекуле. Как правило, искажение сферической орбитали ведет к уменьшению вклада индуцированного поля и создает парамагнитную составляющую $\sigma_{\text{пара}}^{\text{лок}}$, добавляющуюся к рассмотренному диамагнитному эффекту $\sigma_{\text{диа}}^{\text{лок}}$. Вклад в экранирование от других атомов можно учесть как добавку σ' .

$$\sigma = \sigma_{\text{диа}}^{\text{лок}} + \sigma_{\text{пара}}^{\text{лок}} + \sigma'$$

Таким образом, например, в ряде галогеноводородов в результате уменьшения плотности электронного облака 1s орбитали водорода происходит эффект дезэкранирования, причем константа экранирования закономерно падает с уменьшением электроотрицательности в ряде: $HF < HCl < HBr < HI$.

Кроме электроотрицательности связанных с водородом атомов большую роль играют и другие соседние атомы, которые вносят вклад в экранирование, форма орбиталей, кратность связи и другие многочисленные факторы.

2.5.2. Спин-спиновое взаимодействие.

Расщепление резонансной линии на *мультиплет* обусловлено *спин-спиновым взаимодействием* J , которое возникает в результате магнитного взаимодействия между двумя протонами посредством электронного облака химической связи (рис.8). Магнитный момент ядра А вызывает поляризацию электронного облака, которое, в свою очередь, экранирует ядро Х, в зависимости от спина ядра А. Таким образом меняется локальное поле ядра Х и, соответственно, резонансная частота.

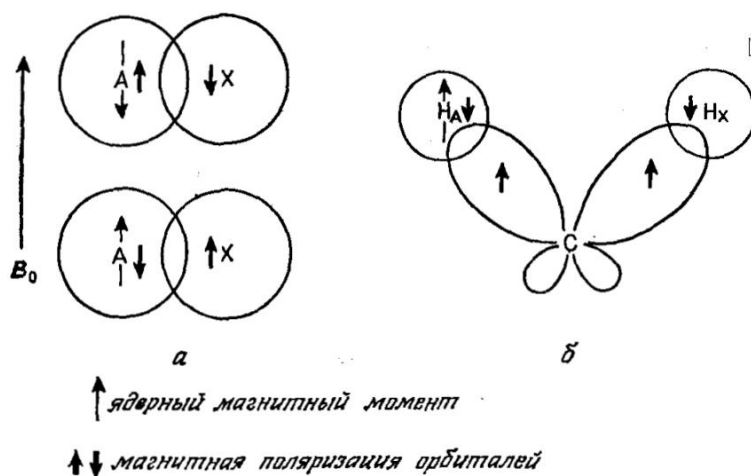


Рис.8. Спин-спиновое взаимодействие ядер, а) орбитали имеют различные центры, по правилу Паули поляризованы противоположно б) вырожденные орбитали, поляризованные одинаково [6]

Энергия спин-спинового взаимодействия не зависит от внешнего поля, поэтому ее можно отличить от химического сдвига проводя эксперимент на различных напряжённостях внешнего поля – энергия спин-спинового взаимодействия не изменится в отличии от химического сдвига.

Таким образом, энергию спин-спинового взаимодействия можно представить как $E = J_{AX}S_A S_X$, где J_{AX} – скалярный коэффициент спин-спинового взаимодействия для ядер АХ, S_A, S_X – соответствующие спины ядер.

Рассмотрим количественное описание спин-спиновго взаимодействия на примере двух-ядерной системы (рис.9). Собственные значения такой системы легко рассчитать исходя из очевидной формулы:

$$E(\Gamma_{ц}) = \sum_i \nu_i m_i + \sum_{i,j(i<j)} J_{ij} m_i m_j$$

- 1) $E_1 = \frac{1}{2}\nu_A + \frac{1}{2}\nu_X + \frac{1}{4}J_{AX}$
- 2) $E_2 = \frac{1}{2}\nu_A - \frac{1}{2}\nu_X - \frac{1}{4}J_{AX}$
- 3) $E_3 = -\frac{1}{2}\nu_A + \frac{1}{2}\nu_X - \frac{1}{4}J_{AX}$
- 4) $E_4 = -\frac{1}{2}\nu_A - \frac{1}{2}\nu_X + \frac{1}{4}J_{AX}$

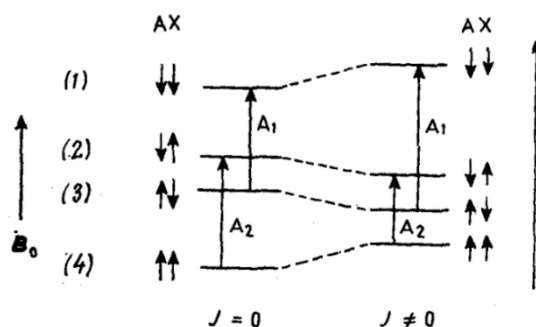
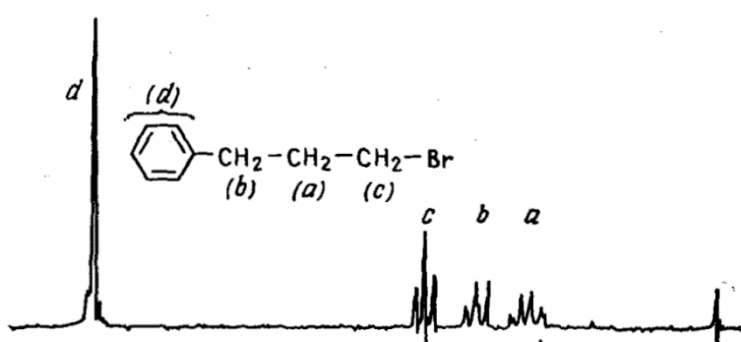


Рис.9. Эффект спин-спиновго взаимодействия [6]

$$(J_{AX} = 0 \rightarrow A_1 = A_2; J_{AX} \neq 0 \rightarrow A_1 > A_2)$$

Мультиплетность пика определяется как $n + 1$, где n – количество ядер в соседнем соединении (рис.10.а). Величина спин-спиновго взаимодействия уменьшается при увеличении числа связей, пока не станет порядка ширины линии и не сольется в один пик. Относительную высоту пиков в мультиплете можно определить, опираясь на *треугольник Паскаля* (рис.10.б)



$n=0$									
1			1	1					
2			1	2	1				
3			1	3	3	1			
4			1	4	6	4	1		
5			1	5	10	10	5	1	
6			1	6	15	20	15	6	1

Треугольник Паскаля

а

б

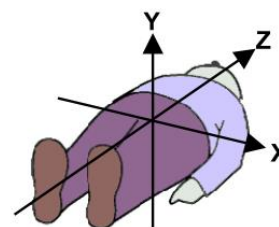
Рис.10. а) Пример спин-спиновго расщепления в спектре элемента алкильной группы, б) треугольник паскаля, определяющий относительные амплитуды пиков мультиплета [6]

Величина J сильно зависит от стереохимии молекулы, т.е. от пути передачи взаимодействия, от конформационных равновесий, наличия гетероатомов и т.д.

3. Локализационные методики в МРТ и спектроскопии. Построение изображений.

До этого момента обсуждался лишь резонанс и сигнал ядер образца, которые провзаимодействовали с радиочастотным электромагнитным излучением. Если говорить о реальном физическом образце в томографе, то сигнал в регистрирующей (приемной) катушке будет приходить от всех частей образца, так как прицелиться радиоизлучением невозможно, ведь длина его волны исчисляется в метрах. Таким образом, в случае человека, сигнал придет как от ног, так и от головы и брюшной полости, это приведет к наложению данных сигналов и смазыванию картинка, полученной при постобработке.

Для разделения областей объекта, участвующих в резонансе, используются градиентные катушки G_z , G_x , G_y , которые кодируют сигнал.



3.1. Срез-кодирующий градиент – G_z

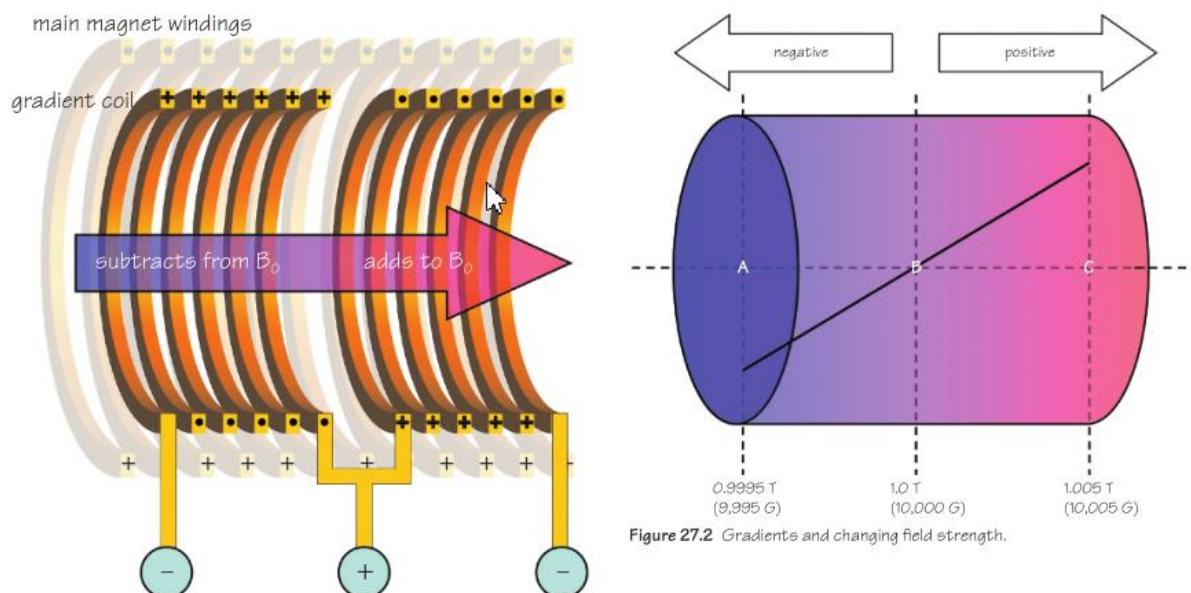


Рис.11. Распределение поля при включение срез-кодирующего градиента – поля вдоль оси z меняется линейно [7].

Суть метода заключается в наложении градиентного магнитного поля поверх основного (рис.11) так, чтобы напряженность поля менялась вдоль оси z – вдоль объекта.

Таким образом, протоны, находящиеся в определенном слое с фиксированным B_i , будут резонировать на соответствующей частоте ω_i и при возбуждение системы РЧ-импульсом определенной частоты, резонанс будет наблюдаться в соответствующем слое. Именно так выделяется определенный срез (рис.12).

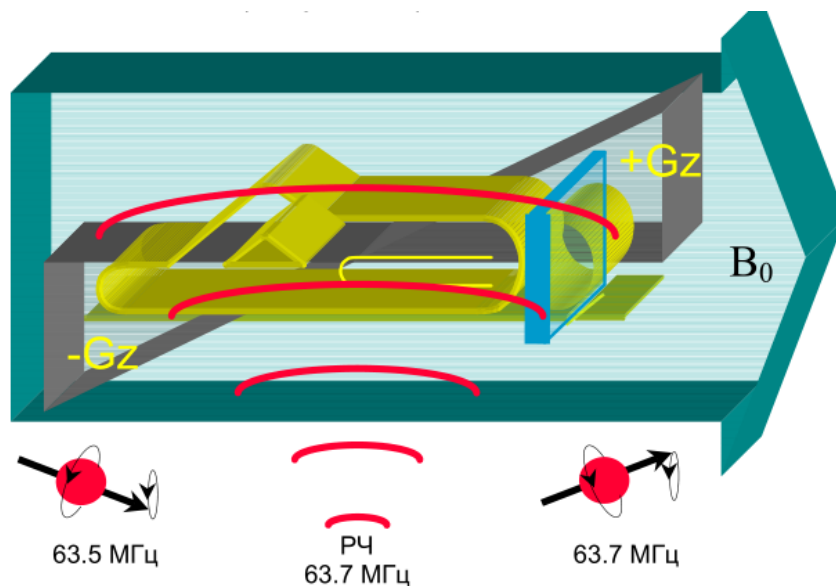


Рис.12. Выделение среза при помощи градиентного поля [5].

Толщина среза определяется крутизной срез-селективного градиента и шириной полосы частот РЧ-импульса (рис.13).

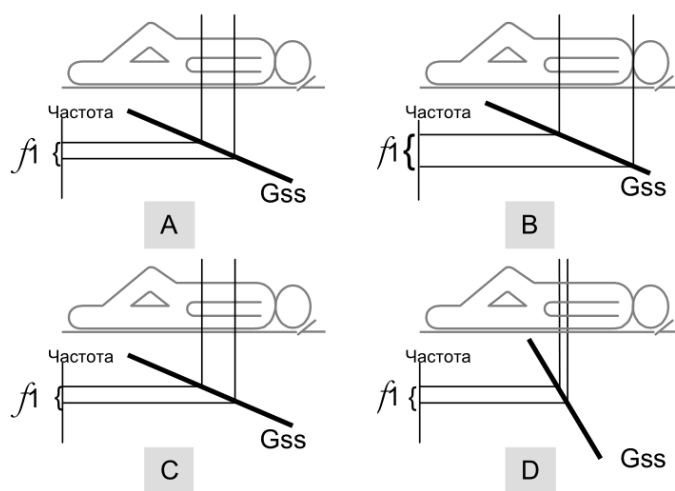


Рис.13. Зависимость толщины среза от крутизны градиента и полосы частот электромагнитного излучения –при постоянной частоте толщина растет с ростом крутизны и при постоянной крутизне толщина растет с ростом ширины полосы частот [5].

3.2. Фазокодирующий градиент – G_y

Срез кодирующий градиент выделяет из всего объекта определенный срез, но этого мало для восстановления изображения объекта, данный срез также необходимо детализировать и разделить на фрагменты. Следующей стадией является фазовое кодирование.

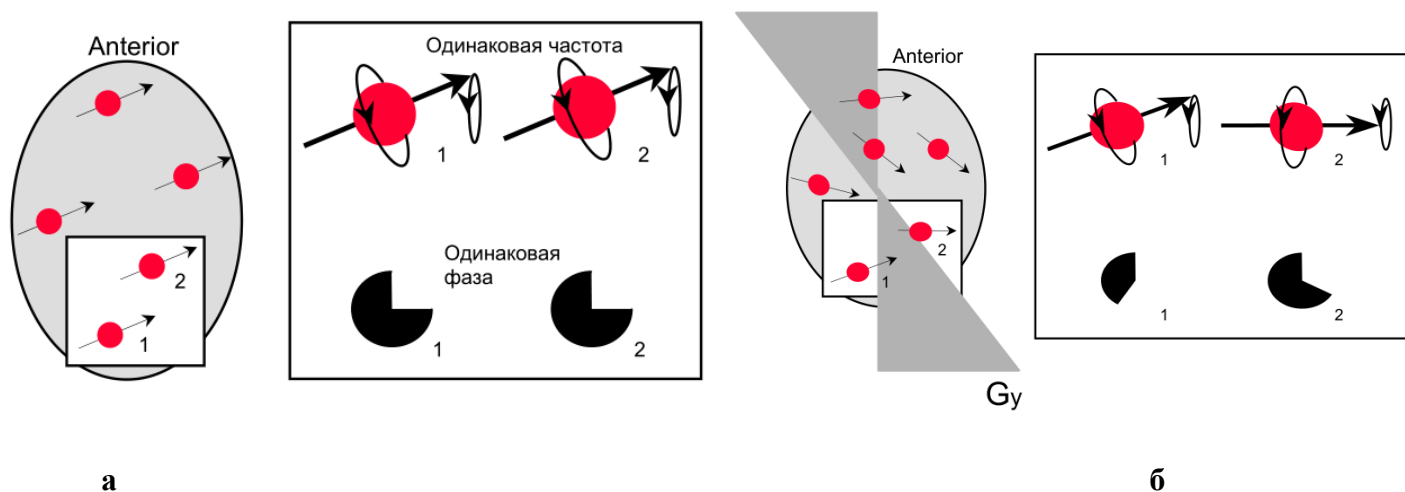


Рис.14. а) срез до фазового кодирования б) после фазового кодирования [5]

Оно заключается во включении на короткое время градиентного поля вдоль оси y (рис.14.б). В результате, в то время, когда катушка G_y будет включена, протоны вдоль оси y будут иметь различные частоты прецессии, таким образом за время действия градиента протоны приобретут различную фазу – чем выше была частота, тем больше набег фазы и наоборот. После выключения градиента G_y протоны вновь будут прецессировать с “одной” (без учета различной химической структуры в срезе, однако вызванные этим изменения локальных полей крайне незначительны по сравнению теми, которые обуславливаются градиентом) частотой, но разной фазой (рис.15). Поэтому получаем отдельный срез, разделенный на горизонтальные (поперек оси y) полосы, которые возможно отличить по параметрам функции колебаний их прецессии и, следовательно, излучения.

Строго говоря, последовательность (см. 3.4) необходимо повторять столько раз, каково разрешение по оси фазового кодирования в k -пространстве, при этом в каждой последующе

итерации менять крутизну фазового градиента (об этом и К-пространстве подробнее см. в пункте 3.5).

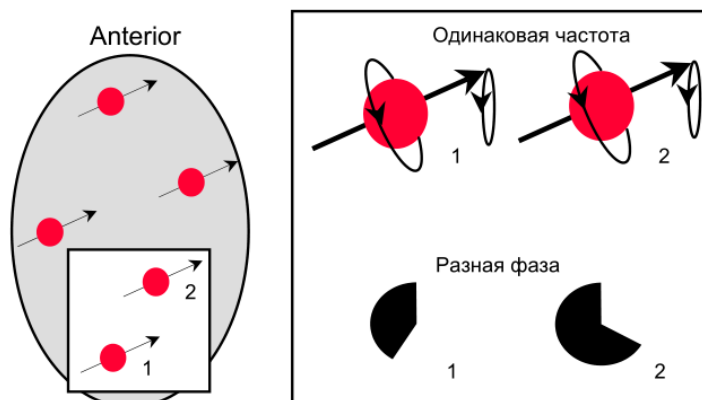


Рис.15. В результате фазового кодирования протоны приобретают различный набег фазы, прецессируя при этом с “одной” частотой [5].

3.3. Частотно-кодирующий градиент – G_x

Заключительным шагом в кодировании сигнала является разделение протонов по частоте в результате включения градиентного поля в направлении оси x (рис.16.а). В конечном результате получаем область, разделенную по параметрам на “кубические” ячейки – *воксели* (рис.16.б). Это, конечно, не означает, что в дальнейшем система описывается только заданными параметрами крутизны частотного фазового и селективного градиентов. Как было сказано выше, фазовый градиент меняется при каждом TR, а значит и распределение по фазам меняется и картинка (рис 16.б) меняется. Однако, в конечном итоге, данное разделение по частотам и фазам помогает привязать полученные данные о гармониках и их амплитудах к координате источника при помощи Фурье-преобразования (см. 3.5, 3.6).

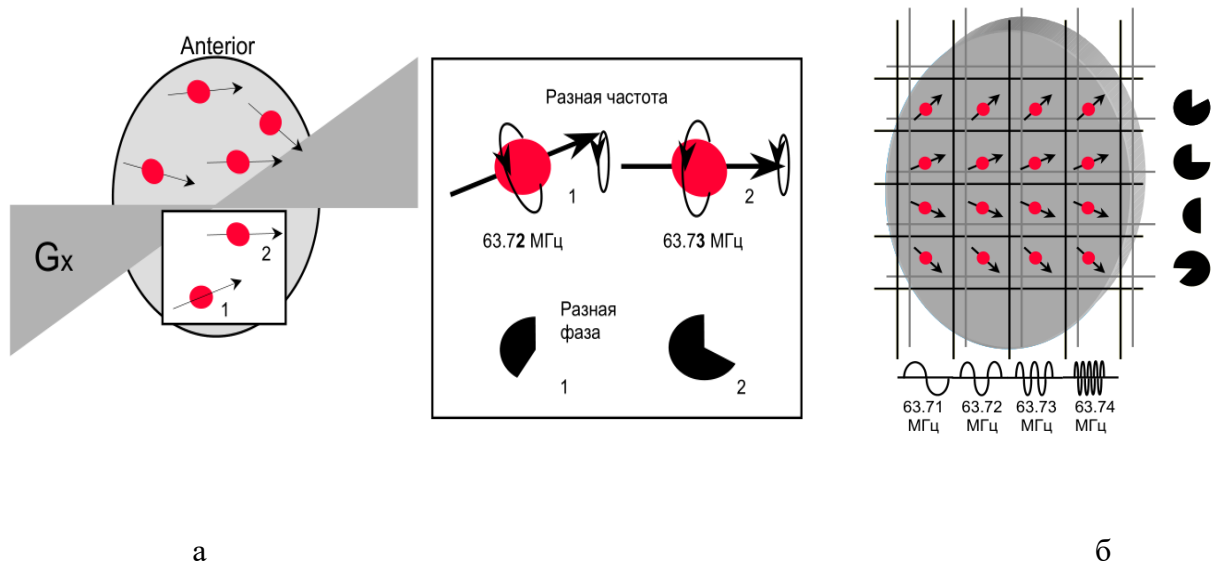


Рис.16. а) Разделение протонов по частоте при включении градиента G_x , б) общий результат кодирования [5]

3.4. Математическое представление процесса кодирования. К-пространство.

1) До частотного и фазового кодирования:

$$S(t) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) e^{-2\pi i f_0 t} dx dy$$

$S(t)$ – сигнал, $h(x, y) e^{-2\pi i f_0 t} \sim M_{xy}(r, t) = M_{xy}(r, 0) e^{-2\pi i f_0 t}$, где $M_{xy}(r, t)$ – намагниченность в плоскости x-y.

2) После частотного кодирования

Поле вдоль оси x: $B_x(r) = \nabla r$. В случае линейного градиента: $B_x(x) = xG_x$.

Тогда частота $f_0 \rightarrow f(x) = \int_0^t w(r, t) d\tau = \gamma \int_0^t G_x(t) x dt = \gamma(B_0 + xG_x)$.

Таким образом сигнал преобразуется к виду:

$$S(t) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) e^{-2\pi i \gamma (B_0 t + x G_x t)} dx dy = e^{-2\pi i \gamma B_0 t} \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) e^{-2\pi i \gamma x G_x t} dx dy$$

3) После фазового кодирования

$\varphi_y(y) = -2\pi \gamma G_y y t$ – добавка к фазе

$$S(t) = e^{-2\pi i \gamma B_0 t} \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) e^{-2\pi i \gamma x G_x t} e^{-2\pi i \gamma y G_y t} dx dy$$

Сделаем замену: $u = \gamma G_x t$; $v = \gamma G_y t$, тогда:

$$H(u, v) = \iint_{-\infty}^{+\infty} h(x, y) e^{-2\pi i u x} e^{-2\pi i v y} dx dy$$

$\{k_x = u = \gamma G_x t; k_y = v = \gamma G_y t\}$ – координаты k-пространства.

Таким образом, сравнивая полученное выражение с формулой из предыдущего пункта, можно заметить, что $h(x, y) \leftrightarrow H(u, v)$ является **двумерным Фурье-преобразованием**.

Получаем типичный двумерный Фурье образ, который можно перевести в изображение обратным Фурье-преобразованием (рис.18).

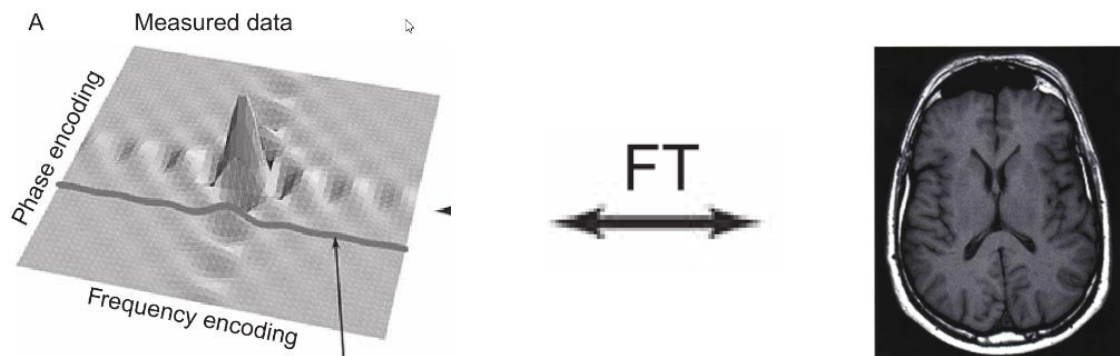


Рис.18. К-пространство как Фурье-образ и изображение как оригинал.

4. Последовательности, использующиеся в МР-спекроскопии.

4.1. Последовательность PRESS – Point-RESolved Spectroscopy

Последовательность PRESS является одной из наиболее распространенных в МРС [8]. Основной принцип, лежащий в основе подобных импульсных последовательностей, состоит в том, чтобы применить три взаимно ортогональных среза-селективных импульса и спроектировать последовательность импульсов так, чтобы собирать эхо-сигнал только из объема в пространстве, где пересекаются все три среза. Последовательность сконструирована таким образом, что сигналы из других областей за пределами желаемого вокселя исключались (обычно с помощью "уничтожающих (spoilers) градиентов") [9].

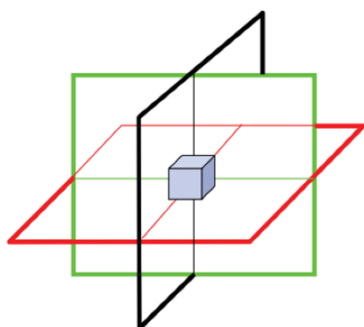


Рис.21. Локализация вокселя.

Таким образом, последовательность PRESS состоит из 90° и двух 180° РЧ импульса. Первый импульс (90°) – возбуждающий, два последующих (180°) – инвертирующие. Кроме срез-селектирующих градиентов, применяются уничтожающие (spoilers) градиенты вокруг 180° РЧ импульсов для подавления нежелательных сигналов за пределами объема интереса. Через время равное TE происходит регистрация сигнала из выбранного вокселя.

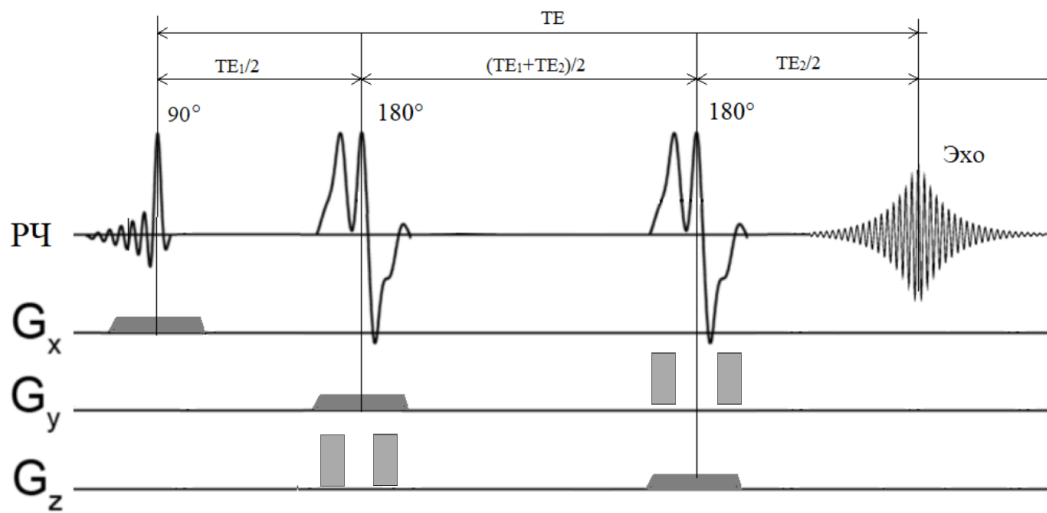


Рис.21. Схема импульсной последовательности PRESS. РЧ – радиочастотные импульсы, G_x, y, z – градиенты магнитного поля, TE – время эха

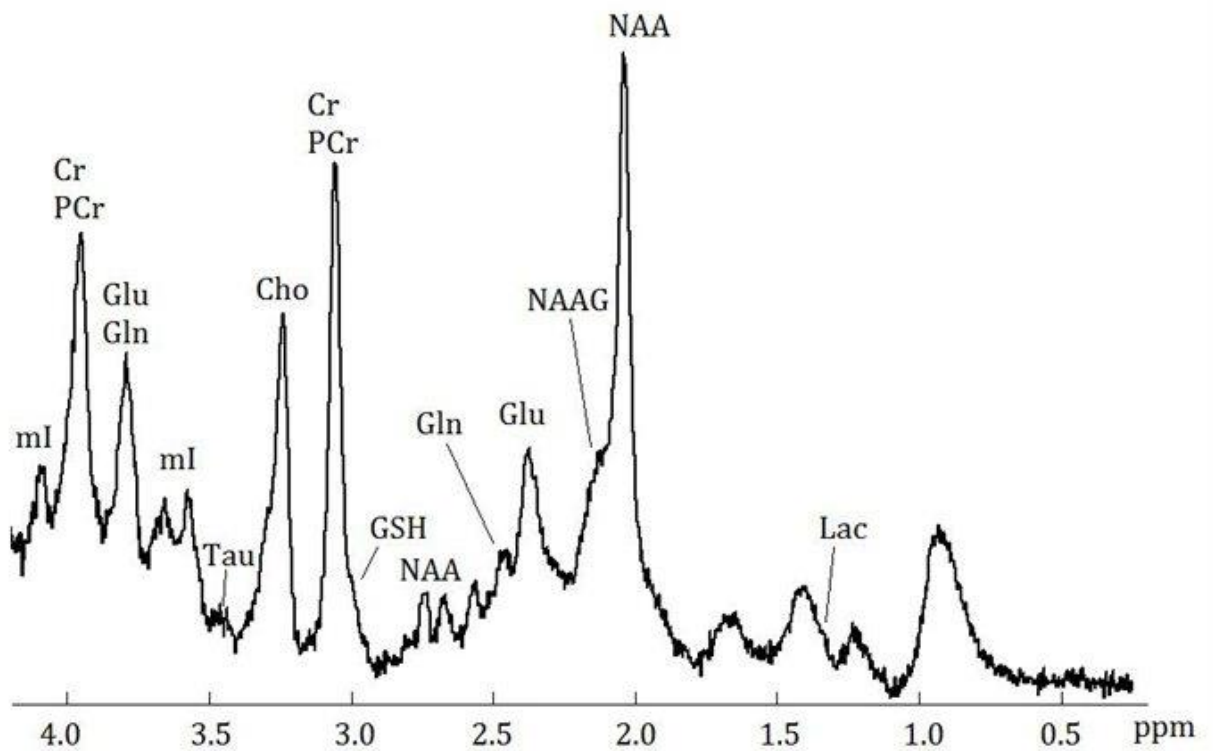


Рис.22. Типичный 1H MR PRESS спектр головного мозга ($B_0 = 3T$) [10]

4.2. Последовательность TE-averaged PRESS

Одной из задач МР-спектроскопии является регистрация скрытых метаболитов, таких как ГАМК (GABA), Глутамат (Glu) и Глутамин (Gln) [11]. Например, в случае PRESS спектров мы получаем вместо отдельных пиков для Glu и Gln их суммарный сигнал Glx, за счет того, что их молекулы очень схожи (рис.23), так как переходят друг в друга при метаболизме: при наличии глюкозы в митохондриях нейронов происходит дезаминирование глутамина до глутамата при помощи фермента глутаминазы.

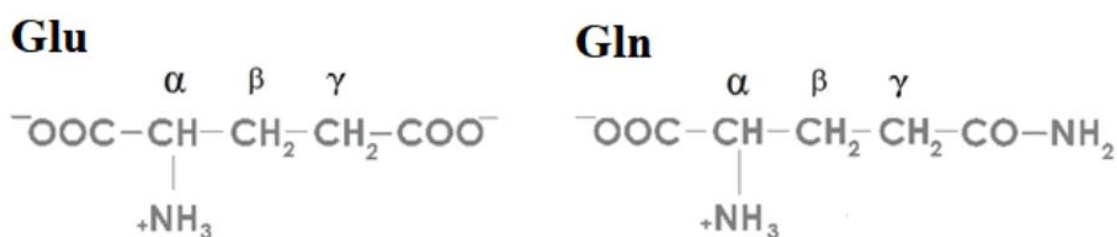


Рис 23. Структурные формулы глутамата и глутамина

Хотя сигнал Glx полезен и несет богатую информацию о нейрональной активности, его оказывается недостаточно для того, чтобы проследить за метаболизмом отдельно Glu и Gln.

Глутамат является одним из основных возбуждающих нейромедиаторов в мозге, изменения в его концентрации могут быть связаны с широким спектром нейродегенеративных заболеваний, таких как, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера и других [12].

По этой причине создаются методы для разделения этих сигналов, одной из которых и является TE averaged PRESS [13]. Главной особенностью данного метода является усреднение PRESS спектров полученных при различных значениях TE, в результате чего сигналы Glu и Gln разделяются по резонансным частотам, что позволяет определять концентрацию конкретно Glu и вследствие Gln (рис.24).

Видно, что на $\delta = 2.35$ м.д. резонансная линия есть только у Glu, т.к. эта линия соответствует γ -протону, окружение которого различно у Glu и Gln. В отличие от α -протонов с линией на $\delta = 3.75$ м.д, для которых химическое окружение одинаково для Glu и Gln. Уровень Gln оценивался как Glx (3,75 ppm) - Glu (2,35 ppm).

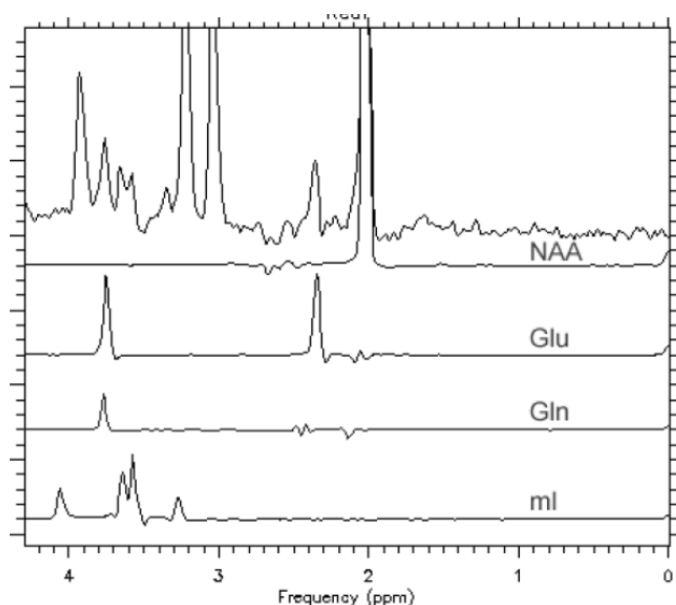


Рис.24. спектр TE-averaged PRESS [13].

4.3. Последовательность MEGA-PRESS

Другой проблемой стандартной МР-спектроскопии является то, что сигналы от протонов всех функциональных групп ГАМК (GABA) перекрываются более интенсивными сигналами других метаболитов. Для получения чистого сигнала ГАМК используется методика MEGA-PRESS [14].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) – аминокислота, которая является основным тормозным нейромедиатором в ЦНС человека [15]. Ее действие тормозит передачу нервных импульсов, что приводит к снижению нервной активности.

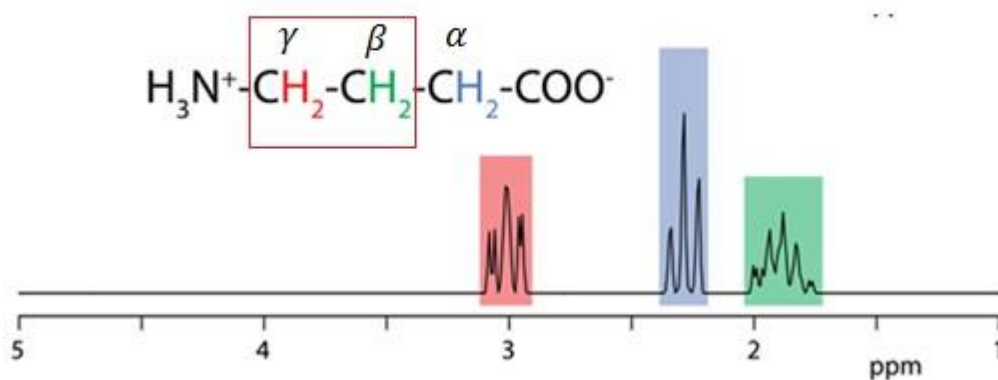


Рис.25. Химическая структура молекулы GABA и сигналы соответствующие его функциональным CH2 группам.

Данная методика позволяет разделить сигнал протонов γ -CH₂ группы ГАМК на $\delta = 3.02$ ppm и более интенсивный сигнал от Сг на $\delta = 3.04$ ppm. Последовательность MEGA PRESS отличается от стандартной последовательности PRESS присутствием двух частотно-селектирующих РЧ импульсов (180°) и градиентов, симметрично окружающих эти РЧ импульсы (рис.26).

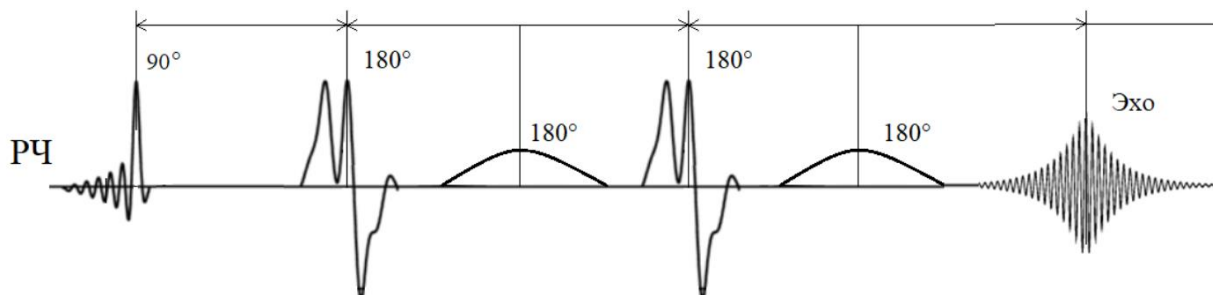


Рис.26. Схема импульсной последовательности MEGA-PRESS.

Для разделения сигналов ГАМК и Сг в методике MEGA-PRESS регистрируется два набора данных: ON-серия и OFF-серия [16]. В ON-серии осуществляется селективное воздействие частотно-селектирующим импульсом на $\delta = 1.90$ м.д. на спины метиленовой β -CH₂ группы ГАМК, за счёт чего осуществляется рефокусировка J взаимодействия спинов γ -CH₂ группы связанной с предыдущей группой спин-спиновым взаимодействием. Данная методика называется J-редактированием.

В OFF-серии частотно-селектирующий импульс применяется на удалённой от этих функциональных групп частоте, в результате свободно происходит эволюция J-взаимодействия. Так как редактирующие импульсы не воздействуют на другие резонансных линий PRESS спектра, поэтому при вычитании ON- и OFF-серий их сигналы взаимно уничтожаются. Таким образом, в результирующем спектре остается чистый сигнал спинов γ -CH₂ группы, которая подвергалась J-взаимодействию (рис.27).

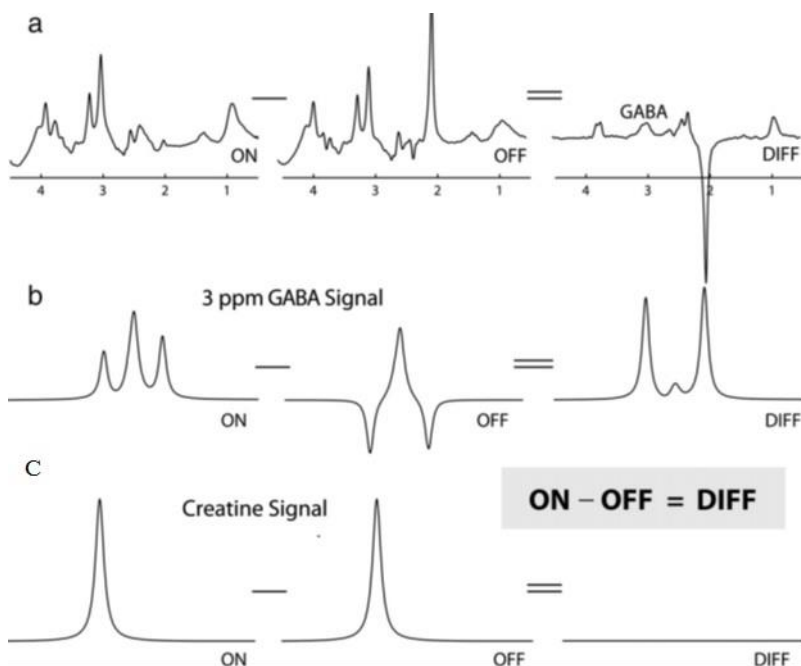


Рис. 27. (а) – спектры OFF, ON, DIFF (после вычитания) серий. (b) – сигнал от ГАМК в ON, OFF и DIFF сериях. (с) сигнал от Cr в ON, OFF и DIFF сериях.

Трудность в определении чистого сигнала ГАМК по спектрам MEGA-PRESS состоит в том, что в сигнал на ~ 3 м.д. входят также резонансы макромолекул, представляющие собой сигналы от аминокислотных остатков белков, содержащихся во внутриклеточной среде мозга[17]. Описанная выше методика называется MEGA-PRESS GABA+ и не позволяет получить сигнал ГАМК, отделенные от макромолекул. Таким образом, сигнал макромолекул может маскировать сигнал ГАМК. Решением данной проблемы является применение методики GABA- [18]. В данной модификации последовательности MEGA-PRESS J-редактирование присутствует как в ON, так и в OFF серии (рис. 28.). В OFF серии оно необходимо для перефокусировки сигнала от макромолекул и его подавления в результирующем спектре.

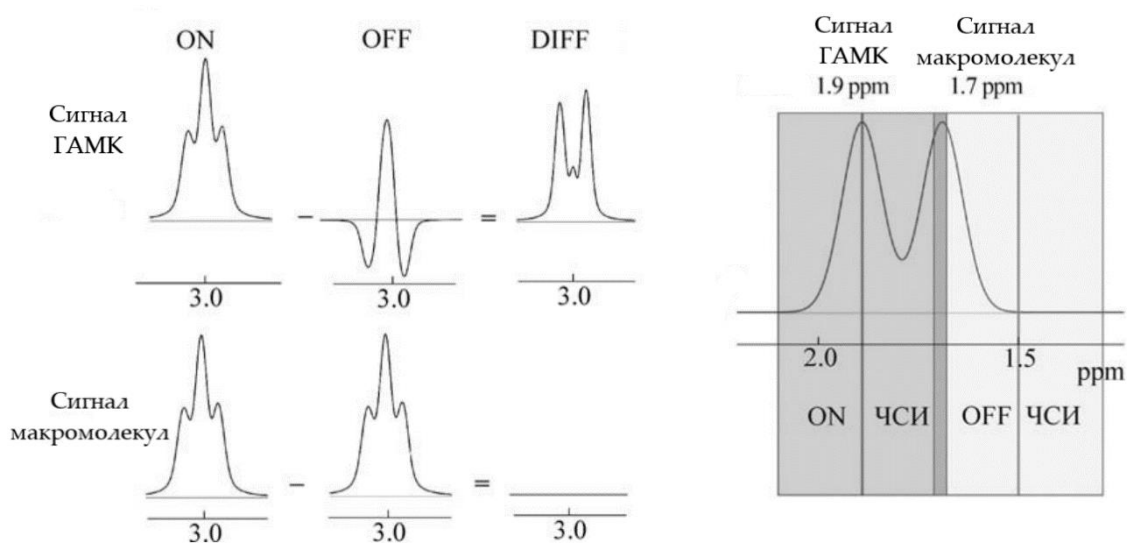


Рис. 28. Схема методики MEGA-PRESS GABA-.

5. Определение pH методами ^1H МРС

5.1. Актуальность определения pH

Основная причина, по которой определение кислотности среды (pH) является важным шагом в изучении биохимических процессов, это зависимость активности ферментов от pH раствора, в котором протекает ферментативная реакция [19]. Таким образом, для каждого фермента существует значение pH при котором наблюдается его максимальная активность. Отклонение от оптимального pH, наоборот, понижает ферментативную активность.

Влияние pH на активность ферментов обусловлено ионизацией функциональных групп молекулы белка, обеспечивающих оптимальную конформацию активного центра фермента. Так, например, при закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH_3^+), а при защелачивании отщепление протона от карбоксильной группы COO^- .

Так, при достаточной кислотности среды, водород может связаться с аминогруппой за счет наличия у нее двух неспаренных электронов. В карбоксильной группе электронная плотность сильно перетянута на кислород, за счет этого протон является подвижным и может диссоциировать, отдалившись на достаточное расстояние. Это произойдет тем вероятнее, чем более щелочной является среда. При потере связи с протоном произойдет резонансная стабилизация группы COO^- и протон сможет присоединиться обратно только при случайном перераспределении электронной плотности на одном из кислорода.

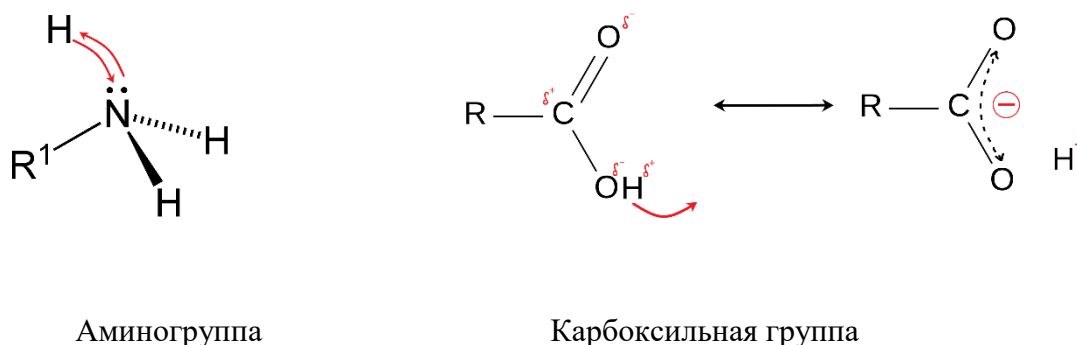


Рис.29. Протонирование и депротонирование amino и карбоксильной групп

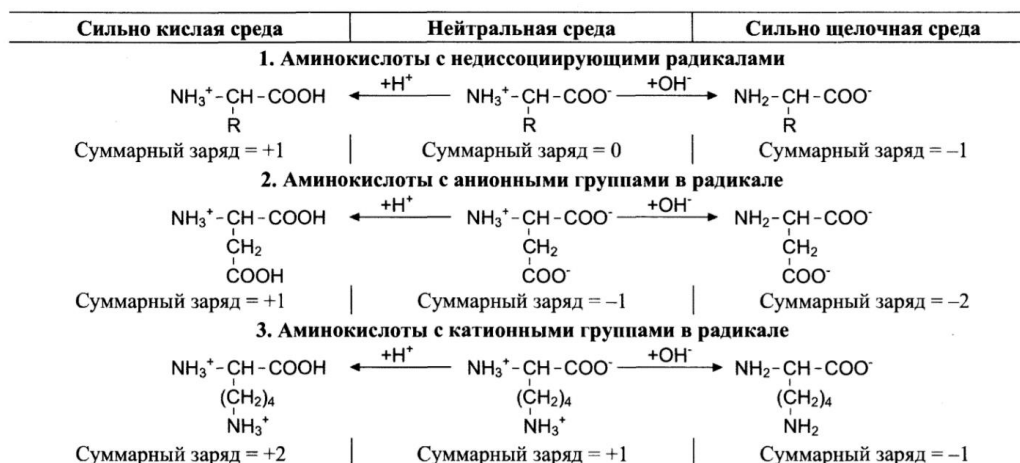


Рис.30. Изменение заряда аминокислот в зависимости от pH среды [19].

Эти изменения влияют на конформацию белка и таким образом меняют его ферментативную активность. Кроме того, pH среды может влиять на степень ионизации и пространственную организацию субстрата, что также будет влиять на сродство субстрата к ферменту. Поэтому значения pH могут служить маркерами различных биохимических процессов или патологий [20].

5.2. Определение pH методами ^1H –МРС

^1H МР-спектроскопия может проводиться на стандартно укомплектованных томографах с возможностью проведения спектроскопии, что позволяет проще вводить этот метод в медицинскую практику, в сравнении с фосфорной спектроскопией.

В протонной спектроскопии определение pH происходит аналогичным способом, как и в фосфорной спектроскопии, меняется лишь ключевое вещество.

В дальней (6-9 м.д.) области спектра (“ароматический регион”) такие метаболиты, как, например, гистидин и гомокарнозин имеют сигнал от 2 и 5 водородов имидазольного кольца. За счет наличия в имидазольном кольце атомов азота в положениях 1 и 3 и делокализации электронной плотности в ароматической структуре, протоны 2 и 5 этих колец имеют pH-зависимый химический сдвиг, зависящий от pH в соответствии с протонированием и депротонированием азотов [21].

Стоит отдельно отметить, что интенсивности сигнала от водородов, связанных с атомами азота в имидазольном кольце, являются зависимыми от подавления воды, т.к. при

этом подавляется сигнал протонов, которые могут постоянно связываться и диссоциировать от атомов азота, что приводит к подавлению их сигнала.

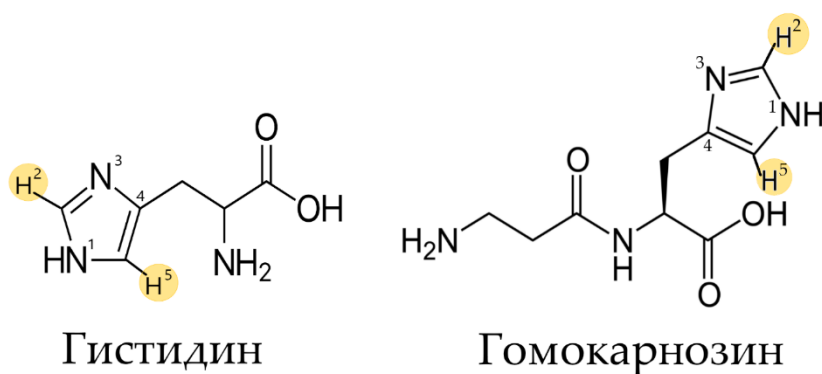


Рис.31 Химические формулы гистидина и гомокарнозина. Выделены протоны имидазольных колец, резонирующие в дальней области спектра и обладающие зависимостью химического сдвига от pH.

<i>Histidine</i>	α CH	3.9752
	β CH ₂	3.1195
		3.2212
Imidazole ring	² CH*	7.7910
	⁵ CH*	7.0580
<i>Homocarnosine</i> ^a	α CH	4.472
	β CH ₂	3.185
		3.003
Imidazole ring	² CH*	7.075
	⁵ CH*	8.081

Табл.2 Значения химических сдвигов для резонирующих протонов в молекулах гистидина и гомокарнозина [1].

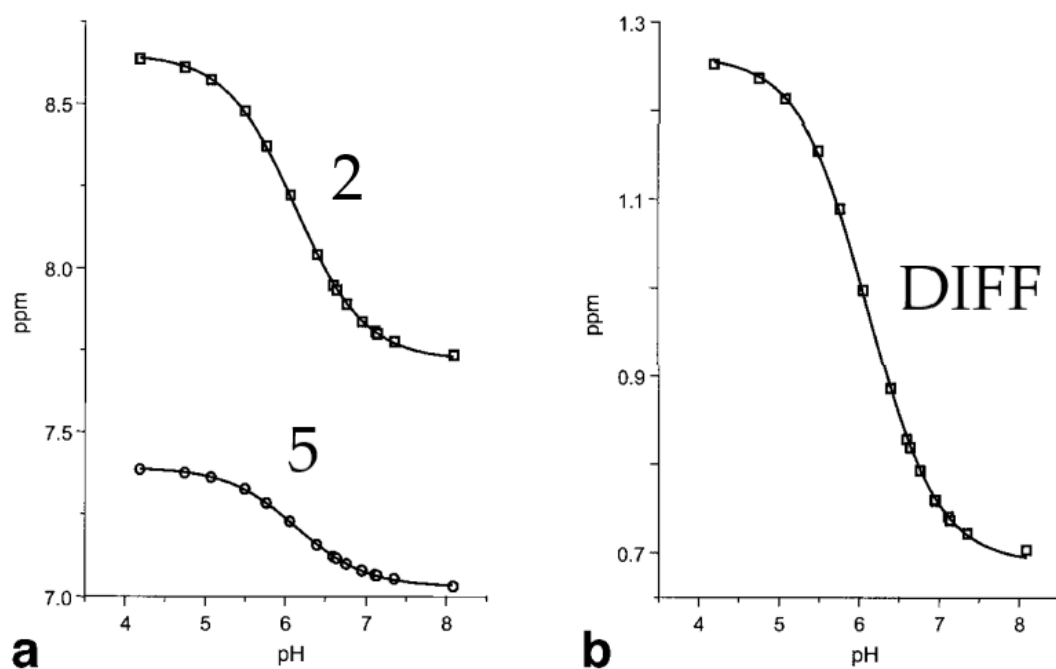


Рис.32. Кривые титрования для химических сдвигов сигналов протонов в положениях 2 и 5 имидазольного кольца гистидина (а), а также кривая титрования для разности значений их химических сдвигов (b) [16].

Кривые титрования определяются уравнением Хендерсона-Хассельбаха:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Где $pK_a = \lg K_a$, K_a – константа диссоциации кислоты,

$[A^-]$ – концентрация основания соответствующего кислоте $[HA]$

Используя экспериментальные кривые титрования для химических сдвигов (рис.4) можно перейти от концентраций к химическим сдвигам [16]:

Для протона 2:

$$pH = 6.114 + \log \left(\frac{8.651 - \sigma}{\sigma - 7.719} \right)$$

Для протона 5:
$$pH = 6.127 + \log\left(\frac{7.390 - \sigma}{\sigma - 7.029}\right).$$

Здесь в выражении для протона 2, например, 8,651ppm – химический сдвиг при $pH \approx 4$ (закисленная среда), т.е. при минимальной концентрации основания $[A^-]$ и максимальной концентрации кислоты $[HA]$. Таким образом при увеличении pH концентрация основания будет пропорциональна разности видимого химического сдвига σ и химического сдвига при $pH \approx 4$: $[A^-] \sim 8,651 - \sigma$.

Аналогично, 7,719 – химический сдвиг при $pH \approx 8$, т.е. при максимальной концентрации основания $[A^-]$ и минимальной концентрации кислоты $[HA]$. Тогда концентрацию кислоты при уменьшении pH можно оценить как $[HA] \sim \sigma - 7,719$.

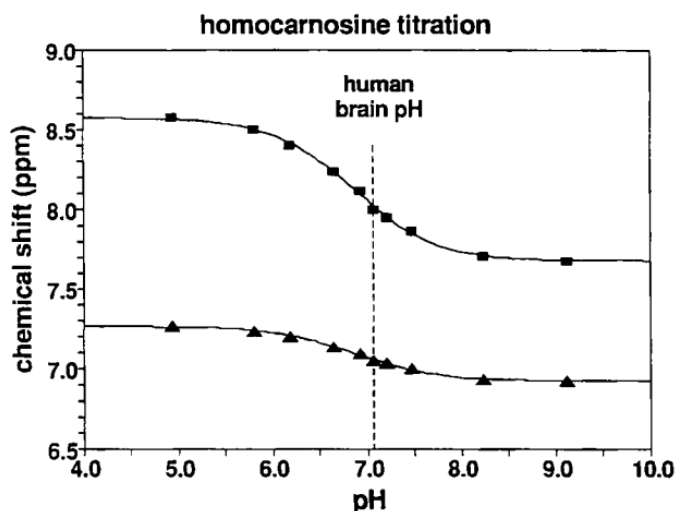


Рис.33. Кривая титрования гомокарнозина [8]

В работе [21] были получены кривые титрования для гомокарнозина и соответствующие формулы Хендерсона-Хассельбаха:

Для протона 2:
$$pH = 6,86 + \log\left(\frac{8,58 - \sigma}{\sigma - 7,68}\right).$$

Для протона 5:
$$pH = 6,86 + \log\left(\frac{7,27 - \sigma}{\sigma - 6,92}\right).$$

Похожие результаты для рН-зависимых сигналов протонов имидазольных колец карнозина были получены в работе, где исследовались изменения рН в скелетных мышцах [20]:

<i>t</i> , °C	pK	σ_H , ppm	σ_A , ppm
C-2 37	6.73 ± 0.03	8.57 ± 0.01	7.67 ± 0.01
C-4 37	6.75 ± 0.06	7.26 ± 0.01	6.91 ± 0.01
C-2 21	7.04 ± 0.03	8.57 ± 0.01	7.66 ± 0.01
C-4 21	7.10 ± 0.06	7.25 ± 0.01	6.92 ± 0.01

$$pH = pK + \log \frac{\sigma_H - \sigma}{\sigma - \sigma_A}$$

6. Цель и задачи исследования

Целью проводимого исследования являлось определение последствий сотрясения головного мозга (mTBI) методами ¹H МР-спектроскопии.

Ставились следующие задачи:

1. Получение PRESS спектров.
2. Получение TE-averaged PRESS спектров.
3. Получение MEGA-PRESS спектров.
4. Предварительная обработка спектров.
5. Количественная обработка спектров.
6. Определение интенсивности сигналов основных метаболитов PRESS спектров (NAA, Cr, Glx, mI, Cho), включая скрытые метаболиты (Glu, Gln, GABA), доступные в TE-averaged PRESS и MEGA-PRESS спектрах.
7. Измерение значений рН по химическим сдвигам сигналов в ароматическо области PRESS спектров.
8. Статистический анализ результатов.

7. Материалы и методы

7.1. Протокол МР-сканирования

Испытуемые: 16 пациентов НИИ НДХиТ с сотрясением мозга (исследование проводилось в острый период: до 3 дней с момента травмы), средний возраст 15 ± 3 лет, и 17 здоровых добровольцев, подписавших согласие на участие в исследовании. Каждый испытуемый проходил предварительное стандартное МРТ исследование головного мозга, которое не выявило патологий или анатомических изменений.

Исследования проводились на МР томографе Philips Achieva dStream 3.0T с использованием приемной 32-канальной катушки SENSE.

Последовательности МРТ сканирования: Стандартный протокол МРТ для пациентов с ЧМТ (T2-, T1-взвешенные изображения, FLAIR, SWI, DTI) не выявил патологических поражений в мозговой ткани ни у одного обследуемого.

Последовательности МРС:

- 1) Импульсная последовательности PRESS: TR = 2 с, TE = 80 мс, N точек = 2048, BW = 2000 Гц, NSA = 144.
- 2) Импульсная последовательность TE-averaged PRESS: TR = 2000 мс, TE начиная с 35 мс до 185 мс с шагом 2.5 мс, NSA для каждого TE=4, (время сбора ~4.5 min). Неподавленный спектр воды (TE = 28 мс, TR = 10000 мс) был также собран.
- 3) Импульсная последовательность MEGA-PRESS: TR=2000 мс, TE=80 мс, 20 мс добавочный частотно-кодирующий импульс: на $\delta_{On}=1.9$ м.д., $\delta_{Off}=1.5$ м.д., NSA=288, время сбора ~10 мин.

Воксель (50 x 25 x 25 мм) располагался в зоне задней поясной коры (рис.34).

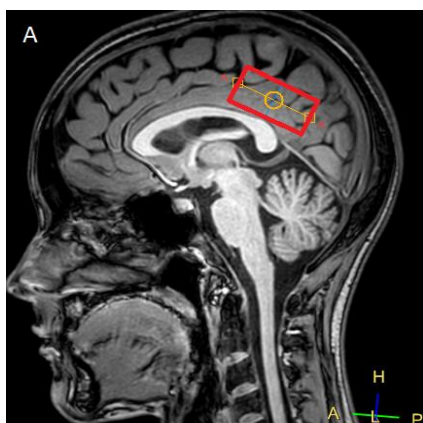


Рис.34. Расположение вокселя: задняя поясная кора

7.2. Предварительная обработка

Предварительная обработка (препроцессинг) проводилась в среде MATLAB с использованием программного пакета для обработки спектров FID-A [22]. Препроцессинг включал в себя следующие шаги:

- Добавление нулевых значений в конец FID, что повышает дискретизацию спектра;
- удаление плохих накоплений, возникших в результате артефактов движения;
- элайнинг (выравнивание) накоплений по фазе и частоте между собой для их успешного усреднения;
- удаление сигнала воды;
- усреднение накоплений – получение индивидуальных спектров для каждого пациента;
- усреднение спектров по всем пациентам из исследуемых групп – получение в результате двух усредненных спектров для группы нормы и группы с сотрясением.

Каждый из шагов препроцессинга является незаменимым и влияет на значения SNR (отношение сигнал/шум) и на ширину на полувысоте (FWHM) [23], что видно на приведенном примере на рис.35.

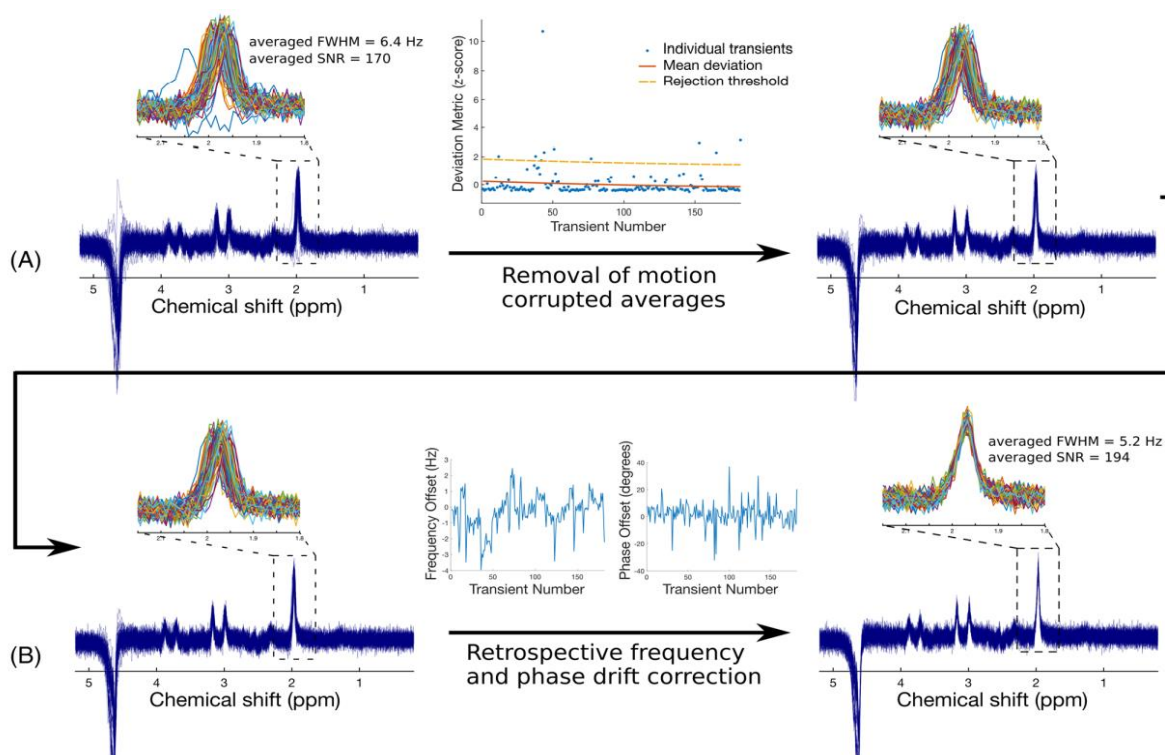


Рис.35. Влияние предварительной обработки на значения SNR и FWHM [24].

Отдельно стоит отметить необходимость усреднения спектров по группам людей, т.к. данная методика повышает отношение сигнал/шум более чем в 3 раза, что позволяет различать маловыраженные эффекты и сигналы. Данный метод успешно использовался в настоящей работе.

7.3. Количественная обработка

PRESS и TE-averaged PRESS. Обработка стандартных спектров PRESS а также спектров TE-averaged PRESS проводилась в программе LCModel [25], которая проводит аппроксимацию *in vivo* спектров модельными спектрами, полученными программным путем или при сканировании фантомов с соответствующими метаболитами. В результате были получены значения интенсивностей и площадей под резонансными пиками таких метаболитов, как: N-ацеталаспартат + N-ацетиласпаргилглутамат (NAA + NAAG), холин (Cho), креатин (Cr), миоинозитол (mI), глутамат + глутамин (Glx), а также в случае TE-averaged PRESS отдельно глутамат (Glu) и глутамин (Gln). При статистической обработке результатов, интенсивности каждого из метаболитов нормировались на интенсивность (площадь под пиком) сигнала Cr в том же спектре по причине его относительно постоянной концентрации в норме и при сотрясении головного мозга.

MEGA-PRESS. Обработка спектров MEGA-PRESS проводилась в среде MATLAB с использованием пакета программ GANNET [26]. Обработка включала в себя аппроксимацию сигнала GABA гауссианой, а также аппроксимацию группы сигналов GABA+Glx совокупностью трех гауссиан. Далее рассчитывались площади под кривыми аппроксимации с помощью интегрирования, а также по известным формулам для площади под кривой Гаусса (различия между данными методиками особенно заметны при смещенной вверх или вниз базовой линии, однако вследствие оценки именно относительного изменения площади под пиками выбор между этими методами несущественен).

Измерение pH. Оценка изменения значения pH проводилась в написанной на MATLAB программе с использованием стандартных PRESS спектров. Значения pH оценивались по химическому сдвигу сигналов в области 7 м.д. и рассчитывались по формуле. Определялись их центральные частоты и pH рассчитывались по формуле:

$$pH = 6,86 + \log\left(\frac{7,27 - \sigma}{\sigma - 6,92}\right),$$

где σ – центральная частота сигнала.

Наряду с этим вычислялись в каждом случае определялись такие параметры, как SNR(сигнал/шум), FWHM(ширина на полувысоте), FitError(ошибка аппроксимации).

7.4. Статистическая обработка

Статистическая обработка проводилась в программах GraphPad Prism 8 и STATISTICA. Решение о нормальности основывалось в первую очередь на результатах теста Шапиро-Уилка, т.к. он является наиболее подходящим для объема изучаемых выборок. Далее в зависимости от нормальности или ненормальности распределения результатов проводились тесты на нахождения достоверных различий между выборками: стандартный непараметрический t-тест – в случае нормального распределения сравниваемых выборок, тест Манна-Уитни – в случае ненормального распределения выборок. Также применялись корреляционные тесты: Пирсона в случае нормального распределения выборок и Спирмена в случае ненормального.

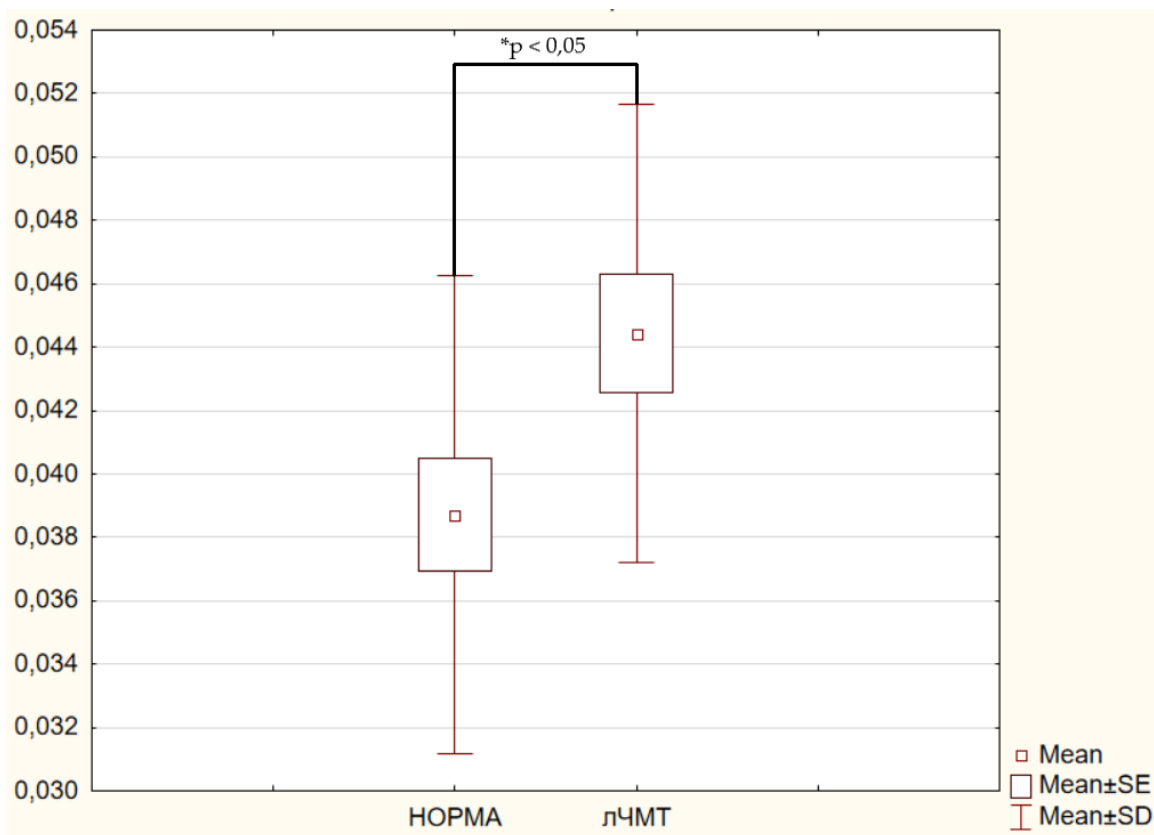
8. Результаты

8.1. Результаты MEGA-PRESS

По результатам обработки индивидуальных спектров MEGA-PRESS в GANNET и проведению статистического анализа для интенсивностей сигналов ГАМК выборки показали ненормальное распределение по тесту Шапиро-Уилка и было обнаружено достоверное ($p=0.025 (<0,05)$) изменение методом Манна-Уитни (рис. 38.). Средние значения интегральной интенсивности ГАМК, нормированной на интегральную интенсивность креатина (ГАМК/Cr), составили для нормы: $0,039 \pm 0,0017$; для группы лЧМТ: $0,044 \pm 0,0018$. Увеличение ГАМК при лЧМТ: $0,005 \pm 0,002$ что соответствует $13 \pm 6\%$.

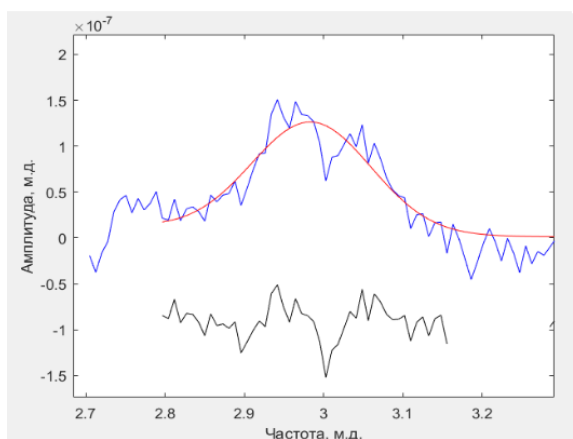
Отдельно стоит обратить внимание на влияние препроцессинга (рис. 39) на значения SNR и FWHM и результирующей ошибки аппроксимации. Так, для малоинтенсивного сигнала ГАМК благодаря предварительной обработке, включающей в себя элайнинг (выравнивание)

и отбрасывание дефектных накоплений, в настоящей работе удалось повысить среднее значение SNR с 6,4 до 6,8; уменьшить среднюю ширину на полувысоте FWHM с 19 до 17, а



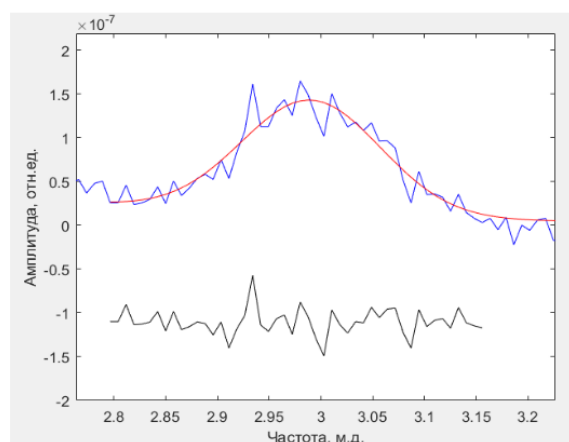
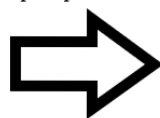
также уменьшить среднюю ошибку аппроксимации с 9,8% до 7,8%.

Рис. 38. Достоверное* увеличение интенсивности сигнала ГМК, нормированной на Сг (ГМК/Сг) при сотрясении мозга (лЧМТ) по отношению к группе нормы. SE – стандартная ошибка, SD – стандартное отклонение Mean – среднее



GABA: SNR = 6,4; FWHM = 19,2; Fit Error = 9,8%
GLX: SNR = 28,4; FWHM = 8,6; Fit Error = 2,1%

Преппроессинг



GABA: SNR = 6,8; FWHM = 17,11; Fit Error = 7,8%
GLX: SNR = 29,5; FWHM = 8,4; Fit Error = 1,8%

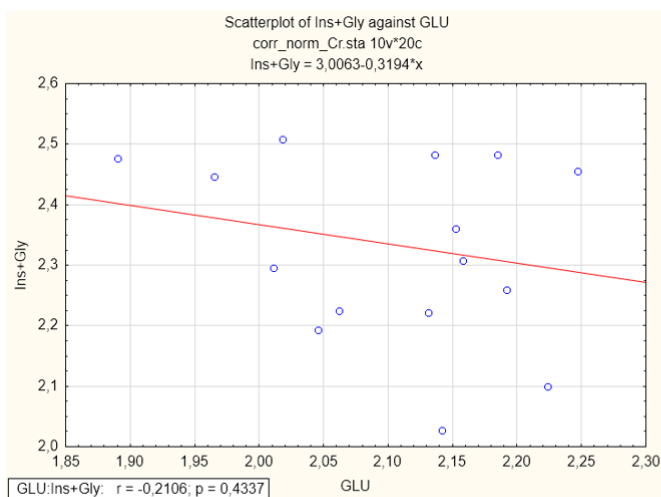
Рис.39. Влияние препроцессинга на SNR (сигнал/шум), FWHM (ширина на полувысоте) и Fit Error (ошибка аппроксимации) сигнала ГАМК.

8.2. Результаты PRESS и TE-averaged PRESS

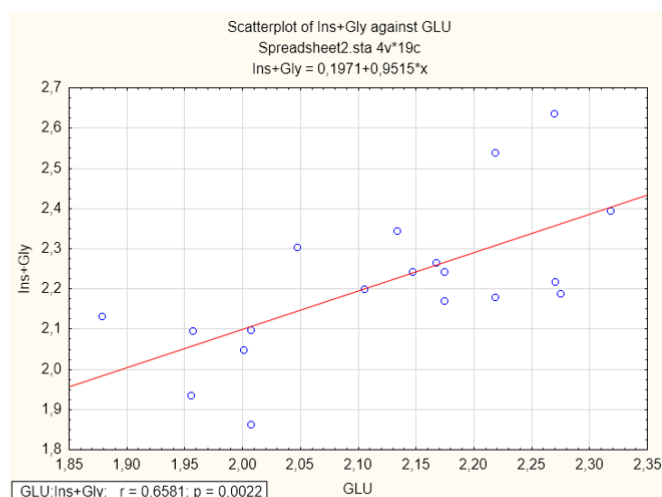
По результатам обработки индивидуальных спектров PRESS и TE-averaged PRESS изменений в интенсивности сигналов метаболитов найдено не было. Однако, был обнаружен эффект присутствия как по данным спектров PRESS, так и TE-averaged PRESS (табл.3) (рис.36), корреляции между значениями mI и Glu при сотрясении. В норме данные корреляции обнаружены не были.

Табл.3. Исследование корреляции между Glu и mI в норме и при сотрясении.

Glu - mI		Glx - mI	
TE-averaged PRESS		PRESS	
Норма	Сотрясение	Норма	Сотрясение
Достоверной корреляции не обнаружено	$r = 0,65$ $p = 0,002$	Достоверных корреляций не обнаружено	



Норма



Сотрясение

Рис.36. Присутствие корреляции между Glu и Ins при сотрясении ($r=0,65$, $p =0,002$) и отсутствие таковой в норме ($r=-0,21$, $p=0,43$) по данным TE-averaged PRESS.

Отдельно стоит отметить влияние дополнительного препроцессинга (предварительной обработки) на сигнал креатина в собранных PRESS спектрах (рис.37). Так, применение элайнинга (выравнивания) спектров между собой позволяет избежать дополнительной ошибки, вызванной случайными смещениями сигналов в результате движений пациента.

Предварительная обработка позволила увеличить SNR креатина с 211 до 239 и уменьшить его ширину на полувысоте (FWHM) с 0,019 до 0,017 м.д.

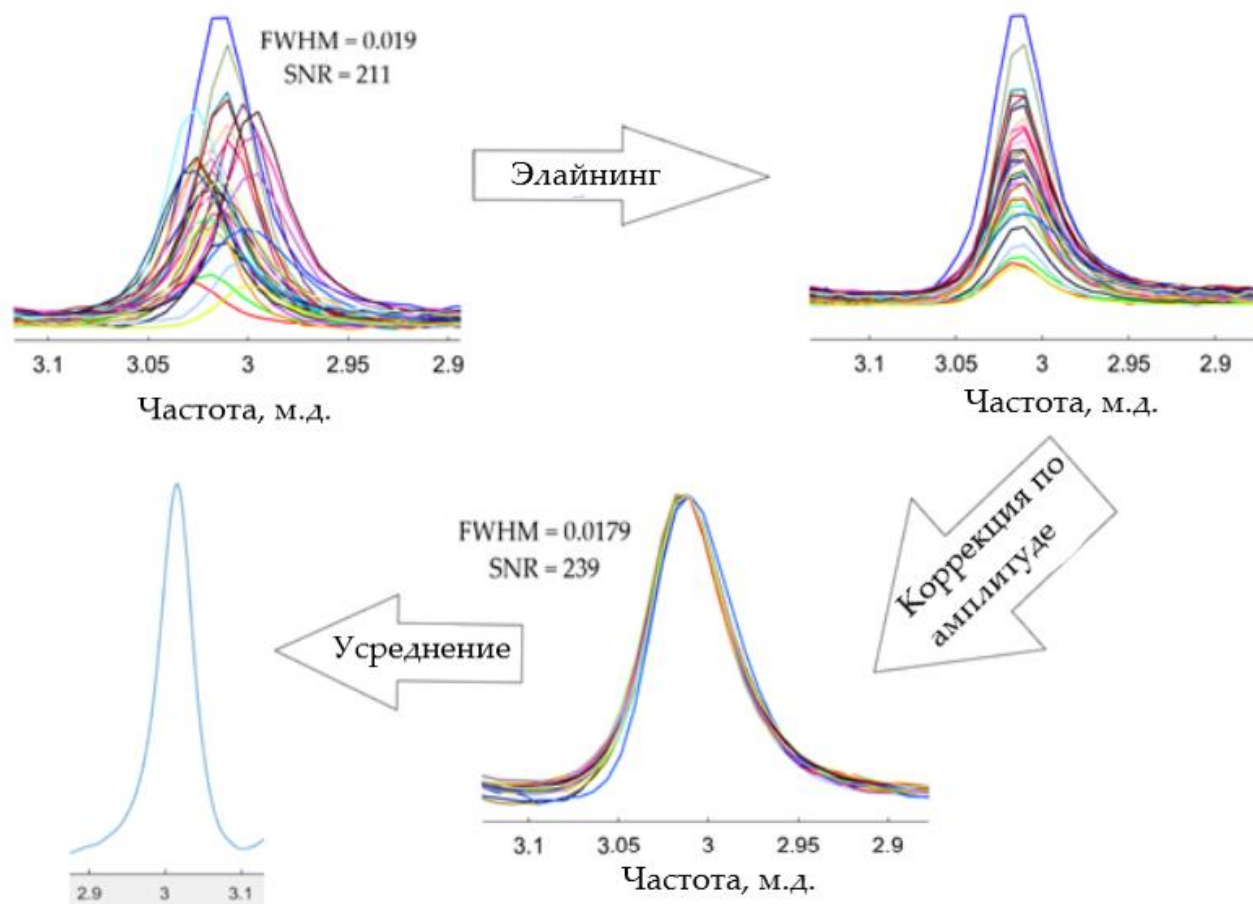


Рис.37 Пример влияния препроцессинга (предварительной обработки) на сигналы Cr. (Элайнинг – выравнивание спектров по частоте и фазе между собой)

8.3. Результаты измерения pH

Значения pH оценивались по химическим сдвигам сигнала в области ~ 7 м.д., сигнал на ~ 8 м.д. не использовался в связи с его малой интенсивностью. SNR среднегрупповых спектров при ~ 7 ppm (рис. 7.a) составляло 11,6 для NORM и 13,9 для mTBI. Для индивидуальных спектров (рис. 7.b) отношение сигнал / шум при ~ 7 ppm составило $4 \pm 1,5$. Из-за малого SNR в индивидуальных спектрах, аппроксимация моделью Гаусса была успешной только для спектров, усредненных по группам.

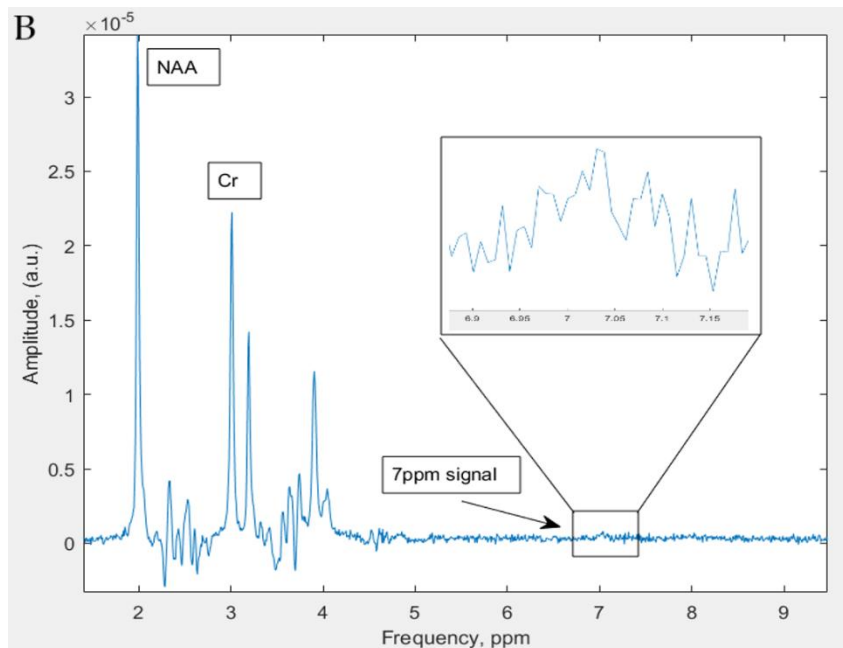
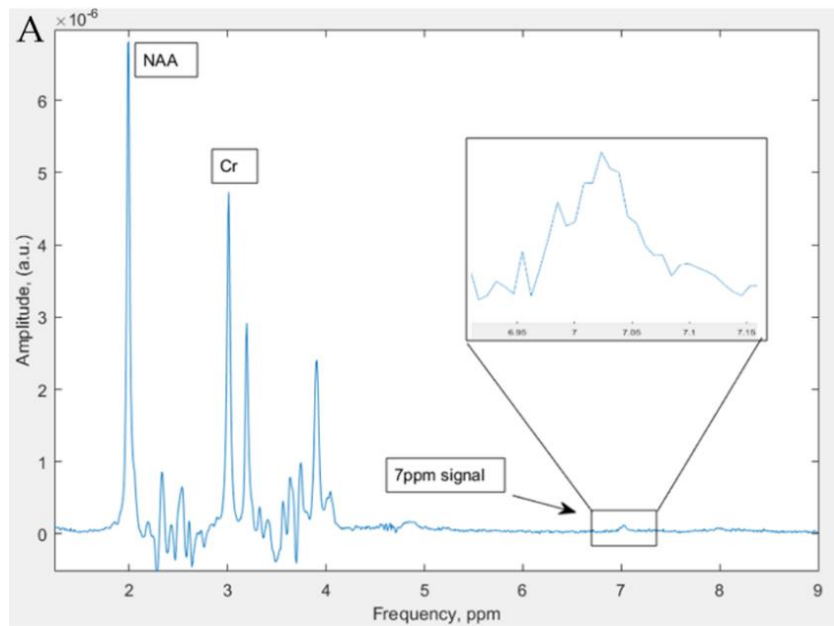


Рис.40. а) Вид сигналов, усредненных по группе NORM; б) Вид сигналов для отдельного исследуемого из группы NORM.

По результатам обработки изменение центральной частоты сигнала в области 7 м.д. составило 0,01 м.д., что соответствует уменьшению значения рН при сотрясении (mTBI) на $1,2 \pm 0,4 \%$ (рис.41). (в норме среднее значение рН = 7,33, при сотрясении: рН = 7,24. Разница между центральными частотами NAA (при ~ 2,01 ppm) в усредненных спектрах NORM и mTBI составила 0,001 ppm, для Cr2 (при ~ 3,9 ppm) - 0,0006 ppm, что на ~ 2 порядка меньше разницы на центральной частоте интересующего сигнала ~ 7 ppm (0,02 м.д.).

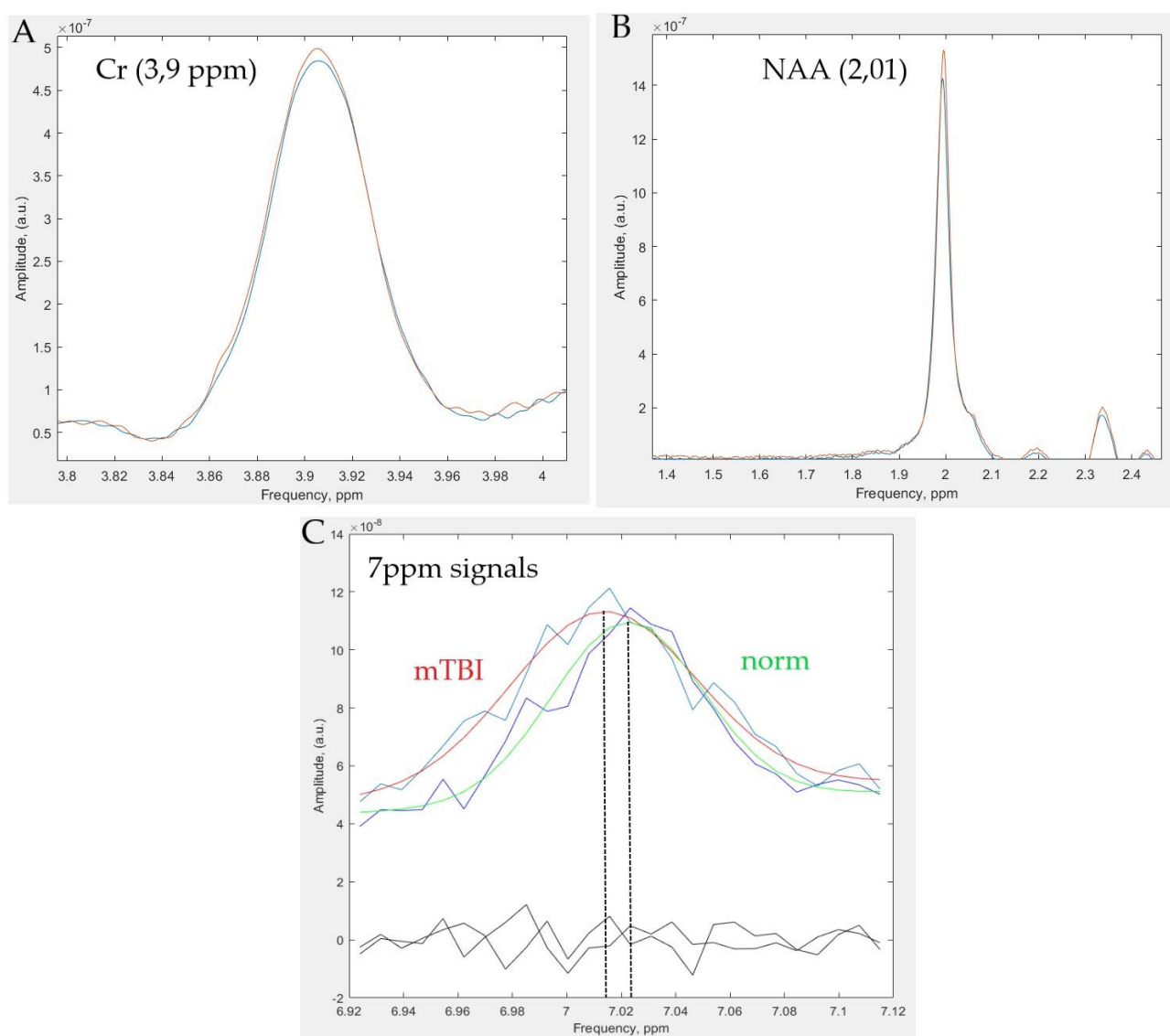


Рис.41. Изменение центральной частоты сигнала в области 7 м.д.

9. Обсуждение

В данной работе было получено достоверное увеличение [ГАМК] в области задней поясной коры, что также согласуется с предыдущими работами, в которых было получено увеличение [ГАМК] в области передней поясной коры [27]. Кроме того, в работе не найдено изменения в концентрации гомокарнозина по сигналам в области 7 – 8 м.д. Таким образом изменение сигнала ГАМК в MEGA-PRESS относится именно к концентрации тормозного нейромедиатора, а не его метаболита. Данный эффект может быть вызван двумя причинами: одной из них является увеличение синтеза ГАМК в результате активации глутаматдекарбоксилазы при лЧМТ [28], другой причиной может быть увеличение концентрации молекул ГАМК, не связанных с рецепторами, что вызвано снижением экспрессии ГАМК(A)-рецепторов [29]. Первую гипотезу опровергает отсутствие изменения в концентрациях Glu и Glx, измеренными с помощью PRESS и TE-averaged PRESS спектров. Говорить об активации ГАМК-шунта в результате легкой ЧМТ также не приходится, потому что в результате сотрясения мозга не возникает ишемии и недостатка кислорода и глюкозы, в отличие, например, от тяжелой ЧМТ [30]. Это подтверждается отсутствием достоверной корреляции GABA-Glu при лЧМТ. Таким образом, наиболее вероятно, что обнаруженный эффект связан именно с нарушением экспрессии субъединиц ГАМК_A рецепторов и связывании ГАМК с ними. Поскольку ГАМК является основным тормозным медиатором, а Glu – основным возбуждающим, при этом концентрация Glu не изменяется при росте несвязанных с рецепторами молекул ГАМК, то подобные изменения говорят о смещении баланса возбуждения-торможения в сторону возбуждения и активации глутаматной активности в данной области. Таким образом, наряду с работами, в которых показано увеличение концентраций ГАМК в передней поясной коре [31], а также уменьшение количества и активности ГАМК рецепторов в зубчатой извилине гиппокампа [32], результаты нашего исследования могут говорить о том, что найденный эффект не является локальным, а охватывает несколько важнейших областей мозга. Подобные изменения могут приводить к гиперактивности глутаматэргической системы и активации апоптотических механизмов вследствие глутаматной эксайтотоксичности, а также дисбалансу между симпатической и парасимпатической системами с преобладанием симпатической активности, это, в свою очередь, может приводить к спазму сосудов и служить причиной дальнейших осложнений [32].

В ходе работы было продемонстрировано, что MEGA-PRESS является единственной и поэтому незаменимой методикой для получения сигналов ГАМК. В данной работе применялась методика GABA-, позволяющая исключить из сигнала на ~ 3 м.д. резонансы макромолекул. Данный подход обеспечивает получение чистого сигнала ГАМК, не смешанного с сигналами макромолекул, это позволяет повысить точность определяемой интенсивности сигнала ГАМК, а следовательно и точность оценки концентраций неромедиатора в интересующей области. Однако, подобная модификация последовательности MEGA-PRESS приводит к повышению времени TE с 68 мс до 80 мс. В совокупности с исключением макромолекул из сигнала, его интенсивность значительно уменьшается. Уменьшение интенсивности сигнала на $\sim 20\%$ при увеличении TE обусловлено T2-релаксацией, а также изменением фазы внешних компонент мультиплетов [33]. Кроме этого, данная методика значительно чувствительна к неоднородностям поля B_0 и артефактам движения. Это связано с симметричностью частотно селективирующих импульсов, применяемых в методике GABA- с целью подавления сигнала макромолекул. В результате флуктуаций внешнего поля B_0 возникают изменения и в резонансных частотах, что приводит к нарушению симметрии частотно-селективирующих импульсов и появлению остаточных сигналов макромолекул. Несмотря на рассмотренные выше недостатки модификации GABA-, она, однако, является беспрецедентной методикой, позволяющей получить исключительно сигналы ГАМК в протонном спектре мозга. Другие исследования также показывают, что преимущества GABA- перед GABA+ значительнее чем ее недостатки, и значения концентраций ГАМК, получаемые с помощью методики GABA- являются более достоверными и позволяют наблюдать эффекты, скрытые на спектрах GABA+ [31].

По данным PRESS и TE-averaged PRESS последовательностей на фоне острого состояния после сотрясения мозга изменений в концентрациях основных метаболитов мозга не обнаружено. Данный результат также подтверждается литературными данными [34]. В некоторых работах [35–37] измеряется сигнал Glx в PRESS или MEGA-PRESS спектрах, при этом в обсуждении предполагается что изменяется Glu и Gln, что приводит к соответствующим биохимическим нарушениям, в том числе и при сотрясении головного мозга. Однако, подобное суждение о концентрации Glu по сигналу Glx может быть ошибочным, так как сигнал Glu и Gln смешаны в Glx. В нашей работе использовалась методика TE-averaged PRESS, которая позволяет разделить сигналы Glu и Gln, и было показано, что концентрации основного возбуждающего медиатора Glu не изменяются при сотрясении головного мозга в области задней поясной коры.

Кроме того, по данным TE-averaged спектров была найдена достоверная корреляция между Glu и mI при сотрясении мозга и отсутствие таковой в норме. Данный эффект не виден по сигналу Glx в PRESS спектрах, что указывает на оправданность применения TE-averaged PRESS в настоящей работе. Выявленную корреляцию можно связать с полученной в работе [38] корреляцией между NAAG и mI при лЧМТ. Она обусловлена тем, что NAAG может выступать агонистом Glu-рецепторов [39]. Связывание NAAG с метаботронными глутаматными рецепторами 3-его типа (mGluR3) инициирует колебания Ca^{2+} в астроцитах и высвобождение вторичных мессенджеров к эндотелиальным клеткам капилляров, что приводит к локальному гиперемическому ответу [40]. Таким образом, изменение в связывании NAAG с глутаматными рецепторами на фоне лЧМТ может опосредованно коррелировать со значениями mI по средствам фосфоинозитидных вторичных мессенджеров. Таким образом, при связывании и агонистическом воздействии NAAG с глутаматными рецепторами происходит увеличение активности инозитолтрифосфатного пути, косвенно связанного с mI. Поскольку NAAG расщепляется в синаптической щели NAAG-пептидазами (GCPII, GCPIII) на исходные вещества: NAA и глутамат, то полученная в данной работе корреляция Glu-mI при лЧМТ связана с полученной ранее корреляцией NAAG-mI при лЧМТ.

Также, важно отметить необходимость предварительной обработки спектров с целью повышения SNR и достоверности анализируемых сигналов. Так, в процессе сканирования в результате минимальных движений пациента возникает смещение сигналов по частотам. При усреднении такого набора накоплений результирующий спектр будет содержать значительно уширенные сигналы, что приведет к некорректной оценке интегральной интенсивности пика и, соответственно, концентрации метаболита. С этой целью проводится элайнинг (выравнивание) накоплений между собой. Выравнивание проводится также и по фазе, что также позволяет избежать некачественного усреднения и увеличения FWHM. Также, перед усреднением накоплений проводится исключение дефектных накоплений, возникших в результате артефактов движения. Особенно чувствительны к артефактам движения и неоднородностям поля спектры MEGA-PRESS. И для –ON и для –OFF серий обязательно проводится их элайнинг, а также выравнивание серий друг между другом. Это особенно важно ввиду того, что результирующие спектры MEGA-PRESS получают в результате комбинации двух серий, которые на момент сложения должны обладать идеальной симметрией. В данной работе проводились все шаги необходимой предварительной обработки, что позволило получить спектры с достаточно высоким SNR и обнаружить малозаметные эффекты.

Однако, даже после тщательно проведенной предварительной обработки, индивидуальные спектры могут не позволить достоверно оценивать некоторые сигналы в силу

различных причин: низкая концентрация метаболитов, недостаточное время сбора данных, ограничение в напряженности магнитного поля. Таким образом, по причине низкого SNR индивидуальных спектров PRESS в области 7 м.д. статистический анализ индивидуальных спектров не показал достоверных различий в значениях рН из-за низкого качества аппроксимации сигналов интереса в индивидуальных спектрах, и, как следствие, большой погрешности определения химического сдвига этих сигналов. Это указывает на необходимость использования группового элайнинга и усреднения по всем испытуемым в группе. Такой подход позволил получить отношение сигнал / шум в области ~ 7 ppm, достаточное для надежного анализа различий в химических сдвигах этих сигналов и, в результате, значений рН. Использование относительно длинного TE = 80 мс в этом исследовании также значительно снизило сигнал макромолекул, резонирующих при ~ 7 ppm, что привело к дальнейшему повышению точности обработки сигнала.

По анализу усредненных PRESS спектров в области 7 м.д. было обнаружено, что значение рН в области задней поясной коры снижается на фоне острого периода сотрясения головного мозга. При этом различия между центральными частотами NAA (при $\sim 2,01$ ppm) в усредненных спектрах NORM и mTBI и Cr2 (при $\sim 3,9$ ppm) - на ~ 2 порядка меньше разницы на центральной частоте интересующего сигнала ~ 7 ppm (0,02 м.д.), по которому оценивались значения рН. Таким образом, данный эффект не вызван случайными смещениями спектров относительно друг друга. Поскольку рН регулирует активность ферментов, участвующих в метаболизме (например, фосфофруктокиназы-1), его изменение может вызывать биохимические нарушения в этой области головного мозга. Эти изменения могут быть связаны с последствиями травмы. Таким образом, сотрясение может сопровождаться нарушениями микроциркуляции, не выявляемым методами МРТ, но обнаруживающимися в снижении рН. В результате этого возможно накопление лактата [41] в результате активации анаэробной фазы гликолиза [42]. Подобное предположение могло бы подтвердить увеличение концентрации лактата по данным PRESS спектров, однако оценить эту величину оказывается затруднительным из-за низкой интенсивности и SNR сигнала лактата. Принимая во внимание то, что изменение значения рН незначительно (1.2%) подобное предположение требует дополнительной проверки.

10. Заключение

Протонная магнито-резонансная спектроскопия не имеет аналогов для неинвазивного изучения биохимических изменений в мозге человека. Благодаря этому методу доступно определение концентраций важнейших метаболитов и нейромедиаторов в различных областях мозга и даже определение значений pH. Магнито-резонансная спектроскопия активно развивается, появляются возможности определения скрытых метаболитов. В работе благодаря этим методикам были найдены недоступные для томографии и при использовании стандартных спектров метаболические изменения, вызванные сотрясением головного мозга. Также существуют и активно развиваются методики определения кислотности среды по сигналам в дальней “ароматической” области спектра, подобная методика также продемонстрирована в данной работе и позволила получить недоступные для обычной магнито-резонансной томографии эффекты. Все эти возможности позволяют развивать раннюю диагностику различных патологий по биохимическим изменениям, недоступным для обычной магнито-резонансной томографии и компьютерной томографии, ультразвуковых и электроэнцефалографических исследований. Благодаря этому, данная работа позволила продвинуться в понимании биохимических изменений в мозге, вызванных сотрясением.

11. Список литературы

1. Govindaraju V., Young K., Maudsley A.A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites // *NMR Biomed.* 2000. Vol. 13, № 3. P. 129–153.
2. Chesler M. The regulation and modulation of pH in the nervous system // *Prog. Neurobiol.* 1990.
3. Romeu-Mejia R., Giza C.C., Goldman J.T. Concussion Pathophysiology and Injury Biomechanics // *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine.* 2019.
4. Brown R.W. et al. Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design: Second Edition // *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design: Second Edition.* Wiley Blackwell, 2014. Vol. 9780471720850. 1–944 p.
5. Basic MRI Physics [Electronic resource]. URL: <http://mri-physics.net/> (accessed: 12.04.2021).
6. Gunther H. *NMR Spectroscopy : Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry.* 1984. 479 p.
7. Westbrook C. *MRI at a Glance.* 2010. 137 p.
8. Wilson M. et al. Methodological consensus on clinical proton MRS of the brain: Review and recommendations // *Magnetic Resonance in Medicine.* John Wiley and Sons Inc, 2019. Vol. 82, № 2. P. 527–550.
9. Lai P.H. et al. Proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging in intracranial cystic mass lesions // *Surg. Neurol.* 2007. Vol. 68, № 5 SUPPL.
10. Kondo D.G. et al. Review: Magnetic resonance spectroscopy studies of pediatric major depressive disorder // *Depression Research and Treatment.* *Depress Res Treat,* 2011. Vol. 2011.
11. Weber O.M. et al. Detection of hidden metabolites by localized proton magnetic resonance spectroscopy in vivo // *Technology and Health Care.* IOS Press, 1997. Vol. 5, № 6. P. 471–491.
12. Krzyzanowska W. et al. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? // *Acta Pharmacologica Sinica.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 35, № 4. P. 444–462.

13. Srinivasan R. et al. TE-Averaged two-dimensional proton spectroscopic imaging of glutamate at 3 T // *Neuroimage*. Academic Press Inc., 2006. Vol. 30, № 4. P. 1171–1178.
14. Harris A.D., Saleh M.G., Edden R.A.E. Edited 1H magnetic resonance spectroscopy in vivo: Methods and metabolites // *Magnetic Resonance in Medicine*. John Wiley and Sons Inc, 2017. Vol. 77, № 4. P. 1377–1389.
15. Petroff O.A.C. GABA and glutamate in the human brain // *Neuroscientist*. Neuroscientist, 2002. Vol. 8, № 6. P. 562–573.
16. Vermathen P., Capizzano A.A., Maudsley A.A. Administration and 1H MRS, detection of histidine in human brain: Application to in vivo pH measurement // *Magn. Reson. Med*. John Wiley and Sons Inc., 2000. Vol. 43, № 5. P. 665–675.
17. Cudalbu C., Mlynárik V., Gruetter R. Handling macromolecule signals in the quantification of the neurochemical profile // *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press, 2012. Vol. 31, № SUPPL. 3.
18. Menshchikov P.E. et al. Cerebral quantification of N-acetyl aspartate, aspartate, and glutamate levels in local structures of the human brain using J-editing of 1H magnetic resonance spectra in vivo // *Russ. Chem. Bull*. Springer, 2018. Vol. 67, № 4. P. 655–662.
19. Биохимия : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 768 с. : ил. [Electronic resource]. URL: <http://www.geotar.ru/lots/NF0012121.html> (accessed: 12.04.2021).
20. Pan J.W. et al. Intracellular pH in human skeletal muscle by 1H NMR // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. Vol. 85, № 21. P. 7836–7839.
21. Rothman D.L. et al. Homocarnosine and the measurement of neuronal pH in patients with epilepsy // *Magn. Reson. Med*. 1997.
22. Simpson R. et al. Advanced processing and simulation of MRS data using the FID appliance (FID-A)—An open source, MATLAB-based toolkit // *Magn. Reson. Med*. John Wiley and Sons Inc, 2017. Vol. 77, № 1. P. 23–33.
23. Mikkelsen M. et al. Big GABA: Edited MR spectroscopy at 24 research sites // *Neuroimage*. Academic Press Inc., 2017. Vol. 159. P. 32–45.
24. Near J. et al. Preprocessing, analysis and quantification in single-voxel magnetic resonance spectroscopy: experts' consensus recommendations // *NMR Biomed*. Wiley, 2020. P. e4257.

25. Provencher S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra // *Magn. Reson. Med.* Magn Reson Med, 1993. Vol. 30, № 6. P. 672–679.
26. Edden R.A.E. et al. Gannet: A batch-processing tool for the quantitative analysis of gamma-aminobutyric acid-edited MR spectroscopy spectra // *J. Magn. Reson. Imaging.* John Wiley and Sons Inc., 2014. Vol. 40, № 6. P. 1445–1452.
27. Меньщиков П.Е. et al. Рост церебральной концентрации γ -аминомасляной кислоты у детей с легкой черепно-мозговой травмой в остром периоде по данным протонной магнитно-резонансной спектроскопии // *Биофизика.* 2017. Vol. 62, № 6. P. 1221–1231.
28. Kobori N., Dash P.K. Development/Plasticity/Repair Reversal of Brain Injury-Induced Prefrontal Glutamic Acid Decarboxylase Expression and Working Memory Deficits by D 1 Receptor Antagonism. 2006.
29. Almeida-Suhett C.P. et al. GABAergic interneuronal loss and reduced inhibitory synaptic transmission in the hippocampal CA1 region after mild traumatic brain injury // *Exp. Neurol.* Academic Press Inc., 2015. Vol. 273. P. 11–23.
30. Н . А. Семенова, Т. А. Ахадов М.. В.У. и, С. Д. Варфоломеев в кн. *Нейродегенеративные заболевания. От генома до целостного организма, под ред. М . В. Угрюмова (Научный Мир, Москва, 2014), т. 2, сс. 657–674.*
31. П.Е. Меньщиков, Н.А. Семенова Т.А.А., О.В. Божко С.Д.В. Рост церебральных концентраций γ -аминомасляной кислоты у детей с легкой черепно-мозговой травмой в остром периоде по данным протонной магнитно-резонансной спектроскопии // *БИОФИЗИКА*, 2017, том 62, вып. 6, с. 1221–1231.
32. Stovicek P.O. et al. Mild tbi in the elderly – risk factor for rapid cognitive impairment in alzheimer’s disease // *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* Editura Academiei Romane, 2020. Vol. 61, № 1. P. 61–72.
33. Harris A.D. et al. Spectral-editing measurements of GABA in the human brain with and without macromolecule suppression // *Magn. Reson. Med.* John Wiley and Sons Inc, 2015. Vol. 74, № 6. P. 1523–1529.
34. Cartwright P.E. et al. Analysis of magnetic resonance spectroscopy relative metabolite ratios in mild traumatic brain injury and normative controls // *Undersea Hyperb. Med.* Undersea and Hyperbaric Medical Society, 2019. Vol. 46, № 3. P. 291–297.
35. Shimizu M. et al. Maturation decrease of glutamate in the human cerebral cortex from

- childhood to young adulthood: A ^1H -MR spectroscopy study // *Pediatr. Res.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 82, № 5. P. 749–752.
36. Bell T. et al. In vivo Glx and Glu measurements from GABA-edited MRS at 3 T // *NMR Biomed.* John Wiley and Sons Ltd, 2020. Vol. 34, № 5.
 37. Gasparovic C. et al. Neurometabolite concentrations in gray and white matter in mild traumatic brain injury: An ^1H -magnetic resonance spectroscopy study // *J. Neurotrauma.* J Neurotrauma, 2009. Vol. 26, № 10. P. 1635–1643.
 38. Menshchikov P. et al. Separate N-acetyl aspartyl glutamate, N-acetyl aspartate, aspartate, and glutamate quantification after pediatric mild traumatic brain injury in the acute phase // *Magn. Reson. Med.* John Wiley and Sons Inc, 2020. Vol. 84, № 6. P. 2918–2931.
 39. Neale J.H. N-Acetylaspartylglutamate is an agonist at mGluR3 in vivo and in vitro // *Journal of Neurochemistry.* 2011. Vol. 119, № 5. P. 891–895.
 40. Baslow M.H., Guilfoyle D.N. Evidence that N-acetylaspartylglutamate is the astrocyte-targeted neurovascular coupling agent that regulates slow tonic control of brain blood flow // *J. Glycomics Metab. Open Access Pub,* 2016. Vol. 1, № 1. P. 25–36.
 41. Gagnon M. et al. High-End pH-controlled delivery of glucose effectively suppresses lactate accumulation in CHO Fed-batch cultures // *Biotechnol. Bioeng.* Biotechnol Bioeng, 2011. Vol. 108, № 6. P. 1328–1337.
 42. Pavy F.W., Siau R.L. An experimental enquiry upon glycolysis in drawn blood // *J. Physiol.* J Physiol, 1902. Vol. 27, № 6. P. 451–456.