

УДК 543.422.23: 612.82

© Ю. И. Неронов, Л. А. Тютин, Л. А. Стуков

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ТОЧНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МЕТАБОЛИТОВ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЯМР-СПЕКТРАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В работе анализируются погрешности определения методом ЯМР-спектроскопии концентрации N-ацетиласпартата (NAA) в тканях белого вещества головного мозга. Разработано программное обеспечение, которое позволяет минимизировать систематические погрешности и определять концентрацию NAA с ошибкой менее трех процентов. Определена концентрация NAA в тканях белого вещества головного мозга для мужчины 19 лет [$C(\text{NAA}) = 11.0 \pm 2.3 \%$ ммоль/л] и мужчины 60 лет [$C(\text{NAA}) = 10.6 \pm 1.0 \%$ ммоль/л].

ВВЕДЕНИЕ

ЯМР-спектроскопия высокого разрешения позволяет определять концентрацию растворенных низкомолекулярных соединений, если их временная химическая стабильность более 0.01 с. По этой причине в биологических тканях, содержащих тысячи химических соединений в состоянии синтеза и распада, лишь некоторые достаточно стабильные низкомолекулярные соединения могут регистрироваться ЯМР-спектрометром.

Современные ЯМР-томографы с высоким полем, как правило, комплектуют приставками и дополнительным программным обеспечением для реализации режима ЯМР-спектроскопических исследований. Такой режим позволяет выполнять сравнительный анализ ряда доступных для регистрации веществ, образующихся в результате процессов метаболизма (метаболитов). Однако для определения концентраций таких веществ с указанием погрешности результатов требуется разработка специальной экспериментальной методики и дополнительного программного обеспечения.

Особый интерес представляет концентрация в тканях мозга N-ацетиласпартата (NAA). Это соединение как предшественник наиболее активных нейромедиаторов участвует в передаче нервных импульсов. Для нормального состояния тканей белого вещества головного мозга концентрация NAA, вероятно, может служить мерой развитости нейронных сетей. Исследования в этом направлении напрямую зависят от возможности повысить точность определения концентрации, поскольку лишь при уменьшении доверительных границ погрешности возможна эффективная проверка рабочих гипотез.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

В настоящей работе использовался томограф Magnetom-Vision, установленный в Центральном научно-исследовательском рентгенорадиологическом институте (ЦНИРРИ), Санкт-Петербург. Этот томограф укомплектован сверхпроводящим магнитом с полем 1.5 Тл, имеющим систему компенсации неоднородностей поля до $\Delta B/B = 10^{-8}$ в шаровом объеме диаметром 250 мм. Применялась методика STEAM 10.0/5000/64 (интервалы между импульсом возбуждения и ЯМР-сигналом $TE = 10$ мс; интервалы времени между высокочастотными импульсами $TR = 5000$ мс; число повторных запусков для суммирования ЯМР-сигналов $NA = 64$) с использованием режима подавления сигналов воды [1].

Для оценки возможных возрастных изменений были обследованы два здоровых добровольца 19 и 60 лет. С целью определения абсолютных концентраций из этих же областей головного мозга (рис. 1) накапливались сигналы от протонов растворителя (H_2O). При этом использовалась импульсная последовательность STEAM 10.0/5000/6 с шестикратной регистрацией сигнала и с выключенным режимом подавления ЯМР-сигнала воды.

Область исследования выбиралась в форме "куба" ($20 \times 20 \times 20$ мм) и размещалась в тканях белого вещества мозга (рис. 1). Спектральная информация накапливалась в виде числовых массивов по 1024 числа в равномерной шкале времени с интервалами отсчетов 1 мс, которые затем пересылались для обработки на персональный компьютер. Перед накоплением данных выполнялась тщательная минимизация градиентов магнитного поля в области исследования для каждого добровольца.

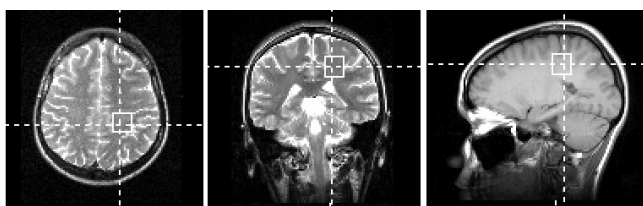


Рис. 1. Выбор области для накопления спектра

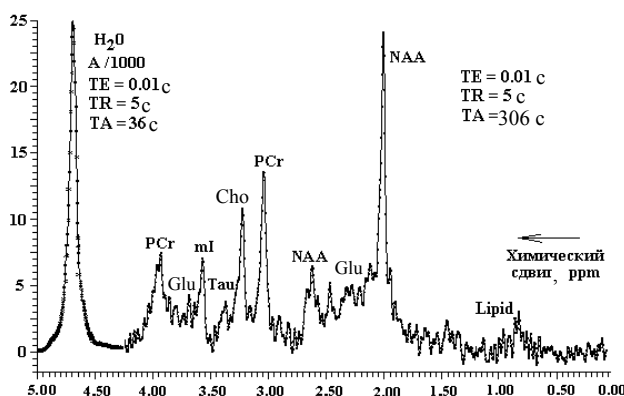


Рис. 2. ЯМР-спектр белого вещества головного мозга. Исходный массив чисел накоплен при $TE=10$ мс. По вертикали — относительные единицы; по горизонтали — химический сдвиг в миллионных долях (ppm) традиционной для ЯМР шкалы относительно тетраметилсилана. Интенсивные сигналы регистрируются от молекулярных соединений: N-ацетил-аспартата — NAA (2.01, 2.48, 2.60, 2.64 ppm), фосфокреатина — PCr (3.03, 3.94 ppm), холина — Cho (3.22 ppm), миоинозитола ml (3.56 ppm). Более слабые сигналы регистрируются от таурина — Tau (3.36 ppm), глутамата — Glu (2.11, 2.18, 2.28, 2.36, 3.77 ppm) и от липидных соединений. Время накопления спектра $TA = 306$ с. Для сравнения на спектре представлен также сигнал от протонов воды, полученный в тех же условиях с накоплением $TA = 36$ с, уменьшенный по амплитуде в 1000 раз

Сигналы от метаболитов, характерных для тканей белого вещества мозга здоровых людей, представлены на частотном спектре (рис. 2) после Фурье-преобразования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Некоторые сигналы спектра имеют ширину на полувысоте 5 Hz, что характеризует разрешающие возможности используемого нами прибора. Аппаратурное разрешение $\Delta B/B = 3 \cdot 10^{-8}$ не уступает лучшим приборам такого класса. Неустраняемые

неоднородности поля ΔB обусловлены в большей степени не самим полем используемого магнита, а искажением поля из-за размещения пациента с неизбежными краевыми изменениями диамагнитных свойств (ткань—воздушная среда) и отклонением расположения тканей от сферического распределения вокруг исследуемого объема [2].

Если обеспечено постоянство коэффициента усиления аппарата в использованных режимах накопления спектра и сигнала воды, то последующая совместная обработка накопленных ЯМР-сигналов х-метаболитов и H_2O позволяет определять абсолютные концентрации метаболитов (метод, который используется в Институте экспериментальной медицины, г. Прага, М. Najek и др.). Однако сопоставление литературных данных и наша практика показывают, что результаты определения концентрации, как правило, содержат систематические погрешности, которые зависят как от методики получения исходных числовых массивов, так и от способа обработки данных.

Для расчета концентрации х-метаболита применяют следующее соотношение:

$$C(x) = C(H_2O) \frac{S(x)}{S(H_2O)} \frac{N_p(H_2O)}{N_p(x)} \times \frac{\exp[-TE/T_2(H_2O)]}{\exp[-TE/T_2(x)]}, \quad (1)$$

где:

$C(H_2O) = 40$ моль/л — число молей воды в исследуемой ткани (внутриклеточная вода; ЯМР-сигналы от молекул воды, входящих в состав биополимеров, имеют малое T_2 и не регистрируются данной методикой);

$S(x)$ — интенсивность (площадь) спектрального сигнала х-метаболита;

$S(H_2O)$ — аналогичная интенсивность сигнала от протонов воды ткани;

$N_p(H_2O) = 2$ — число протонов в молекуле воды;

$N_p(x)$ — число эквивалентных протонов в молекулярной группе х-метаболита ($N_p(NAA) = 3$ для основного сигнала $-CH_3$ группы NAA);

$T_2(x)$ — время спин-спиновой релаксации протонов х-метаболита;

$T_2(H_2O)$ — время спин-спиновой релаксации протонов воды в исследуемой ткани.

Сомножитель, содержащий отношение экспонент, характеризует поправку на уменьшение ЯМР-сигналов за время TE из-за спин-спиновой релаксации (T_2). Однако постоянная T_2 может быть разной у разных пациентов, и, чтобы уменьшить влияние на точность результатов этого сомножителя, следует использовать минимальный параметр TE , который допустим в режиме локального спектрального анализа: $TE = 10$ мс. При таком параметре сомножитель с отношением экспонент (1)

может изменить результат не более чем на несколько процентов.

С другой стороны, при $TE = 10$ мс начинают проявляться более короткоживущие молекулярные соединения. Сигналы некоторых из них (например, глутамат и глутамин) расположены близко к сигналу NAA (рис. 2). Причем концентрация этих веществ в тканях может быть непостоянной. По этой причине возникают систематические погрешности при определении площади сигнала NAA. Кроме этого, при $TE = 10$ мс ЯМР-сигнал от H_2O имеет существенно более сложную форму. На рис. 3 представлено сопоставление формы сигналов H_2O для добровольцев 19 и 60 лет. Оба сигнала имеют одинаковую асимметричную форму. На рис. 3 экспериментальные точки двух видов формируют визуально единый пик с нарушениями монотонности на восходящей ветви (в широком интервале от 4.2 до 4.5 ppm) и на спадающей ветви (в районе 4.9 ppm). Как видим, в контуре сигнала воды при $TE = 10$ мс кроме основной составляющей (внутриклеточная вода) присутствуют компоненты с широким спектром.

В широкой части ЯМР-спектра H_2O при $TE = 10$ мс частично проявляются те молекулы воды, которые вступают во взаимодействие с биополимерами. Кроме этого, частично проявляются процессы обмена протонами между молекулами H_2O и группами R-OH, R-NH различных соединений (см., например, [3]).

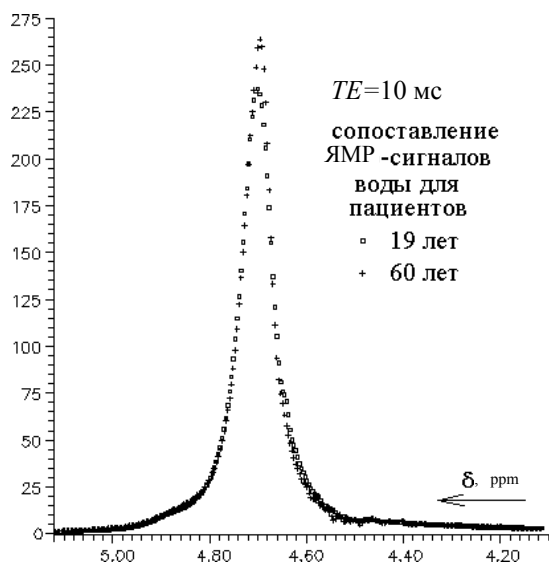


Рис. 3. Сопоставление формы сигналов воды для добровольцев 19 и 60 лет. По осям те же характеристики, что и на рис. 2 (δ — химический сдвиг)

ВЫБОР СПОСОБА ОБРАБОТКИ ЧИСЛОВЫХ МАССИВОВ

С целью минимизации погрешности была разработана такая методика определения концентрации $C(NAA)$, которая не требует вычисления площади спектрального сигнала. Нас интересуют лишь химически эквивалентные протоны для H_2O и NAA. Форма спектральных сигналов должна соответствовать контуру Лоренца. Отношение площадей $S(NAA)/S(H_2O)$ можно определить как отношение

$$[A(NAA) \cdot \Delta\nu(NAA)]/[A(H_2O) \cdot \Delta\nu(H_2O)],$$

где $A(x)$ — амплитуда (спектральный максимум) x -сигнала, $\Delta\nu(x)$ — ширина на полувысоте сигнала. Ширина сигнала определяется в ЯМР-спектроскопии эффективным временем спин-спиновой релаксации как $\Delta\nu(x) = 1/(\pi \cdot T_2^*(x))$.

Следовательно, для определения концентрации $C(NAA)$ можно использовать следующее соотношение:

$$C(NAA) = C(H_2O) \frac{2}{3} \frac{A(NAA)}{A(H_2O)} \frac{T_2^*(H_2O)}{T_2^*(NAA)} \times \exp\{-TE[1/T_2(H_2O) - 1/T_2(NAA)]\}. \quad (2)$$

Поскольку накопление спектра и накопление сигнала воды выполняются при одинаковой настройке спектрометра, то выражение для $T_2^*(x)$ в первом приближении будет иметь общее слагаемое $\gamma \cdot \Delta B$, описывающее уширение сигналов из-за неоднородности магнитного поля:

$$1/T_2^*(H_2O) = 1/T_2(H_2O) + \gamma \cdot \Delta B, \quad (3a)$$

$$1/T_2^*(NAA) = 1/T_2(NAA) + \gamma \cdot \Delta B. \quad (3б)$$

Если вычесть из соотношения (3a) соотношение (3б), то общее слагаемое $\gamma \cdot \Delta B$ исключается, и, следовательно, в формуле (2) разность под знаком $\exp$, содержащая члены вида $1/T_2$ может быть заменена разностью членов вида $1/T_2^*(x)$, т.е. вместо постоянной T_2 допустимо использовать постоянную T_2^* . Причем, оценки показывают, что вносимая погрешность из-за приближенности выражений (3a), (3б) не будет превышать 1 %, если $TE = 10$ мс. При $TE = 135$ мс зависимость $C(x)$ от T_2 столь значительна, что такая замена из-за приближенности выражений (3a), (3б) может быть ошибочной.

Исходные числовые массивы содержат оцифровку ЯМР-сигналов на временном интервале 1.024 с, которые за интервал времени 0.5 с уменьшаются до уровня сигналов случайного электромагнитного шумового фона.

В разработанной нами программе использовалось скользящее Фурье-преобразование с окном 500 отсчетов (0.5 с) по выборке 1024 с шагом смещения окна 10. Причем первый спектр получали без исключения начальных чисел исходного числового массива. Процедура Фурье-преобразования повторяется для каждого массива (1024 числа) 17 раз. Отметим, что уменьшение шага с 10 до 5 не сказывалось на величине конечного результата, но требовало вдвое больше времени на вычисление.

Поскольку оцифровка на томографе проводилась с интервалом включения АЦП 1 мс, то каждому смещению окна на 10 отсчетов соответствует "задержка" в регистрации ЯМР-сигнала на 0.01 секунды. Из-за такой задержки из спектров последовательно исключались соответствующие короткоживущие молекулярные соединения. Мы ограничивались 17 положениями окна, поскольку увеличение "задержки" в регистрации на время более 0.17 с оказалось нерезультативным.

Полученная таким образом последовательность сигналов представлена на рис. 4–5. Как видим, уменьшение амплитуды сигналов достаточно хорошо соответствует уменьшению по экспоненциальному закону $A(t) = A_0 \exp(-t/T_2^*)$. Для определения $A_0(x)$ и $T_2^*(x)$ была использована программа с циклической процедурой минимизации квадратичных отклонений для серии амплитуд 17 сигналов. Найденные таким образом величины $A_0(x)$ и $T_2^*(x)$ далее использовались для вычисления $C(x)$. Отметим, что первый сигнал для НАА имеет более высокую амплитуду (рис. 5), чем расчетная амплитуда для этого сигнала, полученная по совокупности амплитуд 17 сигналов. Очевидно, что при отбросе начальных чисел уменьшается влияние на амплитудный максимум небольших ЯМР-сигналов от протонов таких соединений, как глютамат, глютамин и др.

Таким образом, используя вместо соотношения (1) соотношение (2), мы исключаем ошибки, связанные с погрешностями определения площадей асимметричных сигналов НАА и воды. Поскольку асимметрия сигналов связана с наличием других химических компонентов, то в результате предложенный способ обработки данных уменьшает влияние на расчет $C(\text{НАА})$ соответствующих систематических ошибок.

Результаты расчетов по соотношению (2) представлены в таблице. Указанная в таблице для $C(x)$ погрешность вычислялась по следующему выражению:

$$\Delta = \frac{100}{A_0} \sqrt{\frac{\sum (A(t_j) - A_j)^2}{N - 1.5}},$$

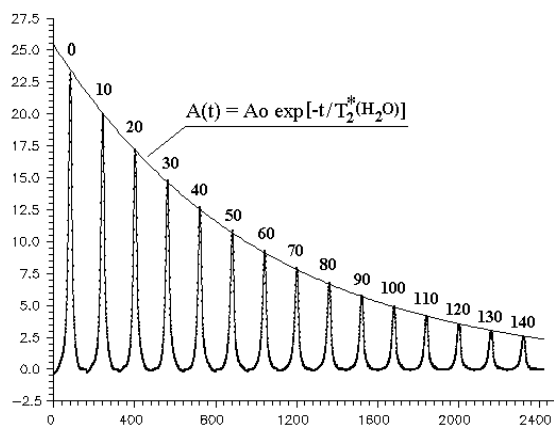


Рис. 4. Последовательность сигналов воды, полученная при использовании для Фурье-преобразования скользящего окна. По осям: по вертикали — относительные единицы, по горизонтали — относительное время. Над каждым из представленных сигналов указано смещение окна (в отсчетах): от 0 до 140

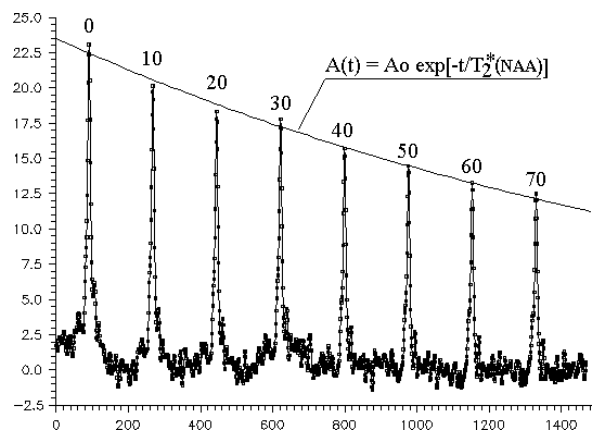


Рис. 5. Последовательность ЯМР-сигналов от протонов НАА, полученная при использовании для Фурье-преобразования скользящего окна. Смещение окна от 0 до 70. Обозначения те же, что и на рис. 4

где: A_j — амплитуда j -го сигнала; $A(t_j)$ — амплитуда j -го сигнала, вычисленная по соотношению $A(t) = A_0 \exp(-t/T_2^*)$; суммирование квадратичных отклонений под корнем выполняли N раз; $N = 17$ — число использованных ЯМР-сигналов. Основная погрешность связана с обработкой сигналов НАА, поскольку уже из сопоставления рисунков 4 и 5 становится очевидным: $\Delta(\text{НАА}) > \Delta(\text{H}_2\text{O})$.

Как видим (см. таблицу), обработка спектров, накопленных в течение 306 с, позволяет определять

Сопоставление концентраций NAA

Возраст добровольца	$A(H_2O)/A(NAA)$	$T_2^*(H_2O)$, мс	$T_2^*(NAA)$, мс	$C(NAA)$, ммоль/л
19 лет	1175	64	132	$11.0 \pm 2.3 \%$
60 лет	1286	78	153	$10.6 \pm 1.0 \%$

концентрацию N-ацетиласпартата с погрешностью менее 3 %.

Для обследованных добровольцев вычисленная нами концентрация $C(NAA)$ отличается лишь на 4 % (причем при любых вариантах расчета $C(NAA)$ у второго добровольца была ниже). Сравним наши данные (см. таблицу), например, с данными группы [4], которые были получены на аппарате Bruker Medsp S200 с полем 2 Тл для мужчины

62 лет: $C(NAA) = 11.12$ ммоль/л (погрешность не указана). Отметим, что аналогичная обработка ЯМР-сигнала миоинозитола выявила отличие концентрации $C(mIns)$ более чем в два раза:

$$[C(mIns)] = 4.03 \pm 4 \% \text{ ммоль/л} \text{ и}$$

$$[C(mIns)] = 9.03 \pm 4.2 \% \text{ ммоль/л}$$

соответственно у первого и второго добровольца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как полагают [5, 6], N-ацетиласпартат является молекулярным предшественником активных нейромедиаторов (ацетилхолина), обеспечивающих передачу импульсов по нервным тканям, и его концентрация пропорциональна средней плотности аксонов, дендритов и нервных клеток в белом веществе мозга.

Известно, что число нервных клеток (нейронов) с возрастом уменьшается, и это должно сопровождаться соответствующим уменьшением $C(NAA)$. Однако имеется и другая противоположная тенденция [5]: число связей (дендритов) у функционирующего нейрона увеличивается с возрастом, что должно сопровождаться увеличением используемого NAA. Вероятно, эти две тенденции и определяют возрастную динамику развитости нейронных сетей.

Для более подробного обсуждения результатов потребуются накопление аналогичных данных для разных возрастных групп добровольцев. Причем при определении $C(NAA)$ необходимо использовать такие методики, которые, как и в представленном нами варианте, минимизируют влияние систематических погрешностей и содержат оценки доверительных интервалов для ошибок определяемых величин. Накопление таких данных связа-

но с решением как морально-этических проблем-привлечения добровольцев, так и с вопросом о компенсации стоимости использования высокопольного томографа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Frahm J., Michaelis T., Verboldt K.D., Bruhn H., Gyngell V.L., Hanicke W.* Improvements in Localized Proton NMR Spectroscopy of Human Brain // *J. Magnetic Resonance*. 1990. V. 90. P. 464–473.
2. *Неронов Ю.И., Нассар Муханнад, Иванов В.К.* Использование избирательного частотного подавления ЯМР-сигналов в МРТ для визуализации неоднородностей магнитного поля // *Научное приборостроение*. 2001. Т. 11, № 1. С. 56–59.
3. *Неронов Ю.И., Рахимов З.* Исследование протонного обмена в растворах $H_2O-C_2H_5OH-C_5D_5N$ // *Журнал структурной химии*. 1971. Т. 12, № 3. С. 392–396.
4. *Rose S.E., Chalk J.D., Galloway G.J. et al.* Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton MRS // *Magnetic Resonance Imaging*. 2000. V. 18. P. 95–98.
5. *Фишбах Д.Д.* Психика и мозг // *В мире науки*. М.: Мир, 1992. Т. 11. С. 10–20 (перевод: *Scientific American*. 1992. V. 267, No 3).
6. *Тютин Л.А., Рохлин Г.Д., Неронов Ю.И. и др.* Протонная магнитно-резонансная спектроскопия головного мозга // *Магнитно-резонансная томография в клинической практике*. СПб.: Изд. ЦНИРРИ, 1996. С. 67–71.

Санкт-Петербургский государственный институт точной механики и оптики (Технический университет) (Ю. И. Неронов)

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт (ЦНИРРИ)
(Л. А. Тютин, Л. А. Стуков)

Материал поступил в редакцию 19.03.2001.

SOME PROBLEMS OF ACCURATE DETERMINATION OF METABOLITE CONCENTRATIONS IN BRAIN TISSUE DURING NMR SPECTRAL STUDIES

Yu. I. Neronov, L. A. Tiutin^{*}, L. A. Stukov^{*}

*Saint-Petersburg State Institute of Fine Mechanics and Optics (Technical University),
^{*}Central Roentgen Radiology Research Institute*

The paper gives the analysis of errors in NMP spectroscopic measurements of N-acetylaspartate (NAA) concentration in brain white substance tissues. The software minimizing the systematic error and providing NAA concentrations measurement errors below 3 % has been developed. The NAA concentration in brain white substance tissues was determined for a 19-year-old man [$C(\text{NAA}) = 11.0 \pm 2.3\% \text{ mmol/l}$] and a 60-year-old man [$C(\text{NAA}) = 10.6 \pm 1.0\% \text{ mmol/l}$].