УДК 616-073.584

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

А.В. Богданов

Обобщены сведения о метаболитах протонной магнитно-резонансной спектроскопии.

Ключевые слова: МР-спектроскопия; N-ацетил-аспартат; холин; креатинин; лактат; глутамат; злокачественные новообразования.

PROTON MR SPECTROSCOPY (REVIEW)

A.V. Bogdanov

Article summarizes all material concerning proton MR spectroscopy.

Keywords: proton MR spectroscopy; N-acetyl-aspartate; choline; creatinine; lactate; glutamate; malignant growths.

Магнитно-резонансная спектроскопия (МРТ-спектроскопия) – это спектроскопический метод исследования химических объектов, использующий явление ядерного магнитного резонанса. Подобно инфракрасной спектроскопии, ядерный магнитный резонанс выявляет информацию о молекулярном строении химических веществ, но, в отличие от первого, позволяет изучать динамические процессы в образце: определять константы скорости химических реакций; величину энергетических барьеров внутримолекулярного вращения [1]. В зависимости от местного электронного окружения разные протоны в молекуле резонируют на слегка отличающихся частотах. Так как смещение частоты и основная резонансная частота прямо пропорциональны величине индукции магнитного поля, данное смещение преобразуется в независимую от магнитного поля безразмерную величину, известную как химический сдвиг. Химический сдвиг определяется как относительное изменение относительно некоторых эталонных образцов. Частотный сдвиг экстремально мал в сравнении с основной ЯМР-частотой. Типичный сдвиг частоты равен 100 Гц, тогда как базовая ЯМР-частота имеет порядок 100 МГц. Таким образом, химический сдвиг выражается в частях на миллион (ppm). Для того чтобы обнаружить такое маленькое различие частоты, приложенное магнитное поле внутри объема образца должно быть постоянным. В каждом химическом соединении (метаболите) протоны имеют характерное значение химического сдвига, зависящее от химического окружения соответствующей функциональной группы. Амплитуда в спектре (высота пиков) зависит, в свою очередь, от количества этих функциональных групп в каждой из молекул и от концентрации данного метаболита в исследуемом объекте [2, 3].

Первая работа по спектроскопическому исследованию живых тканей появилась в 1972 г., еще до того, как Лаутербург получил магнитно-резонансное изображение. С тех пор МР-спектроскопия является во многих лабораториях мира рутинным методом исследования и постепенно открывает новые возможности в изучении патофизиологии биологических объектов, в том числе человека [4]. Хотя еще в начале 1980-х гг. были описаны изменения фосфорных спектров при синдроме Мак-Ардла, представитель одной из фирм производителей МРТ-оборудования в 1990 г. заявил, что клинически эффективных областей применения МРС нет. Несмотря на это, исследования продолжались, данные накапливались и публиковались, и к 2005 г. в интернет-базе Стэнфордского университета США было выставлено уже более 2000 работ по этой теме. Однако говорить о широком применении метода в мире, и в России в частности, рано. Во-первых, пока недостаточно развита приборная и методическая база применения МРС в клинической практике. Во-вторых, как в любых смежных областях науки, спектроскописты уверены, что

“высокомерие невежд медиков тормозит развитие МРС”, а радиологи в ответ утверждают: “Спектроскописты произвели целое море ненужных данных, в которых утонула потенциально полезная для клиники информация ”[1].

В настоящее время наиболее разработаны и чаще используются два основных метода – фосфорная (31Р ЯМР-спектроскопия) и протонная спектроскопия (ПМР-спектроскопия) [5]. Метод фосфорной спектроскопии требует длительного времени пребывания пациента в высоком магнитном поле и довольно большого объема исследуемой ткани (50–100 см^3). Кроме того, типовые высокопольные МРТ-системы, применяемые в клинической практике, редко оснащены опцией 31Р-ЯМР-спектроскопии. Поэтому основным применяемым методом в клинической медицине является протонная спектроскопия по атому водорода (1Н), который обладает большей чувствительностью, содержит больший объем метаболической информации и, кроме того, требует меньших затрат времени, необходимого для получения спектра в магнитном поле напряженностью 1,5 Тл и более [6]. В экспериментальной медицине также используется спектроскопия на ядрах атомов углерода-13 (13С ЯМР-спектроскопия), фтора-19 (19F ЯМР-спектроскопия) и, как указано выше, – фосфора-31 (31Р ЯМР-спектроскопия). При проведении спектроскопии используются импульсные последовательности PRESS или STEAM. STEAM обладает более высокой разрешающей способностью по частоте, но она очень чувствительна к движениям пациента. У PRESS разрешающая способность несколько ниже, чем у STEAM, но она менее чувствительна к движениям (в том числе к естественной дыхательной экскурсии органа) [7].

Результаты протонной спектроскопии в клинической медицинской визуализации представлены: в виде спектроскопических данных, в виде “спектральной кривой” – “моментальный снимок” локального обмена веществ; таблиц концентраций основных метаболитов; метаболических карт, отражающих пространственное распределение концентрации определенных метаболитов в соответствии с анатомической структурой исследуемого объекта. МР-спектр содержит обширную информацию о веществе: положение пиков характеризует химический состав, их ширина отражает величину Т2 времени релаксации, площадь под резонансным пиком пропорциональна протонной плотности и по ней можно вычислить концентрацию метаболита. Соотношение между пиками метаболитов в спектре, уменьшение или увеличение высоты отдельных пиков спектра представляют собой своего рода “отпечатки пальцев” биохимии ткани, по ним можно неинвазивно оценивать биохимические процессы, происходящие в отдельно взятом объеме органа [4].

Для медицинских целей разработано два способа применения метода протонной спектроскопии в зависимости от пространственной локализации и объема источника информации: одновоксельная и мультивоксельная. Одновоксельная МРС получает спектр от заданного объема или вокселя, мультивоксельная – от каждой точки заданного изображения, всех вокселей, вошедших в поле среза объекта. Преимуществом мультивоксельной спектроскопии является возможность получить спектр не только из патологической зоны, но и сравнить его со спектром рядом расположенных вокселов (например, от неповрежденных участков). Однако данная методика требует значительных затрат времени и аппаратных ресурсов. Возможно, поэтому некоторыми производителями МРТ-оборудования она исключена из перечня доступных протоколов исследования. Следует также отметить, что внутривенное контрастирование препаратами гадолиния не влияет на результаты протонной спектроскопии [8].

Основными метаболитами, выявляемыми на протонных спектрограммах, являются:

N-ацетиласпартат (NAA) – это самый заметный пик в 1Н спектре, на протонной шкале представлен пиком 2,01 ppm. В действительности этот пик включает разные комбинации макромолекул с NAA: N-ацетил-аспартил-глутамат, гликопротеины, аминокислотные остатки белков и, следовательно, правильнее было бы называть его пиком “N-ацетиловой группы”. Принято считать, что в тканях NAA выполняет, по крайней мере, две основные функции: является предшественником липидов и участвует во взаимодействиях кофермента А [9]. Кроме того, установлено, что комплекс NAA выполняет протекторные, антитоксические и антиоксидантные функции, а также, возможно, участвует в процессе перекисного окисления липидов. N-ацетиласпартат содержится преимущественно внутри клеток и практически отсутствует во внеклеточном пространстве. Некоторые исследователи полагают, что NAA метаболически инертен и участвует только в поддержании баланса “дефицита анионов” в нейтральных тканях, а его основная функция – форма свободного хранения аспартата. Считается, что амплитуда пика NAA может характеризовать степень поражения ткани, эффективность проводимой терапии и активность процессов восстановления функциональной активности паренхимы [10–12]. Поскольку NAA синтезируется в митохондриях, теоретически предполагается, что истощение энергии без перманентных

повреждений, приводит к снижению концентрации NAA. Причем, чем выше степень истощения энергетического потенциала ткани (например, дегенеративно-дистрофические процессы, высокая степень злокачественности опухолевой массы), тем ниже пик N-ацетиласпартата [13].

В теоретическом аспекте можно сделать следующее предположение. Учтем основополагающий факт, что NAA является предшественником липидов и гликопротеинов. В опухолевой ткани имеет место высокая концентрация гликопротеинов, уменьшение интенсивности свободно-радикального окисления липидов и высокий показатель перекисного окисления липидов. Это связано с высокой потребностью опухолевых клеток в питательных веществах, в частности липидах, потребность которых многократно превышает метаболические потребности здоровых клеток. Также наблюдается избыточный синтез структурных онкобелков (на биохимическом уровне выявляется как феномен "опухоль – ловушка азота") и гликопротеинных комплексов, последний – как вариант защиты опухолевой клетки от иммунной "атаки" макроорганизма. Это объясняет снижение или вернее истощение концентрации NAA, так как последний полностью расходуется на синтез молекул гликопротеинов и липидов. Соответственно, чем выше потребность (степень злокачественности) опухолевой массы в структурных элементах, тем ниже пиковая концентрация N-ацетиласпартата.

Холин (Cho) синтезируется из пищи в две наиболее важные молекулы – ацетилхолин (ACho) и фосфатидилхолин (PtdCho). Пик холина на 3,21 ppm содержит совокупный вклад протонов триметиламмония (N(CH3)3+) в холине, бетаине и карнитине плюс протоны H5 миоинозитола и таурина. Связанные в мембране соединения холина могут быть не определяемы при МРС, однако при разрушении клеточных мембран, вызванных заболеваниями, приводящими к заметной локальной целлюлярности и часто к значительным повреждениям клеточных мембран, связанный холин высвобождается и накапливается в межклеточном пространстве. Накопление холина в злокачественных опухолях связано, вероятно, с тем, что его уровень пропорционален активности мембранного синтеза и имеет тенденцию к возрастанию при опухолях высокой степени злокачественности. Этот же факт подтверждает ряд исследований, в которых холин рассматривают как маркер скорости размножения клеток, соответственно, в том числе и опухолевых [9].

Пик креатина на 3,03 ppm обусловлен протонами метильной (CH3) группы креатина и фосфокреатина, лизина и глютатиона. Креатин частично поступает из пищи и синтезируется в печени, почках и поджелудочной железе. Оказалось, что фосфокреатин является основной молекулой поддержания энергозависимых систем в большинстве клеток организма. Креатинфосфат является энергетическим резервом в скелетных мышцах, нейронах, клетках паренхиматозных органов. Обычно предполагают, что общий уровень креатина стабилен при разных ситуациях, поэтому пик креатина часто используют в качестве референсного при сопоставлении с пиками других метаболитов, т. е. при анализе спектров пики остальных метаболитов (их повышение и снижение) оцениваются относительно Cr [14].

Лактат, обнаруживаемый по характерному дублету, расположенному в протонном МР-спектре вокруг 1,32 ppm, можно видеть в следовых количествах. Пик лактата (Lac) в норме не наблюдается, он появляется при нарушении процессов окисления, связанных с активацией реакций транспорта и утилизации молекул глюкозы. В совокупности с другими признаками может указывать на конкретный патологический процесс (опухоль, инсульт или врожденное нарушение метаболизма) и помогать при назначении специфического лечения [15].

В опухолевых клетках, на основе феномена "опухоль – ловушка углеводов", выявляются три важных закономерности метаболизма глюкозы, что непосредственно связано с возрастанием пиковой концентрации Lac на протонных спектрограммах.

Во-первых, в опухолевой клетке отмечается резкое возрастание включения глюкозы в реакции гликолиза.

Во-вторых, определяется устранение феномена торможения гликолитического окисления глюкозы в аэробных условиях (отрицательный эффект Пастера). Это обусловлено снижением активности цитоплазматической глицерофосфатдегидрогеназы при одновременной существенной активации лактатдегидрогеназы, что обусловливает интенсивное накопление опухолевой тканью молочной кислоты.

В-третьих, в раковой клетке отсутствует феномен активации потребления глюкозы в процессе тканевого дыхания, что ведет к уменьшению относительной доли последнего при ресинтезе АТФ [10].

В том случае, когда при протонной МРС используется короткое TE, в МР-спектрах появляются несколько небольших пиков в районе 2,1 и 2,4 ppm, соответствующих протонам в глутамине и глутамате (Glx) [15].

Глутамин (2-аминопентанамид-5-овая кислота) – "король аминокислот", одна из 20 стандартных аминокислот, входящих в состав белка. Глутамин полярен, не заряжен и является амидом

моноаминодикарбоновой глутаминовой кислоты, образуясь из нее в результате прямого аминирования под воздействием глутаминсинтетазы. Его концентрация в крови составляет 500–900 мкмоль/л, что выше концентрации любой другой из известных аминокислот, в мозговой ткани концентрация глутаминовой кислоты может достигать 10 ммоль/л. Во внеклеточной жидкости, глутамин составляет около 25 % от всего пула свободных аминокислот [16].

Глутамин служит не только для синтеза белка, но и является важным компонентом различных метаболических процессов. Так, последний служит межорганным транспортером азота в организме. Примерно 1/3 всего азота транспортируется в крови в виде глутамина. Большая часть азота используется в мышечных клетках для синтеза глутамина, который является нетоксичным переносчиком аммония из периферических тканей к внутренним органам. Глутамин – главный субстрат для синтеза мочевины в печени и аммониогенеза в почках. В митохондриях с участием глутаминазы глутамин может превращаться в глутамат с образованием аммония.

Гидролиз глутамата с участием фермента глутамат-дегидрогеназы до альфа-кетоглутарата также сопровождается образованием аммония, который используется в печени для синтеза мочевины. Глутамин, как межорганный переносчик азота, имеет важное значение в экскреции азотистых шлаков и поддержании кислотно-основного гомеостаза. В почках с участием почечного изофермента глутаминазы глутамин используется для аммониогенеза с потреблением H+. Глутамин играет важную роль в различных реакциях трансаминирования, поэтому может быть классифицирован как истинный регулятор аминокислотного баланса [16].

Доказано, что глутамин играет ключевую роль в регуляции синтеза глутатиона – трипептида, состоящего из глутамата, цистеина и глицина. Глутатион защищает клетки от окислительного повреждения и активно участвует в перекисном окислении липидов. Глутамин является внутриклеточным источником глутамата, а также регулирует трезмембранный обмен глутамата, образованного внутриклеточно из глутамина, и внеклеточного цистеина. При стресс-факторах, когда в тканях повышено содержание свободных радикалов, повреждающих клетки, потребность в глутамине увеличивается [16].

Глутамин – важный источник углерода и азота для различных субстратов. Он используется непосредственно для синтеза белка и служит предшественником для синтеза других аминокислот. Аминогруппа, получаемая при гидролизе глутамина до глутамата, используется в различных реакциях трансаминирования, включая синтез аланина из пирувата, синтез аспарагиновой кислоты из оксалоацетата, синтез фосфосерина, гидролизуемого с образованием серина. Глутамат в дальнейшем может подвергаться реакции дезаминирования с образованием пролина. Альфа-кетоглутарат, образуемый с участием фермента глутамат-дегидрогеназы в цикле Кребса, через оксалоацетат принимает участие в синтезе аспартата и других аминокислот. Глутамин – донатор азота для синтеза аминосахаров, пуринов и пиримидинов, используемых для синтеза азотистых оснований, входящих в состав дезоксирибонуклеиновой (ДНК) и рибонуклеиновой (РНК) кислот, необходимых для пролиферации клеток и синтеза белков. Синтез жирных кислот и мембранных фосфолипидов также происходит с участием метаболитов глутамина, в том числе субстрата цикла Кребса ацетил-кофермента А, предоставляющим ацетильные группы. Считается, что поступление глутамина в клетки мышц и печени повышает их гидратацию и служит как анаболический пролиферативный сигнал [16].

Доказано, что быстроделящиеся клетки слизистой оболочки кишечника, поджелудочной железы, легочных альвеол и клетки иммунной системы, используют глутамин для энергетических и пластических нужд. Соответственно, к быстроделящимся клеткам с высокой пластической и энергетической потребностью относятся и клетки злокачественных опухолей. При внутриклеточном окислении глутамина образуется АТФ, общее количество энергии зависит от доступности глутамина и степени его окисления. Например, лимфоциты используют глутамин для энергии в большей степени после митогенной стимуляции. В физиологических условиях, окисление глутамина дает около 1/3 энергии этим клеткам, при патологических реакциях окисление глутамина может значительно увеличиваться [16].

При критических состояниях свободный глутамин истощается очень быстро, и организм компенсирует уровень свободного глутамина за счет распада белков мышечной ткани и повышенного синтеза глутамина. Причина развития дефицита глутамина – большое количество метаболических реакций и функций, которые прямо или косвенно зависят от глутамина, и резко возросшая потребность в нем быстропролиферирующих клеток.

При состояниях гиперкатаболизма и гиперметаболизма нарушается баланс между продукцией и потреблением глутамина. Высказываются предположения, что повышенное потребление глутамина при стрессовых ситуациях (в том числе онкологических заболеваниях) позволяет сэкономить глюкозу для органов, которые облигатно исполь-

зуют ее для выработки энергии: мозг, эритроциты, костный мозг и грануляционная ткань. Глутамин может также использоваться для глюконеогенеза в печени. Транспорт глутамина через печень зависит от различных факторов. Физиологические концентрации аммония в "портальной" крови стимулируют печеночную глутаминазу, следовательно, потребление глутамина возрастает. При метаболическом ацидозе глутамин "проходит" через печень и в большем количестве используется почками, при этом печеночный уреогенез снижен, но увеличивается аммониогенез в почках для выведения избыточного количества H+ [16].

Функционирование иммунной системы также во многом зависит от доступности глутамина. Катаболический стресс, вызывая дефицит глутамина, нарушает функцию иммунной системы. Показано, что потребление глутамина пролиферирующими клетками иммунной системы увеличивается в 10 раз по сравнению с другими клетками организма. Глутамин является незаменимым субстратом для нормального функционирования гуморального и клеточного иммунитета. Исследования in vitro показали, что недостаток глутамина в среде тканевой культуры резко ограничивает способность лимфоцитов отвечать на митогенную стимуляцию. Снижение пролиферации лимфоцитов при недостатке глутамина может быть связано с его использованием как предшественника для биосинтеза нуклеотидов, ДНК и РНК и как важного источника энергии. В клетках системы фагоцитирующих мононуклеаров глутамин необходим для транскипции генов секреторных протеинов и цитокинов при антигенной стимуляции, а также для синтеза фосфолипидов для поддержания активности мембран во время пиноцитоза или фагоцитоза [16].

На данный момент в научной литературе накоплены данные по многим спектроскопическим картинам, однако большинство из них характеризуют опухоли головного мозга различной степени злокачественности и гистологической структуры. В общих чертах известно, что доброкачественные медленно растущие опухоли характеризуются высоким пиком Cho на фоне практически полной редукции пиков других метаболитов и отсутствия пика NAA. В спектре злокачественных опухолей обнаружены снижение соотношения пиков NAA/Cr, повышение соотношения пиков Cho/Cr и наличие пика Lac различной высоты. В опухолях высокой степени злокачественности отмечается значительно более выраженный пик Lac, на фоне значительного снижения NAA и повышения Cho, в отдельных случаях определяются значительная редукция пиков основных метаболитов, выраженное увеличение пика лактата и появление пика липидов (Lip). Основное значение в определении степени злокачественности опухолей отводится пикам Cho и NAA относительно пика Cr. Большинство исследований соотношения пиков указанных метаболитов в спектрах опухолей II, III и IV степеней злокачественности установило, что изменение показателя Cho/NAA прямо пропорционально степени злокачественности опухоли [17–21].

Вышеизложенные факты позволяют утверждать, что метаболизм опухолевых клеток, вне зависимости от их гистологической структуры и локализации, имеет идентичные отличительные черты от здоровой ткани и, соответственно, протонная МР-спектрометрия может быть актуальна для опухолей любой локализации. Естественно, МР-спектроскопия по водороду не в состоянии выявить весь спектр атипии метаболизма раковой клетки, однако на основании определения пиковой концентрации основных метаболитов метод в состоянии определить опухолевую природу изменений и косвенно дать оценку степени злокачественности атипичной ткани.

Литература

1. *Ринк П.А.* Магнитный резонанс в медицине / П.А. Ринк. М.: ГЕОТАР-мед, 2003.
2. *Лундин А.Г.* ЯМР-спектроскопия / А.Г. Лундин, Э.И. Федин. М.: Наука, 1986. 223 с.
3. *Сергеев Н.М.* Спектроскопия ЯМР / Н.М. Сергеев. М.: МГУ, 1981, 279 с.
4. *Подопригора А.Е.* Протонная магнитно-резонансная спектроскопия в диагностике опухолевых и неопухолевых поражений головного мозга / А.Е. Подопригора, И.Н. Пронин, Л.М. Фадеева // Мед. виз. 2000. № 4. С. 86–92.
5. *Rink P.A.* Introduction into Magnetic Resonance in Medicine. Stuttgart; New York: Theme Medical Publishers Inc., 1990; 228 p.
6. *Корниенко В.Н.* Диагностическая нейрорадиология / В.Н. Корниенко, И.Н. Пронин. М., 2008. Т. I. С. 54–59.
7. *Diehl P., Fluck E., Gunther H. et al.* NMR. Basic principles and progress in vivo Magnetic resonance spectroscopy III: In vivo Magnetic resonance spectroscopy III: potential and limitations. Berlin; Heidelberg; New York: SpringerrVerlag, 1992; 190 p.
8. *Smith J.K., Kwock L., Castillo M.* Effects of Contrast Material on Single volume Proton MR Spectroscopy // Am. J. Neuroradiol. 2000. V. 21. P. 1084.
9. *Семенова Н.А.* Метод ЯМР-спектроскопии в прижизненных исследованиях обменных процессов. Особенности энергетического метаболизма головного мозга по данным ЯМР in vivo. Успехи современной биологии РАН. 2005; 125: 419–430.

10. *Gunther H.* NMR Spectroscopy. Chichester: Wiley, 1995; 602 p.
11. *Pan J.W., Takahashi K*. Interdependence of N-actyl-aspartate and high-energy phosphates in healthy human brain // Ann. Neurol. 2005; 57: 92–97.
12. *Madhavarao C.N., Chinopoulos C., Chandrasekaran K. et al.* Characterization of the N-acetyl-aspartate biosynthetic enzyme from rat brain // J. Neurochem. 2003; 86: 824-835.
13. *Simmons M.L., Frodonza C.G. and Coyle J.T.* Immunocytochemical localization of N-acetyl-aspartate with monoclonal antibodies. Neuroscience. 1991; 45: 37745.
14. *Bulakbasia N., Kocaoglua M., Wrsa F. et al.* Combination of Single Voxel Proton MR Spectroscopy and Apparent Diffusion Coefficient Calculation in the Evaluation of Common Brain Tumors // Am. J. Neuroradiol. 2003. V. 24. P. 225–233.
15. *Семенова Н.А*. Перспективы магнитно-резонансной спектроскопии как метода диагностики в невропатологии / Н.А. Семенова, Т.Ф. Ахадов, С.Л. Ситников и др. // Медицинская визуализация. 2009. № 2. С. 73–81.
16. *Ложкин С.Н.* Глутамин и его роль в интенсивной терапии / С.Н. Ложкин, А.Д. Тиканадзе, М.И. Тюрюмина // Вестник интенсивной терапии. 2003. № 4. Клиническое питание.
17. *Claus F.G., Hricak H., Hattery R.R.* Pretreatment Evaluation of Prostate Cancer: Role of MR Imaging and 1H MR Spectroscopy // RadioGraphics. 2004. V. 24. P. S167–S180.
18. *Fausto A., Carpinelli G. et al*. Proton MR spectroscopy of breast tumors: in vivo 1,55T and ex vivo 9,44T studies. Millan/IT, ECRR 2006. C. 811.
19. *Tse G.M.K., Cheung H.S., Pang L.M. et al.* Characterization of Lesions of the Breast with Proton MR Spectroscopy: Comparison of Carcinomas, Benign Lesions, and Phyllodes Tumors // Am. J. Roentgenol. 2003. V. 181.P. 1267.
20. *Wang C.K., Li C.W., Hsieh T.J. et al.* Characterization of Bone and Soft Tissue Tumors with in Vivo 1HMR Spectroscopy: Initial Results // Radiology. 2004. V. 232. P. 599–605.
21. *Cho S.G., Kim M.Y., Kim H.J. et al*. Chronic Hepatitis: In Vivo Proton MR Spectroscopic Evaluation of the Liver and Correlation with Histopathologic Findings // Radiology. 2001. V. 221. P. 740.