

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЯМР В ИССЛЕДОВАНИЯХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

**М.В. Гуляев, Н.В. Анисимов,
Г.М. Юсубалиева, Н.А. Брусенцов,
А.А. Самойленко, Ю.А. Пирогов**

Сообщается о применении методов ЯМР-спектроскопии и МР-томографии (в магнитном поле 7 Тл) для исследования глиальных опухолей в рамках их моделирования на лабораторных животных – мышах и крысах. Даны примеры анализа спектральной информации, релаксационных измерений, МР-визуализации, применения контрастных и биологически активных веществ.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография, спектроскопия ЯМР, глиома, лабораторные животные, контрастные агенты, биологически активные вещества.

It is reported on the application of magnetic resonance methods – NMR spectroscopy and MR imaging (in magnetic field 7 Tesla) for the study of glial tumors in their simulation in laboratory animals – mice and rats. There are given an examples of spectral analysis, relaxation measurements, MR visualisation, the use of contrast agents and bioactive substances.

Keywords: magnetic resonance imaging, NMR spectroscopy, glioma, laboratory animals, contrast agents, bioactive substances.

Для изучения глиальных опухолей человека применяется их моделирование на малых лабораторных животных. Моделирование осуществляется путем инвазии в мозг-мышцы или крысы штаммов глиомы, например, глиомы С6, как аналога глиобластомы человека [1]. На животных отслеживается динамика роста опухоли, совершенствуются методы ее диагностики и визуализации. В рамках моделирования апробируются новые контрастные и биологически активные вещества, лекарственные препараты.

На магнитно-резонансном томографе BioSpec 70/30 («Брукер») (7 Тл) проводились исследования по изучению глиомы С6 и глиомы 101.8 методами локальной ЯМР-спектроскопии и МР-томографии. Проводилась апробация железосодержащих негативных контрастных агентов, исследовалось воздействие биологически активных веществ – аминокислоты и глюкозы. Некоторые технические аспекты этих работ и предварительные результаты изложены ниже.

МРТ-визуализация глиомы

Глиомы С6 и 101.8 хорошо визуализировались на Т2-взвешенных изображениях (Т2ВИ) благодаря разнице во временах поперечной релаксации Т2 по сравнению с белым веществом мозга.

© Авторы, 2013

**Михаил Владимирович
Гуляев –**

соискатель,
физический факультет,
МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: mihon-epsilon@yandex.ru

**Николай Викторович
Анисимов –**

д.ф.-м.н., ст. науч. сотрудник,
факультет фундаментальной
медицины,

МГУ им. М. В. Ломоносова

E-mail: anisimovnv@mail.ru

**Гаукхар Маратовна
Юсубалиева –**

к.м.н., ст. науч. сотрудник,
Институт судебной психиатрии
(ГНЦ ССП) им. М.В. Сербского
(Москва)

E-mail: gaukhar@gaukhar.org

**Николай Антонович
Брусенцов –**

д.ф.н., вед. науч. сотрудник,
Российский онкологический
научный центр

им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва)

E-mail: brusentsov2005@yandex.ru

**Андрей Андреевич
Самойленко –**

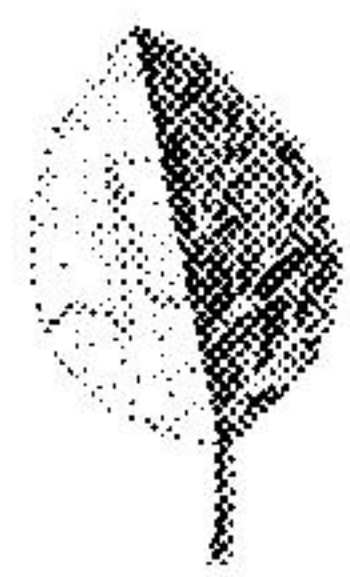
к.х.н., зав. лабораторией,
Институт химической физики
им. Н.Н. Семёнова РАН
(Москва)

E-mail: sam_nmr@chph.ras.ru

**Юрий Андреевич
Пирогов –**

д.ф.-м.н., профессор,
физический факультет,
МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: yupi38@gmail.com



Различия в протонной плотности (PD) и времени продольной релаксации (T1) для глиомы и нормальных тканей менее выражены. Это отчетливо видно на параметрических картах, построенных по изображениям, полученных методом спинного эха при варьировании параметров TR и TE в пределах 0,95...5,0 с и 13...170 мс, соответственно (рис. 1).

При введении в организм животного Gd-агента – вещества, содержащего парамагнетик (Магневист фирмы «Шеринг»), хорошая визуализация глиомы получается и на T1ВИ. Эффект возникает из-за того, что в зоне опухоли у клеток мозга ослаблен гематоэнцефалический барьер. Это способствует проникновению в указанную зону парамагнетика, из-за чего у тканей здесь сокращается время T1.

В последнее время проводятся интенсивные исследования контрастных веществ, содержащих железо (Fe) или марганец (Mn), которые проявляют себя как негативные контрастные агенты, снижающие сигнал от нормальных тканей за счет сокращения T2*, что позволяет лучше выявить зону опухоли и сосуды, ее питающие [2]. При накоплении Fe-содержащего препарата по периферии опухоли создаются условия для их удержания в этой зоне с помощью градиентных магнит-

ных полей и лечения опухоли методом химиотерапии, в том числе с использованием гипертермии, которую можно обеспечить за счет радиочастотного (РЧ) нагрева [3].

В наших исследованиях в качестве Fe-содержащего препарата применялся декстран-магнетит (ДМ) – смесь наночастиц размером 120...240 нм, каждая из которых содержит ядро – кристалл Fe_3O_4 , окруженный молекулами декстрана – полисахаридами с молекулярной массой ~70 кДа. Препарат изготовлен в лаборатории РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Особенностью ДМ является значительное время внедрения в организм – более 24 ч и медленное выведение из организма за счет метаболизма – от нескольких суток до нескольких месяцев для разных органов. Ранее апробация ДМ проводилась авторами при исследовании подкожных опухолей – карциномы, меланомы. Отмечалось накопление препарата по периферии опухолей, что давало основания применить препарат и при исследовании опухолей головного мозга.

Исследовалась крыса с 7-дневной глиомой С6. Применение Gd-агента позволило уточнить локализацию глиомы, особенно на T1ВИ и выявить зону, по периферии которой отмечалось слабо выраженное снижение МР-сигнала на всех режимах сканирования до введения контраста (рис. 2).

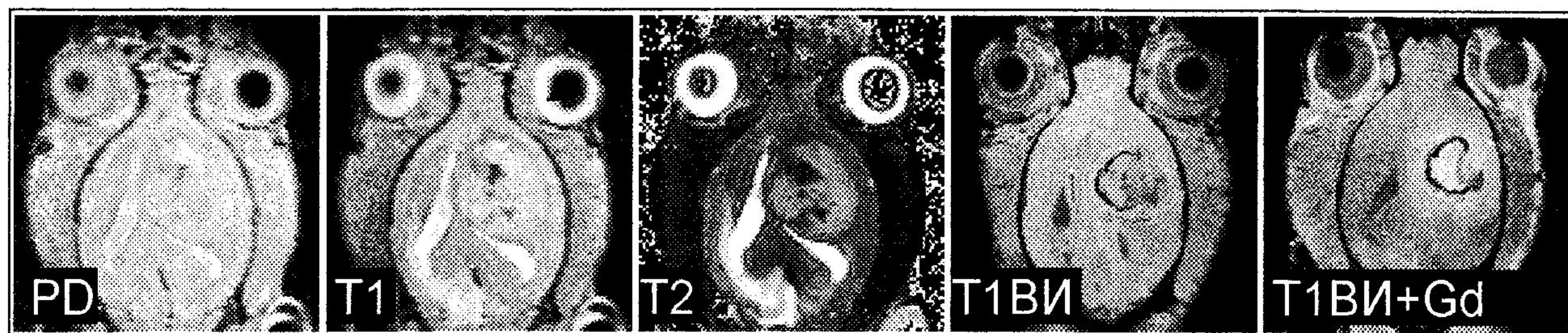


Рис. 1. Слева и в центре: карты – PD, T1, T2. Справа – T1ВИ до и после введения Gd-содержащего контрастного агента Магневист («Шеринг»)

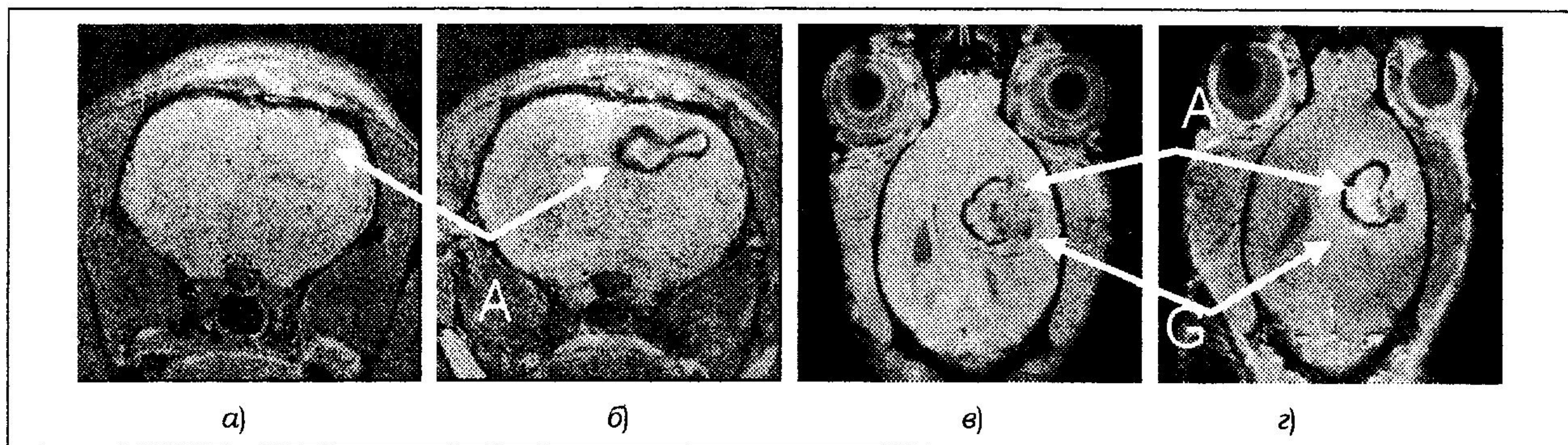


Рис. 2. Зона распада глиомы – А и ее периферии – G на T1ВИ при введении контрастных веществ: а и б – до и после введения ДМ; в и г – до и после введения Gd-агента



Введение Gd-агента сразу приводило к повышению сигнала по периферии зоны. При этом продолжительность эффекта не превышает 1 ч, поскольку Gd-агент после этого выводится из организма. Внутривентрикулярное введение ДМ (75 мкл) позволило уже четко (и надолго) выявить эту зону по существенному снижению МР-сигнала на всех режимах сканирования. Отметим, что этот эффект проявился лишь на следующий день после введения ДМ в организм животного, что соответствует известным данным о времени его введения в организм и метаболизации.

Проблемная зона исследовалась методом локальной ЯМР-спектроскопии. Отмечался рост пика лактата и липидов со временем. При введении ДМ зарегистрировано уширение спектральных линий до 24...28 Гц через 1–2 дня после введения ДМ с последующим восстановлением ширины линии до 12...13 Гц примерно через 5–6 дней. Это согласуется с данными о динамике циркуляции ДМ в организме животного, а потому давало веские основания считать, что снижение сигнала по периферии проблемной зоны связано с накоплением частиц железа.

На это же указывали данные магнитометрических измерений с использованием индукционного магнетометра, произведенного сотрудниками ИОФ РАН. Измерения выявили наличие в голове крысы 19 ± 4 мкг ДМ. В то же время магнитометрические измерения для всей головы, проведенные для нормальной крысы и крысы с глиомой, не выявили существенной разницы в количестве обнаруженных частиц ДМ (~20 мкг при введенной внутривентрикулярно дозе 0,2 мкл). Это указывает на особую избирательность их локализации в зоне поражения.

Особое внимание проблемной зоне было уделено в связи с тем, что она первоначально интерпретировалась как абсцесс, капсула которой стала зоной концентрации железосодержащих частиц. Однако гистопатологический анализ, проведенный на биологическом факультете МГУ, подтвердил гипотезу о том, что проблемная зона действительно является продуктом распада опухоли.

Следует признать, что проникновение ДМ в глиому С6 не зафиксировано, что, возможно, связано со слишком большим разбросом в размерах наночастиц, представленных в данном конкретном препарате. Однако

данные о динамике накопления ДМ в зоне распада опухоли можно использовать для оценки эффективности применения ДМ в качестве контрастного препарата.

Анализ метаболитов по данным локальной *in vivo* ЯМР-спектроскопии

Если МР-изображения регистрировались стандартными методами, то съемка спектров имела специфику для протонов и отличных от них ядер. Отметим их.

Возбуждение сигналов ЯМР протонов (300 МГц) производилось от резонатора диаметром 20 см, а регистрация сигналов – с помощью поверхностной катушки, адаптированной для съемки головы крысы. (Эта же конфигурация использовалась и для получения изображений.) Локализация ^1H -спектров обеспечивалась путем эффективного уменьшения объема за счет применения в импульсной последовательности PRESS (Point Resolved Spectroscopy) градиентных полей. При съемке ^1H -спектров применялось частотно-селективное подавление мощного пика воды.

Для регистрации спектров от ядер ^{31}P и ^{13}C в качестве приемопередающего датчика использована поверхностная катушка диаметром 2 см. Ее позиционирование относительно «зоны интереса» определяло локализацию спектров. Спектры регистрировались с помощью обычной одноимпульсной последовательности. Объект исследования вместе с катушкой помещались внутри резонатора, который использовался для передачи РЧ-мощности на протоны, если регистрация ядер ^{31}P и ^{13}C производилась с развязкой от протонов (decoupling).

Анализ ^1H -ЯМР-спектров. В спектре протонов наиболее отчетливо регистрировались метаболиты: N-ацетиласпартат (NAA), холин (Cho), креатин (Cr), лактат (Lac), сигнал от липидов (Lip). Сопоставление спектров нормального участка мозга и зоны поражения при глиоме С6 показывали существенное повышение пиков лактата и липидов. Отмечается рост этих пиков со временем (рис. 3). Заметно снижение пика N-ацетиласпартата и креатина, а также соотношений NAA/Cr (до 0.9), NAA/Cho (до 0.38); Cr/Cho (до 0.29).

Полученные данные хорошо коррелируют с данными, полученными при исследова-



нии глиобластомы человека [4]. Это указывает на адекватность моделирования данной опухоли с помощью глиомы C6, имплантируемой малым животным.

Помимо интенсивностей пиков измерялась ширина линий спектра для оценки времени поперечной релаксации T_2^* в зоне поражения при исследовании головного мозга животного, пораженного глиомой C6. Такие измерения оказались полезны при проведении экспериментов с введением в организм животного контрастного агента – декстран-магнетита – по уширению линий спектра выявилось накопление железосодержащих частиц в зоне распада опухоли, представленной на МРТ-изображении изоинтенсивными фрагментами.

Анализ ^{31}P -ЯМР-спектров. В спектре фосфора ^{31}P (121 МГц) надежно регистрировались метаболиты: фосфомоноэфир (PME), неорганический фосфат (Pi), фосфодиэфир (PDE), фосфокреатин (PCr), аденозин трифосфат (ATP - α, β, γ).

Сравнивая спектры ^{31}P для нормального мозга и мозга, пораженного глиомой C6,

можно отметить подавление пика PME и возрастание пика Pi (рис. 4).

Аналогичный эффект известен из данных по исследованию мозга человека при сопоставлении спектров, полученных от нормального мозга и мозга, пораженного анапластической астроцитомой [5].

Можно отметить, что, несмотря на сравнительно грубую локализацию спектра, ^{31}P -ЯМР-спектроскопия оказывается достаточно информативной для оценки состояния головного мозга, поскольку отражает основные закономерности, характерные для его поражения глиомой C6.

Анализ ^{13}C -ЯМР-спектров. Из-за низкой чувствительности, обусловленной низким естественным содержанием изотопа ^{13}C , анализ метаболитов представляется малоэффективным. Большее развитие получили исследования с введением в животное биологически активных веществ, в молекулах которых произведено замещение изотопа ^{12}C на ^{13}C . Авторы применяли для этого обогащенные по ^{13}C δ -аминолевулиновую кислоту и D-глюкозу.

На рис. 5,а представлен ^{13}C -спектр от головы мыши после внутривенного введения

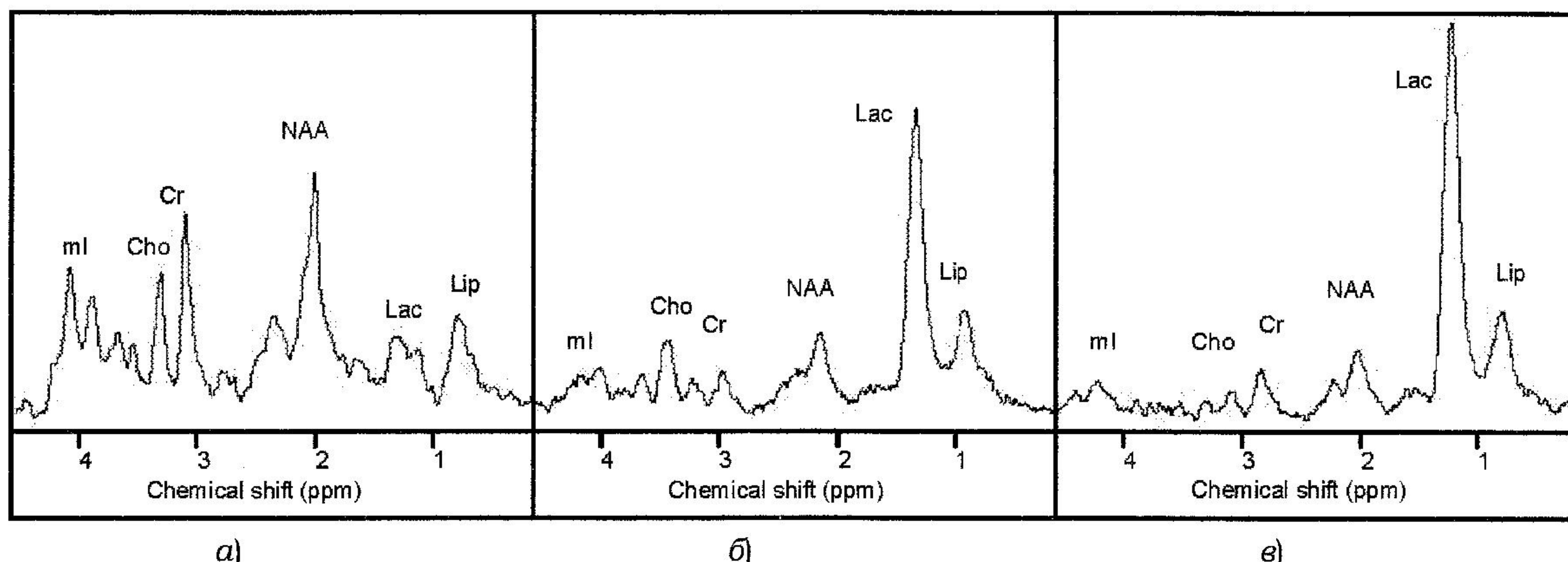


Рис. 3. Спектры ^1H от двух участков мозга крысы размером $2,5 \times 2,5 \times 2,5$ мм: а – норма; б и в – глиома после ее инвазии соответственно через интервалы 7 и 14 дней

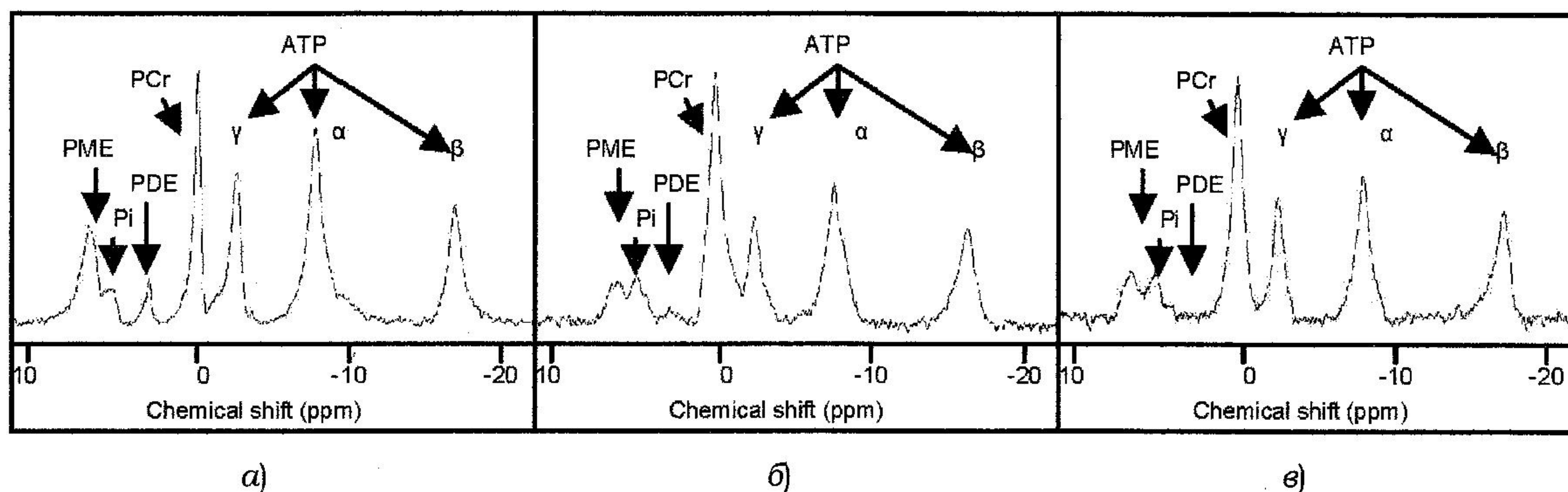


Рис. 4. Спектры ^{31}P спустя разное время после инвазии глиомы: 0 (а), 7 (б), 14 (в) дней

δ-аминолевулиновой кислоты, обогащенной по двум позициям. Была выявлена корреляция между интенсивностью сигналов и степенью поражения органов. Практика показала, что в качестве эталона для калибровки интенсивности линий спектра удобно использовать «жировой пик $(CH_2)_n$ ». Этот мощный сигнал присутствует в спектре ткани вне зависимости от того, вводилась ли глюкоза или другое вещество. При этом его вариабельность не может быть сколько-нибудь значительной, поскольку структура жировой ткани слабо зависит от состояния организма.

На рис. 5 приведены спектры ЯМР ^{13}C (75 МГц), полученные с применением поверхностной катушки, размещенной вблизи голо-

вы мышцы, после введения 50 мг глюкозы полностью обогащенной по ^{13}C . Спектр (б) получен от мыши, которой 7 дней ранее была пересажена глиома С6, спектр (в) – от нормальной мыши. В случае (б) при сканировании применялась гетероядерная развязка от протонов – $^{13}C\{^1H\}$, которая способствует повышению сигнал/шум за счет трансформации мультиплетов в синглеты. Несмотря на это, сигнал от глюкозы оказался ниже по сравнению с «жировым» пиком, чем в случае (в), когда повышение сигнала к шуму достигалось лишь за счет эффекта Оверхаузера – РЧ-насыщение протонных переходов перед считыванием сигналов ^{13}C .

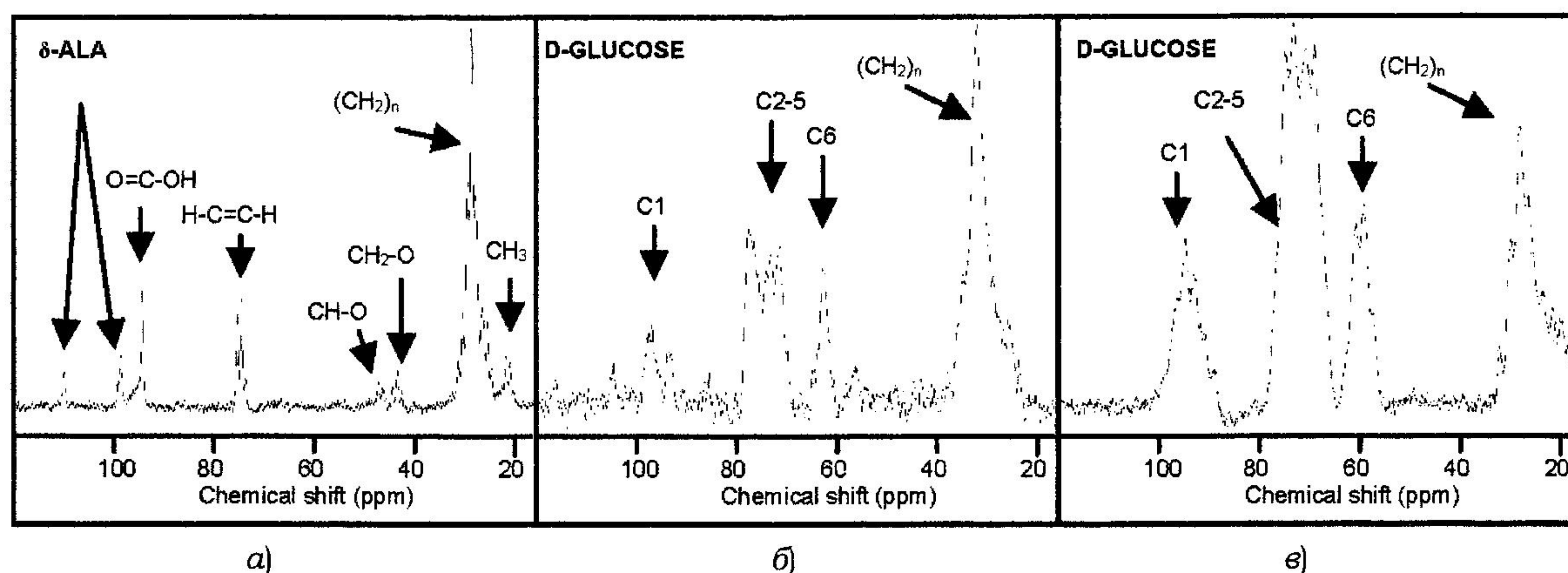
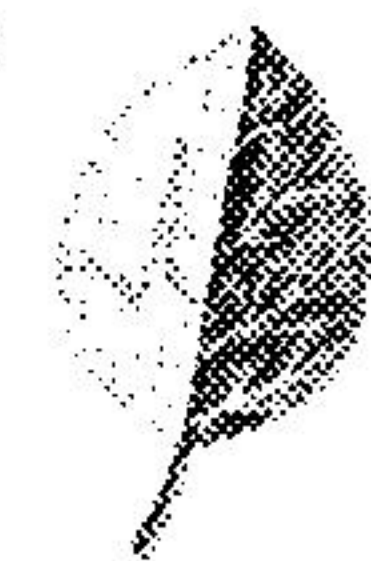


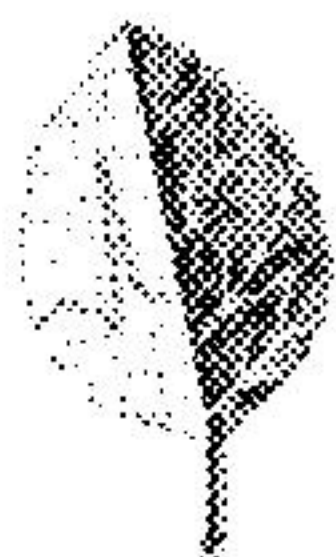
Рис. 5. Спектры ^{13}C от головы мыши: после инъекции δ-ALA (а); после инъекции глюкозы при поражении мозга глиомой С6 (б) и норме (в)

Предполагалось проследить эволюцию сигналов глюкозы с целью сопоставления метаболической динамики для нормальной мыши и мыши с глиомой [6]. Кроме того, предполагалось найти корреляцию между потреблением глюкозы и размерами опухоли. Эксперименты показали, что вариабельность сигнала ЯМР ^{13}C от введенного вещества слишком велика для того, чтобы делать вывод о взаимосвязи вводимого количества вещества и размером зоны поражения. Это может быть связано с индивидуальными особенностями восприятия организмом вводимого вещества. Из-за отсутствия оборудования для газовой анестезии применялось введение подкожного препарата хлоральгидрата, действие которого не превышало 30...40 мин. За этот период не удалось проследить динамику метаболических процессов, временной масштаб которых более 1 ч. Удалось зарегистрировать слабо выраженные сигналы глутамата и лактата.

Полезный результат состоит в том, что наработан опыт *in vivo* регистрации ЯМР спектров ^{13}C , включая эксперименты с внутривенным введением биологических веществ. Регистрация сигналов ЯМР проведена с помощью поверхностной катушки, обеспечивающей пространственную локализацию. При этом съемка спектров ^{13}C проведена с развязкой от протонов, но без перегрева животного.

Авторы планируют использовать газ «Фуран» для долговременной анестезии животных и проследить динамику метаболических процессов глюкозы по ЯМР-спектрам ^{13}C , и 2D , для чего задействовать обогащенные по данным изотопам препараты.

Авторы признательны Т.А. Егоровой (Protein Labelling Innovation) за полезные консультации и содействие в приобретении изотопно обогащенных образцов глюкозы. Необходимо отметить вклад Д.Н. Силачева (биофак МГУ) за гистопатологический анализ и М.П.Никитина (ИОФ РАН) за магнитометрические измерения.



Литература

1. Grobben B., De Deyn P.P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion // *Cell Tissue Res.* 2002. V. 310 (3). P. 257–270.
2. Wickline S.A., Neubauer A.M., Winter P.M., Caru-sels S.D., Lanza G.M. Molecular imaging and therapy of atherosclerosis with targeted nanoparticles // *JMRI*/ 2007. V. 25 (4). P. 667–680.
3. Brusentsov N.A., Pirogov Y.A., Anisimov N.V., Polianski V.A., Lichinicer M.R., Golubeva I.S., Gulyaev M.V., Nikitin M.P., Brusentsova T.N., Nikitin P.I., Verkhoglazova E.V. Combined MRI-adaptive Magneto-thermo-polychemotherapy for Improved Cancer Treatment // *Am. Inst. Phys.* 2010. V. 1311. P. 447–452.
4. Howe F.A., Barton S.J., Cudlip S.A., Stubbs M., Saunders D.E., Murphy M., Wilkins P., Opstad K.S., Doyle V.L., McLean M.A., Bell B.A., Griffiths J.R. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo ^1H magnetic resonance spectroscopy // *Magn. Reson. Med.* 2003. V. 49(2). P. 223–232.
5. Maintz D., Heindel W., Kugel H., Jaeger R., Lackner K.J. Phosphorus-31 MR spectroscopy of normal adult human brain and brain tumours // *NMR Biomed.* 2002. V. 15 (1). P. 18–27.
6. Zwingmann C., Leibfritz D. Regulation of glial metabolism studied by ^{13}C -NMR // *NMR Biomed.* 2003. V. 16(6–7). P. 370–399.

Поступила 25 октября 2012 г.

THE USE OF NMR METHODS IN STUDIES OF GLIAL TUMORS AT LABORATORY ANIMALS

© Authors, 2013

M.V. Gulyaev, N.V. Anisimov, G.M. Yusubalieva, N.A. Brusentsov, A.A. Samoylenko, Yu.A. Pirogov

Methods of a nuclear magnetic resonance (NMR): high resolution NMR- spectroscopy *in vivo* and the MR-imaging in a magnetic field of 7 Tesla were applied to research glial tumors by their modelling on laboratory animals – mice and rats. Tumoral analogs of human glioblastoma - glioma C6 and a glioma 101.8 implanted in the brain of small laboratory animals were modelled.

Dynamics of development of tumors was traced by MRI, NMR spectroscopy and histopathology analysis which were made at Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University. By MRI research were compared T1- and T2-weighted images received before and after introduction of MR contrast substances containing gadolinium (Magnevist from «Schering») and iron (dextran magnetite produced by Blokhin Russian Oncology Science Center). The useful result is marked from combined application of these substances for the best visualization of a tumor and products of its disintegration.

NMR spectra of protons ^1H , phosphorus ^{31}P and carbon ^{13}C were received. Proton spectra were registered with water signal suppression and by use of pulse sequence PRESS where gradient fields are used for small volume localization. As for nucleus other than protons, small surface coils were used for space localization of received spectra. ^1H and ^{31}P spectra were used for registration of the main metabolites. The intensities of their peaks were used as indicators of tumor growth. Similar dynamics of these peaks is marked at evolution of glial tumors for rats and man. As for experiments with introduction of dextran-magnetite as MR contrast agent, presence of iron in brain was estimated by measuring the width of peaks in ^1H spectra. Presence of iron in head was also fixed by means of inductive magnetometer produced by Prokhorov General Physics Institute (RAS).

The spectroscopy ^{13}C was applied for registration of signals from biologically active (BA) substances – amino-levulinic acid and D-glucose, entered intravenously in a mouse. Isotope ^{13}C enriched substances were used. On intensity of spectrum lines and their comparison with the lipid peak it was supposed to detect correlation between consumption of BA substance and the size of a tumor. On the spectra which were registered at certain intervals of time it was supposed to track metabolism of BA substances for normal mice and mice with provoked tumor.

Experiments showed that the spectral data about consumption of BA substances are too variable. Probably it can be connected with specific features of an individual. Because of relatively short time of anesthesia action (hypodermic introduction of chloral hydrate) only separate indications of metabolism of glucose were received. There were slightly evident peaks of lactate and glutamate. It is supposed to continue the research but using long-term gas anesthesia.