

На правах рукописи

Ублинский Максим Вадимович

ЯМР *in vivo* как метод исследования биохимических и биофизических процессов головного мозга человека в норме и психопатологии (на примере шизофрении)

03.01.02 - Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

Научный руководитель: доктор биологических наук
Семенова Наталия Александровна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Пирогов Юрий Андреевич,
профессор физического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»

кандидат биологических наук
Ушаков Вадим Леонидович,
ведущий научный сотрудник Курчатовского
комплекса НБИКС-технологий Федерального
государственного бюджетного учреждения
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт биофизики
клетки» Российской академии наук.

Защита диссертации состоится « » 2016 г. в 12.00 часов на
заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 в Федеральном
государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической
физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334,
Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института химической
физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук по адресу: 119991,
Москва, Ленинский проспект, д. 38 и на веб-сайте
<http://new.chph.ras.ru/dissertatsionnyj-sovet/razmeshchennye-dissertatsii/131-dissertatsiya-ublinskogo-maksima>

Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 002.039.01
кандидат химических наук

Мазалецкая Л.И.

Общая характеристика работы

Актуальность

Работа посвящена изучению важнейших биофизических аспектов функционирования головного мозга и разработке биофизических подходов к их исследованию с помощью методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в норме и психопатологии (на примере шизофрении).

Современные представления о функционировании головного мозга в норме и при различных патологических состояниях невозможны без полученных *in vivo* сведений о макро - и микроструктурных особенностях, функциональной гемодинамике и метаболизме церебральных локусов. Метод ЯМР обеспечивает уникальную возможность исследовать анатомическую структуру, гемодинамику, микроструктуру и обменные процессы в выбранных зонах мозга *in vivo*. ЯМР частоты находятся в радиодиапазоне – диапазоне низких энергий, что делает метод ЯМР неинвазивным и биологически безопасным. Современные высокопольные (3Т) томографы, используемые в клинике, позволяют получать эту информацию в одном исследовании. Однако до настоящего времени такая возможность не реализуется: задача дробится на независимые исследования - выявление локусов нейроактивации по гемодинамическим параметрам, выявление нарушений микроструктуры нервных волокон по показателям диффузии тканевой воды, анализ метаболизма по концентрациям ЯМР - видимых участников обменных процессов. Это не позволяет создать полную картину физико-химических механизмов, обеспечивающих функционирование мозга в норме и при различных патологических состояниях, в частности, при таком социально значимом заболевании как шизофрения.

Выбор этого патологического состояния в нашем исследовании объясняется тем, что шизофрения занимает особое место среди всех форм психической патологии в связи с достаточно высокой распространенностью (распространенность заболевания, по разным данным, составляет 0,8-1,9%) и неблагоприятной динамикой. Шизофрения сопровождается нарушением

основных когнитивных функций, таких, как внимание, различные формы памяти. Патологические процессы в мозге начинаются задолго до проявления клинических симптомов. В настоящее время набор экспериментальных моделей для исследования биофизических механизмов возникновения и развития шизофрении крайне ограничен.

Несмотря на большое количество исследований, посвященных поиску структурных аномалий, особенностей гемодинамики при нейростимуляции, выявлению локальных нарушений церебрального метаболизма, до настоящего времени не разработаны основные представления о наличии и причинах метаболических и структурных сдвигов, сопровождающих нарушения функций центральной нервной системы (ЦНС), вызванных шизофренией.

Настоящая работа имеет **целью** создание новых подходов к прижизненным исследованиям биофизических механизмов, позволяющих выявить структурные, функциональные и метаболические особенности локальных зон мозга человека в состоянии покоя и при нейроактивации в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении).

Задачи исследования:

- 1) Выявление микроструктурных особенностей кортикоспинального проводящего пути (КСП) и мозолистого тела (МТ) мозга человека в норме, характеристика процессов демиелинизации и нарушений функциональной активности аксонов при психопатологии (ранняя стадия шизофрении).
- 2) Построение и анализ функции локального гемодинамического ответа (BOLD) на единичный стимул в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении).
- 3) Выявление взаимосвязей концентраций протонсодержащих метаболитов в дорсолатеральной префронтальной коре (ДЛПФК) мозга человека в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении).

- 4) Исследование динамики концентраций церебральных метаболитов в локусах нейроактивации в периоде гемодинамического ответа на единичные стимулы в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении).
- 5) Влияние нагрузки на уровни фосфатов - участников энергетического обмена в зрительной коре мозга человека в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении).

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Исследование показателей диффузии тканевой воды белого вещества мозга человека в норме и психопатологии (ранняя стадия шизофрении), полученных в неинвазивных исследованиях *in vivo*, выявило, что коэффициент диффузии воды снижается за счет увеличения поперечной диффузии при шизофрении. Согласно данным ^1H ЯМР *in vivo* эффект обусловлен повреждением аксонов и не связан с активной демиелинизацией.
- 2) Создана новая методика функциональной (динамической) спектроскопии, с помощью которой впервые получены и сопоставлены с BOLD временные зависимости концентраций протонсодержащих метаболитов в возбужденном локусе коры мозга человека *in vivo* в норме; выявлено нарушение динамики уровня промежуточного продукта нейронального цикла Кребса N - ацетиласпартата на ранней стадии шизофрении.
- 3) Методом ^{31}P ЯМР *in vivo* установлено, что в периоде нагрузки (видеостимуляция) снижается уровень фосфокреатина в возбужденной зрительной коре нормы. В аналогичных условиях этот параметр остается постоянным при шизофрении. Нагрузка не изменяет уровень АТФ в возбужденной зрительной коре *in vivo* ни в норме, ни при шизофрении.
- 4) Сравнение BOLD при возбуждении моторной коры мозга человека единичным стимулом обнаружило снижение амплитуды функции гемодинамического ответа в условиях шизофрении на ранней стадии.
- 5) Созданный комплексный биофизический подход, включающий в себя одновременный анализ структуры, микроструктуры, функциональной

гемодинамики и метаболизма мозга с помощью методов ЯМР *in vivo*, подтверждает выдвигаемую гипотезу о снижении энергозатрат в ответ на нагрузку в стимулированных зонах мозга на ранней стадии шизофрении.

Научная новизна.

Создан новый комплексный подход к биофизическим исследованиям мозга, включающий в себя анализ структуры, микроструктуры, гемодинамики при нейроактивации и метаболизма, что позволило выдвинуть и подтвердить гипотезу о снижении энергозатрат под влиянием нагрузки на ранней стадии шизофрении по сравнению с нормой.

Разработан новый метод динамической спектроскопии, который позволил сопоставить BOLD с динамикой локальных концентраций метаболитов.

Измерены скорости поперечной диффузии тканевой воды в МТ мозга человека, обнаружено увеличение значений этого показателя в белом веществе на ранней стадии шизофрении, обусловленное повреждением аксонов.

Выявлено снижение величины максимума функции гемодинамического ответа на единичный стимул в премоторной коре мозга на ранней стадии развития шизофрении.

С помощью новой методики динамической спектроскопии установлено обратимое, кратковременное снижение концентрации N-ацетиласпартата (NAA) в моторной коре в норме вследствие нейроактивации и отсутствие эффекта на ранней стадии шизофрении.

Показано, что нейростимуляция в норме снижает концентрацию фосфокреатина ([PCr]) и [NAA] в активированной зоне коры мозга человека в отличие от патологии (ранняя стадия шизофрении). Нагрузка не изменяет [АТР] в зоне активации ни в норме, ни при шизофрении.

Практическая значимость.

Разработан новый биофизический мультимодальный подход к анализу структуры, функции и метаболизма головного мозга, который применен для

анализа мозга человека в норме и патологии (ранняя стадия шизофрении). Результаты проведенного исследования установили высокую информативность и значимость предлагаемого комплексного метода анализа физико-химических процессов, протекающих в мозге.

Анализ диффузии тканевой воды и концентраций протонсодержащих метаболитов впервые позволил установить, что развитие шизофрении является фактором, вызывающим повреждение аксонов, предшествующее демиелинизации, в МТ и КСП мозга человека. Полученный результат открывает перспективы создания адресных терапевтических воздействий.

С помощью анализа BOLD при нейроактивации миллисекундными единичными стимулами впервые выявлено снижение амплитуды функции гемодинамического ответа в области моторной коры мозга на ранней стадии шизофрении. Обнаруженный показатель может использоваться как диагностически значимый.

Благодаря анализу влияния нейроактивации на локальные концентрации метаболитов - участников энергетического обмена впервые выдвинута и подтверждена гипотеза о шизофрении как факторе, снижающем энергозатраты в активированной нагрузкой зоне мозга.

Все вышеупомянутые результаты исследования необходимы для понимания биофизических и биохимических механизмов функционирования локальных структур мозга в норме и анализа влияния психопатологии (ранняя стадия шизофрении) на исследуемые процессы. Полученные данные выявляют потенциальные мишени для терапевтических коррекций функциональных нарушений, вызванных шизофренией.

Апробация работы.

Основные положения и результаты научных исследований доложены на: первой школе-семинаре по новым технологиям МРТ в клинической практике (Москва, 26-29 мая 2013 г.); конгрессе ESMRMB 2013 («European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology», Тулуза, Франция, 03-05 октября 2013 г.); XIII Международной Молодежной Конференции ИБХФ

РАН-ВУЗЫ "Биохимическая Физика" (Москва, 04 ноября 2013 г.); конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 18-20 марта 2014 г.); конгрессе ISMRM-ESMRMB (Милан, Италия, 10-16 мая 2014 г.); семинаре "Медико-биологические исследования ИБХФ РАН" (Москва, 09 июня 2015 г.).

Публикации

По основным результатам исследования опубликовано 5 научных работ в научных рецензируемых журналах (входящих в перечень Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки РФ).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на **130** страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения и выводов. Фактические данные проиллюстрированы **37** рисунками и **6** таблицами. Список литературы включает **185** источников (**19** отечественных и **166** иностранных авторов). Все материалы, представленные в диссертации, получены, обработаны и проанализированы с личным участием автора.

Содержание работы

Материалы и методы

В исследованиях приняли участие 146 испытуемых юношеского возраста, мужчин правшей, без нарушений слуха. Группу из 65 человек (средний возраст 22.7 ± 3.2) с диагнозом шизофрении (F20, МКБ-10) набирали из числа пациентов НЦПЗ РАМН и проводили МР - исследования мозга на этапе становления ремиссии или в ремиссии.

Группа из 81 психически и неврологически здоровых мужчин (средний возраст 22 ± 2.8), без наследственного отягощения по психическим заболеваниям явилась группой контроля.

Все исследование состоит из пяти частей.

Первая часть (Исследование 1) - анализ нарушений метаболизма префронтальной коры мозга человека после первого приступа шизофрении.

Группа (*I*) состоит из 22 больных в возрасте от 16 до 28 лет (ср. возраст 23 ± 3.4). Контрольную группу (*Iк*) составили 26 испытуемых в возрасте 16 - 28 лет (ср. возраст 21 ± 2.5).

Спектроскопический VOI получали с помощью последовательности PRESS с TE = 35 мс и TR = 2000 мс, NSA = 32, AQ – 1 мин 40 с. VOI объёмом 300 мм^3 (20x15x10 мм) локализовали в средней части средней лобной извилины (область ДЛПФК) с наибольшим захватом серого вещества в выбранном объёме.

Для обработки ССИ использовали встроенный программный пакет SpectroView, где автоматически производилось сужение линий с параметрами – 1.5 для экспоненциального множителя и 3 для гауссовой кривой. Базовая линия корректировалась автоматически и дотраивалась вручную. Сигналы метаболитов аппроксимировались гауссовыми линиями, и рассчитывалась их амплитуда. Амплитуды каждого сигнала нормировались на амплитуду сигнала неподавленной воды, записываемого в отдельном файле для каждого спектра. Рассчитывали коэффициенты линейной корреляции между парами переменных NAA/H₂O и Cr/H₂O, NAA/H₂O и Cho/H₂O, Cr/H₂O и Cho/H₂O (число значений переменных равно числу наблюдений в выборке) для групп *I* и *Iк* в правом и левом полушариях.

Вторая часть (*Исследование 2*) представляет собой исследование особенностей микроструктуры кортикоспинального проводящего пути, колена и валика мозолистого тела, и анализ метаболических сдвигов, соответствующих структурным нарушениям белого вещества. Группу патологии (*II*) составили 13 больных в возрасте 17-27 лет (ср.возраст 22.0 ± 3.1). Контрольную группу (*IIк*) (ср. возраст 23 ± 2.4) составили 15 испытуемых.

Диффузионно-тензорные (ДТ) – изображения получены в аксиальной плоскости с использованием эхопланарной (ЭП) импульсной последовательности (ИП): (TR = 9431 мс; TE = 70 мс, матрица 120/144 пикс.,

поле обзора FOV = 240 мм, размер вокселя 2x2x2 мм³, фактор ускорения (EPI factor) = 63, межсрезовое расстояние gap = 0, NSA = 2).

Выделение VOI для получения ¹H спектра осуществлялось с помощью ИП PRESS с TE = 35 мс и TR = 2000 мс. Спектроскопический воксель (2x1x1 см³) помещали в область колена и валика мозолистого тела (МТ).

Обработка ДТ - изображений мозга проводилась на рабочей станции Philips EWS (Extended MR Workspace) с применением опции «Fiber Track» и наложением на трехмерные анатомические изображения. Для получения локальных величин FA, RD, PD и ИКД вручную на ДТ - изображениях мозга выделяли области интереса: структуры КСП (моторная область, лучистый венец, задняя ножка внутренней капсулы, ножки мозга, пирамиды продолговатого мозга), колено и валик МТ.

Третья часть исследования (Исследование 3) – функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ) - анализ функции гемодинамического ответа (HRF) на аудио возбуждение единичными стимулами в локусах мозга пациентов после первого приступа шизофрении.

Группа патологии (*III*) состояла из 9 пациентов (ср. возраст 22.8±3.2 г.). Контрольная группа (*IIIк*) включала 9 испытуемых (ср. возраст 22.1±1.9 г.).

Для проведения фМРТ использовалась ЭП ИП: (TR = 3000 мс, TE = 30 мс, EPI factor - 240, количество срезов - 30, толщина среза - 4 мм, NSA = 1, число динамик 210, длительность одной динамики 3 с).

Стимуляцию проводили с применением приставки Eloquence (*In vivo* Phillips, Нидерланды). Использовали стимулы в слуховой модальности парадигмы oddball. Вероятность предъявления целевого стимула (тон, частота 2 кГц) составляла 0.2 и нецелевого (тон, частота 1 кГц) 0.8, громкость звука была около 70 – 80 дБ, интервал между стимулами 2 с с вариацией в пределах 20%. Испытуемые получали инструкцию нажимать на кнопку большим пальцем правой руки при предъявлении целевого стимула. фМРТ данные, полученные в ходе сканирования, сохраняли в формате DICOM 3.0.

Анализ данных фМРТ проводили с помощью встроенного пакета обработки iViewBOLD на графической станции EWS, а также обрабатывали в программном приложении SPM8, функционирующем в оболочке Matlab “The FIL methods group”, Великобритания. В этом программном приложении индивидуальные данные о трехмерной структуре мозга нормализовали в соответствии с международным анатомическим атласом Талайраха, результаты фМРТ совмещали с временными интервалами подачи стимулов в парадигме oddball, используя общую линейную модель (General Linear Model). В результате получена карта активации мозга.

Для построения HRF в области моторной коры, соответствующей активации движения большого пальца, и в области слуховой коры проводили анализ нативного BOLD сигнала. Для этого вручную выделяли зоны активации на ФМ томограммах в моторной и слуховой коре (области определяли согласно [167]). Данные экспортировали в текстовый формат, используя приложение Quantitative analysis, EWS. Определяли амплитуды HRF, нормируя их на базовые значения сигнала. Кривую гемодинамического ответа получали сложением значений увеличения контраста на карте активации для времени $t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18$ с после выполнения действия. При построении временной зависимости значение BOLD для времени t нормировали на начальное значение, соответствующее времени $t=0$.

Четвертая часть исследования (Исследование 4) - Анализ динамики протонсодержащих метаболитов в моторной коре в периоде гемодинамического ответа на единичные стимулы в норме и на ранней стадии шизофрении. Группа патологии (IV) состояла из 9 пациентов (ср. возраст 21.8 ± 3.4 г.). Контрольная группа (IVк) включала 9 испытуемых (ср. возраст 20.1 ± 1.7 г.).

Для *Исследования 4* разработан новый метод динамической спектроскопии:

Область спектроскопического исследования размером $20 \times 10 \times 15$ мм³ располагали в зоне активированной премоторной коры. Спектры снимали в

состоянии покоя (без предъявления стимуляции, PRESS, TE = 30 мс, TR = 3000 мс, NSA = 16). Затем предъявляли стимул, повторяя его 98 раз с интервалом 18 с, и через каждые 3 с после предъявления записывали в виде отдельного файла сигнал спада свободной индукции (ССИ). Файлы сортировали по временным точкам, соответствующим времени $t = 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18$ с после выполнения действия. В каждой временной точке накапливалось 98 сигналов и производилось их усреднение. Схема проведения фМРТ и динамической ^1H МРС представлена на рисунке 1.

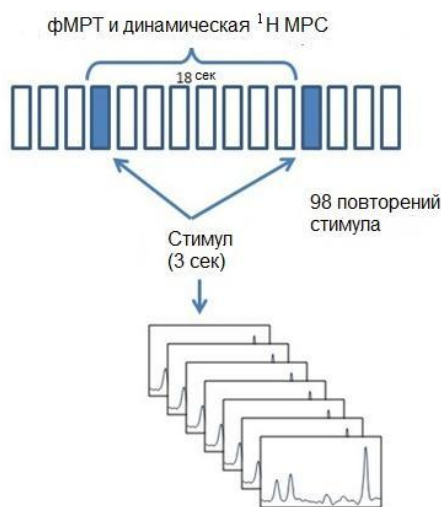


Рисунок 1. Схема проведения фМРТ и динамической ^1H МРС.

После этого исследования регистрировали спектры в динамике покоя, используя ту же методику, но без предъявления стимула.

Для обработки ССИ, полученных с помощью стандартной одновоксельной спектроскопии в статике покоя, использовали такой же метод обработки, как и в *Исследовании 1*.

При обработке ССИ, полученных методом динамической спектроскопии на ядрах ^1H в динамике покоя и предъявления стимула, применяли собственную программу, созданную к. ф-м н. Батовой С. А. на основе языка программирования C++, которая позволяет группировать и суммировать ССИ по временным точкам, включает умножение на экспоненту и функцию Гаусса, преобразование Фурье, коррекцию фазы вручную и измерение амплитуд сигналов.

Амплитуды, полученные в спектрах для времени t , нормировали на соответствующие значения для времени $t = 0$ и на объем клеток в вокселе. Последний получали, вычитая из объема вокселя объем цереброспинальной жидкости, который определяли вручную на аксиальных T_2 - взвешенных изображениях, используя программный пакет Extended MR Workspace.

Пятая часть исследования (*Исследование 5*) представляет собой анализ влияния видеостимуляции на [PCr] и [АТР] в активированной зоне зрительной коры мозга пациентов на ранней стадии шизофрении. Группа патологии (V) состояла из 12 пациентов (ср. возраст 22.8 ± 3.2). Контрольная группа (V_k) включала 22 испытуемых (ср. возраст 22.1 ± 1.9).

Использовали $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ приемо-передающую РЧ катушку "птичья клетка", Rapid Biomed, Germany. Данные фМРТ получали с помощью ИП ЭП: (TR = 3000 мс, TE = 35 мс, EPI - factor 240, количество срезов - 24, толщина среза - 4 мм, NSA = 1, число динамик 80, длительность одной динамики 3 с).

В качестве стимула при фМРТ применялась изображение шахматной доски, мигающее с частотой 1 Гц. Для контроля выполнения задания в видеостимуле появлялись случайно расположенные большие красные кресты с временем экспозиции 0.5 с. Испытуемые получали инструкцию нажимать на специальную кнопку указательным пальцем правой руки при появлении креста, при этом раздавался звуковой сигнал.

Для регистрации данных двумерной (2D) ^{31}P -МРС использовали ИП ISIS (Image Selected In vivo Spectroscopy) с TR = 1200 мс, TE = 0.21 мс, FA = 35° , NSA = 16. Выбирали спектроскопический объем: FOV = 200x200 мм, размеры вокселей 40x40 мм, при реконструкции уменьшающиеся до 20x20 мм, толщину среза = 30 мм.

В периоде накопления ^{31}P МР спектров использовалось изображение шахматной доски, мигающее с частотой 6 Гц. До стимуляции в течение 6 мин регистрировали сигнал ^{31}P МР от спектроскопического объема. В это время испытуемый лежал с закрытыми глазами, освещение в томографе было отключено. Затем через телеочки в течение 6 мин подавали зрительный

стимул, во время демонстрации которого регистрировали сигнал от того же объема. Испытуемые получали инструкцию нажимать на специальную кнопку указательным пальцем правой руки при появлении креста. Исследователь видел предъявляемую стимуляцию и слышал звуковой сигнал, возникающий при нажатии кнопки, что позволяло контролировать бодрствование испытуемых.

До стимуляции в течение 6 мин регистрировали сигнал ^{31}P МР спектры от спектроскопического объема. В это время испытуемый лежал с закрытыми глазами, освещение в томографе было отключено.

Обработку ^{31}P МР спектров проводили в программе jMRUI 5.1 alpha. Предварительная обработка включала в себя коррекцию фазы и аподизацию с целью избавления от высокочастотных шумов. Из всего спектроскопического объема выбирали и усредняли спектры из двух вокселей, соответствующих возбужденной зоне зрительной коры. Для количественных измерений использовался алгоритм AMARES, который позволяет скорректировать базовую линию, а также получить значения δ и величины интегральных интенсивностей сигналов спектра. Для дальнейшего анализа использовали данные для Pi, PCr и β -АТФ. Значения pH_{int} определяли в соответствии с формулой:

$$\text{pH}_{\text{int}} = 6.77 + \log\{(\delta_{\text{Фн}} - 3.29)/(5.68 - \delta_{\text{Фн}})\}$$

В подгруппах V и V_k интенсивности сигналов в спектрах активированной коры нормировали на соответствующие величины в спектрах коры без стимуляции. Для оценки энергетического статуса зрительной коры больных и нормы получали значения [PCr/ β -АТФ] в покое.

Результаты:

Глава 3. Особенности метаболизма ДЛПФК у больных на ранней стадии шизофрении

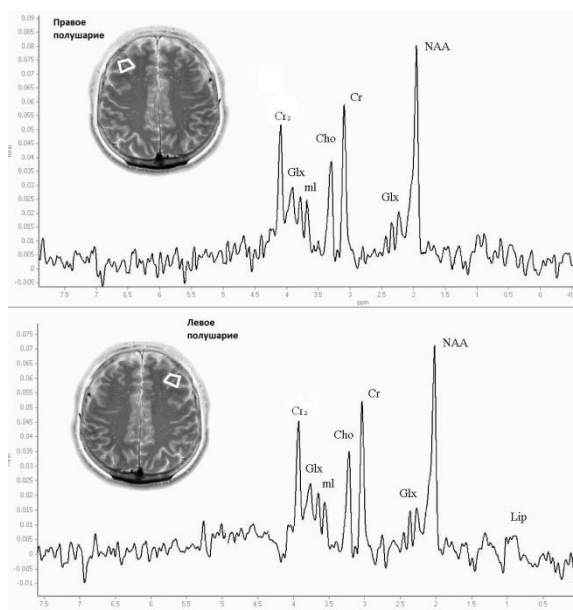


Рисунок 2. Типичный ^1H -МР спектр, полученный в области ДЛПФК в правом (сверху) и левом полушарии мозга одного испытуемого. NAA -N-ацетиласпартат, Glx - глутамат и глутамин, Cr - креатин + фосфокреатин, Cho - холинсодержащие соединения, ml - миоинозитол.

Методом ^1H МРС проанализирована дорсолатеральная префронтальная кора – область, связанная с характерными для шизофрении функциональными нарушениями (типичные спектры этой зоны в правом и левом полушариях представлены на рисунке 2). Статистически значимых межгрупповых различий между интенсивностями сигналов метаболитов в группах нормы и больных обнаружено не было (таблица 1).

Таблица 1. Средние значения (\pm стандартное отклонение) интенсивности сигнала метаболитов ^1H - МР спектра в области левой и правой ДЛПФК в группах I(пациенты) и Iк (норма).

		NAA/H ₂ O	Cr/H ₂ O	Cho/H ₂ O	ml/H ₂ O	Glx/H ₂ O
Левая ДЛПФК	<i>пациенты</i>	0.83 \pm 0.12	0.54 \pm 0.11	0.35 \pm 0.07	0.20 \pm 0.10	0.20 \pm 0.06
	<i>норма</i>	0.87 \pm 0.09	0.58 \pm 0.08	0.36 \pm 0.09	0.24 \pm 0.10	0.22 \pm 0.08
Правая ДЛПФК	<i>пациенты</i>	0.83 \pm 0.08	0.53 \pm 0.07	0.34 \pm 0.07	0.18 \pm 0.07	0.19 \pm 0.04
	<i>норма</i>	0.87 \pm 0.08	0.53 \pm 0.07	0.31 \pm 0.07	0.19 \pm 0.07	0.20 \pm 0.08

		0.07	0.09	0.06	0.95	
--	--	------	------	------	------	--

Однако в группе патологии с помощью корреляционного анализа удалось выявить значимые коэффициенты линейной корреляции между парами переменных Cr-Cho, Cr - NAA, Cr - mI в ДЛФПК левого полушария (таблица 2). Таким образом, корреляционный анализ впервые выявил в левой ДЛФПК взаимосвязи между содержанием маркера энергетического обмена Cr и уровнями клеточных маркеров - нейронального NAA и астроцитарного mI. Полученные данные свидетельствуют о специфической, отличающейся от нормы регуляции энергетического обмена нейронов и астроцитов при шизофрении.

Таблица 2. Статистически значимые коэффициенты корреляции между значениями интенсивностей сигналов метаболитов в ¹H-MР спектре левой ДЛФПК у больных.

Пары метаболитов	Cr-Cho	Cr-NAA	Cr-mI
Коэффициент корреляции R	0.63	0.58	-0.51

Глава 4. Особенности диффузии в головном мозге на ранней стадии шизофрении

Методами диффузионно-тензорной трактографии (ДТТ) детально проанализирован один из важнейших пирамидных путей головного мозга - кортикоспинальный путь (КСП) (рисунок 3), микроструктура которого ранее не исследовалась ни в норме, ни в патологии.

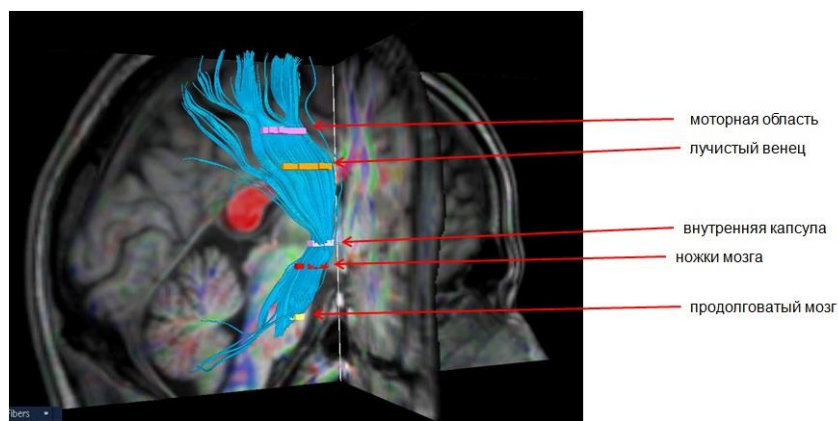


Рисунок 3. Основные элементы КСП.

Проведен сравнительный анализ исчисляемого коэффициента диффузии (ИКД) и коэффициента анизотропии диффузии (ФА) для контрольной группы и группы шизофрении. Статистически значимое снижение ФА при шизофрении по сравнению с контролем группой наблюдается в области задней ножки внутренней капсулы слева ($p=0,024$). В других регионах КСП различий не выявлено. ИКД достоверно выше в моторной области КСП левого ($p=0,044$) и правого ($p=0,004$) полушарий, а также в области лучистого венца справа ($p=0,029$) при шизофрении по сравнению с нормой.

Снижение ФА в КСП свидетельствует о дезорганизации структуры белого вещества на ранней стадии заболевания. Области внутренней капсулы и МТ можно считать областями, детектирующими степень структуризации и развития белого вещества мозга, поскольку ФА увеличивается с возрастом по мере созревания структуры белого вещества в этих зонах.

Для выявления участия нейронов и олигодендроцитов в нарушениях микроструктуры белого вещества измерены показатели диффузии воды и содержание клеточных и метаболических маркеров в локусах мозолистого тела мозга в норме и при шизофрении. Статистический анализ не выявил аномалий показателей диффузии в валике МТ у больных после первого приступа шизофрении. В колоне МТ обнаружено статистически значимое снижение ФА за счет увеличения поперечной диффузии (RD) при постоянстве продольной (PD). Рост RD в может быть обусловлен несколькими факторами: нарушением миелиновых оболочек, повреждением аксонов, вызванным нарушением их цитоскелета, изменением организации волокон. Установить роль каждого из этих процессов позволяет ^1H МРС. При демиелинизации в следствие распада миелина увеличивается интенсивность сигнала холинсодержащих соединений (Cho).

Статистический анализ интенсивностей сигналов метаболитов для больных и контроля в колоне МТ показывает, что при шизофрении уровень нейронального маркера NAA (рисунок 4) достоверно ниже нормы.

Статистически значимых изменений Cho (рисунок 4) по сравнению с нормой не обнаружено.

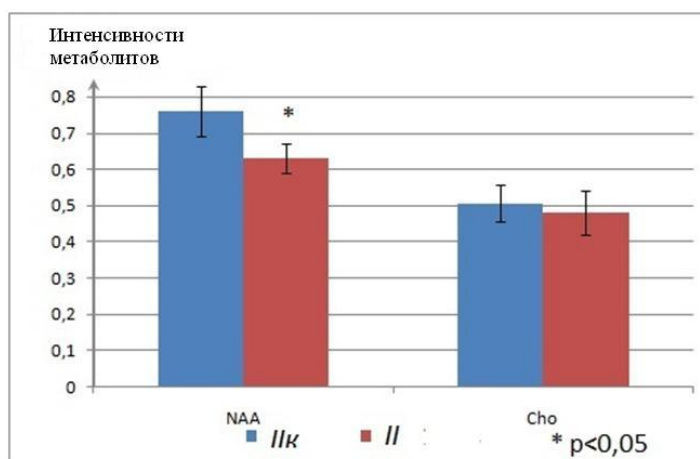


Рисунок 4. Относительная концентрация метаболитов в колоне МТ в группах больных и нормы.

Выявленное нами снижение уровня NAA указывает на аксональное повреждение в колоне МТ на ранней стадии шизофрении. Увеличение RD при нормальном уровне Cho свидетельствует о нарушениях цитоскелета аксонов, а не об активной демиелинизации.

Таким образом, снижение показателя анизотропии диффузии в областях внутренней капсулы и МТ у больных на ранней стадии шизофрении может являться признаком начального процесса нарушения целостности белого вещества головного мозга. Обнаруженный эффект вызван, по-видимому, особенностями цитоскелета аксонов.

Глава 5. Влияние нейростимуляции на локальную гемодинамику метаболизма мозга больных на ранних стадиях шизофрении

Для анализа функции гемодинамического ответа (BOLD) использовался простой вид стимуляции - короткие единичные стимулы в звуковой модальности парадигмы oddball. В ответ на аудиосигнал испытуемый нажимал на специальную кнопку большим пальцем правой руки.

Наиболее выраженными зонами активации при аудиостимуляции являются области премоторной (ответственная за движение) и слуховой коры (рисунок 5).

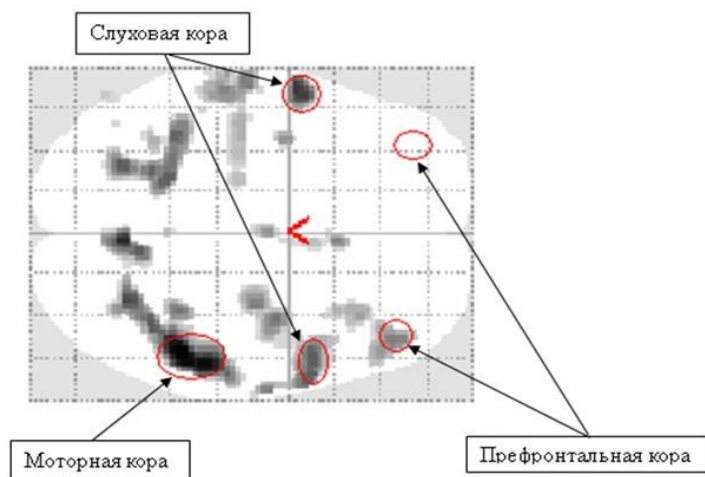


Рисунок 5. Объемный ГО на предъявление звуковых стимулов в парадигме oddball.

Впервые выявлено снижение амплитуды функции гемодинамического ответа в области моторной коры у больных на ранней стадии шизофрении (рисунок 6). Обнаруженный показатель может быть диагностически значимым.

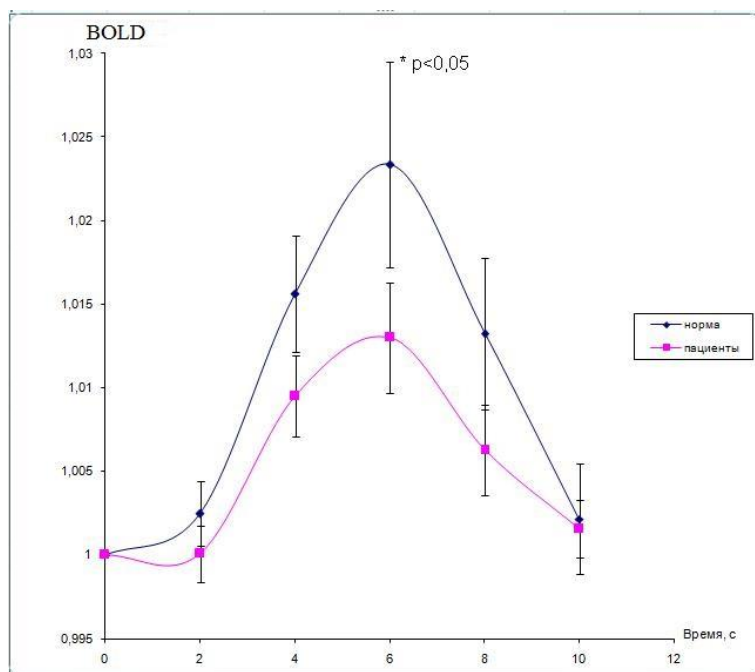


Рисунок 6. BOLD в премоторной коре в группах больных и контроля.

С помощью метода динамической спектроскопии впервые исследовано влияние нейростимуляции на метаболизм активированной зоны мозга. На рисунке 7 представлена зона нейроактивации и соответствующий ей типичный ^1H МР спектр, полученный методом динамической спектроскопии

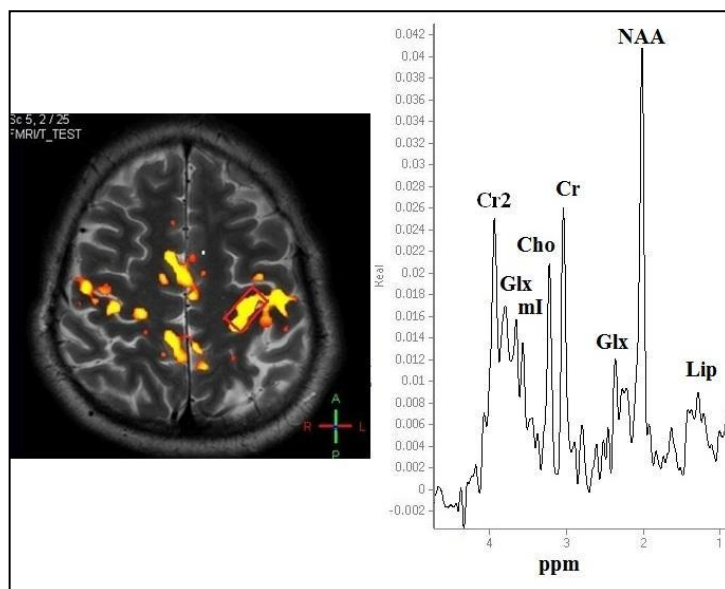
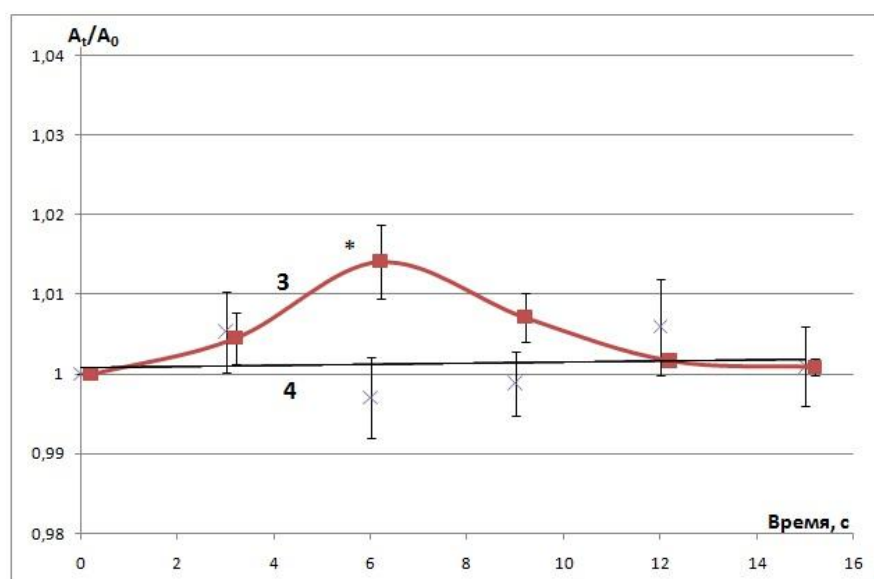
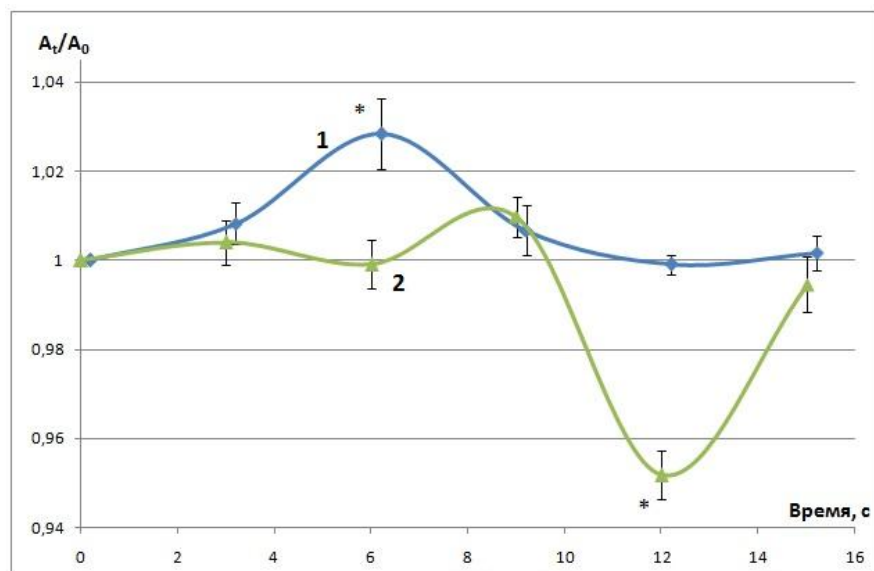


Рисунок 7. Расположение спектроскопического вокселя и вид ^1H – МР спектра в зоне активации премоторной коре.

Стимуляция влияет только на уровень NAA, и только в группе нормы (рисунки 8 и 9). В этой группе [NAA] к 12-й с после предъявления стимула достоверно снижается. До этой временной точки и после нее [NAA] в пределах ошибки постоянна и не отличается от исходных значений; минимум [NAA] запаздывает по отношению максимуму BOLD на 6 с.

В группе больных [NAA] в пределах ошибки не изменяется.



Рисунки 8 (вверху), 9. BOLD сигналы и динамика усредненных по группам больных и нормы значений амплитуд сигнала NAA в ^1H МР спектрах премоторной коры для времени t (A_t), нормированных на амплитуду сигнала NAA для времени $t=0$ (A_0).

1 – BOLD в группе контроля, 2 – NAA в группе контроля, 3 – BOLD в группе больных, 4 – NAA в группе больных, * $p<0,05$ по сравнению с начальным уровнем.

NAA – аминокислота, которая синтезируется в митохондриях нейронов из аспартата и ацетил-коэнзима А (AcCoA) под действием L-аспартат-N-ацетилтрансферазы. В настоящее время установлено, что фермент аспартоцилаза (ASPA) экспрессируется не только в олигодендроцитах, но и в аксонах. Следовательно, нейроны способны не только синтезировать, но и гидролизовать NAA в аксонах. Образующийся при гидролизе NAA ацетат

используется в синтезе АсСоА, а фермент, катализирующий образование АсСоА, АсСоА синтетаза экспрессируется в тех же проводящих путях, что и АSPA.

Можно полагать, что в нашем исследовании снижение [NAA] в группе нормы обусловлено кратковременной активацией гидролиза NAA в аксонах, а восстановление стационарной концентрации NAA вызвано снижением скорости его гидролиза. Наблюдаемое нами снижение NAA может быть следствием нейростимуляции, когда активация синтеза АсСоА требуется для компенсации возросших метаболических затрат, необходимых для восстановления [Glu] в синапсах.

Сниженная экспрессия транспортеров Glu у больных приводит к инактивации синтеза вазодилататоров, обеспечивающих функциональную гиперемия (BOLD), и уменьшению потребления NAA как источника АсСоА, необходимого для компенсации затрат АТФ при энергозависимом транспорте Glu. Это объясняет снижение интенсивности BOLD и отсутствие достоверных изменений [NAA] в группе больных. Альтернативным механизмом, обеспечивающим постоянство [NAA] при шизофрении может быть сниженная активность АSPA, обнаруженная в постмортальных исследованиях больных шизофренией. Выбор между предполагаемыми механизмами, обуславливающими различную динамику NAA в норме и при шизофрении, может быть сделан по результатам исследований влияния нагрузки на уровни фосфатов - участников энергетического обмена в активированной коре мозга нормы и больных.

Быстрым способом восполнения энергозатрат при нагрузке является активация креатинкиназной реакции. Для прямого анализа влияния нагрузки на уровень РСг идеален метод ^{31}P МРС. На рисунке 10 представлена зона найроактивации и соответствующий ей спектр ^{31}P МРС.

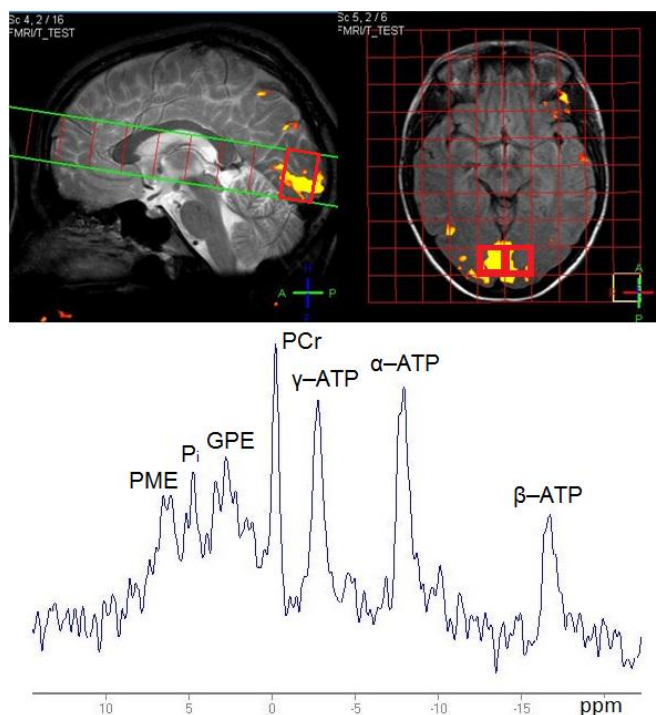


Рисунок 10. Расположение ^{31}P спектроскопических вокселей в области активированной зрительной коры и типичный ^{31}P МР спектр объема интереса.

PCr – фосфокреатин, α -АТФ, β -АТФ, γ -АТФ – АТФ, P_i – неорганический фосфат, PME – фосфомоноэфиры (фосфохолин+фосфоэтаноламин), PDE – фосфодиэфиры (глицерофосфохолин+глицерофосфоэтаноламин).

Согласно полученным в настоящем исследовании данным нейростимуляция в зрительной коре в группе нормы приводит к активации креатинкиназной системы в зрительной коре, в результате чего снижается уровень PCr, а уровень АТФ остается постоянным (рисунок 11).

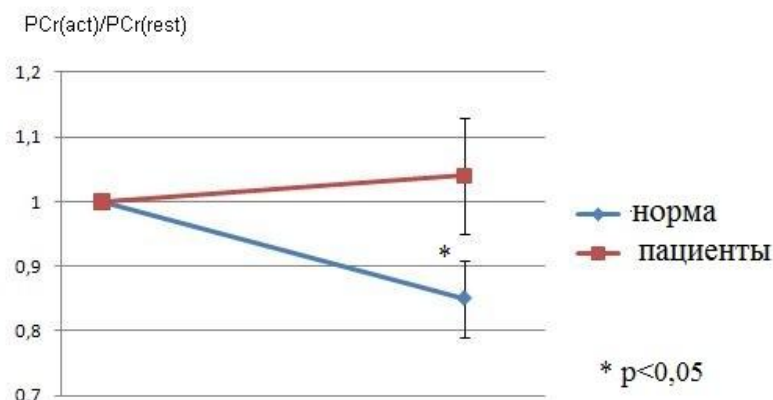


Рисунок 11. Отношение $[\text{PCr}]_{\text{act}}/[\text{PCr}]_{\text{rest}}$ в группах нормы и патологии.

При шизофрении нагрузка не влияет ни на уровень PCr, ни на уровень АТФ. Это означает, что энергозависимый транспорт Glu при шизофрении

нарушен, энергозатраты снижены, поэтому не активируются процессы, необходимые для поддержания стационарного уровня АТФ: нейрональный цикл Кребса и креатинкиназная реакция (рисунок 12).

Таким образом, сниженная интенсивность BOLD, результаты ^1H и ^{31}P МРС позволили выдвинуть и подтвердить гипотезу о снижении энергозатрат в активированных нагрузкой зонах мозга на ранней стадии шизофрении, что может быть следствием нарушения энергозависимого транспорта основного возбуждающего нейромедиатора Glu. Полученные данные свидетельствуют о роли нарушения энергозависимых процессов в патогенезе шизофрении.

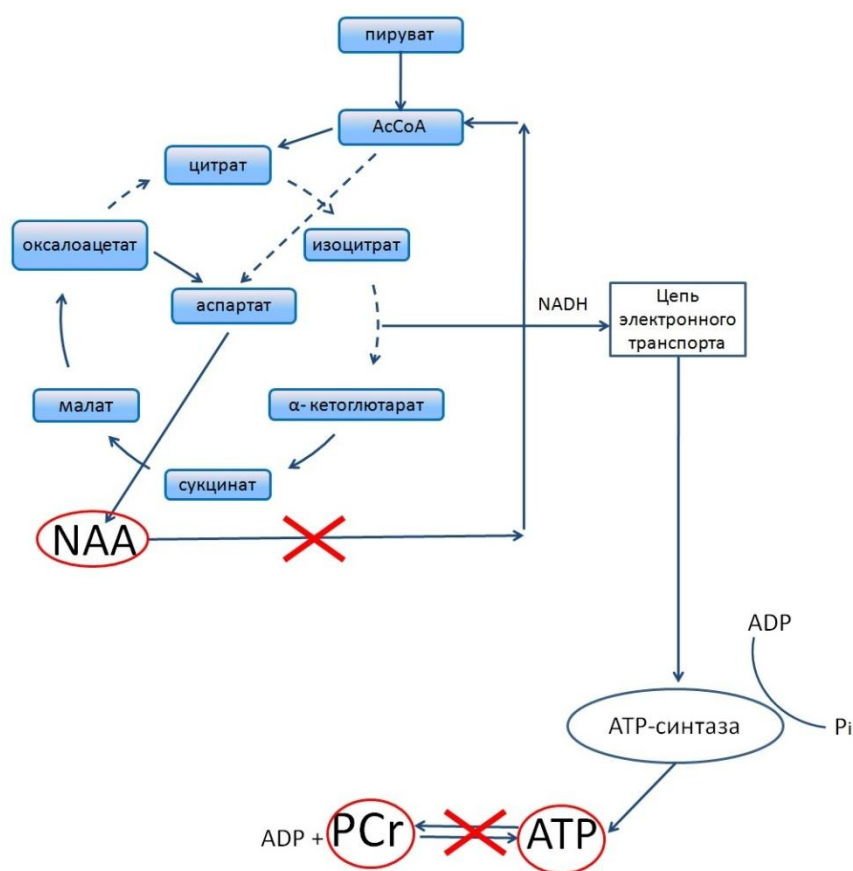


Рисунок 12. Схема нарушения энергетического обмена в нейронах в условиях нейростимуляции. Красным крестом отмечены участки, инактивированные у больных на ранней стадии шизофрении.

Выводы:

- 1) Исследование биофизических и биохимических процессов в белом веществе мозга человека методами ДТТ и ^1H МРС показало, что психопатология (ранняя стадия шизофрении) вызывает повреждение аксонов, предшествующее активной демиелинизации, и обуславливает нарушение

микроструктуры колена МТ.

2) С помощью новой методики динамической МРС впервые получены и сопоставлены с BOLD временные зависимости концентраций протонсодержащих метаболитов в возбужденном локусе коры мозга человека *in vivo* в норме; обнаружено обратимое снижение уровня промежуточного продукта нейронального цикла Кребса N - ацетиласпартата, запаздывающее по отношению к максимуму BOLD ответа на 6 секунд. При патологии данный эффект нейроактивации отсутствует.

3) Показано, что нейроактивация зрительной коры нормального мозга вызывает снижение содержания PCr при постоянном уровне АТФ. Уровни макроэргических фосфатов при шизофрении остаются постоянными при нагрузке.

4) Получена функция гемодинамического ответа в моторной коре мозга на короткие единичные стимулы. Впервые обнаружено снижение амплитуды функции гемодинамического ответа при патологии (ранняя стадия шизофрении), что может быть простым способом раннего выявления психических расстройств.

5) Созданный мультимодальный биофизический подход, включающий в себя анализ структуры, микроструктуры, функциональной гемодинамики и метаболизма мозга позволил выдвинуть и подтвердить гипотезу о шизофрении как факторе, снижающем энергозатраты в активированной нагрузкой зоне мозга.

Список основных работ по теме диссертации:

1) Ублинский, М.В. Использование методики функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) для исследования пациентов с первым приступом шизофрении / М.В. Ублинский, А.В. Петрайкин, И.С. Лебедева, В.Г. Каледа, Н.А. Семенова, С.Ю. Гурьяков, Т.А. Ахадов // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии – 2012 - №1 – С. 6-11.

2) Ублинский, М.В. Характеристики функций гемодинамического ответа в мозге больных шизофренией при выполнении слуховой парадигмы oddball.

// М. В. Ублинский, Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов, А. В. Петрайкин, И. С. Лебедева, А. Ф. Ефремкин, А.С.Тюрнева, В. Г. Каледа / Доклады академии наук – 2013 - том 453, - С. 218-221.

3) Ублинский, М.В. Особенности диффузии в мозолистом теле головного мозга больных на ранней стадии шизофрении // М. В. Ублинский, Н. А. Семенова, О.В. Луковкина, С.В. Сидорин, И. С. Лебедева, Т. А. Ахадов / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2014 - том 158 - № 11 - С. 557-561.

4) Ублинский, М.В. Особенности диффузии в кортикоспинальном проводящем пути у больных на ранней стадии шизофрении по данным диффузионно-тензорной магнитно-резонансной томографии. // М. В. Ублинский, Н. А. Семенова, О.В. Луковкина, С.В. Сидорин, И. С. Лебедева, В.Г. Каледа, А.Н. Бархатова, Т. А. Ахадов / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2015 – том 159 - №1 – С. 36-40.

5) Ублинский, М.В. Релаксационная кинетика в исследовании нейробиологических процессов методами функциональной магнитно-резонансной томографии и спектроскопии // М. В. Ублинский, Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов, И. А. Мельников, С. Д. Варфоломеев / Известия Академии наук. Серия химическая – 2015 - № 2 - С. 451-458.