

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară - câteva aplicații în cercetarea medicală

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – Some Applications in Medical Research

Lorena Ivona Ștefan*

Spitalul Clinic de Urgență Craiova – Secția Laborator Analize Medicale, Departament Biochimie

Rezumat

Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară este o metodă de analiză folosită în principal la determinarea structurii compușilor chimici în stare pură (după o izolare prealabilă). Avantajul principal al spectroscopiei RMN îl reprezintă faptul că pune în evidență un profil global al probei. Posibilitatea de a obține un profil chimic global al probei dovedește că această metodă poate deveni un instrument important pentru stabilirea diagnosticului medical. Această metodă poate fi folosită pentru caracterizarea fluidelor biologice, a stării țesuturilor și pentru a investiga efectele toxice ale preparatelor medicamentoase în organele țintă. Fenomenul fizic central al spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară: absorbția și emisia de energie de către nuclee ce au număr cuantic de spin semiîntreg (conțin număr impar fie de protoni, fie de neutroni) și, care se comportă ca dipoli magnetici atunci când sunt plasați într-un câmp magnetic exterior, nuclee ca cele de ^1H , ^{31}P , ^{19}F sau ^{13}C . În acest referat găsim câteva dintre aplicațiile metodei spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară în domeniul cercetării medicale.

Cuvinte cheie: *spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară, fluide biologice, compuși organici.*

Abstract

Magnetic resonance spectroscopy is one of the most powerful technique for structure elucidation of a mixture's compounds. The possibility of obtaining a global chemical profile of the sample proves that this method might represent an eligible technique for screening tests and also an important tool for medical diagnosis. This method can be used to characterize biological fluids, the tissue state and to investigate toxic effects of medical preparations in the target organs. The central physical phenomena of nuclear magnetic resonance spectroscopy : is the absorption and emission of energy due to the property of some atomic nuclei, which have the spin number equal to $\frac{1}{2}$ (odd number of proton and/or neutrons) to behave like microscopic bar

*Adresa pentru corespondență: Craiovița Nouă Bl.8, Ap.32, Craiova, Dolj, 1100.

Telefon mobil : 0726/314845, E-mail: stefan_lorena@k.ro sau lorenaivona@yahoo.com.

Adresa serviciu: Spitalul Clinic de Urgență Craiova, Secția Laborator Analize Medicale, B-dul 1 Mai, Nr. 60, Craiova, Dolj 1100.

magnets if we apply an external magnetic field, atomic nuclei like ^1H , ^{31}P , ^{19}F or ^{13}C . In this paper we found some applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy in medical research.

Keywords: *Nuclear magnetic resonance spectroscopy, biological fluids, organic compounds, cancer disease.*

Spectroscopia de rezonanță magnetică a protonului, ca tehnică biofizică de investigație, combină perimetre de interes care alătură cercetători din domeniile biochimiei, fiziologiei și investigației clinice, ceea ce îi conferă o largă aplicativitate și implicit un interes interdisciplinar.

Introdusă în 1946 de către Bloch și Purcell, metoda de investigație prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară reprezintă în momentul actual una dintre cele mai noi și destul de puțin exploatare metode de explorare a fluidelor biologice, configurând totodată un teren științific promițător sub aspectul posibilităților de valorificare a descoperirilor în domeniul medicinei și în speță în cel al dezordinilor metabolice majore ce însoțesc anumite boli¹.

Potențialul clinic și al aplicațiilor medicale sunt o achiziție de dată recentă a studiilor de spectroscopie RMN de înaltă rezoluție. Nu mai departe de 1957, Erick Odeblad, un cercetător suedez fiziolog și ginecolog, a folosit pentru prima dată spectroscopia RMN a protonului în studiul fluidelor biologice umane¹. Spectrele realizate de el pe un aparat de 21 MHz pe fluide biologice, precum saliva, laptele uman, film lacrimal, mucus cervical și sânge, erau relativ neinformative, dar au constituit punctul de plecare al unui "departament pentru studii medicale folosind RMN"¹.

În anii 1970 introducerea transformatei Fourier în spectroscopie împreună cu tehnicile avansate (puterea câmpului, secvențele de puls, calculatorul) a permis folosirea RMN pentru determinarea și identificarea diferitelor specii chimice în sistemele biologice¹.

În 1979, Ohsaka și colaboratorii au prezentat spectre de rezonanță magnetică a protonului pentru fluidele corpului uman și au încercat un serodiagnostic al cancerului⁴. Spectrele

lor constau în semnale ascuțite pentru metaboliți cu masă moleculară mică, cu un semnal evident al lactatului ca un criteriu de diagnostic al cancerului⁴. Acesta a fost urmat de un studiu de rezonanță magnetică pentru probe biologice provenite de la pacienți diabetici și cu insuficiență renală⁸. Au fost observate schimbări clare în concentrația unor metaboliți⁸.

Cel mai puternic câmp magnetic folosit în aceste studii și care din punct de vedere comercial este utilizabil a atins deja frecvența de 800 MHz, iar temperatura maximă la care se poate realiza o analiză a probei în dispozitive specializate este de aproximativ 2000°C, folosind sisteme laser de încălzire, iar cea mai mare presiune la care se poate realiza o astfel de determinare este de 10 000 atmosfere. Toate aceste performanțe tehnice nu fac decât să certifice că ne aflăm în fața unui domeniu de cercetare a cărui dezvoltare este un argument în favoarea extinderii aplicațiilor metodei¹.

Tipuri de fluide biologice investigate prin tehnica spectroscopiei de rezonanță magnetică nucleară a protonului

Pe lângă studiul urinei, care este unul dintre cele mai ușor de manipulat fluide biologice datorită conținutului proteic scăzut, precum și datorită faptului că reflectă capacitatea funcțională a rinichilor de a excreta substanțe de origine endogenă sau exogenă, extinderea studiilor asupra celorlalte fluide biologice dimensionează o sferă de aplicativitate în continuă extindere a metodei⁸.

Lichidul cefalorahidian

Compoziția chimică a acestei probe biologice reflectă starea metabolică a sistemului

nervos central. Concentrația în proteine a acestui lichid este foarte scăzută, ceea ce facilitează folosirea acestei metode și elimină procedeele suplimentare de supresie tehnică a semnalului proteinelor. Concentrațiile determinate folosind metoda de spectroscopie de rezonanță magnetică a protonului pentru principalii metaboliți prezenți în lichidul cefalorahidian (lactat, alanină, glutamină, citrat, creatină, creatinină, glucoză, inozitol, piruvat și acetat) au fost comparate cu rezultatele determinărilor biologice clasice și s-a observat o concordanță apreciabilă a rezultatelor.

Alterările prezente în concentrațiile acestor compuși au fost folosite în scop clinic în interpretarea dezordinilor metabolice, terapiei medicamentoase sau infecțiilor sistemului nervos central. De exemplu, spectroscopia de rezonanță magnetică a protonului a evidențiat modificări în cazul meningitei sau encefalopatiei portale datorate consumului exagerat de acetaminofen¹⁰. Prezența în lichidul cefalorahidian a unor metaboliți specifici celulelor tumorale dă posibilitatea identificării tipului de cancer, furnizând informații adjuvante pentru diagnostic, în condițiile imposibilității de a decela prin practici imagistice tipul de afectare malignă¹⁰.

Umoarea apoasă

Constituenții umorii apoase reflectă procesele secretorii de la nivelul corpului ciliar, precum și procesele metabolice ce au loc la nivelul globului ocular. Informațiile cantitative și calitative privitoare la prezența și concentrația diferiților metaboliți, precum și cele privitoare la compușii adiacenți sunt utilizate în scopul decelării patogenezei dezordinilor acestor structuri. Din cauza dificultăților de recoltare ale acestui fluid biologic (sunt necesari aproximativ 0,3 ml), măsurătorile de tip multicomponent sunt relativ dificile. Au fost identificați prin RMN următorii compuși: alanină, valină, glutamină, histidină și tirozină, dintre aminoacizi, precum și lactat, glucoză, citrat, creatinină și acid ascorbic³. Din cauza studiilor relativ recen-

te de identificare a compoziției umorii apoase există încă dificultăți în ceea ce privește corelațiile cu patologia clinică³.

Bila

Bila reprezintă un fluid excretoriu și secretoriu al ficatului, reprezentând, asemeni plasmei, un fluid biologic deosebit de complex. Un spectru de rezonanță protonică reprezintă dezavantajul că prezintă semnale de intensitate scăzută datorate prezenței metaboliților în cantități mici¹. Semnalele acestor compuși sunt prezente pe fondul semnalelor determinate de prezența în cantitate mare a structurilor formate din fosfolipide, colesterol și acizi biliari¹. Unul dintre artificii este acela de prelucrare a probei, care să confere posibilitatea de a crește concentrația acestor compuși și implicit de a ușura determinarea lor⁴. S-a realizat identificarea pe un model xenobiotic pe șoareci a excreției biliare a p-aminofenolului, fiind numeroase alte cercetări în studiu, având drept scop obținerea de informații privitoare la capacitatea metabolică a ficatului, precum și a identificării insuficienței hepatice⁴.

Plasma sanguină

Dintre toate fluidele biologice, plasma este unul dintre cele mai complexe amestecuri chimice, conținând lipoproteine, proteine, glicoproteine, cationi și anioni, toate însumând cel puțin 20 de compuși identificabili prin spectroscopie de rezonanță magnetică⁹. Rezonanța magnetică a protonului generează un spectru de semnale dominat de anvelopa rezonanțelor macromoleculelor proteice, cărora li se adaugă semnalele înguste generate de molecule de dimensiuni mici⁹. Acest spectru dificil de interpretat poate fi simplificat prin folosirea secvențelor spin-echo, care acționează asemănător unui „filtru de mobilitate”, îndepărtând semnalele macromoleculelor, care sunt molecule ce se mobilizează cu dificultate din cauza mărimii lor, lăsând astfel spre detecție semnalele înguste

ale moleculelor de dimensiuni mici⁹. Regiunea aromatică a spectrelor plasmei nu conține rezonanțe cu valori comparabile semnal-zgomot, iar regiunea compușilor alifatici conține semnale determinate de prezența lipoproteinelor, glicoproteinelor, a unor aminoacizi (alanină, valină, glutamină, treonină, leucină), lactatului, glucozei, creatinei, creatininei și acidului citric⁹.

Contribuția macromoleculelor din compoziția plasmei la obținerea spectrului este relativ mică, pentru că proteinele plasmatice au dimensiuni mari, sunt globulare și se deplasează prin rotație lentă în soluție². Cu excepția celor ale lipoproteinelor și a unor glicoproteine, semnalele produse sunt de intensitate joasă sau cel mult medie. Semnalele puternice din regiunea 0.8-1.3 ppm a deplasărilor chimice au fost în mod inițial atribuite componentelor lipidice ale lipoproteinelor². Au fost, de asemenea, semnalate modificări caracteristice ale acestor semnale în plasma diferitelor specii animale².

Relativ recent a fost raportată banda de rezonanță a moleculelor lipidice ca fiind cuprinsă între 0.8 și 1.2 ppm, delimitarea fiind realizată prin compararea semnalelor din plasma pacienților cu cancer cu a subiecților normali, în cazul primilor identificându-se semnale bine individualizate datorate lipoproteinelor, determinare ulterior înfirmată prin nereproductibilitatea determinării în cazul pacienților cu boală canceroasă⁵. Bell și colaboratorii săi au arătat ulterior că semnalele datorate lipidelor includ contribuția diferitelor tipuri de lipoproteine². Folosind experimente cu serii de impulsuri de tip single – puls sau spin – echo a fost posibilă determinarea contribuțiilor diferitelor componente ale moleculelor lipidice, precum VLDL, LDL, HDL și ale chilomicronilor în cadrul semnalului compact al lipidelor plasmatice².

Proteinele și colesterolul din compoziția lipoproteinelor furnizează semnale de intensitate mică și cel mult medie, fiind de asemenea molecule cu mobilitate scăzută².

Concluzia celor mai multe studii a fost

aceea că identificarea semnalului spectroscopic al lipoproteinelor nu poate fi considerat un marker al bolii canceroase, dar ne poate furniza informații structurale și clinice importante despre lipoproteine².

Semnalele cuprinse în intervalul 2.04-2.08 ppm au fost atribuite regiunii glicoproteinelor plasmatice cu mare mobilitate. Aceste semnale sunt generate în special de protonii din grupările N-acetil sau din carbohidrații N-acilați (N-acetil glucozamină, acid N-acetilneuraminic), cărora li se asociază proteinele de fază acută plasmatice și glicoproteine, precum transferina. Intensitatea acestor semnale a fost determinată ca fiind crescută în cazul unor afectări care presupun o creștere a proteinelor de fază acută, precum cancerul, stările infecțioase sau sarcina, traumatismele².

Multe din moleculele cu greutate mică sunt constituenți care participă la realizarea semnalului produs de plasmă, iar dintre cei mai importanți am putea enumera: aminoacizii, glucoza, acetatul, citratul, creatina, creatinina și lactatul¹. S-a putut realiza o bună corelație între studiile clasice biochimice și cele de spectroscopie de rezonanță magnetică a protonului, incluzând detecția acestor metaboliți în stări patologice diverse, precum supradozările medicamentoase, insuficiența renală, hepatică, diabet cu cetoacidoză, sau pentru monitorizarea intrărilor și ieșirilor micilor molecule ale plasmei în cazul procedurilor de dializă⁹.

Datorită numeroșilor compuși care sunt în mod natural legați de macromolecule plasmatice, identificarea lor poate fi de multe ori îngreunată și, de aceea se impune din ce în ce mai des folosirea agenților disruptivi sau procedurilor de extracție, ceea ce dă posibilitatea atât a identificării și măsurării lor corecte, cât și crearea premizelor pentru studii de legare plasmatică sau a celor care delimitează design-ul metabolic al unui anumit medicament⁵.

Alte fluide biologice

Spectroscopia de rezonanță magnetică a protonului a fost folosită ca tehnică de investigație și a altor numeroase fluide biologice, incluzând plasma seminală, sudoarea, lichidul amniotic, saliva. Identificarea acestor semnale a fost realizabilă doar prin folosirea tehnicilor bi-dimensionale¹. Plasma seminală, mediul de transport al spermatozoidelor, conține un număr foarte mare de metaboliți în concentrații milimolare. Cele mai înalte semnale din această probă sunt datorate prezenței glicerofosfolipidelor, fosfolipidelor, citratului, lactatului și aminoacizilor¹.

Schimbările intervenite în prezența sau concentrația acestor metaboliți pot reprezenta un marker foarte important al disfuncțiilor legate de infertilitate sau de mobilitatea spermatozoidelor. Astfel, a fost identificată reducerea intensității semnalului produs de colină la pacienții vasectomizați¹.

Aplicarea spectroscopiei de rezonanță magnetică la studiul altor fluide biologice, precum lichidul amniotic, sudoarea, lichidul sinovial, a constat mai ales în încercarea de a identifica componentele endogene ale acestor probe, pentru a deschide perspectiva unor ulterioare aplicații în studiul diferitelor patologii⁵.

Folosirea metodei Spectroscopiei de Rezonanță Magnetică Nucleară în studiul cancerului

Unul dintre cele mai importante motive pentru care s-a încurajat dezvoltarea acestei ramuri de cercetare biologică a fost perspectiva deosebit de promițătoare a folosirii metodei în clinica medicală. Prin această metodă se crea în sfârșit posibilitatea de a detecta schimbările chimice de la locul afecțiunii, precum și monitorizarea reflectării lor în fluidele biologice.

Când simptomele unui pacient sugerează dezvoltarea unei mase tumorale, ceea ce este

foarte important, este posibilitatea de a decela caracterul benign sau malign al afecțiunii, metoda imagisticii de rezonanță magnetică nucleară fiind considerată una dintre tehnicile cele mai performante în decelarea tumorilor, având limită de rezoluție de câțiva milimetri⁶. Pentru folosirea spectroscopiei RMN este necesară cunoașterea topografiei malignității pentru ca spectrul să fie generat de zona incriminată⁶. Ca și metodă non-invazivă, spectroscopia RMN este capabilă să investigheze compoziția chimică a unei mase tumorale, cu dificultăți uneori în decelarea caracterului malign sau benign al leziunii⁶.

O mare parte dintre celulele tumorale conțin o cantitate mai mare de fosfocreatină, care poate fi detectată printr-un spectru de ³¹P. Capacitatea secretorie a celulelor tumorale este diferită, în funcție de gradul lor de specificitate. Intensitățile masive ale spectrelor fosfolipidelor, fosfolipidelor anorganici, fosfolipidelor, nucleozide trifosfate, sunt cele care au determinat considerarea acestor compuși ca posibili martori ai metabolismului celulei maligne⁶.

O altă importantă aplicativitate a metodei poate fi considerată aceea a posibilității staționalizării prin metoda spectroscopiei ³¹P-RMN, care furnizează date importante cu privire la dezvoltarea tumorii primitive și a posibilei metastazări⁷.

Ciclul de viață tumoral a fost caracterizat din punct de vedere al semnalelor compușilor chimici celulari astfel: semnalele compușilor macroergici fosfolipidici sunt predominante în stadiile inițiale de dezvoltare tumorală, scad aproximativ 1 săptămână, când devin predominante cele ale mono- și di-esterilor, pentru ca spectrul să evolueze ulterior spre unul caracteristic țesutului necrotic⁷. În timpul dezvoltării tumorale fosfocreatina, care este un compus ce stochează energie, are valori crescute, în timp ce valoarea ATP-ului rămâne constantă, până la consumul ei total, care generează creșteri mai mult sau mai puțin stoechiometrice

ale P anorganic⁷. Necroza tumorii duce la scăderea semnalului fosfocreatininei precum și a adenin nucleotidelor⁷.

Spectroscopia de rezonanță magnetică a protonului are avantajul unei sensibilități cu un ordin de mărime superior celei a fosforului, precum și acela al prezenței numeroșilor compuși hidrogenați de interes clinic major¹. Prin metode speciale se elimină inițial semnalul produs de mușchi sau de țesutul gras, iar omogenitatea câmpului magnetic trebuie să fie calibrată foarte exact pentru a putea fi decelate semnalele compuşilor cu mase moleculare mici⁷. A fost remarcată semnificația creșterii semnalului lactatului pentru metabolismul accentuat al celulei tumorale, precum și modificări în diferite proporții ale semnalelor datorate diferiților compuși, specifice anumitor tipuri de tumori⁶.

Un alt aspect deosebit de important constă în monitorizarea răspunsului la tratament antitumoral⁷. Răspunsul celulei tumorale la radioterapie depinde de concentrația de oxigen intracelular, care generează radicali liberi de oxigen, cei care reprezintă cauza deteriorării celulare. Scăderea progresivă a compuşilor macroergici este un aspect care însoțește scăderea oxigenării în celulele agresate de terapie. Din păcate, dimensiunea redusă a micrometastazelor le face nedetectabile prin această metodă⁷.

În concluzie, metoda spectroscopiei de rezonanță magnetică este o metodă importantă și promițătoare pentru monitorizarea tumorilor în diferite stadii ale terapiei, fiind în același timp o metodă clinică complet neinvazivă care dă posibilitatea diferențierii maselor tumorale maligne de cele benigne, dând uneori și posibilitatea predictibilității eficienței terapiei aplicate sau posibilității de răspuns pozitiv la radioterapie în cazul conținutului bogat în oxigen al ce-

lulelor tumorale⁷.

Bibliografie

1. Bell J.D., Brown C.C., Sadler P.J. - NMR studies of body fluids - NMR Biomed., 1989; 2: 246-256.
2. Bell J.D., Sadler P.J., Macleod A et al. - ¹H NMR studies of human blood plasma: assignment of resonances for lipoproteins - FEBS Lett., 1997; 219:239-243.
3. Brown J.C.C., Sadler P.J., Spalton D.J. et al. - Analysis of human aqueous humour by high resolution ¹H NMR spectroscopy - Exp.Eye Res, 1986; 42: 357-362.
4. De Certaines J.D., Bovee W.M.M.J., Podo F., - Magnetic Resonance Spectroscopy in Biology and Medicine - Pergamon Press, Oxford, 1992: 437-477.
5. De Certaines J.D. - Magnetic Resonance Spectroscopy of bodyfluids: a new tool in clinical biology - Singapore: World Scientific Publishing, 1989: 114-1138.
6. Fossel E.T., Carr J.M., McDonagh J. - Detection of malignant tumours: water suppressed ¹H NMR spectroscopy of plasma - N. Engl. J. Med., 1986; 315:1369-1376.
7. Griffiths J.R., - NMRS in the Cancer Clinic - New York: Annals of The New York Academy of Sciences, 1992; 508: 176-199.
8. Nicholson J.K., Flynn M.P., Sadler P.J., et al. - Proton-nuclear-magnetic-resonance of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects - J.Biochem., 1984; 217: 365-375.
9. Nicholson J.K., Foxall P.J.D., Spraul M. - 750 MHz ¹H and ¹H - ¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma - Analytical Chemistry, 1995; 67: 793-811.
10. Petroff O.A.C., Yu R.K., Ogino T., - High - resolution proton nuclear magnetic resonance studies of human cerebrospinal fluid - J.Neurochem, 1986; 47: 1270-1276.