



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

**31-P 자기공명 분광영상에서
자화 전이를 이용한 대뇌
크레아틴키나제 반응속도 측정연구**

**Measurement of creatine kinase reaction rate in
cerebrum using 31-phosphorus magnetization transfer
approach in magnetic resonance spectroscopy**

2014 년 8 월

서울대학교 대학원
협동과정 인지과학 전공
고 은

A Thesis for the Master's Degree

**Measurement of creatine kinase reaction rate
in cerebrum using 31-phosphorus
magnetization transfer approach in magnetic
resonance spectroscopy**

August 2014

Interdisciplinary Program in Cognitive Science

College of Humanities

Seoul National University

Eun Ko

초록

서론: 아데노신 삼인산(ATP, adenosine triphosphate)의 합성과 분해는 생명체의 에너지 대사 활동에 필수적인 과정이다. 특히, 크레아틴키나제(CK, creatine kinase) 반응은 신속하게 ATP를 합성하여 안정적으로 에너지대사가 이루어질 수 있도록 한다. 최근 발표된 연구에서 뇌 내 에너지대사 저하와 다양한 신경, 정신질환과의 상관관계가 알려지면서, 사람에서 에너지대사 효소의 활성도 측정에 대한 연구가 관심을 받고 있다. 그러나, 아직 국내에서는 인(^{31}P , phosphorus) 자화 전이(MT, magnetization transfer) 자기공명 분광영상(MRS, magnetic resonance spectroscopy)을 위한 프로토콜이 정립되어있지 않다. 해외에서는 핵자기공명(NMR, nuclear magnetic resonance) system 또는 Siemens Magnetic Resonance Imaging (MRI) system을 위한 설정이 개발되어 연구가 진행 중이지만, Philips MRI System에서는 아직 표준적인 프로토콜이 설정되어있지 않으며, 시스템 별로 다른 특성이 있기 때문에, 한 시스템에서 설정한 프로토콜을 그대로 다른 시스템에서 사용하는 것은 불가능하다. 따라서, 본 연구에서는 Philips MRI system에서 ^{31}P MT MRS를 이용해 정상 성인에서 CK 반응 속도 상수 k_f 를 측정하는 프로토콜을 개발하고, 측정의 타당성을 확인하여 뇌 내

에너지대사 효율성을 비침습적이고 직접적으로 평가할 수 있는 방법론을 구축하고자 하였다.

방법: Philips Magnetic Resonance Imaging System 에서 ^{31}P volume head coil 을 이용하여 MT MRS 에서 정상 상태(steady-state) 포화 방법론을 통해 CK 반응속도 k_f 를 측정하였다. 건강한 성인 19 명을 대상으로 하였고, 그 중 6 명의 연구참여자가 전 포화(pre-saturation) 파라미터 값을 설정하기 위한 실험에 참여하였다. 13 명의 연구참여자를 대상으로, 설정된 프로토콜을 통해 ^{31}P MT MRS 스펙트라(spectra)를 획득하였고, 포스포크레아틴(PCr, phosphocreatine)의 역전 회복(inversion recovery)방법으로 T1 이완시간(relaxation time)을 측정하여 k_f 값을 계산했다.

결과: γ -ATP (gamma-ATP)를 포화시키기 위한 전 포화 파라미터는, 상쇄 주파수(offset frequency)를 -94(Hz), 진동 각(pulse angle)을 3000, 신호지속시간(window)을 1(Hz), 신호 평균 횟수(NSA, number of signal average)를 64 으로 설정하였다. T1 이완영상을 획득하기 위한 시간 지점을 각 55, 661, 1464, 2653, 5000(ms)으로 다섯 개를 설정하였다. 최종적으로 결정된 프로토콜의 총 촬영시간은 37 분 2 초였다.

본 연구에서 개발한 프로토콜을 통해 측정한 평균 T1 이완시간은 0.48(표준편차 0.05)(s^{-1})이었으며, 평균 k_f 값은

0.28(표준편차 0.07)이었다. 평균 수소이온농도지수(pH)는 7.04(표준편차 0.04), 평균 마그네슘이온농도지수(pMg)는 4.46(표준편차 0.27)이었다. 이 값들은 선행연구의 결과값과 일관된 결과로 볼 수 있다. 따라서 개발된 프로토콜이 타당함을 입증하였다.

고찰: 본 연구에서 설정한 프로토콜을 이용하여 비교적 짧은 시간 안에 타당한 측정이 가능하다. 본 연구는 최초로 Philips Magnetic Resonance System 에서 ^{31}P 코일을 이용하여 뇌 내 에너지대사 연구 방법론을 확립하였음에 그 의의가 있다. 본 연구의 결과는 향후 에너지대사와 관련된 정신질환의 원인을 규명하고 치료효과를 확인하는 데에 이용 될 수 있을 것이다.

주요어: 자기 공명 분광학, 자화 전이, 에너지대사, 아데노신 삼인산, 크레아틴키나제 반응

학 번: 2012-20068

목차

초록	i
목차	iv
표 및 그림 목록	v
서론	1
연구 방법	20
결과	34
고찰	49
참고문헌	59
영문초록	65

표 및 그림 목록

Table 1. Summary of in vivo ^{31}P magnetization transfer studies	14
Table 2. Summary of human brain ^{31}P magnetization transfer studies	16
Table 3. The values of PCr height according to different pulse angles	38
Table 4. The values of PCr height according to different windows	40
Table 5. The values of PCr height at each time point	43
Table 6. Final scan parameters applied in the study	44
Table 7. Demographic information and k_t , pH, pMg values of the participants	48
Figure 1. Volume of interest	24
Figure 2. Analysis of ^{31}P MT MRS spectrum in AMARES	31
Figure 3. Spectra derived from the images obtain with or without saturation pulse	36
Figure 4. Reduction ratio of PCr height according to different saturation windows	41
Figure 5. Analysis of T1 relaxation spectra	46
Figure 6. T1 relaxation graph	47

서론

1. 뇌와 에너지대사

세포는 신체기관을 유지하고 세포의 구성요소를 합성하거나, 생체 신호를 생성하는 등의 역할을 수행하기 위하여 에너지를 필요로 한다. 세포가 구성하는 인체의 여러 신체기관 중 뇌는 다른 어떤 신체기관보다 많은 에너지를 사용하는 기관이다(Fehm, Kern, & Peters, 2006). 인간의 뇌는 신체의 전체 무게에서 2 퍼센트 정도 만을 차지하지만, 몸이 사용하는 전체 글루코스 중 뇌가 사용하는 비중은 20 퍼센트에 달한다(Rolfe & Brown, 1997). 뇌에서 소비하는 에너지는 대부분 활동전위와 시냅스 후에 이어지는 세포막 내외의 전위차 복원과정에 쓰인다(Attwell & Laughlin, 2001). 또한, 신경세포의 휴지전위를 유지하거나 신경전달물질을 재흡수하기 위하여 에너지가 사용되기도 한다(Attwell & Laughlin, 2001). 이렇게 뇌에서 일어나는 모든 신경 활동은 많은 에너지 소비를 수반한다(Attwell & Laughlin, 2001).

최근에는 퇴행성 신경질환인 알츠하이머병(AD, Alzheimer's disease), 헌팅턴병(HD, Huntington's disease), 파킨슨씨병(PD, Parkinson's disease) 및 외상성 뇌 손상 환자에서 뇌 내 에너지대사가 저하되었다는 연구결과들이 보고되고 있다(de la Monte & Tong, 2014;

Eidelberg, 2009; Ferrer, 2009; Ishii et al., 2005; Olah et al., 2008; Rezin, Amboni, Zugno, Quevedo, & Streck, 2009; Stork & Renshaw, 2005). 외상성 뇌 손상 환자와 퇴행성 신경질환 환자 군에서 에너지대사의 저하가 발견되었는데(Khatri & Man, 2013), 이는 신경전달물질의 합성과 시냅스의 활동에 만성적으로 기능 이상이 발생하여 생체 에너지 항상성이 손상되면서 발생한 것으로 보고되고 있다(Khatri & Man, 2013).

또 다른 신경질환 연구들을 살펴보면, Block 등은 양성자 자기공명 분광영상($^1\text{H-MRS}$, proton-magnetic resonance spectroscopy)을 이용하여 알츠하이머병 환자 군의 중앙 측두엽(medial temporal lobe)부분에서 N-아세틸아스팔테이트(NAA, N-acetylaspartate)와 크레아틴(CRE, creatine)이 감소했다는 연구결과를 발표하였고(Block et al., 2002), Ishii 등은 FDG-PET(^{18}F -fluorode-oxyglucose positron emission tomography)를 이용하여 알츠하이머병 환자 군의 후 대상회(posterior cingulate gyri)와 오른쪽 두정엽 부분(parietal lobule)에서 포도당 에너지대사의 감소를 보고하였다(Ishii et al., 2005). 이 연구결과들은 알츠하이머병이 부분적으로 뇌의 대사를 저하시켰음을 보여주고 있다.

퇴행성 신경질환뿐만 아니라 정신질환에서도 뇌 내 대사변이가 발견되었다(Rezin et al., 2009). 양극성 우울장애 연구에서는 $^1\text{H-MRS}$ 영상에서 해마 내에 존재하는 NAA/CRE 의

감소가 관찰되었다(Bertolino et al., 2003; Deicken, Pegues, Anzalone, Feiwell, & Soher, 2003). Stork 등은 양극성 우울장애에서 진행된 MRS 연구의 결과들을 종합하여 인지질대사를 포함한 뇌 에너지 대사의 변화를 제시했는데, 미토콘드리아의 기능이상으로 인해 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)가 손상되어 당 분해작용이 감소하고, 그에 따라 총 에너지 대사량 또는 그 가용성이 감소한다는 결론을 도출해냈다(Stork & Renshaw, 2005).

뇌 내 에너지대사이상은 조현병 환자 군의 연구에서도 발견되었다(Burbaeva, Savushkina, & Boksha, 2003). 조현병 환자의 사후 뇌 조직을 분석한 결과, 당 합성 효소 단백질의 양과 그와 비슷한 단백질의 양이 반대로 바뀌어있었고, 당의 탈수산화효소의 양이 증가되어 있었다. 사후 뇌 연구에서뿐만 아니라 최근에는 자화전이(MT, magnetization transfer)를 이용하여, 생체 내(in vivo)에서 일어나고 있는 에너지대사를 연구한 결과가 발표되었다(Du et al., 2014). Du 등은 조현병 환자들의 MT-MRS 에서 아데노신 삼인산(ATP, adenosine triphosphate)를 합성하는 크레아틴키나제(CK, creatine kinase) 반응 속도가 정상 대조 군에 비해 유의미하게 느리다는 것을 밝혀냈다(Du et al., 2014). 이러한 연구결과는 정신질환의 병리생태를 이해하고 진단을 위한 생물학적 표식을 밝히는 데에 도움을 줄 수 있다.

이러한 신경정신질환들 중 신경 세포 내 미토콘드리아의 기능이상으로 인한 ATP 관련 대사 장애가 원인적 병태생리로 작용할 수 있음을 시사 하는 동물실험과 세포실험 결과들이 발표되면서(Olah et al., 2008; Tsunemi & La Spada, 2012), 신경정신질환을 가진 사람에서 뇌 내 에너지 대사 변이에 대한 관심이 증가하고 있다. 이러한 변이를 확인하고자 뇌 자기공명영상(MRI, magnetic resonance image), 핵 자기 공명(NMR, nuclear magnetic resonance) 등 뇌 영상 연구 방법론을 활용하려는 시도가 계속해서 이루어지고 있다(Du et al., 2014; Forester et al., 2012; Jeong et al., 2011).

이상으로 살펴본 연구들을 통해 뇌의 대사 장애가 신경질환 및 정신질환의 원인요소로 작용할 수 있다는 점을 파악하였다. 그러나 에너지 대사와 신경활동의 과학적 기전에 대해서는 아직 많은 부분이 미제로 남아있다. 그러므로 뇌 내 에너지대사 반응을 측정하고 변화를 분석하기 위한 더 많은 연구들이 필요하다.

뇌 내 에너지대사를 측정하는 방법론 중, 기존의 많은 연구들은 핵 의학 뇌 영상 연구를 통해 포도당의 이용과 산소의 소비의 몰 비율을 평가하여 ATP 소비를 간접적으로 측정하는 방법으로 이루어졌다(Vaishnavi et al., 2010). 이 방법은 대뇌의 산소 포도당지수(OGI, oxygen-glucose index)의 변화량을 측정하여 간접적으로 ATP 생성수준을 평가한다. 대사 작용을 거친 포도당 한

분자가 이산화탄소와 물로 모두 전환되면 OGI는 6이 된다. 즉, 포도당 분자 하나를 소비할 때 산소 6분자가 소비되고, 이로 인해 36분자의 ATP가 생성된다. 이것을 근거로 OGI를 측정하여 에너지대사의 효율을 판단하는 것이다. OGI 방법으로는 포도당이 산소 존재 하에 분해가 되면 호기성 해당작용이 발생하여, OGI가 6보다 작은 수치로 나타난다(Vaishnavi et al., 2010). 그러므로 OGI 측정방법으로 ATP 대사를 정밀하게 측정하는 것에는 한계가 있다. 더욱 정밀한 에너지대사 연구를 위해서는 ATP를 직접적으로 측정할 수 있는 방법론이 필요하다.

2. ATP 의 작용과 CK 반응의 측정

ATP 는 아데닌과 리보오스가 결합한 아데노신에 인산 3 개가
고 에너지 인산결합(HEP, high energy phosphate) 으로 연결된
유기화합물이다(Nelson & Cox, 2000). ATP 가 에이티피효소 (ATPase)에
의해 아데노신 2 인산(ADP, adenosine diphosphate)과 무기인산(Pi,
inorganic phosphate)으로 나누어지면서 에너지가 방출된다(Nelson &
Cox, 2000). 그런데 활동에서 필요로 하는 에너지 양에 비해
세포상에 존재하는 ATP 는 매우 적다. 에너지 소모가 큰 활동을 할
때에는 ATP 가 모두 분해되어 완전히 고갈되기 전에 세포 내에
존재하는 포스포크레아틴(PCr, phosphocreatine)이 분해되면서 ATP 가
빠른 속도로 합성된다(Boyer, 1999). 이 반응을 크레아틴키나제(CK,
creatine kinase)의 반응이라고 한다. 세포는 CK 반응을 통해 안정된
수준으로 세포에 ATP 를 공급할 수 있다(Boyer, 1999). CK 반응에서
ATP 와 PCr 간의 전환을 다음 식(식 1)으로 설명할 수
있다(Wallimann, Wyss, Brdiczka, Nicolay, & Eppenberger, 1992).



이 반응(식 1)은 화학적 평형상태를 이룬다. 에너지대사에 의해
ATP 가 ADP 와 Pi 로 분해되면, 평형상태를 유지하기 위해 ATP 가
합성되는 방향(식 2)으로 반응이 일어난다(Chen, Zhu, Adriany, &

Ugurbil, 1997). CK 는 ATP 의 인산결합이 순환되는 과정에 매우 중요한 효소로 작용한다(Chen, Zhu, Adriany, & Ugurbil, 1997). ATP 에너지 대사 과정에서 CK 반응의 정반응 속도 상수 k_f 값을 통해 에너지대사의 효율성을 평가할 수 있다(Du, Zhu, Qiao, Zhang, & Chen, 2007). 즉, k_f 는 효소 CK 의 활성도를 나타내는 지표로서, 얼마나 ATP 를 얼마나 잘 재생산 해낼 수 있는지를 판단하는 근거가 된다(Du, Zhu, Qiao, Zhang, & Chen, 2007).

k_f 를 측정하기 위해 자화 전이(MT, magnetization transfer)를 이용하는 방법에는 두 가지가 있다(Du et al., 2007; Lei, Ugurbil, & Chen, 2003): (1) 점진적 포화방법(progressive saturation); (2) 정상상태 포화방법(steady-state saturation). 점진적 포화방법은 γ -ATP(gamma-ATP)의 선형 자화(longitudinal magnetization)를 포화시킬 때 포화신호 지속시간(window)을 몇 가지로 다르게 하여, 각 스펙트럼에 대하여 PCr 의 높이를 측정하는 접근 방법이다(Lei, Ugurbil, & Chen, 2003). 정상 상태 포화방법은 γ -ATP 에 계속적으로 포화 진동 신호를 주면 PCr 값이 최대로 감쇄되어 더 이상 줄어들지 않는 정상 상태 시점에서 측정을 하는 접근 방법이다(Lei, Ugurbil, & Chen, 2003).

본 연구에서는 정상상태 접근 방법을 사용하여 k_f 를 구하고자 하였다. Bloch 방정식은 핵의 자화를 계산하기 위한 시간에 대한 함수이다(Bloch, 1946). 정상상태 포화방법으로 PCr 의 높이 값을 측정하여 Bloch 방정식에 대입하면 CK 반응 속도상수인 k_f 를 구할

수 있다. 선행연구들(Chen et al., 1997; Du et al., 2007; Jeong et al., 2011; Lei et al., 2003)에서는 수정된 Bloch 방정식을 이용하여 k_f 를 계산하였는데 그 공식(식 3)은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$k_f = \frac{1}{T_1} \left(\frac{M_0}{M_z} - 1 \right) \quad [3]$$

이때, T_1 은 PCr의 이완시간, M_0 은 γ -ATP에 포화 진동을 주지 않았을 때 PCr 값, M_z 는 γ -ATP가 포화 진동 신호를 계속 받았을 때 완전히 감쇄되어 정상상태를 유지하는 PCr의 높이 값을 의미한다(Chen et al., 1997).

3. 선행연구

생체 내에서의 ^{31}P 의 작용에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. NMR은 쥐의 근육(Hoult et al., 1974)과 개구리의 근육(Barany, Barany, Burt, Glonek, & Myers, 1975)에서 ^{31}P 의 스펙트라를 기록하면서 생물화학적 연구에 이용되기 시작하였다. ^{31}P -MRS는 세포의 조직 내부에서 ATP 에너지대사와 관련된 대사산물의 변화를 비침습적으로 측정할 수 있으므로 생체연구 또는 인체연구에 적합하다(Jansen, Backes, Nicolay, & Kooi, 2006). 뇌는 신체의 어떤 기관보다도 에너지대사가 활발하게 일어나기 때문에(Fehm et al., 2006), ^{31}P -MRS는 뇌 내 에너지대사 연구에 널리 활용되고 있다(Ross et al., 1997).

생체 연구에서 ^{31}P -MRS는 스펙트럼에서 나타나는 에너지대사물질의 양을 측정하거나 성분의 비율을 분석하기 위한 방법론으로 사용된다(Jansen et al., 2006). 또한, 각 물질의 화학적 이동의 차이를 이용하여 에너지대사와 관련된 지표들을 측정하기도 하는데(Gupta, Benovic, & Rose, 1978; Iotti et al., 1996; Kauppinen, Halmekyto, Alhonen, & Janne, 1992; Petroff et al., 1985), PCr과 Pi의 화학적 이동 차이로부터 수소이온농도지수(pH)를 측정할 수 있고(Petroff et al., 1985), PCr과 β -ATP의 화학적 이동 차이로부터 마그네슘이온농도지수(pMg)를 측정할 수 있다(Iotti et al., 1996).

³¹P-MRS 연구 중에서도 MT 를 이용하여 생체 내 ATP 에너지대사의 반응 속도를 측정한 여러 연구결과들(표 1)이 보고되었다. 정상세포에서 이루어진 연구(Brown, Ugurbil, & Shulman, 1977), 동물의 심장(Bittl & Ingwall, 1985; Spencer, Balschi, Leigh, & Ingwall, 1988; Ugurbil, 1985; Ugurbil, Petein, Maidan, Michurski, & From, 1986) 및 사람의 심장(P.A. Bottomley & Hardy, 1992)을 대상으로 MT 를 이용하여 생체지표를 측정한 연구들이 있었다. 골격과 근육에서 ATP 에너지대사 속도를 측정한 연구도 있었다(Brindle, Blackledge, Challiss, & Radda, 1989). 쥐의 뇌(Bresnen & Duong, 2014; Du, Zhang, & Chen, 2012) 또는 토끼의 뇌에 생체 ³¹P MT MRS 를 적용시킨 연구도 발표되었다(Degani, Alger, Shulman, Petroff, & Prichard, 1987).

생체 ³¹P MT MRS 연구 중에서도 사람의 뇌 내에서 발생하는 에너지대사를 측정하는 방법론과, 그 방법론을 이용하여 뇌 내 에너지대사 효율성을 평가한 연구결과들(표 2)을 더 자세히 살펴보고자 한다.

Chen 등은 ³¹P MT MRS 를 이용하여 시각적 자극이 주어졌을 때 뇌 내 에너지대사 변화를 연구하였는데, 시각피질(visual cortex)에서 시각 자극을 주는 동안 CK 반응의 속도가 그렇지 않을 때 보다 약 34% 정도 증가하는 결과를 확인하였다(Chen et al., 1997).

Chen 등은 이 연구에서 γ -ATP 를 충분히 포화시키고 PCr 값을 비교하는 정상상태 분석 방법을 사용하였다(Chen et al., 1997).

Lei 와 Chen 은 ^{31}P MRS 를 이용하여 γ -ATP 를 포화시키고 Pi 의 변화를 측정하여 점진적인 포화(progressive saturation)전이 방법으로 분석을 하였다. 이와 같은 점진적 포화 방법으로 대뇌 일차 시각피질(primary visual cortex)에서 ATP 합성 속도를 측정하였는데, 선행연구와 비슷한 ATP 합성속도를 확인함으로써 점진적 포화 연구 방법론을 수립하는 데에 성공하였다(Lei et al., 2003).

Du 등은 ^{31}P MT MRS 을 통해 ATP 가 PCr 과 Pi 로 전환되는 순환적인 반응에서 각각의 반응 속도를 측정하여 ATP 관련 반응의 효율성을 평가하였다(Du et al., 2007). 이 연구는 ATP 관련 반응에서 한 부분만을 포화시키는 single-site saturation(MSS)방법을 사용하여 PCr 이 ATP 로 전환되는 CK 의 정 반응과 역 반응, ATP 가 Pi 로 전환되는 정 반응과 역 반응의 속도를 모두 측정했다는 점에서 향후 이와 관련된 연구에의 의의가 크다고 볼 수 있다.

Jeong 등은 뇌 내 에너지대사를 측정하는 데에 있어서 새로운 ^{31}P MT MRS 방법론을 제시하였다(Jeong et al., 2011). 해당 연구에서는 용적코일(volume coil)을 사용하여 관심영역을 촬영하여 두개골과 근육으로부터 발생할 수 있는 측정의 결함을 배제하고 관심영역 전체에 균일한 고주파 신호를 주었다. 또한 MT 포화에서 특정

고주파 흡수 효과를 줄이기 위해 비단열화 고주파를 사용하였다. 새로운 방법론을 통해 촬영시간은 최소화하면서도 좋은 영상 결과를 측정할 수 있었으며, 그 결과가 앞선 연구들과도 일관적임을 들어, 새로운 방법론이 타당하다는 것을 입증하였다.

이와 같이, 선행연구들은 ^{31}P MT MRS 을 이용하여 생체 내 에너지대사 지표를 측정하기 위한 방법을 개발해왔다. 그리고, 이러한 방법론을 적용하여 실제 환자 군의 뇌 내 에너지 대사를 평가하는 연구결과가 보고되었다(Du et al., 2014; Forester et al., 2012). ^{31}P MT MRS 방법론을 활용하여 양극성 우울장애 환자 군이 정상 대조 군보다 에너지대사 효율이 어느 정도 낮음을 보여주었으며(Du, Cooper, Lukas, Cohen, & Ongur, 2013), 조현병 환자 군의 에너지대사 효율이 정상 대조 군보다 유의미하게 낮음을 확인하기도 하였다(Du et al., 2014).

사람의 뇌를 대상으로 한 ^{31}P MT MRS 에너지대사 연구는 그 수가 매우 적지만 꾸준히 이루어지고 있다. 뇌 내에서 발생하는 에너지대사가 신경 및 정신질환과도 밀접한 관련이 있다는 것이 밝혀지면서, 현재 ^{31}P -MRS 는 임상적으로 질병의 발병이나 병변의 진행과정 및 회복과 관련된 생물화학적 에너지 대사물질의 변화 연구분야에 활용되고 있으며(Bottomley, 1989; Cousins, 1995; Lim, Hollingsworth, Thelwall, & Taylor, 2010; Valkovic et al., 2014), 이와 관련된 연구는 더욱 확장될 것으로 전망된다. ^{31}P MT MRS 는 뇌

내에서 발생하는 ATP 에너지대사를 직접적으로 정확히 측정할 수 있는 방법론으로서, 이를 이용하여 에너지대사를 관찰하는 것은 신경정신활동 및 관련 질환의 분자생물학적 메커니즘에 대한 결정적인 정보를 제공하며, 새로운 치료 방법을 개발하는 데에도 귀중한 자료가 될 것이다(Lei et al., 2003).

Table 1. Summary of in vivo ^{31}P magnetization transfer studies

Author (year)	Method	Subject	rate constant (SD)	Results
Brown (1977)	^{31}P NMR MT	Escherichia coli cells	rate constant of P_i^{IN} to ATP : 0.6 (0.15)	We have determined the in vivo apparent unimolecular exchange rates between P_i^{IN} and ATP.
Bittl (1985)	^{31}P NMR MT	Rat heart	k_f increased from 0.27 to 1.30 according to rate pressure	Rates of ATP synthesis estimated from magnetization transfer were similar to values calculated from oxygen consumption.
Degani (1987)	^{31}P NMR MT	Rabbit brain	k_f : 0.53 (0.07) k_r : 0.52 (0.04)	The results suggest that in the brain the forward and reverse CK fluxes are equal.
Spencer (1988)	^{31}P NMR MT	Rat heart	k_f : 0.9 (0.08) 0.92 (0.06)	We present a method based on saturation transfer experiment and reaction rates are obtained from the same magnetization transfer data.
Brindle (1989)	^{31}P NMR MT	Rat hind limb muscle	Not measured	Increasing the stimulation pulse width or the frequency resulted in an increase in the flux.

Author (year)	Method	Subject	rate constant (SD)	Results
Bottomley (1992)	^{31}P NMR MT	Human brain and heart	Brain k_f : 0.42 (0.16) Heart k_f : 0.51 (0.15)	Higher field strength can extend the dimensionality of human spectroscopy, enabling saturation transfer measurements in conventional patient exam time.
Du et al. (2012)	^{31}P MT MRS	Rat brain (5)	Not measured	Relayed magnetization transfer effects through spin diffusion were observed in the rat brain.
Bresnen (2014)	^{31}P 4-angle saturation transfer,	Rat brain (4)	Values of k_f in 1.2% isoflurane: 0.26 (0.02) 2.0% isoflurane: 0.16 (0.02)	Different isoflurane levels significantly alter the CK reaction rate but not ATP and phosphocreatine concentrations.

Abbreviations: NMR, nuclear magnetic resonance; MT, magnetization transfer; MRS, magnetic resonance spectroscopy; ATP, adenosine triphosphate; Pi, inorganic phosphorus; CK, creatine kinase; k_f , creatine kinase forward reaction rate constant; k_r , creatine kinase reverse reaction rate constant.

Table 2. Summary of human brain ^{31}P magnetization transfer studies

Author (year)	Method	Subject ROI	Participant (N)	k_f (SD)	Results
Chen et al. (1997)	^{31}P NMR MT Surface coil	human brain visual cortex	Healthy(5)	Resting: 0.56(0.19) Stimulation: 0.76(0.29)	k_f increased 34% in the visual cortex areas during stimulation.
Lei & Chen (2003)	^{31}P MT MRS Surface coil	human brain visual cortex	Healthy(9)	0.17(0.04)	The results agreed well with value calculated the cerebral metabolic rate reported previously.
Du et al. (2007)	^{31}P MT MRS Surface coil	human brain occipital lobe	Healthy(40)	0.30(0.04)	The three-spin exchange model ($\text{PCr} \leftrightarrow \text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$) accurately determines forward and reverse fluxes for both CK and ATPase reactions.
Jeong et al. (2011)	^{31}P MT MRS Volume coil	human brain	Healthy(10)	0.32(0.07)	k_f was $0.320 \pm 0.075 (\text{s}^{-1})$. These values are consistent with those obtained using earlier methods.
Forester et al. (2012)	^{31}P MT MRS Volume coil	human brain	Bipolar(10) Healthy(8)	0.19 (0.02) 0.20 (0.02)	MT MRS technique observe a trend between group differences in the k_f but not significant.

Author (year)	Method	ROI	Subject(N)	k_f (SD)	Results
Du et al. (2013)	^{31}P MT MRS Surface coil	human brain frontal lobe	Healthy(17)	0.29(0.04)	The kinetic network of $\text{PCr} \leftrightarrow \text{ATP} \leftrightarrow \text{Pi}$ can be measured reliably in the human frontal lobe at 4T.
Du et al. (2014)	^{31}P MT MRS Volume coil	human brain frontal lobe	SZ(26) Healthy(25)	0.21(0.07) 0.27(0.06)	A substantial (22%) and statistically significant reduction in creatine kinase k_f was observed in SZ.

Abbreviations: k_f , creatine kinase forward reaction rate constant; NMR, nuclear magnetic resonance; MT, magnetization transfer; MRS, magnetic resonance spectroscopy; ATP, adenosine triphosphate; PCr, phosphocreatine; Pi, inorganic phosphorus; SZ, schizophrenia.

4. 연구의 목적

앞서 살펴본 연구들은 뇌 내 에너지대사의 기능이 뇌의 활동, 신경질환, 정신질환의 병태생리에 밀접하게 관련되어 있다는 가능성을 시사한다. 이렇듯 뇌 내 에너지대사 연구가 매우 중요하고 시급한 과제임에도, 실제 진행되고 있는 연구는 그 수가 매우 적다. 특히, 국내에서 ^{31}P MT MRS 에 대한 연구는 거의 진행되고 있지 않으며, 이에 대한 연구환경 조차 확립되어있지 않은 경우가 많다. 이에, 사람을 대상으로 더 많은 뇌 내 에너지대사 연구를 진행하기 위해서는 비침습적이고 안전하며 효과적으로 에너지대사 지표를 측정할 수 있는 ^{31}P MT MRS 방법론을 확립하는 것이 중요하다. 해외에서는 Siemens MRI system 을 위한 설정이 개발되어 연구가 진행 중이지만, Philips MRI System 에서는 아직 표준적인 프로토콜이 설정되어있지 않으며, 시스템 별로 다른 특성이 있기 때문에 하나의 시스템에서 설정한 프로토콜을 그대로 다른 시스템에서 사용하는 것은 불가능하다. 따라서, 본 연구는 3.0 Tesla Philips Achieva system(Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) 기기에서 ^{31}P 용적코일을 이용하여 뇌 내 에너지대사를 측정하기 위한 프로토콜을 최초로 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 Philips MRI system 에서 ^{31}P MT MRS 를 이용해 정상 성인에서 CK 반응 속도 상수 k_f 를 측정하는 프로토콜을 개발하고, 측정의 타당성을

확인하여 뇌 내 에너지대사 효율성을 비침습적이고 직접적으로 평가할 수 있는 방법론을 구축하고자 하였다.

효과적인 ^{31}P MRS 영상을 획득하기 위해서는 관련된 파라미터들을 조절하여 가능한 한 짧은 시간 내에 원하는 스펙트라를 얻는 것이 중요하다. 파라미터를 설정한 후에는, 실제 연구대상자를 촬영하여, 그 설정이 타당한지 여부를 확인하고자 하였다. 타당여부를 확인하기 위해 정상상태 방법을 이용하여 k_f 값을 측정하고 선행연구의 결과 값들과 비교하였다.

연구 방법

1. 연구대상

본 연구는 자발적인 연구 참여 의사를 표시한 19 명의 정상성인이 참여하였다. 연구 참여 기준은 만 18-65 세 사이의 건강한 남녀 성인이었으며, 제외기준은 (1) 자기를 띄거나 전자기기인 체내 이식물을 가지고 있는 사람, 임신 또는 수유 중, 폐소공포증 등 뇌 자기공명영상 촬영에 부적합한 사람; (2) 뇌 영상상에 영향을 끼칠만한 정신활성 약물을 복용한 사람이었다.

연구참여자 19 명 중 6 명은 프로토콜의 파라미터를 설정하기 위한 연구에 참여하였고, 13 명은 설정된 파라미터가 타당한지 여부를 확인하는 데에 참여하였다.

모든 연구대상자에게 연구에 참여하기 전에 본 연구의 목적, 방법 및 진행과정에 대하여 충분한 설명을 제공하였으며, 서면으로 연구 참여에 동의를 얻었다. 본 연구는 이화여자대학교 생명윤리위원회의 승인을 받았다.

2. 자기공명영상의 획득

뇌 자기공명영상은 3.0 Tesla Philips Achieva system(Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)에서 획득하였다. 촬영에 사용된 코일은 $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ dual tune volume head coil(RAPID Biomedical GmbH, Rimpark, Germany)이었다. Philips console 에서 사용 가능한 소프트웨어인 Spectroview (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)를 사용하여 획득된 영상을 확인하였다.

분광영상의 관심영역 위치를 설정하기 위하여, 2 차원 T1-강조(T1W_FFE)영상을 시상면(sagittal), 관상면(coronal), 축상면(axial) 방향으로 각각 획득하였다. T1-강조 영상을 획득하는 데에는 다음 파라미터를 사용하였다: field of view(FOV) = 230 x 184 x 143(mm); repetition time(TR) = shortest; echo time(TE) = 4.60(ms); flip angle = 80(deg); number of signal average(NSA) = 2.

CK 반응 속도상수를 구하기 위해 γ -ATP 의 정점에 전 포화(pre-saturation)가 충분히 된 MT MRS(31P_MT-Mz), 포화 파동이 없는 MRS(31P_MT_M0), T1 이완영상(31P_T1)의 획득이 필요하다. 이를 위해서는 ^{31}P MRS 의 자화 전이 스펙트럼과 T1 이완영상에서 상쇄주파수(offset frequency), 진동 각(pulse angle), 포화신호지속시간(window), 전환시간(inversion time)과 같은 여러 가지 파라미터의 설정이 필요하다. 본 연구에서는 최단시간 내에

최적의 스펙트라를 얻을 수 있는 파라미터를 설정하고, 설정된 파라미터의 타당성을 검증하기 위한 연구를 진행하였다.

1) 관심영역의 설정

³¹P MRS 영상을 획득할 때 T1 강조영상을 기초자료로 활용하여 관심영역(VOI, volume of interest)을 설정하였다. 관심영역(그림 1)의 크기는 50 x 72.1 x 40 mm 으로 대뇌 전두엽 부위로 설정하였고, 두개골과 두피가 포함되지 않도록 하였다.

Figure 1. Volume of interest

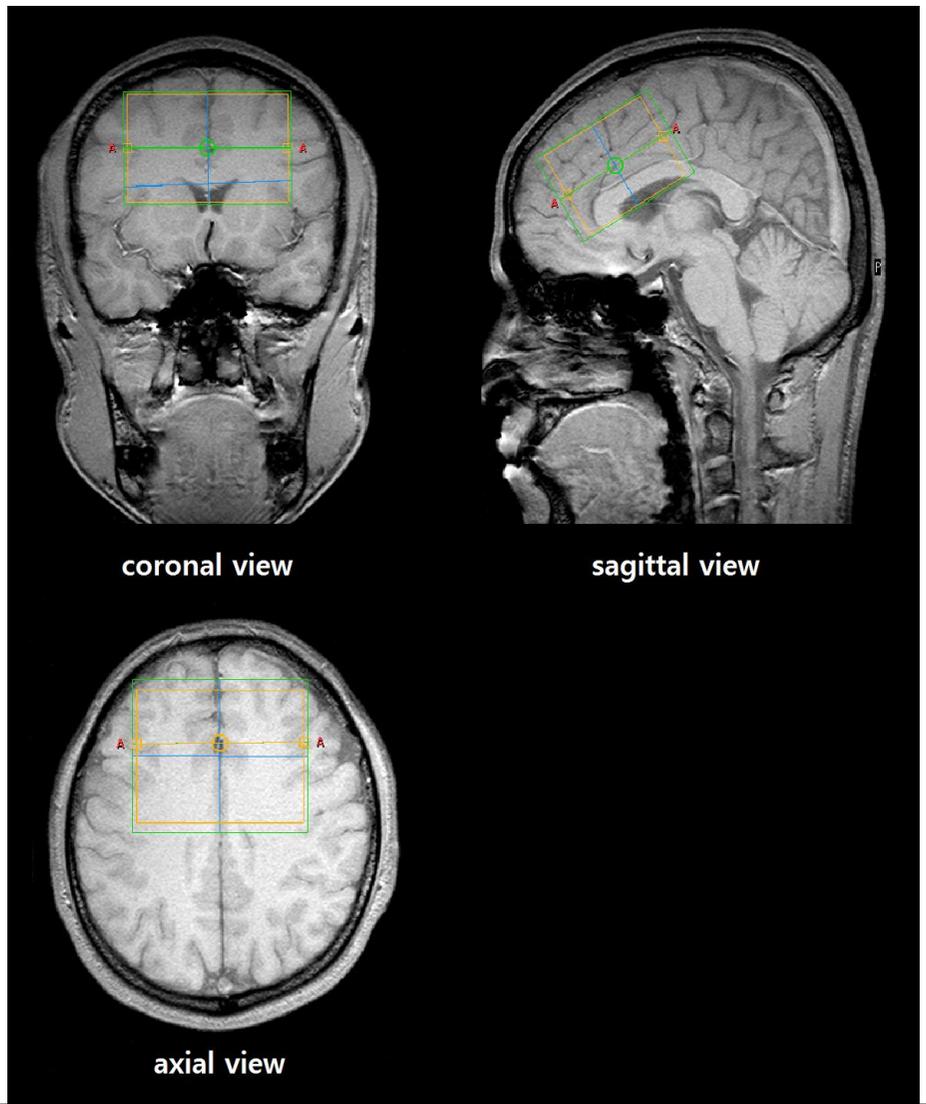


그림 1. 뇌영상 획득시 Philips console 화면에서 T1 강조영상에 표시된 관심영역 전두엽을 부분을 충분히 넓게 설정하되, 두개골과 두피가 포함되지 않도록 설정함. 화면상에 보이는 바깥의 초록색 상자는 쉬밍영역을 표시한 것임. 안쪽의 노란색 상자는 관심영역을 표시한 것임.

2) 전 포화 파라미터의 설정 연구

실험 1. 상쇄 주파수(offset frequency) 설정

상쇄 주파수를 조정하여 포화 진동 신호를 주고자 하는 주파수를 설정할 수 있다. ^{31}P MRS 의 스펙트럼에 나타나는 각 화학적 이동은 물질에 따라 다르기 때문에 상쇄 주파수 설정이 잘못 되었을 경우 스펙트럼의 해당 성분의 신호가 감쇄되지 않거나, 의도하지 않은 다른 성분의 신호가 감쇄될 수도 있다.

본 연구에서는 γ -ATP 에 포화 진동 신호를 주어 감쇄시키고자 했다. γ -ATP 의 화학적 이동은 상대적으로 PCr 정점의 +2.5ppm 에서 발생하는데(Wu & Wasylshen, 1995), 절대적인 위치는 기기의 특성에 따라 다르므로 반복적인 촬영을 통해 본 자기공명영상 시스템에 맞는 상쇄주파수를 찾아내고자 하였다.

실험 2. 진동 각(pulse angle) 설정

진동 각은 포화 진동 신호의 세기로 해석된다. 진동 각이 작으면 스펙트라의 정점이 감쇄되지 않거나, 감쇄되더라도 정상상태에 이르는 데에 시간이 너무 많이 걸려서 완전히 정상상태에 이르지 못하는 경우가 발생하고, 진동 각이 크면 전자과흡수율(SAR, specific absorption rate)의 증가로 인하여 촬영에 제한이 발생할 수 있다. 본 연구에서는 적절한 진동 각을 찾기 위해

0 부터 3000 사이에 진동 각을 500 씩 증가시키면서 반복적으로 촬영을 진행하였다.

실험 3. 신호지속시간(window) 설정

신호지속시간은 포화 진동 신호를 지속적으로 주는 시간을 의미한다.(Mierisova et al., 1998) 선행연구에 따르면, 포화시간이 길수록 γ -ATP 가 더욱 포화되어 PCr 의 높이가 점점 낮아지다가 일정시간 동안 포화가 계속 이루어지면 더 이상 줄어들지 않고 정상상태에 도달하는 것을 볼 수 있다. 본 연구에서는 정상상태에 도달하는 신호지속시간을 설정하고자 하였다.

신호지속시간을 설정하는 단위를 진동수로 나타낸다. 즉, 10(Hz)를 설정하면 0.1 초 동안, 4(Hz)를 설정하면 0.25 초 동안 포화신호가 지속된다. 신호지속시간을 0(Hz)으로 설정하면 최대 포화 시간 값인 4 초가 설정된다. γ -ATP 가 충분히 감쇄되어 정상상태를 관찰 할 수 있는 시간을 찾기 위해 반복적으로 촬영을 진행하였다.

3) T1 이완 영상의 설정연구

T1 이완영상은 자기장 안에서 세차운동을 하고 있는 분자에 그 회전축과 일치하지 않는 진동을 주었을 때, 다시 원상태로 돌아가려는 과정을 측정한 영상이다. 진동을 차단한 후 회전한 자장의 방향이 초기상태의 약 63%가 되는 $\frac{1}{e}$ 로 되돌아갈 때까지의 시간을 T1 이완시간이라고 한다(Chachaty & Langlet, 1976).

실험 4. T1 이완영상 측정 시간 지점 설정

T1 이완시간을 측정하기 위해 T1 이완영상을 촬영할 때, 시간에 따라 변하는 스펙트라를 보기 위하여, 영상을 측정하는 시간 지점을 설정해주어야 한다. 이 때, 시간 지점의 개수를 적게 설정하면 지점의 값을 피팅한 T1 이완 그래프를 찾아내기가 어렵고, 많이 설정하면 촬영시간이 증가하기 때문에 적절한 시간 지점의 개수를 설정해야 한다. 또한, 시간지점을 설정할 때, 파동의 위상이 전환되는 시점(inversion time)의 근처일 경우, 해당 시점의 파동의 정점을 찾아내기가 어렵다. 그러므로 측정 시간은 파동의 위상 전환 시간의 직전이나 직후를 피해서 설정해야 명확한 정점 값을 얻을 수 있다.

3. ^{31}P MT MRS 스펙트라 분석

설정된 파라미터가 타당한지 확인하기 위해, 본 연구에서 획득한 MRS 스펙트라로부터 k_f 값을 구하여 기존의 연구들과 비교하였다. MT MRS 스펙트라를 분석하기 위하여 jMRUI 소프트웨어 패키지(jMRUI; <http://muri.uab.es/muri/>)에 있는 AMARES 알고리즘을 사용하였다. T1 이완 영상에서 그래프를 맞추고 T1 이완 시간을 구하기 위해서 MATLAB 2009b(Mathworks, Natick, MA, USA)환경에서 제공하는 curve fitting tool 을 사용하였다.

1) 전처리

스펙트럼의 뒤에 zero filling 을 하면 신호잡음비를 강화하고 스펙트럼의 해상도를 높이는 효과가 있다(Ebel, Dreher, & Leibfritz, 2006). 본 연구에서는 zero filling 을 2048 으로 처리하였다.

아포다이제이션(apodization)은 증폭은 유지하면서 그 외의 방향에서 잡음을 없애고 스펙트럼을 부드럽게 만드는 효과가 있다(Ebel et al., 2006). 본 연구에서는 apodize 를 20 으로 처리하였다.

위상보정(Phase correction)을 통해 스펙트라의 위상과 정점을 명확히 확인할 수 있도록 조정하였다(Chase, 1982). 위상보정에서 zero order phase (deg)를 조절하여 스펙트럼의 기저점이 중심을 기준으로 수평, 대칭이 되도록 설정하고, Begin time(ms)를 조절하여 각 정점의 좌우가 대칭이 되도록 연구자가 직접 조절하고 확인하여 설정하였다(Chase, 1982).

2) AMARES 에서 정점 값의 획득

^{31}P MRS 의 스펙트라(그림 2)를 확인해보면, 왼쪽에서부터 파동의 각 정점 별로 인산모노에스테르(PME, phosphomonoester), Pi, 인산디에스테르(PDE, phosphodiester), PCr, γ -ATP, α -ATP, β -ATP 의 화학적 이동이 나타난다. AMARES 에서 각 파동의 정점과 중간지점을 각각 클릭하여 해당 물질의 화학적 이동 위치를 인식시키면, 스펙트럼에서 설정한 정점이 아닌 잔류하는 잡음을 제거하고 각 성분의 원래 요소만을 분석하여 해당 물질의 높이를 확인할 수 있다(Mierisova et al., 1998).

Figure 2. Analysis of ^{31}P MT MRS spectrum in AMARES

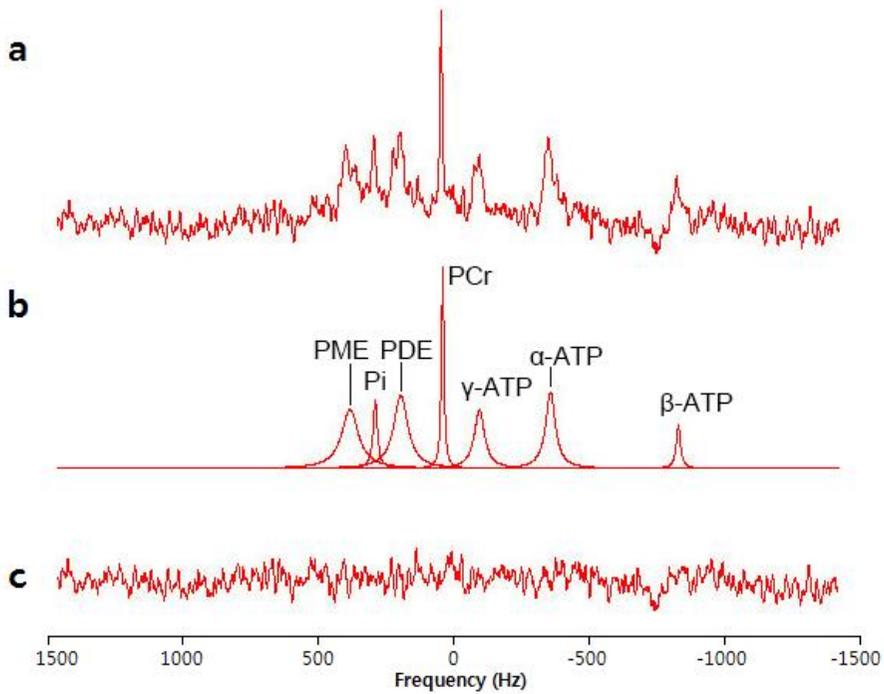


그림 2. jMRUI 프로그램 상에서 ^{31}P MT MRS 스펙트럼 분석

왼쪽부터 PME, Pi, PDE, PCr, γ -ATP, α -ATP, β -ATP 의 화학적 이동을 나타낸다. a) 처음 얻어진 스펙트럼; b) 잔류 잡음을 제거된 후 각 요소의 과형 모형; c) 제거된 잔류 잡음.

Abbreviations: PME, phosphomonoester; Pi, inorganic phosphate; PDE, phosphodiester; PCr, phosphocreatine; ATP adenosine triphosphate.

3) T1 이완 시간 획득

획득된 T1 이완 영상에서 각 시간 지점에 해당하는 스펙트럼을 각각 분석하여, 해당 시점에 대한 스펙트럼의 PCr 정점 값을 구하였다. T1 이완 시간을 찾기 위해 다음 식을 사용하였다.

$$Mz(t) = Mz,eq * (1 - 2e^{-\frac{t}{T1}}) \quad [4]$$

각 시간 지점에 해당하는 정점 값을 MATLAB curve fitting tool 을 통해서, 지점들이 이루는 그래프가 위의 방정식(식 4)에 가장 잘 맞는 T1 값을 구했다.

4) CK 반응 속도 상수 k_f

Chen 등이 제시한 수정된 Bloch 방정식(식 3)에 대입하여 k_f 값을 측정하였다(Chen et al., 1997).

5) pH 와 pMg 의 측정

Petroff 등이 제시한 식(식 5)에 PCr 과 Pi 의 화학적 이동 차이를 적용하여 pH 를 측정하였고(Petroff et al., 1985), Lotti 등이 제시한 식(식 6)에 PCr 과 β -ATP 의 화학적 이동 차이를 적용하여 pMg 를 측정하였다(Lotti et al., 1996).

$$\text{pH} = 6.77 + \log_{10} \left(\frac{\text{Pi shift} - 3.29}{5.68 - \text{Pi shift}} \right) \quad [5]$$

$$\text{pMg} = 4.24 - \log_{10} \left(\frac{(\beta\text{-ATP shift} + 18.58)^{0.42}}{(-15.74 - \beta\text{-ATP shift})^{0.84}} \right) \quad [6]$$

결과

1. 설정된 ^{31}P MT MRS 의 프로토콜

^{31}P MT MRS 는 전 포화 처리를 하지 않은 31P_MT_M0 과 γ -ATP 위치에 전 포화 신호를 충분히 주면서 촬영을 한 31P_MT_Mz 스펙트라를 각각 획득하였다. TR 은 6000(ms), TE 는 0.1(ms)으로 설정하였다.

전 포화신호를 줄 때에는 γ -ATP 의 화학적 이동이 나타나는 정확한 위치를 경험적으로 찾아내어 상쇄 주파수를 -94(Hz)으로 설정하였고, 충분히 포화시키기 위해 진동 각을 3000, 신호지속시간을 1 으로 설정하였다. 높은 해상도의 스펙트라를 얻기 위해 신호평균 횟수(NSA, number of signal average)를 64 으로 설정하였다. 각 MT 영상의 촬영시간은 6 분 36 초였다.

T1 이완영상은 시간 지점을 각 55, 661, 1464, 2653, 5000(ms)으로 다섯 개를 설정하였고, 촬영시간은 17 분 20 초였다. 최종적으로 결정된 프로토콜의 총 촬영시간은 37 분 2 초이며, 설정된 파라미터는 표 6 에 정리하였다.

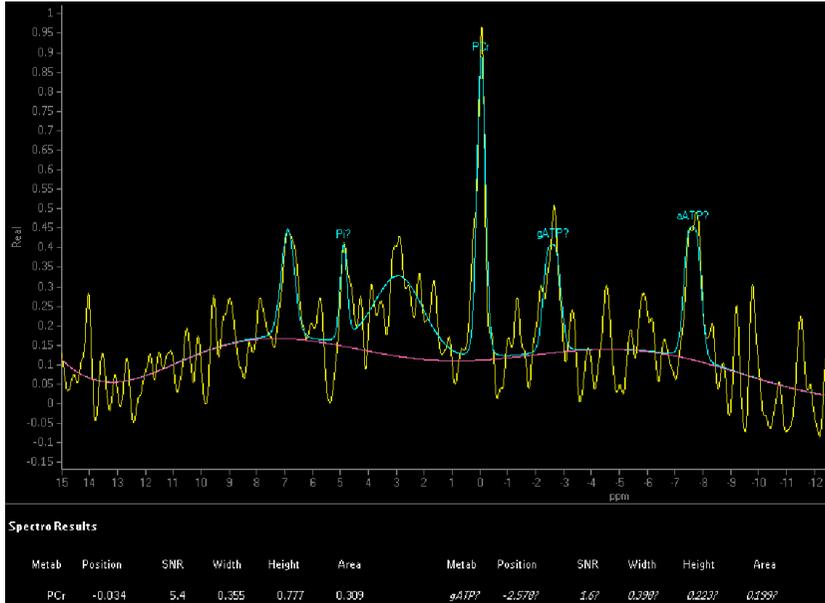
결과 1. 상쇄 주파수 결정

γ -ATP의 화학적 이동이 약 +2.5ppm에서 발생하는데, 이는 PCr을 기준(0 ppm)으로 한 상대적인 위치이다. 따라서, 측정하는 기기에 따라 절대적인 주파수가 다르게 나타난다. 이 값을 본 연구에서 사용하는 MR 시스템의 주파수에 찾기 위하여 γ -ATP 정점의 절대적인 화학적 이동위치를 찾아내어 상쇄 주파수를 계산하였다.

계산된 상쇄 주파수의 대략적인 위치를 1Hz 간격으로 변화시키며, γ -ATP의 감쇄 정도를 확인하였다. 각 주파수마다 촬영을 했기 때문에, 촬영을 여러 번 반복하게 되어, 촬영시간이 길어져 2명의 연구참여자를 대상으로 주파수를 나누어 촬영하였다. 그, 결과 γ -ATP는 상쇄 주파수가 -94(Hz)일 때의 높이 값이 0.055으로 가장 잘 포화되었으며, 포화 신호가 없을 때의 높이 값 0.223보다 약 25 퍼센트 수준으로 감쇄되었다(그림 3).

Figure 3. Spectra derived from the images obtain with or without saturation pulse

a)



b)

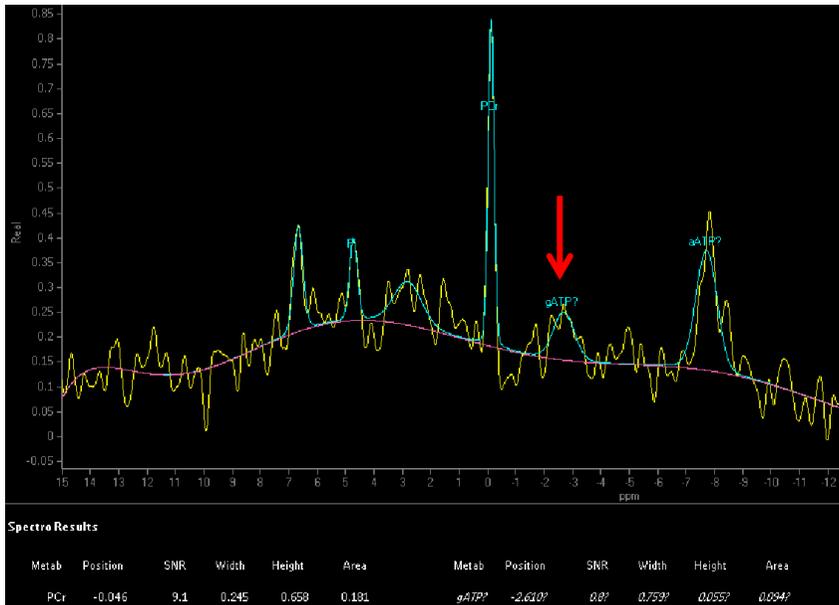


그림 3. Philips system 의 spectroview 에서 γ -ATP 가 포화되기 전, 후의 화면
a) 전 포화 신호가 없는 스펙트럼으로, γ -ATP 높이 값이 0.223 으로 나타남; b). 전 포화신호의 상쇄 주파수가 -94(Hz)인 지점에서 γ -ATP 가 포화되어 그 높이 값이 0.055 으로 나타남.

결과 2. 진동 각 결정

적절한 진동 각 설정을 찾기 위해 1 명의 연구참여자를 대상으로, 다른 파라미터는 일정하게 고정하고 진동 각을 1000 부터 3000 까지 500 씩 변화시키면서 측정하였고, 각 실험에서 나타나는 PCr 의 높이를 비교(표 3)하였다. 진동 각이 클수록 γ -ATP 의 포화가 잘 이루어져서 PCr 의 높이가 많이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

진동 각이 1000 일 때 PCr 의 높이는 $10.69E^{-5}$ 이었고, 1500 에서 $8.576E^{-5}$, 2000 에서 $7.710E^{-5}$, 2500 에서 $7.326E^{-5}$, 3000 에서 $6.304E^{-5}$ 으로 측정되었다. 포화신호가 없을 때의 PCr 높이로부터 감소된 PCr 높이의 비율은 진동 각이 3000 일 때 약 67 퍼센트로 가장 많이 감소된 것을 확인할 수 있다. 또한 이 때 전자파 흡수율의 증가가 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 포화신호를 충분히 주어 PCr 높이가 최대로 감소되도록 설정하고자, 진동 각을 3000 으로 결정하였다.

Table 3. The values of PCr height according to different pulse angles

	Pulse angle (deg)					
	No saturation	1000	1500	2000	2500	3000
PCr ($\times 10^{-5}$)	9.407	9.676	8.576	7.710	7.326	6.304
Reduced ratio	-	1.03	0.91	0.82	0.78	0.67

결과 3. 신호지속시간 결정

γ -ATP 를 충분히 포화시켜 정상상태에 도달할 수 있는 신호지속시간을 찾기 위해, 다른 파라미터는 일정하게 고정하고 신호지속시간(Hz)를 2(0.5 초), 1(1 초), 0(4 초)으로 변경하며 PCr 높이 값의 변화를 측정하였다. 총 3 명의 연구참여자에서 각각 측정하여 평균값을 구하여 정리(표 4)하였다.

PCr 의 평균 높이 값은 포화처리를 하지 않았을 때 $8.446E^{-5}$ 이었고, 신호지속시간이 2(Hz)일 때 $5.151E^{-5}$ 이었고, 1(Hz)일 때 $4.502E^{-5}$ 이었으며, 0(Hz)일 때 $6.426E^{-5}$ 이었다. 신호지속시간에 따라 PCr 높이가 감쇄된 비율을 그래프(그림 4)로 나타내었다. 신호 지속시간이 1 초 일 때 PCr 의 높이가 가장 낮은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 신호지속시간을 1(Hz)으로 결정하였다.

Table 4. The values of PCr height according to different windows

	Window (Hz) (sec)	No saturation	2 (0.5)	1 (1)	0 (4)
Case 1	PCr ($\times 10^{-5}$)	9.344	4.963	4.377	5.152
	Reduction ratio	-	0.53	0.47	0.55
Case 2	PCr ($\times 10^{-5}$)	6.832	4.818	4.108	5.459
	Reduced ratio	-	0.71	0.60	0.80
Case 3	PCr ($\times 10^{-5}$)	9.161	5.673	5.020	8.667
	Reduced ratio	-	0.62	0.55	0.95
average	PCr ($\times 10^{-5}$)	8.446	5.151	4.502	6.426
	Reduced ratio	-	0.62	0.54	0.77

Figure 4. Reduction ratio of PCr height according to saturation window

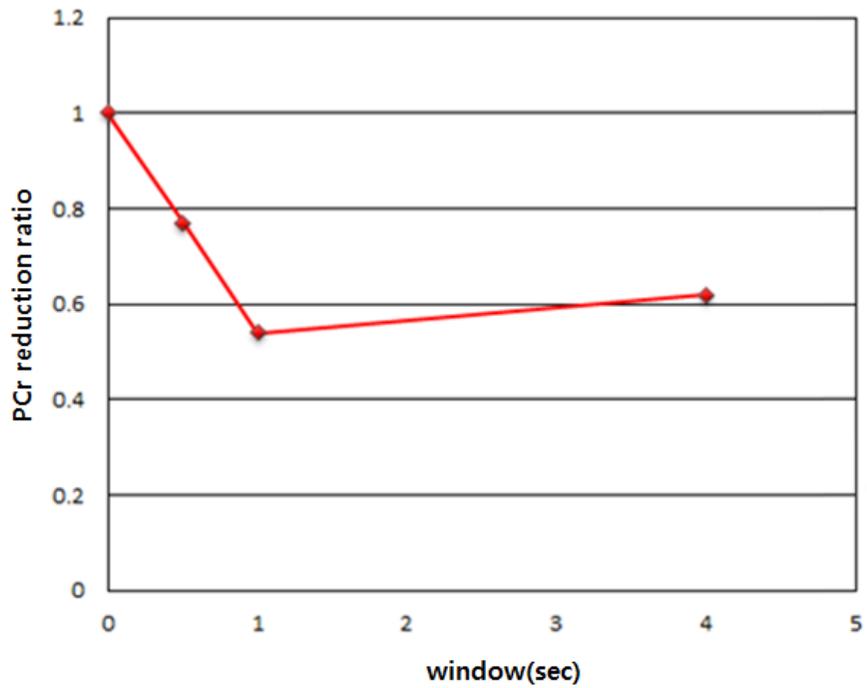


그림 4. 포화 신호지속시간에 따른 PCr의 감쇄 비율 그래프
포화지속시간이 길어질수록 점차 감쇄가 발생하다가, 포화지속시간이 1 초인 지점에서 가장 많이 감쇄되었고, 이후부터 다시 일부 증가됨.

결과 4. T1 이완영상 측정 시간 지점 결정

T1 이완영상(31P_T1)은 MT 영상과 같은 위치의 FOV 를 잡았다.

T1 이완시간이 약 1500~2500(ms)의 사이임을 추정하여 TR 을 충분한 시간인 8000 으로 설정하였고, TE 는 0.1, NSA 는 24 이었다.

T1 이완영상을 측정하는 시간 지점을 초기에는 6 개, 각 200, 700, 1200, 2500, 3000, 3500(ms)로 설정하였고, 이 때 촬영시간은 20 분 24 초였다. 이 설정으로 7 명을 촬영하였고 각 시간 지점별로 PCr 의 높이 값을 측정하고자 하였다. 그러나, 2500(ms)지점의 주변에서 정점의 파동이 음에서 양으로 전환되면서 정확한 정점 값의 측정이 불가능하여 해당 지점을 제외하고 5 개의 값만 분석에 사용하였다. 이후, 시간 지점을 5 개로 설정을 변경하였고, 스펙트라 상에서 정점을 찾기 어려운 전환시간 근처를 피해 55, 661, 1464, 2653, 5000(ms)으로 설정하였다. 최종 설정된 T1 이완영상의 촬영시간은 17 분 20 초였다. 각 시간 지점에서 PCr 의 높이 값을 표 5 에 정리하였다.

Table 5. The values of PCr height at each time point

Time point (ms)	200	700	1200	3000	3500
1	-5.428	-3.600	-1.606	3.604	4.471
2	-5.789	-3.582	-2.611	4.188	4.407
3	-6.591	-3.030	-0.208	3.518	4.207
4	-5.643	-3.997	-1.669	7.416	4.571
5	-4.441	-4.335	-2.130	5.389	6.298
6	-4.440	-3.321	-0.795	4.565	5.097
7	-6.955	-2.518	-1.886	5.714	7.460

Time point (ms)	55	661	1464	2653	5000
8	-8.595	-4.329	-0.341	4.436	8.925
9	-7.186	-6.571	-1.030	1.391	6.459
10	-7.224	-5.079	-1.585	4.378	7.372
11	-8.666	-5.693	-1.433	3.692	4.522
12	-8.059	-3.962	-1.422	2.507	7.310
13	-5.928	-4.242	-5.787	2.122	6.311

* The values of PCr height in this table are represented in units of [$\times 10^{-5}$]

Table 6. Final scan parameters applied in the study

Scan name	FOV (mm)	TR (ms)	TE (ms)	Pre-saturation			NSA	Duration
				Offset freq (Hz)	Pulse angle	Window		
T1W_FFE	230 x 184 x 143	Shortest	4.60	-	-	-	2	(2:10)x3 6:30
31P_MT_M0	50 x 72.1 x 40	6000	0.1	-	-	-	64	6:36
31P_MT_Mz	50 x 72.1 x 40	6000	0.1	-94	3000	1	64	6:36
31P_T1	50 x 72.1 x 40	8000	0.1	-	-	-	24	17:20
	Time point : 55 661 1464 2653 5000							
Total scan time :								37:02

Abbreviations: FOV, field of view; TR, repetition time; TE, echo time; NSA, number of signal average

2. ^{31}P MT MRS 스펙트라 분석 결과

연구참여자 총 19명 중, 파라미터 설정의 타당성 분석에 참여한 사람은 13명이었다. 연구참여자의 인구학적 정보와 촬영 결과는 표 7에 요약되어 있다. 연구 참여자의 평균 나이는 만 25.92세 (표준편차 1.9, 범위 22.4-29.4)였으며, 4명의 남성과 9명의 여성이 포함되었다.

본 연구에서 값 $\frac{Mz}{M0}$ 은 0.63(표준편차 0.08)으로 나타났다. T1 이완 영상에서 얻어진 5개의 시간 지점에 대한 스펙트라(그림 5)를 분석하여 PCr 정점의 값(표 7)을 각각 얻었다. 정점 값을 통해 T1 이완 그래프(그림 6)를 피팅하고, 방정식(식 4)에 맞추어 T1 이완 시간의 평균 값을 구한 결과 $0.48(\text{s}^{-1})$ (표준편차 0.22)으로 나타났다.

CK 반응 속도 상수 k_f 값의 평균은 0.28(표준편차 0.07)이었으며, pH는 7.04(표준편차 0.04), pMg는 4.46(표준편차 0.27)으로 측정되었다.

Figure 5. Analysis of T1 relaxation spectra

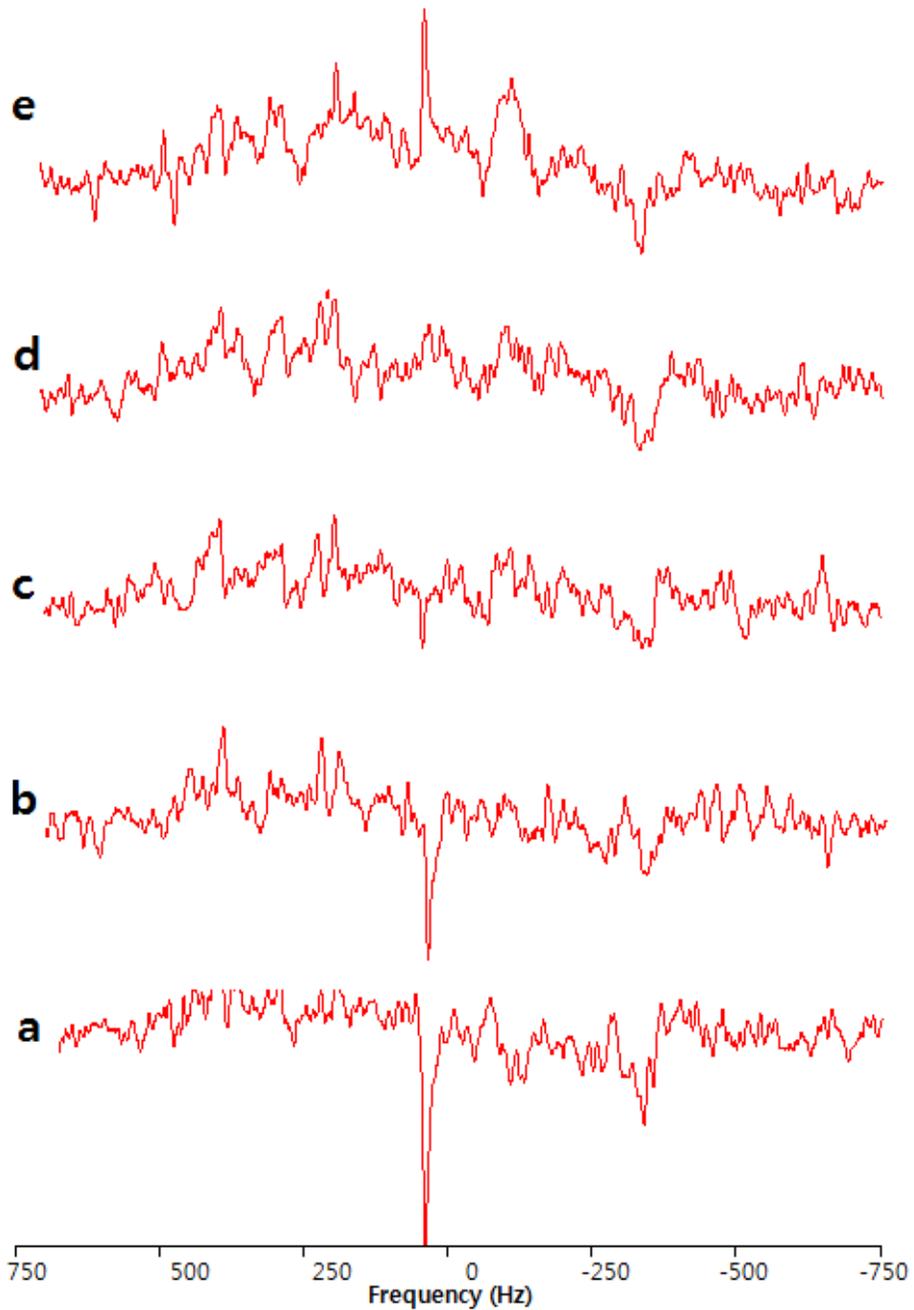


그림 5. jMRUI에서 T1 이완영상의 분석

T1 이완 영상에서 각 시간 지점에 해당하는 각각의 스펙트럼

a) t=55(ms)에서의 스펙트럼; b) t=661(ms)에서의 스펙트럼; c) 1464(ms)에서의 스펙트럼, d) t=2653(ms)에서의 스펙트럼; e) t=5000(ms)에서의 스펙트럼.

Figure 6. T1 relaxation graph

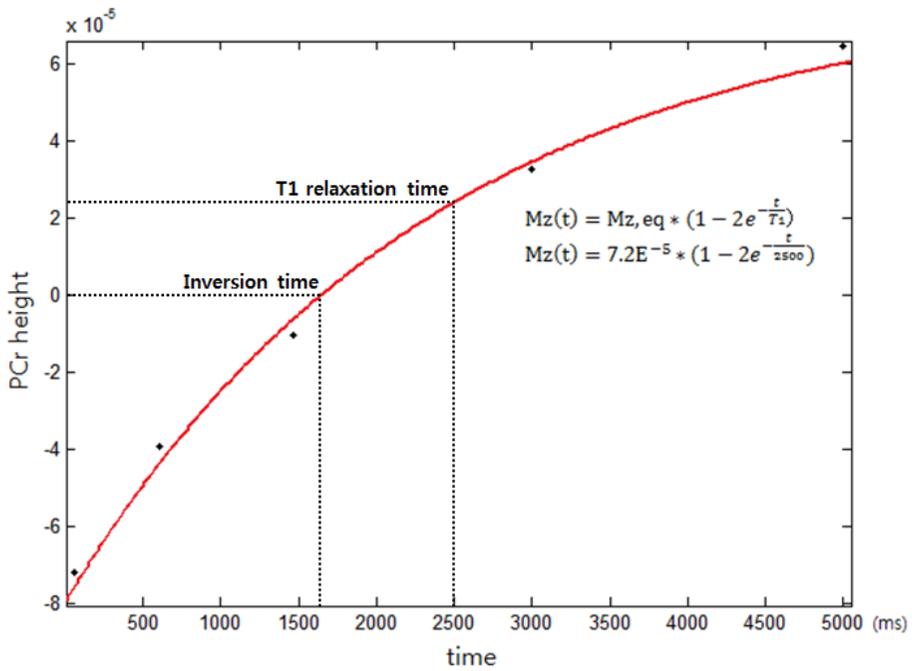


그림 6. Matlab 의 curve fitting tool 에 나타난 T1 이완 그래프
T1 이완 영상에서 획득한 정점 값을 플로팅하고 가장 잘 맞는 그래프를 피팅하여 T1 이완시간 값을 구할 수 있다.

Table 7. Demographic information and k_f , pH, pMg values of the participants

Subject Case number	sex	age	$\frac{Mz}{MO}$	T1(s ⁻¹)	k_f	pH	pMg
1	F	28.16	0.62	0.45	0.27	7.09	4.26
2	F	22.37	0.58	0.43	0.31	7.02	4.06
3	F	26.85	0.66	0.55	0.28	7.02	4.94
4	F	25.75	0.57	0.47	0.35	7.09	4.52
5	F	28.44	0.7	0.52	0.22	6.95	4.11
6	F	25.67	0.63	0.49	0.29	7.06	4.57
7	F	26.73	0.69	0.54	0.24	7.01	4.21
8	F	24.17	0.54	0.42	0.36	7.01	4.35
9	M	26.39	0.57	0.42	0.34	7.09	4.63
10	F	29.44	0.66	0.51	0.26	7.05	4.87
11	M	25.49	0.85	0.49	0.08	7.10	4.45
12	M	25.73	0.64	0.48	0.27	7.07	4.30
13	M	28.72	0.53	0.39	0.34	7.01	4.72
Average (SD)	M:4 F:9	26.45 (1.87)	0.63 (0.08)	0.48 (0.05)	0.28 (0.07)	7.04 (0.04)	4.46 (0.27)

고찰

1. 연구결과 요약 및 결과에 대한 고찰

본 연구에서는 MRI 시스템에서 ^{31}P MT MRS 를 이용하여 뇌 내 에너지대사를 측정하기 위한 프로토콜을 확립하고자 하였다. 또한, 건강한 젊은 성인에서 ATP 에너지대사 과정에서 CK 반응 속도 상수를 계산하여 설정된 방법론이 타당함을 보이하고자 하였다. 본 연구결과에서 측정된 k_f 값은 0.28(표준편차 0.07)으로 측정되었다. 앞서 소개한 선행연구(표 2) 중에서 Du 등은 정상성인의 전두엽에서 표면코일(surface coil)로 ^{31}P MT MRS 를 촬영하여 측정한 k_f 값을 0.29(표준편차 0.02)으로 보고하였다(Du et al., 2013). 또 다른 연구에서는 정상 대조군의 전두엽을 용적코일로 ^{31}P MT MRS 를 촬영하여 측정한 k_f 값을 0.27(표준편차 0.06)으로 보고하였다(Du et al., 2014). 본 연구에서 도출해낸 k_f 값은 선행연구들의 결과와 일관된 값으로서, 설정된 프로토콜을 통해 뇌 내 에너지대사의 효율성을 타당하게 측정할 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 프로토콜에 의한 총 촬영시간은 37분 2초이다. Jeong 등이 3tesla 의 MRI 시스템 환경에서 개발한 프로토콜의 총 촬영시간이 30분이었던 반면에(Jeong et al., 2011). Du 등은 4 tesla 의 NMR 촬영환경에서, 실험세션이 70분으로 설정되었다(Du et al., 2013). 선행 연구들과

비교할 때, 본 연구는 비교적 짧은 시간 내에 적절한 측정이 가능한 프로토콜을 설정하였다고 볼 수 있다.

본 연구는 연구 대상을 건강한 성인으로 한정하였고, 퇴행성 질환, 정신질환을 가지고 있거나, 정신활성에 영향을 미칠만한 약물을 복용하는 경우에는 연구 대상에서 제외하고자 하였기 때문에, 여러 측면에서 잠재적 교란 요인을 통제하는 효과를 얻을 수 있었다.

파라미터 설정과정에서 포화신호 지속기간(표 4)을 보면, 지속시간이 1 초일 때보다 4 초일 때 더 큰 PCr 값이 관찰되었다. 이것은 PCr 과 γ -ATP 사이의 전환 시간이 매우 짧기 때문에, 4 초정도가 지나면 PCr 과 ADP 사이에서 전환된 γ -ATP 가 생겨서, 감쇄되었던 γ -ATP 의 높이 값이 회복하는 것으로 볼 수 있다. 따라서 PCr 값의 높이도 조금 회복된 것으로 볼 수 있다.

^{31}P MT MRS 를 통해 측정된 값들 중, M0 는 포화 신호가 없을 때 PCr 의 높이 값이고, Mz 는 충분한 포화 신호를 받아 정상상태를 유지할 때의 PCr 의 높이 값이다. 따라서 값 $\frac{\text{Mz}}{\text{M0}}$ 은 γ -ATP 가 충분히 포화신호를 받기 전과 후에 PCr 높이 감쇄 정도의 차이를 확인할 수 있는 지표가 된다. 본 연구에서 $\frac{\text{Mz}}{\text{M0}}$ 값은 0.63(표준편차 0.08)이며, 즉 PCr 이 63%으로 감쇄되었음을 의미한다. Lei 등이 진행한 연구에서도 이와 비슷한 값인 0.68(표준편차 0.05)을 제시하였다(Lei

et al., 2003). 본 연구에서는 11 번 연구참여자의 $\frac{Mz}{M0}$ 이 0.85 로 측정되었는데, 이는 PCr 의 초기 값이 너무 작게 측정되었거나, PCr 이 충분히 감쇄되지 않았을 가능성이 있다. 그 결과를 통해 연쇄적으로 계산한 k_f 값은 상당히 낮은 수치인 0.8 로 측정되었다. 그러나 전체 연구 참여자 13 명의 결과 값 중 11 번의 경우에만 매우 낮은 값으로 측정되었으므로 프로토콜이 잘못 설정되었다기보다는 관심영역을 미세하게 다른 부분으로 잡았거나, 연구참여자의 움직임 때문에 이러한 결과가 나타났을 가능성을 제기할 수 있다. 이러한 부분을 보완하기 위해서는 더 많은 표본을 대상으로 연구를 진행하는 것이 필요하다.

T1 이완시간은 평균 $0.48(s^{-1})$, 표준편차 0.05 로 측정되었다. 관심영역의 크기와 위치가 T1 이완시간의 측정에 영향을 줄 수 있다. T1 이완시간은 조직마다 그 값이 다르며, 백질과 회백질의 조직이 서로 다르므로 관심영역에 따라서 T1 이완시간이 달라질 수 있다(Ethofer et al., 2003). 그러므로 측정하고자 하는 곳에 적절한 관심영역의 크기를 설정하여야 한다. 또한, 본 연구에서 측정한 T1 이완시간의 값은 T1 이완 영상에서 획득한 각 시간 지점과 해당하는 값을 그래프에 피팅한 후 방정식(식 4)을 대입하여 가장 유사한 그래프를 보일 때의 근사값을 구한 것이다. 그래프를 더욱 명확히 그리기 위해서 측정하는 시간 지점의 개수를 증가시키면 촬영시간이 지나치게 길어지기 때문에 그 수는 상당히 제한적이다.

본 연구에서는 초기에는 여섯 개의 지점을 설정하였으나,
분석단계에서 다섯 개의 지점만을 사용하면서, 프로토콜을 수정하여
다섯 개의 지점을 설정하여 분광영상을 획득하였다.

2. 본 연구의 장점 및 의의

본 연구는 국내에서는 최초로 MR 시스템에서 ^{31}P 코일을 이용하여 뇌 내 에너지대사 물질을 연구하고자 하는 시도였다. 해외에서 발표된 기존의 연구(Du et al., 2014; Jeong et al., 2011) 중에는 Siemens MRI 시스템 또는 NMR 시스템에서 ^{31}P MT MRS 를 이용하여 뇌 내 에너지대사 물질을 확인하고자 하는 시도들이 있었지만, 각 시스템마다 기기에 따른 프로토콜의 설정이 달라서 Philips MRI 시스템에 적용하는 것은 불가능하여 새로운 설정이 필요했다. 본 연구는 Philips MR 시스템을 기반으로 하는 최초의 시도였다. 또한, 초기에 선행된 일부 ^{31}P MT MRS 연구들(Chen et al., 1997; Du et al., 2007; Lei et al., 2003)은 표면코일을 사용한 것에 반해, 본 연구는 용적코일을 사용하였다. 용적코일은 측정하려는 영역의 전반에 비교적 균질한 자기장 영역을 형성하기 때문에, 작은 복셀(voxel) 영역에서도 좋은 영상 신호를 획득할 수 있을 뿐만 아니라, 두개골과 근육으로부터 발생할 수 있는 효과를 제외하고 측정하고자 하는 관심영역을 직접적으로 측정할 수 있었다(Jeong et al., 2011).

본 연구에서는 ^{31}P MT MRS 에서 k_f 를 측정하기 위한 최적의 스펙트라를 짧은 시간 내에 획득하기 위한 프로토콜의 설정에 대하여 연구하였다. 자기공명영상에 사용되는 공명주파수는

무선주파수(RF, radio frequency) 영역에 속하는 전자파의 일부분이며, 전자파 흡수율은 전자파에 의한 작용을 정량적으로 표현한 것이다(Commission, 2002). 전자파에 인체가 노출되면 인체에 유도되는 전류 때문에 신경을 자극하게 된다. 특히 고주파 전자파에 인체가 노출되면 체온을 상승시키는 열적 작용이 발생한다(Baker et al., 2004). 영상의 질을 높이는 방법으로 신호평균횟수를 크게 설정할 수록 신호 잡음비를 높일 수 있으나, 지나치게 높일 경우 촬영시간이 길어져 전자파흡수율이 증가하게 된다(Baker et al., 2004). 또한, MT 방법론에서 진동 각을 크게 설정할수록 포화 신호가 커서 감쇄가 잘 나타나지만 전자파 흡수율이 증가하는 제한이 있다. 전자파 흡수율이 증가하면 체온이 상승한다는 보고들이 있다(Achenbach et al., 1997; Rezai et al., 2002). 영상의 질을 높이고자, 신호평균횟수를 높이거나 진동 각을 크게 하는 등 전자파 흡수율이 지나치게 높게 발생하도록 설정된 프로토콜은 체온 상승을 초래하고, 체온 상승은 체내 pH와 마그네슘 이온 농도의 변화 등, 에너지대사에서의 영향을 줄 수 있으므로(Gupta et al., 1978), 오히려 실험 결과에 결함으로 작용할 가능성이 있다. 뿐만 아니라, 촬영시간이 길어지면 연구대상자의 동작잡음(motion artifact)이 발생할 수 있다. 이런 점들을 고려하여, 본 연구는 짧은 시간 내에 최적의 스펙트라 획득이 가능한 프로토콜을 설정하여 고주파 전자파에 노출되는 시간과 연구대상자의 움직임 최소화하고자

하였다. 결과적으로, 37 분 2 초 내에 k_f 를 계산하기 위한 모든 시퀀스를 얻을 수 있도록 프로토콜을 설정하였으며, 촬영 도중 전자파 흡수율에 대한 효과는 나타나지 않았다. 이에, 본 연구는 ^{31}P MT MRS 연구를 위한 설정 방법론을 확립함으로써, 향후 뇌 내 ATP 에너지대사 측정 관련 연구의 초석이 될 것이다.

ATP는 포도당이 분해과정을 거친 최종 에너지대사 산물로서, ATP가 ADP와 P_i 로 분해되면서 생체 내에 에너지를 제공하게 된다. 신경세포에 안정적인 에너지 공급을 하기 위해서는 ATP가 고갈되지 않도록 빠르게 재 합성되어야 한다(Boyer, 1999). 뇌 내 ATP 에너지 대사의 저하와 신경질환, 정신질환의 관련성에 대한 연구결과들이 ATP의 원활한 공급의 중요성을 시사한다(de la Monte & Tong, 2014; Eidelberg, 2009; Ferrer, 2009; Ishii et al., 2005; Olah et al., 2008; Rezin et al., 2009; Stork & Renshaw, 2005). Lyoo 등은 크레아틴(Cr, creatine)이 우울증 치료효과를 확대시킨다는 연구결과를 발표했다(Lyoo et al., 2012). 해당 연구에서는 항우울제와 크레아틴을 병용하여 복용했을 때, 크레아틴이 뇌 내 에너지대사를 촉진하여 항우울제의 영향을 확대한다고 설명하고 있다. 이 연구결과는 포스포크레아틴이 ATP의 재합성에 중요한 요소로 작용한다는 것에도 관련이 있으며, 뇌 내 에너지대사의 촉진이 우울장애를 효과적으로 치료할 수 있음을 밝혀냈다(Lyoo et al., 2012). 헌팅턴 병에서도 고용량의 크레아틴을 복용하는 것이 증상을 완화시키는

데에 효과가 있다는 연구결과도 있다(Rosas et al., 2014). 이러한 연구결과들은 뇌 내 ATP 에너지대사가 질환의 진단과 치료효과를 파악하는 생체지표가 될 수 있음을 의미하며, 이를 정확하게 측정하고 확인하는 것이 매우 중요하다.

에너지대사를 측정하는 방법으로 OGI 방법이 있지만, 이 방법은 산소 포도당지수의 변화량 통해 ATP의 생성, 소비수준을 간접적으로 측정하기 때문에 ATP 대사를 정밀하게 측정하는 것에는 한계가 있다(Vaishnavi et al., 2010). 그러므로 정밀한 에너지대사 연구를 위해서는 ATP를 직접적으로 측정할 수 있는 ^{31}P MT MRS 방법론이 더 적합할 수 있다. ^{31}P MT MRS는 두뇌 활동과 관련된 산화적 인산화의 속도와 변화를 측정하는데 적합하다는 연구결과가 발표되었다(Lei et al., 2003). ATP를 포화시킨 후 다른 에너지대사 산물의 변화를 통해 ATP의 반응 속도와 분해속도 모두 측정하는 것이 가능하다. MT MRS 방법론을 활용하면, 2개의 스펙트라와 T1이완시간만을 측정하여 에너지대사 반응 속도를 계산해낼 수 있기 때문에, 측정 시간에 있어서도 매우 경제적이다. 또한, ^{31}P MT MRS 방법론이 ATP 대사 효율성을 정량적으로 측정하는 데에 적합성 도구임을 실제 동물실험을 통해 입증한 연구결과도 있다(Du et al., 2008). Du 등은 뇌 내 ATP 대사와 효율성을 측정하는 데에 ^{31}P MT MRS가 결정적인 역할을 할 수 있으며 이것이 임상적으로 신경질환을 진단하는 근거가 될 수 있음을 제시하였다(Du et al.,

2014). 이와 같이, ^{31}P MRS 방법론의 중요성이 선행연구를 통해 지속적으로 대두되고 있다.

본 연구에서도 ^{31}P MRS 방법론은 생체 내에서 ATP의 작용을 비 침습적이면서도 직접적으로 측정할 수 있는 효과적인 도구임을 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과는 향후 퇴행성 신경질환이나 정신질환을 가진 다양한 군에서의 ^{31}P MRS 연구에 적용 될 수 있다. 따라서 본 연구는 뇌 내 에너지대사와 여러 질환의 관련성과 원인을 규명하거나 새로운 치료제의 개발 및 치료 효과를 확인하는 데에 기여할 수 있을 것이다.

3. 한계점 및 향후 연구 방향

본 연구의 한계점으로 다음을 들 수 있다. 먼저, 연구참여자의 나이가 모두 20 대였기 때문에 건강한 성인을 대표할 수 있는 표본이라고 하기에는 부족하다는 한계점이 있다. 이는 추후에 다양한 연령층의 더 많은 표본을 대상으로 연구를 확장하여 보완할 수 있을 것이다.

블리드 오버 효과는 특정 상쇄주파수를 포화시킬 때 스펙트럼에서 오직 해당 주파수의 신호만 포화되는 것이 아니라 그 주변의 주파수의 신호도 일부 포화시킬 수 있는 효과를 의미한다(Jeong et al., 2011). 열 평형(thermal equilibrium)은 고주파 신호를 받을 때 신체가 받는 전자파 흡수율이 증가함에 따른 체온 상승이 신호의 감쇄에 줄 수 있는 영향을 의미한다(Jeong et al., 2011). 본 연구에서 블리드 오버 효과와 열 평형 효과를 반영하지 않았다. 추후에, 블리드 오버 효과와 열 평형을 고려하여 분석할 수 있는 방향으로 프로토콜을 구체적으로 발전시키려는 연구를 통해 더 세밀하고 정확한 에너지대사 측정을 할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Achenbach, S., Moshage, W., Diem, B., Bieberle, T., Schibgilla, V., & Bachmann, K. (1997). Effects of magnetic resonance imaging on cardiac pacemakers and electrodes. *Am Heart J*, *134*(3), 467-473.
2. Attwell, D., & Laughlin, S. B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, *21*(10), 1133-1145. doi: 10.1097/00004647-200110000-00001
3. Baker, K. B., Tkach, J. A., Nyenhuis, J. A., Phillips, M., Shellock, F. G., Gonzalez-Martinez, J., & Rezai, A. R. (2004). Evaluation of specific absorption rate as a dosimeter of MRI-related implant heating. *J Magn Reson Imaging*, *20*(2), 315-320. doi: 10.1002/jmri.20103
4. Barany, M., Barany, K., Burt, C. T., Glonek, T., & Myers, T. C. (1975). Structural changes in myosin during contraction and the state of ATP in the intact frog muscle. *J Supramol Struct*, *3*(2), 125-140. doi: 10.1002/jss.400030205
5. Bertolino, A., Frye, M., Callicott, J. H., Mattay, V. S., Rakow, R., Shelton-Repella, J., . . . Weinberger, D. R. (2003). Neuronal pathology in the hippocampal area of patients with bipolar disorder: a study with proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Biol Psychiatry*, *53*(10), 906-913.
6. Bittl, J. A., & Ingwall, J. S. (1985). Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A 31P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem*, *260*(6), 3512-3517.
7. Bloch, F. (1946). Nuclear induction. *Physical review*, *70*(7), 14.
8. Block, W., Traber, F., Flacke, S., Jessen, F., Pohl, C., & Schild, H. (2002). In-vivo proton MR-spectroscopy of the human brain: assessment of N-acetylaspartate (NAA) reduction as a marker for neurodegeneration. *Amino Acids*, *23*(1-3), 317-323. doi: 10.1007/s00726-001-0144-0
9. Bottomley, P. A. (1989). Human in vivo NMR spectroscopy in diagnostic medicine: clinical tool or research probe? *Radiology*, *170*(1 Pt 1), 1-15. doi: 10.1148/radiology.170.1.2642336
10. Bottomley, P.A., & Hardy, C.J. (1992). Mapping creatine kinase reaction rates in human brain and heart with 4 tesla saturation transfer 31P NMR. *J Magn Reson*, *99*, 443-448.
11. Boyer, P. D. (1999). What makes ATP synthase spin? *Nature*, *402*(6759), 247, 249. doi: 10.1038/46193
12. Bresnen, A., & Duong, T. Q. (2014). Brain high-energy phosphates and creatine kinase synthesis rate under graded isoflurane anesthesia: An in vivo P magnetization transfer study at 11.7 tesla. *Magn Reson Med*. doi: 10.1002/mrm.25136
13. Brindle, K. M., Blackledge, M. J., Challiss, R. A., & Radda, G. K. (1989). 31P NMR magnetization-transfer measurements of ATP turnover during

steady-state isometric muscle contraction in the rat hind limb in vivo.

Biochemistry, 28(11), 4887-4893.

14. Brown, T. R., Ugurbil, K., & Shulman, R. G. (1977). ^{31}P nuclear magnetic resonance measurements of ATPase kinetics in aerobic *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5551-5553.
15. Burbaeva, GSh, Savushkina, O. K., & Boksha, I. S. (2003). Creatine kinase BB in brain in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*, 4(4), 177-183.
16. Chachaty, C., & Langlet, G. (1976). An improved T1 relaxation time determination of the syn-anti equilibrium of nucleotides in solution. *FEBS Lett*, 68(2), 181-186.
17. Chase, D. B. (1982). Expanded phase out provisions of intermediate care facilities for the mentally retarded (ICFs/MR) correction plans--Health Care Financing Administration. Final rule. *Fed Regist*, 47(166), 37547-37550.
18. Chen, W., Zhu, X. H., Adriany, G., & Ugurbil, K. (1997). Increase of creatine kinase activity in the visual cortex of human brain during visual stimulation: a ^{31}P magnetization transfer study. *Magn Reson Med*, 38(4), 551-557.
19. Commission, International Electrotechnical. (2002). *Medical electrical equipment-Part 2-33: Particular requirements for the safety of magnetic resonance equipment for medical diagnosis*: International Electrotechnical Commission.
20. Cousins, J. P. (1995). Clinical MR spectroscopy: fundamentals, current applications, and future potential. *AJR Am J Roentgenol*, 164(6), 1337-1347. doi: 10.2214/ajr.164.6.7754871
21. de la Monte, S. M., & Tong, M. (2014). Brain metabolic dysfunction at the core of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 88(4), 548-559. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.012
22. Degani, H., Alger, J. R., Shulman, R. G., Petroff, O. A., & Prichard, J. W. (1987). ^{31}P magnetization transfer studies of creatine kinase kinetics in living rabbit brain. *Magn Reson Med*, 5(1), 1-12.
23. Deicken, R. F., Pegues, M. P., Anzalone, S., Feiwell, R., & Soher, B. (2003). Lower concentration of hippocampal N-acetylaspartate in familial bipolar I disorder. *Am J Psychiatry*, 160(5), 873-882.
24. Du, F., Cooper, A. J., Thida, T., Sehovic, S., Lukas, S. E., Cohen, B. M., . . . Ongur, D. (2014). In vivo evidence for cerebral bioenergetic abnormalities in schizophrenia measured using ^{31}P magnetization transfer spectroscopy. *JAMA Psychiatry*, 71(1), 19-27. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.2287
25. Du, F., Cooper, A., Lukas, S. E., Cohen, B. M., & Ongur, D. (2013). Creatine kinase and ATP synthase reaction rates in human frontal lobe measured by (^{31}P) magnetization transfer spectroscopy at 4T. *Magn Reson Imaging*, 31(1), 102-108. doi: 10.1016/j.mri.2012.06.018
26. Du, F., Zhang, Y., & Chen, W. (2012). Relayed magnetization transfer from nuclear Overhauser effect and chemical exchange observed by in vivo

- (3)(1)P MRS in rat brain. *Magn Reson Imaging*, 30(5), 716-721. doi: 10.1016/j.mri.2012.01.005
27. Du, F., Zhu, X. H., Qiao, H., Zhang, X., & Chen, W. (2007). Efficient in vivo 31P magnetization transfer approach for noninvasively determining multiple kinetic parameters and metabolic fluxes of ATP metabolism in the human brain. *Magn Reson Med*, 57(1), 103-114. doi: 10.1002/mrm.21107
 28. Du, F., Zhu, X. H., Zhang, Y., Friedman, M., Zhang, N., Ugurbil, K., & Chen, W. (2008). Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6409-6414. doi: 10.1073/pnas.0710766105
 29. Ebel, A., Dreher, W., & Leibfritz, D. (2006). Effects of zero-filling and apodization on spectral integrals in discrete Fourier-transform spectroscopy of noisy data. *J Magn Reson*, 182(2), 330-338. doi: 10.1016/j.jmr.2006.06.026
 30. Eidelberg, D. (2009). Metabolic brain networks in neurodegenerative disorders: a functional imaging approach. *Trends Neurosci*, 32(10), 548-557. doi: 10.1016/j.tins.2009.06.003
 31. Ethofer, T., Mader, I., Seeger, U., Helms, G., Erb, M., Grodd, W., . . . Klose, U. (2003). Comparison of longitudinal metabolite relaxation times in different regions of the human brain at 1.5 and 3 Tesla. *Magn Reson Med*, 50(6), 1296-1301. doi: 10.1002/mrm.10640
 32. Fehm, H. L., Kern, W., & Peters, A. (2006). The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res*, 153, 129-140. doi: 10.1016/S0079-6123(06)53007-9
 33. Ferrer, I. (2009). Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. *Prog Neurobiol*, 88(2), 89-103. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.02.004
 34. Forester, B. P., Zuo, C. S., Ravichandran, C., Harper, D. G., Du, F., Kim, S., . . . Renshaw, P. F. (2012). Coenzyme Q10 effects on creatine kinase activity and mood in geriatric bipolar depression. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 25(1), 43-50. doi: 10.1177/0891988712436688
 35. Gupta, R. K., Benovic, J. L., & Rose, Z. B. (1978). The determination of the free magnesium level in the human red blood cell by 31P NMR. *J Biol Chem*, 253(17), 6172-6176.
 36. Hoult, D. I., Busby, S. J., Gadian, D. G., Radda, G. K., Richards, R. E., & Seeley, P. J. (1974). Observation of tissue metabolites using 31P nuclear magnetic resonance. *Nature*, 252(5481), 285-287.
 37. Iotti, S., Frassinetti, C., Alderighi, L., Sabatini, A., Vacca, A., & Barbiroli, B. (1996). In vivo assessment of free magnesium concentration in human brain by 31P MRS. A new calibration curve based on a mathematical algorithm. *NMR Biomed*, 9(1), 24-32. doi: 10.1002/(SICI)1099-1492(199602)9:1<24::AID-NBM392>3.0.CO;2-B
 38. Ishii, K., Sasaki, H., Kono, A. K., Miyamoto, N., Fukuda, T., & Mori, E. (2005). Comparison of gray matter and metabolic reduction in mild Alzheimer's disease using FDG-PET and voxel-based morphometric MR

- studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32(8), 959-963. doi: 10.1007/s00259-004-1740-5
39. Jansen, J. F., Backes, W. H., Nicolay, K., & Kooi, M. E. (2006). 1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites. *Radiology*, 240(2), 318-332. doi: 10.1148/radiol.2402050314
 40. Jeong, E. K., Sung, Y. H., Kim, S. E., Zuo, C., Shi, X., Mellon, E. A., & Renshaw, P. F. (2011). Measurement of creatine kinase reaction rate in human brain using magnetization transfer image-selected in vivo spectroscopy (MT-ISIS) and a volume (3)(1)P/(1)H radiofrequency coil in a clinical 3-T MRI system. *NMR Biomed*, 24(7), 765-770. doi: 10.1002/nbm.1636
 41. Kauppinen, R. A., Halmekyto, M., Alhonen, L., & Janne, J. (1992). Nuclear magnetic resonance spectroscopy study on energy metabolism, intracellular pH, and free Mg²⁺ concentration in the brain of transgenic mice overexpressing human ornithine decarboxylase gene. *J Neurochem*, 58(3), 831-836.
 42. Khatri, N., & Man, H. Y. (2013). Synaptic Activity and Bioenergy Homeostasis: Implications in Brain Trauma and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol*, 4, 199. doi: 10.3389/fneur.2013.00199
 43. Lei, H., Ugurbil, K., & Chen, W. (2003). Measurement of unidirectional Pi to ATP flux in human visual cortex at 7 T by using in vivo 31P magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14409-14414. doi: 10.1073/pnas.2332656100
 44. Lim, E. L., Hollingsworth, K. G., Thelwall, P. E., & Taylor, R. (2010). Measuring the acute effect of insulin infusion on ATP turnover rate in human skeletal muscle using phosphorus-31 magnetic resonance saturation transfer spectroscopy. *NMR Biomed*, 23(8), 952-957. doi: 10.1002/nbm.1519
 45. Lyoo, I. K., Yoon, S., Kim, T. S., Hwang, J., Kim, J. E., Won, W., . . . Renshaw, P. F. (2012). A randomized, double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 169(9), 937-945. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12010009
 46. Mierisova, S., van den Boogaart, A., Tkac, I., Van Hecke, P., Vanhamme, L., & Liptaj, T. (1998). New approach for quantitation of short echo time in vivo 1H MR spectra of brain using AMARES. *NMR Biomed*, 11(1), 32-39.
 47. Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2000). Principles of Biochemistry. *Worth Publishers Inc; New York*.
 48. Olah, J., Klivenyi, P., Gardian, G., Vecsei, L., Orosz, F., Kovacs, G. G., . . . Ovadi, J. (2008). Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice. *FEBS J*, 275(19), 4740-4755. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06612.x

49. Petroff, O. A., Prichard, J. W., Behar, K. L., Alger, J. R., den Hollander, J. A., & Shulman, R. G. (1985). Cerebral intracellular pH by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology*, *35*(6), 781-788.
50. Rezai, A. R., Finelli, D., Nyenhuis, J. A., Hrdlicka, G., Tkach, J., Sharan, A., . . . Shellock, F. G. (2002). Neurostimulation systems for deep brain stimulation: in vitro evaluation of magnetic resonance imaging-related heating at 1.5 tesla. *J Magn Reson Imaging*, *15*(3), 241-250.
51. Rezin, G. T., Amboni, G., Zugno, A. I., Quevedo, J., & Streck, E. L. (2009). Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Neurochem Res*, *34*(6), 1021-1029. doi: 10.1007/s11064-008-9865-8
52. Rolfe, D. F., & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*, *77*(3), 731-758.
53. Rosas, H. D., Doros, G., Gevorkian, S., Malarick, K., Reuter, M., Coutu, J. P., . . . Hersch, S. M. (2014). PRECREST: a phase II prevention and biomarker trial of creatine in at-risk Huntington disease. *Neurology*, *82*(10), 850-857. doi: 10.1212/WNL.0000000000000187
54. Ross, B. D., Bluml, S., Cowan, R., Danielsen, E., Farrow, N., & Gruetter, R. (1997). In vivo magnetic resonance spectroscopy of human brain: the biophysical basis of dementia. *Biophys Chem*, *68*(1-3), 161-172.
55. Spencer, R. G., Balschi, J. A., Leigh, J. S., Jr., & Ingwall, J. S. (1988). ATP synthesis and degradation rates in the perfused rat heart. ³¹P-nuclear magnetic resonance double saturation transfer measurements. *Biophys J*, *54*(5), 921-929. doi: 10.1016/S0006-3495(88)83028-5
56. Stork, C., & Renshaw, P. F. (2005). Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry*, *10*(10), 900-919. doi: 10.1038/sj.mp.4001711
57. Tsunemi, T., & La Spada, A. R. (2012). PGC-1alpha at the intersection of bioenergetics regulation and neuron function: from Huntington's disease to Parkinson's disease and beyond. *Prog Neurobiol*, *97*(2), 142-151. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.10.004
58. Ugurbil, K. (1985). Magnetization transfer measurements of creatine kinase and ATPase rates in intact hearts. *Circulation*, *72*(5 Pt 2), IV94-96.
59. Ugurbil, K., Petein, M., Maidan, R., Michurski, S., & From, A. H. (1986). Measurement of an individual rate constant in the presence of multiple exchanges: application to myocardial creatine kinase reaction. *Biochemistry*, *25*(1), 100-107.
60. Vaishnavi, S. N., Vlassenko, A. G., Rundle, M. M., Snyder, A. Z., Mintun, M. A., & Raichle, M. E. (2010). Regional aerobic glycolysis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(41), 17757-17762. doi: 10.1073/pnas.1010459107
61. Valkovic, L., Gajdosik, M., Traussnigg, S., Wolf, P., Chmelik, M., Kienbacher, C., . . . Krssak, M. (2014). Application of localized (³¹P) MRS saturation transfer at 7 T for measurement of ATP metabolism in the liver: reproducibility and initial clinical application in patients with non-alcoholic

fatty liver disease. *Eur Radiol*, 24(7), 1602-1609. doi: 10.1007/s00330-014-3141-x

62. Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, 281 (Pt 1), 21-40.
63. Wu, G., & Wasylishen, R. E. (1995). Phosphorus chemical shift tensors in dithiadiphosphetane disulfides determined by solid-state ³¹P nuclear magnetic resonance. *Solid State Nucl Magn Reson*, 4(1), 47-51.

Abstract

Measurement of creatine kinase reaction rate in cerebrum using 31-phosphorus magnetization transfer approach in magnetic resonance spectroscopy

Eun Ko

Interdisciplinary Program in Cognitive Science

College of Humanities

Seoul National University

Introduction: The synthesis and decomposition of adenosine triphosphate (ATP) are essential processes for the energy metabolism of organisms. In particular, the creatine kinase (CK) reaction rapidly synthesizes ATP and enables stable energy metabolism. Recent studies have reported relationships between brain energy metabolism and neurodegenerative and psychiatric disorders, contributing to growing interest in the field. Thus, the current study aimed to validate a noninvasive and direct methodology to evaluate the efficiency of brain energy metabolism, by measuring the forward transition rate constant (k_f) of the CK reaction through phosphorus (^{31}P) magnetization transfer magnetic resonance spectroscopy (MT-MRS).

Method: Using the steady-state saturation MT-MRS method, the k_f values from 19 participants were measured with a ^{31}P volume head coil in a Philips magnetic resonance system. Among the participants, 6 participants participated in an experiment to set up the protocols for pre-saturation parameters. Subsequently, the ^{31}P MT-MRS spectra were obtained from 13 participants by using the established protocols. The k_f values were calculated from the T1 relaxation time measured by using the inversion recovery of phosphocreatine.

Results: The following parameters were set up in order to saturate the peak of γ -ATP (gamma-ATP): offset frequency = -94 Hz; pulse angle = 3000 degree; window = 1 Hz; number of signal average (NSA) = 64. For the T1 relaxation protocols, 5 time points including 55, 661, 1464, 2653, and 5000 milliseconds were chosen. The total scanning time of the finally established protocol was 37 minutes and 2 seconds. The mean T1 relaxation time was $0.48(\text{s}^{-1})$ (standard deviation, $\text{SD}=0.05$). The mean k_f was measured as 0.28 ($\text{SD} = 0.07$) in the current study. The mean values of pH and pMg were 7.04 ($\text{SD}=0.04$) and 4.46 ($\text{SD}=0.27$), respectively. As these values are consistent with those from previous studies, the validity of the currently proposed novel protocol has been affirmed.

Discussion: Using the new protocols set up in the current study, to obtain a valid measure of k_f in a relatively short period of time has become possible.

The present study is the first South Korean study which has validated a research methodology to study brain energy metabolites with a ^{31}P volume coil in an magnetic resonance system. The current results may constructively contribute to the investigation of the cause of psychiatric disorders related to energy metabolism and the assessment of treatment effectiveness in the future.

Key words: magnetic resonance spectroscopy, magnetization transfer, energy metabolism, adenosine triphosphate, creatine kinase reaction

Student Number: 2012-20068