

개의 뇌 조직로부터 추출한 대사물질의 절대농도 측정 및 평가: 500 MHz 고자장 핵자기공명분광법을 이용한 예비연구결과

우동철¹ · 방은정² · 최치봉¹ · 이성호¹ · 김상수³ · 임향숙³ · 김휘율⁴ · 최보영¹

본 연구는 in vivo 보다 더욱 정확하게 뇌 대사물질을 정량 분석하고자 고자장 NMR 장비 (500MHz; 11.74T)를 이용하여 동물의 뇌를 in vitro 환경에서 조사 및 분석하였다. 일반적으로 in vivo 실험은 생체 내부의 혈류나 조직의 비균질성으로 인한 자기공명분광법의 shimming에 악영향을 미치기 때문에 부정확한 결과를 산출할 수 있다. 그러나, in vitro 실험은 이에 비하여 균질한 샘플을 사용하고 보다 고자장에서 실험환경을 조성할 수 있기 때문에 더욱 정확한 대사물질의 정보를 얻을 수 있다. 본 연구에서는 개 (canine)의 소뇌 (cerebellum) 조직으로부터 대사물질을 추출하고 고자장 핵자기공명분광법으로 대사물질의 절대농도를 획득하고자 하였다. 생체 대사물질의 절대농도를 획득하기 위하여 대표적인 대사물질(i.e., NAA, Cr, Cho, Ins, Lac, GABA, Glu, Gln, Tau Ala)의 팬텀을 제작하여 그 스펙트럼을 확보하였고, 개의 소뇌 부위를 적출하여 methanol-chloroform water extraction (M/C water extraction) 방법으로 대사물질만을 추출한 후 자기공명분광법을 수행하였다. 필터링 (filtering)의 효과를 평가하기 위하여 샘플 제작 시 추출물을 필터링한 그룹과 필터링하지 않은 그룹으로 분류하여 실험을 수행하였다. 팬텀 물질과 추출물은 90% D2O 수용액으로 만든 후 5 mm NMR 튜브에 담아 실험하였다. 실험 결과 조직 추출물을 필터링하는 것이 신호대잡음비 (signal to noise ratio: SNR, S/N)를 향상시키는 데 기여하는 것을 확인하였다. 또한 개의 소뇌 대사물질의 절대농도는 사람보다는 쥐 (rat)의 뇌 대사물질 절대농도와 더 비슷한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과를 토대로 고자장 핵자기공명분광법을 이용한 in vitro 실험은 뇌조직 내 대사물질의 절대농도를 측정하고 기본적인 지표를 확보하는데 매우 정확하고 정량적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

서 론

고자장 핵자기공명분광법 (nuclear magnetic resonance spectroscopy: NMRS/NMR)의 생체 외 (in vitro) 분석은 뇌, 1-3) 유방, 4) 비뇨기, 5) 관절, 6) 임파관, 7) 등 다양한 생체 조직에의 분석에 널리 쓰이고 있는데, 이것은 생체 내 (in

vivo) 분석에 비하여 균질한 샘플을 사용하기 때문에 보다 정확한 대사정보를 획득할 수 있기 때문이다. 이러한 핵자기공명분광법에 의하여 확보된 정확한 대사정보는 병리학이나 생리학 연구에 중요한 자료가 된다. 이를 위하여 생체로부터 채취된 조직 (biopsy materials)으로부터 핵자기공명분광법을 적용하는 방법에는 몇 가지가 있는데, 고체 핵자기공명분광법의 한 방법인 high resolution magic angle spinning (HR-MAS) 을 이용

대한자기공명과학회지 12:100-106(2008)

¹가톨릭대학교 의과대학 의공학교실

²한국기초과학연구소 서울안암분원

³가톨릭대학교 의과대학 분자생명학교실

⁴건국대학교 수의과대학 의공학교실

접 수 : 2008년 6월 2일, 채 택 : 2008년 10월 6일

통신저자 : 최보영, (137-701) 서울시 서초구 반포동 505, 가톨릭대학교 의과대학 의공학교실

Tel. (02) 590-2427 Fax. (02) 590-2425 E-mail: bychoe@catholic.ac.kr

하는 방법은 채취된 조직 샘플을 별다른 처리 과정 없이 냉동된 그대로 핵자기공명장비에 넣고 핵자기공명분광법을 수행하는 방법이다(8-10). 이 방법은 세포 조직을 크게 파괴하지 않기 때문에 핵자기공명분광법을 수행한 후, 다른 병리학적, 생리학적 연구를 할 수 있다는 장점이 있다. 반면에 채취된 조직 샘플을 파괴하여 대사물질과 같은 단백질 및 효소만을 따로 추출하여 D2O 수용액에 넣어 solution-NMR을 수행하는 방법이 있는데 추출을 위한 용매에 따라 perchloric acid (PCA) 추출 방법과 methanol-chloroform 방법 (M/C 추출법) 등으로 분류할 수 있다(11, 12). 비록 조직 샘플로부터 대사물질을 추출하는 방법은 핵자기공명분광법 실험을 수행 후 다른 실험에 샘플을 사용할 수는 없지만, 고체 핵자기공명분광법에 비하여 높은 해상도의 스펙트럼을 얻을 수 있기 때문에 보다 정확한 데이터 분석이 가능하고 샘플이 변질될 우려가 없기 때문에 추후 추가적인 핵자기공명분광 실험을 반복적으로 수행할 수 있다는 장점이 있다.

생체 내 자기공명분광법에서 발견된 대사물질의 신호를 토대로 절대농도를 산출하는 방법 (absolute quantification)에는 생체 내부의 물의 신호나 농도가 알려진 다른 대사물질의 신호를 사용하여 산출하는 내부지표 정량화 방법 (internal concentration reference quantification) 과 대상체와 지표용 팬텀을 한꺼번에 하나의 RF 코일 안에 넣어 팬텀물질의 신호의 크기와 대상체로부터의 신호를 연관하여 산출하는 외부지표 정량화 방법 (external concentration reference quantification), 그리고 대상체와 비슷한 크기와 모양을 흉내낸 팬텀을 제작하여 각각으로부터 신호를 얻어 절대농도를 산출하는 외부 팬텀지표 정량화 방법 (external simulated phantom concentration quantification) 등이 보고되어 있다 (13-16).

본 연구는 in vivo보다 더욱 정확하게 뇌 대사물질을 정량분

석하고자 개 (canine)의 소뇌 조직으로부터 대사물질을 추출하고 외부팬텀지표 정량화 방법을 생체 외 고자장 핵자기공명분광법에 적용하여 대사물질의 절대농도를 산출하고자 하였다. 또한 조직 추출물의 처리에 있어서 필터링 (filtering)이 핵자기공명분광 신호에 얼마만큼 영향을 미치는 지 분석하였다.

대상 및 방법

1. 팬텀 물질 제작

절대농도를 산출하기 위하여 정상인의 회질 부분의 대사물질 조성 농도를 모사하여 GE (General Electric Company - medical)에서 제공하고 있는 기존 single voxel spectroscopy (SVS)용 팬텀인 GE-HD Sphere-TM (General Electric, Milwaukee, WI USA)17)의 대사물질에 몇 가지 물질을 더 추가하였다. 결과적으로 총 10가지 생체 뇌 대사물질을 90% D2O 수용액에 혼합하여 제작하였고 그 구성은 다음과 같다: N-acetyl aspartate (NAA)-12.5 mM, total Creatine (Creatine+phosphocreatine, tCr)-10 mM, Lactate (Lac)-5 mM, Choline (Cho)-3 mM, Glutamine (Gln)-12.5 mM, Glutamic acid (Glu)-12.5 mM, γ -aminobutyric acid (GABA)-10 mM, myo-Inositol (mI)-7.5 mM, Alanine (Ala)-10 mM, Taurine (Tau)-6 mM.

2. 조직 추출 및 샘플 제작

조직의 준비는 정상 개 (beagle; 약 12개월)를 마취 후 소뇌 부분 10g가량을 적출하자마자 액체질소 (-197 °C)에 넣어 냉동보관 시켰다. 채취된 소뇌 조직의 1g만을 -20 °C 환경에서 잘게 갈아 추출이 용이하게 한 후, methanol-chloroform 을 2:1로 혼합한 용액에 담가 두었다. 이 용매 속에서 조직을 녹인

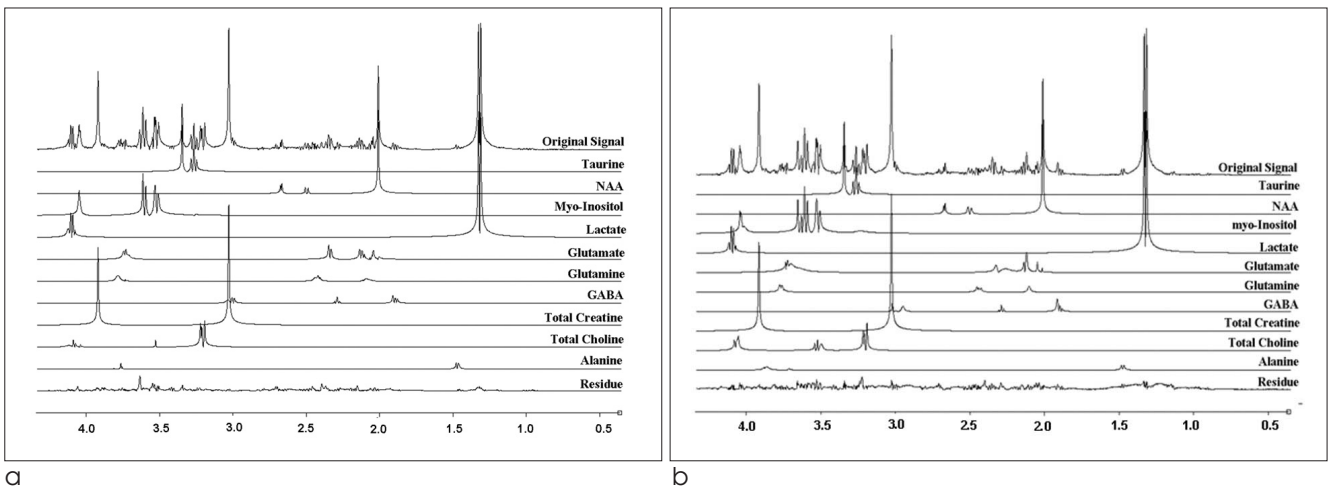


그림 1. Each metabolite peak was analyzed and subtracted from the original signals of Filtered (a) and not filtered solution (b).

우동철 외

후 원심분리용 튜브 안에 넣어 초음파 처리 (sonication)를 하고 약 15분 후 다시 chloroform-water 용매를 1:1로 혼합한 용액에 재차 희석시켰다. 이 샘플을 다시 13,000 rpm으로 약 20분간 원심분리를 시키면 2개의 층으로 분리가 된다. 두 층 사이에 존재하는 조직 내 세포 섬유질은 핵자기공명분광법에서 관심있는 대사물질이 아니기 때문에 이 부분만을 제외한 두 개의 층을 섞고 동결건조를 하여 조직추출물을 얻었다. 얻어진 조직 추출물은 순수한 물에 녹여 syringe filter (Pore size: 0.45~0.2 μ m)로 걸러내어 필터링을 하였고 이것을 다시 99.9% D₂O에 희석하여 90% D₂O 용액 샘플로 제작하였다. 필터링 효과에 대한 비교군으로 사용하기 위하여 필터링을 거치지 않은 용액 샘플을 역시 같은 방법으로 제작하였다.

3. 핵자기공명분광법 실험 및 데이터 분석

핵자기공명분광법은 11.74 T Varian 500 Spectrometer (한국기초과학지원연구원 서울센터) 장비를 이용하여 수행하였다. 작동 환경은 다음과 같다: Proton resonance frequency = 500.384MHz, spin echo pulse, relaxation/saturation delay time = 0.5/1.5 sec, acquisition time = 1.892 sec, data points = 30272, spectral width = 8000 Hz, number of scan (팬텀/ 조직추출물 샘플) = 128/256. 팬텀과 조직 추출물 샘플은 number of scan와 receive gain만 달린 채 나머지 파라미터들은 동일하게 사용하였다.

핵자기공명분광 스펙트럼의 분석은 java based magnetic resonance user interface (jMRUI, version 3.0, European communities project TMR/Networks ERB-FMRX-CT970160)을 사용하였고 advanced method for

accurate, robust, and efficient spectral fitting (AMARES)18), 2Hz Gaussian shape apodization으로 분석하였다. 팬텀 실험을 통해 얻은 신호로부터 각 대사물질들의 피크들에 대한 화학적 이동 (chemical shift) 정보를 얻고 이것을 이용하여 조직 추출물 샘플의 스펙트럼에서 대사물질 하나씩 공제하는 방법 (peak subtraction)으로 대사물질 피크 넓이 (area)를 계산하였다. 이러한 대사물질 피크의 넓이는 그것의 농도와 정비례하므로 이미 알고 있는 팬텀에서의 대사물질 피크의 넓이와 비교하여 조직 추출물 샘플의 절대농도를 구하였다. 여기에서 팬텀과 조직 추출물 샘플의 양은 거의 같으므로 RF 코일에 loading factor는 동일하다는 가정을 세울 수 있기 때문에 이것은 다음과 같이 조직 추출물 내의 농도를 구할 수 있다(19).

$$\frac{I_s}{R_s} : \frac{I_p}{R_p} = C_s : I_p$$

$$\therefore C_s = C_p \times \frac{I_s R_p}{I_p R_s} \quad (1)$$

I_s , I_p 는 샘플과 팬텀의 대사물질 피크의 넓이이고 C_s , C_p 는 샘플과 팬텀의 농도, R_s 와 R_p 는 Receiver gain이다.

결론

개의 소뇌 조직 처리 과정 중 필터링한 그룹과 필터링하지 않은 그룹 샘플 모두 핵자기공명분광 스펙트럼으로부터 10가지 대사물질의 신호를 모두 분리할 수 있었고, 분리한 후 대부분 잡음 (noise) 신호만이 남는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1). 대부분

표 1. Comparison of the Metabolite Concentration(mM) of Canine Cerebellum with Human's and Rat's Cerebellum

Metabolite	ppm	Human cerebellum in vivo §		Adult Rat Cerebellum	Phantom	Filtered Solution (gain = 50)	Not filtered solution (gain = 56)			
		Cerebellar vermis	Cerebellar hemispheres	in vitro 	Concentration (mM)	Peak Concentration	Peak Concentration	Peak Concentration	Peak intensity	
NAA	2.02(s)	7.6±1.0	7.5±0.8	3.63	12.5	148000	4.90	64710	4.70	64030
tCr *	3.02(s), 3.94(s)	8.8±1.7	8.9±2.1	9.2	10	125600	7.17	100400	6.79	98010
tCho †	3.20~3.22	2.3±0.4	2.2±0.6	1.62	3	114900	1.00	42877	1.29	57000
Lac	1.31(d)			-	5	64800	13.50	195100	13.15	196000
Ala	1.49 (d)			0.74	10	135000	0.82	12275	0.85	13200
mI ‡	3.54			3.14	7.5	36800	8.28	45300	7.75	43730
Tau	3.27(t)			0.6	6	69800	2.68	34800	3.00	40100
GABA	2.31~2.35(m)			1.63	10	79600	0.55	4870	0.74	6730
Gln	2.42~2.47(m)			2.71	12.5	98200	1.69	14805	2.35	21200
Glu	2.13(d)			6.1	12.5	53200	6.43	30525	4.92	24100

(s) singlet, (d) doublet, (t) triplet, (m) multiplet

* tCr: total creatine = creatine(Cr) + phosphocreatine(PCr).

† tCho: total choline = choline(Cho) + phosphocholine(PCho) + glycerophosphocholine(GPC).

‡ myo-Inositol의 다중 피크들중 3.54 ppm에서 나타나는 단일 피크만을 측정하였음.

§ 참고문헌[2]

|| 참고문헌 [3]

분 대사물질들은 생체 내 자기공명분광 스펙트럼에서 나타나는 것과는 달리 J-커플링 (J-coupling)에 의한 피크의 쪼개짐 (splitting) 현상을 잘 관찰 할 수 있었는데 특히, choline의 경우에는 3.20-3.22ppm 사이에 choline, phosphocholine, glycerophosphocholine이 모두 분리되어 3개의 피크로 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 분석 시에는 이 세 개의 피크를 모두 더한 total choline (tCho) 값으로 표현하였다. 마찬가지로 creatine (Cr, 3.02 ppm), phosphocreatine (PCr, 3.94 ppm)은 total creatine (tCr)로서 표현하였다.

표 1에서는 관찰된 각 대사물질들의 쪼개짐 현상에 따른 피크의 개수와 이미 보고된 바 있는 인체 소뇌와 쥐 (rat)의 소뇌에서의 대사물질의 농도를 본 연구를 통해 얻어진 개의 소뇌 대사물질 농도와 비교분석하였다. 뿐만 아니라, 필터링 효과를 알아보기 위하여 주요 대사물질-Lac, NAA, Cr, PCr-들의 신호의 크기와 신호대잡음비를 산출하였다 (표 2).

고 찰

조직의 대사물질을 추출하여 만든 샘플의 생체 외 (in vitro) 핵자기공명분광법은 생체 내 (in vivo) 자기공명분광법에 사용되는 장비보다 공명주파수가 높으며, [참고, 현재 임상용 생체 내 자기공명분광법의 경우 128MHz 이하임] 대상체의 균질성이 보장되기 때문에 보다 높은 해상도 (resolution)와 신호대잡음비를 가지기 때문에 더욱 정확하고 유의성 있는 결과를 기대할 수 있다. 본 연구 결과의 핵자기공명 스펙트럼은 500MHz 공명주파수 환경에서 획득한 것으로 일반 임상용 MRI/MRS 장비로 얻은 스펙트럼보다 훨씬 높은 해상도와 신호대잡음비를 가지는 것이 특징이다. 각 대사물질의 커플링 상수에 의하여 피크들이 쪼개짐 현상(20, 21)을 관찰되는 것은 이를 증명한다. 뿐만 아니라, 샘플의 용매로서 90% D2O를 사용하여 수분억제 펄스시퀀스를 사용하지 않았기 때문에 수분 피크 (약 4.7 ppm) 근처에 나타나는 대사물질 피크들이 왜곡되지 않기 때문에 그 정확성을 더욱 높아진다(22).

그림 1.에서 보는 바와 같이 10개의 대사물질을 성공적으로 공제하여 분석하였다. 물론 본 연구에서 수행한 10개 대사물질 이외에도 Aspartate (3.90, 2.69, 2.82 ppm), ATP (6.15, 8.26, 8.54 ppm), Glucose (3.2-3.8 ppm), Glycine (3.56 ppm) 등의 물질들도 뇌 조직에서 핵자기공명분광 신호에서 관찰되는 것으로 알려져 있다. 그러나, 정상 뇌에서는 이들 물질들은 다른 대사물질에 비하여 극소량만이 존재하기 때문에 이들

물질들만 추출하지 않은 상태에서 확인하기란 매우 어렵다(23-25).

M/C 추출법은 PCA 추출법보다 그 추출율이 더 높은 것으로 알려져 있는데 M/C 추출법을 통하여 조직 내의 대사물질을 추출할 경우 각 대사물질 별로는 약간의 차이가 있지만 대체로 92% 정도의 추출율 (extraction efficiency) 을 보인다고 보고된 바 있다(11). 따라서 본 연구에서는 M/C 추출법에 의한 추출율이 92%이라는 가정 하에 실험값을 보정하여 각 대사물질들의 절대농도를 계산하였다. 비록 많은 데이터를 확보하지 못하여 유의성 있는 통계치를 제시하지 못하였지만, 개의 소뇌 대사물질 절대농도는 일반적으로 사람의 소뇌보다는 오히려 쥐의 대사물질 농도와 더 비슷하리라 추정할 수 있다.

표 1과 2 에서서 필터링한 것과 그렇지 않은 것의 차이점을 확인할 수 있었다. 필터링을 하였을 경우가 필터링하지 않았을 경우보다 대사물질 피크의 넓이가 넓고 그에 따라 농도 역시 더 높은 경향을 볼 수 있었다. 필터링에 의하여 대사물질이 필터에 걸려져 농도가 떨어질 수 있는 위험에도 불구하고 이러한 경향을 보이는 것은 필터링에 의해 샘플을 균질하게 하는 것이 필터링에 의한 대사물질 손실에 의한 영향보다 더 큰 신호를 얻을 수 있기 때문이다. 또한 필터링한 샘플의 대사물질 피크의 높이는 작지만 잡음의 크기는 그보다 더 큰 비율로 작아지기 때문에 필터링하지 않았을 때보다 큰 신호대잡음비를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 샘플 내에서 용해되지 않고 남아있는 덩어리나 이물질들을 걸러냄으로써 샘플의 균질성을 확보하여 핵자기공명분광법을 위한 B0, B1 자기장을 균일하게 하는데 상당한 기여를 하기 때문으로 해석된다. 따라서, 대사물질을 추출한 생체 외 핵자기공명분광법에서 대사물질의 손실을 감수하고 필터링을 수행하는 것이 보다 좋은 결과를 획득할 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구의 결과에서 lactate 신호의 크기가 상대적으로 매우 큰 것을 확인할 수 있는데 이것은 생체 외 실험을 하기 위해서 뇌 조직을 적출하는 과정에서 기인하는 것으로 추정한다. lactate의 경우는 혈액 내 저산소증 (hypoxia) 혹은 혈액공급이 중지 (ischemia) 되어 해당작용 (glycolysis)이 원활하지 못한 경우 크게 증가하는 것으로 알려져 있는데, 생체 외 실험을 위한 조직 적출 과정에서 혈액 공급이 원활하지 못한 상태로 있는 경우가 짧은 시간이지만 존재하기 때문에 크게 증가하게 된다. 최근에는 이러한 효과를 억제하기 위하여 적출 전에 모든 대사활동을 멈추도록 미리 액체질소에 의한 냉동상태를 만든 후에 적출을 하는 방법을 사용하고 있지만, 이 효과를 완벽히 없

표 2. Amplitudes and SNRs of Metabolites in a Filtered and not Filtered Solution

		Lac	NAA	Cr	PCr
Filterd solution (Mean of noise level = 1.24E6, Noise st.D = 3.24E4)	Amplitude	2.17E+08	1.34E+08	2.00E+08	1.25E+08
	SNR	1.75E+02	1.08E+02	1.61E+02	1.01E+02
Not filterd solution (Mean of noise level = 1.50E6, Noise st.D = 3.23E4)	Amplitude	2.38E+08	1.49E+08	1.94E+08	1.29E+08
	SNR	1.59E+02	9.93E+01	1.29E+02	8.60E+01

우동철 외

어지는 못하고 있다. 따라서, lipids나 lactate에 대한 조사를 위해 생체 외 핵자기공명분광법을 수행하는 것은 부적절하고, 이외의 다른 대사물질을 조사하는 데에만 이 방법을 사용해야 할 것으로 사료된다.

특히, 대사물질들 중 glutamine, GABA, alanine의 경우 그 양이 매우 소량이기 때문에 NMR 신호에서 상당히 작게 나타나게 된다. 따라서 NAA, Cr, Cho와 같이 비교적 큰 신호를 갖는 대사물질들에 비하여 그 오차범위가 클 수 밖에 없다. 그림 1의 residue에서는 대부분 잡음신호만이 관찰되고 있고 따라서 각각의 고유의 화학적 이동(chemical shift)에서 각 대사물질의 피크는 확연하게 관찰되었으며, 정확한 대사물질의 농도를 구하기 위해서 쪼개짐 현상에 의해 나타나는 여러 개의 피크들 중 가장 큰 피크를 선택하여 대사물질 농도 정량화를 수행하였고 실험 개체 수를 늘림으로서 앞으로 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

최근 우울증, 치매, 정신분열증, 간질, 알츠하이머, 파킨슨질환 등 신경정신질환들은 대부분 어떤 환부나 해부학적인 변화를 가지지 않기 때문에 자기공명영상법(MRI)보다는 자기공명분광법을 이용한 진단을 시도하고 있다. 이러한 신경정신질환은 흥분(excitation) 혹은 억제(inhibition) 신경 대사물질들(i.e., Glu, Gln, GABA, Tau, Ala 등)의 이상으로 기인하는 것으로 알려져 있다(26-29). 하지만 불행하게도 임상용 MRI/MRS 장비를 이용한 생체 내 자기공명분광법에서는 이러한 신경 흥분 및 억제 대사물질들의 양이 매우 적기 때문에 잡음 속에 묻히는 등 분석하기가 매우 어렵다. 따라서 본 연구에서 수행한 바와 같이 생체 외 핵자기공명분광법을 사용한다면 이러한 작은 물질들을 분석할 수 있을 만큼 충분한 해상도를 가지기 때문에 이것을 이용한다면 보다 정확한 신경정신질환의 자기공명분광법에서의 변화를 관찰/분석할 수 있을 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 생체 내 해마부(hippocampus)나 편도체(amygdala)와 같이 구조가 복잡하여 shimming이 어려운 부분 역시 생체 외 핵자기공명분광법이 유용할 것으로 사료된다(30).

결론

본 연구를 통해 우리는 핵자기공명분광법을 이용한 생체 외 대사물질 분석은 생체 내 자기공명분광법보다 높은 해상도와 신호대잡음비를 제공하여 주는 것을 확인하였고, 이것은 생체 내 자기공명분광에서 분석하기 힘들었던 대사물질들까지 정확히 분석할 수 있는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구 결과를 토대로 하여 동물 모델이나 인체 조직에서 정확한 대사물질의 농도에 대한 데이터베이스를 공급할 수 있고, 뿐만 아니라 현재 가장 정확한 진단법으로 여겨지고 있는 병리학(pathology)이나 생리학(physiology)에서 응용되는 생체 검사법(biopsy)에서 채취되는 생체 조직을 가지고 생체 외 핵자기공명분광법을 적용시킨다면 정확한 진단을 위한 풍부한 생화학적 정보를 제공하고

또한 여러 신경정신질환에 대한 기전 연구나 약물 효과 등에 대한 연구가 가능할 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 Grant of the Seoul R&BD Program (10550), the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (02-PJ3-PG6-EV07-0002) (A081057), a grant (R01-2007-000-20782-0) from the Purpose Basic Research Grant of the KOSEF and the Seoul Fellowship from the Seoul metropolitan government 의 도움으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Burri R, Bigler P, Straehl P, Posse S, Colombo JP, Herschkowitz N. Brain development: 1H Magnetic resonance spectroscopy of rat brain extracts compared with chromatographic methods. *Neurochem Res* 1990; 15(10):1009-1016.
2. Jacobs MA, Horska A, van Zijl PC, Barker PB. Quantitative proton MR spectroscopic imaging of normal human cerebellum and brain stem. *Magn Reson Med* 2001; 46:699-705.
3. Florian C-L, Williams SR, Bhakoo KK, Noble MD. Regional and developmental variations in metabolite concentration in the rat brain and eye: A study using 1H NMR spectroscopy and high performance liquid chromatography. *Neurochem Res* 1996; 21(9):1065-1074.
4. Whitehead TL, Kieber-Emmons T. Applying in vitro NMR spectroscopy and 1H NMR metabonomics to breast cancer characterization and detection. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2005; 47: 165-174.
5. Swanson MG, Andrew SZ, Tabatabai ZL, Simko J, Jarso S, Keshari KR, et al. Quantitative analysis of prostate metabolites using 1H HR-MAS spectroscopy. *Magn Reson Med* 2006; 55(6): 1257-1264.
6. Damyanovich AZ, Staples JR, Marshall KW. 1H NMR investigation of changes in the metabolic profile of synovial fluid in bilateral canine osteoarthritis with unilateral joint denervation. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:165-172.
7. Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A, Wright SC Jr., Ackerman JL, Brady TJ, et al. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med* 1996; 36(5):653-658.
8. Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, et al. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:6408-6413
9. Cheng LL, Chang I-W, Louis DN, Gonzalez RG. Correlation of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy with histopathology of intact human brain tumor specimens. *Cancer Res* 1998; 58:1825-1832.
10. Straus SK, Brems T, Ernst RR. Experiments and strategies for the assignment of fully 13C/15N-labelled polypeptides by solid-state NMR. *J Biomol NMR* 1998; 12:39-50.

11. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 2002;15:37-44.
12. Yao FS, Caserta MT, Wyrwicz AM. In vitro ¹H and ³¹P NMR spectroscopic evidence of multiple aberrant biochemical pathways in murine trisomy 16 brain development. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:833-841.
13. Kreis R, Ernst T, Ross BD. Absolute quantification of water and metabolites in the human brain: I. Compartments and water. *J Magn Reson B* 1993;102:1-8.
14. Kreis R, Ernst T, Ross BD. Absolute quantification of water and metabolites in the human brain: II. Metabolite concentrations. *J Magn Reson B* 1993;102:1-8.
15. Danielsen ER, Michaelis, Ross BD. Three methods of calibration in quantitative proton MR spectroscopy. *J Magn Reson B* 1995;106:287-291.
16. Hajek M. Quantitative NMR spectroscopy. Comments on methodology of in vivo MR spectroscopy in medicine. *Quart Magn Reson Biol Med* 1995;2:165-193.
17. Schirmer T, Auer DP. On the reliability of quantitative clinical magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *NMR Biomed* 2000;13:28-36.
18. Vanhamme L, van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* 1997;129:35-43.
19. Bolan PJ, Meisamy S, Baker EH, Lin J, Emory T, Nelson M, et al. In vivo Quantification of choline compounds in the breast with ¹H MR spectroscopy. *Magn Reson Med* 2003;50:1134-1143.
20. Ramsey NF, Purcell EM. Interactions between nuclear spins in molecules. *Phy Rev* 1952;85:143-144.
21. Choe BY, Woo DC, Kim SY, Choi CB, Lee SI, Kim EH, et al. Evaluations of spectral analysis of in vitro 2D-COSY and 2D-NOESY on human brain metabolites. *J Korean Soc Magn Reson Med* 2008;12:8-19.
22. Leibfritz D, Dreher W. Magnetization transfer MRS. *NMR Biomed* 2001;14:65-76.
23. Esslinger CS, Agarwal S, Gerdes J, Wilson PA, Davis ES, Awes AN, et al. The substituted aspartate analogue l- β -threo-benzyl-aspartate preferentially inhibits the neuronal excitatory amino acid transporter EAAT3 *Neuropharmacology* 2005;49(6):850-861.
24. Weis BC, Margolis D, Burgess SC, Merritt ME, Wise H, Sherry AD, et al. Glucose production pathways by ²H and ¹³C NMR in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Magn Reson Med* 2004;51(4):649-654.
25. Garg M, Gupta RK, Husaln M, Chawla S, Chawla J, Kumar R, et al. Brain Abscesses: Etiologic categorization with in vivo proton MR spectroscopy. *Radiology* 2004;230:519-527.
26. Kim HD, Chang KH, Han MH, Kim HJ, Lee SG, Lee MC. The significance and limitation of MR volumetry: Comparison between normal adults and the patients with epilepsy and hippocampal sclerosis. *J Korean Soc Magn Reson Med* 2002;6:47-54.
27. Kwon BJ, Chang KH, Chung CK, Han MH, Choi YL, Chi JG. MR imaging findings of cortical dysplasia of the brain: Correlation with pathologic grades and subtypes. *J Korean Soc Magn Reson Med* 2003;7:47-55.
28. Renshaw PF, Lafer B, Babb SM, Fava M, Stoll AL, Christensen JD, et al. Basal ganglia choline levels in depression and response to fluoxetine treatment: An in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry* 1997;41(8):837-843.
29. Clarke CD, Lowry M, Horsman A. Unchanged basal ganglia N-acetylaspartate and glutamate in idiopathic Parkinson's disease measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Mov Disord* 2004;12(3):297-301.
30. Shirayama Y, Takahashi S, Minabe Y, Ogino Y. In vitro ¹H-NMR spectroscopy shows an increase in N-acetylaspartylglutamate and glutamine content in the hippocampus of amygdaloid-kindled rats. *J Neurochem* 2005;92(6):1317-1326.

Measurement and Assessment of Absolute Quantification from in Vitro Canine Brain Metabolites Using 500 MHz Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Preliminary Results

Dong-Cheol Woo¹, Eunjung Bang², Chi-Bong Choi¹, Sung-Ho Lee¹, Sang-Soo Kim³,
Hyang-Shuk Rhim³, Hwi-Yool Kim⁴, Bo-Young Choe¹

¹*Department of Biomedical Engineering, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

²*Metabolome Analysis Team, Korea Basic Science Institute*

³*Department of Molecular Biology, College of Medicine, The Catholic University of Korea*

⁴*Department of Veterinary Surgery, College of Veterinary Medicine, Konkuk University*

The purpose of this study was to confirm the exactitude of in vitro nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS) and to complement the defect of in vivo NMRS. It has been difficult to understand the metabolism of a cerebellum using in vivo NMRS owing to the generated inhomogeneity of magnetic fields (B₀ and B₁ field) by the complexity of the cerebellum structure. Thus, this study tried to more exactly analyze the metabolism of a canine cerebellum using the cell extraction and high resolution NMRS. In order to conduct the absolute metabolic quantification in a canine cerebellum, the spectrum of our phantom included in various brain metabolites (i.e., NAA, Cr, Cho, Ins, Lac, GABA, Glu, Gln, Tau and Ala) was obtained. The canine cerebellum tissue was extracted using the methanol-chloroform water extraction (M/C extraction) and one group was filtered and the other group was not under extract processing. Finally, NMRS of a phantom solution and two extract solution (90% D₂O) was progressed using a 500MHz (11.4 T) NMR machine. Filtering a solution of the tissue extract increased the signal to noise ratio (SNR). The metabolic concentrations of a canine cerebellum were more close to rat's metabolic concentration than human's metabolic concentration. The present study demonstrates the absolute quantification technique in vitro high resolution NMRS with tissue extraction as the method to accurately measure metabolite concentration.

Index words : Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMRS)
Tissue extraction
Filtering effect

Corresponding author : Bo-Young Choe, Ph.D., Department of Biomedical Engineering, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, #505 Ban-po-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea.
Tel. 82-2-590-2427 Fax. 82-2-590-2425 E-mail: bychoe@catholic.ac.kr