

РОСТ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ У ДЕТЕЙ С ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ПО ДАННЫМ ПРОТОННОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *in vivo*

© 2017 г. П.Е. Меньщиков* **, Н.А. Семенова* ** ***, Т.А. Ахадов**, О.В. Божко**, С.Д. Варфоломеев***

*Институт химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии, 119180, Москва, ул. Большая Полянка, 22

***Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: peeterem@gmail.com

Поступила в редакцию 06.03.17 г.

Впервые *in vivo* определены церебральные концентрации основных тормозного (γ -аминомасляная кислота) и возбуждающего (глутамат) нейромедиаторов при патологии мозга без структурных изменений по данным магнитно-резонансной и компьютерной томографии (легкая черепно-мозговая травма). Использовано J-модулированное редактирование спектров ^1H -MPC-спектров. Показано, что под влиянием легкой черепно-мозговой травмы в лобных долях мозга достоверно (на 36%) увеличена концентрация γ -аминомасляной кислоты, что вызывает смещение баланса основных тормозного и возбуждающего медиаторов. Установлено, что при измерении концентрации γ -аминомасляной кислоты использование импульсной последовательности MEGA-PRESS+ приводит к маскированию эффекта травмы, поскольку регистрируемый сигнал состоит из сигнала протонов γ -метиленовой группы γ -аминомасляной кислоты и сигнала протонов аминокислот подвижных цепей протеинов. Поэтому импульсная последовательность должна быть модифицирована с помощью симметричного подавления сигнала аминокислот подвижных цепей протеинов.

Ключевые слова: легкая черепно-мозговая травма, MEGA-PRESS, GABA, ^1H -MPC.

Механизмы функциональных нарушений центральной нервной системы, вызванных черепно-мозговой травмой (ЧМТ), нуждаются в дальнейшем изучении. В основе возникновения известных посттравматических симптомов (когнитивный дефицит, моторная дисфункция, эпилепсия) может лежать нарушение процессов возбуждения–торможения. Решающим фактором нормального функционирования центральной нервной системы является баланс основных нейромедиаторов – возбуждающего (глутамата) и тормозного (γ -аминомасляной кислоты, GABA).

Глутаматная эксайтотоксичность, обусловленная выбросом глутамата, вызывает гибель нейронов и потерю функциональной активности выживших клеток, дальнейшая гибель которых стимулируется посттравматическим повреждением GABA-эргических нейронов [1]. Отсюда следует, что локальные концентрации GABA и глутамата в мозге являются важнейшими параметрами-предикторами посттравматических функциональных расстройств центральной нервной системы.

В отличие от тяжелой травмы, которая характеризуется структурными нарушениями, выявляющимися методами магнитно-резонансной и компьютерной томографии, легкая травма не приводит к изменениям анатомии мозга, но в ряде случаев вызывает ухудшение когнитивных функций [2]. Причиной функциональных повреждений могут быть посттравматические нарушения нейрохимических процессов, протекающих в клетках мозга. Анализ около 100000

Сокращения: ЧМТ – черепно-мозговая травма, GABA – γ -аминомасляная кислота, ^1H -MPC – протонная магнитно-резонансная спектроскопия, Glx – глутамат и глутамин, ИП – импульсная последовательность, ЧСИ – частотно селективный импульс, АП – аминокислоты подвижных цепей белков, GM – серое вещество головного мозга, WM – белое вещество головного мозга, CSF – спинномозговая жидкость, VOI – объем интереса (volume of interest), $\text{H}_2\text{O}_{\text{unsup}}$ – сигнал неподавленной воды.

публикаций показал, что легкая ЧМТ сопровождается изменением церебральных концентраций целого ряда химических веществ, причем концентрация возбуждающего нейромедиатора глутамата является одним из наиболее часто изменяющихся показателей [3]. Так, методом микродиализа показано, что сотрясение мозга приводит к росту внеклеточной концентрации глутамата у крыс [4]. До настоящего времени не установлено, как влияет легкая ЧМТ на концентрацию основного тормозного медиатора GABA. Однако в модельных экспериментах на крысах обнаружено увеличение концентрации глутаматдекарбоксилазы, фермента синтеза GABA, через час после травмы, что свидетельствует об активации синтеза GABA; с предполагаемой избыточной концентрацией GABA связывают ухудшение рабочей памяти, обнаруженное у травмированных животных [5]. Показано также, что ЧМТ изменяет экспрессию субъединиц рецепторов GABA в гиппокампе, это приводит к дисбалансу процессов торможения и возбуждения и, как следствие, ухудшению когнитивных функций [6,7]. Наряду с дисбалансом торможения–возбуждения легкая ЧМТ у крыс вызывает уменьшение уровня ГАВАэргических интернейронов в базально-латеральном отделе миндалик. По мнению авторов, эти факторы являются причиной повышенной возбудимости после травмы [8].

Таким образом, из приведенных выше данных следует, что оценка локальных концентраций GABA в мозге человека необходима для выявления причин дисбаланса процессов торможения и возбуждения и прогноза возможных расстройств функций центральной нервной системы вследствие легкой ЧМТ.

Локализованная протонная магнитно-резонансная спектроскопия (^1H -МРС) является уникальным методом оценки внутриклеточных концентраций протонсодержащих химических соединений в тканях и органах человека *in vivo*. Исследование влияния ЧМТ на нейрохимические показатели в гиппокампе и коре мозга крыс методом ^1H -МРС, проведенное на высокопольном МР-томографе (напряженность постоянного магнитного поля $B_0 = 9,4$ Тл, резонансная частота ядер $^1\text{H} = 400$ мГц), позволило проанализировать кортикальный уровень более двадцати метаболитов и обнаружить изменение содержания целого ряда химических соединений, в частности, снижение уровней GABA и глутамата, в динамике посттравматического периода (1–14 сут) [9]. Данные, полученные в эксперименте, позволили предположить [10], что интенсивность сигнала GABA может слу-

жить неинвазивным индикатором ранних нарушений церебрального метаболизма при ЧМТ.

В клинических исследованиях используются магнитные поля с существенно более низким значением B_0 (≤ 3 Тл) и, следовательно, более низким спектральным разрешением. Это приводит к перекрыванию сигналов в спектре, которое существенно ограничивает возможности ^1H -МРС. Стандартные локализационные методики (PRESS, STEAM) позволяют получать спектры, в которых в норме детектируется не более пяти соединений: хорошо разрешаются сигналы N-ацетильной группы N-ацетиласпартата ($\delta = 2,0$ ppm), протонов группы $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, N-метильных протонов холинсодержащих соединений (tCho, $\delta = 3,18$ ppm), фосфокреатина + креатина (tCr, $\delta = 3,01$ ppm), $-\text{CH}_2$ -групп глутамата и глутамина (Glx, $\delta = 2,2$ и $3,74$ ppm), сигнал 1,3,4,6 – протонов шестичленного кольца инозитола (mI, $\delta = 3,56$ ppm) [5]. В условиях гипоксии и ишемии в спектрах появляется дублет метильной группы лактата (Lac, $\delta = 1,34$ ppm). Сигнал метильных и метиленовых протонов (Lip, $\delta = 0,9$ и $1,3$ ppm), возникающий при некоторых патологических состояниях, относят к жирнокислотным фрагментам липидов [11]. Сигналы трех метиленовых групп GABA ($\alpha\text{-CH}_2$, $\delta_{\text{H}} = 2,28$ ppm; $\gamma\text{-CH}_2$, $\delta_{\text{H}} = 3,01$ ppm; $\beta\text{-CH}_2$, $\delta_{\text{H}} = 1,89$ ppm) оказываются перекрытыми более интенсивными сигналами других метаболитов. Для определения интенсивностей перекрывающихся сигналов можно использовать разностную методику J-модулированного редактирования спектров, которая реализуется в виде импульсной последовательности (ИП) MEGA-PRESS GABA+ [12]. В этой ИП к стандартной последовательности PRESS добавлено два 180° -частотно-селективных импульса (ЧСИ). Работа данной последовательности основана на спин-спиновом (J) взаимодействии, а именно на J-модуляции мультиплетов под воздействием ЧСИ.

MEGA-PRESS не является стандартной методикой, поэтому данные о содержании GABA и балансе GABA–Glx в локусах мозга человека в норме и при различных патологических состояниях, полученные в прижизненных исследованиях, очень немногочисленны. С помощью этого метода исследовано содержание GABA и Glx в премоторной коре футболистов в отдаленном периоде после многократного сотрясения мозга; показано, что уровни GABA и Glx статистически не отличаются от нормы, однако корреляционный анализ выявил слабый сдвиг баланса GABA/Glx вследствие травмы [13].

Наряду с MEGA-PRESS существуют методики количественных обработок одновоксельных спектров, основанные на аппроксимации сигналов априорными данными, получаемыми на основе спектров фантомов или моделирования сигналов [14]. Исследование повторяющейся легкой ЧМТ методом одновоксельной $^1\text{H-MPC}$ на медицинском томографе с $B_0 = 3 \text{ Тл}$ и последующим разделением перекрывающихся сигналов по априорным данным не выявило посттравматических изменений концентрации GABA, но обнаружило у пациентов связь между уровнем GABA и числом эпизодов травмы [15].

Прямое наблюдение перекрывающихся сигналов представляется наиболее точным и информативным, особенно для *in vivo* определения малых изменений концентраций, например, при динамических исследованиях, или при оценке метаболических сдвигов, вызванных патологией. Однако прямая оценка баланса $[\text{GABA}]/[\text{Glx}]$ и сдвигов в этом параметре до последнего времени осложнялась отсутствием надежного способа обработки спектров. Мы детально разработали метод постпроцессинга редактированных спектров, полученных с помощью ИП MEGA-PRESS [16], и впервые выявили локальное снижение $[\text{GABA}]/[\text{Glx}]$ в мозге пациентов с высоким риском развития шизофрении [17].

Поскольку сведения о нарушениях баланса основных нейромедиаторов $[\text{GABA}]$ и $[\text{Glx}]$ при легкой ЧМТ ограничиваются единичными данными, целью настоящей работы является исследование этого показателя в остром периоде после легкой ЧМТ.

Трудность поставленной задачи состоит в том, что сигнал при $\delta = 3,0 \text{ ppm}$ представляет собой не только суперпозицию резонансов N-метильных групп молекул креатина с фосфокреатином и δ -метиленовых протонов GABA, но и протонов, принадлежащих аминокислотам подвижных цепей белков (АП), присутствующих в цитозоле клеток мозга [18]. Сигнал АП может маскировать слабые изменения концентрации GABA, вызванные легкой ЧМТ. Элиминировать резонанс АП и, следовательно, получить «чистый» сигнал GABA (GABA-) позволяет модификация ИП MEGA-PRESS GABA- [19]. При данной методике J-модуляция сигнала АП происходит в обеих сериях набора спектров и вычитается в результирующем спектре. ЧСИ OFF-серии служат для симметричной перефокусировки J-эволюции сигнала АП при $\delta = 3,0 \text{ ppm}$ [19].

Количественная обработка спектров GABA- осложняется тем, что в них мультиплет при

$\delta = 3,0 \text{ ppm}$ имеет малую интенсивность, следовательно, большую чувствительность к артефактам движения. Поэтому, предполагая, что вклад АП в сигнал с $\delta = 3,0 \text{ ppm}$ постоянен, большинство исследователей для оценки вариаций концентрации GABA в мозге *in vivo* используют сигнал GABA+ АП (GABA+). Однако малые изменения концентрации GABA могут оказаться незамеченными на фоне сигнала АП. Учитывая такую возможность, мы провели оценку влияния легкой ЧМТ на баланс основного тормозного и основного возбуждающего нейромедиаторов и концентрацию GABA на основе анализа как спектров GABA+, так и GABA-.

МЕТОДЫ

Исследуемые пациенты. В исследовании приняли участие 19 детей. В группу из одиннадцати пациентов (средний возраст – 14,3 ± 2,3 года, 6 мальчиков, 5 девочек) входили дети, госпитализированные с диагнозом «легкая черепно-мозговая травма». На момент исследования легкая ЧМТ характеризовалась острой фазой (время с момента травмы в промежутке от 0 до 72 ч) и среднее время, прошедшее с момента травмы, составляло 40 ± 17 ч. По шкале Кома-Глазго [20] состояние всех пациентов оценивалось в 15 баллов. Контрольная группа включала в себя восемь детей (средний возраст 15,0 ± 1,9 года, 4 мальчика, 4 девочки). Статистически достоверные межгрупповые различия возраста отсутствовали. Критерием исключения из обеих групп служило наличие различных неврологических, психических отклонений от нормы и ранее перенесенных ЧМТ разной степени в анамнезе, а также наличие каких-либо врожденных или травматических структурных изменений на МР-диагностических изображениях. Все испытуемые, а также их родители подписали информационное согласие об участии в исследовании.

Регистрация данных $^1\text{H-MPC}$ и магнитно-резонансной томографии. Сбор данных осуществляли с использованием МР-сканера AchievaTX (Philips Healthcare, Best, Голландия) со значением напряженности постоянного поля 3 Тл. В качестве приемной катушки использовалась головная 8-канальная приемная катушка SENSE-Head-8. Для получения спектров с удовлетворительным соотношением сигнал/шум снижали уровень артефактов движения путем фиксации позиции головы с помощью прокладок между наушниками и катушкой.

Помимо получения диагностических изображений протокол исследования включал в

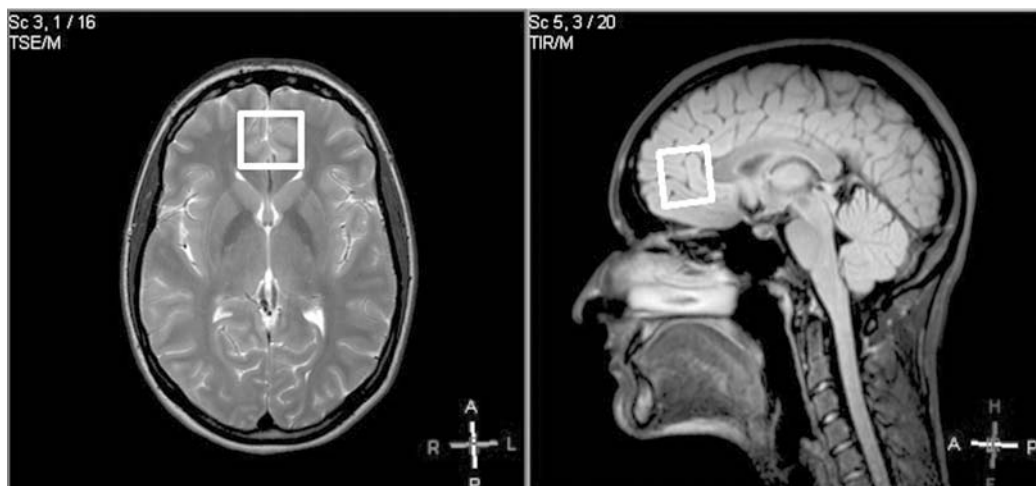


Рис. 1. Расположение спектроскопического VOI в лобной доле ГМ.

себя 3DT1-взвешенное изображение (TFE (TurboFieldEcho), TR/TE (TR – время повторения, TE – время эхо) – 8,1 мс/3,7 мс, угол поворота вектора намагниченности 8° , размер вокселя: 1,00/1,00/2,90 мм, 158 срезов), которое необходимо для сегментации мозга на фракции серого вещества (GM), белого вещества (WM) и спинно-мозговую жидкость (CSF).

Измерение GABA проводили в лобной доле в области передней поясной извилины, объем интереса (VOI) составлял $25 \times 28 \times 28$ мм (рис. 1). Использовали два способа редактирования – MEGA-PRESS GABA+ и MEGA-PRESS GABA-. Исследовательский протокол включал в себя получение спектра MEGA-PRESS GABA+ (MEGA-PRESS+) с параметрами регистрации: $TE = 68$ мс, $TR = 1600$ мс, два ЧСИ длительностью 14 мс при $\delta = 1,9$ ppm и $\delta = 7,56$ ppm, $NSA = 8$, число повторений – 52; а затем, чтобы получить в качестве концентрационного стандарта сигнал неподавленной воды (H_2O_{unsup}) – накопление неотредактированного спектра PRESS в том же VOI, при неизменных настройках передающей РЧ системы и системы шиммирования, с теми же параметрами регистрации ($TE = 68$ мс, $TR = 1600$ мс, $NSA = 64$). Схема работы ИП MEGA-PRESS GABA+ представлена на рис 2а. Разностная методика MEGA-PRESS характеризуется накоплением двух серий спектров – ON и OFF [21], в зависимости от частоты ЧСИ. В ON-серии ЧСИ с $\delta = 1,90$ ppm действует на спины GABA с $\delta = 1,89$ ppm, АП с $\delta = 1,70$ ppm, связанные J-взаимодействием с наблюдаемым сигналом GABA, и АП с $\delta = 3,02$ ppm, что приводит к перефокусировке их J-эволюции (J-модуляции) (рис. 2а). В 1H -МР-спектрах J-эво-

люция проявляется как зависимость фаз компонент мультиплетов от времени эхо (TE). В OFF-серии ЧСИ с $\delta = 7,56$ ppm не затрагивает спиновую систему молекул GABA и АП, как следствие, J-эволюция сигналов в области с $\delta = 3,01$ ppm протекает без изменений (рис. 2а). Ни в одной серии сигнал tCr с $\delta = 3,02$ ppm не подвергается воздействию ЧСИ и, следовательно, вычитание OFF-серии из ON-серии дает нулевой сигнал, освобождая при этом суммарный сигнал GABA+АП. При $TE = 68$ мс внешние пики триплета имеют сдвиг фазы в 180° за счет J-эволюции, что дает в DIFF-серии максимальный сигнал [12].

Исследовательский протокол включал в себя также накопление спектра MEGA-PRESS GABA- с помощью ИП MEGA-PRESS-, которое осуществляется симметричным подавлением сигнала АП. Параметры регистрации отредактированного спектра PRESS GABA-: $TE = 80$ мс, $TR = 1600$ мс, два ЧСИ по 20 мс при $\delta = 1,9$ ppm и $\delta = 1,5$ ppm, $NSA = 8$, число повторений = 52. Так же, как и для MEGA-PRESS GABA+, сигнал H_2O_{unsup} получали, накапливая спектр PRESS ($TE = 80$ мс, $TR = 1600$ мс $NSA = 64$). Симметричное подавление сигнала АП достигается за счет смещения частоты ЧСИ в OFF-серии в область с $\delta = 1,5$ ppm, симметричную ЧСИ в ON-серии относительно центра сигнала АП (рис 2б). При этом и в ON-, и в OFF-сериях сигнал АП с $\delta = 3,02$ ppm оказывается одинаково J-модулированным и при вычитании дает нулевой сигнал. Тем самым сигнал GABA с $\delta = 3,01$ ppm освобождается от вклада АП и tCr.

Количественная обработка спектров и статистический анализ. Спектры GABA+ и GABA-

MEGA-PRESS (рис. 3) количественно обрабатывали в программе jMRUiver 5.2 [22] с помощью алгоритма AMARES [23]. Алгоритм обработки спектров GABA+ и GABA- подробно описан в одной из наших предыдущих работ [16]. Конечным результатом являются величины отношений интегральных интенсивностей сигналов GABA+/NAA, GABA-/NAA, GLX/NAA, GABA+/GLX и GABA-/GLX. Ин-

тегральные интенсивности сигналов NAA, tCho, tCr и (H_2O_{unsup}) в спектрах PRESS рассчитывали в программе Spectroview. Относительную концентрацию каждого метаболита (нормированную на H_2O_{unsup}) с поправками на эффекты парциальных объемов GM, WM и CSF в VOI, а также на времена релаксации (T_1 и T_2) воды и метаболита рассчитывали по формуле (2):

$$[M] = \frac{S_{\text{met}}(f_{\text{GM}}R_{H_2O_GM} + f_{\text{WM}}R_{H_2O_WM} + f_{\text{CSF}}R_{H_2O_CSF}) \frac{\#H_{H_2O}}{\#H_{\text{met}}} [H_2O]}{S_{H_2O}(1 - f_{\text{CSF}})R_M} \quad (1)$$

где S_{met} и S_{H_2O} – интегральные интенсивности сигналов метаболита и H_2O_{unsup} , $\#H_{\text{met}}$ и $\#H_{H_2O}$ – число протонов, которые дают сигнал метаболита и сигнал воды соответственно; $[H_2O]$ – концентрация чистой воды в паренхиме мозга, равная 55,51 моль/кг; f_{GM} , f_{WM} , f_{CSF} – фракции серого, белого вещества и спинномозговой жидкости, рассчитываемые согласно формулам:

$$\begin{aligned} f_{\text{GM}} &= \frac{v_{\text{GM}} \cdot 0,78}{v_{\text{GM}} \cdot 0,78 + v_{\text{WM}} \cdot 0,65 + v_{\text{CSF}} \cdot 0,97}, \\ f_{\text{WM}} &= \frac{v_{\text{WM}} \cdot 0,65}{v_{\text{GM}} \cdot 0,78 + v_{\text{WM}} \cdot 0,65 + v_{\text{CSF}} \cdot 0,97}, \\ f_{\text{CSF}} &= \frac{v_{\text{CSF}} \cdot 0,97}{v_{\text{GM}} \cdot 0,78 + v_{\text{WM}} \cdot 0,65 + v_{\text{CSF}} \cdot 0,97}, \end{aligned} \quad (2)$$

где 0,78, 0,65, 0,97 – относительные плотности МР-видимого сигнала воды в сером веществе, белом веществе и спинномозговой жидкости [24], v_{GM} , v_{WM} и v_{CSF} – относительные содержания серого вещества, белого вещества и спинномозговой жидкости в спектроскопическом VOI. $R_{H_2O_GM}$, $R_{H_2O_WM}$, $R_{H_2O_CSF}$, R_M – поправочные коэффициенты, учитывающие времена релаксации T_1 и T_2 для воды, входящей в состав серого вещества, белого вещества, спинномозговой жидкости и искомого метаболита, определяемые формулой:

$$R_i = e^{-\frac{TE}{T_2}} (1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}).$$

Используемые значения T_1 и T_2 для метаболитов и воды приведены в табл. 1.

Для расчета [GABA-] в формулу (1) вводили поправочный коэффициент $\frac{1}{\sin^2(\pi JTE)}$, учиты-

вающий зависимость амплитуды сигнала от времени TE [19].

Сегментация 3DT1-взвешенных изображений осуществлялась с помощью алгоритма FAST [27] в пакете программного обеспечения FSL v5.0 [28]. Процесс сегментации предваряли разделением тканей головного мозга от немозговых структур (костная, кожная, жировая, мышечные фракции, а также сигнал от глазных яблок и т.д.), которое осуществляется с помощью техники BET [29], также встроенной в программное обеспечение FSLv5.0. Результат сегментации показан на рис. 4. Расчет относительных содержаний v_{GM} , v_{WM} и v_{CSF} в спектроскопическом VOI осуществлялся в FSL с помощью встроенной функции $\$ \text{fslstats}$ с наложением маски VOI. Маска представляла собой бинарное изображение, в котором пиксели, принадлежащие VOI, имеют интенсивность, равную единице, а пиксели, не принадлежащие VOI, имеют интенсивность, равную нулю. Маски VOI генерировались в программе, написанной в нашей лаборатории в среде MATLAB R2015

Статистически данные обрабатывали в программе Statistica 10 с использованием U -критерия Манна-Уитни для сравнения независимых выборок. Значимость критерия определяли на уровне $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены типичные спектры GABA- и GABA+ и соответствующие аппроксимации, полученные в jMRUiver 5.2. Сигнал GABA-, как и ожидалось, менее интенсивен чем сигнал GABA+. Согласно рассчитанным средним значениям концентраций (табл. 2), для группы нормы отношение сигналов [GABA-]/[GABA+] $\cong (0,39 \pm 0,05)$. Для группы пациентов соответствующее отношение составило [GABA-]/[GABA+] = $0,52 \pm 0,07$.

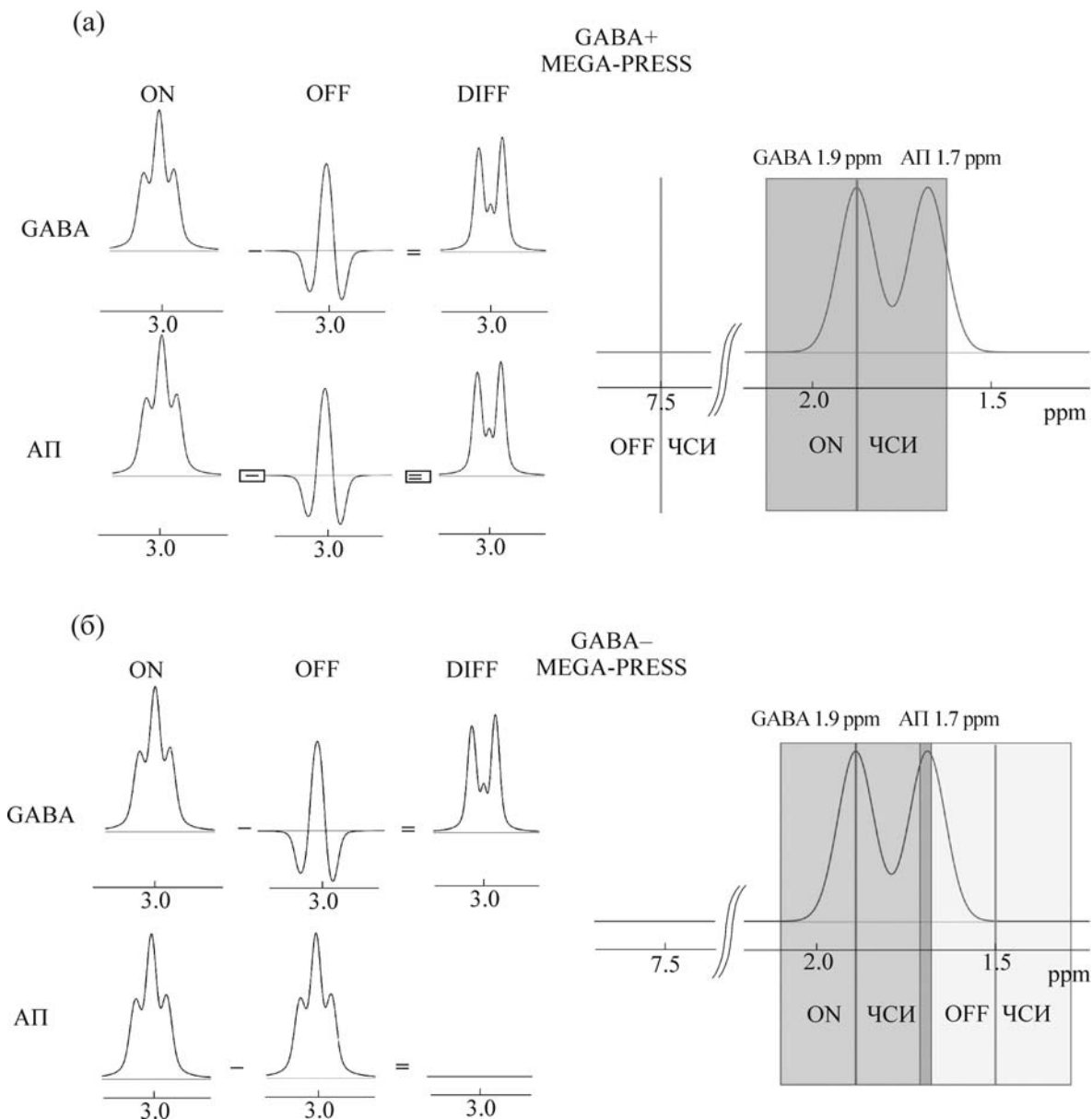


Рис. 2. (а) – Схема J-эволюции и схема применения ЧСИ для сигналов GABA и АП в случае MEGA-PRESS+; (б) – схема J-эволюции и схема применения ЧСИ для сигналов GABA и АП в случае MEGA-PRESS-.

На рис. 5 представлена диаграмма размаха для GABA-/GLX, полученная по данным редактированных спектров GABA-. Согласно этим спектральным характеристикам, отношение GABA-/GLX достоверно выше в группе с

легкой ЧМТ, чем в контрольной группе. По данным редактированных спектров GABA+ статистически достоверного смещения баланса GABA+/GLX не отмечается.

Таблица 1. Значения времен T_1 и T_2

Сигнал	Время релаксации T_1 , мс	Время релаксации T_2 , мс
H_2O_{unSUPGM} , $\delta = 4,67$ ppm [25]	1470	110
H_2O_{unSUPWM} , $\delta = 4,67$ ppm [25]	1060	74
H_2O_{unSUPCSF} , $\delta = 4,67$ ppm [25]	3000	200
GABA, $\delta = 3,01$ ppm [26]	1310	88

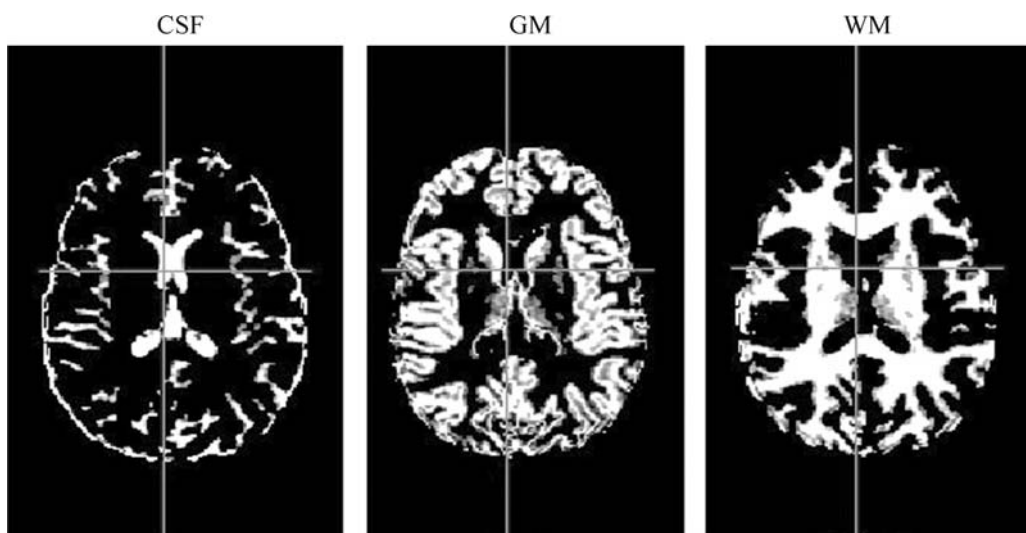


Рис. 3. Результат сегментирования FAST – три изображения, каждое из которых содержит только одну фракцию (спинномозговая жидкость, серое и белое вещество головного мозга).

Данные, представленные на рис. 6а, демонстрируют статистически достоверное увеличение (на 36%) [GABA⁻] и лишь тренд к увеличению [GABA⁺] в группе легкой ЧМТ по сравнению с нормой (рис. 6б).

Не обнаружено статистически значимых межгрупповых отличий содержания GM, WM и CSF (табл. 2).

Корреляционный анализ показал отсутствие статистически достоверных связей между [GABA⁻] и [GLX], [GABA⁺] и [GLX] в обеих группах. Также отсутствуют статистически значимые корреляции между [GABA⁻], [GABA⁺],

возрастом пациентов и временем с момента получения травмы.

ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент J-модулированная ИП MEGA-PRESS является основным и самым эффективным методом измерения [GABA], применяемым в ¹H-MPC *in vivo*. В стандартном виде спектры MEGA-PRESS+ содержат суммарный сигнал от GABA и АП. Согласно литературным данным, интенсивность сигнала GABA+АП на 60% обусловлена вкладом АП [31]. Как следствие, изменение измеряемой

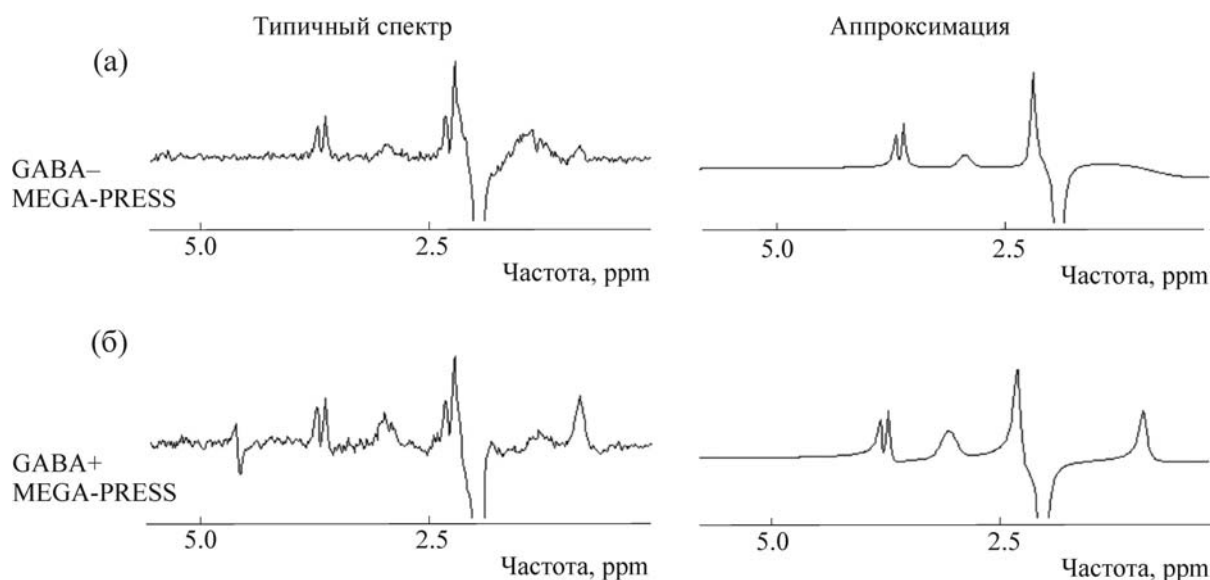


Рис. 4. (а) – Типичный вид [GABA⁻]-MEGA-PRESS-спектра и его аппроксимация в программе jMRUi; (б) – типичный вид [GABA⁺]-MEGA-PRESS-спектра и его аппроксимация в программе jMRUi.

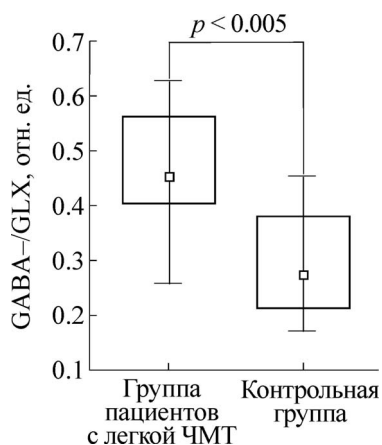


Рис. 5. Диаграмма размаха GABA-/GLX.

концентрации GABA может быть маскировано сигналом АП, а изменение интенсивности сигнала GABA+АП может быть вызвано вариациями концентраций АП. Одной из задач данной работы является выяснение целесообразности разделения сигналов GABA и АП. Для решения этой задачи помимо MEGA-PRESS+ мы использовали MEGA-PRESS- с симметричным подавлением сигнала АП. Найденное отношение $[GABA-]/[GABA+] = (0,39 \pm 0,05)$ в контрольной группе отражает вклад GABA в сигнал GABA+. Полученная в нашем исследовании величина с учетом погрешности совпадает с литературными данными [30], свидетельствуя о высокой точности полученного нами значения. Аналогичное отношение $[GABA-]/[GABA+]$ для группы пациентов с легкой ЧМТ существенно выше $(0,52 \pm 0,07)$, следовательно, изменение интенсивности сигнала GABA+ вызвано увеличением $[GABA]$. Этот факт в сумме с достоверным увеличением $[GABA-]$ и лишь трендом к увеличению $[GABA+]$ наглядно де-

монстрирует пример маскирования изменения $[GABA]$ сигналом АП.

Эффективность модифицированной MEGA-PRESS-, обнаруженная в нашем исследовании, является крайне важным результатом, так как большинство работ по измерению GABA до сих пор основывается на измерениях суммарного сигнала GABA+АП. Связано это с двумя фактами: более низкой интенсивностью сигнала GABA- в сравнении с сигналом GABA+ (рис. 4) [19] и крайней чувствительностью метода к артефактам движения и неоднородности поля B_0 .

В спектрах MEGA-PRESS- уменьшение интенсивности сигнала с $\delta = 3,02$ ppm обуславливается не только элиминированием сигнала АП, но и увеличением времени TE с 68 до 80 мс. Увеличение TE происходит при увеличении длительности ЧСИ, чтобы повысить их селективность (14 мс, что в частотном пространстве соответствует сигналу с шириной на полувысоте ($FWHM$) = 70 Гц (0,56 ppm) для $TE = 68$ мс; 20 мс и $FWHM = 50$ Гц (0,40 ppm) для $TE = 80$ мс). Показано [19], что при симметричном подавлении АП ЧСИ длительностью 14 мс в OFF-серии воздействуют на сигнал GABA с $\delta = 1,9$ ppm, существенно снижая интенсивность сигнала GABA с $\delta = 3,01$ ppm в результирующем спектре. Для ЧСИ длительностью 20 мс данный эффект отсутствует. Однако при увеличении TE фаза внешних компонент мультиплетов смещается, уменьшая тем самым интенсивность сигнала примерно на 10%. Кроме того, увеличение TE вызывает снижение интенсивности сигнала GABA- примерно на 13% в сравнении с GABA+ за счет процесса T_2 -релаксации [26].

Из-за вычитания ON- и OFF-серий для ИП MEGA-PRESS характерна повышенная чувствительность к неоднородностям постоянного

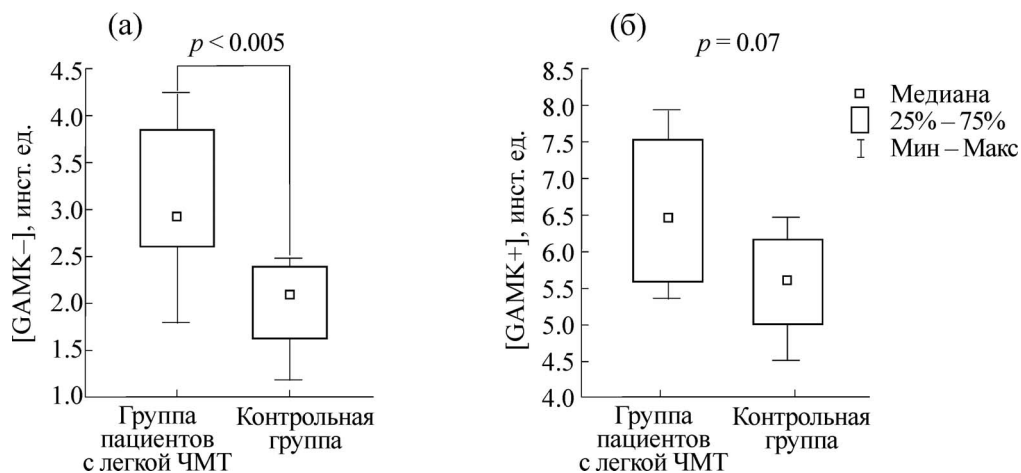


Рис. 6. (а) – Диаграмма размаха $[GABA-]$; (б) – диаграмма размаха $[GABA+]$.

Таблица 2. Результаты межгруппового статистического анализа

Сравниваемый параметр	Группа пациентов (ср. значение \pm ср. линейное отклонение)	Группа нормы (ср. значение \pm ср. линейное отклонение)	Z	P-value
[ГАМК-], инстит. ед	3,46 \pm 0,81	2,15 \pm 0,37	2,93	0,0033
[ГАМК+], инстит. ед	6,51 \pm 0,83	5,57 \pm 0,54	1,82	0,0685
[GLX], инстит. ед	1,86 \pm 0,23	2,02 \pm 0,21	1,06	0,2881
GABA-/GLX, отн. ед.	0,46 \pm 0,09	0,29 \pm 0,08	2,68	0,0072
GABA+/GLX, отн. ед.	0,79 \pm 0,14	0,66 \pm 0,05	0,84	0,3545
GM, отн. ед.	0,56 \pm 0,05	0,58 \pm 0,02	-0,70	0,49
WM, отн. ед.	0,26 \pm 0,03	0,24 \pm 0,02	1,19	0,23
CSF, отн. ед.	0,18 \pm 0,03	0,18 \pm 0,02	0,09	0,90
Возраст, лет	14,3 \pm 2,3	15,0 \pm 1,9	0,52	0,60

поля B_0 и артефактам движения [12]. В случае симметричного подавления воздействие ЧСИ на сигнал АП в обеих сериях должно быть одинаковым. Небольшое смещение резонансной частоты вследствие неоднородностей поля B_0 приводит к потере симметричности воздействия ЧСИ и появлению остаточного сигнала АП при $\delta = 3,01$ ppm.

Несмотря на все вышеперечисленные недостатки MEGA-PRESS-, настоящее исследование показало, что эта последовательность более эффективна для анализа влияния слабых воздействий на церебральную концентрацию GABA *in vivo*, чем MEGA-PRESS+.

Рост концентрации GABA, впервые обнаруженный по данным GABA-спектров в нашей работе, может быть следствием активации синтеза этой аминокислоты, а также следствием увеличения доли несвязанных с рецепторами молекул, присутствующих в цитозоле в свободном состоянии; в этом случае они становятся «видимыми» в МР-спектрах. В пользу первого предположения свидетельствуют данные работы [5] об увеличении концентрации глутаматдекарбоксилазы, обнаруженном в цереброспинальной жидкости крыс после легкой ЧМТ, поскольку глутаматдекарбоксилаза – фермент, ускоряющий декарбоксилирование глутамата, которое является единственным способом синтеза GABA. С увеличением уровня свободных, ЯМР-видимых молекул GABA согласуется снижение экспрессии $\alpha 1$ -, $\beta 2$ - и $\delta 2$ -субъединиц GABA(A)-рецепторов, наблюдающееся у крыс в гиппокампе при легкой ЧМТ [6].

Поскольку GABA синтезируется из глутамина, можно ожидать, что при активации этого процесса возникнет корреляционная связь между [GABA] и [GLX] (основной вклад в сигнал GLX вносит глутамин [31]). В нашем исследо-

вании такая корреляционная связь не обнаружена. Этот факт свидетельствует в пользу снижения экспрессии рецепторов, связывающих GABA, как причины увеличения пула свободных молекул тормозного нейромедиатора. А это, в свою очередь, может означать инактивацию процессов торможения и, как следствие, смещение баланса «торможение–возбуждение» в сторону возбуждения даже при неизменной концентрации возбуждающего нейромедиатора глутамата.

В нервной ткани GABA имеет две основные функции, выступая в роли метаболита, пополняющего пул цикла Кребса через GABA-шунт, и в роли основного тормозного нейромедиатора. GABA-шунт как альтернативный путь производства энергии активируется в условиях недостатка кислорода и глюкозы. Многочисленные данные доказывают активацию этого пути в мозге при ишемии и реперфузии [33,34]. GABA-шунт активируется при тяжелой ЧМТ в неповрежденной по данным магнитно-резонансной томографии лобно-теменной доле мозга [35], что указывает на наличие ишемии в зоне с неповрежденной анатомической структурой в условиях тяжелой ЧМТ.

Отсутствие корреляции GABA – GLX при легкой ЧМТ, выявленное в настоящем исследовании, свидетельствует о том, что в данном случае GABA-шунт не активируется, клетки мозга не нуждаются в дополнительных путях производства энергии, а функция GABA как метаболита в условиях легкой ЧМТ не затронута.

Нарушение медиаторной функции GABA, а именно нарушение баланса процессов торможения–возбуждения, по-видимому, является важнейшим последствием роста концентрации GABA после легкой ЧМТ, поскольку баланс

торможения–возбуждения определяет кортикальную активность. В настоящее время лишь очень небольшое число исследований посвящено связи функционального состояния мозга с этим балансом [36,37]. Однако в работе [38] показано, что активация возбуждения может реализоваться через угнетение тормозных синапсов. Таким образом, впервые обнаруженное нами увеличение концентрации GABA при легкой ЧМТ может быть следствием нарушения связи тормозного медиатора с GABA(A)-рецепторами и расстройства работы тормозных синапсов, в результате чего баланс возбуждение–торможение смещается в сторону возбуждения при неизменной концентрации возбуждающего нейромедиатора.

Влияние на функциональную активность мозга эксайтотоксичности, возникающей при тяжелой ЧМТ, хорошо известно [1]. Возможность развития этого процесса и при легкой травме, не затрагивающей анатомическое строение мозга, указывает на необходимость рассмотрения нейрохимических механизмов как вероятной причины встречающихся при легкой ЧМТ функциональных расстройств.

Ограничением данной работы является, несомненно, большой размер VOI. Уменьшение размеров на данный момент возможно лишь за счет увеличения времени исследования (уменьшение объема в два раза требует увеличения времени накопления спектра в четыре раза), что является критическим при исследованиях методом МРС *in vivo*. Также из-за большого объема VOI MEGA-PRESS относительное содержание различных компартментов (GM, WM и CSF) может отличаться от пациента к пациенту. Эту разницу необходимо учитывать при расчете концентрации метаболита, нормированного на сигнал неподавленной воды, поскольку времена релаксации T_1 и T_2 протонов воды, а также относительные плотности МР видимого сигнала протонов свободной воды [24] в различных тканях мозга сильно разнятся (табл. 2), кроме того, из-за низких концентраций метаболитов в CSF интенсивности их сигналов настолько малы, что не вносят вклад в суммарный сигнал каждого метаболита [25]. Для учета этих эффектов при расчете концентраций были введены поправки на эффекты парциальных объемов GM, WM и CSF с предварительным определением содержания этих компартментов в спектроскопическом VOI.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые *in vivo* были измерены концентрации основных тормозного и возбуж-

дающего нейромедиаторов (GABA и глутамата) у детей с легкой ЧМТ в остром периоде. Статистический анализ данных показал увеличение отношения GABA–/GLX у группы пациентов в сравнении с нормой. Вызванный травмой дисбаланс нейромедиаторов является следствием увеличения концентрации GABA при статистически неизменном уровне GLX. Наиболее вероятной причиной данного эффекта является снижения экспрессии рецепторов, связывающих GABA.

Важным методическим заключением данной работы является демонстрация большей эффективности ИП GABA– MEGA-PRESS с симметричным подавлением сигналов АП, чем ИП GABA+ MEGA, спектры которой содержат суммарный сигнал GABA+АП, в определении изменения концентрации GABA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Guerriero, C. Giza, and A. Rotenberg, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **15** (5), 27 (2015).
2. P. Dean and A. Sterr, *Front. Hum. Neurosci.* **7**, 30 (2013).
3. M. Cairelli, M. Fiszman, and H. Zhang, *Biomed. Semantics* **6**, 25 (2015).
4. Y. Katayama, D. Becker, T. Tamura, and D. Hovda, *J. Neurosurg.* **73** (6), 889 (1990).
5. N. Kobori and P. Dash, *J. Neurosci.* **26**, 4236 (2006).
6. P. Almeida-Suhett, E. Prager, V. Pidoplichko, et al., *Experiment. Neurol.* **273**, 11 (2015).
7. F. Cirgis, J. Pace, and J. Sweet, *Neuroscience* **10**, 1 (2016).
8. P. Almeida-Suhett, E. Prager, V. Pidoplichko, et al., *PLoS One* **9** (7), 1 (2014).
9. J. Harris, H. Yeh, I. Choi, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32** (12), 2122 (2012).
10. S. Xu, J. Zhuo, J. Racz, et al., *J. Neurotrauma* **28** (10), 2091 (2012).
11. P. Diehl, E. Fluck, H. Gunther, et al., in *NMR Basic Principles and Progress; In vivo Magnetic resonance spectroscopy III: potential and limitations*, Ed. by M. Rudin (Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1992), pp. 56–70.
12. M. Mescher, H. Merkle, et al., *MRBiomed.* **11**, 266 (1998).
13. S. Tremblay, V. Beaulé, and S. Proulx, *Clin. Neurophysiol.* **125** (7), 1371 (2014).
14. S. Provencher, *Magn. Reson. Med.* **30**, 672 (1993).
15. S. Wilke, J. List, R. Mekle, et al., *J. Neurotrauma* **34** (2), 281 (2017).
16. П. Е. Меньщиков, Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов и др. *Изв. РАН. Сер. хим.* **9**, 2238 (2015)
17. P. Menschikov, N. Semenova, and T. Akhadov. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **23**, 3536 (2015).

18. K. Behar, D. Rothman, D. Spencer, et al., *Magn. Reson. Med.* **33**, 294 (1994).
19. R. Edden, P. Barker, et al., *Magn. Reson. Med.* **68** (3), 657 (2012).
20. P. Middleton, *Australasian Emerg. Nurs. J.* **15**, 170 (2012).
21. A. Nicolaas, A. Richard, et al., *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.* **60**, 29 (2012).
22. D. Stefan, F. Cesare, et al., *Meas. Sci. Technol.* **20**, 104035 (2009).
23. L. Vanhamme, S. Van Huffel, A. van den Boogaart, et al., *J. Magn. Reson.* **129**, 35 (1997).
24. T. Ernst, R. Kreis, et al., *J. Magn. Res.* **102**, 1 (1993).
25. S. Quadrelli, C. Mountford, and S. Ramadan, *Magn. Reson. Insights* **9**, 1 (2016).
26. R. Edden and P. Barker, *J. Magn. Reson. Imaging* **35** (1), 229 (2012).
27. Y. Zhang, S. Brady, and S. Smith, *IEEE Trans. Med. Imaging* **20** (1), 45 (2001).
28. M. Jenkinson, F. Beckmann, and T. Behrens, *NeuroImage* **62**, 782 (2012).
29. S. Smith, *Human Brain Mapping* **17** (3), 143 (2002).
30. D. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5662 (1993).
31. V. Govindaraju, K. Young, et al., *NMR Biomed.* **13**, 129 (2000).
32. C. Luke, S. Tremblay, Y. Boulanger, et al., *J. Neurotrauma* **27**, 65 (2010).
33. T. Kang, S. Park, I. Hwang, et al., *Neurochem. Int.* **42**, 239 (2003).
34. J. Seo, C. Lee, J. Cho, et al., *J. Neurol. Sci.* **285**, 88 (2009).
35. Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов, М. В. Ублинский и С. Д. Варфоломеев, в кн. *Нейродегенеративные заболевания. От генома до целостного организма*, под ред. М. В. Угрюмова (Научный Мир, Москва, 2014), т. 2, сс. 657–674.
36. B. Haider, M. Häusser, and M. Carandini *J. Neurosci.* **33**, 14359 (2013).
37. M. Zhou, F. Liang, X. Xiong, et al., **17**, 841 (2014).
38. A. Taub, Y. Katz, and I. Lampl. *J. Neurosci.* **33** (36), 14359 (2013).

An Increase in Brain γ -Amino Butyric Acid Concentration in Children with Mild Traumatic Brain Injury in the Acute Phase. In vivo ^1H MRS Study

P.E. Menshchikov* **, N.A. Semenova* ** *, T.A. Akhadov**,
O.V. Bozhko**, and S.D. Varfolomeev*****

**Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

***Scientific Research Institute of Emergency Children's Surgery and Traumatology,
ul. Bolshaya Polyanka 22, Moscow, 119180 Russia*

****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

In this study, for the first time, the concentrations of major inhibitory (γ -amino butyric acid) and excitatory (glutamate) neurotransmitters were estimated in normal-appearing cortex in children with mild traumatic brain injury. ^1H magnetic resonance spectra were processed with a J-difference editing technique. It was shown that after the mild traumatic brain injury a concentration of γ -amino butyric acid increases (by 36%) in the frontal lobes that alters inhibitory/excitatory (γ -amino butyric acid/glutamate) balance. It is found that when measuring concentration of γ -amino butyric acid, the use of pulse sequence MEGA-PRESS+ leads to masking effect of γ -amino butyric acid alteration because the recorded signal consists of the signals from protons of γ methylene group of the γ -amino butyric acid and signals from protons of mobile amino acid chains of proteins. Therefore, a pulse sequence should be modified with symmetrical suppression of signals from mobile amino acid chains of proteins.

Keywords: mild traumatic brain injury, MEGA-PRESS, GABA, ^1H MRS