

УДК 57.07

## ЭФФЕКТ ЗРИТЕЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ НА УРОВНИ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И МАКРОМОЛЕКУЛ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА *in vivo*

© 2019 г. А.Н. Яковлев\*, А. Манжурцев\*\*, \*\*\*, П. Меньшиков \*, М. Ублинский\*\*, \*\*\*, О. Божко\*\*\*, Т. Ахадов\*\*\*, Н. Семенова\*, \*\*, \*\*\*

\*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

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

\*\*\*НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, 119180, Российская Федерация, Москва, ул. Большая Полянка, 22

E-mail: yakovlevalekcej@bk.ru

Поступила в редакцию 26.08.2019 г.

После доработки 19.09.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

GABA (гамма-аминомасляная кислота) — основной тормозной нейромедиатор в мозге — играет важную роль в различных типах синаптической пластичности и патологии. В настоящей работе для прижизненного исследования влияния видеостимуляции на уровень GABA в зрительной коре мозга человека использован метод протонной магнитно-резонансной спектроскопии ( $^1\text{H-MPC}$ ) и импульсная последовательность MEGA-PRESS в двух модификациях:  $^{-}\text{GABA}$ -MEGA-PRESS и  $^{+}\text{GABA}$ -MEGA-PRESS. Первая модификация позволяет получить  $^1\text{H}$ -ЯМР-сигнал метиленовых протонов GABA с химическим сдвигом  $\delta = 3,01$  м.д. ( $^{-}\text{GABA}$ ) без примеси сигнала макромолекул. Во второй модификации этот сигнал ( $^{+}\text{GABA}$ ) является суперпозицией резонансов метиленовых протонов GABA и макромолекул. Измерено также действие постоянной видеостимуляции на уровень N-ацетиласпартата и суммарный уровень глутамата и глутамин. Постоянная видеостимуляция не изменяет содержание N-ацетиласпартата и глутамин в зрительной коре. По уменьшению интенсивности сигнала  $^{-}\text{GABA}$  обнаружено статистически значимое снижение уровня GABA, указывающее на инактивацию синтеза GABA. Выявлено отсутствие статистически значимых изменений интенсивности резонанса  $^{+}\text{GABA}$ , что может быть следствием воздействия видеостимуляции на макромолекулы. Для проверки этой гипотезы с помощью специально разработанной импульсной последовательности инверсии-восстановления получен сигнал макромолекул и показано, что его интенсивность нечувствительна к видеостимуляции, и отсутствие изменений интенсивности сигнала  $^{+}\text{GABA}$  при активации следует отнести к маскирующему эффекту сигнала макромолекул.

**Ключевые слова:**  $^1\text{H-MPC}$ , GABA, MEGA-PRESS, макромолекулы, зрительная стимуляция.

**DOI:** 10.31857/S000630292001007X

Нарушения процессов, регулирующих концентрацию основного тормозного нейромедиатора  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (GABA), могут быть причиной развития церебральной патологии (шизофрении [1], депрессивного расстройства [2], тревожности [3], эпилепсии [4]).

Будучи основным тормозным нейромедиатором, GABA наряду с основным возбуждающим нейромедиатором глутаматом участвует в цикле

физико-химических процессов, обеспечивающих перенос высвобождающихся из везикул нейромедиаторов в астроциты, преобразование нейромедиаторов в глутамин, транспорт глутамин в нейроны, где он превращается в глутамат [5]. В ГАМКергических нейронах глутамат преобразуется глутаматдекарбоксилазой в GABA. Таким образом, единственным предшественником GABA является глутамат, поэтому основной тормозной нейромедиатор непосредственно связан с возбуждающим. Концентрация GABA связана с функцией коры: [GABA] коррелирует со скоростью принятия решений [6], эффективность распознавания ориентации линий изображения периферическим зрением тоже может быть соотнесена с уровнем GABA [7]. Эти данные

**Сокращения:** GABA —  $\gamma$ -аминомасляная кислота, MPC — магнитно-резонансная спектроскопия, ИП — импульсная последовательность, NAA — N-ацетиласпартат, tCr — фосфокреатин, Glx — сумма глутамин и глутамата, ЧСИ — частотно-селективный импульс, SNR — отношение сигнал/шум.

показывают, что прижизненные исследования содержания GABA в различных зонах мозга значимы как для клинических целей, так и для получения новой нейрхимической информации о механизмах биологических функций мозга. Единственным методом, позволяющим измерять церебральные концентрации метаболитов *in vivo*, является магнитно-резонансная спектроскопия (МРС). При помощи стандартных методик локализационной спектроскопии (импульсные последовательности (ИП) PRESS [8] и STEAM [9]) в мозге в зоне интереса можно определить концентрации ряда метаболитов, в том числе оценить содержание глутамата, однако для измерения GABA такие спектры не пригодны: все резонансы GABA ( $^2\text{CH}_2$  – химический сдвиг  $\delta = 3,01$  м.д.;  $^3\text{CH}_2$  –  $\delta = 1,89$  м.д.;  $^4\text{CH}_2$  –  $\delta = 2,28$  м.д.) перекрыты интенсивными сигналами других метаболитов, присутствующих в мозге в концентрациях, на порядок превышающих концентрацию GABA (в сером веществе мозга [GABA]  $\sim 2,8$  мМ, в белом –  $\sim 0,3$  мМ [10]). К мешающим определению GABA сигналам относятся сигналы N-ацетиласпартата (NAA,  $^2\text{CH}_3$  –  $\delta = 2,01$  м.д.), креатина и фосфокреатина (tCr, N( $\text{CH}_3$ ) –  $\delta = 3,03$  м.д.), глутамина + глутамата (Glx,  $^4\text{CH}_2$  –  $\delta = 2,4$  м.д.) [11].

Для определения уровня GABA создана ИП MEGA-PRESS [12], которая позволяет из сигнала при  $\delta = 3,01$  м.д. вычестить интенсивный синглетный сигнал tCr. В этой ИП используется эффект спин-спинового (J)-взаимодействия и зависимость фазы сигналов в мультиплете от времени эха TE (J-эволюция). В молекуле GABA протоны соседних метиленовых групп при  $\delta = 1,89$  м.д. и  $\delta = 3,01$  м.д. связаны J-взаимодействием, в результате которого резонанс при 3,01 м.д. расщепляется в триплет с константой  $J = 7,35$  Гц. J-эволюция вызывает расфазирование триплета, который при  $TE = 1/2J$ , превращается в триплет с внешними компонентами в противофазе к центральной компоненте. Применение частотно-селективного импульса (ЧСИ) на  $\delta = 1,9$  м.д. рефокусирует J-эволюцию сигналов триплета, и он оказывается сфазированным. Очевидно, что влияние на J-эволюцию сигнала GABA не затрагивает сигнал tCr, перекрывающий интересующий нас триплет. В ИП MEGA-PRESS, в отличие от стандартной ИП PRESS, проводится набор двух серий спектров: в  $\oplus$ -серии в ИП PRESS добавляются ЧСИ на  $\delta_{\oplus} = 1,9$  м.д. В  $\ominus$ -серии ЧСИ прилагается симметрично относительно сигнала воды на  $\delta_{\ominus} = 7,6$  м.д. и не затрагивает область сигналов церебральных метаболитов, поэтому спектр  $\ominus$ -серии представляет собой стандартный PRESS-спектр. Вычитание спектров одной серии из спектров другой серии элиминирует сигнал

tCr. Оставшийся редактированный сигнал при 3 м.д. является суперпозицией резонансов GABA, макромолекул и гомокарнозина, поэтому в дальнейшем ИП с приведенным выше расположением ЧСИ мы будем называть  $^{+}\text{GABA}$ MEGA-PRESS. Вклад макромолекул в редактированный резонанс при использовании  $^{+}\text{GABA}$ MEGA-PRESS составляет 50%, а гомокарнозина – 16% [13]. ИП  $^{+}\text{GABA}$ MEGA-PRESS наиболее часто применяется для измерения уровня GABA, вероятно, в предположении, что изменения интенсивности этого сигнала могут быть следствием изменения исключительно GABA.

Из-за недостаточной селективности ЧСИ на  $\delta_{\oplus} = 1,9$  м.д. воздействует не только на триплет GABA, но и на сигнал метиленовых протонов макромолекул при  $\delta = 1,7$  м.д., связанных J-взаимодействием с протонами макромолекул при  $\delta = 3$  м.д. с константой  $J = 7,8$  Гц. Это обуславливает присутствие в спектрах  $^{+}\text{GABA}$ MEGA-PRESS наличия сигнала макромолекул. Однако если в  $\ominus$ -серии использовать ЧСИ на  $\delta_{\ominus} = 1,5$  м.д., можно исключить сигнал макромолекул и получить сигнал GABA с минимальной примесью (гомокарнозин) [14]. Такой вариант ИП MEGA-PRESS мы в дальнейшем будем называть  $^{-}\text{GABA}$ MEGA-PRESS.

Таким образом, в зависимости от расположения селективных импульсов в  $\ominus$ -серии сигнал GABA может быть зарегистрирован либо с макромолекулами ( $^{+}\text{GABA}$ ), либо без макромолекул ( $^{-}\text{GABA}$ ).

Подавление макромолекул приводит к снижению интенсивности сигнала на 3 м.д. и создает сложности при его обработке. Это объясняет частое использование ИП  $^{+}\text{GABA}$ MEGA-PRESS для характеристики содержания GABA *in vivo* в локусах мозга человека. В состоянии покоя этим методом установлено, что вклад макромолекул в суммарный сигнал одинаков в пределах ошибки в разных корковых зонах (несмотря на разную интенсивность сигнала  $^{+}\text{GABA}$  или сигнала макромолекул) и сохраняется со временем [15]. Обнаружено большее содержание макромолекул в сером веществе, чем в белом [16]. Однако неясно, что происходит в случае патологии или при нейроактивации. В ответ на двигательную нагрузку [6], активацию когнитивных функций [17], физическую активность [18] зафиксированы изменения интенсивности сигнала  $^{+}\text{GABA}$ . Существуют лишь четыре исследования GABA в зрительной коре при видеостимуляции. В двух из них измеряли сигнал  $^{-}\text{GABA}$  и обнаружили его снижение [19,20]. При измерении сигнала  $^{+}\text{GABA}$  отмечается как увеличение [21], так и уменьшение его интенсивности [22].

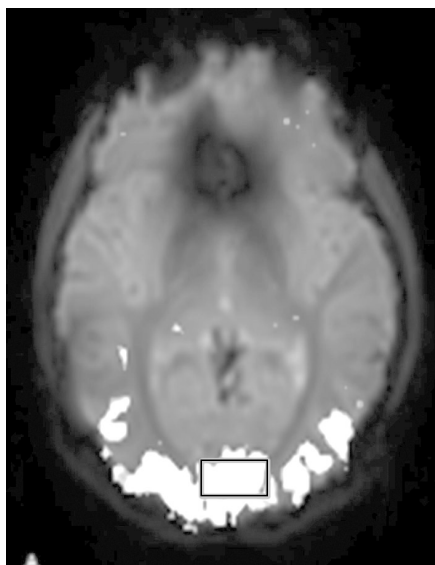


Рис. 1. Расположение спектроскопического вокселя.

Таким образом, участие основного тормозного нейромедиатора в регуляции процессов возбуждения—торможения при нейроактивации изучено явно недостаточно. Имеющиеся данные получены с применением разных модификаций ИП MEGA-PRESS, что, возможно, приводит к неоднозначным результатам. Причиной может быть влияние нейроактивации не только на GABA, но и на макромолекулы. Присутствие сигнала макромолекул может маскировать эффекты изменения GABA [23]. Отсюда возникает необходимость исследовать влияние видеостимуляции на интенсивность сигналов +GABA и –GABA в  $^1\text{H}$ -МР-спектрах зрительной коры мозга человека, выделить сигнал макромолекул, оценить влияние нейроактивации на интенсивность сигнала макромолекул и определить, маскирует ли этот сигнал возможные изменения GABA.

В настоящей работе впервые исследовано влияние видеостимуляции на концентрацию макромолекул. Получены значения уровня GABA и суммарного уровня глутамата и глутамата в условиях постоянной видеостимуляции с использованием ИП  $^{-\text{GABA}}$  MEGA-PRESS.

## МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** В исследовании приняли участие три группы добровольцев. Группа для исследования –GABA состояла из 16 человек (средний возраст  $29 \pm 7$  лет); измерение +GABA проводили в группе из 8 человек (средний возраст  $25 \pm 3$  лет); исследование макромолекул – в группе из 16 человек ( $25 \pm 7$  лет). Все пациенты были

здоровы и ознакомлены с процедурой исследования.

**Зрительная стимуляция.** Исследование состояло из двух блоков одинаковой длительности (9 мин 36 с): «покоя» и «стимуляции». Для исключения незапланированной зрительной активации во время «покоя» освещение в аппаратной томографа было выключено заблаговременно, а испытуемого просили закрыть глаза. Затем испытуемого просили открыть глаза, включали экран (система SensaVue) и через систему зеркал предъявляли зрительную стимуляцию – шахматная доска, мерцающая с частотой 8 Гц. Внимание испытуемого оценивали по появляющимся с разными промежутками времени красным крестам на черном фоне (пять раз за две минуты), которые испытуемый должен был считать и на каждое пятое появление нажимать на кнопку, вызывавшую звуковой сигнал в аппаратной томографа.

**Получение диагностических изображений с помощью магнитно-резонансной томографии.** Все исследования выполнены на магнитно-резонансном томографе Achieva dStream 3T (Philips, Нидерланды) при помощи приемной катушки dStream HeadNeckSpine coil. Отсутствие очагового поражения и объемного процесса в головном мозге устанавливали по данным диагностической магнитно-резонансной томографии ( $T_1$ -,  $T_2$ -взвешенные изображения, изображения с ослаблением сигнала свободной жидкости и диффузионно-взвешенные изображения). Спектроскопический воксел располагали в зрительной коре (рис. 1), которую визуализировали по данным функциональной магнитно-резонансной томографии [24].

**Протокол получения данных методом магнитно-резонансной спектроскопии.** В ИП  $^{-\text{GABA}}$  MEGA-PRESS применяли следующие параметры: время эха ( $TE$ ) = 80 мс, задержка на релаксацию ( $TR$ ) = 2 с, число накоплений (NSA) = 288 (по 144 накопления на каждую серию), ЧСИ длительностью 20 мс применяли на  $\delta_{\oplus} = 1,9$  м.д. в  $\oplus$ -сериях и  $\delta_{\ominus} = 1,5$  м.д. в  $\ominus$ -сериях. В ИП  $^{+\text{GABA}}$  MEGA-PRESS  $TE = 68$  мс, ЧСИ длительностью 14 мс располагали на  $\delta_{\oplus} = 1,9$  м.д. и  $\delta_{\ominus} = 7,5$  м.д. J-модуляция изменяет вид мультиплета GABA в области 3 м.д. в разных сериях. Размер спектроскопического вокселя для спектров макромолекул и –GABA:  $20 \times 40 \times 30$  мм<sup>3</sup>, для +GABA –  $25 \times 45 \times 35$  мм<sup>3</sup>.

**Выделение сигнала макромолекул.** Резонансы, принадлежащие макромолекулам, имеют низкое время продольной релаксации  $T_1$  [25]. Это дает возможность выделить сигнал макромолекул при  $\delta = 3$  м.д., используя инвертирующий импульс с последующим восстановлением макромолеку-

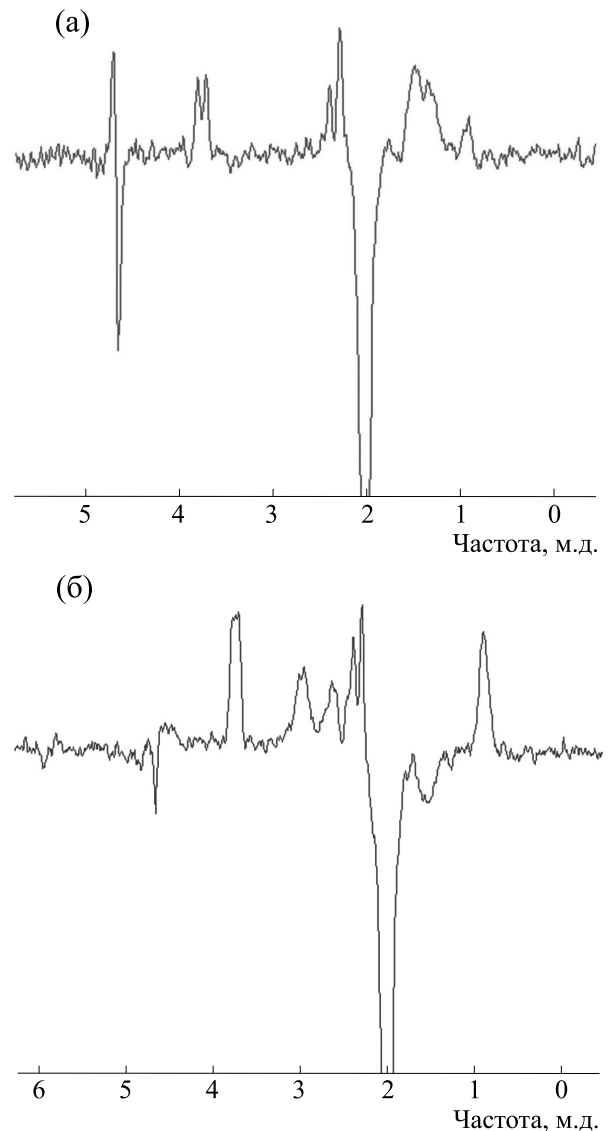
ской намагниченности [25]. Для исключения сигналов GABA и гомокарнозина в области 3 м.д. применяли дополнительный инвертирующий импульс блочной формы шириной 50 Гц и временем инверсии  $TI = 530$  мс. Этот импульс использовали как предварительный в обеих модификациях ИП MEGA-PRESS – для получения сигнала макромолекул в  $^{+}GABA$ MEGA-PRESS и для оценки качества подавления сигналов метаболитов в  $^{-}GABA$ MEGA-PRESS. Оценку остаточного сигнала в последнем случае проводили, сравнивая отношение сигнал/шум (SNR) в сигнале на 3 м.д. с макромолекулами и без них. В отношении сигнал/шум оценка сигнала производится как разница максимального и минимального значения в области  $\delta = 2,8-3,5$  м.д., а шум как стандартное отклонение среднего значения интенсивности шумовых дорожек в области 11–12 м.д. или 12–13 м.д. после вычитания полиномиальной функции ( $n = 2$ ) из спектра в каждой из этих областей. [26].

**Обработка спектральных данных.** Все спектры обрабатывали в программе GANNET [26] на базе MATLAB. Программа автоматически подбирает параметры для аппроксимации резонансов одной гауссовой линией. Результатом обработки являлись значения интенсивностей сигналов  $^{+}GABA$ ,  $^{-}GABA$ , макромолекул а также GLX, tCr (при обработке  $\ominus$ -серии в ИП  $^{-}GABA$ MEGA-PRESS). Погрешность аппроксимации резонансов оценивали по выдаваемому программой параметру *CRLB* [27]. Из дальнейшего анализа исключали значения интенсивностей сигналов  $^{-}GABA$  с погрешностью обработки  $> 20\%$ , что уменьшило размер выборки с 15 до 10 человек.

Для нормировки интенсивностей в качестве референса использовали интенсивность tCr. Эффект видеостимуляции на параметры  $^{+}GABA/Cr$ ,  $^{-}GABA/Cr$ ,  $GLX/Cr$  и интенсивность сигнала макромолекул выявляли путем межгруппового сравнения данных, полученных в покое и в периоде видеостимуляции. Наборы данных проверяли на принадлежность к нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность эффекта оценивали по критерию Вилкоксона для связанных выборок [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Рис. 2а представляет спектр, полученный при использовании ИП  $^{-}GABA$ MEGA-PRESS с предварительным добавлением инвертирующего импульса. Спектр не содержит резонансных линий при  $\delta = 3$  м.д., сигнал подавлен. Для точной интерпретации результата проведена следующая количественная оценка. Среднее значение SNR в спектрах  $^{-}GABA$ MEGA-PRESS с инвертирующим



**Рис. 2.** MEGA-PRESS спектр (усредненный по 288 динамикам) с инвертирующим предварительным импульсом: (а) – с подавлением макромолекул, (б) – без подавления макромолекул. Как и ожидалось, сигнал при  $\delta = 3$  м.д. отсутствует.

импульсом составляет 1,76, в то время как в спектрах  $^{+}GABA$ MEGA-PRESS с таким же импульсом  $SNR = 7,42$ . Таким образом, наш метод обеспечивает подавление сигнала  $^{-}GABA$  в 4,2 раза.

На рис. 2б представлен спектр  $^{+}GABA$ MEGA-PRESS, полученный с использованием с инвертирующего импульса, в котором сигнал на 3 м.д. на 90% (см. обсуждение) соответствует сигналу макромолекул.

На рис. 3а изображены изменения интенсивности сигнала  $^{-}GABA$ , нормированного на креатин, у каждого испытуемого. Видно, что в восьми случаях из десяти изменение отрицательное и

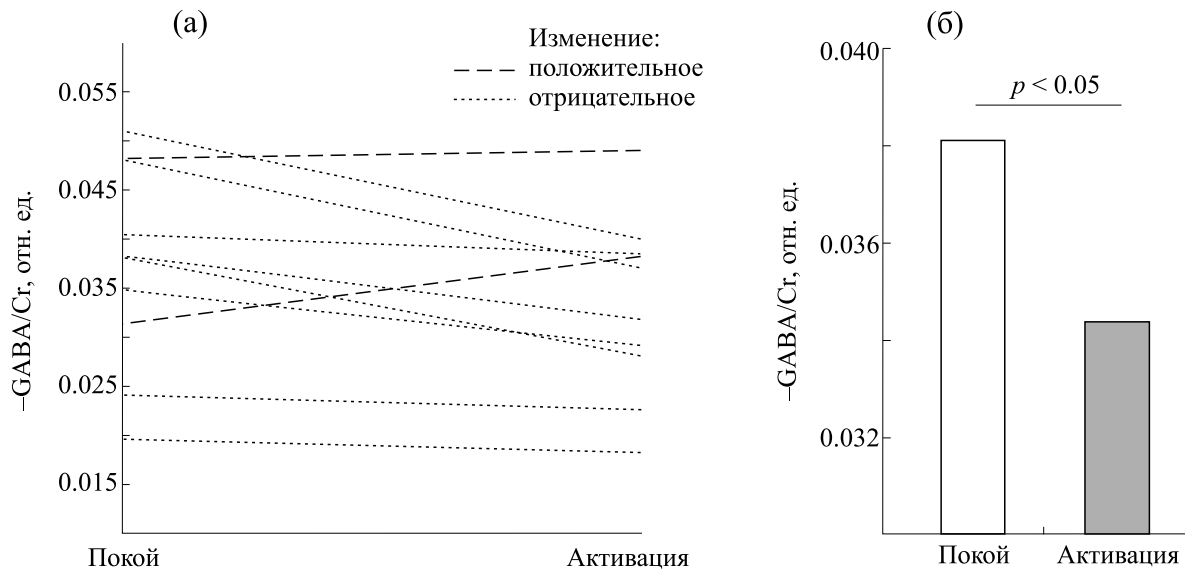


Рис. 3. (а) – Изменения относительной интенсивности сигнала  $-GABA/Cr$  в зрительной коре в состоянии покоя и активации у каждого испытуемого; (б) – сравнение медиан  $-GABA/Cr$  в покое и при зрительной стимуляции.

лишь в двух случаях – положительное. При помощи рангового критерия Вилкоксона установлено, что найденное изменение  $-GABA/Cr$  статистически достоверно. Из рис. 3б видно, что медиана изменения  $-GABA/Cr$  составляет 12% ( $p < 0,05$ ).

В результате зрительной стимуляции не выявлено статистически достоверного изменения отношений  $Glx/Cr$ ,  $+GABA/Cr$ , а также макромолекул.

## ОБСУЖДЕНИЕ

**Снижение уровня GABA в ответ на зрительную стимуляцию.** Полученный нами результат соответствует данным измерений сигнала GABA на томографе с напряженностью постоянного магнитного поля  $B_0 = 7$  Тл; авторы показали, что концентрация GABA в зрительной коре достоверно снижается на 5% под влиянием десятиминутной видеостимуляции [19]. Из данных работы [19] следует, что даже увеличение спектрального разрешения при  $B_0 = 7$  Тл не позволяет разделить сигналы GABA и макромолекул, и обнаруженный авторами эффект относится к сумме GABA и макромолекул, хотя вклад последних в этом случае должен уменьшиться. Вероятно, по этой причине эффект видеостимуляции меньше, чем обнаруженный нами по данным, полученным с помощью ИП  $-GABA$  MEGA-PRESS, когда сигнал макромолекул элиминирован полностью. В отличие от результатов, представленных в настоящей работе, исследование влияния такой же стимуляции с помощью  $+GABA$  MEGA-PRESS МРС в поле 3Т [22] обнаружило статистически значимое сни-

жение  $+GABA/Cr$ . Противоположный по знаку эффект зрительного возбуждения, достоверный рост  $[+GABA]$ , найден в работе [21]. Из приведенных данных следует, что снижение концентрации GABA наблюдается лишь в тех МРС-исследованиях, в которых удастся избавиться от вклада макромолекул, тогда как измерения  $+GABA$  при зрительном возбуждении дают противоречивые результаты [21,22].

Мы не нашли изменения интенсивности сигнала  $Glx$  под влиянием видеостимуляции. Однако измерения глутамата в поле 7Т, в котором разрешаются сигналы глутамата и глутамин, показали, что в ответ на зрительную стимуляцию содержание глутамата статистически значимо увеличивается на 3%, если стимул предъявляют в течение 10 мин [27], и на 2% – при блочной пятиминутной стимуляции [30].

После высвобождения из везикул глутамат почти полностью попадает в астроциты, где из него синтезируется глутамин, превращающийся после переноса в нейроны в глутамат [31]. Таким образом, взаимопревращение глутамата и глутамин в цикле может быть причиной постоянства  $Glx$ . К сожалению,  $^1H$ -МРС-измерений глутамин практически нет, за исключением исследования в поле 7Т с использованием зрительного возбуждения, под действием которого обнаружены противоположенные и примерно одинаковые изменения (содержание глутамата увеличивается на  $0,22 \pm 0,11$  мМ, а содержание глутамин снижается на  $0,18 \pm 0,11$  мМ) [32]. Это означает, что изменения суммарной концентрации глутамата и глутамин под влиянием видеостимуляции не будут наблюдаться, что соответствует нашим данным.

Из постоянства концентрации Glx могут следовать два вывода. Либо при активации зрительной коры глутамат участвует исключительно в цикле нейромедиаторов и не включается в другие процессы (например, окисление, синтез GABA), либо его концентрация пополняется за счет повышения потребления глюкозы. В пользу первого предположения свидетельствует обнаруженное нами снижение GABA, которое может быть следствием уменьшения расхода глутамата в синтезе GABA, а также следствием использования GABA в качестве субстрата вместо глутамата в цикле Кребса.

**Содержание N-ацетиласпартата в ответ на длительную стимуляцию сохраняется.** В нескольких цитированных ранее работах, выполненных на томографах с  $B_0 = 7$  Тл, исследовали влияние зрительной стимуляции на содержание метаболитов в зрительной коре и, как и в нашем исследовании, не зафиксировали статистически достоверного изменения суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата [21,30]. Однако измерение суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата с помощью ИП MEGA-PRESS в поле 3Т показало, что такой же, как использованный нами, способ видеостимуляции вызывает в зрительной коре испытуемых снижение суммарного содержания NAA и N-ацетиласпартат-глутамата на 60% и увеличение NAA на 18% [33]. Если учесть, что вклад NAA и N-ацетиласпартат-глутамата в суммарный сигнал составляет 10% и использовать данные работы [33], то следует ожидать снижения интенсивности суммарного сигнала tNAA примерно на 10%. По нашим данным, этот эффект зрительного возбуждения не наблюдается. Возможно, расхождение данных с нашими результатами объясняются разными способами оценки концентраций: авторы работы [33] измеряют не интегральные интенсивности сигналов, а высоты их пиков.

Таким образом, наблюдаемое в нашем исследовании постоянство tNAA в ответ на видеостимуляцию в основном совпадает с результатами тех авторов, которые использовали стандартную оценку эффектов видеостимуляции на основе интегральной интенсивности сигнала tNAA.

**Маскировка эффекта более интенсивным сигналом макромолекул.** В настоящей работе мы показали, что видеостимуляция влияет на интенсивность сигнала -GABA, тогда как интенсивность сигнала +GABA не изменилась. При этом интенсивность сигнала макромолекул в ответ на стимуляцию не изменяется. Отсюда можно сделать вывод, что сигнал макромолекул маскирует изменения GABA. Причина в том, что сигнал макромолекул значительно превышает по интенсивности сигнал GABA, это делает невозможным зафиксировать небольшой эффект изменения

при текущем уровне погрешности. Согласно нашим измерениям, вклад макромолекул в суммарный сигнал при  $\delta = 3$  м.д. составляет ~63%, а GABA (и гомокарнозин) – соответственно 37%. Расчет выполнен, исходя из сравнения средних значений интенсивностей сигналов макромолекул и -GABA. В нашей работе погрешность обработки сигнала +GABA составляет ~10% (ошибка обработки, полученная в Gannet), при этом вклад зафиксированного изменения GABA (12%) в суммарный сигнал (+GABA) равен ~4%.

В то же время каждое третье измерение -GABA превышает погрешность обработки в 20% из-за низкого значения SNR. Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что измерение сигнала +GABA сопровождается риском потери эффекта. При этом следует иметь в виду низкую интенсивность сигнала -GABA, что создает серьезные трудности при его обработке, а это означает необходимость улучшения методики для повышения значения SNR.

**Оценка качества подавления сигналов метаболитов.** На результат измерения сигнала макромолекул может повлиять неполное подавление сигнала GABA и гомокарнозина. По остаточному вкладу этих сигналов оценим возможность ложного постоянства сигнала макромолекул при видеостимуляции. До подавления доля GABA в общем сигнале +GABA равнялась 37%; после подавления она снизится до 12%, поскольку интенсивность сигнала макромолекул не изменится, а интенсивность GABA снизится в 4,2 раза. Снижение остающейся части GABA на 12% при видеостимуляции соответствует ~1,7% от измеренного сигнала макромолекул. Увеличение интенсивности сигнала макромолекул, превышающее данное значение, могло бы быть обнаружено в настоящей работе в отсутствие других факторов, влияющих на погрешность измерения. Таким образом, не более 2% от интенсивности сигнала макромолекул могут объясняться наличием остаточного сигнала -GABA в активированной зрительной коре.

**Наблюдаемые макромолекулы не участвуют в процессе нейротрансмиссии.** Общую характеристику резонансов макромолекул можно найти в работе [34]. Достоверных биохимических данных о структуре макромолекул все еще нет. В  $^1\text{H}$ -МР-спектрах мозга крысы *in vivo* сигналы этих соединений отнесены согласно их химическим сдвигам к метильным и метиленовым протонам аминокислотных остатков цитозольных белков или аполипопротеинов [34]. В частности, сигнал макромолекул на 3 м.д. соответствует структурному фрагменту с концевой группой  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$  лизина (как и GABA). В настоящей работе в ответ на зрительную активацию изменение сигнала макромолекул на  $\delta = 3$  м.д. не выявлено. Это указывает на

отсутствие концентрационных, конформационных и структурных изменений макромолекул, затрагивающих фрагмент, резонирующий при  $\delta = 3$  м.д., под влиянием процесса нейротрансмиссии.

### ВЫВОДЫ

Из результатов настоящей работы можно сделать вывод, что макромолекулы со структурным фрагментом, резонирующим на 3 м.д., не вовлечены в процесс нейротрансмиссии при обработке зрительного стимула. Снижающийся в условиях нагрузки уровень ГАВА при постоянстве уровня Glx свидетельствует о роли тормозного нейромедиатора в обеспечении баланса процессов возбуждения-торможения в зрительной коре при длительной видеостимуляции.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-13-00030).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры были одобрены этическим комитетом Научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы, а также соответствовали Хельсинкской декларации о проведении исследований с участием людей.

Все участники исследования дали информированное согласие на участие в экспериментах.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- D. A. Lewis, D. W. Volk, and T. Hashimoto, *Psychopharmacology* **174** (1), 143 (2004).
- G. Sanacora, G. F. Mason, D. L. Rothman, et al., *Arch. Gen. Psychiatry* **56** (11), 1043 (1999).
- A. W. Goddard, G. F. Mason, A. Almai, et al., *Arch. Gen. Psychiatry* **58** (6), 556 (2001).
- O. A. Petroff and D. L. Rothman, *Mol. Neurobiol.* **16** (1), 97 (1998).
- L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, *J. Neurochem.* **98** (3), 641 (2006).
- A. Floyer-Lea, M. Wylezinska, T. Kincses, and P. M. Matthews, *J. Neurochem.* **95** (3), 1639 (2006).
- R. A. E. Edden, S. D. Muthukumaraswamy, T. C. A. Freeman, and K. D. Singh, *J. Neurosci.* **29** (50), 15721 (2009).
- P. A. Bottomley, *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* **508** (1), 333 (1987).
- J. Frahm, K. D. Merboldt, and W. Hänicke, *J. Magn. Resonance* **72** (3), 502 (1987).
- P. K. Bhattacharyya, M. D. Phillips, L. A. Stone, and M. J. Lowe, *Magn. Reson. Imaging* **29** (3), 374 (2011).
- V. Govindaraju, K. Young, and A. A. Maudsley, *NMR Biomed.* **13** (3), 129 (2000).
- M. Mescher, H. Merkle, J. D. Kirsch, et al., *NMR Biomed.* **11** (6), 266 (1998).
- S. J. Kish, T. L. Perry, and S. Hansen, *J. Neurochem.* **32** (6), 1629 (1979).
- R. A. Edden, N. A. Puts, and P. B. Barker, *Magn. Reson. Med.* **68** (3), 657 (2012). DOI: 10.1002/mrm.24391.
- D. C. Shungu, X. Mao, R. Gonzales, et al., *NMR Biomed.* **29** (7), 932 (2016).
- M. Považan, G. Hangel, B. Strasser, et al., *Neuroimage* **121**, 126 (2015).
- L. Michels, E. Martin, P. Klaver, et al., *PloS One* **7** (4), e31933 (2012).
- R. J. Maddock, G. A. Casazza, D. H. Fernandez, and M. I. Maddock, *J. Neurosci.* **36** (8), 2449 (2016).
- R. Mekle, S. Kühn, H. Pfeiffer, et al., *NMR Biomed.* **30** (2), e3672 (2017).
- C. Chen, H. P. Sigurdsson, S. Pépés, et al., *NeuroImage* **156**, 207 (2017).
- P. Bednařík, I. Tkáč, F. Giove, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35** (4), 601 (2015).
- K. Kurcys, E. Annac, N. M. Hanning, et al., *J. Neurosci.* **38** (46), 9967 (2018).
- П. Е. Меньшиков, Н. А. Семенова, Т. А. Ахадов и др., *Биофизика* **62** (6), 1221 (2017).
- А. В. Манжурцев, Н. А. Семенова, М. В. Ублинский и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 6, 1630 (2016).
- R. A. De Graaf, *In vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques* (John Wiley & Sons, 2019).
- <http://www.gabamrs.com>.
- S. Cavassila, S. Deval, C. Huegen, et al., *NMR Biomed.* **14** (4), 278 (2001).
- <https://www.stat.auckland.ac.nz/~wild/ChanceEnc/Ch10.wilcoxon.pdf>.
- S. Mangia, I. Tkáč, R. Gruetter, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27** (5), 1055 (2007).
- B. Schaller, R. Mekle, L. Xin, et al., *J. Neurosci. Res.* **91** (8), 1076 (2013).
- A. Schousboe and U. Sonnewald, *Glutamate-/GABA-glutamine Cycle* (Springer International Pu, 2016).
- Y. Lin, M. C. Stephenson, L. Xin, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32** (8), 1484 (2012).
- R. C. G. Landim, R. A. Edden, B. Foerster, et al., *Magn. Reson. Imaging* **34** (3), 239 (2016).
- K. L. Behar and T. Ogino, *Magn. Reson. Medicine* **30** (1), 38 (1993).

## The Effect of Visual Stimulation on GABA and Macromolecules Levels in Human Brain *in vivo*

A. Yakovlev\*, A. Manzhurtsev\*\*, \*\*\*, P. Menshchikov\*, M. Ublinskiy\*\*, \*\*\*, O. Bozhko\*\*\*, T. Akhadov\*\*\*, and N. Semenova\*, \*\*, \*\*\*

\*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

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

\*\*\*Clinical and Research Institute of Emergency Paediatric Surgery and Traumatology, ul. Bolshaya Polyanka 22, Moscow, 119180 Russia

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the brain and plays an important role in various types of synaptic plasticity and pathology. In present work, proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) and two modified MEGA-PRESS pulse sequences such as  $^{-\text{GABA}}$  MEGA-PRESS and  $^{+\text{GABA}}$  MEGA-PRESS were used to investigate the effect of visual stimulation on the GABA level in human visual cortex *in vivo*. With  $^{-\text{GABA}}$  MEGA-PRESS it was possible to acquire  $^1\text{H}$ -NMR-signal of methylene protons of GABA with the chemical shift  $\delta = 3.01$  ppm without signals from macromolecules. When  $^{+\text{GABA}}$  MEGA-PRESS was implemented, the GABA signal was a superposition of resonances of methylene protons of GABA and macromolecules. The effect of constant visual stimulation on the level of N-acetylaspartate and total level of glutamate and glutamine was also estimated. Constant visual stimulation has no effect on the levels of N-acetylaspartate and glutamine in the visual cortex.  $^{-\text{GABA}}$  signal intensity decreased with a statistically significant decrease in the level of GABA signal intensity leading to inactivation of GABA synthesis. No statistically significant changes in the intensity of  $^{+\text{GABA}}$  resonance were found, probably due to the effect of visual stimulation on macromolecules. In order to test this hypothesis a signal from macromolecules was acquired using specifically-designed inversion-recovery pulse sequence. It was shown that the intensity of this signal is unaffected by visual stimulation and the lack of changes in the intensity of  $^{+\text{GABA}}$  signal during stimulation has to be considered as the masking effect of macromolecular signal..

*Keywords:*  $^1\text{H}$ -MRS, GABA, MEGA-PRESS, macromolecules, visual stimulation