

ИССЛЕДОВАНИЕ СУММАРНОГО УРОВНЯ ГЛУТАМАТА И ГЛУТАМИНА В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КОРОТКОЙ АКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2022 г. А. Яковлев*, **, ***, А. Мажурцев*, ***, ****, П. Меньщиков**, *****, М. Ублинский*, ***, И. Мельников*, Д. Куприянов*****, Т. Ахадов*, ****, Н. Семенова*, **, ***, ****

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

**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

****Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/1

*****Philips Healthcare, 123022, Москва, ул. Сергея Макеева, 13

E-mail: yakovlevalekcej@bk.ru

Поступила в редакцию 08.09.2021 г.

После доработки 14.01.2022 г.

Принята к публикации 19.01.2022 г.

Методом функциональной магнитно-резонансной спектроскопии в магнитном поле 3 Тл с временным разрешением 2 с исследована динамика суммарного уровня глутамата и глутамин в затылочной коре мозга человека в периоде зависящего от уровня оксигенации крови ответа на короткую (3 с) зрительную стимуляцию. Обнаружено статистически достоверное увеличение содержания глутамата и глутамин на первой и пятнадцатой секундах после предъявления 25 испытуемым волонтерам изображения шахматной доски, мерцающей с частотой 4 Гц. Корреляция между максимумом амплитуды зависящего от уровня оксигенации крови ответа и максимумами уровня глутамата и глутамин не выявлена. Изменения суммарного уровня глутамата и глутамин во времени после стимула не соответствуют скорости оборота глутамин-глутаматного цикла, но согласуются с временными характеристиками везикулярного цикла: высвобождением глутамин из везикул и его обратным захватом. Таким образом, можно полагать, что обнаруженная динамика глутамата и глутамин обусловлена не метаболическими превращениями в цикле нейромедиаторов, а изменением подвижности глутамин при выходе из везикул и обратной упаковке.

Ключевые слова: ^1H -МРС, глутамат, PRESS, зрительная стимуляция, короткий стимул.

DOI: 10.31857/S000630292202017X

Функциональная ^1H -магнитно-резонансная спектроскопия (фМРС) представляет собой единственный метод неинвазивной оценки изменений концентраций метаболитов в ответ на нейроактивацию. Измерение концентраций основных нейромедиаторов (тормозного нейромедиатора γ -аминомасляной кислоты и возбуждаю-

щего нейромедиатора глутамата (Glu)) в мозге человека представляет собой важнейшую характеристику, необходимую при оценке функционального состояния центральной нервной системы в норме и патологии. Основные нейромедиаторы присутствуют в мозге в миллимолярных концентрациях, что достаточно для детектирования их методами магнитно-резонансной спектроскопии. Из всех аминокислот Glu имеет самую большую концентрацию в мозге человека [1]. Однако вследствие сходства его химической структуры и структуры глутамин (Gln) ^1H -МР-сигналы этих соединений перекрываются в спектрах, регистрируемых на коммерческих МР-томографах, для которых разрешена напряжен-

Сокращения: фМРС — функциональная ^1H -магнитно-резонансная спектроскопия, Glu — глутамат, Gln — глутамин, Glx — сумма глутамата и глутамин, BOLD-ответ — ответ, зависящий от уровня оксигенации крови (от англ. blood oxygenation level dependent), фМРТ — функциональная магнитно-резонансная томография, NAA — n-ацетиласпартат, tNAA — сумма n-ацетиласпартата и n-ацетиласпартилглутамата, Cr — сумма креатина и фосфокреатина, tCho — холинсодержащие соединения.

ность постоянного магнитного поля $B_0 \leq 3$ Тл. Поэтому уровень Glu оценивают по интенсивности суммарного сигнала протонов 4-CH₂-группы обоих веществ с химическим сдвигом δ в диапазоне 2.3 – 2.45 м.д. [2]. Согласно работам [3–5] соотношение интенсивностей этих сигналов Glu и Gln, разрешающихся в поле 7 Тл, составляет в области затылочной коры нормального мозга человека 3/1 [6].

Исследования, проведенные в магнитном поле напряженностью 7 Тл, показали, что под влиянием различных видов нейроактивации с использованием блочных парадигм активации наблюдается рост [Glu] [7–10]. Измерения [Glu], проведенные в поле 7 Тл при активации единичными стимулами, отсутствуют, однако в поле 3 Тл показано, что единичные болевые и когнитивные стимулы увеличивают интенсивность суммарного сигнала глутамата и глутамина (Glx) [11–14]. Количественно эффект зависит от длительности активации и вида применяемого стимула. Например, при постоянной пятиминутной видеостимуляции [15] посредством предъявления изображения мерцающей шахматной доски в зрительной коре наблюдается увеличение [Glu] на 10% по сравнению с состоянием покоя, а при исследовании влияния периода зрительной стимуляции 64 с эффект уменьшается – увеличение [Glu] составляет от 1.5 до 3.0% [7, 9, 10]. Предъявление объектного стимула увеличивает в затылочной коре правого полушария уровень Glx на 11% больше, чем предъявление абстрактного стимула [16]. Влияние коротких стимулов на [Glu] изучено мало. Показано, что под действием короткого (<3 с) болевого стимула [12, 13] [Glx] увеличивается в островке по сравнению с состоянием покоя и по разным данным либо возвращается к исходному уровню в течение 3–6 с [13], либо нет [12].

Известным эффектом нейростимуляции является ответ, зависящий от уровня оксигенации крови (BOLD-ответ), косвенно отражающий нейронную активность. Время BOLD-ответа на единичный стимул составляет 20 с [17]. Приведенные данные по измерению Glx после короткого стимула получены в условиях, когда период между стимулами составляет от 3 до 9 с, что существенно меньше, чем период BOLD-ответа. Это означает незавершенность вызванных стимулом процессов, связанных с расширением сосудов, увеличением притока оксигемоглобина и глюкозы. Можно ожидать, что динамика [Glx] в периоде, превышающем период BOLD-ответа, позволит исследовать процесс оборота нейромедиатора непосредственно в глутаматергических синапсах, так как гемодинамический процесс будет завершен.

Изменения [Glu] зависят от соотношения активности процессов его синтеза и распада. Ос-

новным путем синтеза является аспаратамин-трансферазная реакция [18], в которой участвуют α -кетоглутарат и аспартат, а способом деградации – гидролиз глутаматдегидрогеназой с образованием α -кетоглутарата. Доказано, что нейроактивация сопровождается активацией синтеза Gln из глюкозы в астроцитах, затем в нейронах Gln превращается в Glu [19]. Изменение [Glu] под влиянием нейроактивации может происходить также и другими путями [20, 21] – конверсией в тормозной нейромедиатор γ -аминомасляную кислоту, конденсацией с цистеином при синтезе глутатиона или детоксикации аммиака через образование Gln. Изменение содержания Glu вследствие изменения активности метаболических процессов, протекающих с участием Glu, должно вызывать изменения концентраций других метаболитов, в том числе и детектируемых методами МРС [21, 22].

Причиной изменения значений [Glu], измеренных с помощью ¹H-МРС, может быть также изменение пула МР-видимого подвижного Glu, вызванное высвобождением Glu из везикул и последующим его перемещением между различными компартментами. Показано, что при использовании спинного эха для детектирования глутамата везикулярный Glu, имея меньшее время поперечной релаксации T₂, не дает вклада в суммарный сигнал Glu [23]. Это косвенно подтверждается менее выраженными относительными изменениями [Glu], наблюдающимся в работах с использованием короткого времени эха (<20 мс) [24]. Высвобождение Glu происходит из везикул, и необходимым условием повторения этого процесса является наличие на мембране везикулы, заполненной Glu. Полный цикл, включающий в себя экзоцитоз Glu, эндоцитоз везикулы, ее пополнение нейромедиатором и закрепление на мембране, называется циклом синаптической везикулы [25].

In vitro показано, что изменение постсинаптического потенциала зависит от [Glu] в везикулах [26]. Пополнение везикулярного Glu происходит через глутамат/глутаминавый (Glu-Gln) цикл, а также путем обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели. Оборот Glu через цикл в квазистационарном состоянии характеризуется скоростью 0.3 мМ/мин, измеренной на длительном промежутке времени (>10 мин) без активации методом ¹³C-МРС [27]. Известны быстрый и медленный путь обратного захвата Glu с временными константами < 1 с и 15 с соответственно [26].

К настоящему времени процесс заполнения везикул *in vivo* на промежутке времени цикла синаптической везикулы при активации еще не исследовался.

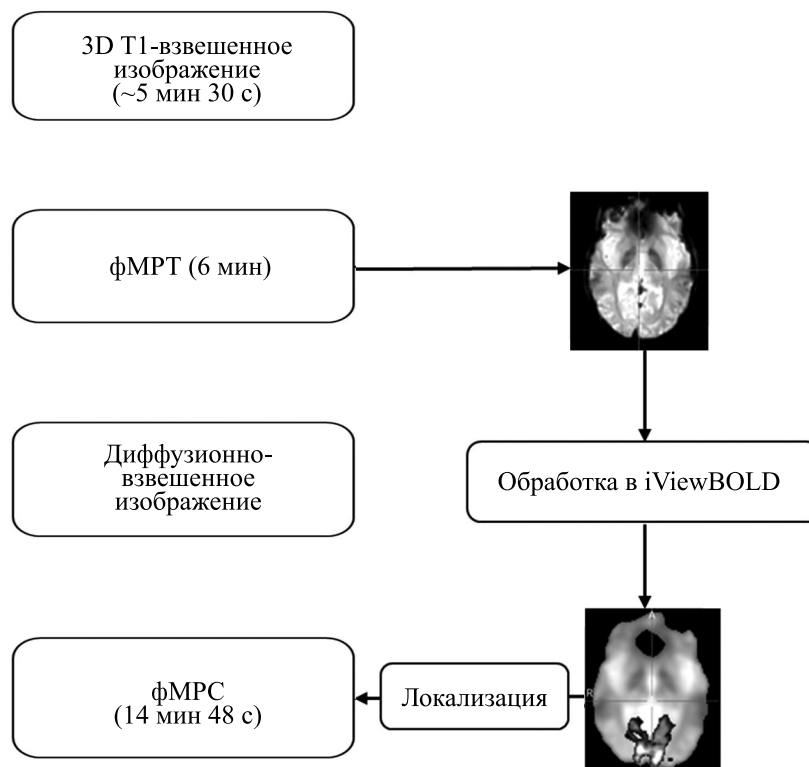


Рис. 1. Протокол исследования. Во время сбора данных DTI фМРТ-изображения обработаны на компьютере и получены карты активации. Локализация спектроскопического вокселя проведена с учетом области активации.

BOLD, как известно, коррелирует с локальными потенциалами поля, которые отражают электрическую активность мозга [28], а Glu является основным возбуждающим нейромедиатором, который непосредственно деполяризует постсинаптические нейроны. Можно предположить, что Glu динамически связан с BOLD. Целью данной работы является измерение [Glu] в динамике BOLD-ответа на короткий стимул на временном интервале, соответствующем везикулярному циклу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Волонтеры. В исследовании участвовало 28 здоровых волонтеров (23.6 ± 2.2 лет, 15 мужчин, 13 женщин). Для каждого волонтера выполнено предварительное диагностическое МРТ (получены T1-, T2- и диффузионно-взвешенные изображения). Заключение об отсутствии патологии головного мозга получали от врача-радиолога.

Протокол исследования. Все данные получены на МРТ-сканере 3T Phillips Achieva dStream (Philips Health Care, Нидерланды) с использованием 20-канальной приемной головной катушки SENSE HeadNeck coil, совместимой с зеркалом. Презентацию стимула и контроль внимания осу-

ществляли при помощи системы InVivo SensaVue, позволяющей точно настраивать временные характеристики применяемого стимула. Стимул предъявляли через монитор, расположенный позади томографа. Изображение передавали волонтеру через систему зеркал, прикрепляемую на катушку.

Получение данных. Сначала получены 3D-T1-взвешенные изображения (5 мин 30 с), затем — изображения, полученные методом функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) (6 мин 0 с). Объем интереса в фМРТ локализовали в затылочной доле по аксиальным проекциям T2*-взвешенных изображений, полученных с помощью градиентного эха. Используются следующие параметры: время повторения/время эха TR/TE = 3000/40 мс, угол отклонения FA = 90°, матрица $128 \times 128 \times 30$, размер вокселя $2.4 \times 2.4 \times 4.0$ мм, количество накоплений — 120, количество срезов — 30. Быстрая обработка фМРТ выполнена для последующего позиционирования вокселя МРС (рис. 1) с использованием программного обеспечения сканера iViewBOLD.

¹H-МР-спектры регистрировали с помощью импульсной последовательности PRESS с использованием автоматического шиммирования

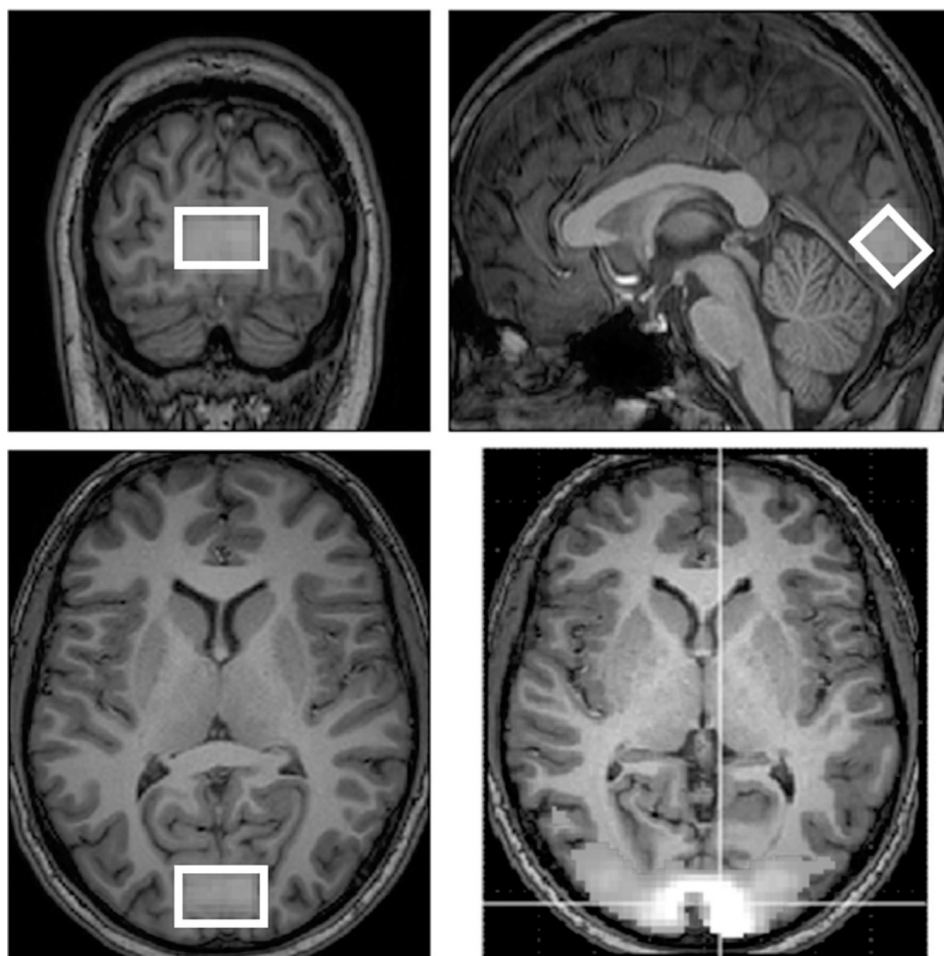


Рис. 2. Усредненная по всем участникам исследования локализация спектроскопического вокселя (прямоугольник белого цвета). Области активации показаны в контрасте. Обе карты изображены на фоне 3D-T1-взвешенного изображения.

второго порядка, которое контролировали по ширине сигнала воды (не более 16 Гц). Параметры регистрации спектров: TR/TE = 2000/35 мс, количество накоплений — 444, размер вокселя — $20 \times 30 \times 20$ мм (рис. 2), FA = 90° , ширина спектра BW = 2000 Гц, подавление воды — MOIST. Общее время исследования составляло 40 мин.

Зрительная стимуляция. Стимуляцию проводили в блоковой парадигме, предъявляемой для получения фМРТ-изображений — 15 раз (6 мин), при исследовании динамики уровней метаболитов — 37 раз (14 мин 48 с). Один блок зрительной стимуляции состоял из трехсекундной демонстрации изображения шахматной доски, мерцающей с частотой 4 Гц, и последующего предъявления темного экрана в течение 21 с (в сумме длительность одного блока равнялась 24 с). Для контроля внимания в процессе предъявления стимула волонтеру давали задание — при каждом пятом появлении стимула нажимать на кнопку

(примерно каждые две минуты). Возникающий при этом звуковой сигнал в аппаратной томографа контролировал оператор. Парадигма зрительной стимуляции показана на рис. 3. Сначала был предъявлен черный экран, после чего показан стимул. За точку отсчета выбрана временная точка за 1 с до начала предъявления стимула (–1 с).

Измерение BOLD-сигнала в вокселе. Карты активации получали путем обработки фМРТ-изображений в пакете SPM12 (SPM, RRID:SCR_007037). Обработка состояла в выравнивании изображений относительно друг друга (для исключения искажений вследствие движения головы волонтера), совмещения с анатомическим 3D-T1-изображением, нормировке на усредненную по времени регистрации интенсивность сигнала каждого вокселя, сведении к единому анатомическому пространству MNI-152 и сглаживании матрицей. Полученные данные подвергали статистическому анализу с примене-

нием GLM (general linear model — общая линейная модель) [29]. Зону, соответствующую спектроскопическому вокселю, фиксировали с помощью маски, созданной в программном пакете Matlab [30]. Маска представляет собой бинарное изображение с тем же разрешением и размерами, что и фМРТ-изображения. Вокселям маски, попадающим в объем спектроскопического вокселя, присваивается интенсивность 1, а всем остальным — 0. Усредняя интенсивности фМРТ сигнала в спектроскопическом вокселе в анализируемой временной точке, получали для каждого испытуемого значение интенсивности BOLD-сигнала, соответствующее времени t , прошедшему после стимула.

Предварительная обработка спектров. Первые 12 накоплений исключали из рассмотрения из-за большей, чем у других накоплений, интенсивности вследствие неполной T_1 -релаксации. Таким образом, спектроскопические данные каждого испытуемого содержали 432 накопления (по 36 накоплений на одну временную точку). Спектральные данные каждого волонтера выравнивали по частоте и фазе в программе FID-A в диапазоне значений $\delta = 1.85\text{--}2.15$ м.д, соответствующем наиболее интенсивному сигналу n -ацетиласпартата (NAA, $\delta = 2.01$ м.д.) в спектре.

Далее спектральные данные каждого испытуемого разделяли в соответствии с временными точками и для каждой временной точки создавали отдельный файл, содержащий 36 накоплений. Общее количество файлов равнялось 216. Кроме того, для оценки стабильности Glx/Cr во время исследования фМРС спектральные данные каждого участника были разделены на три последовательных временных интервала по 4 мин 28 с каждый, усреднены по группе испытуемых. В результате были получены три спектра, характеризующие соответствующие временные отрезки.

Спектральные данные каждого испытуемого усредняли в каждой временной точке и оценивали ширину линии tCr (2.85–3.15 ppm, LW_{tCr}), измеряя ширину на половине высоты, чтобы оценить влияние сужения линий, вызванное BOLD-эффектом, на интенсивность сигналов метаболитов. Измеряли разность между значением LW_{tCr} для каждой временной точки и значением в исходной точке для каждого волонтера. LW_{tCr} измеряли в программе FID-A, модифицированной авторами: использовали аппроксимацию tCr лоренцевой линией, а не прямое измерение ширины сигнала на полувысоте, что позволило исключить искажения базовой линии, вносимые остаточным сигналом макромолекул, который может присутствовать в спектре при относительно коротком TE (35 мс), примененном в настоящем исследовании. Далее ширины спектральных линий корректировали на полученную величину [31].

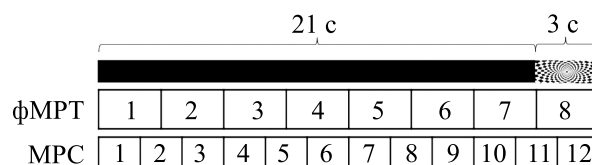


Рис. 3. Парадигма зрительной стимуляции: 3 с — шахматная доска, мерцающая с частотой 4 Гц; 21 с — темный экран; паттерн получения данных (время сбора данных) фМРТ и ^1H -МРС при покое и активации.

Процедуру повторяли до тех пор, пока ширина линии корректируемого спектра отличалась не более чем на 1% относительно спектра, соответствующего исходной временной точке.

Количественная обработка. Спектры обрабатывали в LCModel [32] с набором априорных данных для импульсной последовательности PRESS с TE = 35 мс. Набор априорных данных состоял из 17 метаболитов: аланин, аспартат, креатин (Cr), фосфокреатин, γ -аминомасляная кислота, Glc, Gln, Glu, глицерофосфохолин, фосфохолин, глутатион, миоинозитол, Lac, NAA, N-ацетиласпартат, таурин. Качество аппроксимации оценивали по разности сырого и обработанного спектров (рис. 4).

При нижней границе Крамера–Рао для сигнала Glx более 15% данные исключали из анализа (по этому критерию был исключен один волонтер — Sub.02 (рис. 5). Еще один волонтер был исключен из-за низкого значения отношения сигнал/шум, которое явно наблюдается на «сырых» спектрах по сравнению со спектрами других волонтеров (рис. 5, Sub.24). У одного испытуемого в спектрах наблюдался почти двукратный разброс значений Glx, поэтому его данные также исключили из анализа (рис. 5, Sub.26). Таким образом, для последующей обработки выборка была сокращена до 25 человек (13 мужчин и 12 женщин).

В результате получали значения Glx/Cr, NAA/Cr в каждой временной точке.

Статистический анализ. Распределение всех наборов данных проверяли на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка. Достоверность изменения интенсивности BOLD-сигнала, $[Glx]/[Cr]$, $[NAA]/Cr$, ширины линий NAA, Cr, Cho в динамике после стимула определяли при помощи ANOVA с повторными измерениями (с уровнем значимости $p < 0,05$) и при обнаружении статистически значимых различий какого-либо параметра каждое среднее значение этого параметра во временной точке сравнивали со средним значением на -1 с при помощи двухэтапной линейной процедуры Бенджамини, Кригера и Йекутиели, учитывающей множественные сравне-

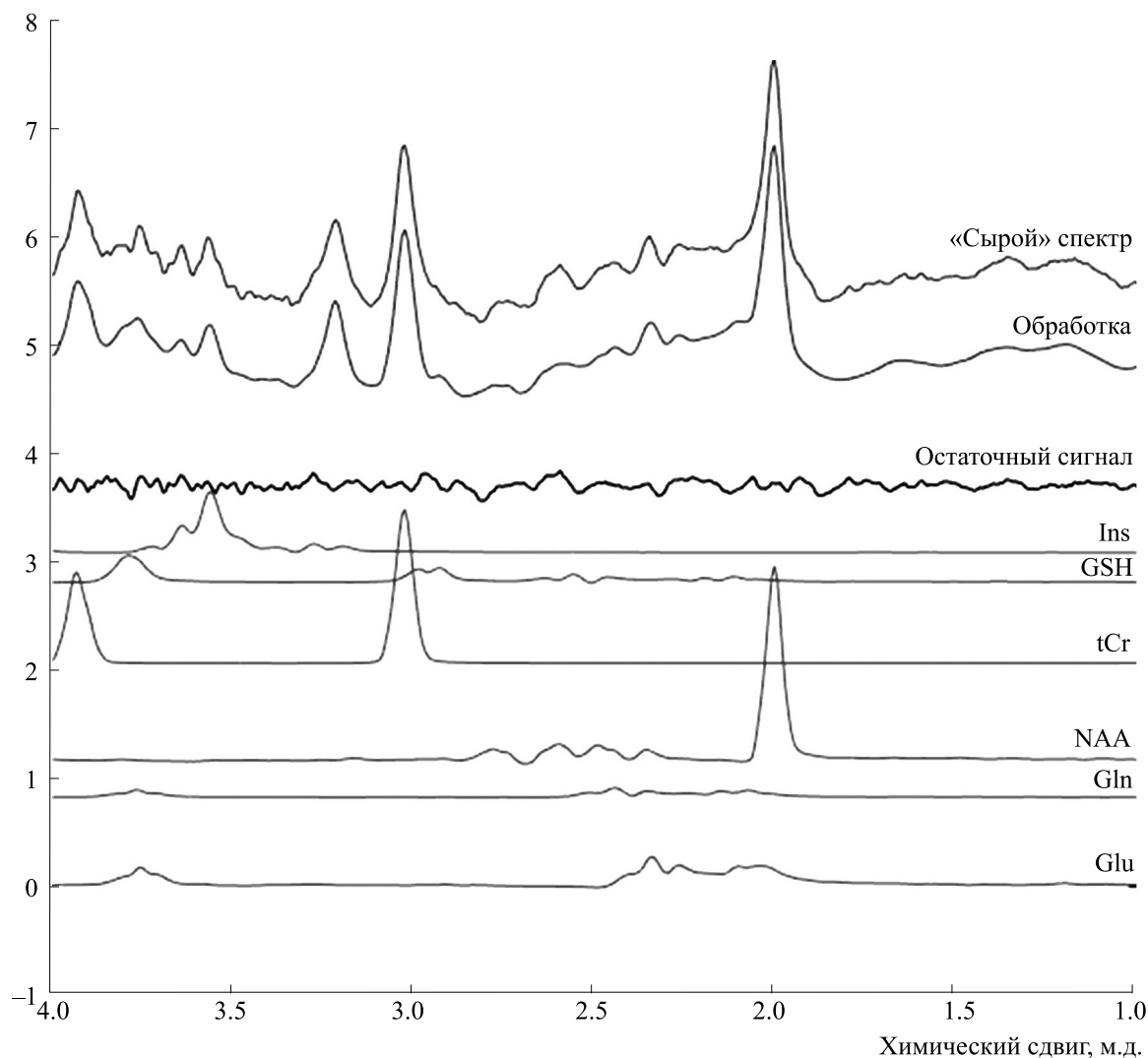


Рис. 4. Аппроксимация спектров с использованием линейной комбинации базисных спектров, выполненная в LCModel, «сырого» (до предварительной обработки) спектра зрительной коры здорового испытуемого. Полученные данные представлены на верхнем спектре, суммарная обработка — на втором сверху спектре, остаточный спектр после аппроксимации — третий сверху. Ниже показаны спектральные вклады каждого элемента в суммарный спектр.

ния. Статистические тесты выполняли в программе GraphPad Prism (GraphPad Prism, RRID:SCR_002798).

Определили коэффициент корреляции между значениями максимума BOLD и разностью $[Glx]/[Cr]$ значений на -1 с и 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активация по данным фМРТ. Анализ фМРТ-изображений при помощи общей линейной модели выявил статистически значимый эффект зрительной стимуляции у всех волонтеров — большой кластер BOLD-активации, включающий в себя первичную и экстрастриарную (в основном V2) зрительные коры билатерально. По-

лученная динамика BOLD-сигнала характеризуется одним пиком с максимумом примерно на 6 с, что соответствует стандартному гемодинамическому ответу [17].

Динамика $[Glx]$ и $[NAA]$ в ответ на короткий стимул. Влияние видеостимуляции на уровень Glu представлено динамикой значений $[Glx]/[Cr]$, нормированных на исходное значение (см. рис. 6). Дисперсионный анализ с повторными измерениями показал статистически значимое отличие ($p = 0.0267$) средних значений $[Glx]/[Cr]$ в группе как минимум в одной из временных точек. Последующий тест двухэтапной линейной повышающей процедуры Бенджамини, Кригера и Йекутиели (контролирующий коэффициент ложного обнаружения) зафиксировал

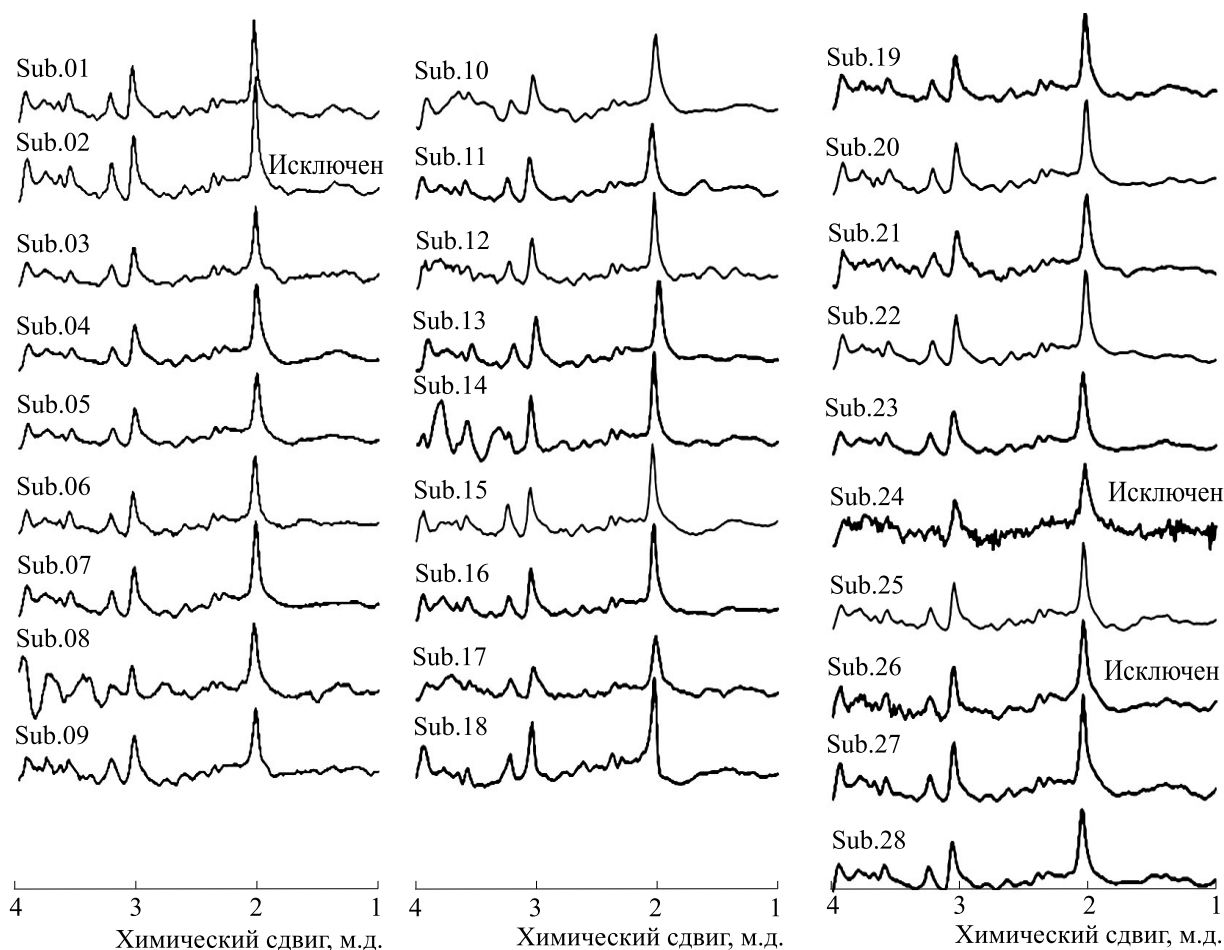


Рис. 5. «Сырые» спектры всех волонтеров, участвовавших в исследовании. Исключенные из обработки спектры волонтеров отмечены надписью «исключен» (причины исключения спектров см. в тексте).

увеличение $[Glx]/[Cr]$ на 1 с ($14 \pm 3\%$, $p = 0.0006$) и 15 с ($10 \pm 3\%$, $p = 0.04$) по сравнению с исходным значением. Статистически значимое увеличение $[Glx]/[Cr]$ соответствует изменению суммарной концентрации $[Glu] + [Gln]$ на 1.7 и 1.2 мМ (на первой и пятнадцатой секунде соответственно), если принять их суммарную концентрацию в зрительной коре мозга человека равной 12 мМ [33].

Анализ временных рядов концентрации других метаболитов не выявил статистически значимых изменений $[NAA]/[Cr]$ и $[Cho]/[Cr]$ (ANOVA: $p = 0.53$ и 0.50 соответственно).

Средние значения $[Glx]/[Cr]$ в начальном, среднем и конечном временных интервалах не изменяются (ANOVA: $p = 0.27$), что свидетельствует о стабильности базового значения $[Glx]/[Cr]$ в течение всего исследования (среднее значение $\pm$ ошибка среднего Glx/Cr в каждый из трех периодов равнялись соответственно 1.97 ± 0.16 , 1.92 ± 0.16 , 1.85 ± 0.14).

ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика $[Glx]/[Cr]$ и скорость везикулярного цикла. Из измерения динамики $[Glx]/[Cr]$ мы обнаружили статистически значимое увеличение этого отношения уже на первой секунде после начала предъявления стимула, указывающее на высокую скорость изменения концентрации Glx (~ 1.7 мМ/с, см. раздел «Результаты»). Предположим, что полученное нами увеличение $[Glx]$ обусловлено синтезом Glu или Gln . Поскольку Gln синтезируется из Glu , можно полагать, что изменение $[Glx]$ происходит через увеличение $[Glu]$. Его синтез непосредственно связан с α -кетоглутаратом, интермедиатом цикла Кребса, поэтому реализация этого пути повышения $[Glx]$ возможна только в том случае, если скорость цикла Кребса превышает скорость нарастания Glx . Суммарная скорость потока веществ в астроцитах и нейронах через цикл Кребса равен ~ 0.8 мМ/мин [27], что на порядок меньше полученной нами оценки скорости увеличения Glx на первой секунде после стимула. Поэтому наблюдаемый на-

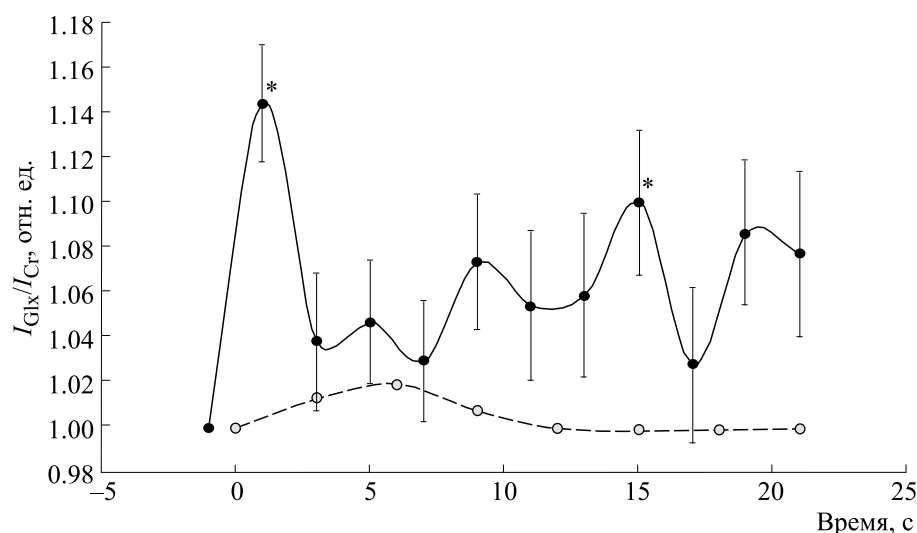


Рис. 6. Зависимость усредненных по группе испытуемых значений отношения интенсивностей Glx/Cr ($\pm$ ошибка среднего, сплошная линия) и BOLD-сигнала (пунктирная линия), нормированные на исходное значение для каждого волонтера; * — $p < 0.05$.

ми рост [Glx] не является следствием его синтеза из интермедиатов цикла Кребса.

Другой причиной увеличения [Glx]/[Cr] может быть перемещение Glu из невидимого везикулярного пула в видимый. Быстрый рост [Glx] в ответ на стимул может быть вызван наличием клеточных компартментов, содержащих малоподвижный и вследствие этого «ЯМР-невидимый» пул Glu. Методом $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -ЯМР на срезах мозга морских свинок такой пул обнаружили авторы работы [23] и предположили, что содержащийся в везикулах Glu имеет низкую подвижность и в спектрах не детектируется. Если принять эту гипотезу, обратимый рост [Glx] на первых секундах после стимула является следствием выброса Glu из везикул в синаптическую щель с последующим его включением в цикл нейромедиаторов и возвращением в везикулы через 15 с посредством Glu-Gln-цикла. В таком случае скорость Glu-Gln-цикла должна составлять 6.8 ± 1.5 мМ/мин, что на порядок больше измеренного с помощью ^{13}C -МРС в состоянии покоя значения (0.32 ± 0.05 мМ/мин) [34].

Показано, что оборот одной молекулы Glu через Glu-Gln-цикл требует затраты одной молекулы глюкозы [35]. Таким образом, при нейроактивации с возрастанием потока Glu через цикл можно ожидать как минимум сопоставимого увеличения потока глюкозы. Увеличение скорости потребления глюкозы, измеренное с помощью ^1H -МРС в мозге в ответ на постоянную зрительную стимуляцию [36], составляет ~ 0.1 мМ/мин; это на порядок меньше скорости, необходимой для увеличения Glx, обнаруженного в нашем ис-

следовании на первой секунде. Следовательно, значительная его доля нейромедиаторного Glu возвращается в нейрон не через Glu-Gln-цикл, а посредством обратного захвата. Возможной причиной снижения подвижности является буферизация Glu [37], процесс, в котором возвращение Glu в клетку сопровождается множественными взаимодействиями с транспортером EAAT. Таким образом, этот пул Glu имеет уменьшенное время релаксации T2, следовательно, интенсивность общего сигнала Glx в этой области уменьшается. Ко времени второго пика [Glx] (15 с после стимула) Glu проникает в клетку и быстро упаковывается в везикулы. Возникает вопрос, может ли Glu, возвращенный в нейроны путем обратного захвата, упаковываться в пузырьки за 15 с, теряя подвижность?

Скорость-лимитирующая стадия подготовки новой везикулы, готовой к экзоцитозу, — это эндоцитоз везикулы для Glu [38]. Характерное время эндоцитоза в зависимости от стимула составляет от ~ 115 мс до 8.3 с [39]. Это означает, что ко времени второго пика [Glx] на пятнадцатой секунде новая везикула уже будет готова к заполнению Glu. Таким образом, можно полагать, что нами впервые обнаружена динамика [Glx], характеризующая процесс выделения Glu из везикул, последующий обратный захват и упаковку в везикулы. Количественно доля высвобождающегося в результате короткой зрительной активации везикулярного Glu относительно доли «видимого» в состоянии покоя Glu составляет 14%.

Несомненно, предположенная интерпретация полученных результатов требует дальнейших доказательств.

Уровни *n*-ацетиласпартата и холинсодержащих соединений. В данном исследовании не наблюдается изменений суммы *n*-ацетиласпартата и *n*-ацетиласпартилглутамата и холинсодержащих соединений, что совпадает с большинством результатов по измерению этого показателя при различных видах стимуляции [7, 8, 22, 40, 41]. Тем не менее, обратимое снижение суммы *n*-ацетиласпартата и *n*-ацетиласпартилглутамата наблюдали в зрительной коре при длительной видеостимуляции [42] и в моторной коре после предъявления единичного моторного стимула [43]. Расхождение в результатах измерения содержания NAA как под влиянием длительной стимуляции, так и в динамике после короткого стимула требует дополнительных исследований и может быть связано с различными условиями экспериментов, разными типами коры, разными видами стимуляции и разной длительностью стимула.

Интенсивность BOLD-сигнала не коррелирует с интенсивностью изменения [Glx]. Корреляционный анализ наших данных не обнаружил достоверной связи между максимальной интенсивностью BOLD-сигнала и максимальной концентрацией Glx. Основной вклад в расширение сосудов, необходимый для возникновения BOLD, вносят производные арахидоновой кислоты, синтез которых активируется в астроцитах глутаматом, транспортирующимся из синаптической щели после высвобождения из везикул [44]. Количественная связь между интенсивностью BOLD-сигнала и [Glx] не доказана. Продемонстрированы одновременные увеличения интенсивности BOLD-сигнала и Glx при периодической видеостимуляции с равными 64 с интервалами покоя и активации [10]. В то же время при предъявлении когнитивной задачи распознавания образов корреляция между амплитудой BOLD-сигнала, моделируемого функцией гемодинамического ответа и изменением [Glx], не выявлена [14].

Взаимосвязь BOLD с нейронной активностью показана нелинейной корреляцией амплитуды изменения BOLD-сигнала с величиной потенциала местного поля (LFP) [45]. Поскольку LFP отражает синаптический входной сигнал, дендритную обработку, подпороговые мембранные колебания [46], изменение LFP связано не только с воздействием возбуждающего нейромедиатора Glu на постсинаптические рецепторы, но и с воздействием тормозного нейромедиатора — ГАМК. Таким образом, BOLD должен быть охарактери-

зован скорее балансом возбуждения и торможения, чем концентрацией одного из нейромедиаторов, в том числе и [Glx].

Ограничения. Полученные выводы о возвращении Glu в везикулы основаны на идее повторной активации значительного количества одной и той же сети нейронов в первичной зрительной коре. Данное предположение строится нами на основании применения одного и того же стимула. Однако изменение положения глаз может приводить к смещению видимого волонтеру изображения и активации других нейронов, что может занижать оценку времени обратного захвата Glu и заполнения везикул.

Кроме этого, в данной работе мы измеряем сумму Glu и Gln, поэтому не можем подтвердить предположение о недостаточной скорости перехода Glu в Gln (через Glu-Gln-цикл).

ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые показано, что после короткого трехсекундного зрительного стимула уровень Glu в возбужденной области мозга имеет два максимума — на первой и пятнадцатой секундах после начала предъявления стимула. Полученный результат может быть следствием высвобождения Glu из везикул, обратного захвата Glu и заполнения везикул.

Интенсивность BOLD-сигнала не коррелирует с изменением [Glx] в периоде после короткого стимула. Регуляция BOLD-эффекта может осуществляться балансом возбуждения и торможения, что может быть предметом дальнейших исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранта № 19-29-10040) и Российского научного фонда (грант № 18-1300030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено комитетом по этике научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии. Участники исследования были проинформированы о деталях исследования и подписали согласие на его проведение. Все процедуры соответ-

ствовали Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Robinson and C. B. Williams, *Clin. Chim. Acta* **12** (3), 311 (1965).
2. P. G. Mullins, H. Chen, J. Xu, et al., *Magn. Reson. Med.* **60** (4), 964 (2008).
3. I. Tkáč and R. Gruetter, *Appl. Magn. Reson.* **29** (1), 139 (2005).
4. M. Garwood and L. DelaBarre, *J. Magn. Reson.* **153** (2), 155 (2001).
5. E. Frias-Martinez et al., in *Proc. 16th Scientific Meeting of Int. Soc. for Magnetic Resonance in Medicine* (Toronto, 2008), p. 691.
6. P. O. Wyss, C. Bianchini, M. Scheidegger, et al., *Magn. Reson. Med.* **80** (2), 452 (2018).
7. P. Bednářík, I. Tkač, F. Giove, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 601 (2015).
8. R. Mekle, S. Kühn, H. Pfeiffer, et al., *NMR Biomed.* **30** (2), (2017).
9. I. Betina Ip, U. E. Emir, A. J. Parker, et al., *J. Neurosci.* **39** (40), 7968 (2019).
10. I. Betina Ip, A. Berrington, A. T. Hess, et al., *Neuroimage* **155**, 113 (2017).
11. N. Lally, P. G. Mullins, M. V. Roberts, et al., *Neuroimage* **85**, 823 (2014).
12. M. Cleve, A. Gussew, and J. R. Reichenbach, *Neuroimage* **105**, 67 (2015).
13. A. Gussew, R. Rzanny, M. Erdtel, et al., *Neuroimage* **49** (2), 1895 (2010).
14. D. Apšvalka, A. Gadie, M. Clemence, and P. G. Mullins, *Neuroimage* **118**, 292 (2015).
15. K. Kurcys, E. Annac, N. M. Hanning, et al., *J. Neurosci.* **38** (46), 9967 (2018).
16. N. Lally, P. G. Mullins, M. V. Roberts, et al., *Neuroimage* **85**, 823 (2014).
17. S. A. Huettel, A. W. Song, and G. McCarthy, *Funct. Magn. Reson. Imaging*, 3rd ed. (Oxford University Press, 2014).
18. A. Schousboe, S. Scafidi, L. K. Bak, et al., in *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain* (Springer, Cham, 2014), pp. 13–30.
19. L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, *J. Neurochem.* **98** (3), 641 (2006).
20. S. Mangia, F. Giove, and M. DiNuzzo, *Neurochem. Res.* **37** (11), 2554 (2012).
21. M. C. McKenna, *J. Neurosci. Res.* **85** (15), 3347 (2007).
22. S. Mangia, I. Tkáč, R. Gruetter, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27** (5), 1055 (2007).
23. R. A. Kauppinen, T. R. M. Pirttilä, S. O. K. Auriola, and S. R. Williams, *Biochem. J.* **298** (1), 121 (1994).
24. P. G. Mullins, *Scand. J. Psychol.* **59** (1), 91 (2018).
25. T. C. Südhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 509 (2004).
26. T. Hori and T. Takahashi, *Neuron* **76** (3), 511 (2012).
27. D. L. Rothman, H. M. de Feyter, R. A. de Graaf, et al., *NMR Biomed.* **24** (8), 943 (2011).
28. D. J. Heeger and D. Ress, *Nat. Rev. Neurosci.* **3** (2), 142 (2002).
29. J. M. Chambers, in *Statistical Models in S*, Ed. by J. M. Chambers & T. J. Hastie (Chapman & Hall, Boca Raton, FL, 1992), pp. 95–144.
30. P. E. Menshchikov, N. A. Semenova, T. A. Akhadov, et al., *Biophysics* **62** (6), 1009 (2017).
31. J. Near, R. Edden, C. J. Evans, et al., *Magn. Reson. Med.* **73** (1), 44 (2015).
32. S. W. Provencher, *Magn. Reson. Med.*, **30** (6), 672 (1993).
33. M. Z. Goryawala, S. Sheriff, and A. A. Maudsley, *NMR Biomed.*, **29** (8), 1108 (2016).
34. J. Shen, K. F. Petersen, K. L. Behar, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (14), 8235 (1999).
35. L. Hertz and Y. Chen, *Front. Integr. Neurosci.* **11**, 18 (2017).
36. W. Chen, E. J. Novotny, X. H. Zhu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (21), 9896 (1993).
37. A. V. Tzingounis and J. I. Wadiche, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8** (12), 935 (2007).
38. S. P. Gandhi and C. F. Stevens, *Nature* **423** (6940), 607 (2003).
39. J. Y. Sun, X. S. Wu, and L. G. Wu, *Nature* **417** (6888), 555 (2002).
40. B. Schaller, R. Mekle, L. Xin, et al., *J. Neurosci. Res.* **91** (8), 1076 (2013).
41. Y. Boillat, L. Xin, W. van der Zwaag, and R. Gruetter, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **40** (3), 488 (2020).
42. M. H. Baslow, J. Hrabec, and D. N. Guilfoyle, *J. Mol. Neurosci.* **32** (3), 235 (2007).
43. A. V. Manzhurtsev, N. A. Semenova, M. V. Ublinskii, et al., *Russ. Chem. Bull.* **65** (6), 1630 (2016).
44. D. Attwell, A. M. Buchan, S. Charpak, et al., *Nature* **468** (7321), 232 (2010).
45. X. Zhang, W. J. Pan, and S. Keilholz, *Front. Neurosci.* **13**, 1126 (2019).
46. G. Buzsáki, C. A. Anastassiou, and C. Koch, *Nat. Rev. Neurosci.* **13** (6), 407 (2012).

Study of the Total Glutamate plus Glutamine Concentrations in the Human Visual Cortex Activated Areas Detected by Functional Magnetic Resonance Imaging upon Short Visual Stimulation

A. Yakovlev*, **, ***, A. Manzhurtsev*, ***, ****, P. Menshchikov**, *****, M. Ublinskiy*, ***, I. Melnikov*, D. Kupriyanov*****, T. Akhadov*, ****, and N. Semenova*, **, ***, ****

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

***Semenov Federal Research Center for 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*

*****Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/1, Moscow, 119991 Russia*

******LLC Philips Healthcare, ul. Sergeya Makeeva 13, Moscow, 123022 Russia*

Functional magnetic resonance spectroscopy at 3 T with a time resolution of 2 s was used to study the dynamics of the total glutamate plus glutamine concentrations in the human occipital cortex during BOLD response upon short visual stimulation (3 s). It was found that when 25 volunteers were shown the view of chessboard at the flickering frequency of 4 Hz, an increase in the levels of glutamate and glutamine at 1 s and 15 s upon stimulation was statistically significant. No correlation between the maximum BOLD response amplitude and maximum glutamate and glutamine levels was found. Changes in the total glutamate plus glutamine concentrations in time upon stimulation do not correspond to the rate of the glutamine-glutamate turnover cycle, but are consistent with the temporal characteristics of the vesicular cycle: the release of glutamate from the vesicles and its reuptake. Thus, it can be assumed that the observed dynamics of glutamate and glutamine is caused by a change in glutamate mobility upon release from vesicles and reverse packing but not metabolic transformations in the cycle of neurotransmitters.

Keywords: ^1H -MRS, glutamate, PRESS, visual activation, short stimulus