

15. Yamamoto J., Takahashi M., Idei M., Nakano Y., Soejima Y., Akiba D., Kitagawa T., Ueta K., Miyaoka R., Nishizawa S. Clinical features and surgical management of intracranial meningiomas in the elderly. *Oncol Lett.* 2017. 14 (1). P. 909-917.

16. Тиглиев Г.С., Олюшин В.Е., Кондратьев А.Н. Внутрочерепные менингиомы. СПб.: Изд-во РНХИ им. проф. А.И. Поленова, 2001. 560 с.

Tigliev G.S., Olyushin V.E., Kondrat'ev A.N. Vnutricherepny'e meningiomy. SPb.: Izd-vo RNXI im. prof. A.I. Polenova, 2001. 560 s.

17. Buhmer A.E., Oses J.P., Schmidt A.P., Peryn C.S., Krebs C.L., Oppitz P.P., D'Avila T.T., Souza D.O., Portela L.V., Stefani M.A. Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2011. № 6 (68). P. 1624-1630. doi: 10.1227/NEU.0b013e318214a81f.

18. Gradisek P., Osredkar J., Korsic M., Kremzar B. Multiple indicators model of long-term mortality in traumatic brain injury. *Brain Injury.* 2012. № 26 (12). P. 1472-1481. doi: 10.3109/02699052.2012.694567.

19. Гришанова Т.Г., Вавин Г.В., Григорьев Е.В., Будаев А.В., Евтушенко А.Я. Особенности изменений концентрации нейронспецифических белков у пострадавших с тяжелыми травмами. Медицина в Кузбассе. 2011. № 4 (10). С. 21-26.

Grishanova T.G., Vavin G.V., Grigor'ev E.V., Budaev A.V., Evtushenko A.YA. Osobennosti izmenenij koncentraczii nejronecificheskix belkov u posttradavshix s tyazhely'mi travmami. Mediczina v Kuzbasse. 2011. № 4 (10). S. 21-26.

20. González-García S., González-Quevedo A., Fernández-Concepción O., Peña-Sánchez M., Menéndez-Saínz C., Hernández-Díaz Z., Artech-Prior M., Pando-Cabrera A., Fernández-Navales C. Short-term prognostic value of serum neuron specific enolase and S100B in acute stroke patients. *Clinical Biochemistry.* 2012. №45. P. 1302-1307. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.07.094.

21. Singh H.V., Pandey A., Shrivastava A.K., Raizada A., Singh S.K., Singh N. Prognostic value of neuron specific enolase and IL-10 in ischemic stroke and its correlation with degree of neurological deficit. *Clinica Chimica Acta.* 2013. № 419. P. 136-8.

22. Zaheer S., Beg M., Rizvi I., Islam N., Ullah E., Akhtar N. Correlation between serum neuron specific enolase and functional neurological outcome in patients of acute ischemic stroke. *Annals of Indian Academy of Neurology.* 2013. № 16. P. 504-508. doi: 10.4103/0972-2327.120442.



УДК: 616.831-005-073

Код специальности ВАК: 03.03.01; 14.01.11

О МЕХАНИЗМАХ МОДУЛЯЦИИ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА ПРИ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

О. А. Брагина^{1,3}, О. В. Семячкина-Глушкова¹, А. О. Трофимов², Д. Е. Брагин^{1,3},

¹ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского»,

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», г. Н. Новгород,

³University of New Mexico School of Medicine, Albuquerque, USA

Брагина Ольга Анатольевна – e-mail: obragina@salud.unm.edu

Дата поступления
02.08.2018

Транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) – перспективный метод, предложенный для терапии черепно-мозговой травмы (ЧМТ), внедрению которого препятствует недостаток понимания механизмов действия вследствие ограниченного числа доклинических исследований. **Цель работы:** изучение механизмов физиологических изменений церебральной микроциркуляции и метаболизма головного мозга мыши при воздействии анодной tDCS. **Материалы и методы.** Метод контролируемого коркового повреждения головного мозга (CCI) мыши использовался как модель ЧМТ. При помощи in vivo двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии было исследовано влияние tDCS на тонус артериол, микрососудистый кровоток и метаболизм митохондрий в интактном и травмированном мозге мыши. Фармакологическое ингибирование эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) при помощи N-(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитина (L-NIO) использовалось для определения роли NO в tDCS-индуцированной дилатации церебральных артериол. **Результаты.** Анодная tDCS вызывала пролонгированную дилатацию церебральных артериол посредством активации eNOS. Дилатация артериол увеличивала объемный кровоток, что вело к усилению капиллярного кровотока и улучшению метаболизма митохондрий вследствие улучшения доставки кислорода к тканям травмированного мозга мыши (p<0.05).

Ключевые слова: транскраниальная стимуляция постоянным током, вазодилатация, церебральный кровоток, черепно-мозговая травма, эндотелиальная синтаза оксида азота.

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a promising treatment modality proposed for the therapy of traumatic brain injury (TBI). However, poor understanding of the mechanisms of tDCS due to lack of preclinical studies impedes its clinical implementation. **Purpose of the study.** To study the mechanisms of tDCS-induced physiological changes in cerebral microcirculation and brain metabolism. **Materials and methods.** The controlled cortical impact (CCI) was used as a model of TBI in mice. tDCS-induced changes in arteriolar tonus, microvascular blood flow, and mitochondrial metabolism in the intact and injured mouse brain were studied using in vivo two-photon laser scanning microscopy. Pharmacological inhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by N-(5)-(1-imiноethyl)-L-ornithine (L-NIO) was used to determine the role of NO in tDCS-induced dilatation of cerebral arterioles. **Results.** Anodal tDCS induced a prolonged dilatation of cerebral arterioles via eNOS activation. Dilatation of arterioles increased the blood volume flow rate leading to increase in capillary blood flow and improved mitochondrial metabolism due to improved oxygen delivery to the cortex of the injured brain (p <0.05).

Key words: transcranial direct current stimulation, vasodilation, cerebral blood flow, traumatic brain injury, endothelial nitric oxide synthase.

Введение

Транскраниальная стимуляция низкоамперным постоянным током (tDCS) через электроды, расположенные на коже головы [1], является перспективным методом терапии последствий черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [2], внедрению которого препятствует недостаток понимания механизмов действия вследствие ограниченного числа доклинических исследований. В недавних исследованиях на пациентах, перенёсших ЧМТ [3], и модели ЧМТ у мышей [4] мы показали, что анодная tDCS вызывает дилатацию церебральных артериол, увеличение мозгового кровотока и улучшение неврологических функций. Однако механизмы и динамика увеличения кровотока остались не изучены, что обуславливает актуальность данной работы. Мы предположили, что дилатация церебральных артериол после анодной tDCS происходит за счет повышения синтеза оксида азота (NO) вследствие активации эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). В этой работе, используя модель ЧМТ мышей, мы изучили роль eNOS в tDCS-индуцированной дилатации артериол методом фармакологического ингибирования.

Цель исследования: изучение механизмов и динамики физиологических изменений церебральной микроциркуляции и метаболизма головного мозга мыши при воздействии анодной tDCS.

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных [5] на 40 мышах-самцах весом 27 ± 3 г (С6В57). Хирургические процедуры, tDCS и ДФЛСМ проводились под ингаляционным наркозом (2% изофлуран в смеси газов, состоящей из 70% закиси азота и 30% кислорода). В качестве экспериментальной модели ЧМТ использовалось контролируемое корковое повреждение головного мозга (CCI), которое наносилось при помощи стереотаксического импактора Benchmark (Leica, Германия) с использованием наконечника диаметром 3 мм, падающего со скоростью 5 м/сек и глубиной 2 мм от поверхности коры через краниотомию, как описано в нашей предыдущей работе [4]. Ложнооперированные (интактные) мыши подвергались только краниотомии. Для анодной tDCS (0,1 мА/15 мин) или ложной стимуляции (0 мА/15 мин) использовался стимулятор DCS 2100 (Soterix Medical, США). Анодный электрод диаметром 5 мм размещался на коже непосредственно над краниотомией, катодный электрод – на грудной клетке.

Двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (ДФЛСМ). Физиологические параметры визуализировались при помощи системы ДФЛСМ Prairie View Ultima (Prairie View, США) до, во время и в течение 3,5 часа после tDCS. Для исследования микроциркуляции 5% раствор тетраметилпродамин-изотиоцианат-декстрана (TAMRA, 500 кДа) в физиологическом растворе вводился через хвостовую вену до достижения конечной концентрации в крови 150 мкМ/л. Флюоресценция визуализировалась при помощи 20-кратного водно-иммерсионного объектива LUMPlan FL/IR 20X/0.5W (Olympus, Япония), отфильтровывалась оптическими фильтрами с пропусканием 570–600 нм для TAMRA и 425–475 нм для никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н) и регистрировалась про-

граммой Prairie View. Скорость потока эритроцитов и диаметр измерялись в микрососудах диаметром от 3 до 50 мкм на глубину до 300 мкм от поверхности теменной коры, как мы писали ранее (рис. 1а) [4]. Объем крови, протекающей через поперечное сечение артериолы (кровоток), рассчитывали следующим образом: профиль кровотока был представлен в виде суммы трёхмерного параболоида вращения и цилиндра. Тканевую гипоксию оценивали путем измерения аутофлюоресценции НАД-Н, отражающего активность митохондрий. Данные анализировались при помощи пакета ImageJ (NIH, США).

Фармакологическое ингибирование eNOS N-(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитином (L-NIO) использовалось для определения роли NO в tDCS-индуцированной дилатации церебральных артериол. L-NIO (10 мг/кг в физиологическом растворе) вводили внутривенно, в контрольной группе делались инъекции физиологического раствора (10 мышей в каждой группе). Физиологические переменные измерялись при помощи ДФЛСМ до инъекции, через тридцать минут после инъекции с последующим tDCS и в течение трёх часов после tDCS.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью пакета программ MS Office и GraphPad Prism с использованием t-теста Стьюдента или теста Колмогорова–Смирнова, межгрупповые различия определялись с помощью двухстороннего ANOVA. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего, уровень достоверности – $p < 0,05$.

Результаты исследования

1. Микрососудистый кровоток и метаболизм мозга мыши после анодной tDCS.

In vivo ДФЛСМ показала, что ЧМТ вызывала нарушение кровотока в периконтузионной зоне коры головного мозга мыши. У интактных животных диаметр церебральных артериол, измеренных в объёме $500 \times 500 \times 300$ мкм, составил $37,4 \pm 2,5$ мкм, у травмированных – $31,5 \pm 2,2$ мкм, $p < 0,05$. Анодная tDCS вызывала долговременную дилатацию с максимумом $42,2 \pm 2,4$ мкм у интактных и $35,6 \pm 2,2$ мкм у травмированных мышей, $p < 0,001$ (рис. 1б). Объёмный кровоток через артериолы у интактных животных составлял $2,1 \pm 0,2$ мкл/мин, а у травмированных $1,4 \pm 0,2$ мкл/мин, $p < 0,01$. Анодная tDCS усиливала объёмный кровоток с максимумами $3,2 \pm 0,3$ и $1,9 \pm 0,2$ мкл/мин у интактных и травмированных животных соответственно, $p < 0,001$ (рис. 1в). Скорость эритроцитов в капиллярах мозга интактных мышей составила $1,18 \pm 0,143$ мм/с, в периконтузионной зоне травмированных – $0,36 \pm 0,143$ мм/с, $p < 0,001$. После анодной tDCS эти показатели увеличились до $1,38 \pm 0,188$ мм/с ($p < 0,05$) в группе интактных и до $0,75 \pm 0,18$ мм/с ($p < 0,01$) в группе животных с ЧМТ (рис. 1г).

In vivo ДФЛСМ аутофлюоресценции восстановленного НАД-Н использовалось для выявления влияния tDCS-индуцированного увеличения капиллярного кровотока на метаболизм и оксигенацию ткани мозга. Кофермент НАД-Н является донором электронов в окислительном фосфорилировании митохондрий и его окислительно-восстановительное состояние отражает митохондриальную активность, которая зависит от насыщения тканей кислородом. Восстановленный НАД-Н является флюоресцентным,

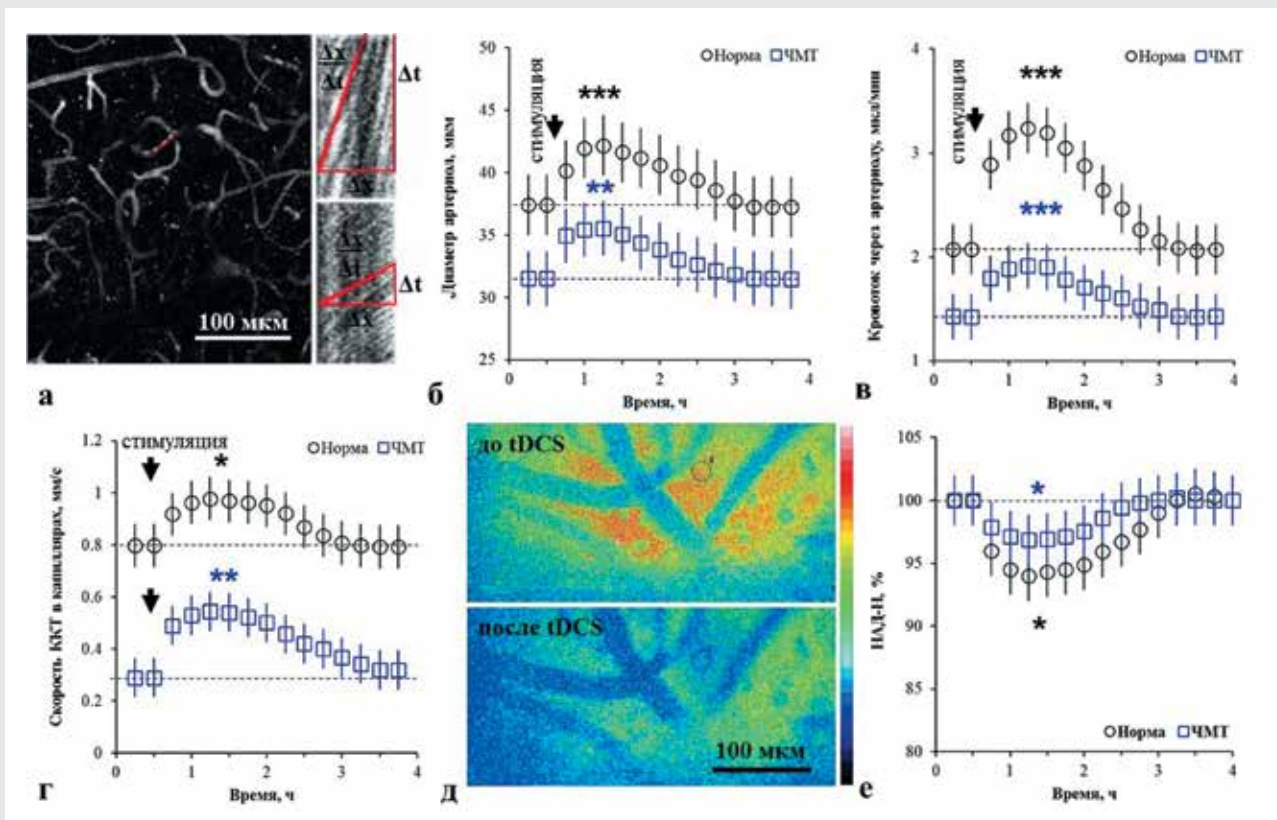


РИС. 1.

(а) Микрофотография региона, в котором измерялась скорость эритроцитов в микросудах (проекция максимальной интенсивности пяти изображений, снятых с шагом 10 мкм) (справа), данные линейного сканирования скорости эритроцитов в помеченном красным капилляре, показывающие базовую скорость (вверху) и ее увеличение после стимуляции (внизу). Наклон полос обратно пропорционален скорости эритроцитов; (б) Анодная tDCS вызывает дилатацию артериол и (в) усиливает объемный кровоток через артериолы; (г) Автофлуоресценция НАДФ-Н в коре головного мозга мыши до и после стимуляции. Темно-синий цвет шкалы – минимальная концентрация НАДФ-Н, красной – максимальная; (е) Динамика НАДФ-Н, показывающая повышение оксигенации ткани после стимуляции, согласно снижению уровня НАДФ-Н (% от базового уровня). N=10 в каждой группе, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с базовыми значениями.

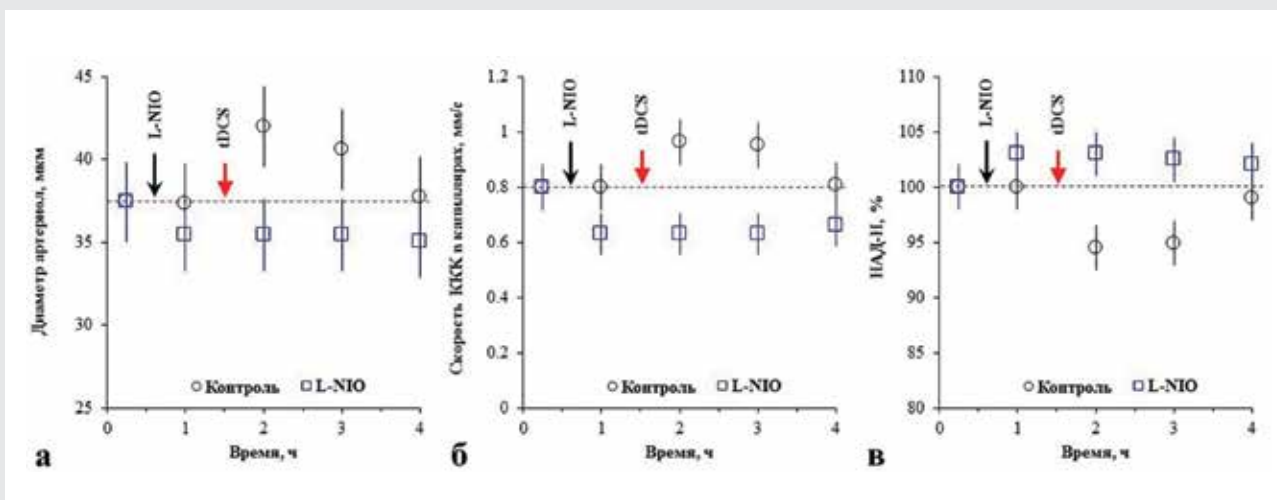


РИС. 2.

(а) Ингибирование eNOS предотвращает дилатацию артериол после tDCS, в контроле артериолы расширяются; (б) Ингибирование eNOS предотвращает увеличение скорости эритроцитов в капиллярах после tDCS, в контроле скорость увеличивается; (в) Ингибирование eNOS предотвращает снижение аутофлуоресценции НАДФ-Н после tDCS, в контроле аутофлуоресценция НАДФ-Н снижается, что является показателем увеличения оксигенации. Красная пунктирная линия – базовый уровень. N=10 в каждой группе.

в то время как окисленный НАД⁺ нет, поэтому флуоресценция НАД-Н является чувствительным индикатором насыщения клеток кислородом и может использоваться для оценки оксигенации ткани/уровня гипоксии, где увеличение НАД-Н вследствие накопления отражает относительное снижение митохондриального окислительного фосфорилирования и, соответственно, оксигенации [6].

Анодная стимуляция вызывала снижение аутофлуоресценции НАД-Н в обеих группах – 94,1±2,4% и 96,8±2,3% по сравнению с исходным уровнем, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ в интактных и ЧМТ соответственно (рис. 1 д, е). Таким образом, увеличение микроциркуляции увеличивало насыщение ткани кислородом. Разница изменений между интактными и травмированными мышцами могла быть связана со сниженным метаболизмом и нарушенным кровообращением, вследствие перенесённой травмы.

Все вышеперечисленные параметры возвращались к первоначальным значениям через 2–2,5 часа после tDCS (рис. 1 б, в).

2. Роль оксида азота в дилатации артериол, вызванной анодной tDCS.

Ингибирование eNOS предотвращало tDCS-индуцированную дилатацию артериол, увеличение скорости эритроцитов и насыщение ткани кислородом (рис. 2 а–в). Полученные данные показывают влияние анодной tDCS на церебральную микроциркуляцию и оксигенацию модулируются оксидом азота, который синтезируется при участии эндотелиальной NOS. В контрольной группе, как и в наших предыдущих исследованиях, tDCS вызывала дилатацию артериол, увеличение микроциркуляции и оксигенации ткани.

Обсуждение

Таким образом, механизмом tDCS-индуцированной дилатации церебральных артериол является активация eNOS, которая увеличивает синтез NO, хорошо известного дилатирующего агента [7]. Дилатация, в свою очередь, ведёт к увеличению объёмного кровотока в артериолах и капиллярах, что улучшает доставку кислорода к тканям мозга и активность митохондрий.

Следует отметить, что в травмированном мозге, усиление кровотока и оксигенации ткани происходило от околоишемических и гипоксических значений, а артериолы были изначально в большем тонусе, вероятно, вследствие развития элементов вазоспазма, что соотносится с литературными данными [8]. Так как статус мозгового кровотока коррелирует с неврологическим исходом [9], улучшение микроциркуляции может быть одним из основных терапевтических механизмов tDCS.

Изучение механизмов активации eNOS осталось за рамками данного исследования, хотя мы предположили несколько возможных механизмов: 1) tDCS-индуцированная активация нейронов [1] может активировать eNOS вследствие нейроваскулярного сопряжения; 2) tDCS-индуцированная активация астроцитов, показанная в недавних работах, может влиять на метапластичность нейронов и активировать eNOS [10]; 3) tDCS может вызывать увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ в клетках эндотелия сосудов, который образует Ca-кальмодулиновый комплекс и активирует eNOS; [11]; 4) tDCS может повышать напряжение сдвига кровотока в артери-

олах, или через влияние тока на свойства протекающей крови, или в результате воздействия тока непосредственно на мембрану эндотелиальных клеток, в этом случае происходит фосфорилирование Ser1177 участка eNOS по механизму PI3K/Akt [12].

Следовательно, активация eNOS после tDCS может происходить как в результате непосредственного воздействия тока на эндотелий сосудов, так и опосредованно через нейроваскулярное сопряжение вследствие активации нейронов или астроцитов, что будет выяснено в нашей дальнейшей работе.

Выводы

1. Анодная tDCS вызывает пролонгированную дилатацию церебральных артериол и увеличение объёмного кровотока через артериолы, ведущую к усилению капиллярного кровотока и улучшению метаболизма митохондрий вследствие улучшения доставки кислорода к тканям в интактном и травмированном мозге мыши.

2. Механизмом tDCS-индуцированной дилатации церебральных артериол является активация eNOS и увеличение синтеза NO.

Благодарности. Работа поддержана Российским научным фондом – № 17-75-20069 и NIH-NIGMS P20GM109089.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nitsche M., Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 2000. Vol. 527. № 3. P. 633-639.
2. Dhaliwal S., Meek B., Modirrousta M. Non-Invasive Brain Stimulation for the Treatment of Symptoms Following Traumatic Brain Injury. *Front Psychiatry.* 2015. Vol. 2. № 6. P. 1-13.
3. Trofimov A., Kalentiev G., Karelsky M., Ksenofontova C., Ruzavina A., Yuriev M., Bragin E. Cerebral Hemodynamics After Transcranial Direct Current Stimulation in Patients with Consequences of Traumatic Brain Injury. *Adv Exp Med Biol.* 2018. Vol. 1072. Chapt. 10.
4. Bragina O., Lara D., Nemoto E., Shuttleworth C., Semyachkina-Glushkovskaya O., Bragin D. Increases in Microvascular Perfusion and Tissue Oxygenation via Vasodilation After Anodal Transcranial Direct Current Stimulation in the Healthy and Traumatized Mouse Brain. *Adv Exp Med Biol.* 2018. Vol. 1072. Chapt. 5.
5. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington. The National Academies Press. 2011.
6. Chance B., Oshino N., Sugano T., Mayevsk. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. *Adv Exp Med Biol.* 1973. Vol. 37. P. 277-292.
7. Ignarro L. Nitric oxide: Biology and Pathobiology. Academic Press. 2009. P. 139-154.
8. Bramlett H, Dietrich W. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J Neurotrauma.* 2015. Vol. 32. № 23. P. 1834-1848.
9. Overgaard J., Tweed W. Cerebral circulation after head injury. *J Neurosurg.* 1974. Vol. 41. P. 531-541.
10. Monai H., M. Ohkura M., Tanaka, Y., Hirase H. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation induced plasticity in mouse brain *Nat Commun.* 2016. Vol. 7. P. 1-10.
11. Zhu J., Song W., Li L., Fan X. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. *Mol Brain.* 2016. Vol. 9. P. 1-8.
12. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999. Vol. 399. №6736. P. 601-605.