

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Саратовский национальный исследовательский  
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

*На правах рукописи*



**БРАГИНА ОЛЬГА АНАТОЛЬЕВНА**

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТРАНСРАНИАЛЬНОЙ  
СТИМУЛЯЦИИ ПОСТОЯННЫМ ТОКОМ НА ЦЕРЕБРАЛЬНЫЙ  
КРОВОТОК И МЕТАБОЛИЗМ МОЗГА МЫШИ  
В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна

Саратов 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1 Общие механизмы действия транскраниальной стимуляции постоянным током .....	14
1.2 Особенности церебрального кровообращения .....	19
1.3 Оксид азота, как модулятор сосудистого тонуса и микроциркуляции .....	29
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	36
2.1 Объект исследования .....	36
2.2 Общий дизайн исследования .....	36
2.3 Методы исследования .....	37
2.3.1 Анодная транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) .....	37
2.3.2 Контролируемое корковое повреждение головного мозга (CCI) .....	38
2.3.3 Лазерная спекл-визуализация .....	40
2.3.4 Двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (ДФЛСМ) .....	41
2.3.5 Магнитно-резонансная томография (МРТ) .....	43
2.3.6 Исследование моторных и когнитивных функций .....	44
2.4 Методы статистической обработки результатов .....	45
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	47
3.1 Влияние анодной tDCS на церебральный кровоток .....	47
3.1.1 Изменения регионального церебрального кровотока после tDCS .....	47
3.1.2 Изменения капиллярного церебрального кровотока после tDCS .....	49
3.1.3 Влияние tDCS на тонус и кровоток церебральных артериол .....	53
3.1.4 Изменения глобального церебрального кровотока после tDCS .....	57
3.2 Влияние анодной tDCS на насыщение тканей мозга кислородом и метаболизм митохондрий .....	61

3.3	Роль оксида азота в дилатации артериол, вызванной анодной tDCS .....	64
3.4.	Влияние анодной tDCS на реактивность сосудов и церебральную ауторегуляцию.....	66
3.5	Влияния курса tDCS на когнитивные и моторные неврологические функции у мышей.....	69
3.5.1	Сенсорно-моторная координация и выносливость .....	70
3.5.2	Пространственная рабочая память.....	72
3.5.3	Способность к обучению и функциональная память.....	75
3.5.4	Уровень тревожности.....	77
3.5.5	Кратковременная когнитивная память .....	80
3.6	Влияние анодной tDCS на гематоэнцефалический барьер .....	83
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....		86
ВЫВОДЫ .....		95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		97

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

**ДФЛСМ** – двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия

**ИГ** – интракраниальные геморрагии

**ИКС** – инфракрасная спектроскопия

**ККК** – красные клетки крови

**ЛСВ** – лазерная спекл-визуализация

**МРТ** – магнитно-резонансная томография

**НАД-Н** – Никотинамидадениндинуклеотид

**ЦК** – церебральный кровоток

**ЦНС** – центральная нервная система

**ЧМТ** – черепно-мозговая травма

**УРПИ** – методика Условного Рефлекса Пассивного Избегания

**ASL** – артериальная маркировка спина

**CCI** – Контролируемое корковое повреждение головного мозга (от controlled cortical impact)

**eNOS** – эндотелиальная синтаза оксида азота

**L-NIO** – N-(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитин (N(5)-(1-Iminoethyl)-L-ornithine)

**mNOS** – макрофагальная синтаза оксида азота

**НИИ** – Национальный Институт Здоровья (США)

**НИИ-NIGMS** – Национальный Институт Здоровья – Национальный Институт Общих Медицинских Наук

**NO** – оксид азота

**nNOS** – нейрональная синтаза оксида азота

**NOS** – синтаза оксида азота

**TAMRA** – тетраметилпродамин-изотиоцианат-декстран

**tDCS** – транскраниальная стимуляция постоянным током (transcranial direct current stimulation)

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в мире происходит бурный рост разнообразных неинвазивных методов стимуляции головного мозга, применяемых для модуляции эмоционального состояния, нормализации сна, улучшения памяти и обучаемости, картирования мозга, а также лечения различных неврологических патологий (Peterchev et al., 2012). Данные методы, объединяемые общим термином электроцевтика, используют такие виды физических воздействий, как магнитные и электромагнитные поля и постоянный или переменный электрический ток (Famm et al., 2013).

Один из таких методов, использующий стимуляцию постоянным низкоамперным электрическим током через электроды, расположенные на коже головы, получил название транскраниальной стимуляции постоянным током (tDCS, от transcranial direct current stimulation (Nitsche et al., 2000)). Интерес к этому методу в последние годы растет с экспоненциальной прогрессией. Если посмотреть статистику публикаций в PubMed, то за последние два десятилетия XX века опубликовано 48 работ, за первое десятилетие XXI уже 420, а только за один 2016 год опубликовано 699 статей. Однако из более чем 2800 опубликованных работ, только около 100 исследований было проведено на животных, к тому же, основной фокус исследований направлен на психологические и психиатрические эффекты, но не на физиологические механизмы стимуляции. Таким образом, количество фундаментальных исследований физиологических эффектов tDCS достаточно ограничено.

Несмотря на то, что эффекты непосредственной стимуляции тканей головного мозга электрическим током достаточно хорошо изучены (Perlmutter et al., 2006; Borchers et al., 2011; Clayton et al., 2016), при транскраниальной стимуляции, где электроды не касаются поверхности мозга или не погружены в него (т.е. ток проходит через кожу, мягкие ткани головы и череп), механизмы

воздействия могут существенно отличаться (Jackson et al., 2016). Принято считать, что основной клеточной мишенью tDCS являются нейроны, а механизмом действия является сдвиг порога раздражения мембраны нейрона в ту или иную сторону, в зависимости от полярности электрического тока (Nitsche et al., 2000; Jackson et al., 2016). Несколько более поздних работ показали, что основной первичной мишенью tDCS возможно являются астроциты, которые могут влиять на метапластичность нейронов (Gellner et al., 2016; Monai et al., 2016). В других работах показано влияние tDCS на церебральный кровоток (ЦК), однако механизмы изменений не были детально изучены (Fox et al., 1974; Wachter et al., 2011; Mielke et al., 2013).

Как известно, головной мозг – это комплексный орган, основными структурными элементами которого являются нейроны и клетки глии. При этом мозг использует около 20% от общего циркулирующего в крови кислорода и поэтому сильно зависит от кровоснабжения (Hossmann et al., 1994), нарушение которого связано со многими неврологическими патологиями (Farkas et al., 2001). Доставка питательных веществ и кислорода в ткани головного мозга регулируется такими механизмами, как церебральная ауторегуляция, реактивность сосудов и нервно-сосудистое сопряжение (Peterson et al., 2011, Raune et al., 2016). Одной из уникальных особенностей мозгового кровообращения является тесный контакт между кровеносными сосудами (сосудистым эндотелием), нейронами и астроцитами, которые структурно и функционально образуют так называемую нейрососудистую единицу (Iadecola et al., 2004). Считается, что микрососудистый кровоток мозга регулируется через нейроваскулярное сопряжение в соответствии с активностью нейронов. Однако важно отметить, что эндотелиальные клетки стенок сосудов могут усиливать кровоток посредством дилатации артериол под воздействием оксида азота (NO), который может синтезироваться при помощи эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) независимо от воздействия нейронов или астроцитов (Toda et al., 2009; Zhu et al., 2016). Эндотелий сосудов мозга является высокоспециализированной тканью, влияющей на такие физиологические

функции, как тромбоз, адгезия, проницаемость гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), тонус сосудов и ангиогенез (Daneman et al., 2015). В связи с этим эффекты tDCS на микроциркуляцию крови могут быть связаны как с активацией нейронов и астроцитов через нейроваскулярное сопряжение, так и с непосредственным влиянием на клетки сосудистого эндотелия.

Таким образом, представляется весьма актуальным детальное изучение влияния tDCS на кровообращение и сравнение реакции нормального и патологического церебрального кровотока на стимуляцию. Так как церебральный кровоток и функциональное состояние головного мозга как в норме, так и в патологии тесно взаимосвязаны (Bertsch et al., 2009), целесообразно изучение и сравнение влияния tDCS и церебрального кровообращения на моторные и когнитивные функции и их изменение.

Исходя из вышеизложенного, были сформулированы следующие цели и задачи настоящего исследования.

**Целью исследования** было изучение механизмов физиологических изменений церебральной микроциркуляции и метаболизма головного мозга мыши при воздействии анодной транскраниальной стимуляции постоянным током, а также влияния курса tDCS на изменение когнитивных и моторных неврологических показателей.

#### **Задачи исследования:**

1. Изучение влияния анодной tDCS на: микроциркуляцию в коре головного мозга мыши с использованием *in vivo* двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии (ДФЛСМ), региональную гемодинамику коры головного мозга с применением лазерной спекл-визуализации (ЛСВ) и глобальную церебральную гемодинамику с применением магнитно-резонансной томографии (МРТ).



2. Определение влияния tDCS на статус церебральной ауторегуляции мозгового кровотока у мышей методом гиперкапнического теста с параллельным мониторингом динамики диаметра артериол, насыщения тканей мозга кислородом и метаболизма митохондрий при помощи *in vivo* двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии.
3. Выявление вклада сосудистого эндотелия в tDCS – индуцированное изменение церебральной микроциркуляции у мышей методом фармакологического ингибирования эндотелиальной синтазы оксида азота.
4. Исследование влияния tDCS – индуцированных изменений в церебральной гемодинамике на насыщение тканей мозга кислородом и метаболизм митохондрий с применением *in vivo* двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии.
5. Изучение влияния курса tDCS на изменение когнитивных и моторных неврологических показателей у мышей.

### **Научная новизна**

Впервые в условиях эксперимента показаны *in vivo* физиологические изменения церебрального кровотока на микроваскулярном уровне с высоким 3D пространственным разрешением (т.е. скорость кровотока в артериолах и капиллярах, диаметр микрососудов, объем крови и проницаемость ГЭБ) под воздействием анодной tDCS в головном мозге мыши в норме и патологии. Доказано, что tDCS вызывает дилатацию артериол посредством, как минимум частично, стимуляции синтеза оксида азота эндотелиальной синтазой оксида азота. Получены новые данные о том, что в результате дилатации увеличивается артериолярный кровоток, что приводит к усилению и восстановлению скорости эритроцитов в капиллярном русле в норме и патологии, соответственно. Впервые

показано на микроскопическом уровне, что tDCS-индуцированное увеличение капиллярного кровотока усиливает и восстанавливает доставку кислорода и тканевое дыхание в мозге мыши в норме и патологии, соответственно. Впервые установлено что анодная tDCS улучшает и восстанавливает ауторегуляцию мозгового кровообращения, соответственно. Получены новые данные о том, что tDCS улучшает и восстанавливает когнитивные и моторные функции у мышей в норме и в патологии, соответственно. Разработана оригинальная модель транскраниальной стимуляции головного мозга мыши постоянным током в норме и реабилитационном периоде после черепно-мозговой травмы (ЧМТ), которая позволяет изучать влияние различных параметров tDCS на церебральный кровоток и метаболизм, а также оценивать эффективность стимуляции и предполагаемые механизмы, лежащие в основе эффекта tDCS в головном мозге в норме и патологии.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные в настоящей диссертационной работе данные существенно расширяют научные представления о физиологических реакциях церебральной циркуляции на транскраниальную стимуляцию постоянным током в норме и патологии. Разработанная в процессе исследования методика оценки воздействия tDCS на церебральную микроциркуляцию является важной научной моделью для дальнейших исследований механизмов воздействия электрической, магнитной или электромагнитной стимуляции. Принимая во внимание рост сферы применения различных видов неинвазивной стимуляции в медицине, психиатрии и домашнем использовании, полученные данные и разработанная методика имеют важное значение для определения безопасного уровня воздействия и оптимальных режимов стимуляции. Описанные исследования обеспечили необходимое

представление об эффективном времени начала применения tDCS после ЧМТ, которые были оценены по результатам долгосрочных поведенческих тестов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Анодная tDCS вызывает пролонгированную дилатацию церебральных артериол за счет активации eNOS, ведущую к усилению и восстановлению микроциркуляции, а также повышению насыщения тканей мозга кислородом в нормальном и травмированном мозге мыши, соответственно.
2. Связанные с анодной tDCS изменения церебральной гемодинамики лежат в основе восстановления ауторегуляции мозгового кровообращения в посттравматический период у мышей.
3. Четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшает моторные и когнитивные показатели у мышей с травмированным мозгом.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации были представлены на конференции «День нейронаук» (Альбукерке, Нью Мексико, США, 17 марта, 2016 г. и 16 марта, 2017 г.); на 34-ом и 35 национальном симпозиуме по нейротравме (Лексингтон, Кентукки, США, 26–29 июня, 2016 г. и Сноубёрд, Юта, США, 9-12 июня, 2017); на 16-ом Международном симпозиуме по нейромониторингу (Кембридж, Массачусетс, США, 28 июня – 2 июля, 2016); на 6-ой международной конференции по транскраниальной стимуляции мозга (Гёттинген, Германия, 7–10 сентября, 2016 г.); на 46-ой международной конференции по нейронаукам SFN (Сан Диего, Калифорния, США, 12-16 ноября, 2016 г.); на 3-ей конференции по

нейромодуляции (Нью Йорк, США, 13-15 января, 2017); на III всероссийской 14 межрегиональной с международным участием сессии молодых учёных и студентов "Современное решение актуальных научных проблем медицины" (Нижний Новгород, Россия, 15-16 марта, 2017), на 18-ом международном симпозиуме по церебральному кровотоку, метаболизму и функциям (Берлин, Германия, 1-4 апреля, 2017 г.), на 16 российской научно-практической конференции "Поленовские чтения" (Санкт Петербург, Россия, 13-15 апреля, 2017); на 2 Московской международной конференции по неинвазивной стимуляции и функциональному картированию мозга (Москва, Россия, 25-27 мая, 2017 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 39 научных работ, в том числе 38 статей в международных журналах и 1 статья в отечественном журнале.

### **Структура и объём работы**

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: перечень сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 1 таблицей. Список цитированной литературы включает 272 источника, в том числе 38 отечественных и 234 зарубежных.

### **Декларация личного участия автора**

Экспериментальные исследования выполнялись автором лично, либо при его непосредственном участии в следующих коллективных работах: грант Rio Grande Neurosciences по теме «Воздействие высокочастотной импульсной электромагнитной стимуляции на мозг в норме и патологии», 2012-2015 гг., грант Национального Института Здоровья – Национального Института Общих Медицинских Наук (NIH-NIGMS, США) по теме «Стимуляция мозга на животных моделях травмы головного мозга», № P20 GM109089, 2014-2017 гг., грант Российского Научного Фонда по теме «Ворота гемато-энцефалического барьера: механизмы регуляции, их зависимость от состояния организма и возраста, способы коррекции с помощью супрамолекулярных транспортных систем», № 14-15-00128, 2014-2017 гг. Вклад автора составил 65-75%.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общие механизмы действия транскраниальной стимуляции постоянным током

В последние десятилетия в мире произошёл всплеск интереса к неинвазивной электрической стимуляции головного мозга, однако позитивные эффекты транскраниального применения электричества были известны с античности. Так, первыми достоверными свидетельствами использования электричества в терапевтических целях были работы древнеримских врачей Скрибония Ларга (*De Compositionibus Medicamentorum*) и Галена (*De Puero Epileptico*), в которых описаны способы снижения головной боли и снятия приступов эпилепсии методом приложения живого электрического ската к голове (Семячкина-Глушкова, 2010; Finger, 2011).

С изобретением электрической батареи в 18-м веке, появилась возможность оценить влияние транскраниальной стимуляции электрическим током на систематической основе. Такие учёные, как Джон Уолш, Луиджи Гальвани и Алессандро Вольта обнаружили, что электрическая стимуляция может вызвать различные физиологические эффекты (Zago et al., 2008). В 1804 году Джованни Альдини, племянник Луиджи Вольта, опубликовал один из первых систематических отчетов клинического применения транскраниальной электростимуляции для лечения меланхолии (*Essai Theorique et Experimental sur le Galvanisms*) (Brunoni et al., 2012).

Первые работы, близкие к современному понятию tDCS, были опубликованы в 1964 году Redfearn и Lippold, которые исследовали поляризацию током для лечения психоневрологических заболеваний (Guleyupoglu et al., 2013). Их исследования были мотивированы экспериментами на животных, которые свидетельствовали, что длительная стимуляция коры головного мозга постоянным

током может вызывать продолжительные изменения возбудимости (там же). Однако после нескольких позитивных наблюдений, последовавшее контролируемое клиническое исследование показало негативный результат (Arfai et al., 1970), что возможно вызвало охлаждение интереса исследователей на несколько десятилетий.

В отечественной науке в это время так же велись активные исследования стимуляции мозга слабым электрическим током. Так, в конце 70-х годов прошлого века была разработана методика стимуляции мозга с помощью поверхностных электродов малой площади, названная транскраниальной микрополяризацией (Вартанян, 1978). Были показаны: улучшение или восстановление двигательных, психических, речевых функций; купирование гиперкинезов, судорожных приступов; уменьшение очагов деструктивного поражения головного мозга у больных с инсультом и черепно-мозговой травмой (Шелякин и др., 2006).

В 1998 году Priori с коллегами показали, что кратковременная tDCS вызывает нейромодуляцию (Priori et al., 1998). Вскоре после этого, Nitsche и Paulus установили, что длительная (минуты) tDCS вызывает продолжительные полярно-специфические изменения возбудимости коры головного мозга (Nitsche, 2000). С этого момента начались активные исследования возможности применения tDCS при различных психиатрических и неврологических нарушениях (Datta et al., 2008). Кроме того, в связи с предполагаемой безопасностью tDCS ведётся активное изучение применения у здоровых людей с целью улучшения когнитивных функций, памяти и обучения (там же).

В основе исследований действия постоянного тока на головной мозг лежат фундаментальные исследования отечественной физиологической и нейрофизиологической школы: законы электровозбудимости Е. Пфлюгера и Б.Ф. Вериго (цит. по (Шелякин и др., 2006)), учение о парабиозе Н.Н. Введенского, учение о доминанте А.А. Ухтомского (Русинов, 1969), теория Н.П. Бехтеревой о жестких и гибких связях (Бехтерева и др., 1990), теория детерминанты Г.Н.

Крыжановского (Крыжановский, 2002), экспериментальные и клинические исследования поляризационной доминанты Г.А. Вартаняна (Илюхина и др., 2006; Шелякин и др., 2001, 2006).

Изучение влияния постоянного тока на нервную ткань было начато одним из основоположников нейрофизиологии Э.Ф. Пфлюгером в середине XIX века. Его работы были продолжены видным отечественным физиологом Б.Ф. Вериго (1918), который систематизировал основные закономерности действия постоянного тока на нервное волокно: при длительном воздействии на нервный ствол постоянного тока под анодом возбудимость увеличивалась (анодическая экзальтация), а под катодом уменьшалась (катодическая депрессия) (цит. по (Шелякин и др., 2006)). В общей физиологии возбудимых тканей данная феноменология описывается, как полярные законы Пфлюгера-Вериго (Окс, 1969; Шостак и др., 1999).

Транскраниальная стимуляция постоянным током является неинвазивной процедурой стимуляции мозга, в котором слабый постоянный ток (~1 мА) проходит через электроды, расположенные на коже черепа, в течение 20-30 минут. Показано, что tDCS приводит к долговременной поляризации клеточных мембран нейронов (Nitsche et al., 2000; Datta et al., 2009). Исследования показали, что ток по направлению к мембране нейрона приводит к местной гиперполяризации мембраны, текущий по направлению от мембраны – к локальной деполяризации мембраны пирамидальных нейронов, т.е. увеличивает или уменьшает возбудимость коры головного мозга (Reato et al., 2010; Rahman et al., 2013). В рамках современных представлений эффекты могут быть изменениями проницаемости ионных каналов. Под катодом при длительном воздействии постоянного тока происходит инактивация потенциал-зависимых натриевых каналов, что приводит к уменьшению возбудимости за счет позитивного смещения критического уровня деполяризации. Под анодом наоборот каналы активируются, что приводит к гиперполяризации мембраны (Шостак и др., 1999).



Более поздние работы показали, что основной первичной мишенью tDCS возможно являются астроциты, которые могут влиять на метапластичность нейронов (Gellner et al., 2016; Monai et al., 2016). Так, с использованием оптических и электрофизиологических методов на модели генетически модифицированных мышей наблюдался tDCS-индуцированный скачок астроцитарного  $Ca^{2+}$  по всей поверхности коры головного мозга без видимых изменений локального внеклеточного потенциала нейронов (Monai et al., 2016). В другой работе было показано увеличение реактивности как астроцитов, так и клеток микроглии (Gellner et al., 2016). Авторы предположили, что несмотря на то что глиальные клетки не могут генерировать потенциалы действия, их клеточные свойства меняются под воздействием электрической стимуляции. А так как роль астроцитов в синаптической пластичности хорошо известна, то эффекты модуляции глии должны влиять на пластичность нейронов.

Ограниченное количество работ посвящено влиянию tDCS на церебральный кровоток, а механизмы изменений не были детально изучены и не вполне понятны (Fox et al., 1974; Wachter et al., 2011; Mielke et al., 2013). Согласно одной точке зрения, tDCS-индуцированные изменения возбудимости нейронов должны вызывать изменения церебрального кровотока и уровня оксигенации (Baudewig et al. 2001; Lang et al., 2005, Jang et al., 2009; Merzagora et al., 2010). С другой стороны, предложено также прямое влияние tDCS на мускулатуру стенки кровеносных сосудов (Fox et al., 1974).

Фармакологические исследования показывают, что возбудимость коры головного мозга зависит от поляризации мембран нейронов при стимуляции (Islam et al., 1995; Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al., 2003). Если tDCS применяется достаточно долго (больше нескольких минут), эти изменения мембранных потенциалов приводят к изменению силы синаптической передачи посредством модуляции активности NMDA-рецепторов (Liebetanz et al., 2002). Как было показано, длительные эффекты tDCS связаны с изменением BOLD MPT сигнала и

церебральной перфузии (Baudewig et al., 2001; Lang et al., 2005; Jang et al., 2009; Merzagora et al., 2010). Это подтверждает вероятность того, что изменение ЦК при tDCS связано с нейроваскулярным сопряжением и может быть даже опосредовано активацией астроцитов. После активации астроциты могут выделять как сосудорасширяющие, так и сосудосуживающие медиаторы. Тип вазомоторного ответа, как полагают, зависит от состояния покоя церебральных артериол (Carmignoto et al., 2010). tDCS может модулировать ЦК путем изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в плоских отростках астроцитов, которые могут вызывать либо вазодилатацию, либо вазоконстрикцию в зависимости от полярности стимуляции. Однако альтернативным объяснением tDCS-индуцированного изменения ЦК может быть непосредственное действие tDCS на мышцы стенок артериол. Данный механизм был предложен Фох (Fox et al., 1974), который вызывал фокальную долговременную дилатацию базилярной артерии путем стимуляции постоянным током. Авторы предположили, что этот эффект может быть объяснён локальным накоплением ионов, образующихся в процессе электролиза в гладкомышечных и эндотелиальных клетках артериол.

Vernieri и др. показали, что tDCS обладает полярно-специфичным влиянием на вазомоторную реактивность церебральных сосудов (Vernieri et al., 2010). Так как в экспериментах tDCS вызывала изменение вариабельности сердечного ритма, они пришли к выводу, что эти эффекты были результатом модуляции симпатической нервной системы, хотя не исключено возможное влияние на миогенный и метаболический контроль мозгового кровообращения.

Другие формы электрической стимуляции могут напрямую изменять функции сосудов (ter Laan et al., 2014; Dutta et al., 2015; Nitsche et al., 2015). Глубокая стимуляция эндотелиального монослоя в отсутствие нейронов усиливает его проницаемость (Lopez-Quintero et al., 2010), доказывая непосредственное влияние на эндотелиальный барьер. Были показаны изменения эндотелиальных клеток, вызываемые стимуляцией постоянным током (Zhao et al., 2004; Song et al.,

2007; Long et al., 2011), в том числе переориентация и секреция факторов роста и оксида азота (Bai et al., 2011). Так же было выявлено изменение церебральной перфузии после tDCS у человека (Stagg et al., 2013; Giorli et al., 2015; Wang et al., 2015) и животных (Mielke et al., 2013), хотя данные функциональной МРТ не позволяют различить изменения функции ГЭБ вторичной по отношению к стимуляции нейронов или прямой электрической стимуляции ГЭБ в связи с относительно низким пространственным разрешением функциональной МРТ (Saiote et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2015), в котором самое высокое разрешение составляет ~ 100 мкм/пиксель, что далеко за пределами необходимыми для определения проницаемости ГЭБ. Если tDCS может приводить к изменениям в ЦК, этот метод может иметь терапевтическое значение для больных с различными нарушениями церебрального кровотока (Wachter et al., 2011).

Таким образом, до сих пор достоверно не известно, является ли tDCS-индуцированное изменение ЦК косвенным результатом модуляции нейроваскулярного сопряжения, действия непосредственно на кровеносные сосуды и эндотелий или даже модуляции симпатической нервной системы.

## **1.2 Особенности церебрального кровообращения**

Структурные и функциональные свойства мозгового кровообращения, вследствие высоких метаболических потребностей и необходимости жесткой регуляции водно-солевого гомеостаза, сильно отличаются от других органов (Cirolla, 2009). Стенка церебральных артериол состоит из трех слоев: внутренний слой (*tunica intima*) – монослой эндотелиальных клеток, лежащих на базальной мембране – тонкой прослойке рыхлой соединительной ткани и тонкой внутренней эластической мембраны; следующий слой (*tunica media*) содержит клетки гладкой мускулатуры, эластин и коллагеновые волокна; и наружный слой (*tunica adventitia*) – адвентициальная соединительнотканная оболочка, и связанные с ней клетки, такие как периваскулярные нервы (в больших и малых пиллярных артериях),

и перициты и отростки астроцитов (в паренхимальных артериолах) (Lee, 1995). Церебральные артерии отличаются от системных артерий скудностью эластичных волокон в среднем слое и очень тонким адвентицием. Кроме того, гладкие мышцы в мозговых артериолах расположены строго циркулярно и ориентированы перпендикулярно к потоку крови (там же). Мозговые вены, в отличие от периферических, очень тонкостенны и не содержат клапаны.

Мозг составляет только около 2% от массы тела, но использует ~ 20% доступного кислорода для нормальной функции, что требует тонкую регуляцию постоянства кровотока и доставки кислорода критической для выживания (Clarke et al., 1989). В нормальном физиологическом состоянии церебральный кровоток постоянен, частично вследствие сосудистого сопротивления крупных артерий и паренхимальных артериол (Faraci et al., 1990). Высокая метаболическая потребность нервной ткани требует тесной координации между активностью нейронов и кровотоком (Drake et al., 2007). Для увеличения кровотока к областям с повышенной активностью, вышележащие сосуды должны дилатировать, чтобы избежать сокращения микрососудистого давления (Faraci et al., 1990). Для поддержания кровоснабжения мозга и оксигенации на постоянном уровне существует физиологическая система известная, как церебральная ауторегуляция, нарушения которой приводят к неадекватной реакции сосудов мозга.

Ауторегуляция – одно из фундаментальных свойств мозгового кровообращения, основной задачей, которого является поддержание относительно постоянного потока крови и минимизация отклонений циркуляторных параметров и химического состава головного мозга при различных функциональных состояниях вне зависимости от изменений перфузионного давления (разницы между системным артериальным давлением и внутричерепным) в широких пределах (от 50 до 170 мм рт. ст.) (Paulson, 1990; Хилько и др., 1989; Тихомирова, 2000). Ширина диапазона системного давления, в пределах которого мозговой кровоток остается стабильным, свидетельствует о количественном состоянии

ауторегуляции, а изменения кровотока в пределах этого диапазона – о качественных характеристиках ауторегуляции. Это предполагает сложную структурно-функциональную организацию процесса регулирования мозгового кровотока. В настоящее время общепризнано взаимодействие трех основных механизмов регуляции мозгового кровотока: миогенного, метаболического и нейрогенного (Шахнович и др., 1996). В отличие от периферических органов, где основное сосудистое сопротивление обеспечивается небольшими артериями и артериолами, в головном мозге значительный вклад в сосудистое сопротивление вносят крупные экстракраниальные и внутричерепные артерии. Заметная роль крупных артерий головного мозга в сосудистом сопротивлении поддерживает кровоток и защищает нижележащие сосуды от изменений перфузионного давления.

Миогенный механизм, независимо описанный Остроумовым и Бейлисом, является внутренним свойством гладких мышц реагировать на изменение механической нагрузки или внутрисосудистого давления (Инюшкин и др., 2008). Гладкие мышцы в мышечном слое сосудистой стенки артерий и артериол самопроизвольно сокращаются, сужая стенки сосудов при повышенном давлении и расширяются при пониженном давлении, тем самым способствуя ауторегуляции кровотока (Busija et al., 1984; Кадыков и др., 2006). Миогенная реакция возникает в гладких мышцах сосудов даже при удалении эндотелия и блокаде иннервации, что доказывает чисто миогенный характер этого механизма (Busija et al., 1984). Тем не менее, вазоактивные факторы и местные метаболиты могут увеличивать или уменьшать уровень миогенного тонуса и, таким образом, влиять на сосудистое сопротивление.

Миогенный механизм не рассчитан на длительный регуляторный эффект и рассматривается, как «пусковой» (Конради, 1973). За ним следует стабильный долговременный механизм регуляции состояния артерий – гуморальный (метаболический). Этот механизм заключается в способности некоторых

продуктов обмена нервных клеток (метаболитов) оказывать активное влияние на величину просвета сосудов и интенсивность мозгового кровотока (Конради, 1973). Регуляция соответствия функциональной активности нейронов и их кровоснабжения осуществляется также и в результате колебаний концентрации метаболитов мозга. Это осуществляется посредством транспортной способности эндотелия и присутствием на внутренней поверхности эндотелиальных клеток специальных рецепторов (Инюшкин и др., 2008; Teasdale et al., 1986). Констрикторным действием на сосуды головного мозга обладают ангиотензин, вазопрессин и катехоламины (Конради Г.П. 1973). Вазодилатацию вызывают гормоны, выделяемые клетками сосудистой стенки: гистамин, брадикинин и катехоламины при взаимодействии с бета-адренорецепторами внутримозговых артерий (Конради, 1973). Многие вазоактивные гормоны имеют нейросекреторное происхождение.

Углекислый газ ( $\text{CO}_2$ ) также влияет на мозговой кровоток: гиперкапния и снижение зависимого от него показателя рН цереброспинальной жидкости вызывает значительную дилатацию мозговых артерий и артериол и увеличение кровотока, в то время как гипокапния вызывает сужение и уменьшение кровотока (Kontos et al., 1977; Teasdale et al., 1986). При изменении напряжения  $\text{CO}_2$  на 1 мм рт.ст. величина мозгового кровотока изменяется на 5-6%.

Несмотря на то, что мозг имеет очень высокую метаболическую потребность в кислороде, напряжение кислорода в крови в норме до определённых пределов мало влияет на величину мозгового кровотока, так как снижение концентрации кислорода компенсируется за счет увеличения извлечения кислорода из крови (Iadecola et al., 1998). Признаки ишемии не видны пока снижение перфузии не превышает способность увеличения извлечения кислорода. Однако острая гипоксия ( $\text{pO}_2$  менее 50 мм рт.ст.), через прямое воздействие на клетки сосудов церебральных артерий и артериол, вызывает церебральную вазодилатацию, и последующее увеличение мозгового кровотока, сопровождающееся увеличением

кислотности крови (метаболический ацидоз) (Masamoto et al., 2009; Конради, 1973). Индуцированное гипоксией падение уровня АТФ открывает АТФ-зависимые калиевые каналы гладких мышц, вызывая гиперполяризацию и вазодилатацию (Taguchi et al., 1994). Кроме того, при гипоксии быстро возрастает синтез оксида азота и аденозина, что также способствует вазодилатации (Golapov et al., 1997). Этот механизм соответствует функциональной метаболической гиперемии и реализуется, главным образом, на уровне пиальных артерий, обеспечивая перераспределение крови в пользу функционирующих в данный момент участков нервной ткани (Жулев и др., 2002).

Сосудорасширяющий эффект углекислого газа и продуктов анаэробного обмена осуществляет медленную регуляцию мозгового кровотока с латентным периодом от десятков секунд. В осуществлении быстрой регуляции (2-3 секунды) принимают участие аденозин и ионы калия, концентрация которых возрастает в течение нескольких долей секунд после усиления функциональной активности нейронов.

В быстрой регуляции участвует также нервная система по холинергическому или пуринергическому механизму (Конради, 1973). Магистральные, пиальные и внутримозговые сосуды обладают холинергической иннервацией, наиболее выраженной в системе пиальных артерий (Конради, 1973; Чербак и др., 1988). Кроме того, в стенках магистральных, пиальных и внутримозговых артерий были найдены серотонинсодержащие нервные окончания (Семенютин, 2002.). Адренергическая регуляция наиболее развита в магистральных артериях. Разнонаправленность нейрогенных влияний на мозговой кровоток определяется характером взаимодействия медиаторов и рецепторов сосудов. Адренергическое воздействие вызывает сужение магистральных и пиальных сосудов при одновременной дилатации внутримозговых сосудов (Конради, 1973). Холинергическая активация вызывает дилатацию церебральных сосудов. Этот эффект связан с М-холинорецепторами эндотелиоцитов, способных под

воздействием ацетилхолина вызывать дилатацию (Долго-Сабуров и др., 1989). Активация серотонинергических нервных окончаний в стенках сосудов мозга вызывает констрикцию, опосредованную D-рецепторами гладкомышечных клеток (Шахнович, 1996).

В отличие от пиллярных артерий и артериол, паренхиматозные артериолы находятся в тесной ассоциации с астроцитами и в меньшей степени с нейронами, которые могут играть определенную роль в регулировании локального кровотока (Cohen et al., 1997). Нейроны контролируют локальный кровоток, высвобождая медиаторы (ацетилхолин, норадреналин или серотонин) (Hamel, 2006). Высвобождение медиатора стимулирует рецепторы гладких мышц, эндотелия или астроцитов и вызывают сужение или дилатацию, тем самым регулируя местную микроциркуляцию согласно метаболической необходимости. Астроциты же, тесно охватывающие плоскими отростками почти все артериолы и капилляры, также активно вовлечены в регуляцию тонуса сосудов (там же).

Таким образом, церебральное кровообращение регулируется несколькими взаимодействующими механизмами. Зачастую, патологические процессы, вызывая структурные изменения в стенке сосудов, нарушают это взаимодействие, приводя к тяжёлым нарушениям мозгового кровотока и функции нервных клеток. Ауторегуляция мозгового кровотока нарушается при ишемических и геморрагических инсультах, при черепно-мозговой травме и при остром отравлении. Срыв ауторегуляции составляет основное звено патогенеза нарушений мозгового кровообращения, что приводит к поражению головного мозга.

Капиллярное русло в мозге состоит из плотной сосудистой сети, в которой в интактом головном мозге практически все капилляры постоянно перфузируются кровью. Подсчитано, что почти каждый нейрон в мозге имеет свой собственный капилляр (Zlokovic, 2005), что говорит о критической взаимосвязи между нейрональным и сосудистыми компонентами. Внутрисосудистый градиент



давления между прекапиллярными артериолами и посткапиллярными венулами является основным регулятором капиллярного потока. Дилатация артериол увеличивает градиент давления и увеличивает капиллярный поток. Скорость эритроцитов в церебральных капиллярах достаточно высокая (~ 1 мм/сек) и гетерогенная (Wei et al., 1993). Гетерогенность микроциркуляции имеет важное значение для эффективной доставки кислорода в нервную ткань, которая имеет постоянно меняющиеся метаболические потребности.

Структура церебрального капилляра также сильно отличается от капилляров в других тканях. Эндотелиальные клетки и перициты окружены базальной мембраной (~ 30-40 нм), содержащей белки внеклеточного матрикса (Ballabh et al., 2004). Базальная мембрана выстлана плоскими отростками астроцитов, которые оказывают существенное влияние на функции капилляров, в том числе регулируют кровоток, соединение плотных контактов, водно-солевой гомеостаз и взаимодействие с нейронами (Lok et al., 2007). Тесно взаимодействующие нейроны, капилляры и астроциты образуют нейроваскулярную единицу, а их взаимодействие называется нейроваскулярным сопряжением. Нейроваскулярная единица является первичной мишенью при таких патологических процессах, как церебральные геморрагии, вазогенный отек, инфекционные и воспалительные процессы (Lok et al., 2007).

Важным компонентом нейроваскулярной единицы являются также перициты. Перициты были обнаружены в 1890 году Руже в качестве клеток, прилегающих к капиллярам, которые разделяют общую базальную мембрану эндотелиальных клеток (Allt et al., 2001). Соотношение перицитов/эндотелиоцитов очень высоко в головном мозге по сравнению с сосудистой сетью других органов (там же). Перициты способствуют стабильности сосуда и выделяют факторы, необходимые для проницаемости микрососудов, ремоделирования и ангиогенеза

Церебральный эндотелий также уникален тем, что образует гематоэнцефалический барьер – физиологический барьер между кровеносной

системой и центральной нервной системой, который образуется эндотелиальными клетками сосудов мозга с участием перицитов и астроцитов. Он защищает мозг от нежелательных патогенных микроорганизмов и контролирует иммунный статус головного мозга (Wolburg et al., 2009). ГЭБ не позволяет ионам диффундировать в мозг и, таким образом, предотвращает колебание электролитного баланса, препятствует белкам и клеткам циркулирующей крови проникать в мозг и контролирует гомеостаз воды (Kimelberg, 2004).

Отличительной особенностью эндотелия церебральных сосудов является плотное прилегание клеток друг к другу, которые образуют сплошной слой (Lee, 1971). Между стенками эндотелиоцитов образуются плотные контакты, предотвращающие проникновение в ткань мозга различных веществ из кровеносного русла (Zlokovic, 2008). Плотные контакты состоят из трех интегральных мембранных белков (клаудина, окклюдина и замыкательных адгезионных молекул (JAM)), и нескольких вспомогательных белков, включая ZO-1, ZO-2, ZO-3 сингулин и других (Cecchelli et al., 2007; Kniesel et al., 2000). Молекулярная организация плотного контакта образует непрерывную мембрану, которая придает высокое электрическое сопротивление ГЭБ ( $\sim 1500-2000 \Omega\text{-cm}^2$ ), что удерживает ионы в просвете сосудов, но позволяет небольшим липидорастворимым молекулам ( $<400 \text{ Da}$ ) проникать через ГЭБ (Zlokovic, 2008). Многие патологические состояния, включая хронические заболевания такие, как рассеянный склероз, аутоиммунный энцефаломиелит и болезнь Альцгеймера и острые патологии такие, как ишемический инсульт и гипертония, связаны с нарушением регуляции межклеточных белков (там же). Другими уникальными особенностями церебрального эндотелия являются отсутствие фенестраций и очень низкая скорость пиноцитоза, что ограничивает трансцеллюлярный транспорт, а также большое количество митохондрий, связанных с его высокой метаболической активностью (Zlokovic, 2008).

Сократительная активность эндотелиальных клеток при помощи растяжимых волокон актина, содержащихся в цитоплазме, имеет центральное значение для регулирования проницаемости плотного контакта. Агонисты, которые способствуют релаксации волокон (например, циклические АМФ), снижают проницаемость клеток за счёт их расширения и усиления межклеточных контактов (Geockeler et al., 1995). Агонисты, стимулирующие сокращение волокон (например, РКС, VEGF) способствуют повышению проницаемости клеток, вызывая округление, что уменьшает межклеточные контакты (Lum, et al., 1994). Внутриклеточные волокна актина также сокращаются под действием различных патологических факторов, которые вырабатываются травмированным мозгом (гистамин, брадикинин, арахидоновая кислота), что ведёт к отеку головного мозга и т.д. (Cipolla, 2006).

Каждая 2–4-я эндотелиальная клетка имеет контакт с перицитом (Pardridge, 2005), которые, как правило, располагаются в местах контакта эндотелиальных клеток (D'Amore, 1990). Перициты крепко связаны с эндотелиоцитами. Эта связь осуществляется благодаря трём щелевым соединениям, фокальным адгезиям и инвагинациям мембраны одной клетки в полость другой (Rucker et al., 2000). Щелевые соединения непосредственно связывают цитоплазму двух клеток, являясь проницаемыми для ионов и небольших молекул. С помощью фокальных адгезий осуществляется прочная механическая связь двух типов клеток (Fujimoto, 1995). Перициты содержат большое количество способного к сокращению белка актина, благодаря которому они в состоянии изменять просвет капилляров и таким образом, регулировать местное кровяное давление (Herman et al., 1985).

Роль астроцитов заключается в регуляции фенотипа ГЭБ, в частности, индукции формирования межклеточных белков (Bauer et al., 2000). Астроциты тесно взаимодействуют с эндотелиальными клетками, например, водный канал аквапорин-4 (AQP-4) в основном экспрессируется только в окончаниях астроцитов, окружающих сосуды в паренхиме, но не во взаимодействующих с нейронами.

Таким образом, поддержание свойств и функции ГЭБ, вероятно, зависит от взаимодействия между эндотелием и астроцитами. Кроме того, астроциты имеют большое количество  $K^+$ -каналов и буферизируют ионы  $K^+$  в периваскулярном пространстве (Price et al., 2002). Астроциты играют важную роль в регуляции воды-солевого гомеостаза в мозге и являются важными факторами при цитотоксическом отеке мозга при травмах.

ГЭБ свободно пропускает кислород, двуокись углерода и небольшие липофильные вещества, но непроницаем для гидрофильных молекул, таких как глюкоза, аминокислоты и другие питательные вещества, необходимые для жизнедеятельности нейронов (Zlokovic, 2008). Таким образом, одной из основных физиологических функций ГЭБ является регуляция транспорта питательных веществ и других молекул в и из головного мозга. Все другие вещества пересекают ГЭБ с помощью различных специфических транспортеров на апикальной или базолатеральной эндотелиальной мембране (Zlokovic, 2008).

Особой формой диффузии через клеточную мембрану является облегчённая диффузия, которая при помощи транспортеров осуществляет перенос питательных веществ таких, как глюкоза и галактоза, аминокислоты, нуклеозиды, пурины, амины и витамины по градиенту их концентраций от крови к мозгу. Транспортировка этих веществ в целом регулируется метаболическими потребностями мозга и концентрацией субстратов в плазме. Существуют также рецептор-опосредованные транспортные системы (транцитоз) для белков и пептидов необходимых для транспортировки нейроактивных пептидов, хемокинов и цитокинов в мозг (Zlokovic, 2008). Активный транспорт при помощи транспортеров заключается в переносе веществ в пространство с большей концентрацией вещества для удаления молекул из мозга в кровь и требует больших затрат клеточной энергии, получаемой при распаде молекул АТФ. Кроме того, транспортеры ГЭБ участвуют в инактивации и обратного захвата нейротрансмиттеров (там же).

Еще одной уникальной особенностью церебрального эндотелия является то, что он имеет необычно высокую устойчивость к фильтрации воды в ответ на гидростатическое давление. Это связано с тем, что мозг заключен в череп, костная жесткая конструкция которого не позволяет расширения ткани или внеклеточной жидкости без значительных патологических эффектов. Например, повышение внутричерепного давления (ВЧД) вследствие вазогенного отека может вызвать серьезные неврологические осложнения и смерть. Из-за необходимости поддержания ВЧД в пределах нормы и поддержания соответствующего баланса ионов для нормального функционирования нейронов, транспорт воды и растворенных веществ из крови в паренхиму головного мозга контролируется ГЭБ. Такие патологические процессы, как, ишемический инсульт, острая гипертония и ЧМТ вызывают разрушение ГЭБ, что ведёт к вазогенному отеку и повышению ВЧД.

### **1.3 Оксид азота, как модулятор сосудистого тонуса и микроциркуляции**

Как уже описано выше, первичными механизмами, регулирующими церебральный кровоток, являются вазодилатация и вазоконстрикция. Одним из основных дилатирующих веществ, роль которого еще не до конца понятна, является монооксида азота, который, помимо регуляции сосудистого тонуса, участвует во многих физиологических процессах (Furchgott, 1999; Ignarro, 2009; Chen et al., 2007).

Образование монооксида азота происходит в результате окисления атомом кислорода гуанидиновой группы L-аргинина в присутствии специфического фермента синтазы оксида азота (Böger, 2007; Малахов, 2009). Существуют три основные изоформы синтаз оксида азота: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и макрофагальная (mNOS) (Малахов, 2009). Экспрессия и активность всех трех изоформ обуславливают как регуляторное, так и токсическое действие NO (Львова, 2010). nNOS и mNOS содержатся, главным образом, в цитоплазме клетки,

а eNOS в основном связана с клеточными мембранами. nNOS и eNOS постоянно присутствуют в клетках и называются конститутивными (cNOS), а mNOS является индуцибельной (iNOS), то есть синтезируется в ответ на внешнее воздействие на клетку.

Активность индуцибельной NOS не зависит от уровня кальция/кальмодулина, поскольку считается, что кальмодулин постоянно прочно связан с ферментом. Макрофагальная NOS активируется в процессе защитно-адаптационных реакций в ответ на поступление в организм биологически активных веществ: эндотоксинов, цитокинов, оксидантов (Малахов, 2009). После активации нейтрофилы, макрофаги, микроглиальные клетки, эндотелиальные клетки, содержащие эту изоформу NOS, продуцируют значительное количество NO, существенно превышающее физиологические количества, индуцируемые другими NO-синтазами (Ba, 2000).

Конститутивные NOS спонтанно активны и обеспечивают базальный уровень NO. Они обнаружены практически во всех внутренних органах, а также в гладких миоцитах сосудов, эндотелиоцитах артерий и вен, в тучных клетках, в макрофагах, в эпителиоцитах, в неадренергических и нехолинергических нейронах, в альвеолоцитах (Малахов, 2009). Активность конститутивных форм зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция, которые связываются с внутриклеточным кальций-связывающим белком – кальмодулином под влиянием физической или рецепторной стимуляции (Малахов, 2009; Львова, 2010). Комплекс Ca-кальмодулин выступает как кофактор, активирующий NO-синтазу, под влиянием которой синтезируется NO. Образовавшийся оксид азота диффундирует к прилегающим гладким мышцам и связывается с геммом гуанилатциклазы (Пятакова, 2012), что приводит к её активации и образованию гуанозин монофосфата (цГМФ). цГМФ дефосфорилирует головки миозина, что приводит к снижению тонуса гладких мышц (Denninger et al., 1999; Tsoukias et al., 2004). Действие цГМФ имеет два аспекта: во-первых, он снижает концентрацию ионов

кальция в клетках гладких мышц сосудов за счёт активации  $\text{Ca}^{2+}$  АТФазы, которая активно выкачивает ионы кальция из клетки (Carvajal et al., 2000); а во-вторых, косвенно стимулирует фосфатазу легкой цепи миозина (MLCP) (Lee et al., 2001), которая дефосфорилирует головки миозина, тем самым снижая тонус гладкой мускулатуры.

Таким образом, расширение сосудов провоцируется диффузией оксида азота из эндотелия в соседние гладкомышечные клетки стенок сосудов, с образованием цГМФ вследствие активации гуанилатциклазы. Следовательно, участие молекулы монооксида азота в метаболизме сводится, фактически, к участию цГМФ в различных внутриклеточных процессах (Малахов, 2009), что было подтверждено экспериментально.

Эндотелиальная NO-синтаза наиболее активна в эндотелии артериальных сосудов, в то время, как в эндотелии капилляров и венозных сосудов ее активность минимальна (Chen, 2007). Стимуляция синтеза NO в эндотелиальных клетках осуществляется за счет активации механорецепторов, вызванной напряжением сдвига кровотока, а также повышения уровня цитозольного кальция  $\text{Ca}^{2+}$  (Martini, 2006). Так, на культурах эндотелиальных клеток, выращенных на поверхности мелких стеклянных шариков (Buga et al., 1991), было показано, что синтез NO стимулируется в ответ на напряжение сдвига на поверхности эндотелиальных клеток, контактирующих с кровью. Это предполагает, что действие NO в ауторегуляции может быть противоположным миогенной реакции. При повышении давления возникает миогенная реакция сужения артериол, сопровождающаяся усилением кровотока и, следовательно, напряжения сдвига кровотока, что, в свою очередь вызывает увеличение синтеза NO, который действует антагонистически, смягчая сужение вследствие миогенного механизма или перекрывая его и вызывая расширение. Синтез NO также усиливается при динамическом напряжении мышечного слоя сосуда, вызванном падением содержания кислорода в тканях (Natarajan et al., 2005). Ингибирование eNOS

вызывает вазоконстрикцию с последующим повышением артериального давления (Rees et al., 1990) вследствие истощения NO в тканях.

Синтезируемый в эндотелии NO диффундирует либо в окружающие эндотелий клетки гладких мышц сосудов, либо в кровь. По этой причине около 90% NO, синтезированного в эндотелии, уносится с током крови. NO может действовать как в самой клетке, так и достигать клеток-мишеней путем обычной диффузии (El-Farra et al., 2003). Молекулы NO, несмотря на высокую химическую активность, могут транспортироваться на расстояния, существенно превышающие клеточные размеры (Deanfield et al., 2007). Биологические эффекты, оказываемые NO, могут быть ослаблены за счет его необратимой инактивации в реакции с анионами супероксида, происходящей в стенке кровеносного сосуда, или при связывании с железосодержащими комплексами крови (Малахов, 2009). NO, присоединяясь к центральному гемму, образует метгемоглобин, рассматриваемый, как транспортная форма оксида азота (Зинчук и др., 2013). NO может так же взаимодействовать с оксигемоглобином, при этом окисляясь до нитратов, что провоцирует гемическую гипоксию (Allen et al., 2006).

Таким образом, непрерывно образующийся в эндотелии, оксид азота поддерживает сосуды кровеносной системы (вены, артерии, капилляры) в постоянном базальном активном состоянии релаксации (Тюренков и др., 2006; Кравченко и др., 2008). Нормальный уровень NO, необходимый для поддержания сосудистого гомеостаза (Chen et al., 2007), не превышает нескольких микромолей. Концентрации в несколько микромолей на 1 кг ткани достаточно для осуществления регуляторной функции NO. Вместе с тем, в противоположность эффекту NO, возбуждение клеток гладкой мускулатуры постоянно поддерживается за счет нервногуморальной и механической стимуляции (Малахов, 2009). Помимо воздействия на тонус сосудов, монооксид азота сохраняет фильтрационную функцию микрососудов (Tsoukias et al., 2004).



Однако, как уже было отмечено ранее, NO способен проявлять не только активирующее, но и ингибирующее воздействие на различные процессы метаболизма, его действие зависит от физиологического состояния организма (Малахов, 2009). При различных физиологических и патологических условиях может колебаться уровень экспрессии eNOS (Chen et al., 2007). Вопрос о том, является ли повышенная активация системы генерации NO защитным механизмом или, напротив, представляет собой часть патологического процесса – остаётся открытым. В последние несколько лет появляются новые данные, свидетельствующие о стресс-лимитирующих эффектах NO (Малышев и др., 1998; Манухина и др., 2000; Марков, 2005). При повышении продукции NO проявляются как цитотоксическое, так и цитостатическое действие NO (Mander et al., 2004). Высвобождение значительного количества оксида азота под воздействием медиаторов воспаления приводит к резкой вазодилатации, усилению сосудистой проницаемости, формированию отёка и развитию воспалительной реакции (Douzinas et al., 2008). Эндотелиальные клетки в условиях гипоксии, снижают экспрессию вазоконстрикторов – тромбоксана и эндотелина и усиливают высвобождение вазодилататоров – простоциклина, аденозина и NO (Петрищев, 2003). При умеренной гипоксии активность eNOS и высвобождение NO увеличивается. Однако при длительном воздействии повреждающих факторов, к которым относятся гипоксия, воспаление и гемодинамическая перегрузка, происходит инверсия эндотелиального ответа с гиперактивацией вазоконстрикторных эффектов и гемокоагуляции, что в конечном итоге ведет к развитию эндотелиальной дисфункции (Szabo et al., 2004). Дисфункция сосудистого эндотелия вследствие изменения продукции NO считается одним из ключевых факторов в патогенезе сосудистых нарушений (Марков, 2005; Donato et al., 2009). Существуют данные, что под влиянием различных повреждающих факторов, эндотелиальные клетки теряют способность синтезировать вазодилататоры, в то время, как способность синтезировать вазопрессоры

сохраняется (Маянская и др., 2009). Известно, что тяжелая гипоксия способна угнетать синтез монооксида азота в эндотелии (McQuillan et al., 1994). Кроме того, вследствие увеличения активных форм кислорода, эффекты NO из защитных трансформируются в цитотоксические (Möller et al., 2007). Вазодилатирующие эффекты при патологическом повышении концентрации NO могут оказывать негативное влияние при кровотечениях (Musser et al., 2004), в то время, как высокая продукция NO является важным фактором развития гипореактивности сосудов к вазоконстрикторам (Landry et al., 1992; Chen et al., 2007; Preiser et al., 2003). Избыток NO повышает синтез цГМФ, способствуя фосфорилизации белков, открывающих  $K_{ATP}$  и  $Ca^{2+}$ -каналы. Открытие  $K^+$ -каналов ведет к развитию гиперполяризации на поверхности мембран клеток. Концентрация  $Ca^{2+}$  внутри клеток снижается, в результате чего развивается вазопатия (Nelson et al., 2002; Brayden, 1995).

nNOS регулирует рост и дифференциацию клеток ЦНС и, предположительно, их восстановление после локальных ишемических повреждений головного мозга (Полетаев и др., 2002). Однако в ишемизированном участке мозга глутаматергические нейроны вместо физиологической концентраций выделяют избыточное количество глутамата, который попадает в NO- синтезирующие нейроны и происходит так называемый глутаматный каскад. В результате повышается поступление  $Ca^{2+}$  в клетку и, как следствие, возрастает избыточный синтез NO (Сомова и др., 2006). В этом случае ингибиторы синтеза оксида азота (нитроаргинин, гемоглобин) защищают нейроны, снижая их гибель на 73% (Berdt, 2003; Волошин и др., 2006).

Таким образом, синтез оксида азота играет ключевую роль в эндотелиальных механизмах регуляции сосудистого тонуса и микроциркуляции. При этом физиологические концентрации NO ( $<10^{-6}$  M), которые сопровождают нормальное функционирование конститутивных эндотелиальных и нейронных изоформ NOS, оказывают цито- и нейропротекторное действие. Избыточная продукция

вследствие действия повреждающих факторов усиливает развитие патофизиологических процессов. Исследования в этом направлении являются необходимыми для формирования целостного понимания функционирования NO-зависимых механизмов регуляции кровоснабжения в зависимости от начального состояния организма.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе дана общая характеристика материалов и методов. С целью более логичного изложения отдельные методические моменты представлены в начале соответствующих разделов.

### 2.1 Объект исследования

Исследования выполнены на 180 мышах-самцах линии C6B57, весом  $27 \pm 3$  г. Экспериментальные животные были получены в Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, США) и содержались в лабораторном виварии при температуре помещения  $25 \pm 2$  °C, 55% влажности и естественном световом режиме (12/12 часов свет/темнота). Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здравоохранения США (NIH Publication No.85-23, revised 1996). Хирургические процедуры проводились под адекватным ингаляционным наркозом с использованием 2% изофлурана в смеси 70% закиси азота и 30% кислорода.

### 2.2 Общий дизайн исследования

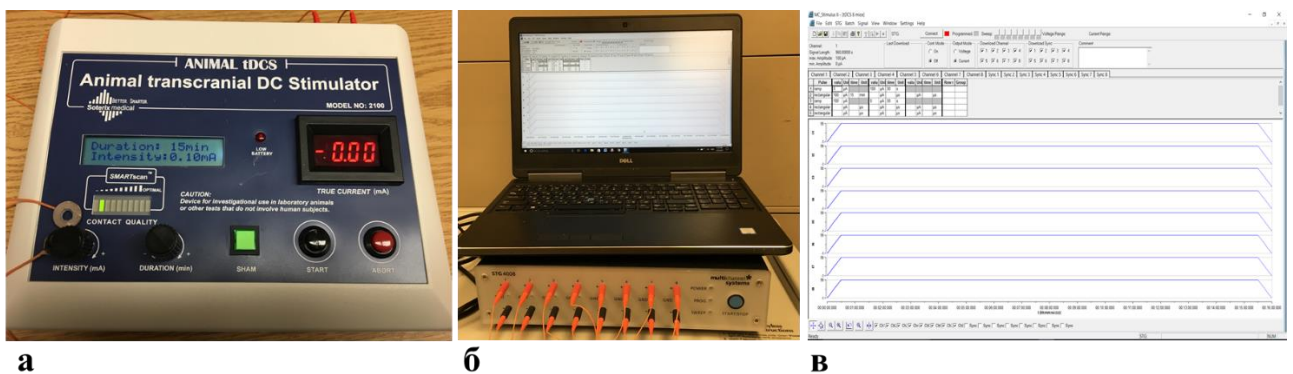
Исследования были проведены в два этапа: на первом этапе были исследованы непосредственные физиологические эффекты анодной стимуляции на нормальное и патологическое церебральное кровообращение, ауторегуляцию и метаболизм; на втором этапе было исследовано долговременное влияние четырёхнедельного курса анодной tDCS на неврологические показатели у интактных мышей и мышей в раннем и позднем посттравматическом периоде после ЧМТ. На первом этапе были использованы методы *in-vivo* визуализации кровотока, позволяющие изучить физиологические изменения на всех уровнях организации: органном (МРТ), тканевом (ЛСВ), и микроскопическом (ДФЛСМ). На втором этапе была использована линейка поведенческих тестов, позволяющая

оценить: моторные функции, оперативную пространственную память, способность к обучению, уровень тревожности и кратковременную когнитивную память.

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Анодная транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS)

Анодная tDCS применялась под ингаляционным наркозом (2% изофлурана, 70% закиси азота и 30% кислорода), как описано в работах других авторов на крысах и мышах (Liebetanz et al., 2006; Liebetanz et al., 2009; Yoon et al., 2012; Peruzzotti-Jametti et al., 2013) с использованием двух систем: 1) одноканальный стимулятор Animal DCS 2100 (SoterixMedical, США) использовался для ЛСВ, ДФЛСМ и МРТ; и 2) восьмиканальный программируемый стимулятор STG4008, контролируемый программным обеспечением MS Stimulus II (Multichannel Systems, Германия) для четырехнедельных курсов tDCS (Рисунок 2.1).



**Рисунок 2.1** – (а) Одноканальный стимулятор Animal DCS 2100. (б) Восьмиканальный программируемый стимулятор STG4008. (в) Скриншот программы MS Stimulus II.

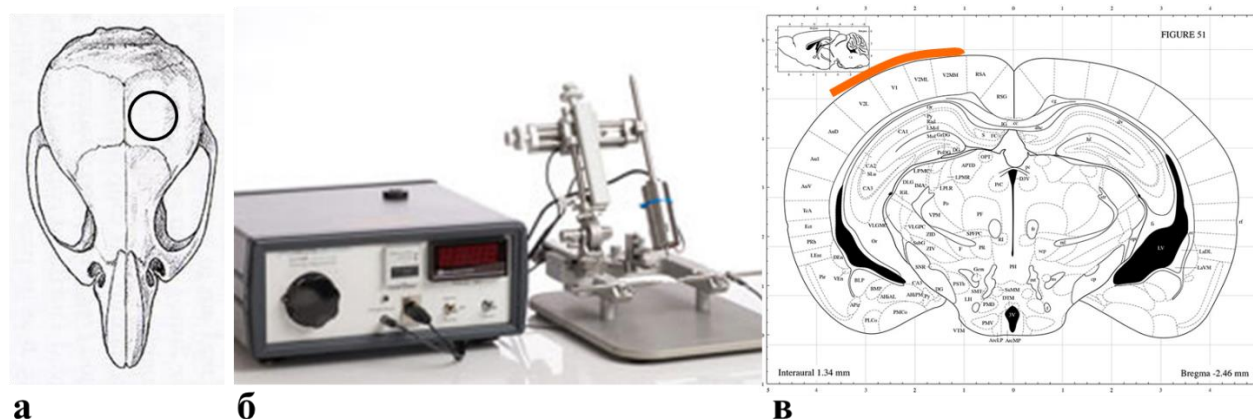
Анодный хлоридсеребряный концентрический электрод диаметром 5 мм, покрытый гелем с высокой проводимостью, помещался на кожу головы над краниотомией. Катодный электрод, также покрытый электропроводящим гелем,

был размещен на вентральной части грудной клетки и закреплён повязкой. Животные стимулировались постоянным током с интенсивностью 0,1 мА в течение 15 мин. При этом в течение 30 секунд сила тока постепенно увеличивалась до достижения 0.1 мА, а в конце стимуляции постепенно снижалась до 0 мА (Рисунок 2.1в). Интенсивность tDCS была выбрана в соответствии с исследованиями эффективности и безопасности, описанными в статьях по tDCS на крысах и мышах (Liebetanz et al., 2006; Liebetanz et al., 2009; Yoon et al., 2012; Peruzzotti-Jametti et al., 2013) и в наших предварительных исследованиях.

### **2.3.2 Контролируемое корковое повреждение головного мозга (CCI)**

Для моделирования нарушенного церебрального кровотока у мышей было использовано контролируемое корковое повреждение головного мозга (CCI от controlled cortical impact), вызывающее очаговую черепно-мозговую травму с нарушенным кровотоком в зоне контузии и периконтузии, ведущую к устойчивому моторному и когнитивному дефициту. Эта классическая модель ЧМТ у мышей была внедрена D.H. Smith (Smith et al., 1995) и успешно применена в наших предыдущих исследованиях (Chohan et al., 2015).

Перед травмой мыши были взвешены и после индукции анестезии в коробке, заполненной смесью 4% изофлурана, 70% закиси азота и 30% кислорода, зафиксированы в стереотаксической установке (Narishige, Япония). Наркоз поддерживался смесью 2% изофлурана, 70% закиси азота и 30% кислорода, подаваемой через ингаляционную маску. Шерсть была сбрита, выполнен продольный разрез по срединной линии, лоскуты кожи раздвинуты латерально и зафиксированы зажимами. После скелетонирования кости, краниотомия диаметром 5 мм была выполнена дрелью над левой париетальной корой головного мозга в координатах: 1 мм дорсально от брегмы, 1 мм латерально от срединной линии, часть кости удалялась (Рисунок 2.2а).

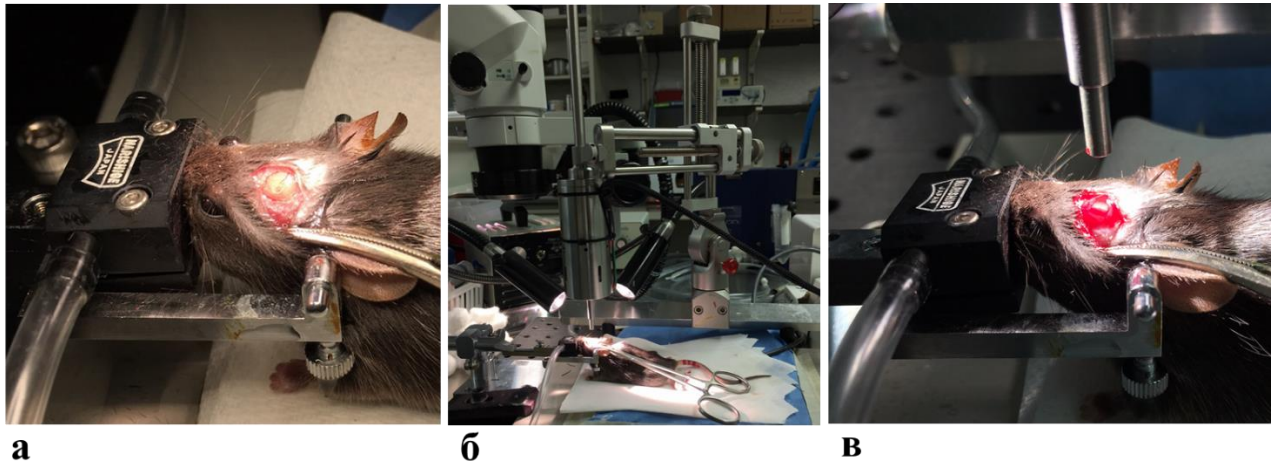


**Рисунок 2.2** – (а) Стереотаксические координаты краниотомии. (б) Установка для контролируемого кортикального стереотаксического повреждения. (в) Зоны травмирования относительно центра оси ударника.

Непосредственно перед травмой уровень анестезии был снижен: концентрация изофлурана 0.5%, закись азота 70% и кислород 30%. Травма наносилась при помощи контролируемого кортикального стереотаксического импактора Benchmark (Leicabiosystems, Германия, Рисунок 2.2б, в), с использованием металлического ударника с плоским наконечником, имеющего диаметр 3 мм, падающего с высоты со скоростью 5 м/с и с глубиной проникновения 2,0 мм от интактной пиальной мозговой оболочки (Рисунок 2.3). Таким образом, непосредственные зоны травмирования включали V2L, V1, V2ML и V2MM теменной коры и нижележащий гипокамп (Рисунок 2.2в).

После ЧМТ краниотомия была закрыта костным воском, заклеена хирургическим клеем и кожный разрез был зашит. Для предотвращения дегидратации подкожно вводилось 2 мл раствора Рингера, для обезболивания вводился раствор бупренорфина (0,01 мкг на кг веса) и для предотвращения развития инфекций вводился раствор бицилина (500 единиц на грамм веса). После этого мыши восстанавливались в течение 2-х часов в нагретом до 37°C инкубаторе

и затем были перенесены обратно в виварий. В ложноперируемых (интактных) группах все хирургические процедуры были такими же, но без ЧМТ.



**Рисунок 2.3** – (а) Мышь в установке, подготовленная к нанесению ЧМТ. (б) Ударник, настроенный на координаты ЧМТ. (в) Мышь после ЧМТ.

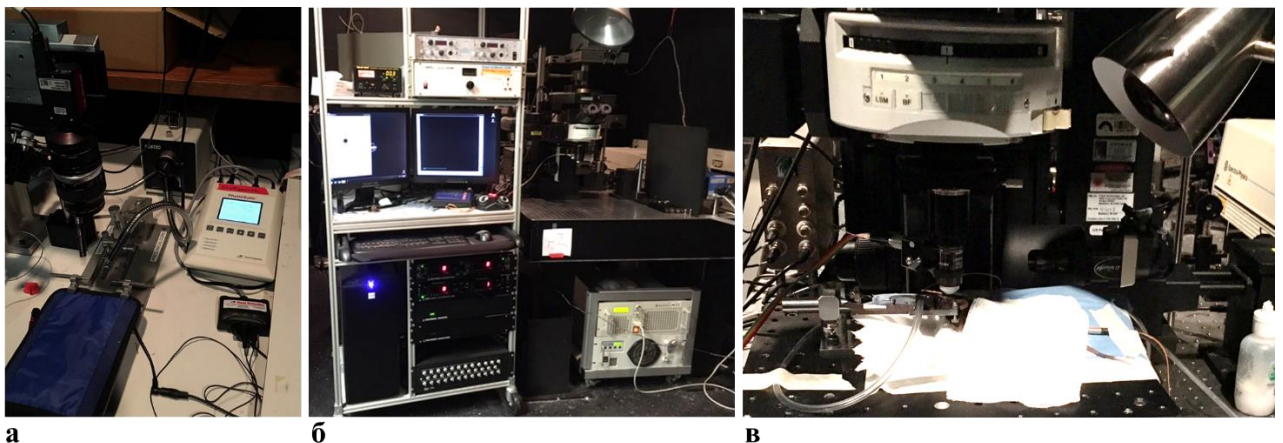
### 2.3.3 Лазерная спекл-визуализация

*In vivo* лазерная спекл-визуализация региональной перфузии коры головного мозга осуществлялась путем освещения скелетонизированного черепа лазерным диодом длиной волны 785 нм и регистрацией отраженного света с длиной волны более 720 нм цифровой камерой. Метод основан на эффекте беспорядочной интерференции, известной, как спекл, происходящей при освещении объекта исследования лазерным светом. Движущиеся эритроциты изменяют интенсивность спеклов, предоставляя информацию о движении кровяных клеток в сосудах. Подробное описание метода приведено в следующих публикациях (Semyachkina–Glushkovskaya et al., 2013; Pavlov et al., 2014).

Использованная система для лазерной-спекл визуализации состоит из: лазерного диода 785 нм (L785P090, Thorlabs, США), питаемого контроллером LDC201C (Thorlabs), оптического пропускного фильтра R72 (Ноуа, Япония), объектива камеры SLR (f/3.5, 55mm, Nikon, Япония), цифровой CCD камеры



(Stingray F-504B, Allied Vision Technologies, Германия), стереотаксической установки (Kopf, Германия) и системы поддержки температуры PhysioSuite (KentScientific, США) (Рисунок 2.4а). Система ЛСВ контролировалась программным обеспечением LabVIEW (National Instruments, США), модифицированным согласно Bernard Choi (Yang et al., 2011), которое рассчитывало и отображало в режиме реального времени кровотоков в коре головного мозга.



**Рисунок 2.4** – (а) Общий вид системы для ЛСВ. (б) Общий вид системы для ДФЛСМ. (в) Мышь в установке для ДФЛСМ, подготовленная к эксперименту.

### 2.3.4 Двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (ДФЛСМ)

*In vivo* двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия обладает рядом преимуществ таких, как субмикронное разрешение, значительная глубина визуализации и низкая степень фототоксичности, что позволяет получать двух- и трехмерные изображения высокого разрешения. При помощи ДФЛСМ были исследованы следующие физиологические и анатомические параметры церебральной микроциркуляции и метаболизма: диаметр сосудов (капилляры и артериолы); скорость эритроцитов в сосудах; профиль скорости эритроцитов в артериолах, скорость объема перфузируемой крови через артериолы; трёхмерная карта микрососудистой архитектуры, аутофлуоресценция никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н), показывающая оксигенацию тканей

мозга и активность митохондрий; цереброваскулярная реактивность и ауторегуляция.

ДФЛСМ осуществлялась с помощью системы Prairie View Ultima (Prairie Technologies, США), как описано в наших предыдущих работах (Bragin et al., 2016, Bragin et al., 2016, Bragin et al., 2016). Основными компонентами системы являются: 10 Ваттный диодный лазер накачки Millennia Prime (Spectra-Physics, США), титан-сапфировый лазер Tsunami (Spectra-Physics), микроскоп Olympus BX51WI с водяно-иммерсионным объективом LUMPlan FL/IR с увеличением 20×/0.50W (Olympus, Япония), четыре фотоэлектрических умножителя с контроллерами, система управления мощности лазера, обогреватель объектива Bioptechs (США) и гомеотермическая система с ректальной пробой (Harvard Apparatus, США) (Рисунок 2.4б). Система контролируется и данные регистрируются программным обеспечением Prairie View V.

*Хирургическая подготовка к ДФЛСМ.* Для подготовки оптического окна для ДФЛСМ был использован модифицированный протокол, основанный на работе А. Shih (Shih et al., 2012). Анестезия поддерживалась смесью 2% изофлурана, 70% закиси азота и 30% кислорода, подаваемой через ингаляционную маску во время подготовки, и 1-0,5% изофлурана, 70% азота и 30% кислорода во время ДФЛСМ. Температура тела поддерживалась на протяжении всех хирургических процедур и ДФЛСМ на уровне 37.5°C с помощью гомеотермической системы с ректальной пробой. После удаления шерсти кожа вдоль срединной линии была надрезана и париетальная часть черепа был обнажена. Кость была истончена до толщины от 10 до 15 мкм в координатах 1-6 мм дорсально от брегмы и 1-6 мм латерально от срединной линии с помощью ручной дрели для достижения оптической прозрачности, а затем покрыт цианакриловым клеем и покровным стеклом, чтобы обеспечить жесткость и уменьшить рассеяние света от неровностей на поверхности кости (Рисунок 2.4в).

Обработка и анализ полученных оптических изображений осуществлялись при помощи программного обеспечения NIH ImageJ (National Institutes for Health, США) и Rincon 7.7 (Optronics, США).

### **2.3.5 Магнитно-резонансная томография (МРТ)**

Магнитная-резонансная томография – метод неинвазивной трёхмерной визуализации, использующий физическое явление магнитного резонанса ядер атомов водорода воды в ответ на возбуждение электромагнитными волнами в постоянном магнитном поле высокой напряженности. В данной работе использовался 4.7-Тесла Biospec сканнер (Bruker BioSpin, Германия), 660 мТл / м (время нарастания в течение 120 мкс); передача и прием радиочастотного сигнала осуществлялись при помощи линейной катушки (внутренний диаметр 72 мм) и настроенной поверхностной катушки (Rapid Biomedical, Rimpac, Германия). Во время МРТ поддерживалась ингаляционная анестезия (2% изофлурана, 30% кислорода и 70% закиси азота). Температура тела и дыхание контролировались и поддерживались при помощи теплового нагнетателя воздуха. Используемые методы МРТ детально описаны в нашей предыдущей публикации (Bragin et al., 2016).

Для определения анатомического строения, выявления координат контузии и определения необходимых координат ASL сканирования глобального кровотока в поперечном сечения мозга, использовалась стандартная анатомическая T2-взвешенная магнитно-резонансная томография. T2-взвешенные изображения были получены при помощи быстрой эхо-спин последовательности (RARE): TR / TE = 5000 мс / 56 мс, в объёме = 4 см x 4 см, толщина среза = 1 мм, расстояние между срезами = 1,1 мм, количество срезов = 12, матрица = 256 x 256, количество повторов = 3. Мульти-срезовая серийная съемка диффузно-взвешенной эхо-планарной визуализации (EPI) (TR / TE = 3800 мс / 38 мс; b-значения = 600 и 1900 с / мм<sup>2</sup> в 30 направлениях; в объёме = 4 см x 4 см, толщина среза = 1 мм, матрица = 256 × 256) использовалась для оценки тканевой структуры.

Глобальный церебральный кровоток измеряли с использованием импульсной артериальной маркировки спина (ASL). Последовательность: FAIR-RARE имела параметры: TE / TR = 46 мс / 16000 мс, в объёме = 4 см x 4 см, толщина среза = 1 мм, количество срезов = 1, матрица = 128 x 128. Карты перфузии была построены с использованием макроса ASL в программе ParaVision 5.1 (Bruker BioSpin, Германия). Перфузию в конкретных областях мозга определяли, используя метод интерполяции с соответствующими T-2 томограммами.

### **2.3.6 Исследование моторных и когнитивных функций**

Моторные и когнитивные функции мышей, соответствующие функциям человека после ЧМТ (Xiong et al., 2013), были оценены в процессе тестирования с использованием следующих поведенческих тестов: ротарод, Y-образный лабиринт, открытое поле, условный рефлекс пассивного избегания и распознавание нового объекта.

#### *Сенсорно-моторные тесты:*

Ротарод использовался для оценки сенсорно-моторной координации, моторной обучаемости и выносливости по способности мышей балансировать на вращающемся с ускорением барабане (Hamm et al., 1994). Тестирование проводилось на установке Rotor-rod, контролируемой программным обеспечением Gemini (San Diego Instruments, США).

#### *Когнитивные тесты:*

Y – образный лабиринт использовался для быстрого и точного измерения рабочей пространственной памяти и спонтанных альтераций (Hughes et al., 2004). Устройство представляет собой Y – образный лабиринт с тремя рукавами длиной 50 см, расположенными под углом 120°. Над лабиринтом располагалась подвешенная видеочка для видеорегистрации всех проведенных сессий, контролируемая программным обеспечением EthoVision XT (Noldus, США), предназначенным для регистрации поведения и обработки результатов.

Тест «Открытое поле» использовался для оценки уровня тревожности посредством определения уровня двигательной активности мышей на новой незнакомой арене. Тестирование проводили на открытой арене размером 60 см x 60 см, над которой располагалась подвешенная видеокамера для регистрации передвижения, контролируемая программным обеспечением EthoVision XT (Noldus, США), предназначенным для регистрации и обработки результатов. По результатам эксперимента были рассчитаны такие параметры, как общая пройденная дистанция, скорость перемещения и время, проведенное в центре арены.

Тест распознавания нового объекта использовался для оценки кратковременной когнитивной памяти (Oliveira et al., 2010). Тест проводился на той же арене, что и открытое поле. Система слежения Ethovision (Noldus, США) использовалась для расчета процента времени, потраченного на исследование нового объекта.

Для оценки способности к обучению и памяти использовалась методика Условного Рефлекса Пассивного Избегания (УРПИ) (Whiting et al., 2006). Методика основана на теории классического обусловливания И.П. Павлова. Выработка условного рефлекса избегания осуществлялась в камере Gemini Avoidance System, контролируемой программным обеспечением (San Diego Instruments, США).

## **2.4 Методы статистической обработки результатов**

Для определения минимального количества животных, необходимых, чтобы избежать ошибки типа II, был проведён анализ мощности (Daniel et al., 2009). Заданными параметрами для определения были: фиксированный уровень 0,05 с планируемым парным сравнением, стандартное отклонение 20% и разница 50% между группами. Эти вычисления определили, что  $n=10$  на каждый исследуемый показатель требуется для обнаружения статистически значимой разницы.

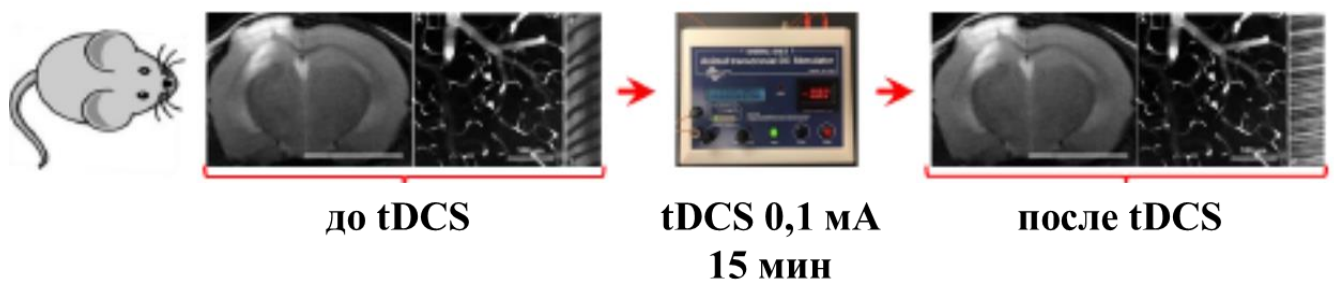
Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ MS Office и GraphPad Prism. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовались параметрический критерий t – Стьюдента и непараметрический критерий U – Уилкоксона-Манна-Уитни. Значения в каждой группе сравнивались и противопоставлялись во времени с использованием одно- или двухсторонней ANOVA и теста Стьюдента-Ньюмена. Различия между группами и между временными интервалами были определены с использованием двухсторонней ANOVA повторных измерений для множественных сравнений и постфактум тестирования с помощью U-теста Манна-Уитни. Относительные распределения частот в гистограммах были проверены с помощью непараметрических тестов Колмогорова-Смирнова.

Результаты представлены в виде  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ , где  $\text{mean}$  — среднее арифметическое, а  $\text{SEM}$  — стандартная ошибка среднего. Результаты математического и статистического анализа приведены в виде рисунков. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Влияние анодной tDCS на церебральный кровоток

Для изучения физиологических изменений кровотока и метаболизма головного мозга под действием анодной tDCS были использованы такие неинвазивные методы, как ЛСВ, ДФЛСМ и МРТ. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 3.1.



**Рисунок 3.1** – Общая схема эксперимента

У животного, находящегося под ингаляционной анестезией, визуализировались базовые физиологические параметры, после 15 минутной tDCS, визуализация продолжалась в течение 3,5 часов.

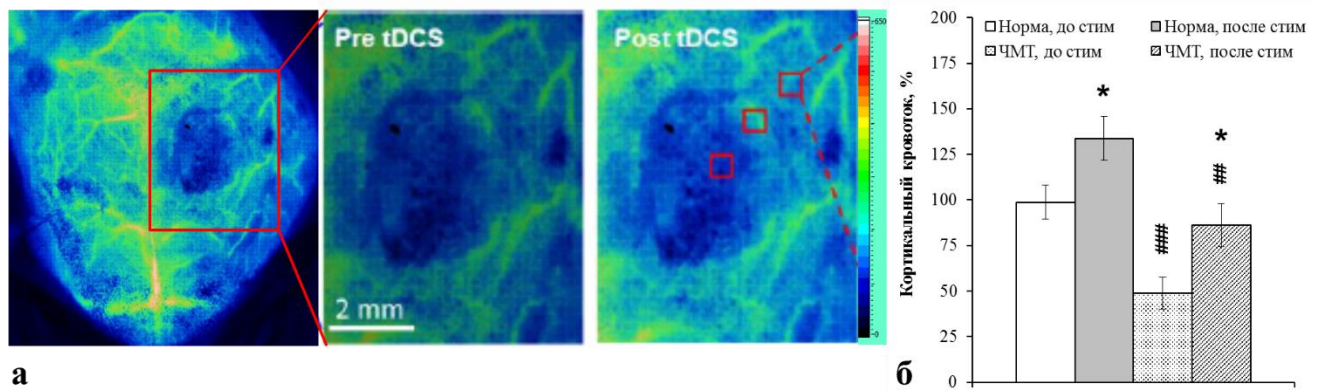
#### 3.1.1 Изменения регионального церебрального кровотока после tDCS

Изменения региональной перфузии коры головного мозга изучали с помощью *in vivo* системы лазерной спекл-визуализации. ЛСВ является достаточно простым и недорогим неинвазивным методом мониторинга мозгового кровотока, в основе которого лежит эффект беспорядочной интерференции, известный, как спекл, происходящий при освещении объекта исследования лазерным светом. В присутствии таких движущихся частиц, как эритроциты, интенсивность спеклов изменяется, предоставляя информацию о движении кровяных клеток в сосудах. Подробное описание метода приведено в следующих публикациях (Semyachkina–

Glushkovskaya et al., 2013; Pavlov et al., 2014). ЛСВ осуществлялась путем освещения объекта лазерным диодом с длиной волны 785 нм и регистрацией отраженного света с длиной волны более 720 нм цифровой CCD камерой. У анестезированных мышей удаляли лоскут кожи над теменными костями и удаляли надкостницу с поверхности черепа, который покрывали тонким слоем минерального масла для улучшения качества изображения. Цифровая камера всегда располагалась под прямым углом к дорсальной поверхности черепа на фиксированном расстоянии для облегчения сравнения образцов. Псевдоцветные карты кровотока, где красный цвет отражает наибольшие значения кровотока, были рассчитаны и отображены в режиме реального времени в программе LabVIEW с помощью модифицированного протокола (Yang et al., 2011).

После подготовки, регистрировалась перфузия до и после стимуляции. На Рисунке 3.2а представлены типичные псевдоцветные карты кровотока в травмированной коре головного мозга мышей до и после стимуляции. Достаточно ясно видна сниженная перфузия в контузионной и периконтузионной зонах теменной коры головного мозга и её увеличение после tDCS. Анализ данных выявил, что кровоток в коре головного мозга в группе мышей с ЧМТ был намного ниже, чем в контрольной группе и составил  $48,8 \pm 8,8\%$  до стимуляции в сравнении со здоровой группой  $98,8 \pm 9,4\%$ , разница между группами была статистически достоверной (Рисунок 3.2б,  $p < 0,001$ ). После анодной tDCS кровоток увеличился в обеих группах, в частности, до  $133,8 \pm 11,9\%$  в нормальной группе и до  $86,3 \pm 11,9\%$  в группе травмированных мышей, в обоих случаях результаты были статистически достоверны (Рисунок 3.2б,  $p < 0,05$ ). Статистический анализ выявил, что после анодной стимуляции разница между контрольной и травмированной группой сохранилась, однако статистическая достоверность снизилась до  $p < 0,01$ .





**Рисунок 3.2** – (а) ЛДВ карты перфузии нормальной и травмированной коры головного мозга мыши до и после tDCS. (б) Кровоток в коре головного мозга мыши до и после tDCS;  $p < 0,05$  по сравнению с: \* - до стимуляции;  $p < 0,01$  = ## и  $p < 0,001$  = ### по сравнению с нормальным мозгом.

### 3.1.2 Изменения капиллярного церебрального кровотока после tDCS

В предыдущей главе мы показали усиление регионального кортикального кровотока под воздействием tDCS, однако, что происходит на уровне микрососудов осталось неизвестно. Для этой цели была использована *in vivo* двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия, которая обладает рядом преимуществ, таких, как субмикронное разрешение, значительная глубина визуализации и низкая степень фототоксичности, что позволяет получать двух- и трехмерные изображения высокого разрешения

Подробное описание метода приведено в наших предыдущих публикациях (Bragin et al., 2016; Bragin et al., 2016; Bragin et al., 2016) и осуществлялась с помощью системы Prairie View Ultima (Prairie Technologies, США). Накачка обеспечивалась 10 Ваттным диодным лазером Millennia Prime (Spectra-Physics, США), двухфотонная эмиссия – титан-сапфировым лазером Tsunami (Spectra-Physics, США), настроенным на длину волны 750 нм. Для исследования микроциркуляции, 5% раствор флуоресцентного тетраметилпродамин-изотиоцианат-декстрана (TAMRA, 500 кДа) в физиологическом растворе был

введён в кровоток через хвостовую вену до достижения конечной концентрации в крови 150 мкМ/л (Kleinfeld et al., 1998). Флуоресценция плазмы крови в сосудах визуализировалась при помощи микроскопа BX51WI (Olympus, Япония) с 20-кратным водно-иммерсионным объективом LUMPlan FL/IR 20X/0.5 W (Olympus, Япония), отфильтровывалась оптическим фильтром с пропусканием 570-600 нм и усиливалась фотоэлектрическим умножителем и регистрировалась программой Prairie View.

Все видимые микрососуды в объёме визуализации (500 x 500 x 300 мкм, XYZ) были отсканированы на каждом этапе исследования и скорость красных клеток крови (ККК) и диаметр каждого сосуда были измерены. При последующем анализе с использованием программы NIH ImageJ, трёхмерная анатомия сосудистой сети в интересующей нас области реконструировалась из Z-стеков плоских изображений и микрососуды были распределены по типам. Капилляры определялись, как сосуды с диаметром от 3 до 8 мкм (Hasegawa et al., 1967; Ravens et al., 1968; Schiszler et al., 2000) со средним значением диаметра около 5 мкм (Motti et al., 1986; Seylaz et al., 1999), характерной извитостью и однопоточным расположением красных кровяных телец (Motti et al., 1986; Hudetz et al., 1995; Hudetz et al., 1996; Seylaz et al., 1999; Nauck et al., 2004). Пиальные, проникающие и прекапиллярные артериолы и венулы дифференцировались по морфологии и скорости потока эритроцитов и диаметру от 9 до 100 мкм (Kleinfeld et al., 1998).

Скорость эритроцитов в каждом капилляре в объёме визуализации (500 x 500 x 300 мкм) определялась методом линейного сканирования (line scan), то есть линейным повторяющимся сканированием вдоль центральной оси каждого микрососуда (Рисунок 3.3а). При этом среднее расстояние сканирования составляло 35 мкм с пространственным разрешением 0,15 мкм на пиксель, 2 мс на одно сканирование и продолжительностью 1024 мс (512 сканов). Линейное сканирование через микрососуд и последовательное сложение всех сканов образует пространственно-временное изображение последовательности

чередующихся диагональных светлых и темных полос, соответствующих флуоресцентной плазме и нефлуоресцентным эритроцитам, при этом наклон полос обратно отражает скорость кровотока. Ширина, резкость, и угол темных полос, представляющих движение красных кровяных телец, а также расстояние между ними были проанализированы с использованием программы Rincon 7.7 (Optronics, США). Скорость кровотока была рассчитана по формуле гипотенузы для противолежащего угла  $\alpha$  (Рисунок 3.2а):

$$c = \frac{a}{\sin \alpha}$$

где:

**a** это пройденное расстояние  $\Delta x$ ;

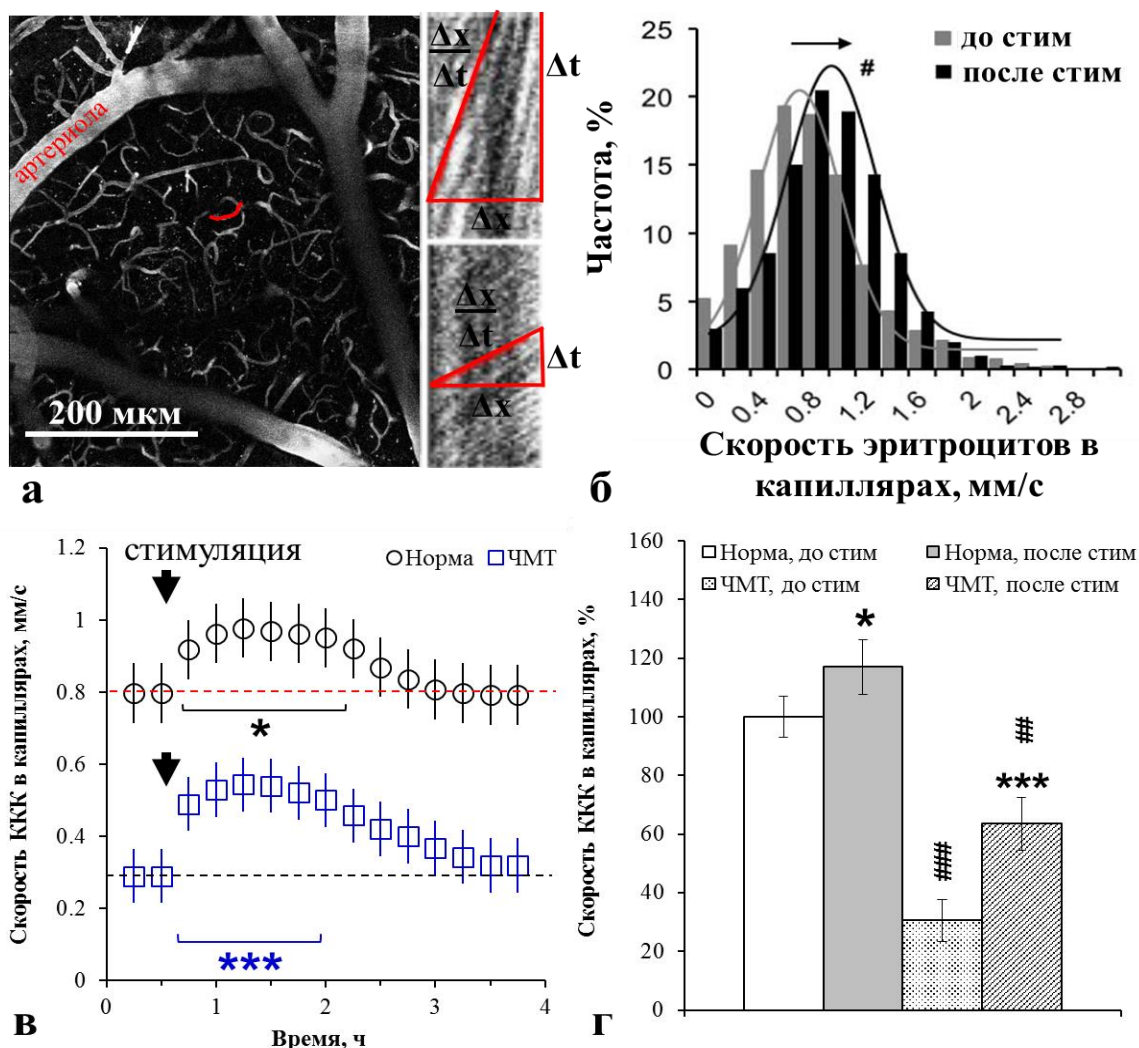
**b** это время  $\Delta t$ ;

**c** это скорость  $v = \frac{\Delta x}{\Delta t}$  выраженная в мм/с

Таким образом:

$$v = \frac{\Delta x}{\sin \alpha}$$

После расчёта скорости эритроцитов в каждом капилляре, были построены частотные гистограммы скорости для каждой мыши и каждого этапа эксперимента и рассчитаны кривые распределения Гаусса. Как видно на Рисунке 3.3б, анодная tDCS сдвигала распределение скорости эритроцитов в капиллярах в область с более высокой скоростью. Далее были построены графики временного ряда, показывающие изменение средней скорости, рассчитанной для всех капилляров во времени после стимуляции (Рисунок 3.3в).



**Рисунок 3.3** – (а) Микрофотография региона, в котором измерялась скорость эритроцитов в капиллярах (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) Частотные гистограммы и кривые распределения Гаусса, показывающие увеличение скорости эритроцитов во всех капиллярах после стимуляции. (в) График динамики увеличения скорости эритроцитов; и (г) максимального увеличения скорости в капиллярах после стимуляции; \* $p < 0,05$  и \*\*\* $p < 0,001$  по сравнению с базовыми значениями; ## $p < 0,01$  и ### $p < 0,001$  по сравнению с нормальным мозгом.

Анодная tDCS значительно увеличивала скорость кровотока в капиллярах в обеих группах мышей: здоровой ( $p < 0,05$ ) и ЧМТ ( $p < 0,001$ ), при этом эффект длился около двух часов, а изначальная скорость кровотока в группе травмированных мышей была значительно ниже, чем в группе здоровых ( $p < 0,001$ ).

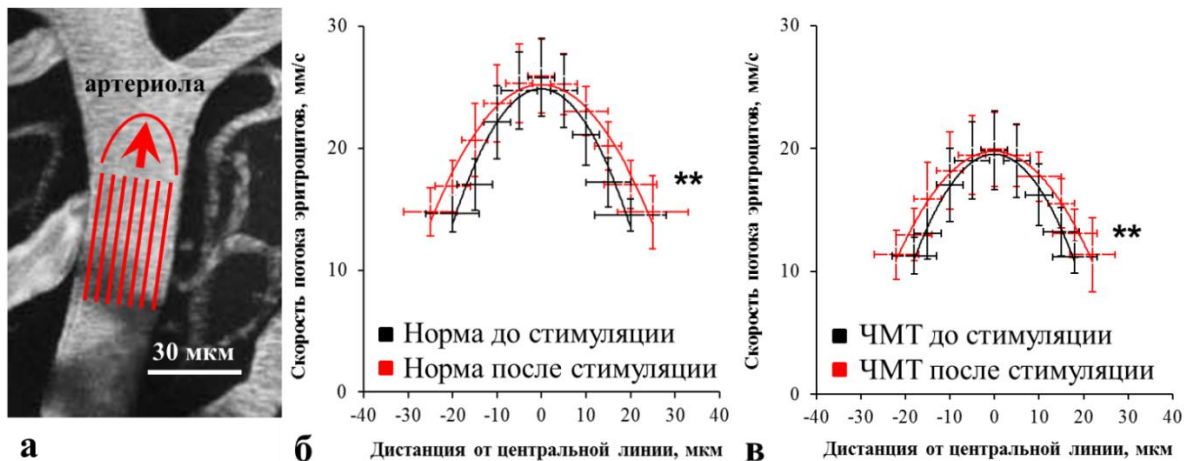
На Рисунке 3.3г показаны значения скорости в момент максимального изменения. Скорость эритроцитов в капиллярах у здоровых мышей составила  $1,18 \pm 0,143$  мм/с и была значительно выше, чем в группе травмированных мышей ( $0,36 \pm 0,143$  мм/с), разница между группами была статистически достоверной ( $p < 0,001$ ). После анодной tDCS эти показатели увеличились в обоих случаях, в частности, до  $1,38 \pm 0,188$  мм/с ( $p < 0,05$ ) в группе здоровых и до  $0,75 \pm 0,18$  мм/с ( $p < 0,01$ ) в группе животных с ЧМТ. Тестирование выявило, что после анодной стимуляции статистическая разница между группами снизилась до  $p < 0,01$ .

### 3.1.3 Влияние tDCS на тонус и кровоток церебральных артериол

В предыдущей главе мы показали существенное увеличение скорости эритроцитов в капиллярах после анодной tDCS, однако причина этого явления осталась не выявлена. Как известно, кровь поступает в капилляры из артериол, которые обладают гладкомышечной оболочкой, способной к сокращению, изменению просвета сосуда и объёма протекаемой крови, поэтому было исследовано влияние стимуляции на тонус и кровоток в церебральных артериолах при помощи *in vivo* ДФЛСМ.

Так как кровоток в артериолах не является однородным и снижается от центра сосуда к стенкам, то есть является ламинарным потоком, измерения были проведены методом линейного сканирования, где последовательные сканирования проводились с шагом 5 мкм от осевой линии сосуда к стенке сосуда, как показано на Рисунке 3.4а. В результате анализа данных были получены характерные профили артериолярного кровотока (Рисунок 3.4б-в) и диаметра сосудов, причём диаметр артериол у интактных животных был выше, чем у травмированных ( $p < 0,01$ ). У интактных животных пристеночная скорость эритроцитов

церебральных артериол составила  $14,7 \pm 3,8$  мм/с, тогда как скорость по осевой линии была  $25,9 \pm 3,3$  мм/с. У травмированных животных пристеночная скорость была  $11,5 \pm 1,3$  мм/с, а по осевой линии  $19,8 \pm 3,2$  мм/с. Т.е., вследствие разницы в диаметрах, и скорости эритроцитов объём протекаемой крови в единицу времени (кровоток) должен был быть существенно выше у интактных мышей.



**Рисунок 3.4** – (а) Микрофотография участка артериолы, с которого был получен профиль скорости эритроцитов с координатами линейных сканирований. (б) Профиль скорости эритроцитов и диаметра артериол в интактном мозге мыши до и после стимуляции. (в) Профиль скорости эритроцитов и диаметра артериол в мозге мыши, перенесшей черепно-мозговую травму до и после стимуляции.  $**p < 0,01$ .

Стимуляция вызывала дилатацию артериол, но не увеличивала скорость эритроцитов, однако вследствие дилатации, объём протекаемой крови в единицу времени должен был существенно увеличиться в обеих группах, как видно из изменений в профилях кровотока.

На Рисунке 3.5а отображена динамика изменения диаметра артериол, при этом у интактных животных средний диаметр составил  $37,4 \pm 2,5$  мкм, а у травмированных  $31,5 \pm 2,2$  мкм, статистическая разница составила  $p < 0,05$ . Анодная tDCS вызывала дилатацию с максимумом  $42,2 \pm 2,4$  мкм у интактных и  $35,6 \pm 2,2$

мкм у травмированных мышей со статистической значимостью  $p < 0,001$  в обеих группах по сравнению с показателями до стимуляции. Примерно через 2,5 часа диаметры артериол возвращались к первоначальным показателям.

Как описано выше, кровоток в артериолах не является планарным и поэтому не является производным поперечного сечения артериолы и скорости эритроцитов. В связи с этим объем крови, протекающей через поперечное сечение артериолы (кровоток), рассчитывали следующим образом: профиль кровотока был представлен в виде суммы трёхмерного параболоида вращения и цилиндра (Рисунок 3.5б), где:

1) общая формула параболы:

$$y = a(x - x_1)(x - x_2),$$

которая в нашем случае:

$$y = a(x - R)(x + R)$$

отсюда:

$$2) a(x^2 - R^2)|_{x=0} = h \rightarrow -R^2 a = h \rightarrow a = \frac{h}{-R^2} \rightarrow y = \frac{h}{R^2}(x^2 - R^2) \quad (1)$$

$$3) V_p = 2\pi \int_0^R \frac{h}{-R^2}(x^2 - R^2)x dx = \frac{2\pi h}{-R^2} \int_0^R (x^3 - R^2 x) dx = \frac{2\pi h}{-R^2} \left[ \frac{1}{4} x^4 \Big|_0^R - R^2 \frac{1}{2} x^2 \Big|_0^R \right] = -\frac{2\pi h}{R^2} \left[ \frac{1}{4} R^4 - R^2 \frac{1}{2} R^2 \right] = -\frac{2\pi h}{R^2} \left[ -\frac{1}{4} R^4 \right] = \frac{\pi h}{2} R^2 \quad (2)$$

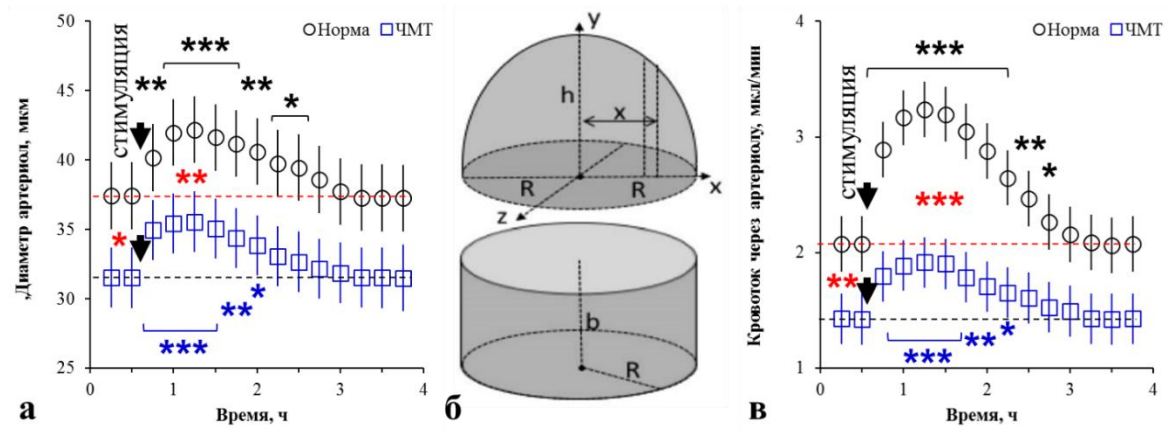
4) Объём цилиндра, где  $b$  – высота цилиндра:

$$V_c = \pi R^2 b$$

5) Исходя из этого, общий объём параболоида вращения и цилиндра у основания, эквивалентные кровотоку в артериоле ( $V_{total}$ ), вычислялись по формуле:

$$V_{total} = V_p + V_c = \frac{\pi h}{2} R^2 + \pi R^2 b = \pi \left( \frac{R^2 h}{2} + b \right) \quad (3)$$

Где  $R$  – радиус цилиндра и основания параболы вращения,  $h$  – высота параболы вращения и  $b$  высота цилиндра.



**Рисунок 3.5** – (а) График динамики диаметра артериол, показывающий дилатацию после стимуляции. (б) Схематическая модель профиля скорости эритроцитов в артериолах, используемого для расчета объема кровотока, выраженная в виде суммы общих объемов параболоида вращения и цилиндра:  $V_{total} = \pi \left( \frac{R^2 h}{2} + b \right)$ . (в) График динамики кровотока через артериолу, показывающий его увеличение после стимуляции; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Расчёт объёмного кровотока через артериолы и построение кривых динамики изменений показали, что до стимуляции у интактных животных объёмный



кровоток 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,  $p < 0,001$ . Кривые изменений объёмного кровотока коррелировали с кривыми изменений диаметров артериол и кровотоков, как и диаметр сосудов снижался до базового через 2,5 часа после стимуляции.

Таким образом, мы показали, что анодная стимуляция вызывает дилатацию артериол, увеличивая объёмный кровоток, что в свою очередь, увеличивает прекапиллярное давление и, соответственно, кровоток в капиллярах.

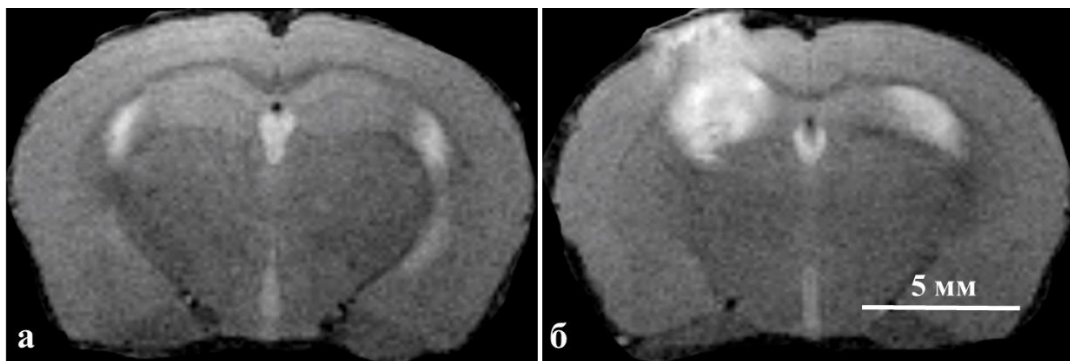
### **3.1.4 Изменения глобального церебрального кровотока после tDCS**

В предыдущих главах мы описали стимулирующее влияние анодной tDCS на кровоток, однако использованные методы позволяют регистрировать только околоповерхностный кровоток коры головного мозга (ЛСВ) или до глубины 300 мкм от пиальной поверхности (ДФЛСМ). Таким образом, глубина распространения эффекта стимуляции в нижние структуры мозга осталась неизвестна. Для выявления глубины распространения эффекта применялась неинвазивная магнитно-резонансная томография, использующая в своей основе физическое явление магнитного резонанса ядер атомов водорода воды в ответ на возбуждение электромагнитными волнами в постоянном магнитном поле высокой напряженности.

Глобальный церебральный кровоток измерялся методом ASL (артериальной маркировки спина), который использует протоны воды в артериальной крови в качестве эндогенного контрастного вещества для оценки перфузии головного мозга неинвазивным методом (Deibler et al., 2008). Этот метод, позволяющий количественно оценить перфузию в головном мозге, был впервые применён в 1992 году на крысах (Williams et al., 1992) и через два года в клинических исследованиях (Detre et al., 1994).

Для определения анатомического строения, выявления координат контузии и определения необходимых координат ASL сканирования поперечного сечения мозга анестезированной мыши использовалась стандартная анатомическая T2-взвешенная магнитно-резонансная томография, использующая время релаксации протонов воды после  $90^\circ$  радиочастотного импульса, при этом, чем больше воды в ткани, тем светлее изображение.

На рисунке 3.6 представлены типичные изображения здорового головного мозга мыши (Рис. 3.6а) и через 3 недели после ЧМТ (Рис. 3.6б). Хорошо виден отёк части париетальной коры и гиппокампа в месте повреждения.

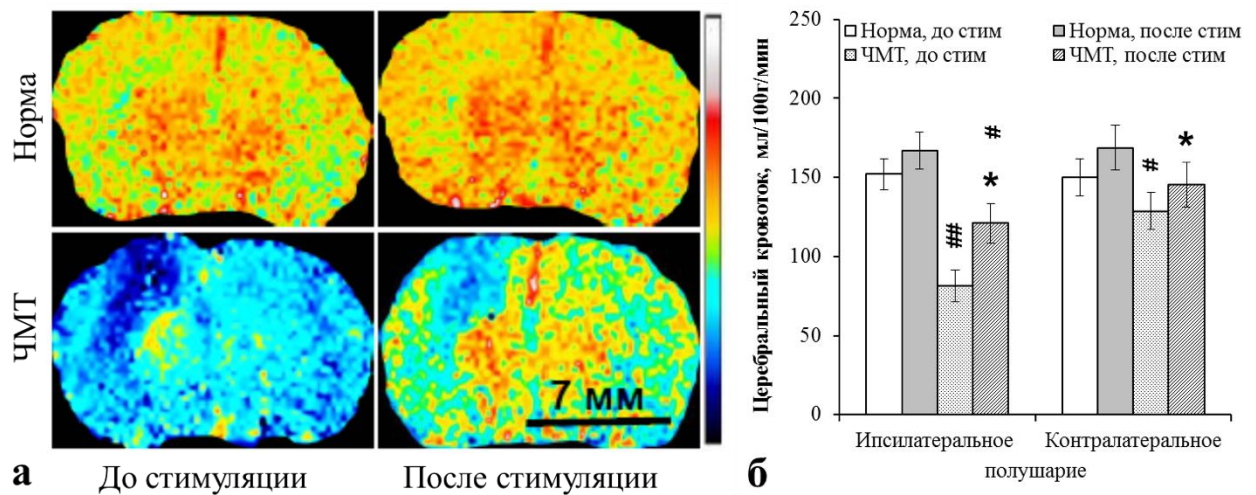


**Рисунок 3.6** – Типичные T2-взвешенные МРТ анатомические изображения секций (а) интактного мозга мыши и (б) травмированного мозга мыши.

После определения координат проводилось сканирование кровотока в срезе шириной 1 мм. Мыши подвергались анодному или ложному tDCS и ASL сканирование повторялось. Полученные данные были проанализированы при помощи программы ParaVision 5.1 (Bruker, США) и посредством ADC картирования были построены псевдоцветные карты перфузии, представленные на Рисунке 3.7, где кровоток увеличивается от синего цвета к красному.

В результате эксперимента выявлено, что объёмный церебральный кровоток в ипсилатеральном полушарии в группе мышей с ЧМТ был намного ниже, чем в контрольной группе и составил  $81,3 \pm 10,0$  мл/100г/мин до стимуляции в сравнении с нормальной группой –  $152,0 \pm 10,0$  мл/100г/мин, разница между группами была

статистически достоверной (Рисунок 3.7,  $p < 0,01$ ). После анодной tDCS эти показатели увеличились в группе травмированных мышей до  $121,1 \pm 12,5$  мл/100г/мин, результаты были статистически достоверны (Рисунок 3.2,  $p < 0,05$ ). В группе здоровых мышей наблюдался тренд к увеличению, но статистической значимости не достиг – объёмный церебральный кровоток составил  $167,0 \pm 11,7$  мл/100г/мин (Рисунок 3.7). Тестирование показало, что после анодной tDCS разница между контрольной и травмированной группой сохранилась и статистическая достоверность составила  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.7** – (а) Карты перфузии в интактном и травмированном головном мозге мыши до и после tDCS. (б) Церебральный кровоток в ипсилатеральных и контралатеральных полушариях мозга мыши до и после tDCS;  $p < 0,05$  по сравнению с: # - нормальным мозгом; \* - до стимуляции;  $p < 0,01 = ##$  по сравнению с нормальным мозгом.

Церебральный кровоток в контралатеральном полушарии в группе травмированных мышей до стимуляции составил  $128,6 \pm 11,7$  мл/100г/мин и был ниже, чем в группе здоровых мышей –  $150,0 \pm 11,7$  мл/100г/мин, разница между группами была статистически достоверной (Рисунок 3.7,  $p < 0,05$ ). После анодной tDCS эти показатели увеличились в группе мышей с ЧМТ до  $146,3 \pm 14,2$  мл/100г/мин, результаты были статистически достоверны ( $p < 0,05$ ), хотя в

нормальной группе значительных изменений не наблюдалось и объёмный церебральный кровоток составил  $168,7 \pm 14,2$  мл/100г/мин, с трендом к увеличению (Рисунок 3.7). Как было показано в этом эксперименте, разница между контрольными и травмированными группами после анодной tDCS сохранилась, статистическая достоверность  $p < 0,05$ .

Разница в церебральном кровотоке в группе животных с ЧМТ между ипсилатеральным и контралатеральным полушариями до и после анодной стимуляции была так же статистически достоверна ( $p < 0,05$ ).

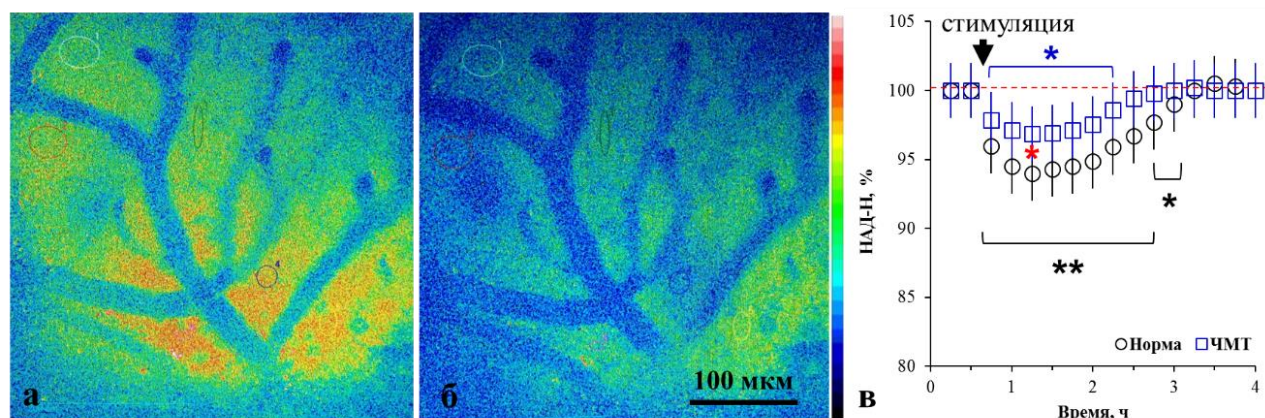
### 3.2 Влияние анодной tDCS на насыщение тканей мозга кислородом и метаболизм митохондрий

В главе 3.1 мы показали, что анодная стимуляция вызывает дилатацию церебральных артериол, ведущую к усилению капиллярного кровотока в интактном и травмированном мозге мыши. Так как капиллярная сеть доставляет кислород и нутриенты к тканям и уносит углекислый газ и метаболиты, то изменение капиллярного кровотока должно быть связано с изменением тканевого дыхания и метаболизма. С целью изучения влияния усиления капиллярного кровотока на физиологические процессы в тканях мозга была использована *in vivo* двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия динамики аутофлуоресценции восстановленного никотинамидадениндинуклеотида.

Кофермент НАД-Н является первичным донором электронов в окислительном фосфорилировании в митохондриях клеток и его окислительно-восстановительное состояние отражает митохондриальную активность, которая зависит от насыщения тканей кислородом. Восстановленный НАД-Н является флуоресцентным с максимумом эмиссии 447 нм, в то время как окисленный НАД<sup>+</sup> нет. Следовательно, флуоресценция НАД-Н является чувствительным индикатором насыщения клеток кислородом (Chance et al., 1973) и может использоваться для оценки оксигенации ткани / уровня гипоксии, где увеличение НАД-Н вследствие накопления отражает относительное снижение митохондриального окислительного фосфорилирования и, соответственно, оксигенации. Впервые использование аутофлуоресценции НАД-Н, как индикатора оксигенации, было описано в работах Бриттона Чэнса (Chance et al., 1973), позднее была разработана методика для *in vivo* ДФЛСМ (Takano et al., 2007).

Подробное описание НАД-Н микроскопии, которая осуществлялась с помощью системы Prairie View Ultima (Prairie Technologies, США), приведено в наших предыдущих публикациях (Bragin et al., 2016; Bragin et al., 2016; Bragin et al.,

2016), а применение ДФЛСМ в предыдущей главе. Аутофлуоресценция НАД-Н вызывалась длиной волны 740 нм и отфильтровывалась оптическим фильтром с пропусканием 425-475 нм, усиливалась фотоэлектрическим умножителем второго канала и регистрировалась программой Prairie View. На каждом этапе эксперимента снималось 20 планарных изображений интенсивности аутофлуоресценции, начиная с глубины 40 мкм от пиальной оболочки с шагом в 10 мкм. При анализе полученных данных при помощи программного обеспечения NIH ImageJ, были рассчитаны средние значения интенсивности аутофлуоресценции в выделенных регионах и построены кривые динамики изменения НАД-Н, представленные как % от базового уровня НАД-Н в соответствующих группах.



**Рисунок 3.8** – (а) Аутофлуоресценция НАД-Н в коре головного мозга мыши до стимуляции; и (б) после стимуляции. Тёмно синий цвет шкалы – минимальная концентрация НАД-Н, красной – максимальная. (в) Динамика НАД-Н, показывающая повышение оксигенации ткани после стимуляции, согласно снижению уровня НАД-Н, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Данные представлены как % от базового уровня в обеих группах.

Как показано на рисунке 3.8а, исходная аутофлуоресценция НАД-Н была равномерно распределена в коре головного мозга с постепенным увеличением интенсивности, в зависимости от расстояния от микрососудов, что отражает

градиент кислорода вследствие диффузии (Takano et al., 2007). Анодная стимуляция вызывала снижение аутофлуоресценции НАД-Н в обеих группах –  $94,1 \pm 2,4\%$  и  $96,8 \pm 2,3\%$  по сравнению с исходным уровнем,  $p < 0,01$  и  $0,05$  в интактных и ЧМТ, соответственно. При этом разница изменений между интактными и травмированными мышцами была статистически достоверна ( $p < 0,05$ ) и могла быть связана со сниженным метаболизмом и нарушенным кровообращением, вследствие перенесённой травмы. Таким образом, увеличение церебральной микроциркуляции увеличивало насыщение ткани кислородом и активность окислительного фосфорилирования в митохондриях.

### 3.3 Роль оксида азота в дилатации артериол, вызванной анодной tDCS

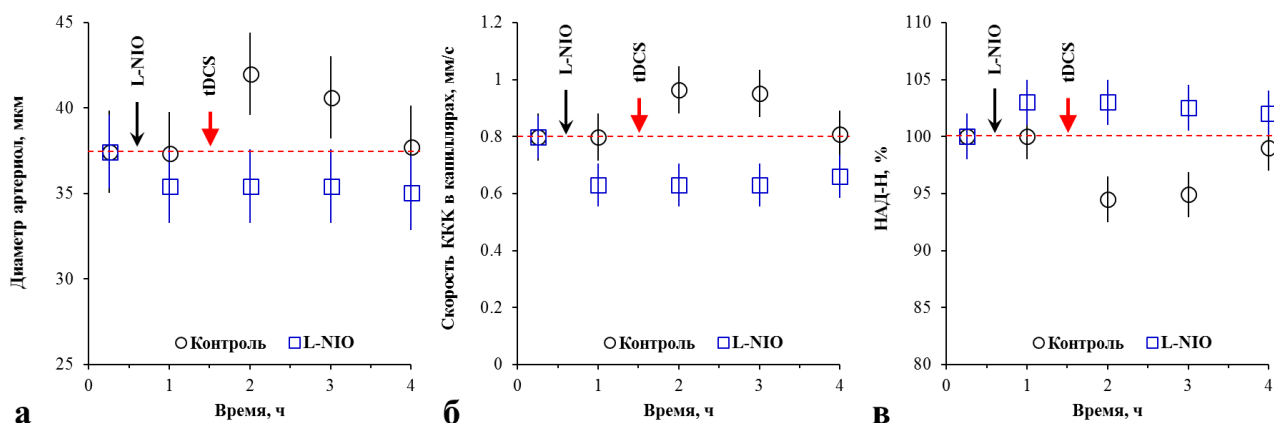
В предыдущих двух главах мы показали, что анодная tDCS вызывает дилатацию артериол, усиление капиллярного кровотока и оксигенации тканей головного мозга мыши в норме и патологии, однако механизм дилатации не был изучен. Существует несколько возможных механизмов, одним из которых является дилатация под воздействием оксида азота. Оксид азота представляет собой хорошо известный вазодилататор, синтезируемый синтазами оксида азота различного типа. В одной из предыдущих работ мы показали, что импульсное электромагнитное поле активирует синтез оксида азота и вызывает дилатацию артериол, усиление микроциркуляции и метаболизма (Bragin et al., 2015).

С целью изучения роли NO в дилатации артериол в мозге мыши во время анодной tDCS было использовано фармакологическое ингибирование эндотелиальной синтазы оксида азота N-(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитинном (L-NIO, N(5)-(1-Iminoethyl)-L-ornithine) с последующей *in vivo* двухфотонной микроскопией. Для этого были использованы следующие группы: 1) контрольная (интактные мыши + tDCS) и 2) L-NIO (интактные мыши + L-NIO + tDCS). L-NIO вводили внутривенно (10 мг/кг) для ингибирования eNOS, в контрольной группе делались инъекции физиологического раствора. Физиологические переменные измерялись при помощи ДФЛСМ до инъекции, через тридцать минут после инъекции с последующим tDCS и в течение трёх часов после tDCS.

Как показано на рисунке 3.9а, ингибирование eNOS в L-NIO группе вызывало незначительное снижение диаметра артериол с  $37,4 \pm 2,4$  до  $35,4 \pm 2,1$  мкм,  $p < 0,21$ , вероятно, вследствие истощения NO. Сужение артериол привело к уменьшению объема, протекающей через артериолы, крови и снижению скорости эритроцитов в капиллярах с  $0,79 \pm 0,08$  до  $0,63 \pm 0,07$  мм/с,  $p < 0,23$  (Рисунок 3.9б). Снижение микрососудистой перфузии привело к увеличению аутофлуоресценции НАД-Н до



103,1% ± 1,3% от исходного уровня, что отражает снижение оксигенации тканей,  $p < 0,19$  (Рисунок 3.9б).



**Рисунок 3.9** – (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 НАД-Н после *tDCS*, в контроле аутофлуоресценция НАД-Н снижается, что является показателем увеличения оксигенации. Красная пунктирная линия – базовый уровень.

Ингибирование *eNOS* в группе L-NIO предотвращало *tDCS*-индуцированную дилатацию артериол, увеличение скорости эритроцитов и насыщения ткани кислородом (Рисунок 3.9). Полученные данные показывают, что влияние анодной *tDCS* на церебральную микроциркуляцию и оксигенацию модулируются оксидом азота, который синтезируется при участии эндотелиальной *NOS*. В контрольной группе *tDCS* вызывала дилатацию артериол, увеличение микроциркуляции и оксигенации ткани (Рисунок 3.9), как и в экспериментах, описанных в предыдущих главах.

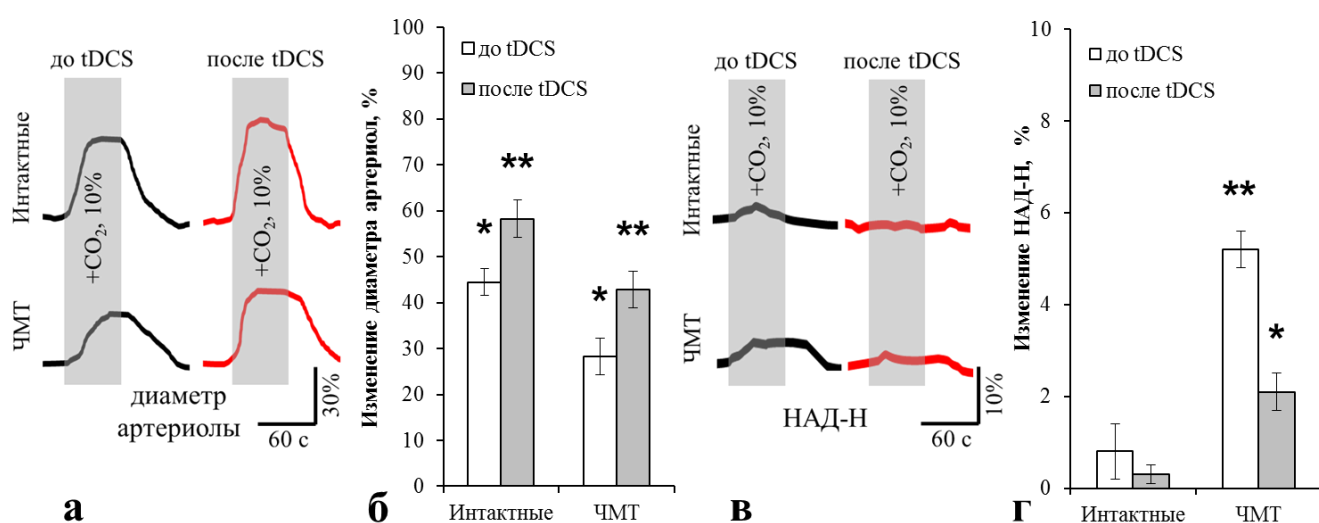
### **3.4. Влияние анодной tDCS на реактивность сосудов и церебральную ауторегуляцию.**

Важной функциональной особенностью кровообращения мозга является церебральная ауторегуляция, т.е. поддержание постоянного уровня объемного кровотока и оксигенации согласно метаболическим потребностям мозга (Демченко, 1983; Artru et al., 1992) и вне зависимости от изменений артериального давления и других факторов (Шахнович и др., 1996; Гайдар, 2000). В основе ауторегуляции лежит вазореактивность – способность гладкомышечной оболочки артериол к изменению тонуса, т.е. к сокращению или дилатации. Ауторегуляция тонуса мозговых сосудов – сложный многокомпонентный физиологический механизм регуляции, обеспечивающий адекватность церебрального кровотока, оксигенации и метаболизма. При повреждениях головного мозга ауторегуляция может нарушаться (Alberts, 1997; Smielewski et al., 1997; Soehle et al., 2003). Основу ауторегуляции мозговых сосудов составляют несколько компонентов, таких, как миогенный, гуморальный, метаболический, нейрогенный, эндотелиальный (Шмидт, 1996). Одним из классических способов оценки реактивности является гиперкапнический тест, при котором временно повышается концентрация вдыхаемого углекислого газа и оценивается изменение церебрального кровотока. В этой главе мы оценили влияние анодной стимуляции на состояние реактивности сосудов и церебральную ауторегуляцию.

Динамика реактивности артериол оценивалась при помощи ДФЛСМ по изменению диаметров артериол до, во время и после кратковременной гиперкапнии. Для индукции кратковременной гиперкапнии состав дыхательной смеси, подаваемой на ингаляционную маску, изменялся на 60 секунд – концентрация  $\text{CO}_2$  увеличивалась с 0 до 10%.

Как видно на рисунке 3.10а, гиперкапния вызывала расширение артериол в обеих группах, которое проходило после окончания гиперкапнии. Однако в группе

с ЧМТ динамика дилатации и последующего сужения артериол была более замедленной, характеризуя нарушенную вазореактивность вследствие пережитой травмы мозга (Рисунок 3.10а). При этом максимальная амплитуда изменений в интактной группе была выше, чем в травмированной, вероятно, вследствие хронического посттравматического вазоспазма и снижения цереброваскулярного резерва. В интактной группе диаметр увеличивался на  $44,5 \pm 3,1\%$ , тогда как в группе ЧМТ на  $28,2 \pm 4,2\%$ ,  $p < 0,05$  в обоих случаях.



**Рисунок 3.10** – (а) Изменение диаметра церебральных артериол интактного и травмированного мозга мыши в динамике гиперкапнического теста до и после tDCS. (б) Анодная tDCS улучшает реактивность церебральных артериол. (в) Изменение аутофлуоресценции НАД-Н в паренхиме интактного и травмированного мозга мыши в динамике гиперкапнического теста до и после tDCS. (г) Анодная tDCS улучшает нарушенную церебральную ауторегуляцию в травмированном мозге: концентрация НАД-Н, а следовательно оксигенация тканей, становится более стабильна; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  от до стимуляции, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  от интактной группы.

После анодной tDCS динамика и амплитуда реактивности значительно увлечивалась в обеих группах (Рисунок 3.10а). В интактной группе диаметр при

максимуме дилатации увеличивался на  $58,3 \pm 4,3\%$ , тогда как в травмированной группе на  $42,9 \pm 4,4\%$ , статистическая значимость составила  $p < 0,01$  для обеих групп (Рисунок 3.10б).

Для определения состояния церебральной ауторегуляции, параллельно с дилатацией артериол во время гиперкапнического теста измерялась динамика аутофлуоресценции НАД-Н. Концентрация НАД-Н напрямую связана с оксигенацией ткани и активностью митохондрий, которая в свою очередь зависит от активности и состояния нейронов. Как видно на рисунке 3.10в, в мозге интактных мышей гиперкапния практически не изменяла аутофлуоресценцию НАД-Н, что хорошо коррелирует с усилением кровотока вследствие дилатации для компенсации сниженной концентрации кислорода и подтверждает нормальную ауторегуляцию и способность сосудов поддерживать неизменный уровень метаболизма. В группе мышей с ЧМТ гиперкапния статистически достоверно увеличивала аутофлуоресценцию НАД-Н, отражая его накопление вследствие снижения доставки кислорода и активности митохондрий (Рисунок 3.10в). Данный эффект хорошо коррелирует со сниженной реактивностью артериол в этой группе, описанной выше.

После анодной tDCS увеличение аутофлуоресценции НАД-Н в группе ЧМТ при гиперкапнии было значительно ниже ( $5,2 \pm 0,4\%$  до стимуляции и  $2,1 \pm 0,3\%$  после стимуляции,  $p < 0,01$  и  $0,05$ , соответственно, см. Рисунок 3.10г), что хорошо коррелирует с улучшением реактивности артериол. В интактной группе статистически значимых изменений после стимуляции не наблюдалось, хотя тренд к улучшению ауторегуляции присутствовал ( $0,8 \pm 0,3\%$  до стимуляции и  $0,3 \pm 0,1\%$  после стимуляции, см. Рисунок 3.10г).

### 3.5 Влияния курса tDCS на когнитивные и моторные неврологические функции у мышей

В предыдущих главах мы показали, что анодная стимуляция вызывает продолжительное улучшение церебральной микроциркуляции, ауторегуляции, насыщения ткани кислородом и метаболизма. В многочисленных работах описано улучшение памяти, когнитивных функций, обучаемости, и нормализация эмоционального состояния после tDCS. В этой главе мы изучили влияние курса повторяемой tDCS на моторные и когнитивные функции интактных мышей и мышей в раннем и позднем посттравматических периодах после ЧМТ. Экспериментальные группы представлены в Таблице 1.

В ходе работы были использованы следующие тесты: Ротарод – для оценки сенсорно-моторной координации, моторной памяти и выносливости; Y-образный лабиринт – для изучения пространственной рабочей памяти и спонтанной альтерации; открытое поле – для оценки уровня тревожности; распознавание нового объекта – для исследования кратковременной когнитивной памяти; и условного рефлекса пассивного избегания – для исследования способности к обучению и памяти. Были оценены изменения когнитивных и моторных функций, соответствующие дефициту у человека после ЧМТ (Xiong et al., 2013)

Таблица 1

#### Экспериментальные группы

Группы	1 неделя после ЧМТ		3 недели после ЧМТ	
	ЧМТ	Контроль	ЧМТ	Контроль
Ложная tDCS	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей
tDCS 0,1 А	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей



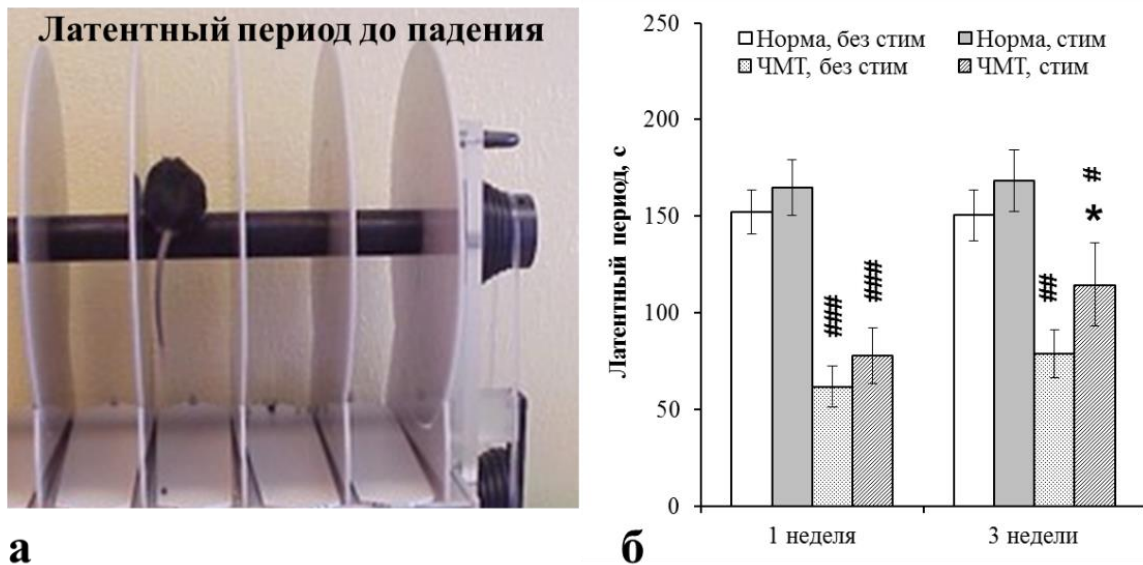
**Рисунок 3.11** – *Схема эксперимента*

На рисунке 3.11 представлена схема эксперимента. Курс анодной стимуляции проводился при помощи программируемого стимулятора STG4008 (Multichannel Systems, Германия) и начинался через 1 или 3 недели после травмы. Анодный хлоридсеребряный концентрический электрод диаметром 5 мм, смазанный проводящим гелем, располагался на темени животного, катодный – на грудной клетке. Животные стимулировались на протяжении четырёх недель четыре дня в неделю с трёхдневным интервалом покоя по 15 минут силой тока 0.1 миллиампер, в группе ложностимулированных ток через электроды не пропускаться. Все группы животных подверглись эквивалентному тестированию моторных и когнитивных функций по окончании tDCS (начиная через 3 дня после последней стимуляции).

### **3.5.1 Сенсорно-моторная координация и выносливость**

Сенсорно-моторная координация и выносливость животных оценивалась методом Ротарод по способности балансировать на вращающемся с ускорением барабане (Hamm et al., 1994). Впервые эта методика тестирования была применена на грызунах в 1957 году N.W. Dunham и является классическим тестом оценки моторного дефицита (Dunham, 1957). Тестирование проводилось на установке Rotor-rod, контролируемой программным обеспечением Gemini (San Diego Instruments, США). Мыши были подвержены претренингу за одну неделю до ЧМТ. Животные помещались на неподвижный ротор, который начинал вращение с

ускорением, что провоцировало их падение с установки, при этом автоматически регистрировались такие показатели, как максимальная скорость вращения и время, проведенное животным на вращающемся роторе. Время падения животного на платформу под ротором регистрировалось при помощи фотоэлектрических датчиков.



**Рисунок 3.11** – (а) Установка для оценки сенсорно-моторной функции методом Ротарод. (б) Латентный период падения с вращающегося ротора увеличился после 4-недельного курса анодной *tDCS*; \* $p < 0,05$  от до стимуляции, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  от интактной группы.

В ходе исследования было выявлено, что латентный период падения с ротора составлял  $152,2 \pm 11,6$  секунд в контрольной группе с ложной стимуляцией, начатой через одну неделю после нанесения ложной травмы и  $150,4 \pm 13,4$  секунд через 3 недели после нанесения ложной травмы. Анодная стимуляция увеличивала эти значения до  $164,7 \pm 14,3$  секунд в контрольной группе, в которой стимуляция начиналась через одну неделю после получения ложной травмы и  $168,3 \pm 16,1$  секунд в контрольной группе, в которой стимуляция начиналась через три недели после получения ложной травмы, однако разница была статистически недостоверна.

Во обеих группах травмированных мышей было выявлено нарушение моторной координации в сравнении с контрольными. При этом тяжесть нарушений снижалась с течением времени после ЧМТ, так в ложностимулированной группе через одну неделю после получения травмы латентный период падения с ротора составил  $61,8 \pm 10,7$  секунд ( $p < 0,01$ ), тогда как в ложностимулированной группе через три недели после получения травмы  $78,8 \pm 12,5$  секунд ( $p < 0,01$ ) в сравнении с контрольными значениями. Анодная tDCS статистически достоверно улучшала показатели сенсорно-моторной координации в группе, где стимуляция начиналась через 3 недели после травмы - латентный период падения с ротора составил  $114,6 \pm 21,5$  секунд ( $p < 0,05$ ). В группе мышей с ЧМТ, в которой курс стимуляции начинался через одну неделю после травмы, улучшение было статистически недостоверным и латентный период падения с ротора составил  $77,9 \pm 14,3$  секунд.

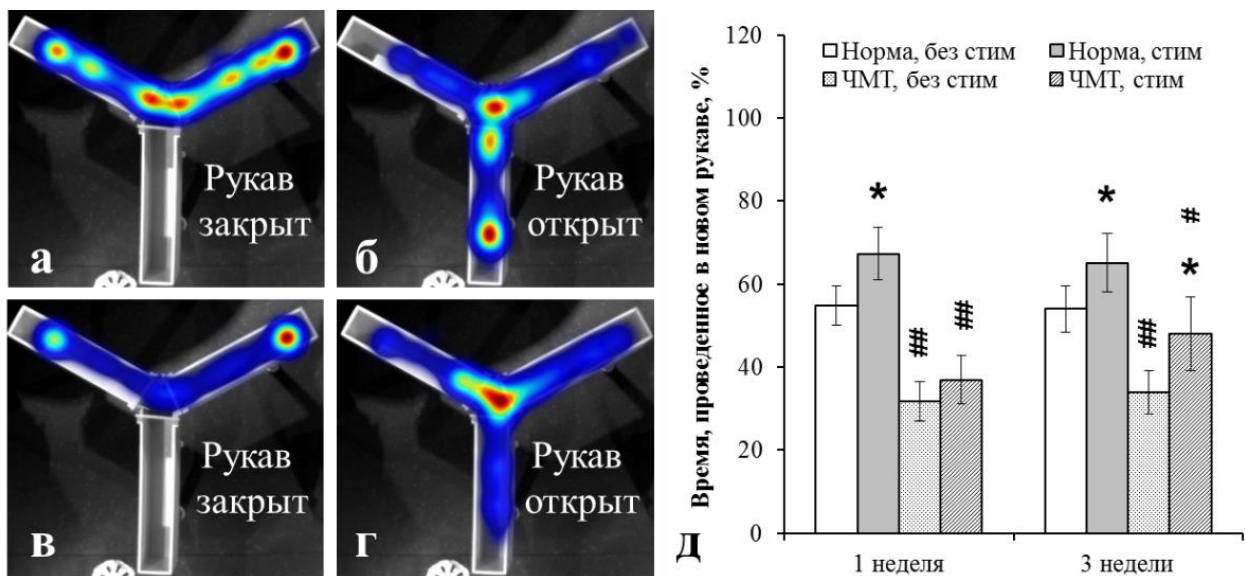
Таким образом, во всех четырёх стимулированных группах наблюдалась тенденция к улучшению сенсорно-моторных функций, однако статистически достоверный уровень был достигнут только у ЧМТ группы, в которой курс стимуляции был начат через 3 недели после травмы, в позднем посттравматическом периоде.

### **3.5.2 Пространственная рабочая память**

Пространственная рабочая память, спонтанная альтерация и способность к исследовательскому поведению оценивалась в Y-образном лабиринте. Впервые эта методика была использована на животных Dember и Fowler и является незаменимым и точным инструментом для исследования и измерения пространственной рабочей памяти (Dember et al., 1958; Hughes, 2004). Устройство представляет собой Y-образный лабиринт с тремя рукавами длиной 50 см, расположенными под углом  $120^\circ$ . Во время первой сессии каждое животное помещалось в центр лабиринта, в котором один из трех рукавов был перекрыт перегородкой (Рисунок 3.12а,в) и оно имело возможность свободно перемещаться по двум рукавам в течение пяти минут. Над лабиринтом располагалась



повешенная видеокамера для видеорегистрации всех проведенных сессий, контролируемая программным обеспечением EthoVision XT (Noldus, США), предназначенным для регистрации поведения и обработки результатов. Интактные мыши обладают врождённой склонностью к исследованию нового окружающего пространства, что отображено на рисунке 3.12а, где красный цвет на построенной псевдоцветной тепловой карте указывает на высокую активность животных, синий – на низкую.



**Рисунок 3.12** – (а) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений интактной мыши, показывающая активное исследование обоих рукавов (б) Также животное при открытии нового рукава активно исследует новое пространство. (в) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений мыши с ЧМТ. Животное малоактивно. (г) Также животное при открытии нового рукава. Животное малоактивно и заходит во все рукава с одинаковой частотой, что свидетельствует о нарушении рабочей пространственной памяти. (д) Четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшает рабочую пространственную память. Время, проведённое в новом рукаве, увеличилось во всех группах; \* $p < 0,05$  от ложностимулированных, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  от контроля.

При неврологических нарушениях, как например, вызванных ЧМТ, животные меньше склонны к исследованию пространства, как это показано на рисунке 3.12б. Во время второй сессии, проводимой через 30 минут, перегородка убиралась и грызуны имели возможность исследовать новое незнакомое им пространство (Рисунок 3.12б,г). При этом если пространственная память не нарушена, животные будут исследовать преимущественно новый рукав (Рисунок 3.12б), если нет – то все рукава в относительно одинаковой степени (Рисунок 3.12г). В результате анализа видеорегистраций всех сессий было посчитано общее число выбранных рукавов и число спонтанных альтераций (т.е. случаев, где предыдущие два варианта выбранных рукавов отличались от третьего).

Анализ полученных данных показал, что мыши из контрольных групп с ложной стимуляцией проводили  $54,8 \pm 4,8\%$  от общего времени в новом рукаве (Рисунок 3.12д). В группах контрольных мышей с анодной стимуляцией эти показатели были выше и составили  $67,3 \pm 6,3\%$  и  $65,1 \pm 7,0$  от общего времени тестирования,  $p < 0,05$ .

Результаты тестирования показали нарушение пространственной рабочей памяти во обеих группах ложностимулированных мышей с ЧМТ в сравнении с контрольными ложностимулированными группами. При этом в группе ЧМТ с началом курса ложной стимуляции через одну неделю после травмы время, проведенное в новом рукаве, составило  $31,8 \pm 4,8\%$  от общего времени ( $p < 0,01$ ), тогда как в ЧМТ группе с началом ложной стимуляции через три недели после получения травмы  $34 \pm 5,2\%$  от общего времени в сравнении с контрольными группами ( $p < 0,01$ ). Анодная стимуляция улучшала пространственную память в группе мышей с ЧМТ, у которых курс стимуляции начинался через 3 недели после травмы; время, проведенное в новом рукаве, составило  $48,1 \pm 8,9\%$  от общего времени тестирования ( $p < 0,05$ ). В группе травмированных мышей, в которой курс стимуляции начинался через одну неделю после травмы, улучшение не было статистически достоверным и составило  $37 \pm 5,9\%$  от общего проведенного

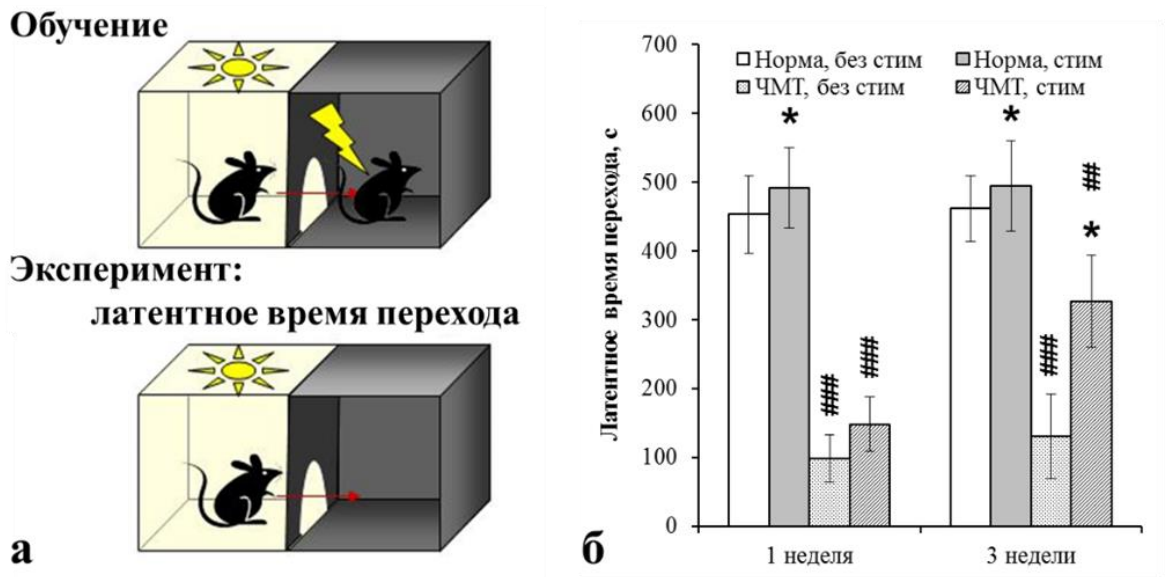
времени. Таким образом, четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшал пространственную рабочую память как у контрольных мышей, так и у мышей в позднем посттравматическом периоде.

### **3.5.3 Способность к обучению и функциональная память**

Для оценки способности к обучению использовалась методика Условного Рефлекса Пассивного Избегания (УРПИ). Методика основана на теории классического обусловливания И.П. Павлова. Выработка условного рефлекса избегания осуществлялась в камере Gemini Avoidance System, контролируемой программным обеспечением (San Diego Instruments, США). Камера состоит из двух сообщающихся отсеков – освещённого и тёмного, которые разделяются закрываемой заслонкой между ними. Эксперимент состоял из нескольких этапов: привыкание, обучение и эксперимент и осуществлялся за два дня. В первый день мышь помещалась в центр освещённого отсека для привыкания на три минуты, заслонка между отсеками была открыта и животное, повинаясь врожденному инстинкту предпочтения, перебежало в тёмный отсек. На следующем этапе обучения животное опять помещалось в освещённый отсек и когда перебежало в тёмный, то подвергалось там однократному шоку электрическим током (0,5 мА) длительностью пять секунд через металлическую решётку пола. Предполагается, что у мыши должен выработаться рефлекс избегания тёмного отсека, что идёт вразрез с естественными предпочтениями грызунов. Во время эксперимента мышь повторно помещалась в освещённый отсек через 24 часа после обучения, через 30 секунд заслонка между отсеками открывалась и латентное время перехода (ЛВП) в затемнённый отсек регистрировалось в течение 10 минут (Рисунок 3.13а) (Whiting et al., 2006). Животные с интактной памятью и обучаемостью оставались в освещённом отсеке, или перебежали в тёмный отсек значительно позже, чем животные с нарушениями памяти.

В ходе эксперимента было выявлено, что ЛВП у контрольных ложностимулированных мышей составило  $452,4 \pm 56,6$  и  $461,1 \pm 47,9$  секунд

(Рисунок 3.13б). Как показали результаты контрольных групп со стимуляцией, анодная tDCS способствовала увеличению показателей ЛВП до  $491,6 \pm 58,7$  секунд в группе с началом курса tDCS через одну неделю после получения ложной травмы и до  $493,7 \pm 65,3$  секунд в группе, в которой курс tDCS начинался через три недели после получения ложной травмы, в обоих случаях отличия от нестимулированных групп были статистически достоверны ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 3.13** – (а) Схема теста на условный рефлекс пассивного избегания. (б) Четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшает способность к обучению и память. Латентное время перехода увеличилось после tDCS; \* $p < 0,05$  от ложностимулированных, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  от контроля.

В обеих нестимулированных группах с ЧМТ наблюдались значительно нарушенные функциональная память и способность к обучению в сравнении с контрольными группами, так как ЛВП было значительно меньше ( $p < 0,001$ ). При этом в группе с началом курса стимуляции через 1 неделю после травмы, ЛВП составило  $97,9 \pm 34,8$  секунд, тогда как в группе с началом курса стимуляции через 3 недели после травмы -  $130,5 \pm 60,9$  секунд (Рисунок 3.13б). Улучшение ЛВП во

второй группе может быть объяснено естественным процессом восстановления памяти в группе, протестированной на две недели позже.

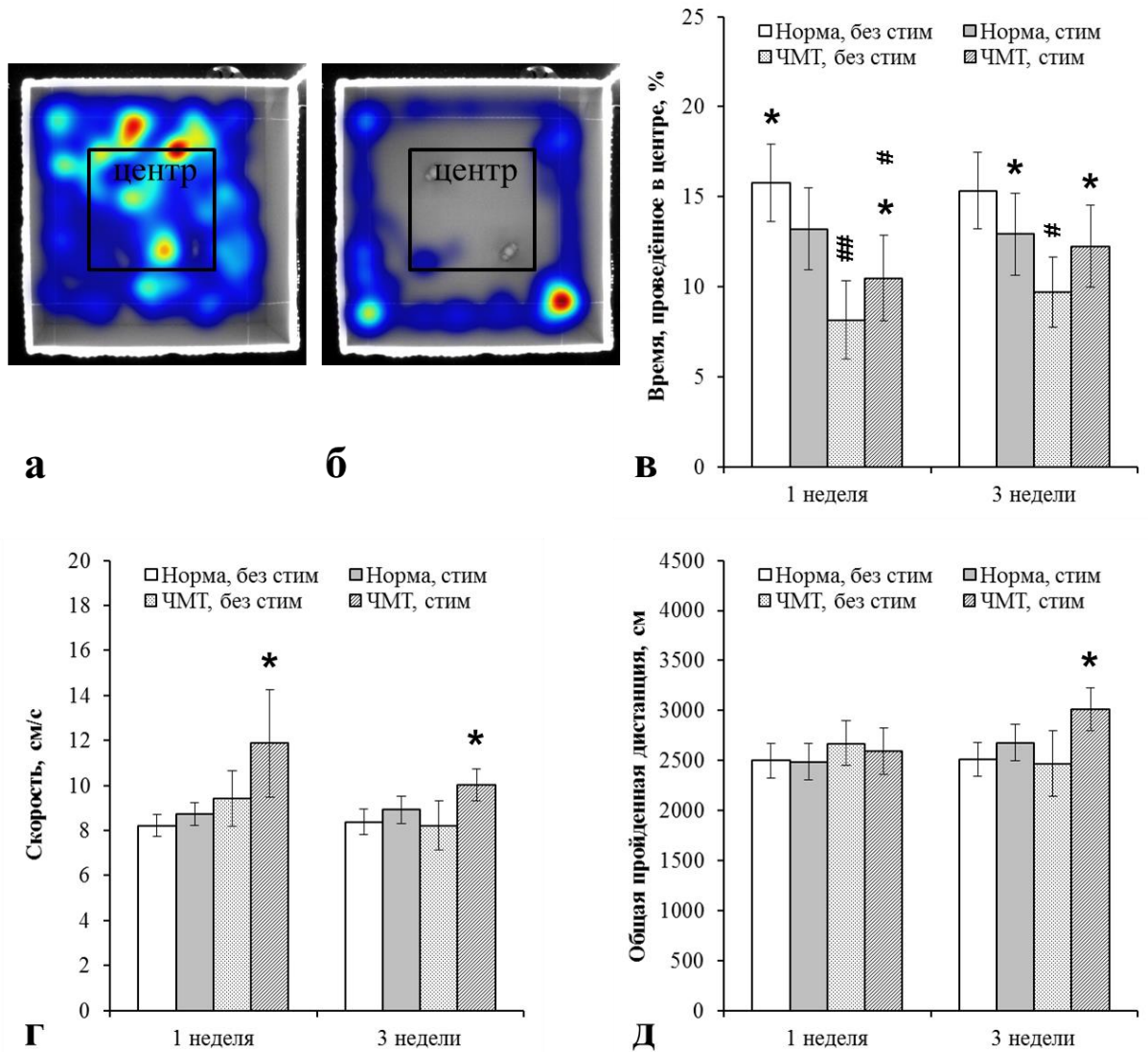
Результаты в группе ЧМТ с началом курса стимуляции через 3 недели после травмы были значительно лучше, чем в соответствующей группе ложностимулированных, ЛВП составило  $326,3 \pm 67,4$  секунд,  $p < 0,05$  (Рисунок 3.13б). В группе травмированных мышей, в которой курс стимуляции начинался через одну неделю после травмы, статистически достоверных изменений не было выявлено, хотя ЛВП было заметно выше  $147,9 \pm 39,2$  секунд. Таким образом результаты УРПИ показывают, что анодная tDCS улучшает способность к обучению и функциональную память у интактных животных и у мышей в позднем посттравматическом периоде.

#### **3.5.4 Уровень тревожности**

Уровень тревожности оценивался при помощи теста «Открытое поле» посредством определения уровня двигательной активности мышей на новой незнакомой арене. Тестирование проводили на открытой арене размером 60 см x 60 см, над которой располагалась подвешенная видеокамера для регистрации передвижения, контролируемая программным обеспечением EthoVision XT (Noldus, США), предназначенным для регистрации и обработки результатов. По результатам эксперимента были рассчитаны такие параметры, как общая пройденная дистанция, скорость перемещения и время, проведенное в центре арены. Мышь помещалась в центр арены и её передвижения регистрировались в течении 5 минут.

На рисунке 3.14а показана типичная тепловая карта активности интактной мыши, на которой видно, что животное не избегает центра арены. Процент общего проведенного времени в центре у контрольных нестимулированных животных составил  $15,8 \pm 2,2\%$  и  $15,3 \pm 2,1\%$ . Анодная стимуляция не вызывала значительных изменений времени, проведенного в центре арены и составило  $13,2 \pm 2,3\%$  и  $12,9 \pm$

2,3 % для группы с началом курса стимуляции через одну и три недели после ложной травмы, соответственно (Рисунок 3.14в).



**Рисунок 3.14** – (а) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений интактной мыши. (б) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений мыши после ЧМТ, показывающая, что мышь избегает центр арены. (в) Время, проведённое в центре арены. (г) Скорость передвижения. (д) Общая пройденная дистанция; \* $p < 0,05$  от ложностимулированных, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  от контроля.

На рисунке 3.14б показана типичная тепловая карта активности мыши, перенёвшей травму, на которой видно, что животное избегает центр арены, что может говорить о ситуативной тревожности. Процент общего проведённого

времени в центре составил  $8,2 \pm 2,1\%$ ,  $p < 0,01$  и  $9,7 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,05$  для группы с началом курса стимуляции через одну и три недели после ложной травмы, соответственно (Рисунок 3.14в). Результаты теста стимулированных групп ЧМТ показали существенно увеличенное время, проведённое в центре арены, процент общего проведенного времени в центре составил  $10,6 \pm 2,4\%$  и  $12,4 \pm 2,3\%$  для группы с началом курса стимуляции через одну и три недели после ложной травмы, соответственно,  $p < 0,05$  для обеих групп (Рисунок 3.14в).

Скорость перемещения животных во всех нестимулированных группах была практически одинакова:  $8,2 \pm 0,5$  и  $8,4 \pm 0,5$  см/с в контрольных группах и  $9,3 \pm 1,2$  и  $8,2 \pm 1,1$  см/с в травмированных группах, для групп с началом курса стимуляции через одну и три недели после ложной травмы или ЧМТ, соответственно (Рисунок 3.14г). Анодная tDCS не изменила показатели скорости в обеих контрольных группах: так в группе, в которой курс стимуляции начинался через одну неделю после ложной травмы, она составила  $8,7 \pm 0,5$  см/с, а через три недели –  $8,9 \pm 0,6$  см/с. Однако у травмированных мышей, tDCS значительно увеличила скорость перемещения:  $11,9 \pm 2,4$  см/с и  $10,0 \pm 0,7$  см/с, для группы с началом курса стимуляции через одну и три недели после ЧМТ, соответственно,  $p < 0,05$  (Рисунок 3.14г).

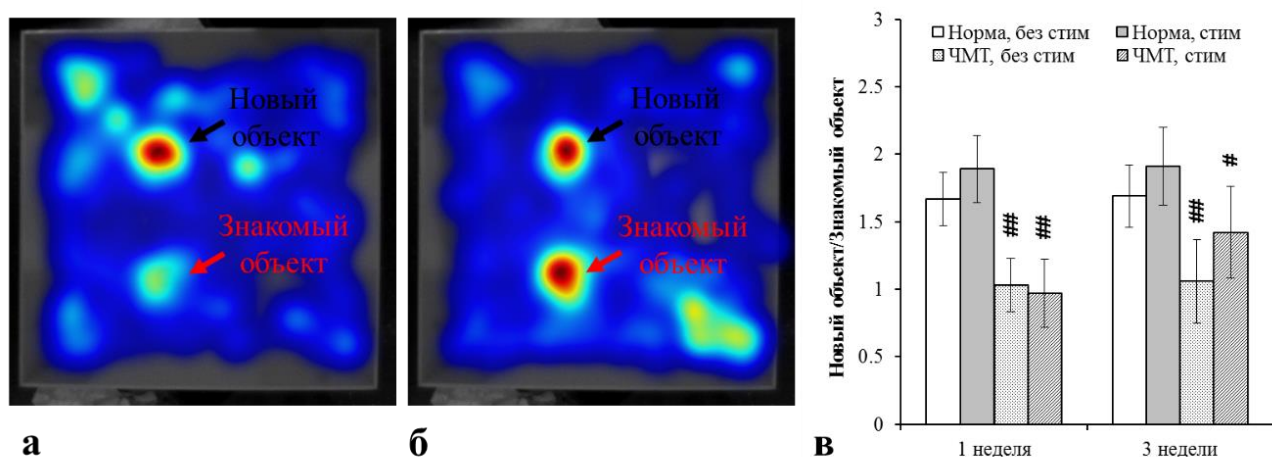
Общая пройденная дистанция также мало отличалась между группами и составляла –  $2498,1 \pm 175,4$  см и  $2512,8 \pm 182,8$  см в контрольных группах и  $2672,6 \pm 221,2$  см и  $2467,4 \pm 328,2$  см в травмированных группах, для групп с началом курса стимуляции через одну и три недели после ложной травмы или ЧМТ, соответственно (Рисунок 3.14д). Анодная tDCS не изменила пройденное расстояние в обеих контрольных группах: так в группе, в которой курс стимуляции начинался через одну неделю после ложной травмы, она составила  $2487,2 \pm 179,5$  см и через три недели –  $2677,9 \pm 182,8$  см (Рисунок 3.14д). Анодная tDCS статистически достоверно увеличивала пройденное расстояние в группе ЧМТ, в которой курс стимуляции начинался через 3 недели после травмы, дистанция

составила  $3010,9 \pm 211,8$  см ( $p < 0,05$ ). В группе мышей с ЧМТ, в которой курс стимуляции был начат через одну неделю после травмы, изменения были незначительными и статистически недостоверными –  $2597,5 \pm 232,4$  сантиметров (Рисунок 3.14д).

### **3.5.5 Кратковременная когнитивная память**

Кратковременная когнитивная память оценивалась при помощи теста распознавания нового объекта, который проводился согласно описанию Oliveira (Oliveira et al., 2010). Тест проводился на арене размером 60 см x 60 см в три этапа: привыкание, обучение и тестирование, осуществляемых в течение 3 дней. Первый этап совмещался с тестом открытое поле, где животных помещали на арену на 10 минут для оценки уровня тревожности и привыкания. На второй день животных помещали на ту же арену на 10 минут, где располагались два аналогичных объекта на равном расстоянии друг от друга и от стенок для обучения и исследования. На третий день животных помещали на 10 минут на арену с одним знакомым и одним новым объектами, которые отличались по форме и текстуре. Система слежения EthoVision XT (Noldus, США) использовалась для расчета процента времени, потраченного на исследование незнакомого объекта. Предполагается, что животное с интактной памятью во время тестирования потратит больше времени на исследование нового объекта (Рисунок 3.15а), тогда как животное с нарушениями памяти потратит сопоставимое время на оба объекта (Рисунок 3.15б). После анализа полученных данных были получены коэффициенты соотношения времени потраченного на новый объект к старому, где чем больше коэффициент, тем больше времени потрачено на новый объект, а следовательно, когнитивные функции лучше.





**Рисунок 3.15** – (а) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений интактной мыши при тестировании. Видно, что мышь больше времени проводит, исследуя незнакомый объект (б) Типичная псевдоцветная тепловая карта передвижений мыши после ЧМТ, показывающая нарушения памяти, так как мышь исследует оба объекта в относительно одинаковой степени. (в) Курс анодной стимуляции не вызвал статистически значимых изменений когнитивной памяти, хотя тренд к улучшению в некоторых группах наблюдался; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  от контроля.

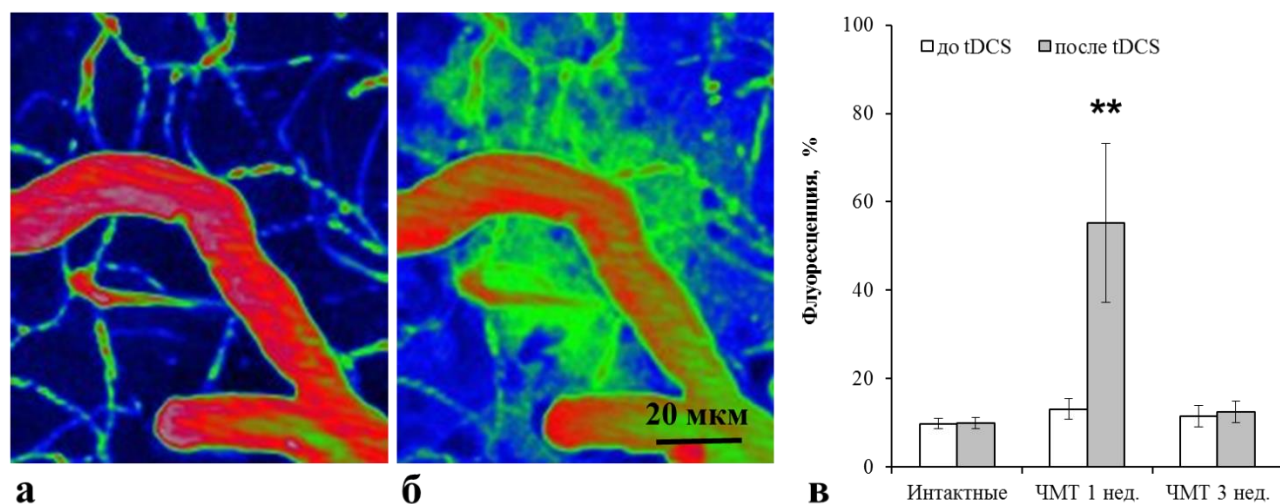
В обеих контрольных группах соотношение новый объект/знакомый объект составило  $1,7 \pm 0,2$ . После анодной стимуляции в обеих контрольных группах эти значения незначительно увеличились до  $1,9 \pm 0,3$ , однако разница была статистически недостоверна в обоих случаях. Тестирование показало функциональное нарушение памяти и когнитивных функций в обеих группах мышей с ЧМТ в сравнении с контрольными группами: соотношение новый объект/знакомый объект составило  $1,0 \pm 0,2$  ( $p < 0,01$ ) и  $1,1 \pm 0,3$  ( $p < 0,01$ ) в сравнении с контролем, в группе с началом курса стимуляции через одну и три недели после ЧМТ, соответственно (Рисунок 3.15в). После анодной tDCS наблюдался тренд улучшения показателей памяти и когнитивных функций в группе, в которой курс стимуляции начинался через 3 недели после травмы, соотношение новый объект/знакомый объект составило  $1,4 \pm 0,3$ , однако

результаты были статистически недостоверны. В группе травмированных мышей, в которой курс стимуляции был начат через одну неделю после травмы, значительных изменений не наблюдалось, соотношение новый объект/знакомый объект составило  $1,0 \pm 0,3$  (Рисунок 3.15в).

### 3.6 Влияние анодной tDCS на гематоэнцефалический барьер

В предыдущей главе мы показали, что четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшает моторные и когнитивные показатели как у интактных мышей, так и у мышей, перенёсших ЧМТ. Динамика улучшения у мышей, перенёсших ЧМТ, была более позитивна после четырёхнедельного курса анодной tDCS, начатого в позднем посттравматическом периоде (3 недели после ЧМТ), чем в раннем посттравматическом периоде (1 неделя после ЧМТ). Причина этого различия осталась не выяснена, однако можно предположить, что в более ранний посттравматический период патофизиологические процессы всё ещё находятся в активной фазе. В том числе и перестройка церебральной сосудистой системы. Как известно, в стрессовых и постстрессовых состояниях гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), обеспечивающий разграничение кровяного русла и тканей мозга, становится более проницаемым и состояние проницаемости ГЭБ может служить маркером стресса. С целью оценки проницаемости ГЭБ мы использовали *in vivo* ДФЛСМ.

Проницаемость ГЭБ оценивали путем измерения динамики флуоресценции периваскулярной ткани головного мозга на уровне 50 мкм от пиальной поверхности в течение 15 мин после интравенной инъекции 5% раствора флуоресцеин-декстрана (150 кДа), как описано в предыдущих работах (Bragin et al., 2011, Bragin et al., 2016). С использованием ImageJ была проанализирована флуоресценция 10 случайно выбранных сосудов и 10 регионов периваскулярной паренхимы мозга на каждом изображении. Используя модифицированный протокол анализа данных, полученные в интерстициальном пространстве, значения были нормализованы к максимальной интенсивности флуоресценции в кровеносных сосудах и выражены, как процент интенсивности флуоресценции (Egawa et al., 2013).



**Рисунок 3.16** – (а) Псевдоцветная микрофотография, показывающая яркие микрососуды, заполненные красителем и тёмную паренхиму головного мозга с интактным ГЭБ. (б) Микрофотография той же области, показывающая снижение флуоресценции в сосудах и увеличение в приваскулярной паренхиме из-за экстравазации декстрана вследствие увеличения проницаемости ГЭБ. (в) График, иллюстрирующий увеличение проницаемости ГЭБ в группе, в которой анодная стимуляция была начата через 1 неделю после ЧМТ; \*\*  $p < 0,01$ .

В ходе эксперимента было показано, что до стимуляции ГЭБ во всех трёх группах был интактным: через 15 минут после инъекции флуоресценция составила  $9,8 \pm 1,2$ ,  $13,5 \pm 2,3$  и  $11,5 \pm 2,5\%$  в интактной, 1-недельной ЧМТ и 3-недельной ЧМТ группах, соответственно. Однако после анодной tDCS, в группе, в которой стимуляция была начата через 1 неделю после травмы, флуоресценция увеличилась до  $55,2 \pm 18,1\%$ ,  $p < 0,01$ , что отражает повышение проницаемости ГЭБ. При этом в интактной группе и группе с началом стимуляции через 3 недели после ЧМТ, ГЭБ оставался интактным:  $9,9 \pm 1,3$  и  $12,5 \pm 2,4\%$ , соответственно. Таким образом, можно предположить, что в раннем посттравматическом периоде ГЭБ более подвержен проницаемости вследствие активно протекающих вторичных патофизиологических процессов. Тогда как ГЭБ в интактном мозге и мозге в позднем посттравматическом периоде, где основные активные патологические

изменения завершены, нечувствителен к tDCS. Вероятно, что в раннем посттравматическом периоде tDCS является дополнительным стрессом, вызывающим проницаемость ГЭБ, ведущую к усилению текущих патофизиологических процессов и снижению позитивного эффекта стимуляции.

## ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью данных исследований являлось изучение механизмов физиологических изменений церебральной микроциркуляции и метаболизма головного мозга мышей при воздействии анодной транскраниальной стимуляции постоянным током, а также оценка влияния четырёхнедельного курса tDCS на изменение когнитивных и моторных неврологических показателей у интактных и перенёсших ЧМТ мышей.

### *I - Непосредственные физиологические эффекты анодной tDCS*

Для достижения поставленной цели на первом этапе данной работы были изучены непосредственные эффекты 15-минутной анодной tDCS с интенсивностью 0,1 мА на глобальный церебральный кровоток (МРТ), региональный кровоток в коре головного мозга (ЛСВ) и микроциркуляцию на уровне капилляров и артериол (ДФЛСМ). Параллельно была изучена взаимосвязь изменений микроциркуляции с тканевой оксигенацией и дыханием митохондрий; влияние на реактивность артериол и церебральную ауторегуляцию, а также проницаемость гематоэнцефалического барьера (ДФЛСМ). Таким образом, были изучены tDCS-индуцированные изменения циркуляции и метаболизма *in vivo* на всех уровнях организации: органном (МРТ), тканевом (ЛСВ) и микроскопическом (ДФЛСМ).

Результаты исследований показали, что анодная tDCS вызывает дилатацию церебральных артериол через активацию системы синтеза NO, что ведёт к увеличению объёмного кровотока в артериолах и увеличению прекапиллярного давления. Последнее усиливает скорость эритроцитов (кровоток) в капиллярах, что улучшает доставку кислорода к тканям мозга и увеличивает активность митохондрий. В работах других авторов было показано усиление кровотока после tDCS, однако исследования были проведены методами с низким пространственным разрешением, не позволяющими оценить физиологические изменения количественно (Wachter et al., 2011; Mielke et al., 2013), или показать динамику

изменений (Saiote et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2015). Насколько нам известно, это первая работа, показывающая, что механизмом усиления кровотока является дилатация артериол. Фох показал фокальную долговременную дилатацию базилярной артерии у собак при стимуляции постоянным током (Fox et al., 1974), однако данное воздействие не может считаться транскраниальным.

Как мы показали, дилатация артериол при tDCS происходит, как минимум частично, вследствие действия оксида азота, синтезируемого эндотелиальными синтазами оксида азота. Данный физиологический эффект стимуляции также продемонстрирован впервые. Однако в исследованиях других групп на клеточных культурах, были показаны изменения в эндотелиальных клетках, вызываемые стимуляцией постоянным током (Zhao et al., 2004; Song et al., 2007; Long et al., 2011), в том числе секреция оксида азота (Bai et al., 2011). В предыдущей работе мы наблюдали NO-зависимое расширение артериол при воздействии импульсного электромагнитного поля (Bragin et al., 2015), однако использованный ингибитор не обладал специфичностью к определённому типу NOS и конкретный источник NO остался не выявленным. Изучение механизма, по которому происходит активация eNOS осталось за рамками данного исследования. Можно предположить два возможных механизма: 1) tDCS может вызывать перераспределение ионов в клетках эндотелия сосудов, в частности увеличивать концентрацию внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , который через активацию кальмодулина высвобождает и активирует eNOS (Zhu et al., 2016); 2) tDCS может повышать напряжение сдвига кровотока (shear stress) в артериолах, 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 (Dimmeler et al., 1999; Ulker et al., 2009).

Усиление капиллярного кровотока улучшает оксигенацию тканей мозга, что было выявлено при помощи *in vivo* ДФЛСМ, показавшей снижение

аутофлуоресценции НАД-Н после tDCS. В других работах было опосредованно показано увеличение оксигенации при помощи функциональной МРТ (Baudewig et al., 2001; Lang et al., 2005; Jang et al., 2009; Merzagora et al., 2010) и инфракрасной спектроскопии (Ishikuro et al., 2014; Sood et al., 2016; Takai et al., 2016), недостатком данных методов является низкое пространственное разрешение, не позволяющее визуализировать взаимосвязь с изменениями микроциркуляции. Преимущество метода измерения аутофлуоресценции НАД-Н не только в возможности неинвазивной оценки оксигенации тканей в режиме реального времени, но и в возможности оценить оксигенацию митохондрий, где парциальное давление кислорода составляет менее 1 мм ртутного столба, в сравнении 23 мм ртутного столба в тканях мозга (Chance et al., 1973), что позволяет оценить активность митохондрий и насыщение кислорода в точке его потребления. Кислород распространяется от капилляров к паренхиме мозга исключительно путем диффузии, поэтому локальное насыщение ткани кислородом обратно пропорционально расстоянию от капилляра (Kasischke et al., 2011), как это видно на рисунке 3.8.

Увеличение кровотока и метаболической активности, показанные при помощи функциональной МРТ (Baudewig et al., 2001; Lang et al., 2005; Jang et al., 2009; Merzagora et al., 2010) и инфракрасной спектроскопии (Ishikuro et al., 2014; Sood et al., 2016; Takai et al., 2016), связаны с нейроваскулярным сопряжением. Под нейроваскулярным сопряжением подразумевается изменение локального церебрального кровотока и оксигенации мозга в соответствии с активацией и изменением метаболических потребностей нейронов (Ostergaard et al., 2014). Регуляция оксигенации мозга, необходимой для поддержания метаболической активности нейронов на определённом уровне, осуществляется за счёт увеличения или снижения регионального объема циркулирующей крови в результате констрикции или дилатации сосудов. Реактивность сосудов, то есть степень дилатации/констрикции и время реакции, является важным физиологическим



механизмом регуляции микроциркуляции. В наших исследованиях гиперкапнический тест показал увеличение реактивности сосудов при неизменном уровне НАД-Н в интактном мозге. Полученные данные подтверждают активирующее влияние tDCS на нейроваскулярное сопряжение, так как в ответ на снижение кислорода, за счёт увеличения углекислого газа в поступающей крови в мозг, произошла более выраженная компенсационная дилатация. При этом уровень НАД-Н, оксигенация ткани и активность нейронов остались на том же уровне.

Как показали наши исследования, диаметр артериол и кровотоков в периконтузионной зоне травмированного мозга были значительно меньше, чем в интактном, а уровень оксигенации тканей мозга достигал гипоксического уровня. Это соотносится с литературными данными клинических и экспериментальных исследований (Pop et al., 2011; Badaut et al., 2014; Bramlett et al., 2015).

Как известно, за первичной ЧМТ следуют вторичные осложнения, включая контузию, снижение мозгового кровотока, отек головного мозга, нарушение гематоэнцефалического барьера, кровоизлияние и снижение церебральной скорости метаболизма кислорода (Schroder et al., 1995; Steiner, et al., 2003; Walker et al., 2013). Гемодинамические изменения в ЦК после ЧМТ характеризуются вазоконстрикцией, вазоспазмом и микротромбозом (Stein et al., 2004). Посттравматический тромбоз микрососудов и стазис капиллярного русла развиваются по разным причинам, включая: аномальную активацию и накопление тромбоцитов (Dietrich et al., 1994; Dietrich et al., 1998), увеличение адгезии лейкоцитов (Keskil et al., 1994), повышенную вязкость крови, компрессию капилляров вследствие набухания лапок астроцитов и сжатия перицитов (Ostergaard et al., 2014).

Структурные повреждения после ЧМТ вызывают нарушения церебрального кровотока, снижение которого приводит к депривации кислорода и доставки глюкозы, что снижает метаболизм в мозге животных (Yamakami et al., 1991; Engel et al., 2008) и человека (Boima et al., 1992) и может рассматриваться как ишемия

(Bramlett et al., 2004; Engel et al., 2008; Algattas et al., 2014). Посттравматическая ишемия инициирует каскад вторичных повреждений (Prins et al., 2013) и патологических процессов (Hovda et al., 1995), которые развиваются в течение длительного времени (Martini et al., 2013) и заканчиваются обширной гибелью нейронов и последующими неврологическими нарушениями (Marion et al., 1991; Rink et al., 1995; Walker et al., 2013; Algattas et al., 2014).

Так как мозг является высокоаэробным, требовательным к энергии органом, который зависит от активности митохондрий и непрерывной доставки кислорода, одним из последствий ишемии является гипоксия. Гипоксия мозга вызывает накопление цитозольного кальция его избыточную абсорбцию митохондриальными мембранами (Sciamanna et al., 1992), что приводит к дисфункции митохондрий (Verweij et al., 2000), нарушению баланса окисленной и восстановленной формы НАД в мембране митохондрий и приводит к накоплению НАД-Н. Этот дисбаланс приводит к снижению скорости аэробного метаболизма, снижению генерации энергии (Marklund et al., 2006), сдвигу аэробного метаболизма к анаэробному (Scafidi et al., 2009) и усилению вторичных патофизиологических процессов (Sullivan et al., 1998; Scafidi et al., 2009). Последующее снижение генерации АТФ ведёт к нарушению работы АТФ-зависимых ионных каналов и протеинов (Werner, et al., 2007), развитию воспалительных процессов (Dalgard et al., 2012), пертурбациям кальция (Ahmed et al., 2002; Louin et al., 2004) набуханию митохондрий и деформации крист (Scafidi et al., 2009; Dalgard et al., 2012), заканчивающееся гибелью клеток в результате некроза или апоптоза (Rink et al., 1995).

Также как и в интактном мозге, анодная tDCS вызывала дилатацию артериол, усиливала микроциркуляцию, оксигенацию ткани и вазореактивность в посттравматическом. Однако в отличие от интактного мозга, усиление кровотока происходило от околоишемических значений, а артериолы были изначально в большем тоне, вероятно, вследствие развития элементов вазоспазма.

Характерным явлением после ЧМТ является нарушение церебральной ауторегуляции и вазореактивности. В наших экспериментах гиперкапнический тест показал значительно сниженную по сравнению с интактным мозгом реактивность артериол. Кроме того, во время гиперкапнии происходило накопление НАД-Н, указывающее на усиление гипоксии в этот период. Анодная tDCS улучшала реактивность сосудов, при этом снижение оксигенации ткани во время индуцированной гиперкапнии было значительно меньше.

### *II – Влияние длительного курса на моторные и когнитивные неврологические функции*

На втором этапе данной работы был изучен длительный эффект повторяемой tDCS (4-недельный курс) на неврологический статус интактных мышей и мышей в раннем и позднем посттравматическом периоде. Была использована линейка поведенческих тестов на моторные и когнитивные функции, сопоставимые с таковыми у человека (Xiong et al., 2013).

Исследования показали, что 4-недельный курс анодной tDCS вызывает улучшения моторной функции (Ротарод), пространственной рабочей памяти (Y-образный лабиринт), обучаемости (УРПИ) и снижает ситуативную тревожность (открытое поле).

Преыдушие исследования других авторов показали модулирующее влияние tDCS на моторные и когнитивные функции мышей и крыс. Так было показано улучшение рабочей памяти (Dockery et al., 2011) и моторное обучение (Faraji et al., 2013) у интактных крыс; снижение тревожности и улучшение рабочей и когнитивной памяти у мышей (Pedron et al., 2014; Podda et al., 2016). В наших исследованиях не было выявлено статистически достоверного улучшения когнитивной памяти (тест на распознавание нового объекта), однако в исследованиях Podda стимулировались бодрствующие животные, стимуляция была в 3,5 раза интенсивней (0,35 мА в сравнении с нашими исследованиями – 0,1 мА) и продолжалась 20 минут (15 минут в наших исследованиях) (Podda et al.,

2016). Кроме того, электрод помещался не на кожу головы, а имплантировался под кожу (там же). Таким образом, в работе Podda стимуляция была намного интенсивней за счёт: большей силы тока, продолжительности, меньшего электрического сопротивления (стимуляция через кости черепа, а не через кожу) и отсутствия анестезии.

На сегодняшний день, помимо нашего, было проведено только одно контролируемое исследование влияния курса tDCS на животных после ЧМТ (Yoon et al., 2016). В данной работе изучалось влияние однонедельного курса анодной стимуляции, начатой через 1 или 2 недели после жидкостно-перкусионной ЧМТ на моторную функцию и пространственную рабочую память у крыс. Было показано улучшение обоих параметров в группе, где курс ЧМТ был начат через 2 недели после ЧМТ. В группе с более ранним началом стимуляции наблюдалось менее выраженное улучшение пространственной рабочей памяти (там же). Авторы пришли к такому же выводу, что в более раннем посттравматическом периоде происходят активные патофизиологические изменения, которые снижают эффективность tDCS.

Похожие выводы были получены и на животных моделях ишемического инсульта, где стимуляция в более позднее после инсульта время показывала лучшие результаты, а в более раннем сопровождалась негативными изменениями. Так, у мышей анодная tDCS, применённая в остром периоде через 30 минут после инсульта, усиливала патологические процессы (Peruzzotti-Jametti et al., 2013). У крыс, начатый через один день или одну неделю после инсульта курс tDCS, улучшал пространственную память в обеих группах, а моторные функции только в более поздней группе (Yoon et al., 2012).

Количество клинических исследований эффекта tDCS на пациентах, перенёвших ЧМТ, также ограничено, а результаты противоречивы. Так, Angelakis протестировал влияние двухнедельного курса анодной tDCS на пациентов в минимально сознательном или вегетативном состоянии (Angelakis et al., 2014) и

показал улучшение состояния, измеряемого по шкале Глазго, у всех пациентов в минимально сознательном состоянии. Один пациент перешёл из вегетативного в минимально сознательное состояние, а повторный курс в течение 3 месяцев значительно улучшил состояние пациентов (там же). В другой работе было показано значительное улучшение слуховой памяти у пациентов, перенёсших ЧМТ в течение года (O'Neil-Pirozzi et al., 2016). Однако в работе Lesniak улучшение памяти и внимания у пациентов через 4 - 92 месяца после ЧМТ не достигло статистически достоверных величин (Lesniak et al., 2014). Возможной причиной мог быть большой разброс времени после травмы. Другие исследователи совмещали tDCS с физической терапией или тренировками и получили более значительное и долговременное улучшение неврологических показателей (Middleton et al., 2014; Sacco et al., 2016).

Как показали наши исследования, ГЭБ у интактных животных оказался не чувствителен к tDCS. В недавней работе Shin и др. показали повышение проницаемости ГЭБ у интактных крыс после tDCS интенсивностью 1 мА (Shin et al., 2016). Таким образом, tDCS может повышать проницаемость ГЭБ, однако для интактного мозга требуются запредельная интенсивность tDCS.

В отличие от этого, ГЭБ мозга, подвергнувшегося сильному стрессу или повреждению может быть более чувствителен к tDCS нормальной интенсивности. Как показали наши исследования, применение tDCS через неделю после ЧМТ вызывает увеличение проницаемости ГЭБ, однако через 3 недели после ЧМТ, стимуляция не изменяет проницаемость ГЭБ. Как мы уже писали выше, ЧМТ вызывает повреждение ГЭБ (Некматапанah et al., 1985; Cortez et al., 1989; Dietrich et al., 1994; Algattas et al., 2014). Считается, что ЧМТ вызывает "открытие" ГЭБ в течение первого дня после травмы, что способствует образованию вазогенного отека, при этом открытие ГЭБ считается переходным процессом, которое нормализуется в течение одной-двух недель (Pop et al., 2011). Изменения ГЭБ после ЧМТ могут варьироваться от полного разрыва и утечки до изменения

биохимического и функционального профиля. Таким образом, через неделю после травмы, ГЭБ у мышей находится в нестабильном состоянии и tDCS вызывает повышение проницаемости, что в условиях идущих патофизиологических процессов может негативно сказываться на восстановлении и как минимум снижает эффективность стимуляции.

В целом, результаты исследования показали, что анодная tDCS вызывает активизацию церебрального кровотока и ауторегуляции, ведущие к физиологическим изменениям состояния головного мозга. Пролонгированный курс tDCS значительно улучшает неврологическое состояние, однако активные патофизиологические процессы, происходящие в повреждённом мозге в раннем посттравматическом этапе, могут усиливаться при воздействии tDCS. Дальнейшее активное исследование различных режимов tDCS в норме и патологии является целесообразным для выработки безопасных критериев применения данного вида стимуляции.

## ВЫВОДЫ

1. Анодная транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS, 0,1 мА, 15 минут) вызывает дилатацию церебральных артериол в интактном и травмированном головном мозге мыши, соответственно. Эффект дилатации артериол длится около 2.5 часов и распространяется не меньше, чем на 3 сантиметра от контактной поверхности электрода.
2. Дилатация церебральных артериол после анодной tDCS происходит за счет повышения синтеза оксида азота (NO), так как фармакологическое ингибирование эндотелиальной синтазы NO предотвращает tDCS-индуцированную вазодилатацию.
3. Увеличение объёмного кровотока через артериолы вследствие дилатации после анодной tDCS повышает прекапиллярное давление, что усиливает капиллярную микроциркуляцию в интактном мозге и является механизмом ее восстановления после травмы головного мозга у мышей.
4. Увеличение капиллярного кровотока (скорости эритроцитов) после анодной tDCS повышает насыщение тканей мозга кислородом в интактном и травмированном мозге мыши.
5. Анодная tDCS восстанавливает вазореактивность церебральных артериол и ауторегуляцию мозгового кровообращения в пост-травматический период у мышей.
6. Четырёхнедельный курс анодной tDCS улучшает моторные и когнитивные показатели у мышей, перенёсших черепно-мозговую травму (ЧМТ).
7. Динамика улучшения моторных и когнитивных показателей у мышей, перенёсших ЧМТ, более позитивна после четырёхнедельного курса анодной tDCS, начатого в позднем посттравматическом периоде (3 недели после ЧМТ), чем в раннем посттравматическом периоде (1 неделя после ЧМТ). Возможным объяснением данного факта является tDCS-индуцированная

проницаемость ГЭБ, который находится в нестабильном состоянии вследствие активно протекающих патологических процессов, что приводит к дополнительным нарушениям цереброваскулярного гомеостаза.



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Белкин А.А. Синдром острой церебральной недостаточности как концепция нейрореаниматологии/ А.А. Белкин, Б.Д. Зислин, А.А. Аврамченко// Анестезиол. и реаниматол. – 2008. – Т.2. – С. 4-8.
2. Бехтерева Н.П. Электрическая стимуляция мозга и нервов у человека/ Н.П. Бехтерева, С.В. Медведев, А.Н. Шандурина/ Л.: Наука. – 1990. – С. 261.
3. Вартанян Г.А. Физиологический анализ микрополяризационного воздействия на следовые процессы/ Г.А. Вартанян, М.И. Лохов, Л.А. Попова// Журн. высш. нервн. деят. – 1978. – Вып. 3. – С. 589-597.
4. Волошин Л.В. Эндотелиальная дисфункция при цереброваскулярной патологии/ Л.В. Волошин, В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя// Харьков: Харьковская медицинская академия последипломного образования. – 2006. – С. 92.
5. Гайдар Б.В. Полуколичественная оценка ауторегуляции кровоснабжения головного мозга в норме/ Б.В. Гайдар// Журн. невропатологии и психиатрии. – 2000. – Т. 6. – С. 38.
6. Демченко И.Т. Кровоснабжение бодрствующего мозга/ И.Т. Демченко// Наука. – 1983. – С. 174.
7. Долго-Сабуров В.Б. Молекулярные механизмы функционирования мускариновых холинорецепторов/ В.Б. Долго-Сабуров, Ю.А. Шорохов// М.: ВИНТИ. – 1989. – С. 154.
8. Жулев Н.М. Цереброваскулярные заболевания. Профилактика и лечение/ Н.М. Жулев, В.Г. Пустозеров, С.Н. Жулев// СПб: Невский Диалект. – 2002. – С. 384.
9. Зинчук В.В. Кислородсвязывающие свойства гемоглобина и монооксида азота/ В.В. Зинчук, Н.В. Глуткина// Российский физиологический журнал. – 2013. – № 5. – С. 537-554.

10. Илюхина В.А. Транскраниальная микрополяризация в физиологии и клинике/ В.А. Илюхина, Ю.К. Матвеева, Е.М. Чернышева// СПб: Ин-т мозга человека РАН. – 2006. – С. 192.
11. Инюшкин С.Н. Синдром острой церебральной недостаточности как концепция нейрореаниматологии/ С.Н. Инюшкин, Д.В. Почепко, Е.Н. Рудник, А.С. Солдатов// Анестезиол. и реаниматол. – 2008. – №2. – С. 4-8.
12. Кадыков А.С. Хронические сосудистые заболевания головного мозга. (Дисциркуляторная энцефалопатия)/ А.С. Кадыков, Л.С. Манвелов, Н.В. Шахпаронова// М: ГЭОТАР-Медиа. – 2006. – С. 224.
13. Конради Г.П. Регуляция сосудистого тонуса/ Г.П. Конради// Л.: Наука. – С. 1973.-328.
14. Кравченко Н.А. Регуляция экспрессии эндотелиальной NO–синтазы и дисфункция сосудистого эндотелия при сердечно–сосудистой патологии/ Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш// Цитология и генетика. – 2008. – №4. – С. 69-79.
15. Крыжановский Г.П. Патологические доминанта и детерминанта в патогенезе нервных и психических расстройств/ Г.П. Крыжановский// Журн.невропатол. и психатрии. – 2002. – Т. 102, №3. – С.4-9.
16. Львова О.А. К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы/ О.А. Львова, А.Е. Орлова, В.В. Гусев и др.// Системная интеграция в здравоохранении. – 2010. – №4. – С. 20-34.
17. Малахов В.А. Проблема оксида азота в неврологии./ В.А. Малахов, А.Н. Завгородняя, В.С. Лычко и др// Харьков. – 2009. – С. 242.
18. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота/ И.Ю. Малышев, Е.Б.Манухина/ Биохимия. – 1998. – Т. 63, №7. – С. 992-1006.
19. Манухина Е.Б. Стресс–лимитирующая система оксида азота/ Е.Б. Манухина, И.Ю. Малышев// Росс. физиол. журнал. – 2000. – Т. 86, №10. – С. 1283-1292.

20. Марков Х.М. Оксидантный стресс и дисфункция эндотелия/ Х.М. Марков// Патолог. физиология и эксперим. терапия. – 2005. – №4. – С. 5–9.
21. Маянская С.Д. Артериальная гипертония и дисфункция эндотелия/ С.Д. Маянская, А.А. Попова, Н.Н. Маянская и др.// Вестник современной клинической медицины. – 2009. – Т. 2, №3. – С. 43-47.
22. Окс С. Основы нейрофизиологии/ С. Окс// М.: Мир./ Пер. с англ. – 1969. – С. 234.
23. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия: Причины, механизмы, фармакологическая коррекция/ Н.Н. Петрищев// СПб.: Изд-во СПб ГМУ. – 2003. – С. 181.
24. Полетаев А.Б. Регуляторная метасистема. Иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза/ А.Б. Полетаев, С.Г. Морозов, И.В. Ковалев// М.: Медицина. – 2002. – С. 168.
25. Пятакова Н.В. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме действия лекарственных средств/ Н.В. Пятакова, И.С. Северина// Биомед. химия. – 2012. – Т.58, №1. – С. 32-42.
26. Русинов В.С. Доминанта: электрофизиологическое исследование/В.С. Русинов/М.: Медгиз. – 1969. – С. 23.
27. Семенютин В.Б. Внутримозговые холинергические механизмы регуляции тонуса мозговых сосудов при стандартизированной психической нагрузке/ В.Б. Семенютин// Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2002. – №1. – С. 47-51.
28. Семякина-Глушковская О.В. Загадки природы: живое электричество/ О.В. Семякина-Глушковская// Наука и жизнь. – 2010. №9. – С. 48-54.
29. Сомова Л.М. Оксид азота как медиатор воспаления/ Л.М. Сомова, Н.Г. Плехова// Вестник ДВО РАН. – 2006. – №6. – С. 7-80.

30. Тихомирова О.В. Допплерографическая диагностика в остром периоде ишемического инсульта/ О.В. Тихомирова// СПб: Sky Graphics. – 2000. – С. 90.
31. Тюренков И.Н. Изменение кровотока в различных сосудистых регионах при стимуляции и блокаде синтеза эндогенного оксида азота/ И.Н. Тюренков, А.В. Воронков/ Регион. кровооб. и микроцир. – 2006. – Т.5, №6. – С. 93-95.
32. Хилько В.А. Реактивность мозговых сосудов по данным транскраниальной доплерографии/ В.А. Хилько, Ю.Е. Москаленко, Б.В. Гайдар// Физиол. журн. СССР. – 1989. – Т. 75, №11. – С. 1486 - 1500.
33. Чербак В.М. Иннервация пияльных артерий разного диаметра человека при атеросклерозе/ В.М. Чербак, Ю.И. Пиголкин// Журн. невропатол. и психиатр. – 1988. – №10. – С. 55-58.
34. Шахнович А.Р. Диагностика нарушений мозгового кровообращения: Транскраниальная доплерография/ А.Р. Шахнович, В.А. Шахнович// Москва: Мир. – 1996. – С. 446.
35. Шелякин А.М. Микрополяризация мозга/ А.М. Шелякин, Г.Н. Пономаренко// Теоретические и практические аспекты. Санкт-Петербург. – 2006. – С. 224.
36. Шелякин А.М. Применение локального постоянного тока в эксперименте и клинике/ А.М. Шелякин, И.Г. Преображенская, О.В. Богданов// Журн. неврол. и психиатр. – 2001. – №8. – С. 62-64.
37. Шмидт Р.Т. Физиология человека/ Р.Т. Шмидт, Г. Тевс// – Том 2. – Костюк. П.Г. (ред). – Москва: Мир. – 1996. – С. 333-641.
38. Шостақ В.И. Физиология психической деятельности человека/ В.И. Шостақ, С.А. Лытаев// СПб: Деан. – 1999. – С. 128.
39. Ahmed S.M. NMDA receptor activation contributes to a portion of the decreased mitochondrial membrane potential and elevated intracellular free calcium in

- strain-injured neurons/ S.M. Ahmed, J.T. Weber, S. Liang, K.A. Willoughby, H.A. Sitterding, B.A. Rzigalinski, E.F. Ellis// *J Neurotrauma*. – 2002. – Vol. 19, №12. – P. 619-1629.
40. Alberts M.J. Hyperacute stroke therapy with tissue plasminogen activator/ M.J. Alberts// *Am J Cardiol*. –1997. –Vol. 80, №4C. – P. 29–34.
41. Algattas H. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury/ H. Algattas and J.H. Huang// *Int J Mol Sci*. – 2014. – Vol. 15, №1. – P. 309-341.
42. Allen B.W. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO–hemoglobin paradigm/ B.W. Allen, C.A. Piantadosi// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2006. – Vol. 291, №4. – P. 1507-1512.
43. Allt G. Pericytes: cell biology and pathology/ G. Allt, J.G. Lawrenson// *Cells Tissues Organs*. – 2001. – Vol. 169. – P. 1–11.
44. Angelakis E. Transcranial direct current stimulation effects in disorders of consciousness/ E. Angelakis, E. Liouta, N. Andreadis, S. Korfiatis, P. Ktonas, G. Stranjalis, D.E. Sakas// *Arch Phys Med Rehabil*. – 2014. – Vol. 95, №2. – P. 283-289.
45. Arfai E.A. controlled study of polarization in depression/ E. Arfai, G. Theano, J.D. Montagu, A.A. Robin// *Br J Psychiatry*. – 1970. – Vol. 116, №533. – P. 433-434.
46. Artru F. Monitoring of intracranial pressure with intraparenchymal fiberoptic transducer. Technical aspects and clinical reliability/ F. Artru, A. Terrier, I. Gibert, K. Messaoudi, M. Charlot, H. Naous, C. Jourdan// *Ann Fr Anesth Reanim*. – 1992. – Vol. 11, №4. – P. 424-9.
47. Aucoin P.J. Intracranial pressure monitors. Epidemiologic study of risk factors and infections/ P.J. Aucoin, H.R. Kotilainen, N.M. Gantz, R. Davidson, P. Kellogg, B. Stone// *Am J Med*. – 1986. – Vol. 80, №3. – P. 369-376.

48. Ba Z.F. Alterations in tissue oxygen consumption and extraction after trauma and hemorrhagic shock/ Z.F. Ba, P. Wang, D.J. Koo// *Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 28, № 8. – P. 2837-2842.
49. Badaut J. Vascular neural network phenotypic transformation after traumatic injury: potential role in long- term sequelae/ J. Badaut, G.J. Bix// *Transl Stroke Res.* – 2014. – Vol. 5, №3. – P. 394- 406.
50. Bai H. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors/ H. Bai, J.V. Forrester, M. Zhao// *Cytokine.* – 2011. – Vol.55, №1. – P. 110-115.
51. Ballabh P. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications/ P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard// *Neurobiol Dis.* – 2004. – Vol. 16. – P. 1–13.
52. Baudewig J. Regional modulation of BOLD MRI responses to human sensorimotor activation by transcranial direct current stimulation/ J. Baudewig, M.A. Nitsche, W. Paulus and J. Frahm// *Magn Reson Med.* – 2001. – Vol. 45, №2. – P. 196-201.
53. Bauer H.C. Neural induction of the blood–brain barrier: still an enigma/ H.C. Bauer, H. Bauer// *Cell Mol Neurobiol.* – 2000. – Vol. 20. P. 13–28.
54. Bertsch K. Resting cerebral blood flow, attention, and aging/ K. Bertsch, D. Hagemann, M. Hermes, C. Walter, R. Khan, E. Naumann// *Brain Res.* – 2009. – Vol. 1267. – P. 77- 88.
55. Böger R.H. The pharmacodynamics of L–arginine/ R.H. Böger// *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. – P. 1650-1655.
56. Borchers S. Direct electrical stimulation of human cortex - the gold standard for mapping brain functions?/ S. Borchers, M. Himmelbach, N. Logothetis, H.O. Karnath// *Nat Rev Neurosci.* – 2011. – Vol. 13, №1. – P. 63- 70.

57. Bouma G.J. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia/ G.J. Bouma, J.P. Muizelaar, S.C. Choi, P.G. Newlon, H.F. Young// *J Neurosurg.* – 1991. – Vol. 75, №5. – P. 685-693.
58. Bouma G.J. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography/ G.J. Bouma, J.P. Muizelaar, W.A. Stringer, S.C. Choi, P. Fatouros, H.F. Young// *J Neurosurg.* – 1992. – Vol. 77, №3. – P. 360-368.
59. Bragin D. E. Drag-Reducing Polymer Enhances Microvascular Perfusion in the Traumatized Brain with Intracranial Hypertension/ D.E. Bragin, S. Thomson, O.A. Bragina, G.L. Statom, M.V. Kameneva, E.M. Nemoto// *Acta Neurochir Suppl.* – 2016. – Vol. 122. – P. 25-9.
60. Bragin D.E. High intracranial pressure effects on cerebral cortical microvascular flow in rats/ D.E. Bragin, R.C. Bush, W.S. Muller, E.M. Nemoto// *J Neurotrauma.* – 2011. – Vol. 28, №5. – P. 775-785.
61. Bragin D.E. Improvement of Impaired Cerebral Microcirculation Using Rheological Modulation by Drag-Reducing Polymers/ D.E. Bragin, Z. Peng, O.A. Bragina, G.L. Statom, M.V. Kameneva, E.M. Nemoto// *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – Vol. 923. – P. 239-44.
62. Bragin D.E. Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain/ D.E. Bragin, G.L. Statom, S. Hagberg, E. M. Nemoto// *J Neurosurg.* – 2015. – Vol. 122, №5. – P. 1239-47.
63. Bragin D.E. Rheological effects of drag-reducing polymers improve cerebral blood flow and oxygenation after traumatic brain injury in rats/ D.E. Bragin, M.V. Kameneva, O.A. Bragina, S. Thomson, G.L. Statom, D.A. Lara, Y. Yang, E.M. Nemoto// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2016. – P. 1-14. [Epub ahead of print].
64. Bramlett H.M. Long- Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes/ H.M.

- Bramlett, W.D. Dietrich// *J Neurotrauma*. – 2015. – Vol. 32, №23. – P. 1834-1848.
65. Bramlett H.M. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences/ H.M. Bramlett, W.D. Dietrich// *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2004. – Vol. 24, №2. – P.133-150.
66. Brayden J.E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle/ J.E. Brayden// *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. – 2002. – Vol. 29. – P. 312-316.
67. Bredt D.S. Nitric Oxide Signaling in Brain: Potentiating the Gain with YC-1/ D.S. Bredt// *Molecular Pharmacology*. – 2003. – № 63. – P. 1206-1208.
68. Brunoni A.R. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions/ A.R. Brunoni, M.A. Nitsche, N. Bolognini, M. Bikson, T. Wagner, L. Merabet, D.J. Edwards, A. Valero-Cabre, A. Rotenberg, A. Pascual-Leone, R. Ferrucci, A. Priori, P.S. Boggio, F. Fregni// *Brain Stimul*. – 2012. – Vol. 5, №3. – P. 175-195.
69. Buga G.M. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads/ G.M. Buga, M.E. Gold, J.M. Fukuto, L.J. Ignarro// *Hypertension*. – 1991. – Vol. 17, №2. – P. 187-193.
70. Busija D.W. Factors involved in the physiological regulation of the cerebral circulation/ D.W. Busija, D.D. Heistad// *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. – 1984. – Vol. 101. – P. 161–211.
71. Carmignoto G. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling/ G. Carmignoto, M. Gomez-Gonzalo// *Brain Res Rev*. – 2010. – Vol. 63, №1-2. – P. 138-148.
72. Carvajal J.A. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation/ J.A. Carvajal, A.M. Germain, J.P. Huidobro-Toro, C.P. Weiner// *J Cell Physiol*. – 2000. – Vol. 184, №3. – P. 409-420.



73. Cecchelli R. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development/ R. Cecchelli, V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M.P. Dehouck, L. Fenart// *Nat Rev Drug Discov.* – 2007. – №6. – P. 650–661.
74. Chance B. Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals/ B. Chance, N. Oshino, T. Sugano, A. Mayevsky// *Adv Exp Med Biol.* – 1973. – Vol. 37A. – P. 277-292.
75. Chen K. Vascular and perivascular nitric oxide release and transport: biochemical pathways of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and endothelial nitric oxide synthase (NOS3)/ K. Chen, A.S. Popel// *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42 – P. 811-822.
76. Chen X.L. Sphingosine kinase-1 mediates TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow/ X.L. Chen, J.Y. Grey, S. Thomas, F.H. Qiu, R.M. Medford, M.A. Wasserman, C. Kunsch// *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – Vol. 287, №4. – P. 1452-1458.
77. Chohan M.O. Enhancement of neurogenesis and memory by a neurotrophic peptide in mild to moderate traumatic brain injury/ M.O. Chohan, O.A. Bragina, S.F. Kazim, G.L. Statom, N. Baazaoui, D.E. Bragin., K. Iqbal, E.M. Nemoto, H. Yonas// *Neurosurgery.* – 2015. – Vol. 76, №2. – P. 201-14.
78. Chiu J.J. Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells/ J.J. Chiu, P.L. Lee, C.N. Chen, C.I. Lee, S.F. Chang, L.J. Chen, S.C. Lien, Y.C. Ko, S. Usami, S. Chien// *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2004. – Vol. 24, №1. – P. 73-79.
79. Cipolla MJ. Stroke and the blood–brain interface. In: *Blood–Brain Barrier Interfaces/* Spray D, Dermietzel R (Eds.). – New York: Wiley. – 2006. –P. 225-236.
80. Cipolla MJ. *The Cerebral Circulation [Электронный ресурс]*/ MJ. Cipolla// – San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. – 2009.

81. Clarke D.D. Circulation and energy metabolism of the brain/ D.D. Clarke, L. Sokoloff In: Basic Neurochemistry// G. Siegel, B.V. Agranoff, R.W. Albers, P.V. Molino (Eds.). – New York: Raven Press. – 1989. C. 565–590.
82. Clayton E. Brain stimulation: Neuromodulation as a potential treatment for motor recovery following traumatic brain injury/ E. Clayton, S.K. Kinley-Cooper, R.A. Weber, D.L. Adkins// Brain Res. – 2016. – Vol. 1640. – P. 130-138.
83. Cohen Z. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex/ Z. Cohen, G. Molinatti, E. Hamel// J Cereb Blood Flow Metab. – 1997. – Vol. 17. – P. 894–904.
84. Coles J.P. Incidence and mechanisms of cerebral ischemia in early clinical head injury/ J.P. Coles, T.D. Fryer, P. Smielewski, D.A. Chatfield, L.A. Steiner, A.J. Johnston, S.P. Downey, G.B. Williams, F. Aigbirhio, P.J. Hutchinson, K. Rice, T.A. Carpenter, J.C. Clark, J.D. Pickard, D.K. Menon// J Cereb Blood Flow Metab. – 2004. – Vol. 24, №2. – P. 202-211.
85. Coles J.P. Defining ischemic burden after traumatic brain injury using 15O PET imaging of cerebral physiology/ J.P. Coles, T.D. Fryer, P. Smielewski, K. Rice, J.C. Clark, J.D. Pickard, D.K. Menon// J Cereb Blood Flow Metab. – 2004. – Vol. 24, №2. – P. 191-201.
86. Cortez S.C. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations/ S.C. Cortez, T.K. McIntosh, L.J. Noble// Brain Res. – 1989. – Vol. 482, №2. – P. 271-282.
87. Dalgard C.L. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact/ C.L. Dalgard, J.T. Cole, W.S. Kean, J.J. Lucky, G. Sukumar, D.C. McMullen, H.B. Pollard, W.D. Watson// Front Mol Neurosci. – 2012. – Vol. 5. – P. 6.
88. D'Amore P.A. Culture and Study of Pericytes/ P.A. D'Amore// in Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research. – Verlag Springer, 1990. — P. 299.

89. Daniel W.W. Biostatistics : a foundation for analysis in the health sciences/ W.W. Daniel// J. Wiley & Sons./ NJ Hoboken – 2009.
90. Datta A. Gyri-precise head model of transcranial direct current stimulation: improved spatial focality using a ring electrode versus conventional rectangular pad/ A. Datta, V. Bansal, J. Diaz, J. Patel, D. Reato, M. Bikson //Brain Stimul. – 2009. – Vol. 2. – P. 201-207.
91. Datta A. Transcranial current stimulation focality using disc and ring electrode configurations: FEM analysis/ A. Datta, M. Elwassif, F. Battaglia, M. Bikson// J Neural Eng. – 2008. – Vol. 5, №2. – P. 163-174.
92. Deanfield J.E. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance/ J.E. Deanfield, J.P. Halcox, T.J. Rabelink// Circulation. – 2007. – Vol. 115. – P. 1285-1295.
93. Deibler A.R. Arterial spin-labeling in routine clinical practice, part 1: technique and artifacts/ A.R. Deibler, J.M. Pollock, R.A. Kraft, H. Tan, J.H. Burdette, J.A. Maldjian// AJNR Am J Neuroradiol. – 2008. – Vol. 29, №7. – P. 1228-34.
94. del Zoppo G.J. The neurovascular unit in the setting of stroke/ G.J. del Zoppo// J Intern Med. – 2010. – Vol. 267, №2. – P. 156-171.
95. Dember W.N. Spontaneous alternation behavior/ W.N. Dember, H. Fowler// Psychol Bull. – 1958. – Vol. 55, №6. – P. 412-28.
96. Denninger J.W. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway/ J.W. Denninger, M.A. Marletta// Biochim Biophys Acta. – 1999. – Vol. 1411, №2-3. – P. 334-350.
97. Detre J.A. Tissue specific perfusion imaging using arterial spin labeling/ J.A. Detre, W. Zhang, D.A. Roberts, A.C. Silva, D.S. Williams, D.J. Grandis, A.P. Koretsky, J.S. Leigh// NMR Biomed. – 1994. – Vol. 7, №1-2. – P. 75-82.
98. Dietrich W.D. Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats/ W.D. Dietrich, O. Alonso, M. Halley// J Neurotrauma. – 1994. – Vol. 11, №3. – P. 289-301.

99. Dietrich W.D. Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats/ W.D. Dietrich, O. Alonso, R. Busto, R. Prado, W. Zhao, M.K. Dewanjee, M.D. Ginsberg// *Neurosurgery*. – 1998. – Vol. 43, №3. – P. 585-593.
100. Dimmeler S. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation/ S. Dimmeler, I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, A. M. Zeiher// *Nature*. – 1999. – Vol. 399, №6736. – P. 601-605.
101. Dockery C.A. Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats/ C.A. Dockery, D. Liebetanz, N. Birbaumer, M. Malinowska, M.J. Wesierska// *Neurobiol Learn Mem*. – 2011. – Vol. 96, №3. – P. 452-460.
102. Donato A. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase/ A. Donato, L. Gano, I. Eskurza et al.// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2009. – Vol. 297. – P. 425-432.
103. Douzinas E.E. The effect of hypoxemic resuscitation from hemorrhagic shock on blood pressure restoration and on oxidative and inflammatory responses/ E.E. Douzinas, O. Livaditi, I. Andrianakis// *Intensive Care Med*. – 2008. – Vol. 34. – P. 1133-1141.
104. Drake C.T. The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow/ C.T. Drake, C. Iadecola// *Brain Lang*. – 2007. – Vol. 102. – P. 141–152.
105. Dunham N.W. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice/ N.W. Dunham, T.S. Miya// *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*. – 1957. – Vol. 46, №3. – P. 208-9.
106. Dutta A. EEG-NIRS based assessment of neurovascular coupling during anodal transcranial direct current stimulation--a stroke case series/ A. Dutta, A. Jacob, S.R. Chowdhury, A. Das, M.A. Nitsche// *J Med Syst*. – 2015. – Vol. 39, №4. – P. 205.

107. Egawa G. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy/ G. Egawa, S. Nakamizo, Y. Natsuaki, H. Doi, Y. Miyachi and K. Kabashima// *Sci Rep.* – 2013. – Vol.3. – P.1932.
108. El-Farra N.H. Analysis of nitric oxide consumption by erythrocytes in blood vessels using a distributed multicellular model/ N.H. El-Farra, P.D. Christofides, J.C. Liao// *Ann. Biomed. Eng.* – 2003. – Vol. 31. – P. 294-309.
109. Engel D.C. Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by <sup>14</sup>C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol/ D.C. Engel, G. Mies, N.A. Terpolilli, R. Trabold, A. Loch, C.I. De Zeeuw, J.T. Weber, A.I. Maas, N. Plesnila// *J Neurotrauma.* – 2008. – Vol. 25, №7. – P.739-753.
110. Famm K. Drug discovery: a jump-start for electroceuticals/ K. Famm, B. Litt, K.J. Tracey, E.S. Boyden, M. Slaoui// *Nature.* – 2013. – Vol. 496, №7444. – P.159-161.
111. Faraci F.M. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure/ F.M. Faraci, D.D. Heistad// *Circ Res.* – 1990. – Vol. 66. – P. 8–17.
112. Faraji J. Beyond the silence: bilateral somatosensory stimulation enhances skilled movement quality and neural density in intact behaving rats/ J. Faraji, A. Gomez-Palacio-Schjetnan, A. Luczak, G.A. Metz// *Behav Brain Res.* – 2013. – Vol. 253. – P. 78-89.
113. Finger S. The shocking history of electric fishes: from ancient epochs to the birth of modern neurophysiology/ S Finger// New York, Oxford University Press. – 2011.
114. Fox J.L. The experimental effect of direct electrical current on intracranial arteries and the blood-brain barrier/ J.L. Fox, M.G. Yasargil// *J Neurosurg.* – 1974. – Vol. 41, №5. – P. 582-589.

115. Freed J.K. Revealing the role of phosphatidylserine in shear stress-mediated protection in endothelial cells/ J.K. Freed, M.R. Shortreed, C.J. Kleefisch, L.M. Smith, A.S. Greene// *Endothelium*. – 2008. – Vol. 15, №4. – P. 225-230.
116. Fujimoto K. Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries: a fine structural study/ K. Fujimoto// *Anat Rec*. – 1995. – №242. – P. 562-565.
117. Furchgott R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide/ R.F. Furchgott// *Biosci. Rep*. – 1999. – V. 19, №4. – P. 235-251.
118. Gellner A.K. Glia: A Neglected Player in Non- invasive Direct Current Brain Stimulation/ A.K. Gellner, J. Reis, B. Fritsch// *Front Cell Neurosci*. – 2016. – Vol. 10. – P. 188.
119. Geockeler Z.M. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: relationship between isometric tension, actin polymerization and myosin phosphorylation/ Z.M. Geockeler, R.B. Wysolmerski// *J Cell Biol*. – 1995. – Vol. 130. – P. 613–627.
120. Giorli E. Transcranial Direct Current Stimulation and Cerebral Vasomotor Reserve: A Study in Healthy Subjects/ E. Giorli, S. Tognazzi, L. Briscese, T. Bocci, A. Mazzatenta, A. Priori, G. Orlandi, M. Del Sette, F. Sartucci// *J Neuroimaging*. – 2015. – Vol. 25, №4. – P. 571-574.
121. Golanov E.V. Oxygen and cerebral blood flow/ E.V. Golanov, D.J. Reis// In: *Primer on Cerebrovascular Diseases*. – Welch K.M.A., Caplan L.-R., Reis D.J., Siesjo B.K., Weir B. (Eds.). – San Diego: Academic Press. –1997. – P. 58-60.
122. Guleyupoglu B. Classification of methods in transcranial electrical stimulation (tES) and evolving strategy from historical approaches to contemporary innovations/ B. Guleyupoglu, P. Schestatsky, D. Edwards, F. Fregni, M. Bikson// *J Neurosci Methods*. – 2013. – Vol. 219, №2. – P. 297-311.

123. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone/ E. Hamel// *J Appl Physiol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 1059–1064.
124. Hamm R.J. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury/ R.J. Hamm, B.R. Pike, D.M. O'Dell, B.G. Lyeth, L.W. Jenkins// *J Neurotrauma.* – 1994. – Vol. 11, №2. – P. 187-96.
125. Hasegawa T. Precapillary arteriovenous anastomoses. "Thoroughfare channels" in the brain/ T. Hasegawa, J.R. Ravens, J.F. Toole// *Arch Neurol.* – 1967. – Vol. 16, №2. – P. 217-24.
126. Hauck E.F. Capillary flow and diameter changes during reperfusion after global cerebral ischemia studied by intravital video microscopy/ E.F. Hauck, S. Apostel, J.F. Hoffmann, A. Heimann, O. Kempfski// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2004. – Vol. 24, №4. – P. 383-91.
127. Hekmatpanah J. Microvascular alterations following cerebral contusion in rats. Light, scanning, and electron microscope study/ J. Hekmatpanah, C.R. Hekmatpanah// *J Neurosurg.* – 1985. – Vol. 62, №6. – P. 888-897.
128. Herman I.M. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins/ I.M. Herman, P.A. D'Amore// *J Cell Biol.* – 1985. – № 101. – P. 43–52.
129. Hovda D.A. The neurochemical and metabolic cascade following brain injury: moving from animal models to man/ D.A. Hovda, S.M. Lee, M.L. Smith, S. Von Stuck, M. Bergsneider, D. Kelly, E. Shalmon, N. Martin, M. Caron, J. Mazziotta// *J Neurotrauma.* – 1995. – Vol. 12, №5. – P. 903-906.
130. Hudetz A.G. Heterogeneous autoregulation of cerebrocortical capillary flow: evidence for functional thoroughfare channels?/ A.G. Hudetz, G. Feher, J.P. Kampine// *Microvasc Res.* – 1996. – Vol. 51, №1. – P. 131-6.
131. Hudetz A.G. Video microscopy of cerebrocortical capillary flow: response to hypotension and intracranial hypertension/ A.G. Hudetz, G. Feher, C.G. Weigle, D.E. Knuese, J.P. Kampine// *Am J Physiol.* – 1995. – Vol. 268, №6. – P. 2202-10.

132. Hughes R.N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory/ R.N. Hughes// *Neurosci Biobehav Rev.* – 2004. – Vol. 28, №5. – P. 497-505.
133. Iadecola C. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia/ C. Iadecola// In *Cerebrovascular Diseases.* – Ginsberg MD, Bogousslavsky J. (Eds.). – Cambridge: Blackwell Science. 1998. – P. 319–332.
134. Ignarro L.J. Nitric oxide: Biology and Pathobiology/ L.J. Ignarro// Academic Press. – 2009. – P.139-154.
135. Ishikuro K. Cerebral functional imaging using near-infrared spectroscopy during repeated performances of motor rehabilitation tasks tested on healthy subjects/ K. Ishikuro, S. Urakawa, K. Takamoto, A. Ishikawa, T. Ono, H. Nishijo// *Front Hum Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 292.
136. Islam N. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain/ N. Islam, M. Aftabuddin, A. Moriwaki, Y. Hattori, Y. Hori// *Brain Res.* – 1995. – Vol. 684, №2. – P. 206-208.
137. Jackson M.P. Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms/ M.P. Jackson, A. Rahman, B. Lafon, G. Kronberg, D. Ling, L.C. Parra, M. Bikson// *Clin Neurophysiol* – 2016. – Vol. 127, №11. – P. 3425-3454.
138. Jang S.H. The effect of transcranial direct current stimulation on the cortical activation by motor task in the human brain: an fMRI study/ S.H. Jang, S.H. Ahn, W.M. Byun, C.S. Kim, M.Y. Lee, Y.H. Kwon// *Neurosci Lett.* – 2009. – Vol. 460, №2. – P. 117-120.
139. Kasischke K.A. Two-photon NADH imaging exposes boundaries of oxygen diffusion in cortical vascular supply regions/ K.A. Kasischke, E.M. Lambert, B. Panepento, A. Sun, H.A. Gelbard, R.W. Burgess, T.H. Foster, M. Nedergaard// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2011. – Vol. 31, №1. – P. 68-81.



140. Keskil S. Head trauma and leucocytosis/ S. Keskil, M.K. Baykaner, N. Ceviker, S. Aykol// *Acta Neurochir (Wien)*. – 1994. – Vol. 131, №3-4. – P. 211-214.
141. Kimelberg H.K. Water homeostasis in the brain: basic concepts/ H.K. Kimelberg // *Neuroscience*. – 2004. – Vol. 129, №4. – P. 851–860.
142. Kleinfeld D. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex/ D. Kleinfeld, P.P. Mitra, F. Helmchen, W. Denk/ *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – Vol. 95, №26. – P. 15741-6.
143. Kniesel U. Tight junctions of the blood–brain barrier/ U. Kniesel, H. Wolburg// *Cell Mol Neurobiol*. – 2000. – Vol. 20. – P. 57–76.
144. Kontos H.A. Local mechanism of CO<sub>2</sub> action of cat pial arterioles/ H.A. Kontos, E.P. Wei, A.J. Raper, J.L. Patterson// *Stroke*. – 1977. – Vol. 8. – P. 226–229.
145. Krishnamurthy V. Resting-state fMRI reveals enhanced functional connectivity in spatial navigation networks after transcranial direct current stimulation/ V. Krishnamurthy, K. Gopinath, G.S. Brown, B.M. Hampstead// *Neurosci Lett*. – 2015. – Vol. 604. – P. 80-85.
146. Krizanac-Bengez L. Loss of flow induces leukocyte-mediated MMP/TIMP imbalance in dynamic in vitro blood-brain barrier model: role of pro-inflammatory cytokines/ L. Krizanac-Bengez, M. Hossain, V. Fazio, M. Mayberg, D. Janigro// *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2006. – Vol. 291, №4. – P. 740-749.
147. Landry D.W. The ATP–sensitive K–channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog/ D.W. Landry, J.A. Oliver// *J. Clin. Invest*. – 1992. – Vol. 89. – P. 2071-2074.
148. Lang N. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain?/ N. Lang, H.R. Siebner, N.S. Ward, L. Lee, M.A. Nitsche, W. Paulus, J.C. Rothwell, R.N. Lemon, R.S. Frackowiak// *Eur J Neurosci*. – 2005. – Vol. 22, №2. – P. 495-504.

149. Langfitt T.W. Cerebral Vasomotor Paralysis Produced by Intracranial Hypertension/ T.W. Langfitt, J.D. Weinstein, N.F. Kassell// *Neurology*. – 1965. – Vol. 15. – P. 622-641.
150. Laste G. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation/ G. Laste, W. Caumo, L.N. Adachi, J.R. Rozisky, I.C. de Macedo, P.R. Filho, W.A. Partata, F. Fregni, I.L. Torres// *Exp Brain Res*. – 2012. – Vol. 221, №1. – P. 75-83.
151. Lee R.M. Morphology of cerebral arteries/ R.M. Lee// *Pharmacol Ther*. – 1995. – Vol. 66. – P. 149-173.
152. Lee C. Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon/ C. Lee// *Progress in neuropathology*. – Verlag Grune und Stratton. – 1971. – Vol. 1. – P. 84–145.
153. Lee S.P. Relative changes of cerebral arterial and venous blood volumes during increased cerebral blood flow: implications for BOLD fMRI/ S.P. Lee, T.Q. Duong, G. Yang, C. Iadecola, S.G. Kim// *Magn Reson Med*. – 2001. – Vol. 45, №5. – P. 791-800.
154. Leffa D.T. Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder/ D.T. Leffa, A. de Souza, V.L. Scarabelot, L.F. Medeiros, C. de Oliveira, E.H. Grevet, W. Caumo, D.O. de Souza, L.A. Rohde, I.L. Torres// *Eur Neuropsychopharmacol*. – 2016. – Vol. 26, №2. – P. 368-377.
155. Lesniak M. Effects of repeated anodal tDCS coupled with cognitive training for patients with severe traumatic brain injury: a pilot randomized controlled trial/ M. Lesniak, K. Polanowska, J. Seniow, A. Czlonkowska// *J Head Trauma Rehabil*. – 2014. – Vol. 29, №3. – P. 20-29.
156. Li Y. Anodal transcranial direct current stimulation relieves the unilateral bias of a rat model of Parkinson's disease/ Y. Li, X. Tian, L. Qian, X. Yu, W. Jiang// *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. – 2011. – P. 765-768.

157. Liebetanz D. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy/ D. Liebetanz, F. Klinker, D. Hering, R. Koch, M.A. Nitsche, H. Potschka, W. Loscher, W. Paulus, F. Tergau// *Epilepsia*. – 2006. – Vol. 47, №7. – P. 1216-24.
158. Liebetanz D. Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability/ D. Liebetanz, M.A. Nitsche, F. Tergau, W. Paulus// *Brain*. – 2002. – Vol. 125. – P. 2238-2247.
159. Liebetanz D. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats/ D. Liebetanz, R. Koch, S. Mayenfels, F. Konig, W. Paulus, M.A. Nitsche// *Clin Neurophysiol*. – 2009. – Vol. 120, №6. – P. 1161-7.
160. Lok J. Cell–cell signaling in the neurovascular unit/ J. Lok, P. Gupta, S. Guo, W.J. Kim, M.J. Whalen, K van Leyen, E.H. Lo// *Neurochem Res*. – 2007. – Vol. 32. – P. 2032–2045.
161. Long H. Galvanotactic migration of EA.Hy926 endothelial cells in a novel designed electric field bioreactor/ H. Long, G. Yang, Z. Wang// *Cell Biochem Biophys*. – 2011. – Vol. 61, №3. – P. 481-491.
162. Lopez-Quintero S.V. DBS-relevant electric fields increase hydraulic conductivity of in vitro endothelial monolayers/ S.V. Lopez-Quintero, A. Datta, R. Amaya, M. Elwassif, M. Bikson, J.M. Tarbell// *J Neural Eng*. – 2010. – Vol. 7, №1. – P. 16005.
163. Lopez-Ramirez M.A. Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells/ M.A. Lopez-Ramirez, R. Fischer, C.C. Torres-Badillo, H.A. Davies, K. Logan, K. Pfizenmaier, D.K. Male, B. Sharrack, I.A. Romero// *J Immunol*. – 2012. – Vol. 189, №6. – P. 3130-3139.
164. Louin G. Cortical calcium increase following traumatic brain injury represents a pitfall in the evaluation of Ca<sup>2+</sup>-independent NOS activity/ G. Louin, V.C. Besson, N.C. Royo, D. Bonnefont-Rousselot, C. Marchand-Verrecchia, M.

- Plotkine, M. Jafarian-Tehrani// *J Neurosci Methods*. – 2004. – Vol. 138, №1-2. – P. 73-79.
165. Lum H. Regulation of vascular endothelial barrier function/ H. Lum, A.B. Malik// *Am J Physiol*. – 1994. – Vol. 267. – P. 223–241.
166. Mander P. Nitric oxide, hypoxia and brain inflammation/ P. Mander, G.C. Brown// *Biochemical Society Transactions*. – 2004. – Vol.32, №6. – P. 1068-1069.
167. Marion D.W. Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries/ D.W. Marion, J. Darby, H. Yonas// *J Neurosurg*. – 1991. – Vol. 74, №3. – P. 407-414.
168. Marklund N. Energy metabolic changes in the early post-injury period following traumatic brain injury in rats/ N. Marklund, K. Salci, G. Ronquist, L. Hillered// *Neurochem Res*. – 2006. – Vol. 31, №8. – P. 1085-1093.
169. Martini J. Mechanotransduction and the homeostatic significance of maintaining blood viscosity in hypotension, hypertension and haemorrhage/ J. Martini, P. Cabrales, A.G. Tsai// *J. Inter. Med*. – 2006. – Vol. 259, №4. – P. 364-372.
170. Martini R.P. Targeting brain tissue oxygenation in traumatic brain injury/ R.P. Martini, S. Deem, M.M. Treggiari// *Respir Care*. – 2013. – Vol. 58, №1. – P. 162-172.
171. Masamoto K. Oxygen transport in brain tissue/ K. Masamoto, K. Tanishita// *J Biomech Eng*. – 2009. – Vol. 131. – P. 74–82.
172. McIntosh T.K. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model/ T.K. McIntosh, R. Vink, L. Noble, I. Yamakami, S. Fernyak, H. Soares, A.L. Faden// *Neuroscience*. – 1989. – Vol. 28, №1. – P. 233-244.
173. McQuillan L.P. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms/ L.P. McQuillan, G.K. Leung, P.A. Marsden et al.// *Am. J. Physiol*. – 1994. – Vol. 267. – P. 1921-1927.

174. Merzagora A.C. Prefrontal hemodynamic changes produced by anodal direct current stimulation/ A.C. Merzagora, G. Foffani, I. Panyavin, L. Mordillo-Mateos, J. Aguilar, B. Onaral, A. Oliviero// *Neuroimage*. – 2010. – Vol. 49, №3. – P. 2304-2310.
175. Mielke D. Cathodal transcranial direct current stimulation induces regional, long-lasting reductions of cortical blood flow in rats/ D. Mielke, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, A. Taghizadeh-Waghefi, M.A. Nitsche, V. Rohde, D. Liebetanz// *Neurol Res*. – 2013. – Vol. 35, №10. – P. 1029-1037.
176. Middleton A. Using clinical and robotic assessment tools to examine the feasibility of pairing tDCS with upper extremity physical therapy in patients with stroke and TBI: a consideration-of-concept pilot study/ A. Middleton, S.L. Fritz, D.M. Liuzzo, R. Newman-Norlund, T.M. Herter// *NeuroRehabilitation*. – 2014. – Vol. 35, №4. – P. 741-754.
177. Mielke D. Cathodal transcranial direct current stimulation induces regional, long-lasting reductions of cortical blood flow in rats/ D. Mielke, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, A. Taghizadeh-Waghefi, M.A. Nitsche, V. Rohde, D. Liebetanz// *Neurol Res*. – 2013. – Vol. 35, №10. – P. 1029-1037.
178. Monai H. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain/ H. Monai, M. Ohkura, M. Tanaka, Y. Oe, A. Konno, H. Hirai, K. Mikoshiba, S. Itohara, J. Nakai, Y. Iwai, H. Hirase// *Nat Commun*. – 2016. – Vol. 7. – P. 11100.
179. Motti E.D. The terminal vascular bed in the superficial cortex of the rat. An SEM study of corrosion casts/ E.D. Motti, H.G. Imhof, M.G. Yasargil// *J Neurosurg*. – 1986. – Vol. 65, №6. – P. 834-46.
180. Möller M. Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes/ M. Möller, Q. Li, Jr J.R. Lancaster et al.// *IUBMB Life*. – 2007. – Vol. 59. – P. 243-248.

181. Musser J.B. Hemorrhagic Shock in Swine: Nitric Oxide and Potassium Sensitive Adenosine Triphosphate Channel Activation/ J.B. Musser, T.B. Bentley, S. Griffith et al.// *Anesthesiology*. – 2004. – Vol. 101, №2. – P. 399-408.
182. Natarajan R. Hypoxia inducible factor-1: regulation by nitric oxide in posthypoxic microvascular endothelium/ R. Natarajan, D.G. Jones, B.J. Fisher// *Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83, №5. – P. 597-607.
183. Nekhendzy V. The antinociceptive effect of transcranial electrostimulation with combined direct and alternating current in freely moving rats/ V. Nekhendzy, C.P. Fender, M.F. Davies, H.J. Lemmens, M.S. Kim, D.M. Bouley, M. Maze// *Anesth Analg.* – 2004. – Vol. 98, №3. – P. 730-737.
184. Nelson M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle/ M.T. Nelson, J.M. Quayle// *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 799-822.
185. Nitsche M.A. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation/ M.A. Nitsche, W. Paulus// *J Physiol.* – 2000. – Vol. 527, №3. – P. 633- 639.
186. Nitsche M.A. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans/ M.A. Nitsche, K. Fricke, U. Henschke, A. Schlitterlau, D. Liebetanz, N. Lang, S. Henning, F. Tergau, W. Paulus// *J Physiol.* – 2003. – Vol. 553, №1. – P. 293-301.
187. Nitsche M.A. Vascular safety of brain plasticity induction via transcranial direct currents/ M.A. Nitsche, W. Paulus// *Neurology*. – 2015. – Vol. 84, №6. – P. 556-557.
188. Oliveira A.M. Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory/ A.M. Oliveira, J.D. Hawk, T. Abel, R. Havekes// *Learn Mem.* – 2010. – Vol. 17, №3. – P. 155-60.
189. O'Neil-Pirozzi T.M. Immediate memory and electrophysiologic effects of prefrontal cortex transcranial direct current stimulation on neurotypical

- individuals and individuals with chronic traumatic brain injury: a pilot study/ T.M. O'Neil-Pirozzi, D. Doruk, J.M. Thomson, F. Fregni// *Int J Neurosci.* – 2016. – P. 1-9.
190. Ostergaard L. Capillary transit time heterogeneity and flow-metabolism coupling after traumatic brain injury/ L. Ostergaard, T.S. Engedal, R. Aamand, R. Mikkelsen, N.K. Iversen, M. Anzabi, E.T. Naess-Schmidt, K.R. Drasbek, V. Bay, J.U. Blicher, A. Tietze, I.K. Mikkelsen, B. Hansen, S.N. Jespersen, N. Juul, J.C. Sorensen, M. Rasmussen// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014. – Vol. 34, №10. – P. 1585-1598.
191. Pardridge W.M. Molecular biology of the blood–brain barrier/ W.M. Pardridge// *Mol Biotechnol.* – 2005. – Vol. 30, №1. – P. 57–70.
192. Paulson O.B. Cerebral autoregulation/ O.B. Paulson, S. Strandgaard, L. Edvinsson// *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* – 1990. – Vol. 2. P. 161–192.
193. Pavlov A.N. Wavelet–based analysis of cerebrovascular dynamics in newborn rats with intracranial hemorrhages/ A.N. Pavlov, O.N. Pavlova, V.V. Lychagov, V.V. Tuchin, O.A. Bibikova, S.S. Sindeev, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya// *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2014. – Vol. 7, №1. – P. 1350055-1350065.
194. Payne S. Cerebral Autoregulation: Control of Blood Flow in the Brain/ S. Payne// Springer. – 2016. – P. 1- 125.
195. Pedron S. Repeated transcranial direct current stimulation prevents abnormal behaviors associated with abstinence from chronic nicotine consumption/ S. Pedron, J. Monnin, E. Haffen, D. Sechter, V. Van Waes// *Neuropsychopharmacology.* – 2014. Vol. 39, №4. – P. 981-988.
196. Perlmutter J.S. Deep brain stimulation/ J.S. Perlmutter, J.W. Mink// *Annu Rev Neurosci.* – 2006. – Vol. 29. – P. 229- 257.
197. Peruzzotti-Jametti L. Safety and efficacy of transcranial direct current stimulation in acute experimental ischemic stroke/ L. Peruzzotti-Jametti, M.

- Cambiaghi, M. Bacigaluppi, M. Gallizioli, E. Gaude, S. Mari, S. Sandrone, M. Corsi, L. Teneud, G. Comi, G. Musco, G. Martino, L. Leocani// *Stroke*. – 2013. – Vol. 44, №11. – P. 3166-74.
198. Peterchev A.V. Fundamentals of transcranial electric and magnetic stimulation dose: definition, selection, and reporting practices/ A.V. Peterchev, T.A. Wagner, P.C. Miranda, M.A. Nitsche, W. Paulus, S.H. Lisanby, A. Pascual- Leone, M. Bikson// *Brain Stimul.* – 2012. – Vol. 5, №4. – P. 435- 453.
199. Peterson E.C. Regulation of cerebral blood flow/ E.C. Peterson, Z. Wang, G. Britz// *Int J Vasc Med.* – 2011. – P. 823525.
200. Podda M.V. Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression/ M.V. Podda, S. Cocco, A. Mastrodonato, S. Fusco, L. Leone, S. A. Barbati, C. Colussi, C. Ripoli, C. Grassi// *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 22180.
201. Pop V. A neurovascular perspective for long- term changes after brain trauma/ V. Pop, J. Badaut// *Transl Stroke Res.* – 2011. – Vol. 2, №4. – P. 533- 545.
202. Preiser J.C. Hemodynamic effects of glibenclamide during endotoxemia: Contrasting findings in vitro versus in vivo/ J.C. Preiser, H. Zhang, F. Debelle et al.// *Shock.* – 2003. – Vol. 19. – P. 223-228.
203. Price D.L. Distribution of rSlo Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat astrocyte perivascular endfeet/ D.L. Price, J.W. Ludwig, H. Mi, T.L. Schwarz, M.H. Ellisman// *Brain Res.* – 2002. – Vol. 956. – P. 183–193.
204. Prins M. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance/ M. Prins, T. Greco, D. Alexander, C.C. Giza// *Dis Model Mech.* – 2013. – Vol. 6, №6. – P. 1307-1315
205. Priori A. Polarization of the human motor cortex through the scalp/ A. Priori, A. Berardelli, S. Rona, N. Accornero, M. Manfredi// *Neuroreport.* – 1998. – Vol. 9, №10. – P. 2257-2260.



206. Rahman A. Cellular effects of acute direct current stimulation: somatic and synaptic terminal effects/ A. Rahman, D. Reato, M. Arlotti, F. Gasca, A. Datta, L.C. Parra, M. Bikson// *J Physiol.* – 2013. – Vol. 591. – P. 2563-2578.
207. Ravens J.R. Anastomoses in the vascular bed of the human cerebrum/ J.R. Ravens, J.F. Toole, T. Hasegawa// *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1968. – Vol. 27, №1. – P. 123-4.
208. Reato D. Low-intensity electrical stimulation affects network dynamics by modulating population rate and spike timing/ D. Reato, A. Rahman, M. Bikson, L.C. Parra // *J Neurosci.* – 2010. – Vol. 30. – P. 15067-15079.
209. Rees D.D. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo/ D.D. Rees, R.M. Palmer, R. Schulz, H.F. Hodson, S. Moncada// *Br J Pharmacol.* – 1990. – Vol. 101, №3. – P. 746-752.
210. Resnick N. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse/ N. Resnick, H. Yahav, A. Shay-Salit, M. Shushy, S. Schubert, L.C. Zilberman, E. Wofovitz// *Prog Biophys Mol Biol.* – 2003. – Vol. 81, №3. – P. 177-199.
211. Rink A. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat/ A. Rink, K.M. Fung, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, E. Neugebauer, T.K. McIntosh// *Am J Pathol.* – 1995. – Vol. 147, №6. – P. 1575-1583.
212. Rochfort K.D. Shear-dependent attenuation of cellular ROS levels can suppress proinflammatory cytokine injury to human brain microvascular endothelial barrier properties/ K.D. Rochfort, L.E. Collins, A. McLoughlin, P.M. Cummins// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2015.
213. Rucker H.K. Cellular mechanisms of CNS pericytes/ H.K. Rucker, H.J. Wynder, W.E. Thomas/ *Brain Res Bull.* – 2000. – №51. – P. 363-369.
214. Sacco K. Concomitant Use of Transcranial Direct Current Stimulation and Computer-Assisted Training for the Rehabilitation of Attention in Traumatic

- Brain Injured Patients: Behavioral and Neuroimaging Results/ K. Sacco, V. Galetto, D. Dimitri, E. Geda, F. Perotti, M. Zettin, G.C. Geminiani// *Front Behav Neurosci.* – 2016. – Vol. 10. – P. 57.
215. Saiote C. Combining functional magnetic resonance imaging with transcranial electrical stimulation/ C. Saiote, Z. Turi, W. Paulus, A. Antal// *Front Hum Neurosci.* – 2013. – Vol. 7. – P. 435.
216. Scafidi S. Delayed cerebral oxidative glucose metabolism after traumatic brain injury in young rats/ S. Scafidi, J. O'Brien, I. Hopkins, C. Robertson, G. Fiskum, M. McKenna// *J Neurochem.* – 2009. – Vol. 109. – P. 189-197.
217. Schiszler I. New optical method for analyzing cortical blood flow heterogeneity in small animals: validation of the method/ I. Schiszler, M. Tomita, Y. Fukuuchi, N. Tanahashi, K. Inoue// *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2000. – Vol. 279, №3. – P. 1291-8.
218. Schroder M.L. Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies/ M.L. Schroder, J.P. Muizelaar, M.R. Bullock, J.B. Salvant, J.T. Povlishock// *J Neurosurg.* – 1995. – Vol. 82, №6. – P. 966-971.
219. Sciamanna M.A. Ischemic injury to rat forebrain mitochondria and cellular calcium homeostasis/ M.A. Sciamanna, J. Zinkel, A.Y. Fabi, C.P. Lee// *Biochim Biophys Acta.* – 1992. – Vol. 1134, №3. – P. 223-232.
220. Semyachkina–Glushkovskaya O.V. The assessment of pathological changes in cerebral blood flow in hypertensive rats with stress induced intracranial hemorrhage using Doppler OCT: Particularities of arterial and venous alterations/ O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, O.A. Bibikova, I.A. Semyachkin–Glushkovsky, S.S. Sineev, E.M. Zinchenko, M.K. Mohhanad, H.A. Braun, F. Al–Fadle, L. Al Hassani, V.V. Tuchin// *Photonics & Lasers in Medicine.* – 2013. – P. 109116.

221. Seylaz J. Dynamic in vivo measurement of erythrocyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy/ J. Seylaz, R. Charbonne, K. Nanri, D. Von Euw, J. Borredon, K. Kacem, P. Meric, E. Pinard// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1999. – Vol. 19, №8. – P. 863-70.
222. Shih A.Y. A polished and reinforced thinned-skull window for long-term imaging of the mouse brain/ A.Y. Shih, C. Mateo, P.J. Drew, P.S. Tsai, D. Kleinfeld// *J Vis Exp.* – 2012. – Vol. 61.
223. Shin D.W. Transcranial direct current stimulation transiently increases the blood-brain barrier solute permeability in vivo/ D.W. Shin, N. Khadka, J. Fan, M. Bikson, B.M. Fu// *Proc. SPIE, Medical Imaging: Biomedical Applications in Molecular, Structural, and Functional Imaging.* – 2016. – Vol. 97881. – P. 121-133.
224. Siesjo B.K. Mechanisms of secondary brain injury/ B.K. Siesjo, P. Siesjo// *Eur J Anaesthesiol.* – 1996. – Vol. 13, №3. – P. 247-268.
225. Smielewski P. Evaluation of the transient hyperemic response test in head-injured patients/ P. Smielewski, M. Czosnyka, P. Kirkpatrick, J.D. Pickard// *J Neurosurg.* – 1997. – Vol. 86, №5. – P. 773-8.
226. Smith D.H. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects/ D.H. Smith, H.D. Soares, J.S. Pierce, K.G. Perlman, K.E. Saatman, D.F. Meaney, C.E. Dixon, T.K. McIntosh// *J Neurotrauma.* – 1995. – Vol. 12, №2. – P. 169-78.
227. Soehle M. Online assessment of brain tissue oxygen autoregulation in traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage/ M. Soehle, M. Jaeger, J. Meixensberger// *Neurol Res.* – 2003. – Vol. 25, №4. – P. 411-7.
228. Song B. Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo/ B. Song, Y. Gu, J. Pu, B. Reid, Z. Zhao, M. Zhao// *Nat Protoc.* – 2007. – Vol. 2, №6. – P. 1479-1489.

229. Sood M. NIRS-EEG joint imaging during transcranial direct current stimulation: Online parameter estimation with an autoregressive model/ M. Sood, P. Besson, M. Muthalib, U. Jindal, S. Perrey, A. Dutta, M. Hayashibe// *J Neurosci Methods*. – 2016. – Vol. 274. – P. 71-80.
230. Spezia Adachi L.N. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model/ L.N. Spezia Adachi, W. Caumo, G. Laste, L. Fernandes Medeiros, J. Ripoll Rozisky, A. de Souza, F. Fregni, I.L. Torres// *Brain Res*. – 2012. – Vol. 1489. – P. 17-26.
231. Stagg C.J. Widespread modulation of cerebral perfusion induced during and after transcranial direct current stimulation applied to the left dorsolateral prefrontal cortex/ C.J. Stagg, R.L. Lin, M. Mezue, A. Segerdahl, Y. Kong, J. Xie, I. Tracey// *J Neurosci*. – 2013. – Vol. 33, №28. – P.11425-11431.
232. Stein S.C. Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury/ S.C. Stein, D.I. Graham, X.H. Chen, D.H. Smith// *Neurosurgery*. – 2004. – Vol. 54, №3. – P. 687-691.
233. Steiner L.A. Responses of posttraumatic pericontusional cerebral blood flow and blood volume to an increase in cerebral perfusion pressure/ L.A. Steiner, J.P. Coles, A.J. Johnston, M. Czosnyka, T.D. Fryer, P. Smielewski, D.A. Chatfield, R. Salvador, F.I. Aigbirhio, J.C. Clark, D.K. Menon, J.D. Pickard// *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2003. – Vol. 23, №11. – P. 1371-1377.
234. Sullivan P.G. Traumatic brain injury alters synaptic homeostasis: implications for impaired mitochondrial and transport function/ P.G. Sullivan, J.N. Keller, M.P. Mattson, S.W. Scheff// *J Neurotrauma*. – 1998. – Vol. 15, №10. – P. 789-798.
235. Szabo C. Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction: Role of poly (ADP-ribose) polymerase activation/ C. Szabo, P. Pacher, Z. Zsengeller et al.// *Mol Med*. – 2004. – Vol. 10. – P. 28-35.

236. Taguchi H. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia/ H. Taguchi, D.D. Heistad, T. Kitazono, F.M. Faraci// *Circ Res.* – 1994. – Vol. 74. – P. 1005–1008.
237. Takai H. Effect of Transcranial Direct Current Stimulation over the Primary Motor Cortex on Cerebral Blood Flow: A Time Course Study Using Near-infrared Spectroscopy/ H. Takai, A. Tsubaki, K. Sugawara, S. Miyaguchi, K. Oyanagi, T. Matsumoto, H. Onishi, N. Yamamoto// *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – Vol. 876. – P. 335-341.
238. Takano T. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia/ T. Takano, G.F. Tian, W. Peng, N. Lou, D. Lovatt, A.J. Hansen, K.A. Kasischke, M. Nedergaard// *Nat Neurosci.* – 2007. – Vol. 10, №6. – P. 754-62.
239. Tanaka J. Astrocytes prevent neuronal death induced by reactive oxygen and nitrogen species/ J. Tanaka, K. Toku, B. Zhang, K. Ishihara, M. Sakanaka, N. Maeda// *Glia.* – 1999. Vol. 28. – P. 85–96.
240. Teasdale G.M. Intracranial pressure/ G.M. Teasdale, J.O. Rowan// Berlin: Springer-Verlag. – 1986. – P. 260 - 264.
241. ter Laan M. Modulation of cerebral blood flow with transcutaneous electrical neurostimulation (TENS) in patients with cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage/ M. ter Laan, J.M. van Dijk, R. Stewart, M.J. Staal, J.W. Elting// *Neuromodulation.* – 2014. – Vol. 17, №5. – P. 431-436.
242. Toda N. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances/ N. Toda, K. Ayajiki, T. Okamura// *Pharmacol Rev.* – 2009. – Vol. 61, №1. – P. 62-97.
243. Topper J.N. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype/ J.N. Topper, M.A. Gimbrone// *Mol Med Today.* – 1999. – Vol. 5, №1. – P. 40-46.
244. Tsoukias N.M. A theoretical model of nitric oxide transport in arterioles: frequency– vs. amplitude–dependent control of cGMP formation/ N.M.

- Tsoukias, M. Kavdia, A.S. Popel// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 286. – P. 1043-1056.
245. Ulker P. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes/ P. Ulker, L. Sati, C. Celik-Ozenci, H.J. Meiselman, O.K. Baskurt// *Biorheology.* – 2009. – Vol. 46, №2. – P. 121-132.
246. Vandeputte C. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders/ C.Vandeputte, J.M. Taymans, C. Casteels, F. Coun, Y. Ni, K. Van Laere, V. Baekelandt// *BMC Neurosci.* – 2010. – Vol. 11. – P. 92.
247. Vernieri F. Cortical neuromodulation modifies cerebral vasomotor reactivity/ F. Vernieri, G. Assenza, P. Maggio, F. Tibuzzi, F. Zappasodi, C. Altamura, M. Corbetto, L. Trotta, P. Palazzo, M. Ercolani, F. Tecchio, P.M. Rossini// *Stroke.* – 2010. – Vol. 41, №9. – P. 2087-2090.
248. Verweij B.H. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans/ B.H. Verweij, J.P. Muizelaar, F.C. Vinas, P.L. Peterson, Y. Xiong, C.P. Lee// *J Neurosurg.* – 2000. – Vol. 93, №5. – P. 815-820.
249. Wachter D. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat/ D. Wachter, A. Wrede, W. Schulz-Schaeffer, A. Taghizadeh-Waghefi, M.A. Nitsche, A. Kutschenko, V. Rohde, D. Liebetanz// *Exp Neurol.* – 2011. – Vol. 227, №2 – P. 322-327.
250. Walker K.R. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury/ K.R. Walker, G. Tesco// *Front Aging Neurosci.* – 2013. – Vol.5. – P. 29.
251. Walsh T.G. Stabilization of brain microvascular endothelial barrier function by shear stress involves VE-cadherin signaling leading to modulation of pTyr-occludin levels/ T.G.Walsh, R.P. Murphy, P. Fitzpatrick, K.D. Rochfort, A.F. Guinan, A. Murphy, P.M. Cummins// *J Cell Physiol.* – 2011. – Vol. 226, №11. – P. 3053-3063.

252. Wang Y. Direct current stimulation over the human sensorimotor cortex modulates the brain's hemodynamic response to tactile stimulation/ Y. Wang, Y. Hao, J. Zhou, P.J. Fried, X. Wang, J. Zhang, J. Fang, A. Pascual-Leone, B. Manor// *Eur J Neurosci.* – 2015. – Vol. 42, №3. – P. 1933-1940.
253. Wei L. The velocities of red cell and plasma flows through parenchymal microvessels of rat brain are decreased by pentobarbital/ L. Wei, T. Otsuka, V. Acuff, D. Bereczki, K. Pettigrew, C. Patlak, J. Fenstermacher// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1993. – Vol. 13. – P. 487-497.
254. Werner C. Pathophysiology of traumatic brain injury/ C. Werner, K. Engelhard// *Br J Anaesth.* – 2007. – Vol. 99, №1. – P. 4-9.
255. Whiting M.D. Cognitive Impairment following Traumatic Brain Injury [Электронный ресурс]/ M.D. Whiting, A.I. Baranova, R.J. Hamm// *Animal Models of Cognitive Impairment.* E.D. Levin, J.J. Buccafusco – Boca Raton (FL). – 2006.
256. Williams D.S. Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water/ D.S. Williams, J.A. Detre, J.S. Leigh, A.P. Koretsky// *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1992. – Vol. 89, №1. – P. 212-6.
257. Wolburg H. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex/ H. Wolburg, S. Noell, A. Mack, K. Wolburg-Buchholz, P. Fallier-Becker// *Cell Tissue Res.* – 2009. – Vol. 335. – P. 75–96.
258. Wu H.M. Redefining the pericontusional penumbra following traumatic brain injury: evidence of deteriorating metabolic derangements based on positron emission tomography/ H.M. Wu, S.C. Huang, P. Vespa, D. A. Hovda, M. Bergsneider// *J Neurotrauma.* – 2013. – Vol. 30, №5. – P.352-360.
259. Xiong Y. Animal models of traumatic brain injury/ Y. Xiong, A. Mahmood, M. Chopp// *Nat Rev Neurosci.* – 2013. – Vol. 14, №2. – P. 128-42.
260. Xu Y. Early nonischemic oxidative metabolic dysfunction leads to chronic brain atrophy in traumatic brain injury/ Y. Xu, D.L. McArthur, J.R. Alger, M.

- Etchepare, D.A. Hovda, T.C. Glenn, S. Huang, I. Dinov, P. M. Vespa// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2010. – Vol. 30, №4. – P. 883-894.
261. Yamakami I. Alterations in regional cerebral blood flow following brain injury in the rat/ I. Yamakami, T.K. McIntosh// *J Cereb Blood Flow Metab.* – 1991. – Vol. 11, №4. – P. 655-660.
262. Yamawaki H. Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells/ H. Yamawaki, S. Pan, R.T. Lee, B.C. Berk// *J Clin Invest.* – 2005. – Vol. 115, №3. – P. 733-738.
263. Yang O. Real-time blood flow visualization using the graphics processing unit/ O. Yang, D. Cuccia, B. Choi// *J Biomed Opt.* – 2011. – Vol. 16, №1. – P. 016009.
264. Yoon K.J. Effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) on behavioral and spatial memory during the early stage of traumatic brain injury in the rats/ K.J. Yoon, Y.T. Lee, S.W. Chae, C.R. Park, D.Y. Kim// *J Neurol Sci.* – 2016. – Vol. 362. – P. 314-320.
265. Yoon K.J. Functional improvement and neuroplastic effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats/ K.J. Yoon, B.M. Oh, D.Y. Kim// *Brain Res.* – 2012. – Vol. 1452. – P. 61-72.
266. Yu S.H. The Effect of tDCS on Cognition and Neurologic Recovery of Rats with Alzheimer's Disease/ S.H. Yu, S.D. Park, K.C. Sim// *J Phys Ther Sci.* – 2014. – Vol. 26, №2. – P. 247-249.
267. Yu X. Intensity-dependent effects of repetitive anodal transcranial direct current stimulation on learning and memory in a rat model of Alzheimer's disease/ X. Yu, Y. Li, H. Wen, Y. Zhang, X. Tian// *Neurobiol Learn Mem.* – 2015. – Vol. 123. – P. 168-178.
268. Zago S. Bartholow, Sciamanna, Alberti: pioneers in the electrical stimulation of the exposed human cerebral cortex/ S. Zago, R. Ferrucci, F. Fregni, A. Priori// *Neuroscientist.* – 2008. – Vol. 14, №5. – P. 521-528.



269. Zhao M. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors/ M. Zhao, H. Bai, E. Wang, J.V. Forrester, C.D. McCaig// *J Cell Sci* – 2004. – Vol. 117, № 3. – P. 397-405.
270. Zhu J. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases/ J. Zhu, W. Song, L. Li, X. Fan// *Mol Brain*. – 2016. – Vol. 9. – P. 30.
271. Zlokovic B.V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration/ B.V. Zlokovic// *Trends Neurosci*. – 2005. – Vol. 28. – P. 202-208.
272. Zlokovic B.V. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders/ B.V. Zlokovic// *Neuron*. – 2008. – Vol. 57. – P. 178–201.