

РЕГИСТРАЦИЯ ПОЛЕВЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ В ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК НОВЫЙ КРИТЕРИЙ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРАНИЦ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

DOI: 10.17691/stm2018.10.3.4

УДК 616.831–006

Поступила 8.05.2018 г.



М.А. Мищенко, к.ф.-м.н., научный сотрудник кафедры теории колебаний и автоматического регулирования радиофизического факультета¹;

А.В. Лебедева, к.б.н., научный сотрудник лаборатории функционального имиджинга отдела фундаментальных и прикладных исследований¹; ассистент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ²;

К.С. Яшин, младший научный сотрудник лаборатории сверхразрешающей микроскопии и генных технологий Института биомедицинских технологий²; нейрохирург, Институт травматологии и ортопедии²;

Л.С. Лепехина, магистр кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;

К.А. Астафьева, младший научный сотрудник отдела физико-химических исследований ЦНИЛ²;

И.П. Иванова, д.б.н., зав. отделом физико-химических исследований ЦНИЛ²;

М.В. Ведунова, д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биологии и биомедицины¹; директор Института биологии и биомедицины¹;

И.А. Медяник, д.м.н., ведущий научный сотрудник группы микронеурологии Института травматологии и ортопедии²;

В.Б. Казанцев, д.ф.-м.н., проректор по научной работе¹; зав. кафедрой нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — оценить возможности использования показателей электрофизиологической активности опухолевой ткани и перитуморальной области в качестве критериев определения границ на примере экспериментальной модели глиобластомы.

Материалы и методы. Использованы методы регистрации электрофизиологической внеклеточной активности (полевых постсинаптических потенциалов) и регистрации глутаматных токов в астроцитах с помощью метода пэтч-кламп; магнитно-резонансная томография; хирургическая операционная техника *in vivo*. Эксперименты выполнены с использованием клеточных культур (первичная моноастроцитарная культура мыши, культура постоянной клеточной линии глиомы человека 2211); переживающих срезов гиппокампа головного мозга мышей; крыс с привитой злокачественной глиомой 101.8 для *in vivo* исследований.

Результаты. Проведена оценка нескольких электрофизиологических параметров активности нейронов и глиальных клеток в клеточных культурах, переживающих срезах гиппокампа, а также в ткани целого мозга. При регистрации полевых постсинаптических потенциалов в ткани целого мозга установлены различия функциональной активности неповрежденных участков и области развития глиомы. Полевые потенциалы в области глиомы не детектировались, что свидетельствует о невозбудимости опухолевой ткани.

Заключение. Полевые потенциалы, регистрируемые в ткани мозга *in vivo*, могут быть использованы в качестве нового критерия для определения границ глиальных опухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиома; астроцит; полевой постсинаптический потенциал; границы опухоли; интраоперационная диагностика.

Как цитировать: Mishchenko M.A., Lebedeva A.V., Mishchenko T.A., Yashin K.S., Lepekhina L.S., Astafyeva K.A., Ivanova I.P., Vedunova M.V., Medyanik I.A., Kazantsev V.B. Field potentials recording in the brain tissue as a new criterion for determination of glial tumors boundaries. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 32–42, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.4>

Для контактов: Мищенко Михаил Андреевич, e-mail: mischenko@neuro.nnov.ru

Field Potentials Recording in the Brain Tissue as a New Criterion for Determination of Glial Tumors Boundaries

M.A. Mishchenko, PhD, Researcher, Department of Theory of Oscillations and Automatic Control, Faculty of Radiophysics¹;

A.V. Lebedeva, PhD, Researcher, Functional Imaging Laboratory, Department of Basic and Applied Research¹; Assistant, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹;

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular and Cell Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory²;

K.S. Yashin, MD, Junior Researcher, Laboratory of Super-Resolution Microscopy and Gene Technologies, Institute of Biomedical Technologies²; Neurosurgeon, Institute of Traumatology and Orthopedics²;

L.S. Lepekhina, Master, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹;

K.A. Astafyeva, Junior Researcher, Department of Physico-Chemical Researches, Central Scientific Research Laboratory²;

I.P. Ivanova, DSc, Head of the Department of Physico-Chemical Researches, Central Scientific Research Laboratory²;

M.V. Vedunova, DSc, Leading Researcher, Institute of Biology and Biomedicine¹; Director of Institute of Biology and Biomedicine¹;

I.A. Medyanik, MD, DSc, Leading Researcher, Microneurosurgery Group, Institute of Traumatology and Orthopedics²;

V.B. Kazantsev, DSc, Vice-Rector for Research¹; Head of the Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to evaluate the electrophysiological activities of tumor and peritumoral tissues in an experimental glioblastoma model and rationalize their use for determining the tumor boundaries.

Materials and Methods. Following methods were used in this study: extracellular electrophysiological activity (field postsynaptic potentials) registration; astrocytic glutamate currents patch-clamp registration; magneto-resonant imaging; surgical techniques *in vivo*. The experiments were performed using cell cultures (primary murine astrocyte culture and constant cell line cultures of rat glioma cells 2211), acute murine hippocampal slices, and rats with transplanted malignant glioma 101.8.

Results. A number of electrophysiological parameters of neurons and glial cells were evaluated using cell cultures, acute hippocampal slices, and the rat brain as a whole. Field postsynaptic potentials in the brain tissue differed between the non-injured areas and the zone of glioma development. No field potentials detected in the tumoral area, indicating the lack of excitability in the tumor cells.

Conclusion. Field potentials recorded in the brain tissue *in vivo* can be used as a novel criterion for determining the glial brain tumors boundaries.

Key words: glioma; astrocyte; postsynaptic field potential; tumor boundary; intraoperative diagnosis.

Введение

Проблема эффективной диагностики и терапии злокачественных глиом головного мозга является одним из наиболее острых социально значимых вопросов современной нейроонкологии. По степени распространенности глиомы занимают лидирующие позиции среди других видов опухолей головного мозга, при этом средняя продолжительность жизни пациентов с данным диагнозом в среднем составляет 10–24 мес и лишь в редких случаях доходит до 5 лет [1–3].

Современная терапия злокачественных глиом

представляет собой комплекс методов и подходов, включающих микрохирургическое удаление опухоли, лучевую и химиотерапию в сочетании с инновационными методами лечения, например фотодинамической терапией и иммунотерапией [4–6].

Хирургическая резекция является основным этапом всех применяемых схем лечения, так как позволяет удалить большой объем опухолевой ткани, уменьшить внутричерепную гипертензию, снизить степень неврологического дефицита, а также установить точный фенотип опухоли для решения вопроса о дальнейшей тактике лечения. Основной задачей хирургического

лечения является максимально возможное удаление опухоли и элиминация жизнеспособных опухолевых клеток из перитуморальной области с минимальным повреждением прилежащих к опухоли функционально значимых зон мозга. Однако тотальное удаление опухолевых клеток хирургическим путем не представляется возможным. В первую очередь причина заключается в инвазивном характере роста новообразований, которые распространяются в окружающие ткани до нескольких сантиметров от основного опухолевого узла и являются источником продолженного роста опухолей [2, 7–11]. В этих обстоятельствах важную роль играет диагностика опухоли.

Для определения границ глиальных опухолей головного мозга требуется, во-первых, установить различия между нормальными и патологическими глиальными клетками, во-вторых, выявить взаимодействие данных типов клеток на границе опухоли. Результаты исследования клеток глиомы показывают ряд изменений в электрических свойствах и в работе транспортеров возбуждающих аминокислот [12]. В норме транспортеры астроцитов необходимы для нормальной синаптической передачи и обеспечивают быстрое очищение синаптической щели от высвободившегося глутамата, что предотвращает эффект эксайтотоксичности. Однако при развитии глиальных опухолей нарушается работа данных транспортеров, что приводит к ряду негативных изменений в метаболизме глиальных клеток и, как следствие, в синаптической передаче.

Новым подходом в диагностике является определение границ глиальных опухолей на основе оценки функционального состояния тканей головного мозга. Формирование электрофизиологического сигнала в ответ на электрическую стимуляцию является отличительной особенностью нервной ткани. При этом глиальная ткань, составляющая большую часть опухоли, является электрически невозбудимой. По своему принципу данный метод является уникальным методом диагностики для нейрохирургии, так как в отличие от всех остальных существующих методов основывается на анализе электрофизиологической активности, представленной полевыми потенциалами ткани, а не на ее морфологической структуре. Такая информация является крайне важной, учитывая стремление современной хирургии опухолей головного мозга предотвратить развитие неврологических (функциональных) нарушений в постоперационном периоде.

Цель исследования — оценить электрофизиологические особенности злокачественно трансформированной ткани головного мозга и перитуморальной области путем регистрации полевых потенциалов в ответ на электрическую стимуляцию.

Материалы и методы

Материалом для исследований *in vitro* служили клетки постоянной клеточной линии глиомы крысы 2211 и первичные моноастроцитарные культуры, по-

лученные от новорожденных мышей линии C57BL/6 (P=2).

В экспериментах *in vivo* использованы половозрелые самцы крыс линии Wistar с привитой злокачественной глиомой (глиобластомой) 101.8 (получена из ФГБНУ НИИ морфологии человека РАН, Москва) [13]. Возраст крыс на момент перевивки опухоли составлял 2,5 мес. Эксперименты проводились на 10–12-е сутки после трансплантации клеток глиомы.

Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали Правилам для проведения работ с использованием экспериментальных животных (Россия, 2010) и Международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (CIOMS и ICLAS, 2012), при этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). На проведение экспериментальных исследований на животных получено разрешение Биоэтического комитета Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Культивирование постоянной клеточной линии глиомы крысы 2211. Постоянная клеточная линия 2211 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде Игла MEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 0,32 мг/мл глутамин («ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия). По завершении периода экспоненциального роста клетки снимали раствором версен (0,02%) / трипсин (0,25%) в соотношении 3:1 и пересевали. Кратность посева составляла 1:10. Экспериментальные работы проводились после третьего пассажа.

Культивирование первичных моноастроцитарных культур. Первичные моноастроцитарные культуры получали из ткани коры больших полушарий головного мозга новорожденных мышей (P=2). Хирургически извлеченная нервная ткань подвергалась механическому измельчению и ферментативной диссоциации 0,25% раствором трипсина (Invitrogen, США). После центрифугирования (3 мин, 1000 об./мин) суспензию клеток раскапывали на покровные стекла (18×18 мм), предварительно обработанные положительно заряженным гидрофильным веществом — полиэтиленимином (Sigma, США), обеспечивающим эффективное прикрепление клеток к субстрату. Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 0,32 мг/мл глутамин («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия) и 1 мМ пировиноградной кислоты (Sigma, США) в течение 30 дней.

Жизнеспособность первичных культур и постоянной клеточной линии поддерживали в условиях CO₂-

инкубатора MCO-18AIC (Sanyo, Япония) при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂. Первичную морфологическую оценку развития первичных культур и клеток постоянной клеточной линии осуществляли при помощи широкопольной световой микроскопии с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Наркотизация животного. Перед трансплантацией опухоли, а также перед проведением магнитно-резонансной томографии (МРТ) каждое животное проходило предоперационную наркотизацию. Для введения экспериментального животного в состояние хирургического наркоза использовали Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 125 мг/кг массы тела внутривенно. Необходимым критерием хирургической стадии наркоза является отсутствие болевого рефлекса (отдергивание конечностей на щипок пинцетом). Далее экспериментальное животное было инъецировано 2% раствором анальгезирующего и миорелаксирующего препарата Рометар (Interchemie, Нидерланды) в дозе 0,2 мл/кг массы тела внутримышечно.

Трансплантация опухоли и определение сроков проведения эксперимента in vivo. Опухолевые клетки в количестве 10⁵–10⁶ в 1 мл раствора Хенкса вводили в правую теменную область (латеральнее от сагиттального шва на 2 мм и кзади от коронарного шва на 2 мм). В указанной области сначала формировали трепанационное отверстие в черепе диаметром 2 мм с помощью зубохирургического бора, затем твердую мозговую оболочку вскрывали и в ткань головного мозга с помощью троакара вводили опухолевые клетки на глубину 2–4 мм.

Через 5–7 сут после трансплантации обычно появлялись первые симптомы неопластического процесса, которые клинически проявлялись в малоподвижности, неопрятности и отсутствии аппетита у животного.

К 9–11-м суткам после трансплантации клеток клиническая картина глиобластомы в основном зависела от характера роста опухоли. При ограниченном росте в теменной доле, но с прорастанием опухоли в кору больших полушарий и желудочек мозга у 65–80% животных наблюдались очаговые нарушения в виде гемипарезов.

На 11–13-е сутки после перевивки опухоль достигала больших размеров (~1,5–2,2 см³), что приводило к летальному исходу. Оптимальным временем для регистрации электрофизиологических параметров в данном эксперименте был выбран период с 10-х по 12-е сутки после перевивки, когда опухоль полностью сформирована и достигает максимальных размеров. Клинически верифицировать точную локализацию опухоли и ее размеры при внутримозговом росте практически невозможно, поэтому определение местоположения опухоли и выбор оптимального периода проведения электрофизиологических экспериментов осуществляли на основании данных МРТ.

Магнитно-резонансная томография. Наркотизированное животное закрепляли в специальном фиксаторе за резцы на челюсти и помещали в сверхпроводящий магнитно-резонансный томограф туннельного типа Agilent DD2 NMR 400WB (Agilent Technologies, США) с рабочей частотой 400 МГц и величиной напряженности постоянного магнитного поля 9,4 Тл.

Для получения структурных T2-взвешенных изображений была использована импульсная последовательность FSEMS (fast spin echo multi slice). Время повторения — 3000 мс, время эха — от 40 мс, размер матрицы — 256×192, количество срезов — 10, толщина срезов — 1 мм, поле обзора — 40×40 мм.

Регистрация электрофизиологической активности с помощью метода внеклеточной регистрации. Перед выполнением регистрации проводили ингаляционную наркотизацию животного 5% Изофлураном (Piramal Healthcare Limited, Индия). Краниотомию осуществляли с использованием бормашины «Унибор-МК» (ОАО «Сапфир», Россия) от верхнего сагиттального синуса до верхней височной линии, от верхней челюсти до поперечного синуса. Для предупреждения нагревания твердой мозговой оболочки проводили ирригацию бура холодным физиологическим раствором каждые 10 с.

Регистрацию параметров электрофизиологической активности (полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы — пВПСП) осуществляли с использованием светового микроскопа Olympus BX51WI (Olympus, Япония), оснащенного автоматизированными манипуляторами и системой электродов для регистрации и стимуляции нервной ткани, и усилителя биологических сигналов MultiClamp 700B (Axon Instruments, США). Стимулирующий электрод представлял собой биполярный электрод из нержавеющей стали (FHC Inc., США), который устанавливали в разных областях трепанационного окна в зависимости от конкретной задачи. Регистрирующий электрод представлял собой микроэлектрод сопротивлением 4–7 МОм. Электроды вытягивались из стеклянных капилляров (Harvard Part No. 30-0053) при помощи пуллера P-97 (Sutter Instruments, США). Для регистрации пВПСП данный электрод заполнялся внутриклеточным раствором в составе: 119 мМ NaCl; 2,5 мМ KCl; 1,3 мМ MgSO₄; 1 мМ NaH₂PO₄; 26,2 мМ NaHCO₃; 2 мМ CaCl₂; 10 мМ D-глюкоза (pH=7,4; осмолярность — 298 мОсм). Значения пВПСП регистрировали в разных областях трепанационного окна в зависимости от конкретной задачи в режиме тока, равного нулю (*I*=0).

Полученные электрофизиологические данные были проанализированы с помощью программ WinWCP 4.7 (<http://winscp.net>), Clampfit (Axon Instruments Inc.; США), Origin Pro 2016 (OriginLab, США).

Результаты

На первом этапе исследований была проведена оценка транспортерных токов глутамата для глиаль-

ных клеток в переживающих срезах гиппокампа мозга животного и клеток глиомы. Глутаматные токи возникают при регуляции синаптической передачи и могут иметь решающее значение при оценке функциональной активности астроцитов в головном мозге [14–15]. Возбуждение транспортерного тока астроцитов вызывали путем локальной аппликации глутамата посредством патч-пипетки. Установлено, что кинетика транспортерного тока глутамата в астроцитах переживающих срезов гиппокампа и в клетках глиомы не различима (рис. 1).

Таким образом, несмотря на существенные метаболические изменения, происходящие при злокачественной трансформации клеток, нами не зарегистрировано разницы в изменениях одного из основных электрофизиологических параметров астроцитов, что делает невозможным использование этого показателя для оценки границ глиальных опухолей.

В связи с этим на следующем этапе работы в качестве диагностического критерия были исследованы пВПСП. Эти потенциалы представляют собой суммарный потенциал, возникающий при активации группы нейронов (популяционный спайк) или группы возбуждающих синапсов (полевой возбуждающий постсинаптический потенциал) в ответ на электрическую стимуляцию близлежащих нейрональных отростков.

Полевой потенциал характеризуется амплитудой и углом наклона, отражающими количество активированных нейронов и отростков. Известно [16], что

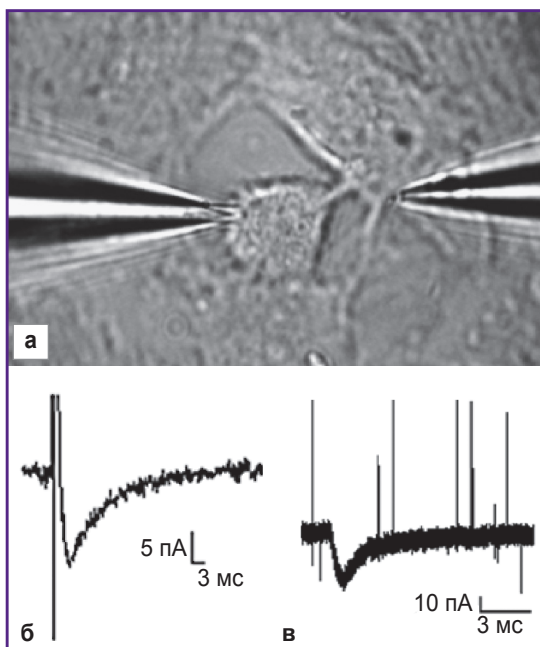


Рис. 1. Электрофизиологическая запись транспортерного тока астроцитов:

а — возбуждение путем аппликации глутамата; *б* — запись в переживающем срезе гиппокампа мыши; *в* — в культуре глиомы

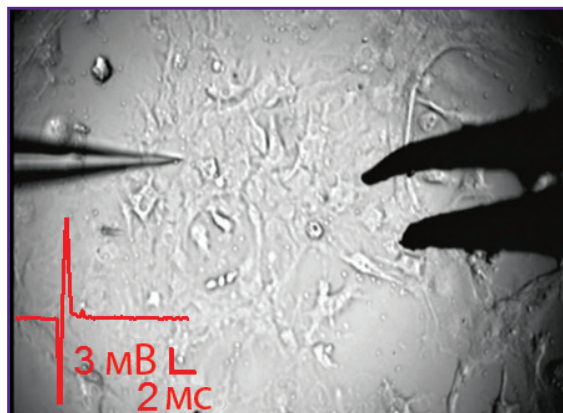


Рис. 2. Регистрация полевых потенциалов в культуре астроцитов

астроциты являются электрически не возбудимыми клетками, не способными в норме генерировать потенциалы действия. Можно предположить, что онкотрансформированные астроциты претерпевают изменения, позволяющие генерировать потенциалы, например пВПСП. Для проверки данной гипотезы была осуществлена попытка регистрации полевых потенциалов в культуре астроцитов. Обнаружено отсутствие пВПСП в культуре астроцитов в ответ на электрическую стимуляцию (рис. 2).

Таким образом, регистрация полевых потенциалов может выступать в качестве критерия, позволяющего отличать опухолевую ткань, сформированную онкотрансформированными астроцитами, от нормальной ткани, содержащей нейроны и нервные волокна.

Следующим шагом в исследовании пВПСП тканей мозга для определения границ глиальных опухолей стало исследование *in vivo* на крысах линии Wistar с перевитой глиомой 101.8. Верификацию точной локализации глиомы и ее размеров проводили по результатам МРТ экспериментальных животных (рис. 3).

Затем были изучены пВПСП различных областей головного мозга при экспериментальной неоплазии. Для оценки электрофизиологической активности ткани головного мозга *in vivo* проведены эксперименты с различным расположением стимулирующего и регистрирующего электродов. Расстояние между этими электродами всегда составляло 4 мм. Были определены области мозга, дающие физиологический ответ на электростимуляцию (неизмененная ткань), и области, являющиеся невозбудимыми (глиома). Отмечены различия пВПСП нормальной и злокачественно трансформированной тканей головного мозга (рис. 4).

При регистрации ответа с опухолевой ткани или в непосредственной близости от нее (перитуморальная зона) определяется существенное снижение амплитуды ответа (рис. 4, *а*, *б*), что может быть обусловлено разрушением волокон миелина, отвечающих за про-

Рис. 3. МРТ-изображения головного мозга крыс линии Wistar:
 а — крыса из контрольной группы без развития опухоли головного мозга; б — крыса с развитой опухолью головного мозга; снятие изображения осуществляли на 11-й день после перевивки опухоли

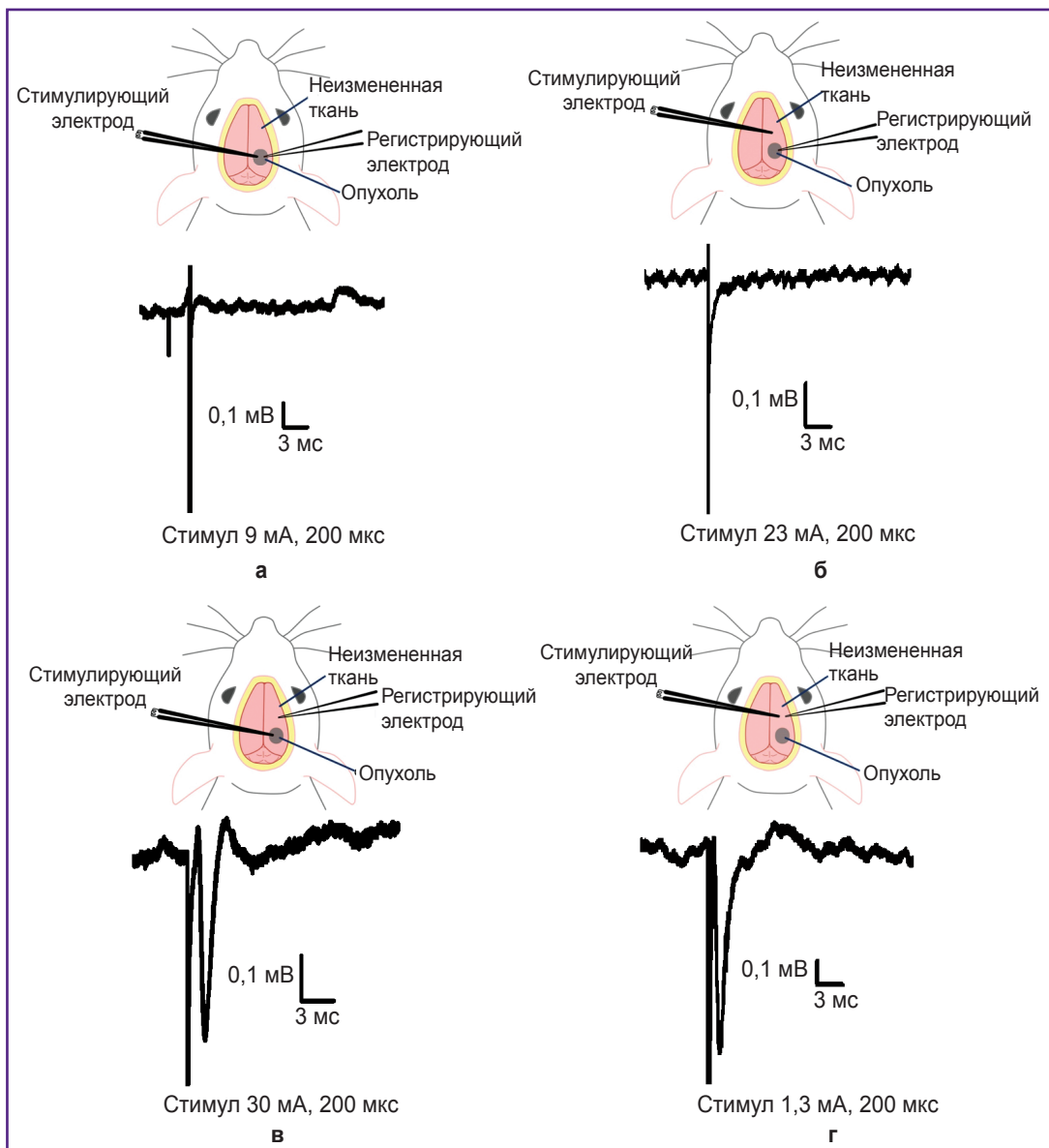
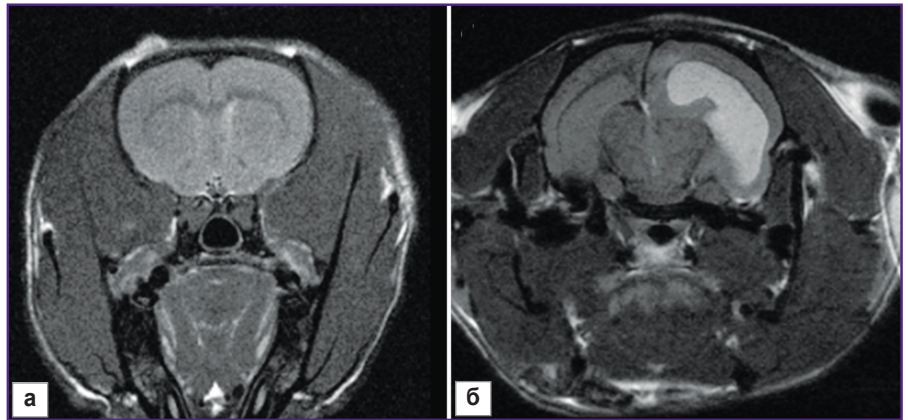


Рис. 4. Расположение стимулирующего и регистрирующего электродов в головном мозге животного и регистрируемые полевые потенциалы:
 а — оба электрода расположены в опухоли; б — регистрирующий электрод расположен в опухоли, стимулирующий — в нормальной ткани; в — стимулирующий электрод расположен в опухоли, регистрирующий — в нормальной ткани; г — оба электрода расположены в нормальной ткани

ведение нервных сигналов, или нарушением структуры коры.

Внеклеточная электрическая стимуляция нервной ткани (см. рис. 4, а, б и рис. 4, в) способна оказывать воздействие как на близлежащие клетки,

так и на достаточно отдаленные, поскольку генерируемое стимулирующим импульсом электрическое поле распространяется через межклеточную среду или через возбуждение частично сохранившихся нервных волокон. Несмотря на затухание

при распространении, данное электрическое поле при достаточно больших амплитудах стимуляции способно создавать локальную деполяризацию клеточных мембран, что может приводить к генерации потенциалов действия нейронами. По этой причине на регистрирующем электроде, расположенном в неизменной ткани, наблюдается пВПСП амплитудой до 1 мВ при стимуляции в области развития глиомы (см. рис. 4, в).

Поскольку величина полевого потенциала зависит от амплитуды стимуляции, установлено увеличение ответа при увеличении амплитуды стимула в случае расположения электродов в неизменной ткани мозга (рис. 5) и отсутствие ответа при тех же значениях амплитуды стимула в случае расположения стимулирующего и регистрирующего электродов в опухоли (рис. 6).

Следующим этапом экспериментальных исследований стало исследование электрофизиологических параметров в условиях моделирования нейрохирургической процедуры удаления опухоли с получением ответа от «ложа» удаленной опухоли. Поскольку опухоли глиального ряда прорастают вдоль волокон белого вещества, задачей данной работы явилась регистрация пВПСП в подкорковых структурах головного мозга. При стимуляции в «ложе» экспериментальной опухоли обнаружено наличие пВПСП, амплитуда которого значительно меньше амплитуды полевого потенциала, зарегистрированного в неизменной ткани коры головного мозга, но все же это говорит о наличии возбудимых клеток после хирургического удаления опухоли, которые имеют функциональную активность (рис. 7).

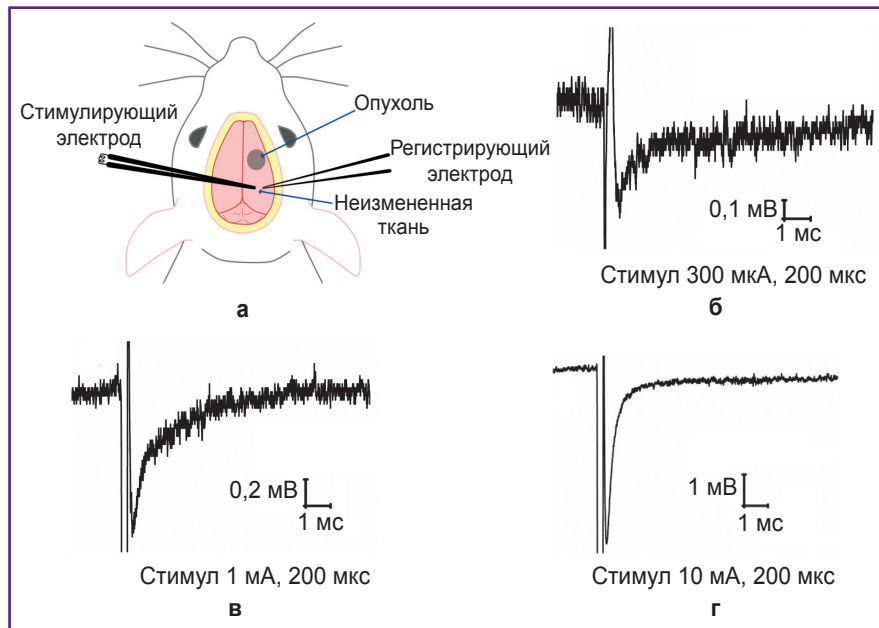


Рис. 5. Регистрация пВПСП в неизменной области головного мозга:

а — схематичное отображение электродов; б — пВПСП при амплитуде стимула 300 мкА, амплитуда ответа — 0,2 мВ; в — пВПСП при амплитуде стимула 1 мА, амплитуда ответа — 1,2 мВ; г — пВПСП при амплитуде стимула 10 мА, амплитуда ответа — 5 мВ

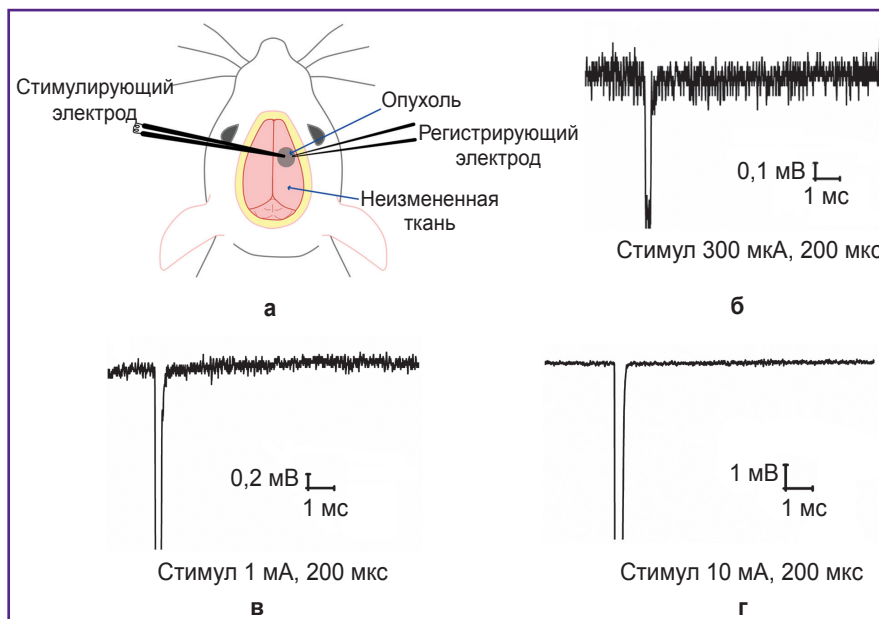


Рис. 6. Регистрация пВПСП непосредственно в привитой глиобластоме 101.8:

а — схематичное отображение электродов; б — отсутствие ответа при амплитуде стимула 300 мкА; в — отсутствие ответа при амплитуде стимула 1 мА; г — отсутствие ответа при амплитуде стимула 10 мА

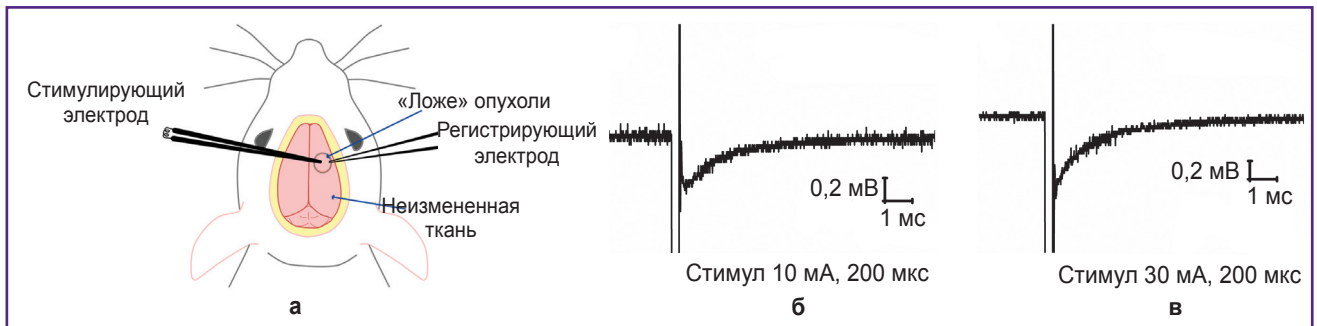


Рис. 7. Регистрация пВПСП после удаления привитой глиобластомы 101.8. (в «ложе» опухоли):

а — схематичное отображение электродов; **б** — ответ при амплитуде стимула 10 мА, амплитуда ответа — 0,2 мВ; **в** — ответ при амплитуде стимула 30 мА, амплитуда ответа — 0,5 мВ

Обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что электрофизиологическая активность, определяемая регистрацией пВПСП, в ответ на локальную электрическую стимуляцию в нормальной и онкотрансформированной ткани мозга значительно различается. Регистрация пВПСП, отражающих суммарную электрическую активность нервных клеток или отдельных волокон, показала, что в онкотрансформированной ткани отсутствует ответ на электрическую стимуляцию, в то время как в неизменной ткани возникает полевой потенциал, амплитуда которого увеличивается при увеличении амплитуды стимула. Кроме того, полевые потенциалы возникают также в ответ на стимуляцию в «ложе» удаленной опухоли, расположенной в подкорковых структурах мозга. Таким образом, различия в полевых потенциалах нормальной и онкотрансформированной тканей головного мозга могут быть использованы в качестве диагностического критерия при интраоперационном определении границ глиальных опухолей головного мозга. При определении типа ткани на основе регистрации полевых потенциалов установлена ключевая роль места расположения регистрирующего и стимулирующего электродов. Регистрация полевых потенциалов в ткани мозга крысы с перевитой глиомой 101.8 осуществлялась по четырем возможным вариантам расположения электродов: стимулирующий и регистрирующий электроды в одной области (в нормальной ткани или в области развития перевитой глиомы), а также в различных областях. При расположении регистрирующего электрода в нормальной ткани в результате стимуляции наблюдается полевой потенциал, амплитуда которого увеличивается при увеличении амплитуды стимула вне зависимости от того, где расположен стимулирующий электрод. Если регистрирующий электрод располагается в области развития опухоли, где отсутствуют электровозбудимые нервные клетки, полевые потенциалы не возникают. В «ложе» удаленной опухоли, формируемой подкорковыми структурами,

могут быть зарегистрированы полевые потенциалы от пролегающих там нервных волокон или их частичных остатков, возбуждаемых электрической стимуляцией. При этом амплитуда регистрируемых ответов оказывается ниже, чем амплитуда в кортикальных областях нормальной ткани, но различима в сравнении с областью развития опухоли. Это свидетельствует о наличии функционально активных нервных клеток, которые способны формировать отростки в области мозга после хирургического удаления опухоли.

Основными ограничениями для достижения максимальной резекции злокачественных глиом (95–98%) являются недостаточная визуализация границ опухоли вследствие ее инфильтративного роста и необходимость сохранения функционально значимых зон головного мозга. При традиционном удалении опухоли в белом свете микроскопа максимальная резекция достигается лишь в 23–50% случаев [9, 17], что стимулирует разработку новых методов интраоперационной диагностики границ злокачественных опухолей головного мозга.

В настоящее время существует множество методов, применяемых при удалении опухоли для достижения максимальной резекции с минимальным риском функциональных осложнений: интраоперационная КТ и/или МРТ [5, 18–21], УЗ-сканирование [22–24], нейронавигационные системы [25–27], флюоресцентная диагностика [28–36], интраоперационный нейрофизиологический мониторинг, краниотомия в сознании и различные комбинации этих методов. Работа перечисленных методов основана на нескольких подходах: первый — регистрация контрастных веществ, накапливающихся в опухолевой сосудистой сети (КТ, МРТ), второй — регистрация метаболических изменений в тканях (специальные режимы МРТ — МР-спектроскопия, DVI, флюоресцентная диагностика, лазерная спектроскопия), третий — регистрация изменений плотности тканей (ультразвуковая диагностика). Исключение составляют навигационные системы, в которых определение типа тканей основано на результатах дооперационного обследования больных

[1, 37]. В настоящее время проводятся исследования возможности применения в целях интраоперационной визуализации структур головного мозга конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии [38–42].

Однако вместе с тем наличие у каждого метода ограничений в определении границ опухолевой инвазии оставляет актуальной проблему поиска новых технологий интраоперационной диагностики границ опухолей. Данная работа показала возможности использования нового метода для определения границ глиальной опухоли — на основе оценки полевых потенциалов ткани мозга в опухоли и в близлежащих участках.

Заключение

Полученные результаты позволяют предложить новый диагностический критерий для определения границ глиальных опухолей головного мозга, основанный на регистрации полевых потенциалов ткани в ответ на электрическую стимуляцию. Этот критерий является уникальным для нейрохирургии, поскольку основывается на оценке функциональной активности ткани, а не ее морфологии. Полученные данные крайне важны для современной нейрохирургии, что обусловлено необходимостью предотвращения развития неврологических (функциональных) нарушений в постоперационном периоде у пациентов. При этом точность оценки границ опухоли, которая достигается лишь взаимным расположением стимулирующего и регистрирующего электродов, может теоретически достигать субмиллиметровых значений.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Тюриковой Ольге Валерьевне и Дембицкой Юлии Владимировне за помощь в дизайне экспериментов, важные указания и критический взгляд на данную работу.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-31-60080 мол_а_дк), государственного задания (проекты 17.3335.2017/4.6 и 6.6659.2017/6.7), гранта Президента Российской Федерации МД-2634.2017.4 и стипендии Президента Российской Федерации СП-2458.2018.5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Mahboob S.O., Eljamel M. Intraoperative image-guided surgery in neuro-oncology with specific focus on high-grade gliomas. *Future Oncol* 2017; 13(26): 2349–2361, <https://doi.org/10.2217/fo-2017-0195>.
2. Cohen A.L., Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res* 2015; 163: 15–30, https://doi.org/10.1007/978-3-319-12048-5_2.
3. Смолин А.В., Бекашев А.Х., Кобяков Г.Л., Шарабур Т.М., Муфазалов Ф.Ф., Каницева Н.В., Бумагина В.О.

Первые результаты Российского многоцентрового исследования по эпидемиологии злокачественных глиом. Современная онкология 2014; 16(2): 50–55. Smolin A.V., Bekyashev A.H., Kobayakov G.L., Sharabura T.M., Mufazalov F.F., Kanischeva N.V., Bumagina V.O. First results of the Russian multicenter epidemiology project on the malignant gliomas. *Sovremennaya onkologiya* 2014; 16(2): 50–55.

4. de Paula L.B., Primo F.L., Tedesco A.C. Nanomedicine associated with photodynamic therapy for glioblastoma treatment. *Biophys Rev* 2017; 9(5): 761–773, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0293-3>.

5. Eljamel M.S., Mahboob S.O. The effectiveness and cost-effectiveness of intraoperative imaging in high-grade glioma resection; a comparative review of intraoperative ALA, fluorescein, ultrasound and MRI. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016; 16: 35–43, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.07.012>.

6. Абсалимова О.В., Анিকেва О.Ю., Голанов А.В., Кобяков Г.Л., Коновалов А.Н., Корниенко В.Н., Кривошапкин А.Л., Лошаков В.А., Олюшин В.Е., Потапов А.А., Рыжова М.В., Танышин С.В., Трунин Ю.Ю., Улитин А.Ю., Шишкина Л.В. Клинические рекомендации по лечению первичных опухолей центральной нервной системы. Н.Новгород; 2013. Absalyamova O.V., Anikeeva O.Yu., Golanov A.V., Kobayakov G.L., Konovalov A.N., Kornienko V.N., Krivoshapkin A.L., Loshakov V.A., Olyushin V.E., Potapov A.A., Ryzhova M.V., Tanyashin S.V., Trunin Yu.Yu., Ulitin A.Yu., Shishkina L.V. *Klinicheskie rekomendatsii po lecheniyu pervichnykh opukholey tsentralnoy nervnoy sistemy* [Clinical guidelines for the treatment of primary central nervous system tumors]. Nizhny Novgorod; 2013.

7. Reitman Z.J., Winkler F., Elia A.E.H. New directions in the treatment of glioblastoma. *Semin Neurol* 2018; 38(1): 50–61, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623534>.

8. Улитин А.Ю., Мацко Д.Е., Олюшин В.Е. Нейроэпителиальные опухоли головного мозга. СПб: Изд-во ФГБУ «РНХИ им. проф. А.Л. Поленова»; 2014. Ulitin A.Yu., Matsko D.E., Olyushin V.E. *Neuroepitelialnye opukholi golovnogo mozga* [Neuroepithelial brain tumors]. Saint Petersburg: Izd-vo FGBU “RNKH im. prof. A.L. Polenova”; 2014.

9. Анохина Ю.Е., Гайдар Б.В., Мартынов Б.В., Свистов Д.В., Папаян Г.В., Григорьевский Д.И. Прогностическая значимость объема хирургического вмешательства в условиях применения интраоперационной флуоресцентной диагностики у пациентов со злокачественными глиомами головного мозга. Вестник Российской военно-медицинской академии 2014; 1(45): 19–24. Anokhina Yu.E., Gaidar B.V., Martynov B.V., Svistov D.V., Papayan G.V., Grigorievsky D.I. Prognostic significance of surgery volume under fluorescent intraoperative diagnostic applications in patients with malignant brain gliomas. *Vestnik Rossijskoj voenno-meditsinskoj akademii* 2014; 1(45): 19–24.

10. Sanai N., Chang S., Berger M.S. Low-grade gliomas in adults: a review. *J Neurosurg* 2011; 115(5): 948–965, <https://doi.org/10.3171/2011.7.jns10238>.

11. Kuhnt D., Becker A., Ganslandt O., Bauer M., Buchfelder M., Nimsky C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol* 2011; 13(12): 1339–1348, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor133>.

12. Robert S.M., Sontheimer H. Glutamate transporters in the biology of malignant gliomas. *Cell Mol Life Sci*

2014; 71(10): 1839–1854, <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1521-z>.

13. Халанский А.С., Кондакова Л.И. Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8 I. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная морфология 2013; 4(8): 63–69. Khalansky A.S., Kondakova L.I. Transplanted rat glioma 101.8. I. Biological characteristics. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya* 2013; 4(8): 63–69.

14. Lebedeva A.V., Dembitskaya Y.V., Pimashkin A.S., Zhuravleva Z.D., Shishkova E.A., Semyanov A.V. The role of energy substrates in astrocyte calcium activity of rat hippocampus in early postnatal ontogenesis. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2015; 7(3): 14–19, <https://doi.org/10.17691/stm2015.7.3.02>.

15. Lebedeva A., Plata A., Nosova O., Tyurikova O., Semyanov A. Activity-dependent changes in transporter and potassium currents in hippocampal astrocytes. *Brain Res Bull* 2018; 136: 37–43, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.08.015>.

16. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1): 7–35, <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>.

17. Vogelbaum M.A. Does extent of resection of a glioblastoma matter? *Clin Neurosurg* 2012; 59: 79–81, <https://doi.org/10.1227/neu.0b013e31826b2e75>.

18. Li P., Qian R., Niu C., Fu X. Impact of intraoperative MRI-guided resection on resection and survival in patient with gliomas: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 2017; 33(4): 621–630, <https://doi.org/10.1080/03007995.2016.1275935>.

19. Scherer M., Jungk C., Younsi A., Kickingeder P., Müller S., Unterberg A. Factors triggering an additional resection and determining residual tumor volume on intraoperative MRI: analysis from a prospective single-center registry of supratentorial gliomas. *Neurosurg Focus* 2016; 40(3): E4, <https://doi.org/10.3171/2015.11.focus15542>.

20. Kubben P.L., Scholtes F., Schijns O.E., Ter Laak-Poort M.P., Teernstra O.P., Kessels A.G., van Overbeeke J.J., Martin D.H., van Santbrink H. Intraoperative magnetic resonance imaging versus standard neuronavigation for the neurosurgical treatment of glioblastoma: a randomized controlled trial. *Surg Neurol Int* 2014; 5: 70, <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132572>.

21. Senft C., Bink A., Franz K., Vatter H., Gasser T., Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(11): 997–1003, [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70196-6).

22. Enchev Y., Bozinov O., Miller D., Tirakotai W., Heinze S., Benes L., Bertalanffy H., Sure U. Image-guided ultrasonography for recurrent cystic gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(10): 1053–1063, <https://doi.org/10.1007/s00701-006-0858-6>.

23. Cheng L.G., He W., Zhang H.X., Song Q., Ning B., Li H.Z., He Y., Lin S. Intraoperative contrast enhanced ultrasound evaluates the grade of glioma. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2643862, <https://doi.org/10.1155/2016/2643862>.

24. Prada F., Mattei L., Del Bene M., Aiani L., Saini M., Casali C., Filippini A., Legnani F.G., Perin A., Saladino A., Vetrano I.G., Solbiati L., Martegani A., DiMeco F. Intraoperative cerebral glioma characterization with contrast enhanced ultrasound. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 484261, <https://doi.org/10.1155/2014/484261>.

25. Wirtz C.R., Albert F.K., Schwaderer M., Heuer C., Stauber A., Tronnier V.M., Knauth M., Kunze S. The benefit

of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery. *Neurol Res* 2000; 22(4): 354–360, <https://doi.org/10.1080/01616412.2000.11740684>.

26. Tursynov N., Grigolashvili M., Kauynbekova S., Grigolashvili S. Evaluating the efficacy of neuronavigation in surgical treatment of glial tumors. *Georgian Med News* 2017; 262: 14–20.

27. Gerard I.J., Kersten-Oertel M., Petrecca K., Sirhan D., Hall J.A., Collins D.L. Brain shift in neuronavigation of brain tumors: a review. *Med Image Anal* 2017; 35: 403–420, <https://doi.org/10.1016/j.media.2016.08.007>.

28. Suero Molina E., Schipmann S., Stummer W. Maximizing safe resections: the roles of 5-aminolevulinic acid and intraoperative MR imaging in glioma surgery-review of the literature. *Neurosurg Rev* 2017, <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0907-z>.

29. Xie Y., Thom M., Ebner M., Wykes V., Desjardins A., Miserocchi A., Ourselin S., McEvoy A.W., Vercauteren T. Wide-field spectrally resolved quantitative fluorescence imaging system: toward neurosurgical guidance in glioma resection. *J Biomed Opt* 2017; 22(11): 1–14, <https://doi.org/10.1117/1.jbo.22.11.116006>.

30. Eljamel S. 5-ALA fluorescence image guided resection of glioblastoma multiforme: a meta-analysis of the literature. *Int J Mol Sci* 2015; 16(5): 10443–10456, <https://doi.org/10.3390/ijms160510443>.

31. Acerbi F., Cavallo C., Schebesch K.M., Akçakaya M.O., de Laurentis C., Hamamcioglu M.K., Broggi M., Brawanski A., Falco J., Cordella R., Ferroli P., Kiris T., Höhne J. Fluorescein-guided resection of intramedullary spinal cord tumors: results from a preliminary, multicentric, retrospective study. *World Neurosurg* 2017; 108: 603–609, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.09.061>.

32. Acerbi F., Broggi M., Eoli M., Anghileri E., Cavallo C., Boffano C., Cordella R., Cuppini L., Pollo B., Schiariti M., Visintini S., Orsi C., La Corte E., Broggi G., Ferroli P. Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? *Neurosurg Focus* 2014; 36(2): E5, <https://doi.org/10.3171/2013.11.focus13487>.

33. Barone D.G., Lawrie T.A., Hart M.G. Image guided surgery for the resection of brain tumours. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD009685, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd009685.pub2>.

34. Li Y., Rey-Dios R., Roberts D.W., Valdés P.A., Cohen-Gadol A.A. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: a comparison of the present techniques and evolution of future strategies. *World Neurosurg* 2014; 82(1–2): 175–185, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2013.06.014>.

35. Jenkinson M.D., Barone D.G., Bryant A., Vale L., Bulbeck H., Lawrie T.A., Hart M.G., Watts C. Intraoperative imaging technology to maximise extent of resection for glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 1: CD012788, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd012788.pub2>.

36. Горайнов С.А., Потапов А.А., Пицхелаури Д.И., Кобяков Г.Л., Охлопков В.А., Гаврилов А.Г., Шурхай В.А., Жуков В.Ю., Шишкина Л.В., Лощенов В.Б., Савельева Т.А., Кузьмин С.Г., Чумакова А.П., Spallone A. Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия при повторных операциях по поводу глиом головного мозга. Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко 2014; 78(2): 22–31. Goriainov S.A., Potapov A.A., Pitskhelauri D.I., Kobiakov G.L., Okhlopov V.A., Gavrillov A.G., Shurkhay V.A.,

Zhukov V.Iu., Shishkina L.V., Loshchenov V.B., Savel'eva T.A., Kuz'min S.G., Chumakova A.P., Spallone A. Intraoperative fluorescence diagnostics upon recurrent operations for brain gliomas. *Voprosy neyrokhirurgii im. N.N. Burdenko* 2014; 78(2): 22–31.

37. Tyurikova O., Dembitskaya Y., Yashin K., Mishchenko M., Vedunova M., Medyanik I., Kazantsev V. Perspectives in intraoperative diagnostics of human gliomas. *Comput Math Methods Med* 2015; 2015: 1–9, <https://doi.org/10.1155/2015/479014>.

38. Banc A., Stan C., Florian I.S. Optical coherence tomography as a marker of vision in children with optic pathway gliomas. *Childs Nerv Syst* 2018; 34(1): 51–60, <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3578-8>.

39. Garzon-Muvdi T., Kut C., Li X., Chaichana K.L. Intraoperative imaging techniques for glioma surgery. *Future Oncol* 2017; 13(19): 1731–1745, <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0092>.

40. Gempt J., Bette S., Ryang Y.M., Buchmann N., Peschke P., Pyka T., Wester H.J., Förster S., Meyer B., Ringel F. 18F-fluoro-ethyl-tyrosine positron emission tomography for grading and estimation of prognosis in patients with intracranial gliomas. *Eur J Radiol* 2015; 84(5): 955–962, <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2015.01.022>.

41. Zehri A.H., Ramey W., Georges J.F., Mooney M.A., Martirosyan N.L., Preul M.C., Nakaji P. Neurosurgical confocal endomicroscopy: a review of contrast agents, confocal systems, and future imaging modalities. *Surg Neural Int* 2014; 5(1): 60, <https://doi.org/10.4103/2152-7806.131638>.

42. Kiseleva E.B., Yashin K.S., Moiseev A.A., Snopova L.B., Gelikonov G.V., Medyanik I.A., Kravets L.Ya., Karyakin N.N., Vitkin I.A., Gladkova N.D. Quantitative cross-polarization optical coherence tomography detection of infiltrative tumor margin in a rat glioma model: a pilot study. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(1): 6, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.1.01>.