

Сведения о выполненных работах в 2017 году
по проекту «**Неинвазивное количественное картирование миелинизации
серого вещества головного мозга у человека и животных**»,
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 14-45-00040

Руководитель канд. хим. наук Ярных Василий Леонидович

В течение прошедшего года исследования проводились в нескольких направлениях, включая трансляцию метода картирования макромолекулярной протонной фракции (МПФ) в клинику в области визуализации очага инсульта и динамики развития мозга в пре- и постнатальном периоде, комплексные экспериментальные исследования на животных, посвященные валидации метода в качестве универсального инструмента для количественной оценки де- и ремиелинизации при ишемическом инсульте, и некоторые методологические аспекты, связанные с повышением надежности, простоты использования и стабильности разработанной технологии.

Значительные усилия были направлены на решение основной задачи 1 "Гистологически валидировать быстрое картирование МПФ в качестве практического доклинического метода мониторинга де- и ремиелинизации при ишемическом инсульте с использованием крысиной модели". Проведено две серии экспериментов, посвященных исследованию динамики изменений нервной ткани в зоне ишемического очага. Первый эксперимент был организован как одномоментное исследование с контрольной группой. Этот эксперимент проведен на 15 взрослых крысах-самцах линии Sprague-Dawley, которые подверглись обратимой окклюзии срединной церебральной артерии (middle cerebral artery occlusion, МСАО), еще 5 крыс той же линии составили группу ложнооперированного контроля. После операции животные были случайным образом поделены на три экспериментальные группы и были отсканированы на магнитно-резонансном томографе с напряженностью поля 11.7Т на 1-е, 3-и и 10-е сутки после операции, после чего были выведены из эксперимента для проведения гистологических и иммуногистохимических исследований. Протокол сканирования включал комплекс методов количественного параметрического картирования, в том числе картирование МПФ, T1, T2, протонной плотности и измеряемого коэффициента диффузии (ИКД). Результаты неинвазивного картирования были сопоставлены с гистологическими и иммуногистохимическими маркерами демиелинизации (окрашивание Люксолем быстрым синим (ЛБС)), потерей нейронов (NeuN, иммунофлуоресценция), аксонов (окрашивание по Бильшовскому) и воспаления (маркер микроглии Iba1, иммунофлуоресценция). Количественные переменные, полученные с помощью МРТ- и гистологических\иммуногистохимических методов, были выражены как относительные изменения вышеуказанных параметров для зоны ишемического инсульта относительно симметричных регионов контралатерального полушария. Процентные изменения МПФ и оптической плотности ЛБС в зоне инсульта относительно контралатерального полушария значительно отличались только на первый

день после операции. Среди всех измеренных МРТ параметров только значения МПФ ($R=0.81$, $P<0.001$, коэффициент корреляции Пирсона) высокозначимо коррелировали с оптической плотностью ЛБС. Кроме того, значения МПФ не коррелировали больше ни с одним гистологическим параметром. Полученная модель зависимости между МПФ и оптической плотностью ЛБС была улучшена благодаря коррекции эффекта отека введением в регрессионную модель параметра T2, в результате коэффициент корреляции составил $R=0.89$ ($P<0.001$). Таким образом, в результате эксперимента получено подтверждение того, что МПФ является специфичным биомаркером количественной оценки миелина при инсульте, который нечувствителен к другим патологическим процессам, таким как потеря нейронов, аксонов и воспаление. МПФ картирование может служить методологической основой для дальнейшего клинического и доклинического использования в качестве маркера демиелинизации при церебральной ишемии.

Второй эксперимент был построен как долговременное исследование эволюции ишемического очага, оцениваемой по МПФ и с помощью других методов визуализации. Гистологическая валидация проводилась в конечной временной точке. Эксперимент был проведен на 9 крысах-самцах линии Вистар с использованием описанной выше модели инсульта. Всего для неинвазивного картирования МПФ было выбрано одиннадцать временных точек: 1) до операции, а также 2) через 3-4 часа, 3) 1 сутки, 4) 3 суток, 5) 5 суток, 6) 7 суток, 7) 14 суток, 8) 21 сутки, 9) 31 сутки 10) 42 дня и 11) 56 суток после операции. Ко времени подготовки отчета гистологическая валидация включает окрашивание ЛБС, однако в дальнейшем планируется исследование срезов с помощью других гистологических и иммуногистохимических методов благодаря доступности биологического материала. Главным результатом этого исследования стало заключение о существенных различиях эволюции ишемического очага в зонах демиелинизации и соседствующих с ними зонах ремиелинизации. Наличие этих зон было подтверждено гистологическим окрашиванием ЛБС. В частности, зоны демиелинизации характеризуются монотонным снижением МПФ от базовых значений 9-10% в стриатуме (типичной зоны локализации ишемического очага) до 2-5%. В зоне ремиелинизации, напротив, наблюдалось снижение МПФ в начальный период и заметное повышение МПФ на 5-7 суток после моделирования инсульта. Значения МПФ в этих зонах практически восстанавливались до исходных к концу периода наблюдения, а значения оптической плотности ЛБС были близки к таковым в контралатеральном полушарии или даже превышали их. Таким образом, эксперимент показал, что изменения МПФ могут предсказать эволюцию нервной ткани после инсульта - некроз или восстановление.

Для решения основной задачи 2 "Установить диагностическое и прогностическое значение быстрого картирования МПФ как метода для клинического мониторинга повреждения и восстановления миелина после ишемического инсульта" мы инициировали клиническое исследование в Городской клинической больнице имени С.С. Юдина (г. Москва). Нами был разработан сверхбыстрый (время сканирования около 5 минут) протокол картирования МПФ для клинического магнитно-резонансного томографа Toshiba EXCELART Vantage Atlas-X с напряженностью

магнитного поля 1.5T, который был включен в стандартный клинический протокол исследования пациентов с ишемическим инсультом. К моменту написания отчета проведено сканирование по протоколу картирования МПФ у 5 пациентов на разных сроках после ишемического инсульта. В 2018 году набор пациентов будет продолжен. В этом исследовании МПФ картирование показало способность четко визуализировать ишемический очаг в острой, подострой и хронической фазе инсульта. Результаты исследования хорошо согласуются с описанными выше экспериментами, выполненными на животных с использованием модели МСАО, что подтверждает необходимость дальнейшего использования МПФ картирования в качестве прогностического инструмента при инсульте.

Для решения основной задачи 3 "Валидировать быстрое картирование МПФ в качестве универсального метода количественной оценки созревания мозга в норме и патологии с использованием генетической модели дисмиелинизации центральной нервной системы собаки" была выполнена серия экспериментов в Университете Висконсина (Мэдисон, США) с использованием 10 генетически дисмиелинизированных мутантных собак и 7 нормальных собак. Питомник, в котором содержится эта уникальная генетическая модель дисмиелинизации, является единственным в мире. Данные были собраны на магнитно-резонансном томографе General Electric 3T с использованием стандартного и быстрого протоколов МПФ картирования. Стандартный протокол включал сбор двух изображений с переменной величиной угла поворота (VFA) и одиннадцати МТ-взвешенных изображений с различной отстройкой рабочей частоты и мощностью насыщения МТ импульса. Новый (быстрый) метод МПФ картирования использовал всего три набора данных, включая два VFA изображения и одно МТ-взвешенное изображение, что соответствует почти четырёхкратному уменьшению времени сканирования по сравнению со стандартным протоколом. Дополнительно были собраны V1 карты для локальной коррекции углов поворота и мощности насыщения МТ-импульса во время подгонки модели, что является традиционным подходом в ранних методах МПФ картирования. Полученные карты МПФ продемонстрировали высокую степень соответствия стандартного (длительного) и нового быстрого в различных группах животных ($R^2 > 0.99$). Результаты экспериментального анализа эффектов коррекции V1 значений показали, что V1 не оказывает значительного влияния на точность МПФ картирования. Наши результаты подтверждают теоретические предсказания о минимальной чувствительности нового протокола быстрого МПФ картирования к V1 коррекции, которая является необходимой во многих традиционных методах МПФ картирования. Этот результат позволяет исключить сбор карт V1 из протоколов, что является важным шагом для адаптации быстрого картирования МПФ для клинической практики, так как сбор V1 карт является наиболее нестабильной и проблематичной методологией на современных МРТ сканерах.

Для решения основной задачи 4 "Установить количественные траектории миелинизации белого и серого вещества в процессе пренатального развития головного мозга человека с использованием быстрого прижизненного картирования МПФ плода" был разработан сверхбыстрый протокол картирования МПФ головного

мозга плода для клинического магнитно-резонансного томографа 1.5 Т (Philips Medical Systems, Netherlands), установленного в Международном Томографическом Центре Сибирского Отделения Российской Академии Наук (г. Новосибирск). В комбинации со сложным алгоритмом обработки изображений, основанном на исключении двигательных артефактов, этот протокол сделал возможной уникальную технологию визуализацию развития мозга человека в пренатальном периоде. В сотрудничестве с ведущим в Российской Федерации центром пренатальной МРТ диагностики, Международным Томографическим Центром СО РАН (Новосибирск) мы начали пилотное исследование, сфокусированное на пренатальной миелинизации. Сверхбыстрый протокол МПФ картирования (время сканирования менее 5 минут) был добавлен к стандартному клиническому протоколу МРТ сканирования плода человека. Исследование проводилось с участием 28 беременных женщин (средний гестационный возраст 27.6 ± 5.8 недель), которые проходили МРТ сканирование плода для клинической диагностики. Значения МПФ были измерены вручную в регионах интереса для следующих структур: ствол мозга, мозжечок, таламус и белое вещество фронтальной, височной и затылочной коры. Различия значений МПФ для исследуемых структур мозга, связанные с гестационным возрастом, исследовались с использованием ANCOVA с гестационным возрастом в качестве ковариаты. Значения МПФ для исследуемых структур мозга варьировали в пределах 2-4% и были в среднем в 5 раз ниже, чем у взрослого человека. Наиболее высокие значения МПФ наблюдались в стволе мозга, более низкие – в таламусе, мозжечке и корковом белом веществе. Практически идентичные значения МПФ наблюдались для фронтального, затылочного и теменного коркового белого вещества. Значимые позитивные корреляции МПФ с гестационным возрастом обнаружены для ствола мозга, мозжечка и таламуса ($r=0.9, 0.8, \text{ и } 0.7$ соответственно; $P<.001$), корреляция с корковым белым веществом оказалась не значимой. Наблюдаемый паттерн корреляционных связей между МПФ и гестационным возрастом для ствола мозга, мозжечка и таламуса хорошо соответствует гистологическим данным о ранней пренатальной миелинизации этих структур на 20-30 гестационной неделе. Отсутствие корреляций для корковых структур белого вещества также соответствует сведениям о постнатальной миелинизации этих структур. Таким образом, наше исследование продемонстрировало возможность быстрого картирования МПФ мозга плода в клинике. Значения МПФ структур мозга плода коррелируют с пренатальными стадиями миелинизации и могут быть использованы для диагностики пренатального развития мозга.

Для решения основной задачи 5 "Провести клиническую оценку эффективности быстрого картирования МПФ как метода количественной диагностики нарушений миелинизации при задержках развития в педиатрической нейрорадиологии" было продолжено начатое в Проекте 2014 сотрудничество с Детской больница №1 г. Томска с использованием установленного протокола картирования МПФ и процедур анализа данных. Начат набор пациентов с задержкой развития моторных и речевых функций. Наши предварительные данные показывают, что как визуально, так и количественно выявляемые аномалии МРФ для моторных трактов часто связаны с

задержкой развития двигательных функций. Кроме того, предварительный статистический анализ детей с задержкой развития речи выявил снижение миелинизации в некоторых подкорковых структурах серого вещества и фронтальном белом веществе по сравнению с контрольной группой детей аналогичного возраста. Сбор данных продолжается. Наши предварительные результаты подтверждают гипотезу о связи задержки развития ребенка с нарушениями миелинизации, а также демонстрируют возможность применения метода в клинической лучевой диагностике.

В 2017 году рамках проекта была проведена Четвертая международная конференция с элементами молодежной научной школы «Магнитно-резонансная томография в биомедицинских исследованиях» с 27 по 29 октября 2017 года в Томском государственном университете (ТГУ). Эта была уже четвертая международная конференция по этой тематике, проведенная при поддержке РФФИ. Тематика докладов конференции включала фундаментальные и прикладные аспекты МРТ исследований, в том числе количественная МРТ методология, новые контрастные агенты, передовые доклинические и клинические МРТ исследования. В мероприятии приняло участие 15 российских и 5 зарубежных ученых (в том числе – членов международной научной группы), а также 24 российских молодых ученых, аспирантов и студентов очной формы обучения. По итогам Конференции подготовлен сборник статей, который будет опубликован издательством IOP Publishing Group журнале «Journal of Physics: Conference Series», индексируемом в Scopus и Web of Science.