

Сведения о выполненных работах в 2018 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 отчетного года работы 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". Проведена серия экспериментов, посвященных исследованию динамики изменений нервной ткани в зоне ишемического очага. Кроме того, были проведены дополнительные иммуногистохимические исследования срезов мозга для серий 2017 года.

Оба эксперимента были построены как долговременное исследование эволюции ишемического очага, оцениваемой по МПФ и с помощью других методов визуализации. Гистологическая валидация проводилась в конечной временной точке. Эксперимент 1 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 сутки 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. Иммуногистохимические исследования срезов мозга показали, что в зоне демиелинизации, идентифицируемой нами по картам МПФ, наблюдается практически полная потеря нейронов и разрушение миелина, но в то же время наблюдается значительное увеличение клеток со специфичными маркерами, которые связывают с процессами восстановления нервной ткани.

Результаты третьего эксперимента, проведенного на большой выборке животных с длительными сроками наблюдения (2 месяца), полностью подтвердили результаты пилотной серии. Начиная с 30х суток в зоне ишемического очага на картах МПФ четко выделялись зона гипоинтенсивности (зона демиелинизация), в которой наблюдается дальнейшее снижение значений МПФ, и зона гиперинтенсивности (зона ремиелинизация), в которой значения МПФ повышаются и к 60 суткам превышают значения МПФ в симметричной зоне контралатерального полушария. Иммуногистохимический анализ показал заметные различия динамики изменения содержания миелина и плотности зрелых нейронов в этих зонах. В зоне демиелинизации гибель значительной части нейронов наблюдается уже на 1-3 сутки, в то время как изменения содержания миелина происходят более медленно, нарастая к 10-60 суткам. В зоне ремиелинизации наблюдается медленное восстановление миелина к 60 суткам после инсульта, в то время как заметного увеличения количества нейронов в эти сроки не наблюдается.

Наиболее важным заключением на основании всех трех проведенных экспериментов является вывод о том, что МПФ картирование может служить надежным источником количественной оценки миелина при инсульте, причем не только его повреждения, но и спонтанного восстановления при длительных сроках наблюдения. Иммуногистохимическое исследование процессов повреждения (гибель нейронов, демиелинизация) и восстановления (ремиелинизация, нейрогенез, олигодендрогенез) мозговой ткани это подтверждают. Вторым важным заключением является корреляция динамики МПФ именно со специфическими маркерами миелина, но не с плотностью нейронов и астроцитов, что подтверждает специфичность МПФ в отношении миелина.

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" было завершено клиническое исследование в Городской клинической больнице имени С.С. Юдина (г. Москва). 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 1.5 Т, который был включен в стандартный клинический протокол исследования пациентов с ишемическим инсультом. Всего было обследовано 24 пациента в сверхострой, острой и подострой фазах после инсульта. В сверхостром периоде ишемический очаг был практически не различим на картах МПФ или демонстрировал минимальное снижение параметра. На более поздних сроках, МПФ карты демонстрировали очаг как четкую гипоинтенсивную зону. Различиями между всеми фазами инсульта были статистически значимыми. Изменение МПФ в

очаге ишемического инсульта хорошо согласуется с динамикой демиелинизации установленной ранее в наших исследованиях на животных. Более того, процент снижения МПФ в ишемическом очаге сильно коррелировал со временем наступления симптомов ( $r=0.68$ ,  $p<0.001$ ). Результаты исследования показали, что МПФ может служить уникальным инструментом для клинического мониторинга потери и восстановления миелина и дает обоснование для дальнейшего использования МПФ в качестве прогностического маркера.

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" для серии экспериментов, проведенной в 2017 году в Университете Висконсина (Мэдисон, США) с использованием 10 генетически дисмиелинизированных мутантных собак и 7 нормальных собак, были проведены дополнительные исследования.

Новым аспектом этого эксперимента стало исследование точности и применимости универсального набора ограничений параметров двух-компарментной модели, используемой для МПФ картирования, для нормального и патологически измененного мозга. Было проведено сравнение гистограммы ошибок МПФ картирования во всем мозге, а также значений этого параметра в одиннадцати отсегментированных регионах интереса (*corpus callosum*, *left/right frontal white matter*, *left/right internal capsule*, *pyramidal tract*, *left/right caudate nuclei*, *cortex*, *pyriform*, *hippocampus*). Обнаружено, что гистограммы ошибок более точно центрируются на нуле при использовании быстрого метода с параметром  $R$  ( $19 \text{ с}^{-1}$ ), чем в случаях с альтернативными значениями этого параметра. Этот результат показывает универсальность метода быстрого МПФ картирования, который может быть применён не только для исследований пациентов с рассеянным склерозом, но также для оценки миелинизации в условиях отсутствия воспаления и сохранения аксонов, т.е. при нормальной миелинизации белого и серого веществ в процессе взросления.

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" было завершено пилотное исследование, сфокусированное на пренатальной миелинизации. Клиническое исследование проведено с использованием сверхбыстрого протокола 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). Сверхбыстрый протокол МПФ картирования (время сканирования менее 5 минут) был добавлен к стандартному клиническому протоколу МРТ сканирования плода человека. Исследование проводилось с участием 41 беременной женщины (средний гестационный возраст  $27.6 \pm 5.8$  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 и триместров беременности, исследовались с использованием ANCOVA. Значения МПФ для исследуемых структур мозга варьировали в пределах 2-4% и были в среднем в 5 раз ниже, чем у взрослого человека. Значения МПФ для третьего триместра беременности были выше, чем для второго для ствола мозга, мозжечка и таламуса.

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 исследование, начатое в сотрудничестве с Детской больница № 1 г. Томска с использованием установленного протокола картирования МПФ и процедур анализа данных. В этом исследовании приняли участие 22 педиатрических пациентов с задержкой развития и 26 детей такого же возраста для контроля. Значения МПФ были оценены в различных областях белого и серого вещества. Было обнаружено, что задержка развития моторики в значительной степени ассоциирована с понижением МПФ в задней ножке внутренней капсулы. Задержка речевого развития характеризуется пониженным значением МПФ в таламусе, средней ножке мозжечка, лучистом венце и перитригональных терминальных регионах боковых желудочков. В рамках вышеуказанной задачи, другим направлением исследований, нацеленных на пробное определение картирования МПФ, стал диагностический инструмент в педиатрической нейрорадиологии. Быстрое МПФ картирование было включено в качестве дополнительной модальности в клиническом протоколе в местном детском томографическом отделении. Карты МПФ были локально реконструированы и переданы детским радиологам. Для консенсуса врачей, карты МПФ предоставили дополнительную диагностическую информацию и повысили достоверность радиологических заключений в 15% случаев, относящихся в основном к ДЦП.

В 2018 году в рамках проекта была проведена международная конференция с элементами молодежной научной школы «Магнитно-резонансная томография в биомедицинских исследованиях», состоявшаяся 25-26 октября в г. Новосибирске в сотрудничестве с Новосибирским государственным томографическим центром.