

Сведения о выполненных работах в 2015 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 третьего года работы над проектом исследования проводились в нескольких направлениях включающих в себя изучение динамики ремиелинизации белого и серого вещества головного мозга на купризоновой модели демиелинизации у мышей, изучение корреляционных связей нейрогенеза, олигодендрогенеза и миелинизации на экспериментальных моделях демиелинизации мозга, таких как купризоновая модель и модель ишемии мозга, также продолжался сбор и анализ данных о возрастных изменениях миелинизации в течении созревания мозга детей на основе неинвазивного сканирования мозга разработанным нами методом MPF.

На купризоновой модели демиелинизации у мышей детально проанализированы взаимосвязи параметров MPF картирования и количественных оценок оптической плотности гистологического окрашивания миелиновых волокон на LFB, иммуногистохимического окрашивания на основной белок миелина (MBP), нейрогенез (DCX, маркер молодых нейронов) и олигодендрогенез (NG2, маркер молодых олигодендроцитов). Выявлена сильная корреляция между значениями MPF и степени миелинизации структур мозга мышей. Полученные результаты подтверждают универсальный характер связи MPF с содержанием миелина по гистологическим количественным оценкам и обеспечивает надежное использование MPF картирования в качестве биомаркера миелина. Полученная нами зависимость уравнения регрессии MPF относительно MBP после введения купризона объясняется различной динамикой потери основного белка миелина в белом и сером веществе мозга. В то же время сильная корреляционная связь MPF с оптической плотностью LFB, как интегральным методом оценки содержания миелина, подтверждает высокую специфичность MPF картирования в качестве биомаркера миелина на купризоновой модели демиелинизации. Кроме того, проанализированы корреляционные связи параметра MPF с интенсивностью нейрогенеза и олигодендрогенеза, а также изменение количества молодых нейронов и олигодендроцитов под влиянием введения купризона. Введение купризона приводило к значимому снижению количества молодых нейронов в зубчатой извилине гиппокампа и нейрогенной зоне вблизи боковых желудочков, в то время как количество молодых олигодендроцитов во всех исследуемых нами структурах белого и серого вещества, за исключением внутренней капсулы, значимо повышалось. Обнаружены значимые корреляции параметра MPF с количеством молодых олигодендроцитов и нейронов. Количество молодых олигодендроцитов отрицательно коррелировало с MPF в тех же структурах

мозга. Количество молодых нейронов, напротив, положительно коррелировало со средним уровнем МРФ. Значимые отрицательные корреляционные связи наблюдались также между олигодендрогенезом и нейрогенезом как для субвентрикулярной зоны, так и для зубчатой извилины гиппокампа.

Купризонная модель демиелинизации характеризуется избирательным повреждением взрослых олигодендроцитов, формирующих миелиновые волокна, причем гибель олигодендроцитов наблюдается в различных структурах белого и серого вещества мозга. В то же время увеличивается продукция молодых олигодендроцитов, которые стремятся заместить собой погибшие клетки. Выявленные взаимосвязи между уровнем нейрогенеза и олигодендрогенеза позволяют предположить, что введение купризона вызывает сдвиг дифференцировки прогениторных клеток в сторону продукции олигодендроцитов, которые затем мигрируют в демиелинизированные участки мозга. Корреляция МРФ с восстановительными процессами нейрогенеза и олигодендрогенеза в купризонной модели демиелинизации открывает перспективу использования этого параметра в качестве интегрального показателя восстановительных процессов при демиелинизирующих заболеваниях.

Корреляционные связи между интенсивностью нейрогенеза, олигодендрогенеза, миелинизации и данными, полученными в процессе МРТ-сканирования, включая карты МРФ и T2-взвешенные изображения, изучали на модели ишемии мозга крыс. Модель ишемического инсульта воспроизводилась окклюзией срединной церебральной артерии (МСаО) с последующей реперфузией. Для неинвазивного картирования МРФ были выбраны следующие 3 временные точки: 1) через 1 сутки после операции, 2) через 3 суток после операции, 3) через 10 суток после операции. Сканирование на томографе Bruker «BioSpec 117/16USR» под газовой анестезией с использованием 1.5-2% изофлурана. Карты МРФ рассчитывались с помощью одноточечного метода с синтетическим рефернтным изображением аналогично нашим недавним публикациям. Дополнительно проводились измерения макромолекулярной протонной плотности (МПП) с использованием карт МРФ и карт протонной плотности (ПП), получаемых в качестве промежуточного результата в одноточечном методе с синтетическим рефернтным изображением. После последнего МРТ сканирования срезы мозга окрашивали гистологически на миелин с помощью красителя люксоль быстрый синий (LFB) и иммуногистохимически для оценки нейрогенеза (DCX).

Очаг ишемического поражения вещества мозга визуализировался у всех животных как на картах МРФ, так и на гистологических срезах, окрашенных LFB. Очаг преимущественно локализовался в подкорковых ядрах с вовлечением кортикального серого вещества в некоторых случаях. Значения МРФ, МПП и оптической плотности LFB в ишемическом очаге были статистически значимо снижены по сравнению с аналогичным анатомическим регионом непораженного полушария во всех группах животных, сформированных по времени после операции (1, 3 и 10 суток) согласно

t-тесту для связанных выборок. Величины относительного снижения MPF и МПП демонстрировали высокосignificantную корреляцию ( $p < 0.001$ ) с относительным снижением оптической плотности LFB. Результаты данного исследования показывают, что демиелинизация начинается в острой фазе ишемического инсульта и приобретает ярко выраженный характер по окончании первых суток формирования ишемического очага. Также имеет место дальнейшее прогрессирование демиелинизации, которое наблюдалось в группе животных, исследованных на десятые сутки. Данный вывод хорошо согласуется с опубликованными ранее исследованиями, в которых было показано раннее (в течение первых суток) разрушение миелина в белом веществе при ишемическом инсульте. В то же время, наши результаты являются принципиально новыми в аспекте изучения демиелинизации серого вещества. Сравнение динамических изменений MPF и оптической плотности окрашивания LFB подтверждает, что демиелинизация является определяющим фактором наблюдаемого снижения MPF. В то же время, формирование вазогенного отека также влияет на MPF и обуславливает ее дополнительное снижение. В хроническом ишемическом очаге на десятые сутки, снижение MPF может быть интерпретировано исключительно как результат демиелинизации, поскольку величины относительного снижения MPF и оптической плотности LFB очень близки. Неожиданным результатом данного исследования является практически идентичное динамическое поведение MPF и МПП в ишемическом очаге. Последняя величина теоретически должна обеспечивать коррекцию эффекта накопления свободной воды на MPF, но на практике демонстрирует аналогичное MPF количественное снижение. Данное наблюдение может отражать ряд биофизических факторов, в частности смешанный характер отека (вазогенный и цитотоксический) и/или участие межклеточной воды в быстрых обменных процессах с макромолекулярной фазой, которые не учитываются в упрощенной двухкомпонентной модели переноса намагниченности. С практической точки зрения, использование параметра МПП в дальнейших клинических и доклинических исследованиях представляется нецелесообразным, поскольку данный параметр не предоставляет дополнительной информации по сравнению с MPF и усложняет обработку данных. При этом MPF остается надежным количественным индикатором демиелинизации даже в остром периоде инсульта, поскольку вклад отека не является доминирующим для данного параметра.

Анализ изменения нейрогенеза у животных с моделированием инсульта, срезы которых были окрашены на даблкортин (DCX, маркер молодых нейронов), показал его значимое увеличение как в самой нейрогенной зоне вблизи боковых желудочков, так и увеличение количества мигрирующих нейробластов. Более выраженным это увеличение было вблизи бокового желудочка в пораженном полушарии, однако увеличение нейрогенеза и значительное количество мигрирующих нейробластов наблюдалось и в контралатеральном полушарии. Эти результаты согласуются с многочисленными исследованиями, в которых также обнаружены увеличение нейрогенеза при ишемическом поражении мозга и миграция молодых нейронов в

зону поражения, в том числе нашими исследованиями с использованием модели тотальной ишемии мозга. Увеличение количества как резидентных, так и мигрирующих молодых нейронов на 10 сутки после инсульта отрицательно коррелировало с параметром MPF, измеренным в ишемическом очаге. Поскольку увеличение нейрогенеза положительно коррелирует с тяжестью поражения при инсульте, можно заключить, что MPF адекватно количественно отражает степень повреждения в ишемическом очаге. Таким образом, данное исследование обеспечивает гистологическую валидацию MPF как биомаркера миелина при ишемическом инсульте и открывает возможность его дальнейшего применения в клинике в качестве потенциального прогностического индикатора.

В 2016 году был завершен сбор данных по возрастным различиям миелинизации головного мозга у детей на клиническом томографе Toshiba Vantage Titan с напряженность поля 1.5 Т, установленном в Детской клинической больнице № 1 г. Томска. Всего за 2015-2016 гг было проведено 46 МРТ исследования у детей в возрасте от 0 до 14 лет, в том числе 15 детей в возрасте от 0 до 6 месяцев, 8 детей в возрасте от 7 до 18 месяцев, 9 детей в возрасте от 19 до 36 месяцев, 11 детей в возрасте от 3 до 7 лет и 3 детей в возрасте от 8 до 14 лет. Для детей разных возрастных групп применялись 3 стандартных протокола MPF картирования. Проведен детальный анализ возрастных изменений MPF карт для большого количества анатомических структур белого и серого вещества головного мозга. У новорожденных детей мозг выглядит практически немиелинизированным, с частичной миелинизацией, видимой в стволе мозга, мозжечке и нижних отделах кортикоспинальных трактов. Развитие миелина обуславливает ярко выраженное увеличение MPF с формированием аналогичной взрослому мозгу картины миелинизации к концу первого года жизни. В то же время, количественные значения MPF отражают неполную миелинизацию и продолжают увеличиваться с возрастом. Важной особенностью карт MPF является четкая визуализация увеличения количества миелина в структурах серого вещества, включая подкорковые ядра и кору головного мозга. Зависимость MPF от возраста с коррекцией на гестационный возраст адекватно описывается общей логистической моделью, что позволяет формализовать описание миелинизации различных структур мозга с использованием четырех параметров: минимальное (в отсутствие миелинизации) и максимальное (при полной миелинизации) значения MPF, константа времени, соответствующая половине миелинизации (точка перегиба логистической кривой) и степенной параметр, описывающий крутизну кривой, т.е. скорость миелинизации.

Анализ данных показал, что различные структуры демонстрируют значительную вариабельность времени и скорости миелинизации. Можно отметить более раннюю миелинизацию структур, как белого, так и серого вещества, связанных с сенсомоторными функциями, в частности, задних рогов внутренней капсулы и прецентральной извилины. Особо интересным является тот факт, что миелинизация серого вещества происходит раньше, чем миелинизация функционально связанных

проводящих путей белого вещества. Например, прецентральная извилина миелинизируется раньше, чем задние рога внутренней капсулы, а поясная извилина - раньше, чем мозолистое тело и белое вещество лобных и затылочных долей. Подкорковые структуры серого вещества (таламус, скорлупа, хвостатое ядро) демонстрируют наиболее раннюю миелинизацию среди всех анатомических зон переднего мозга. Более того, характер временных параметров логистических моделей указывает на значительный вклад пренатальной миелинизации для этих структур, так же как и для ствола мозга. Данное обстоятельство обуславливает необходимость расширения исследования миелинизации с использованием разработанной методологии на пренатальный период. Еще одним важным практическим результатом настоящего исследования является возможность измерения MPF всего мозга, которая обеспечивает универсальный, легко измеряемый количественный критерий нормальной миелинизации со значительным потенциалом будущего клинического применения. Данные о возрастной динамике миелинизации серого вещества получены в настоящем проекте впервые, не только в аспекте нейровизуализации, но и в контексте общих представлений нейроанатомии и нейрофизиологии, поскольку литературные данные о процессе миелинизации серого вещества у детей вообще отсутствуют. Результаты оценки динамики миелинизации в детском возрасте демонстрируют уникальные возможности метода картирования MPF в качестве универсального инструмента изучения миелинизации, как белого, так и серого вещества в фундаментальных нейронауках и открывают широкие перспективы его будущего клинического использования для диагностики аномалий развития мозга.

В рамках проекта было организовано два международных научных мероприятия (симпозиум и конференция) с элементами молодежной научной школы. Симпозиум «Современные методы магнитно-резонансной томографии для исследования структурной и функциональной организации головного мозга» проходил в рамках Двенадцатого международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для психологии и медицины» 4-5 июня в г. Судак, Россия. Были представлены пленарные лекции ведущих специалистов в области МРТ, в том числе пленарные доклады участников проекта и доклады российских молодых ученых. Результаты проекта были представлены в 3 пленарных докладах и 4 устных докладах. В мероприятии приняло участие 20 российских и 12 зарубежных ученых (в том числе 7 членов международной научной группы), а также 90 российских молодых ученых, аспирантов и студентов очной формы обучения. Третья международная конференция с элементами молодежной научной школы «Магнитно-резонансная томография в биомедицинских исследованиях» проводилась с 24 по 26 ноября 2016 года в Новосибирском государственном университете (НГУ), г. Новосибирск, Россия. Данная конференция проходила в рамках Международного конгресса по клинической и трансляционной нейровизуализации, проводимого совместно институтом «Международный томографический центр» СО РАН, Лабораторией трансляционных исследований мозга «МРТ ТЕХНОЛОГИИ», Институтом медицины и психологии при Новосибирском государственном университете (НГУ), Институтом цитологии и

генетики СО РАН и Томским государственным университетом (ТГУ). Результаты проекта были представлены в 3 пленарных докладах и 8 устных докладах. В мероприятии приняло участие 22 российских и 7 зарубежных ученых (в том числе – 8 членов международной научной группы), а также 122 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.

Помимо запланированных мероприятий в рамках гранта РФФИ, результаты проекта были представлены в виде приглашенных устных докладов на 24-ой ежегодной конференции Международного общества по магнитно-резонансной томографии в медицине (ISMRM) в Сингапуре, 7-13 мая 2016 г. и на 141-ой ежегодной конференции Американской неврологической ассоциации и Общества по детской неврологии в г. Балтиморе (США, 16-18 октября 2016 г.), а также на 15-ой ежегодной всероссийской школе-семинаре "Волны-2016", проводимой на базе Московского государственного университета им. Ломоносова, состоявшейся 4-11 июня 2016 г.