

Сведения о выполненных работах
в период с 01.07.2022 г. по 30.06.2023 г.

по проекту **«Исследование восстановительного потенциала нейрогенеза и олигодендрогенеза после экспериментального ишемического инсульта»**,
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 21-75-00038

Руководитель: Кисель Алена Андреевна, канд. биол. наук

За отчетный год был проведен детальный анализ данных эксперимента, проведенного в первый год выполнения проекта. Для ИГХ исследований были получены коронарные криосрезы мозга толщиной 10 и 50 мкм. Саггитальная координата срезов относительно bregma была подобрана в соответствии с локализацией ишемического очага, определяемого по T2-взвешенным изображениям. Срезы окрашивали иммуногистохимически с помощью следующих антител: Goat-anti-doublecortin – для мечения молодых нейронов, Rabbit-anti-NeuN – для визуализации зрелых нейронов, Rabbit anti-NG2 – для мечения предшественников олигодендроцитов, Goat-anti-MBP - для визуализации миелина, Mouse-anti-BrdU – для визуализации пролиферации клеток, у которых репликация ДНК перед делением клеток произошла в период введения животным BrdU, Rabbit anti-GFAP – для визуализации астроцитов, Rabbit anti-NF-H– для визуализации нейрофиламентов аксонов, Для гистологического окрашивания миелиновых волокон использовали 0,1 %-ный раствор быстрого голубого люксоля (ЛФБ).

Контурсы очага, сегментированные по МРТ T2 изображениям, переносились на карты МПФ по которым считался процент содержания миелина в области поражения. Размер ишемического очага достигает максимального размера на 3-и сутки после операции, а затем его размер снижается от 10-х до 60-х суток наблюдения. На картах ADC на 1-3 сутки после операции наблюдается гипоинтенсивность в очаге инсульта, на 10-е сутки – едва заметная гиперинтенсивность, а на 30-е и 60-е сутки – более заметная интенсивность, сходная с локализацией очага на T2-взвешенных изображениях. На картах МПФ отмечается другая динамика. Наиболее обширная область демиелинизации наблюдается на 1-3 сутки после ишемии, далее эта область уменьшается в размере и в целом соответствует локализации очага на T2-взвешенных изображениях и картах ADC. На 30-60 сутки на картах МПФ в области, прилегающей к очагу, согласно T2-взвешенным изображениям, наблюдается зона гиперинтенсивности относительно исходного уровня и контралатерального полушария. Это соответствует полученным ранее результатам на меньшей выборке животных, другой линии, с другими временными точками и с помощью другого томографа. Обнаруженное нами увеличение значений МПФ относительно контроля в зоне ремиелинизации, прилегающей к ядру ишемического очага, мы связываем с восстановительными процессами роста аксонов и их ремиелинизацией, что подтверждают и описанные выше данные гистологии и ИГХ.

Оценен вклад новых нейронов в восстановление структуры нервных связей после ишемического инсульта. Подсчёт предшественников нейронов (DCX+ клеток) проводился в зонах ишемического поражения мозга, на картах МПФ визуализировавшихся как зоны гипо- и гиперинтенсивностей, а также в симметричных зонах контралатерального полушария. Ишемический инсульт приводил к усилению продукции новых нейронов в субвентрикулярной зоне боковых желудочков и дальнейшей миграции нейробластов в направлении ишемического очага. Большинство DCX+ клеток было обнаружено в зоне ремиелинизации, то есть в зоне гиперинтенсивности на МПФ картах, что свидетельствует о восстановительных процессах, происходящих на периферии ишемического очага. Количество DCX+ клеток в зоне ремиелинизации увеличивалось со временем и значительно превышало количество предшественников нейронов как в контроле, так и в зоне демиелинизации.

Анализ микрофотографий срезов мозга, полученных на 10-й, 30-й, 60-й дни после операции, выявил существенное увеличение количества предшественников олигодендроцитов в очаге ишемии по сравнению с контралатеральным полушарием. Прослеживается закономерность, что в ипсилатеральном полушарии происходит большее количество делений ядер олигодендроцитов, чем в контралатеральном полушарии, что свидетельствует об их участии в восстановительных процессах.

Структуру формирующихся нейроглиальных комплексов и пучков аксонов в ишемическом очаге исследовали на толстых срезах 50 мкм. Проводили ряд двойных иммуноокрашиваний в сочетании маркеров к молодым нейронам (DCX) и астроглии (GFAP), аксонам (NF_H) и миелина (MBP), микроглии (Iba-1) и миелина (MBP). К сожалению, из-за санкций приобрести антитела CD31, маркер эндотелия сосудов, не удалось, поэтому для исследования взаимодействия астроглии с сосудами использовали окрашивание фаллоидином, конъюгированным с FITC для окрашивания F-актина, в сочетании с GFAP. Восстановление отростков нейронов в ишемическом очаге существенно зависело от степени поражения головного мозга. У животных с обширным ишемическим очагом восстановление отростков нейронов было незначительным. Это может свидетельствовать о том, что восстановление только начинается, либо ишемия привела к потере миелиновых оболочек, а тела аксонов находятся за пределами очага. У животных с небольшим по площади ишемическим поражением аксоны нейронов через 30 дней после ишемии не имели миелиновых оболочек и присутствовали в ишемическом очаге в виде отдельных волокон или были собраны в пучки. По периферии очага у многих животных на этом сроке наблюдения еще сохраняется глиальный рубец, однако для некоторых астроцитов наблюдалось взаимодействие в тонкими прорастающими сосудами, несмотря на продолжающееся нейровоспаление.

Оценку содержания миелина на картах МРТ и микроскопических гистологических изображениях срезов, окрашенных ЛФБ, проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Для точного соответствия МРТ карт и гистологических постмортальных изображений, на которых срезы искажены из-за пробоподготовки (растяжения, сжатия, разрезы), использовали разработанное в лаборатории программное

обеспечение – плагин ROIТ для ImageJ, позволяющий корректировать морфологические несоответствия между МРТ и гистологией. Этот метод сопоставления МРТ и гистологических срезов опубликован в статье в журнале *Biomedicines* (Q1), указана грантовая поддержка на данный проект. Для статистической обработки данных использовали показатель оптической плотности ЛФБ (LFB OD). Согласно большинству предшествующих исследований, в том числе опубликованных по проекту, LFB OD является наиболее точным показателем для гистологической оценки содержания миелина, в то же время картирование МПФ признано одной из наиболее точных неинвазивных оценок содержания миелина. Поэтому для оценки взаимосвязей между демиелинизацией, оцененной гистологически и с помощью МРТ, процентные изменения в LFB OD сравнивали с процентными изменениями МПФ и ADC в серии дисперсионных анализов с повторными измерениями. Взаимосвязь между томографическими и гистологическими переменными была оценена с помощью коэффициента корреляции Пирсона (R).

На картах ADC на 1-3 сутки после операции наблюдается гипоинтенсивность в очаге инсульта, на 10-е сутки – едва заметная гиперинтенсивность, которая была четко различима не у всех животных, а на 30-е и 60-е сутки – более заметная интенсивность, сходная с локализацией очага на T2-взвешенных изображениях. На картах МПФ отмечается другая динамика. Наиболее обширная область демиелинизации наблюдается на 1-3 сутки после ишемии, далее эта область уменьшается в размере и в целом соответствует локализации очага на T2-взвешенных изображениях и картах ADC. На 30-60 сутки на картах МПФ в области, прилегающей к очагу, согласно T2-взвешенным изображениям, наблюдается зона гиперинтенсивности относительно исходного уровня и контралатерального полушария. Это соответствует полученным ранее результатам на меньшей выборке животных, другой линии, с другими временными точками и с помощью другого томографа.

Для МПФ в зоне демиелинизации показана высокозначимая корреляция с LFB OD ($r = 0.83$, $p < 0.001$), как и в ранее проведенном на этой же модели исследовании для более ранних временных точек. Еще более высокая корреляция с гистологическими данными получена для зоны ремиелинизации ($r = 0.92$, $p < 0.001$). Эта корреляция получена нами впервые. Этот результат является основанием для дальнейшего использования МПФ в клинике для диагностики восстановления миелина после инсульта и еще раз гистологически валидирует метод МПФ в отношении количественной оценки миелина.