

Сведения о выполненных работах  
в период с 27.07.2021 г. по 30.06.2022 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

Эксперимент был проведен на 35 животных (взрослые крысы-самцы линии Sprague-Dawley, 250±20 г) (SPF- виварий ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). В качестве модели ишемического инсульта использовалась модель (МСаО) окклюзии церебральной артерии (МСа) с реперфузией. После операции животные были случайным образом поделены на три экспериментальные группы согласно временным точкам 10 суток (с), 30 с и 60 с. Ложнооперированные животные (n = 15) подвергались тем же манипуляциям но без окклюзии МСа. Выживаемость к концу эксперимента составила 78 % (n = 15 в группе "Ишемия", n = 15 в группе "Контроль"). Через 1 с после операции проводилась оценка неврологического дефицита (NSS), которая выявила нарушения у животных с МСаО. Маркер пролиферации клеток, бромдезоксисуридин (BrDU) вводился внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг с 1 по 10 с после операции, для мечения новых нейронов и олигодендроцитов в ранние сроки после инсульта и отслеживания их миграции через 30 и 60 с после ишемии. Животные выводились из эксперимента на трех временных точках после МСаО: 10, 30 и 60 с. Выведение осуществлялось методом транскардиальной перфузии 4 % параформальдегидом. Затем ткани (мозг) проходили двухэтапную криопротекцию (10 % и 20 % сахара в фосфатном-буфере) и заморожены в парах жидкого азота для хранения (при T = -80°C).

МРТ-сканирование проводилось в ряде временных точек: до и после операции на 1, 3, 10, 30 и 60 с на магнитно-резонансном томографе Bruker Biospec 11.7 T для мелких лабораторных животных. Протокол МПФ картирования (параметр, который ранее показал сильную корреляцию с содержанием миелина в структурах мозга) включал 5 импульсных последовательностей: MT - взвешенная последовательность, T1 - взвешенная последовательность, PD - взвешенная последовательность, GRE последовательность, AF1 последовательность. Сканирование осуществлялось в коронарной проекции, разрешение 200×200×400 мкм, 4 усреднения сигнала, матрица 180×180×90, толщина среза 0.4 мм Полное время сканирования одного животного составляло 35 минут. 3D карты МПФ были реконструированы с использованием одноточечного алгоритма с синтетическим референтным изображением, реализованного в ранее разработанном в нашей лаборатории программном обеспечении на языке C. Дополнительно были получены T2-взвешенные и диффузионно-взвешенные изображения для построения карт измеряемого коэффициента диффузии (ADC).

T2-взвешенные изображения были получены с использованием последовательности множественного спинного эха с TR = 3000 мс, 16 эхо-сигналов с TE в диапазоне 10–160 мс, толщиной среза 1.2 мм, матрица 300×300×12, разрешением в плоскости 200×200 мм<sup>2</sup> и временем сканирования 6 мин 50 с. Для картирования ADC использовалась однократная диффузионно-взвешенная эхо-планарная последовательность спинного эха с TR/TE = 1500/15,4 мс, тремя фактическими значениями b 4,5, 484,2 и 946,5 с/мм<sup>2</sup>, толщиной среза 0,8 мм, разрешением в плоскости 300×300 мм<sup>2</sup>, время сканирования 6 мин 40 с. Параметрические карты ADC были реконструированы с использованием стандартного программного обеспечения Paravision. Все параметрические карты были получены в коронарной плоскости.

Применен новый алгоритм для расчёта МПФ карт, который использует не реальную, а синтетическую карту поля В1. Принцип алгоритма основан на математических зависимостях, связанных с В1 и МПФ, позволяющих извлекать синтетическую карту поля В1 из нескорректированных карт R1 и МПФ. Новый алгоритм обеспечивает одновременно коррекцию В1 на основе данных VFA R1 и одноточечное картирование МПФ. Применение этого алгоритма позволило существенно улучшить качество МПФ карт, полученных в ходе экспериментов, и уменьшить артефакты, вызванные нестабильной работой катушки томографа. Обработку T2-взвешенных изображений и карт МПФ и ADC проводили в программе ITK-SNAP 3.8.0. Границы полушарий, всего мозга, ишемического поражения и его отдельных зон сегментировались вручную. Статистическая обработка результатов проводилась в программе Statistica 10.0.

Для определения центральной области ишемического поражения из серии изображений мозга животного, полученной через 3 с после МСАО, выбиралось то, на котором область с гиперинтенсивным сигналом была самой обширной. Из серий изображений мозга до операции, через 1, 10, 30 и 60 с выбирались изображения, находящиеся на этом же уровне, что и 3 дневное изображение. Из выбранных изображений составили последовательности, иллюстрирующие эволюцию ишемических очагов. Измерение площади области с гиперинтенсивным сигналом проводили в программе ImageJ. Границы области ишемического очага оценивали визуально по T2-взвешенным изображениям. По выбранным изображениям определялась сагитальная координата для получения криосрезов мозга, которые будут проанализированы гистологически и иммуногистохимически относительно процессов восстановления.

Анализ динамики очага по данным T2 изображениям показал, что в интервале от 1 до 3 с происходит изменение объема ишемического поражения. У отдельных животных выраженное уменьшение зоны поражения наблюдается уже к 3 с, у других происходит дальнейшее расширение объема поражения. К 10 с у всех животных выявлено уменьшение зоны поражения, у отдельных животных зона очага вообще не фиксируется на T2-изображениях. У большинства крыс (9 из 11) через 30 и 60 с после МСАО наблюдается уменьшение или полное исчезновение области гиперинтенсивного сигнала, кроме животных, у которых наблюдалось сильное

поражение мозга с первых с после МСАО, затрагивающее обширные области мозга, включая кору. Уменьшение размеров отека или его отсутствие может означать, что к этому времени происходит частичное восстановление пораженной области.

Для ряда животных область и начиная с 10 с после МСАО разделяется на две зоны, в одной из которых наблюдается дальнейшая демиелинизация согласно картам МПФ, а в другой – восстановление миелина. В области демиелинизации значимое снижение содержания миелина наблюдается, начиная с 1 с наблюдения, на 10 с начинается снижение прогрессирует и достигает максимума к 60 с. Следовательно, выраженное разрушение миелина происходит позже, начиная с 10-х с и нарастая к 60 суткам (85-90 %,  $p \leq 0.05$ ). В зоне ремиелинизации, напротив, наблюдается медленное восстановление миелина (85 % относительно контроля к 60 с,  $p \leq 0.05$ ). Зона ремиелинизации визуально наблюдается внутри очага на картах МПФ и представляет собой значительный интерес в плане восстановительного потенциала головного мозга после инсульта в долгосрочной перспективе. Однако, отличия статистически значимых отличий выявлено не было. В зоне гиперинтенсивности (ремиелинизации) не наблюдается значимых отличий между ишемическим и контралатеральным полушарием, но на 30 и 60 с % МПФ в ипсилатеральном полушарии значимо ( $p \leq 0.01$ ) выше, чем на 1-10 с.

Для иммуногистохимических исследований (ИГХ) были получены коронарные криосрезы мозга толщиной 10 и 50 мкм на криотоме HM525 с саггитальной координатой, соответствующей наиболее обширной области ишемического поражения. В ходе выполнения работ по проекту были отработаны методики и поставлены протоколы окрашивания, которые будут использованы для анализа срезов на второй год выполнения проекта: 1) На молодые (DCX) и зрелые (NeuN) нейроны в сочетании с антителами к BrdU, а также в сочетании с другими маркерами (GFAP – маркер астроцитов, VEGF – маркер роста сосудов, NF – маркер аксонов, NG2 и CNP – маркеры олигодендроцитов). 2) На миелин (MBP), зрелые олигодендроциты (CNP) и их предшественники (NG2) в сочетании с антителами к BrdU, а также в сочетании с другими маркерами (DCX и NeuN – маркеры нейронов, NF – маркер аксонов). Были получены флуоресцентные микрофотографии целых срезов мозга толщиной 10 мкм на микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) и программного обеспечения AxioVision 4.8. 3D флуоресцентные изображения фрагментов срезов толщиной 50 мкм получены с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Carl Zeiss) и программного обеспечения ZEN 2.1 (Carl Zeiss). С использованием данных протоколов ИГХ на второй год выполнения проекта будут исследованы процессы олигодендрогенеза, нейрогенеза, рост аксонов и миелинизация пораженных аксонов.