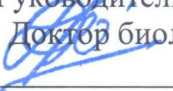


Министерство образования и науки Российской Федерации
Национальный исследовательский Томский государственный университет
(ТГУ)
Биологический институт
Кафедра физиологии человека и животных

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП

Доктор биол. наук

 Д.С. Воробьев

« 1 » июня 2017 г.

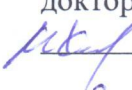
Выпускная квалификационная работа бакалавра
ОЛИГОДЕНДРОГЕНЕЗ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ
ЛОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

По основной образовательной программе подготовки бакалавров
Направление подготовки 06.03.01- БИОЛОГИЯ

Дорошенко Ольга Сергеевна

Руководитель ВКР

доктор биол. наук.

 М. Ю. Ходанович

« 9 » июня 2017 г.

Автор работы

студентка группы № 01301

 О.С. Дорошенко

Томск 2017

Оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Нейрохимические механизмы ишемического инсульта	7
1.2 Олигодендрогенез в норме и при патологии.....	11
1.3 Влияние локальной ишемии головного мозга на олигодендрогенез	15
1.3 Иммуногистохимия	19
Глава 2. Материалы и методы	22
1.1 Объект исследования	22
2.2. Моделирование локальной ишемии головного мозга.....	22
2.3 Схема эксперимента.....	23
2.4. Изготовление срезов головного мозга	24
2.5. Иммуноокрашивание	25
2.6 Обработка данных	27
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	29
3.1 Распределение олигодендроцитарных клеток– предшественников в белом и сером веществе контралатерального, не подвергнувшегося ишемическому инсульту, полушария головного мозга крыс.....	29
3.2 Распределение олигодендроцитарных клеток– предшественников в белом и сером веществе ипсилатерального, пораженного ишемией полушария головного мозга крыс.	31
3.3 Оценка количества олигодендроцитарных клеток – предшественников в полушариях головного мозга.	31
Заключение	33
Выводы	34

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	35
--------------------------------------	----

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ЦНС – центральная нервная система

OPC - oligodendrocyte precursor cells

MCA - middle cerebral artery

NG2 - Neuron-glial antigen 2

LSI – Lateral septal nu intermediat

SVZ - Subventricular zone

PDGF – Platelet-derived growth factor

GGF - Glial growth factor

FGF - Fibroblast Growth Factors

VEGF - Vascular endothelial growth factor

EAE - Experimental autoimmune encephalomyelitis

Ascl1 - Achaete-scute homolog 1

SDF-1 - Stromal cell-derived factor-1

GLP - Good Laboratory Practice

ЦКП - Центры коллективного пользования

ИЦиГ - Институт Цитологии и Генетики

ВВЕДЕНИЕ

По статистике Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) ишемический инсульт головного мозга на сегодняшний день является второй ведущей причиной смертности во всем мире [1]. Последствия ишемического инсульта, как правило, связаны с тяжелыми формами инвалидности, высокой частотой рецидивов и других неблагоприятных исходов. В зависимости от локализации ишемического очага, у пациентов наблюдается нарушение возможностей сенсорной обработки информации, коммуникации, процессов обучения и двигательных функций [2]. Кроме того, инсульт повышает риск развития болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера [3].

Несмотря на интенсивное исследование репаративных процессов в головном мозге после ишемии, в настоящее время существующие методы восстановления после инсульта недостаточно эффективны [4].

Исследования нейродегенеративных процессов при ишемическом инсульте головного мозга, в основном, направлены на изучение патофизиологии гибели нейронов. Значительно меньшее внимание уделяется исследованию ишемического повреждения клеток глии [5]. Тем не менее, в настоящее время известно, что глиальные клетки центральной нервной системы (ЦНС), не менее подвержены повреждению при инсульте головного мозга. Подобно нейронам, глиальные клетки крайне чувствительны к травмам, окислительному стрессу, действию возбуждающих аминокислот и активации апоптоза [6].

Олигодендроциты, миелин–образующие глиальные клетки, являются основными компонентами белого вещества в ЦНС. Исходя из этого, повреждение олигодендроцитов влечет за собой нарушение функционирования проводящих путей белого вещества головного и спинного мозга [7]. С помощью диагностик *in vitro* и *in vivo* было доказано, что

олигодендроциты очень уязвимы к повреждающему действию ишемического инсульта [8].

Несмотря на то, что было доказано губительное влияние ишемии на олигодендроциты, немного известно о детальном механизме, по которому это заболевание приводит к гибели клеток. Исследование повреждающего действия ишемического инсульта на олигодендроциты с использованием экспериментальной модели локальной ишемии головного мозга требует особого внимания к точности идентификации их фенотипа с помощью иммуногистохимических маркеров.

С клинической точки зрения, крайне важно найти способы защиты олигодендроцитов от ишемического повреждения. Терапевтические стратегии, направленные на сохранение или восстановление функций и структуры белого вещества после ишемического инсульта должны быть основаны на понимании того, каким образом происходит повреждение клеток и их последующую гибель [9]. Это может быть достигнуто с помощью исследований *in vitro* и *in vivo*, а также с помощью использования специфических морфологических, биохимических и молекулярных маркеров для мечения патологически измененных тканей.

Цель работы: оценить уровень олигодендрогенеза в ответ на ишемическое повреждение с использованием экспериментальной модели локальной ишемии головного мозга у крыс.

Задачи:

1) Изучить распределение олигодендроцитарных клеток-предшественников в белом и сером веществе контралатерального, не подвергнувшегося ишемическому инсульту, полушария головного мозга крыс.

2) Изучить распределение олигодендроцитарных клеток–предшественников в белом и сером веществе ипсилатерального, пораженного ишемией полушария головного мозга крыс.

3) Оценить значимость различий в количестве олигодендроцитарных клеток-предшественников между контрлатеральным, контрольным, и ипсилатеральным, пораженным, полушариями головного мозга крыс.

Работа выполнена в Лаборатории нейробиологии НИИ биологии и биофизики (НИИББ) ТГУ под руководством доктора биологических наук Ходанович М.Ю.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Нейрохимические механизмы ишемического инсульта

Ишемический инсульт (инфаркт мозга) — это острое нарушение мозгового кровообращения с повреждением ткани мозга, нарушением его функций вследствие затруднения или прекращения поступления крови к тому или иному отделу. Сопровождается размягчением участка мозговой ткани — инфарктом мозга, который может быть обусловлен недостаточностью кровоснабжения определённого участка головного мозга по причине снижения мозгового кровотока, тромбоза или эмболии, связанных с заболеваниями сосудов, сердца или крови. Независимо от причины, вызвавшей локальную ишемию мозга, развивается каскад патобиохимических изменений, приводящих к необратимому повреждению нервной ткани по механизмам некроза и апоптоза. Эта серия взаимосвязанных изменений получила название «патобиохимический каскад» или «ишемический каскад» [25].

Процесс ишемии мозга динамический, и, как правило, потенциально обратимый. Степень ишемического повреждения находится в зависимости от глубины и длительности снижения церебрального кровотока.

Оптимальный объём мозгового кровотока составляет 50-60 мл на 100 г/мин. При уровне церебрального кровотока ниже 55 мл на 100 г вещества в минуту, отмечается первичная реакция, которая характеризуется торможением синтеза белков в нейронах — «маргинальная зона ишемии». При церебральном кровотоке ниже 35 мл на 100 г/мин биохимические реакции в клетках мозга нарушаются — гликолиз завершается по анаэробному пути с накоплением лактата и образованием всего 2 молекул АТФ. При дальнейшем снижении кровотока возникает нарушение функционального состояния коры головного мозга, а снижение до 10-15 мл на 100 г/мин приводит к быстрым, в течение нескольких минут,

необратимым изменениям в нейронах и формированию центральной зоны инфаркта («ядра ишемии»). В течение 6 – 8 минут нейроны остаются жизнеспособными и могут восстановить свои функции при нормализации кровообращения.

При локальной ишемии мозга вокруг участка с необратимыми изменениями формируется зона, кровоснабжение которой ниже уровня, необходимого для нормального функционирования, но выше критического порога необратимых изменений — «ишемическая полутень» или «пенумбра» (англ. penumbra). В этой зоне морфологические изменения отсутствуют. Гибель клеток в области пенумбры приводит к расширению зоны инфаркта. Однако эти клетки в течение определённого времени могут сохранять свою жизнеспособность. Окончательное формирование зоны инфаркта завершается через 48 — 56 часов.

Этапами ишемического каскада являются:

1. Снижение мозгового кровотока;
2. Глутаматная эксайтотоксичность (возбуждающие медиаторы глутамат и аспартат обладают цитотоксическим действием);
3. Внутриклеточное накопление кальция;
4. Активация внутриклеточных ферментов;
5. Повышение синтеза NO и развитие оксидантного стресса;
6. Экспрессия генов раннего реагирования;
7. Отдаленные последствия ишемии (реакция местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждение гематоэнцефалического барьера);
8. Апоптоз.

Эксайтотоксичность (от англ. to excite — возбуждать, активировать) — патологический процесс, ведущий к повреждению и гибели нервных клеток под воздействием нейромедиаторов, способных гиперактивировать NMDA- и AMPA-рецепторы. При этом излишнее поступление ионов кальция в клетку активирует ряд ферментов (фосфолипаз, эндонуклеаз, протеаз (кальпаины)),

разрушающих цитозольные структуры и приводит к запуску апоптоза клетки. В качестве эксайтотоксинов могут выступать L-глутамат и глутаматомиметики (α -аминометилизоксазолпропионат (AMPA), виллардин, каинат, квисквалат, N-метил-D-аспартат (NMDA), метилглутамат и ряд других веществ). Помимо ишемического инсульта, процесс может играть определённую роль в патогенезе рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, амиотрофического латерального склероза, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, а также в развитии глаукомной оптиконейропатии [26].

Эксайтотоксичность является ключевым звеном в каскаде гибели нервных клеток, следующей за ишемическим инсультом от гипоксии. Серое вещество мозга содержит глутамат в концентрации до 10 мМ, большая часть которого сосредоточена в синаптических пузырьках для использования в качестве нейротрансмиттера, внеклеточная концентрация глутамата обычно поддерживается в районе 1 мкМ с помощью Na^+ -сопряжённого транспорта. Во время гипоксии-ишемии, когда клеточные запасы энергии и градиент Na^+ падают, усиленное высвобождение и ослабленный обратный захват глутамата ведут к увеличению концентрации внеклеточного медиатора, что вызывает гиперстимуляцию глутаматных рецепторов и последующую нейрональную смерть. Эксайтотоксичность может быть усугублена сниженными клеточными запасами энергии [26].

Наращение концентрации внутриклеточных ионов Ca^{2+} в сочетании с повышением содержания диацилглицерола изменяет активность ферментов, модифицирующих мембранные белки, в том числе глутаматные рецепторы. В результате увеличивается чувствительность нейронов к возбуждающим сигналам. Замыкается порочный круг: повышенная возбудимость может способствовать дальнейшему накоплению ионов Ca^{2+} и усилению выделения глутамата из нервных окончаний [27].

В зоне пенумбры, как правило, не отмечается длительного и выраженного увеличения концентрации глутамата, что свидетельствует о

том, что эксайтотоксические процессы в ней не связаны с повышением синтеза возбуждающих аминокислот. Повышенное количество глутамата может поступать в зону пенумбры из ядерной области ишемии, повреждать близлежащие нейроны, индуцируя дальнейший выброс нейротрансмиттера. Таким образом, вероятным механизмом глутаматной эксайтотоксичности в зоне пенумбры является самораспространяющийся процесс метаболических нарушений от клетки к клетке, от центра к периферии ишемизированной территории («механизм домино») [28].

Кроме того, параллельно с эксайтотоксическим некрозом может развиваться ишемический апоптоз, но он имеет мало шансов проявиться в условиях, в которых преобладает стремительно развивающаяся эксайтотоксичность. Одним из факторов, которые могут способствовать постишемическому апоптозу, является затруднение доставки ростового фактора к клеткам-мишеням. В результате гипоксической ишемии могут погибать нейрональные и глиальные клетки, продуцирующие ростовые факторы. Однако в тканях после ишемии обнаружена повышенная концентрация некоторых ростовых факторов, что, в свою очередь, может быть либо ответом на возможное снижение чувствительности клеток-мишеней к нейротрофинам, либо контрмерой повреждающим факторам ишемии, таким как свободные радикалы. Дополнительное введение ростовых факторов, таких как фактор роста нервов (NGF) или основной фактор роста фибробластов (bFGF), может уменьшить размер повреждения. Однако стоит заметить, что повышение концентрации нейротрофинов может не только уменьшить апоптотическую гибель клеток, но и оказывать пагубное воздействие за счёт усиления эксайтотоксического некроза, индуцированного ишемией [29].

Апоптоз также может быть запущен окислительным стрессом, следующим за ишемией. Свободные радикалы могут не только быть пусковым механизмом апоптотической смерти клеток, но и служить сигналами в апоптотическом каскаде. Нервные клетки, не получающие в

достаточном количестве ростовых факторов, демонстрируют раннее усиление образования свободных радикалов кислорода и могут быть сохранены благодаря применению антиоксидантов [30].

1.2 Олигодендрогенез в норме и при патологии

Центральная нервная система (ЦНС) содержит три основных класса глиальных клеток: астроциты, микроглию и олигодендроциты. Многие линии последних данных свидетельствуют о том, что клетки-предшественники, обладающие способностью производить новые нейроны и клетки глии, остаются и во взрослой центральной нервной системе. Так называемые олигодендроцитные клетки-предшественники (ОРС) были идентифицированы и охарактеризованы в развивающейся и взрослой центральной нервной системе с использованием антител к протеогликану хондроитинсульфата, называемому нейрон-глиальным антигеном 2 (NG2), [20]. Они принадлежат к популяции клеток, которые при развитии ЦНС дифференцируются в олигодендроциты. Однако большая доля ОРС не дифференцируется и остаётся в циклическом состоянии [10].

Первоначально взрослые ОРС были выделены в 1968 году из зрительного нерва и характеризовались *in vitro* как маленькие однополярные или биполярные клетки, которые экспрессируют ганглиозидные антигены, распознаваемые моноклональным антителом A2B5 [11]. Также было показано, что эти необычные клетки, которые составляют 5% всей глии в зрительном нерве, являются митотически активными и способны увеличить свое число в ответ на демиелинизирующее повреждение. Исходя из этого, впервые было сделано предположение, что эти новые глиальные клетки могут быть мультипотентными глиальными клетками-предшественниками [12].

Олигодендроцитарные клетки – предшественники(ОРС) как полагают, развиваются из перинатальных ОРС. Но, несмотря на то, что ОРС также экспрессируют многие антигены, свойственные перинатальным аналогам,

такие антигены, как гликолипидов 04 и хондроитинсульфат (NG2), от перинатальных они отличаются более медленным темпом миграции, гораздо более продолжительным периодом клеточного цикла (65 часов против 18 часов) и временем дифференцировки в олигодендроциты или астроциты [13].

Экспериментально было установлено, что ОРС со свойствами взрослых клеток могут индуцироваться для развития перинатальных свойств после длительного воздействия множественных митогенов. Было установлено, что некоторые внеклеточные сигналы могут побудить клетки-предшественники олигодендроцитов вернуться к мультипотентным нервным стволовым клеткам, которые могут самовосстанавливаться и генерировать олигодендроциты, астроциты, а также нейроны. Это подтверждает предположение о том, что олигодендроцитарные клетки-предшественники обладают большим потенциалом развития, чем считалось ранее.

ОРС или взрослые клетки, поддерживаемые в присутствии митогенов, не экспрессируют антигены, связанные с олигодендроцитами, астроцитами или микроглиями, но они сохраняют способность в течение многих поколений дифференцироваться в олигодендроциты или астроциты [14,15].

Эти наблюдения *in vitro* показывают, что, по крайней мере, одна потенциальная судьба перинатального ОРС должна превратиться во взрослого олигодендроцитарные клетки - предшественники. Также предполагается, что свойства любого индивидуального ОРС могут быть различными, при этом взрослые и перинатальные фенотипы представляют противоположные полюсы широкого спектра потенциальных свойств.

Наиболее очевидной ролью ОРС в функции ЦНС является генерация новых олигодендроцитов при демиелинизирующих заболеваниях. В большинстве экспериментальных моделей демиелинизирующих заболеваний, наблюдается относительно быстрая и эффективная ремиелинизация. Это предполагает наличие эффективного механизма репопуляции участков поражения за счет клеток, способных дифференцироваться в

олигодендроциты. Существуют три основные предположения, объясняющих происхождение новых олигодендроцитов при ремиелинировании:

- ✓ активация клеточного цикла выживших олигодендроцитов;
- ✓ наличие клеток – предшественников, мигрирующих в очаг поражения
- ✓ наличие клеток-предшественников, эндогенных по отношению к участку поражения.

Существует мало данных *in vivo*, чтобы поддержать предположение о том, что олигодендроциты, пережившие демиелинирующий инсульт, способны дифференцироваться и делиться. Напротив, многочисленные независимые исследования показывают, что немногие выжившие олигодендроциты в области демиелинизации не индуцируются для деления и не способствуют ремиелинизации [36]. Поэтому, маловероятно, что зрелые олигодендроциты играют важную роль в восстановлении демиелинизированных поражений.

В настоящее время имеется много доказательств того, что ОРС являются основным источником новых олигодендроцитов при ремиелинизации. С помощью ретровирусных исследований было показано, что олигодендроцитарные клетки – предшественники, прилегающие к участку демиелинизации или находящиеся непосредственно внутри него, пролиферируют и дифференцируются в ремиелинирующие олигодендроциты, после лизолецитиновой демиелинизации [37].

Данные, подтверждающие идею миграции взрослых олигодендроцитарных клеток-предшественников в пораженные районы, были получены в нескольких исследованиях, моделирующих демиелинизированные поражения в белом веществе [18,19]. Олигодендроцитарные клетки – предшественники идентифицировались с помощью иммуногистохимических методов с использованием антител против нейроглиального белка (NG2). При этом, NG2–позитивные клетки

наблюдались в области, прилегающей к очагу поражения, а вновь образованные олигодендроциты позже были обнаружены в зоне поражения, хотя прямая связь между ними не исследовалась. Миграция взрослых OPC через неповрежденное белое вещество, вероятно, строго ограничена [38, 39]. Поэтому, если взрослые OPC мигрируют в демиелинизированные поражения, предполагается, что они делают это только на очень коротких расстояниях.

Экспериментально было установлено, что взрослые OPC не только выживают внутри очага поражения после демиелинизирующих воздействий, но также сохраняют способность к делению. Было показано, что изначально реактивные OPC увеличивают NG2 иммунореактивность, при этом изменяя свою морфологию. Наблюдалось укорочение отростков, а, впоследствии, их значительное утолщение [40]. Было отмечено, что большинство OPC в таких демиелинизированных областях имеют биполярную ориентацию, свойственную их незрелым перинатальным глиальным предшественникам. В связи с этим, предполагается, что реактивные клетки могут дедифференцироваться в менее зрелый фенотип, что впоследствии было продемонстрировано *in vitro* при комбинированном присутствии фактора роста фибробластов (FGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и глиального фактора роста (GGF). Увеличение числа OPC локализованного в непосредственной области демиелинизирующего поражения, указывает на то, что клетки эндогенные по отношению к поражению, размножаются в ответ на местные сигналы [41].

Таким образом, становится понятно, что эти формы экспериментальной демиелинизации сопровождаются генерацией новых олигодендроцитарных клеток - предшественников, которые могут обеспечить достаточное количество олигодендроцитов для эффективного ремиелинирования.

Сигналы, участвующие в организации реакции взрослых OPC на демиелинизацию, на сегодняшний день остаются неизвестными. Однако сравнение различных типов поражений указывает на некоторые

возможности. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие, что ОРС особенно остро реагируют на воспаление. При этом, увеличение деления клеток наблюдается только тогда, когда демиелинизации сопровождается острым воспалением или более значительным повреждением тканей [42]. Значительное увеличение олигодендроцитарных клеток - предшественников в воспалительных демиелинизированных очагах свидетельствуют о том, что митогенный ответ взрослых ОРС усиливается в присутствии распространяющегося воспалительного процесса.

1.3 Влияние локальной ишемии головного мозга на олигодендрогенез

Индукцированный инсультом олигодендрогенез в ишемическом мозге начал изучаться сравнительно недавно. Тем не менее, исследования на животных моделях инсульта показывают, что церебральная ишемия индуцирует олигодендрогенез во время процессов восстановления мозга. В результате проведенной в последнее время исследования с использованием индуцибельной стратегии картирования суставов креалоксина у взрослых клеток-предшественников нейродегенеративных трансгенных мышей показано, что ОРС, происходящие из клеток нейронных предшественников в субвентрикулярной зоне (SVZ) латерального желудочка, дифференцируются в миелинообразующие олигодендроциты в физиологических и ишемических условиях [31]. Доклинические исследования показывают, что усиление эндогенного олигодендрогенеза в ишемическом мозге посредством клеточной и фармакологической терапии облегчает процессы восстановления мозга и уменьшает неврологический дефицит.

Инсульт вызывает повреждение олигодендроцитов, что приводит к потере миелина, в связи с гибелью аксонов [32]. Однако во время восстановления после инсульта происходит значительное увеличение генерации ОРС, а некоторые из них становятся зрелыми миелинирующими

олигодендроцитами в периинфарктной зоне серого и белого вещества, где присутствуют прорастающие аксоны [33].

Увеличение зрелых миелинизирующих олигодендроцитов, наблюдаемых после инсульта во взрослом мозге, вероятно, связано с олигодендроцитами, дифференцированными из олигодендроцитарных клеток - предшественников. Исследования у взрослых трансгенных мышей, которые экспрессируют индуцируемую тамоксифеном форму рекомбиназы Cre под контролем промотора *Ascl1* или нестина, показали, что OPC, расположенные в сером и белом веществе и OPC из SVZ, участвуют в генерации новых олигодендроцитов [34]. В течение первых 2 недель после инсульта в ишемических пограничных областях серого и белого вещества наблюдалось устойчивое увеличение OPC с *Ascl1*-экспрессией. Однако через 2 месяца после инсульта клетки линии *Ascl1* или белка нестина проявили морфологию листа миелина и экспрессировали белковые компоненты миелина, 3'-фосфодиэстеразы циклического нуклеотида (CNPase) и основной белок миелина [34].

В дополнение к резидентным OPC в белом веществе, инсульт рекрутирует SVZ - прогениторные клетки, путем привлечения их из субвентрикулярной зоны к ишемическому очагу [35]. Эти данные указывают на то, что инсульт индуцирует олигодендрогенез путем рекрутирования OPC-клеток в белом и сером веществе и OPC, генерируемых клетками нейронных предшественников SVZ, и что новые олигодендроциты, образующиеся после инсульта, становятся зрелыми миелинизирующими олигодендроцитами. [35]. Имеются данные, что стромальный фактор 1 α (SDF-1 α) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), секретируемый активированными церебральными эндотелиальными клетками в ишемической пограничной области, вероятно, связаны с миграцией OPC в периинфарктную область серого и белого вещества головного мозга [36].

В работах Майрона Д. и соавторов было показано, что олигодендроцитарные клетки – предшественники стали более многочисленными на 1 и 2 недели после ишемической рецркуляции, что свидетельствует о том, что OPC могут быть умножены в ответ на ишемическое повреждение. Увеличение числа OPC было значительно в области перинфаркта, тогда как в субвентрикулярной зоне и зернистом слое зубчатой извилины не обнаружено ни одного признака активации и пролиферации OPC, что указывает на то, что активация OPC происходила локально в области перинфаркта. Также в олигодендроцитарных клетках – предшественниках отмечалось увеличение фосфорилирования циклического АМФ-ответного связывающего белка (CREB). В коре головного мозга в ложно оперированной группе наблюдалось большое количество NG2 – позитивных клеток, равномерно распределенных по всему пространству. При этом они имели маленькие круглые или овальные клеточные тела, от которых отходили множественные, сильно разветвленные отростки, ориентированных во всех направлениях (рис.1). В мозолистом теле также было обнаружено большое количество олигодендроцитарных клеток – предшественников. При этом их морфология отличалась от остальных зон. Для них были характерны довольно продольные клеточные тела и разветвленные отростки. Через 24 часа рецркуляции OPC в перинфарктная область показала лишь незначительное увеличение размеров клеточных тел и процессов (рис.1). За 1 неделю рецркуляции OPC испытали большее увеличение клеток и отростки обладали повышенной интенсивностью иммунного окрашивания. Те же самые клетки были еще больше заметные по размеру и интенсивности окраски при пробоотборе через 2 недели, и их число было также значительно увеличено (Рис.1). При этом, они имели еще большие морфологические изменения. Они отличались опухшими с очень сильным окрашиванием клеточными телами и имели много коротких гипертрофированных процессов с бисерным, варикозным внешним видом.

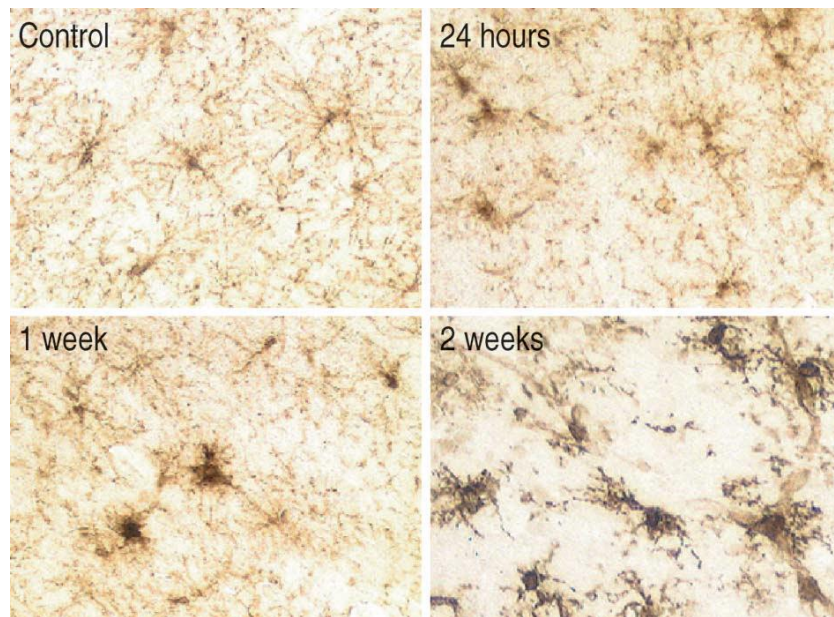


Рисунок 1. Представительные микроскопические снимки в области периинфаркта, которые были окрашены анти-NG2 (Kortaro Tanaka, 2003).

Сильно окрашенные с расширенными клеточными телами и ветвистыми отростками NG2-позитивных OPC, которые были отмечены в настоящем исследовании, также наблюдались после заболеваний, таких как, механическая травма головного мозга [18], острый экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит [19,20], вирусной инфекции [6] и инъекции каината [21]. Эти морфологические изменения могут представлять общую реакцию OPC на повреждение головного мозга. Из-за плохой миграционной способности, предполагается, что увеличение числа олигодендроцитарных клеток – предшественников происходит за счет их деления. В доказательство этого предположения существует большое количество исследований, в которых OPC часто находили парами в периинфарктной области, указывая, на то, что эти клетки могут быть результатом “деления на месте” [19].

Ряд исследований показал, что число зрелых олигодендроцитов в периинфарктной области, которые были уменьшены в ранней фазе пост-ишемической рециркуляции, восстанавливалось на поздней стадии рециркуляции. Предполагается, что добавление новых зрелых олигодендроцитов произошло за счет дифференцировки OPC. Параллельно с восстановлением числа зрелых олигодендроцитов, плотность

миелинизированных волокон в области перинфаркта также восстанавливалась через 2 недели рециркуляции [24].

Таким образом, результаты многих исследований свидетельствуют о том, что даже у пожилых животных олигодендрогенный потенциал присутствует в клетках нейронных предшественников SVZ в ответ на инсульт. Что еще более важно, увеличение количества новых олигодендроцитов тесно связано с увеличением прорастания аксонов в перинфракционных областях, что может способствовать восстановлению функциональности после инсульта [42].

1.4 Иммуногистохимия

Иммуногистохимия (ИГХ) – это метод идентификации и определения локализации в клетке и тканях различных структур, имеющих антигенные свойства, основанный на реакции антиген – антитело для селективного выявления белков (и других молекул, обладающих антигенными свойствами) в гистологических срезах и цитологических препаратах. Основателем метода является Альберт Кунс, он впервые в 1941 году получил меченые флюоресцеином антитела и применил их в диагностических целях [13].

Кардинальным событием в иммуногистохимии явилась разработка Г. Кохлером и Ц. Милстейном в 1975 году гибридной технологии, основанной на слиянии короткоживущих лимфоцитов, продуцирующих антитела, и постоянно растущих клеток плазмцитомы и полученные, теоретически «бессмертные», культивируемые клоны гибридных клеток позволили получать разнообразные моноклональные антитела в больших количествах (в 1984 г. авторы были удостоены Нобелевской премии «за открытие принципа синтеза моноклональных антител» [5]. В 1990х было обнаружено, что возможен поиск нереактивных антигенов в тканях, фиксированных формалином и заключённых в парафин, путём их нагрева в

буферных растворах. Это расширило возможности метода и повысило его чувствительность

В последнее время метод ИГХ широко применяется как в клинической практике для диагностики различных заболеваний, главным образом, в дифференциальной диагностике опухолей, так и в научно – исследовательской работе. Ставшее доступным получение большого количества моно – и поликлональных антител, обладающих высокой специфичностью и авидностью, позволило расширить спектр клинко – диагностических и научных задач, для решения которых могут применяться ИГХ методы[14].

В научных исследованиях ИГХ метод обладает следующими преимуществами:

- позволяет определить местоположение и распределение белка.
- позволяет обнаружить белки в больших и маленьких образцах исследуемой ткани, а также образцах, фиксированных в формалине.
- обладают высокой пропускной способностью.

Основой для ИГХ является иммунологическая реакция антиген – антитело. Существует несколько наиболее часто используемых вариантов постановки ИГХ – метода:

- Прямой иммунофлюоресцентный (основан на непосредственном выявлении искомого антигена в ткани мечеными первичными антителами).
- Непрямой пероксидазный.
- Метод растворимых ферментных комплексов.

В практической деятельности наиболее широко распространено не прямое иммуноокрашивание. Этот метод более чувствителен, чем прямой, так как, то же количество первичных антител, присоединенных к тканевым антигенам, будет более интенсивно окрашиваться по сравнению с прямым методом либо то же количество антигенов можно локализовать за счет более

низкой концентрации первичных антител [15]. Другим преимуществом непрямого метода является возможность применения одних и тех же меченых вторичных антител, при использовании первичных антител от одного и того же вида животных. Маркеры для этого метода могут быть флуоресцентными (флуоресцин, родамин), ферментными (пероксидаза хрена), а также коллоидное золото [16].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали половозрелых самцов крыс линии Sprague-Dawley. Вес каждого животного в среднем составлял 250 – 270 граммов. Общий объем выборки составил 20 особей. На момент проведения эксперимента животные содержались в ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ по всем стандартам GLP, со свободным доступом к воде и пище.

Эксперимент проводился в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей.

2.2. Моделирование локальной ишемии головного мозга

В данном исследовании для изучения влияния локальной ишемии головного мозга на олигодендрогенез была использована модель обратимой окклюзии срединной церебральной артерии (middle cerebral artery occlusion, MCAo) (рис. 2). На левую общую сонную артерию накладывалась лигатура, в левую внутреннюю сонную артерию вводился нейлоновый филамент с силиконовым наконечником (Doccol, USA), который перекрывал кровоток в МСА, тем самым прекращая кровоснабжение левого полушария. Ишемический эпизод начинался с момента введения филамента к МСА и продолжался 1 час, после чего филамент извлекался и наступала частичная реперфузия левого полушария (70% кровотока), так как, левая общая сонная артерия пока оставалась лигатурована. Спустя 15 минут частичной реперфузии лигатура с левой общей сонной артерии снималась после чего восстанавливалась полная реперфузия левого полушария. Операция осуществлялась под изофлурановым ингаляционным наркозом (1,5-2% изофлуран в кислороде). Температура тела животного в течение операции поддерживалась на уровне $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

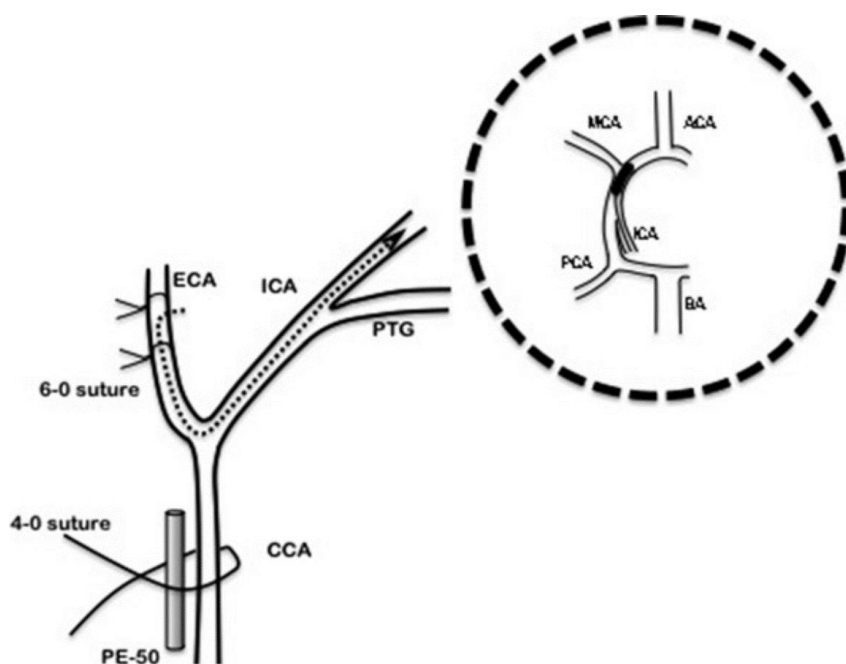


Рисунок 2. Методика введения филамента.

Примечание: АСА - передняя мозговая артерия; ВА - базилярная артерия; ССА - общая сонная артерия; ЕСА - внешняя сонная артерия; ИСА - Внутренняя сонная артерия; МСА - средняя церебральная артерия; РСА - задняя сообщающаяся артерия; РТГ - птеригопалатиновая артерия.

2.3 Схема эксперимента

В проведенном исследовании, для изучения влияния ишемического инсульта на олигодендрогенез, после операции животные были случайным образом поделены на три экспериментальные группы по 5 животных со следующими временными точками: 1 сутки, 3 суток и 10 суток после операции, а также была введена группа ложнооперированного контроля, они подвергались тем же хирургическим манипуляциям за исключением введения филамента. В данной работе для исследования была выбрана группа с временной точкой 10 суток.

По истечении указанного срока животным под эфирным наркозом проводилась транскардиальная перфузия 4% параформальдегидом. Мозг извлекался, проводилась криопротекция в 10% и 20% растворах сахарозы и

заморозка в парах жидкого азота для последующих гистологических и иммуногистохимических исследований.

Все манипуляции, проводимые с животными в ходе эксперимента, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Схема эксперимента.

Группа	Предварительное сканирование	Операция	Повторное сканирование	Транскардиальная перфузия
Ложно оперированные	-1 день	0 день (ложная операция) + МРТ для контроля	3 день	3 день
1 день 1 день	-1 день	0 день (МСаО) + МРТ для контроля наступления ишемии	1 день	1 день
3 дня	-1 день	0 день (МСаО) + МРТ для контроля наступления ишемии	3 день	3 день
10 дней	-1 день	0 день (МСаО) + МРТ для контроля наступления ишемии	10 день	10 день

2.4. Изготовление срезов головного мозга

По истечении указанного срока животным под эфирным наркозом проводилась транскардиальная перфузия 4% параформальдегидом. После извлечения мозг выдерживали в 10 % и 20 % растворах сахарозы в течение 12 часов для криопротекции. Далее производили заморозку мозга в парах

жидкого азота. Хранение осуществлялось при -80 °С. Изготовление срезов проводилось с помощью криотома Thermo Scientific Microm HM-525 при -23 °С. Срезы имели толщину 10 мкм и монтировались на полилизинные стекла.

2.5. Иммуноокрашивание

В данной работе для визуализации OPC применялось не прямое иммуногистохимическое мечение по стандартной методике антителами, имеющими сродство к NG2 – специфическому протеогликану прекурсоров. NG2 является одним из главных иммуноцитохимических маркеров олигодендроцитарных клеток - предшественников — важнейшего представителя макроглии в центральной нервной системе млекопитающих. В качестве маркера прекурсоров он широко применяется в диагностических целях и в экспериментальных работах при исследовании функций нервной системы в норме и при патологии.

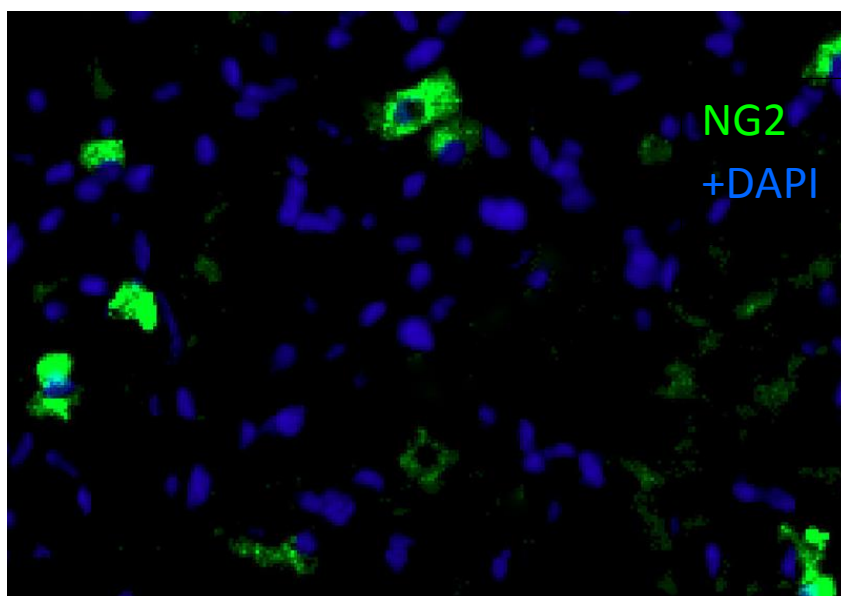


Рисунок 2. NG2 – меченные клетки срезов головного мозга крыс.

Реактивы:

Рабочий раствор PBS:

NaCl: 86 г

Na₂HPO₄ x 12 H₂O: 25 г

Na₂HPO₄ x 2 H₂O: 4,7

Азид натрия: 30 мг.

Довести объём до 1л дистиллированной водой

Блокирующий раствор:

1 часть маточного р-ра + 9 частей дистиллированной воды

Блокирующий буфер:

PBS (рабочий р-р) 10 мл

Тритон 50 мкл

Азид натрия 2-3 мг

Сыворотка Donkey serum 15 мг

Маточный раствор (H₂O₂)

100 мкл. PBS

577 мкл. H₂O

100 мкл. Triton (подождать до растворения)

333 мкл. 3% перекиси водорода (добавлять в последнюю очередь)

Антитела:

Первичные антитела:

Rabbit anti NG2 разведение 1мкл. к 100 мкл. блокирующего буфера.

Вторичные антитела:

Donkey anti rabbit AF488 разведение 1 мкл вторичного антитела к 500 мкл блокирующего буфера.

Процедура иммуноокрашивания:

ДЕНЬ 1

- 1) отмыть срезы в рабочем растворе PBS 3 раза по 5 минут
- 2) Поместить раствор перекиси на 30 минут накрыв parafilm.
- 3) Промыть срезы 3 раза по 5 минут в рабочем растворе PBS

4) Покрыть блокирующим раствором на 1 час.

5) Покрыть раствором первичных антител

ДЕНЬ 2

1) Промыть срезы 3 раза по 5 минут в рабочем растворе PBS

2) Покрыть раствором вторичных антител на 3 часа

3) Промыть срезы 3 раза по 5 минут в рабочем растворе PBS

4) Mounting medium with DAPI 20 мкл на стекло

5) Накрыть покровным стеклом

9) Смотреть через 30 минут

2.6 Обработка данных

Микрофотографии срезов мозга были получены с помощью флуоресцентного микроскопа *Zeiss AxioImager Z2*.

Обработка фотографий производилась с помощью программы *AxioVision Rel. 4.8*.

Подсчет клеток с флуоресцентными метками NG2 осуществлялся с помощью программного обеспечения *ImageJ 1.48*.

Для исследования была выбрана зона *Penumbra* - периинфарктная зона/зона "полутени", в которой были выбраны регионы интереса. Подсчет количества олигодендроцитарных клеток – предшественников осуществлялся в трех структурах:

- Corpus callosum
- Lateral septal nu intermediat (LSI)
- Striatum

Для этого были выбраны области размером 100x100 мкм.

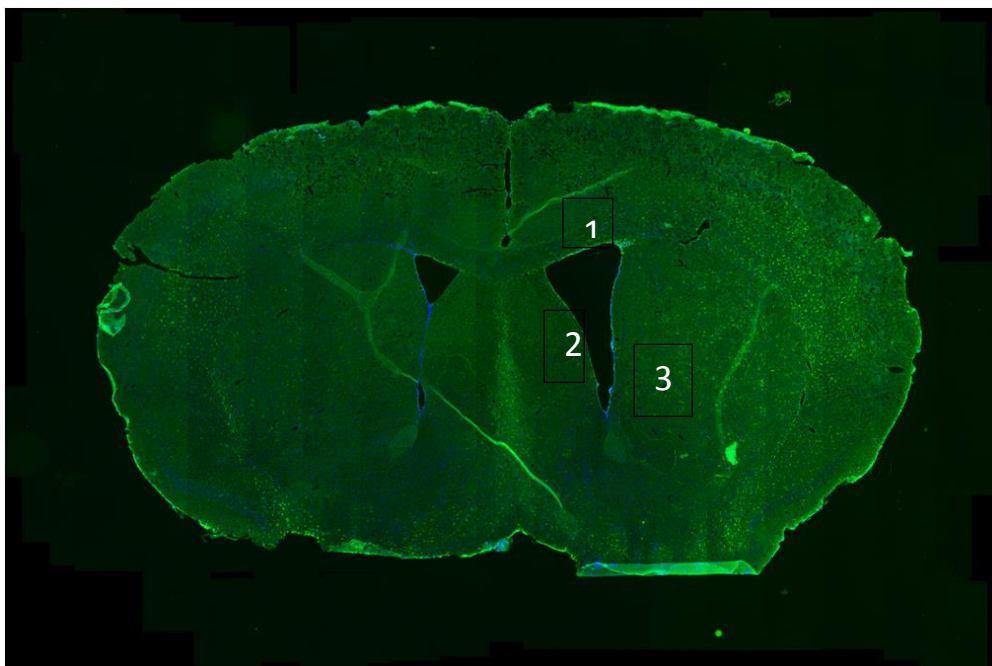


Рисунок 3. Иммуногистохимически окрашенный срез головного мозга крысы.

Примечание: 1 - Corpus callosum; 2- LSI; 3 – Striatum.

В качестве контроля также использовали контралатеральное полушарие.

Статистическая обработка данных проводилась в программе *STATISTICA 10*. Значимость различий между ипсилатеральным и контралатеральным полушариями, а также различия между исследуемыми структурами оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Статистически значимыми принимали различия с $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Распределение олигодендроцитарных клеток-предшественников в белом и сером веществе контралатерального, не подвергнувшегося ишемическому инсульту, полушария головного мозга крыс

В данном исследовании, в контралатеральном полушарии наблюдается увеличение олигодендроцитарных клеток – предшественников в латеральных септальных ядрах, однако, это увеличение не является статистически значимым. Тем не менее, эти результаты подтверждают предположение относительно локализации септальных ядер вблизи стенок боковых желудочков, которые являются основными источниками олигодендроцитарных клеток – предшественников.

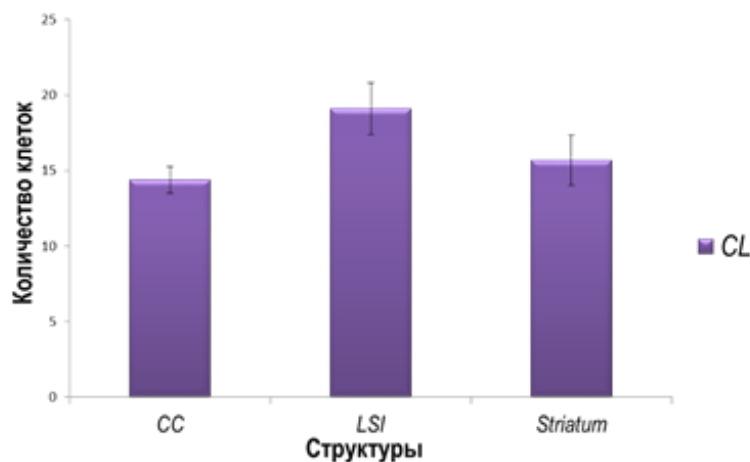


Рисунок 4. Количество NG2 – позитивных клеток в контралатеральном полушарии головного мозга крыс. Столбцы отражают значения среднего $\pm$ стандартное отклонение. Значимость различий между структурами выявлялась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона ($p < 0,05$).

3.2 Распределение олигодендроцитарных клеток–предшественников в белом и сером веществе ипсилатерального, пораженного ишемией полушария головного мозга крыс

В данной работе в ипсилатеральном относительно зоны инсульта, поврежденном полушарии наблюдается значительное увеличение количества олигодендроцитарных клеток - предшественников в латеральных септальных ядрах в среднем на 3% относительно мозолистого тела и стриатума (рис. 5). Это подтверждает экспериментальные данные, полученные в работах Гензерта и соавторов, свидетельствующих о том, что олигодендроцитарные клетки – предшественники обладают ограниченной миграционной способностью. Это свидетельствует о том, что основные репаративные процессы при ишемическом повреждении идут за счет прекурсоров, локализующихся непосредственно в области, прилегающей к участку демиелинизации [24].

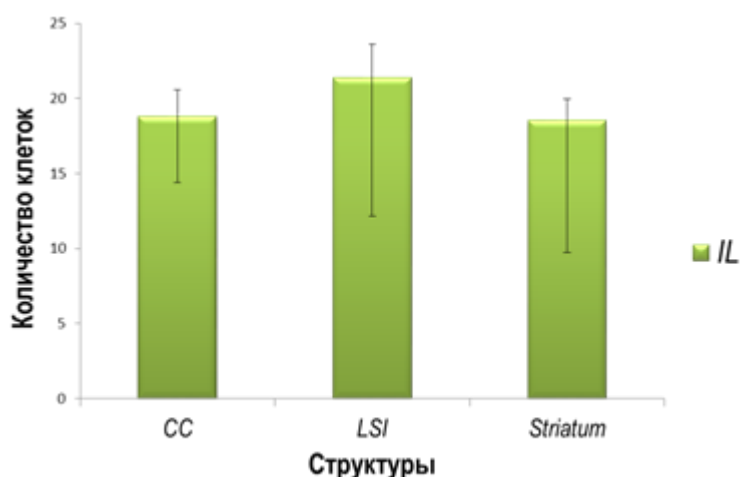


Рисунок 5. Количество NG2 – позитивных клеток в ипсилатеральном полушарии головного мозга крыс. Столбцы отражают значения среднего $\pm$ стандартное отклонение. Значимость различий в количестве прогениторных клеток в латеральных септальных ядрах относительно других структур выявлена с помощью непараметрического критерия - Вилкоксона ($*p < 0,05$).

В литературе существуют данные, которые свидетельствуют о том, что в норме олигодендроцитарные клетки – предшественники равномерно распределяются во всех тканях головного мозга. При ишемическом инсульте в большей степени повреждаются структуры белого вещества, что влечет за собой активацию пролиферативных процессов олигодендроцитарных клеток – предшественников в этих структурах. В работах Левайна и соавторов было показано, что при ишемическом инсульте наблюдается значительное увеличение количества олигодендроцитарных клеток – предшественников в мозолистом теле и стриатуме. Это связано с тем, что ишемический очаг, в основном, охватывает эти зоны [15].

3.3 Оценка количества олигодендроцитарных клеток – предшественников в полушариях головного мозга

Согласно полученным результатам, через 10 суток после ишемического инсульта у животных наблюдалось увеличение количества олигодендроцитарных клеток предшественников в периинфарктной зоне полушария, в котором локализовался ишемический очаг, однако, их уровень был ниже относительно неповрежденного полушария в среднем на 29% (рис. 2). При этом морфология клеток также различалась в зависимости от зоны. В мозолистом теле олигодендроцитарные клетки – предшественники имели достаточно вытянутые крупные клеточные тела, тогда, как в латеральных септальных ядрах и стриатуме клеточные тела были более округлые и несколько меньше (рис. 7), что коррелирует с имеющимися литературными данными.

Согласно экспериментальным данным, полученным в работах Кортаро Танака с соавторами, увеличение количества олигодендроцитарных клеток – предшественников значительно возрастало в периинфарктной зоне через две недели после восстановления рециркуляции. При этом отмечалось изменение в морфологии клеточных тел, у них наблюдались сильно разветвленные

гипертрофированные отростки, ориентированные во всех направлениях. Через одну неделю рециркуляции наблюдалось лишь незначительное увеличение количества олигодендроцитарных клеток – предшественников в области перинфаркта [24].

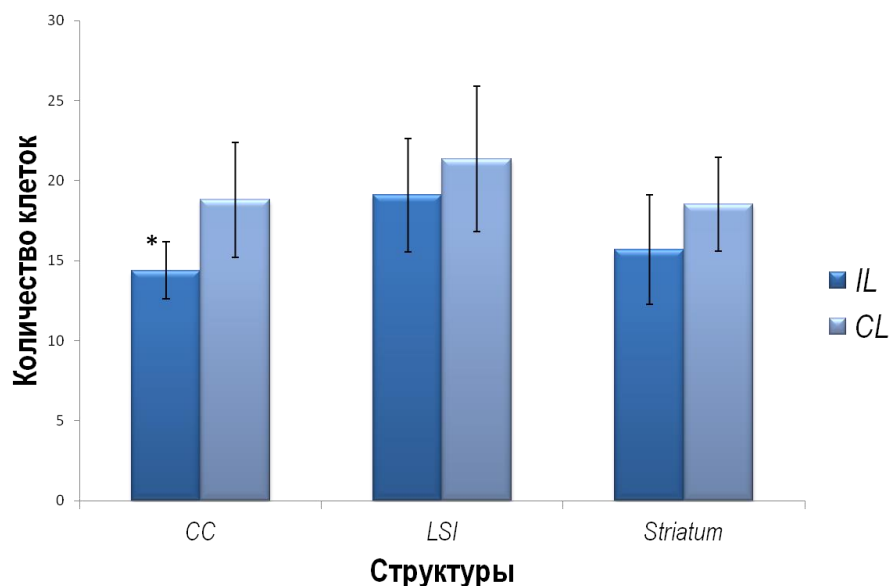


Рисунок 6. Количество NG2 – позитивных клеток в ипсилатеральном и контралатеральном полушариях головного мозга крыс. Столбцы отражают значения среднего $\pm$ стандартное отклонение. Значимость различий в количестве прогенеторных клеток между полушариями выявлена с помощью непараметрического критерия – Вилкоксона (* $p < 0,05$).

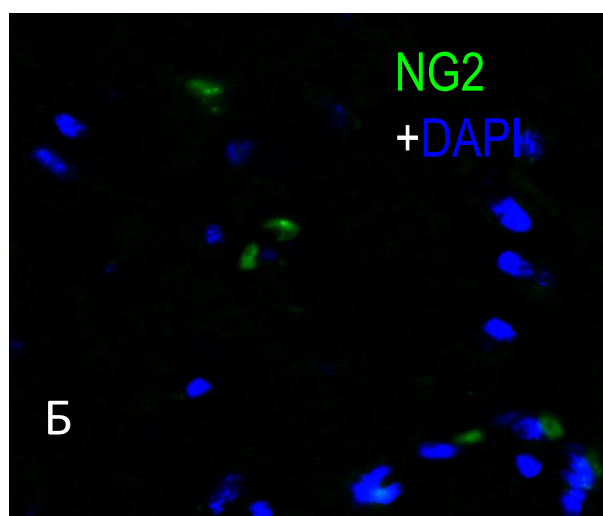
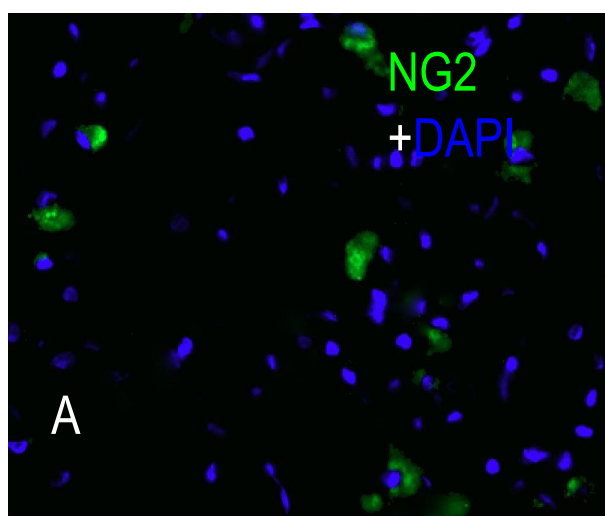


Рисунок 7. NG2 – позитивные клетки контралатерального полушария (А) и ипсилатерального полушария (Б).

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования по изучению влияния локальной ишемии головного мозга на олигодендрогенез, были получены результаты, свидетельствующие о том, что ишемический инсульт оказывает значительное влияние на процесс образования ремиелинизирующих олигодендроцитов посредством активации клеточного цикла олигодендроцитарных прогениторных клеток и увеличением скорости миграции к очагу поражения.

Выводы

1.) В контралатеральном, не подвергнувшемуся ишемическому инсульту полушарии, наблюдается увеличение олигодендроцитарных клеток – предшественников в латеральных септальных ядрах относительно других структур, но это увеличение не является статистически значимым.

2.) В полушарии, подвергнувшемуся ишемическому инсульту, наблюдается значительное увеличение количества олигодендроцитарных клеток- предшественников в латеральных септальных ядрах в среднем на 3% относительно мозолистого тела и стриатума

3.) В результате статистической обработки данных было выявлено значимое различие в количестве олигодендроцитарных клеток – предшественников между контралатеральным и ипсилатеральным полушариями. В контралатеральном полушарии количество прогениторных клеток превышает значение в ипсилатеральном полушарии, в среднем на 29%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эллиниди В.Н, Аникеева Н.В., Иммуногистохимия: теория и практика. // Эллиниди В.Н [и др.]: учеб. пособие. Спб.: 2013. – 52с.
2. Эксайтотоксичность. [Электронный ресурс]: Биология человека. URL: <http://humbio.ru/humbio/01122001/muvn/0000d594.htm> [1999, б.м.]. (Дата обращения: 09.04.2017).
3. Иммуногистохимия (ИГХ): [Электронный ресурс] // BioVitrum: URL: <http://www.biovitrum.ru/product/morfologiya/immunogistohimiya/> (дата обращения 10. 05. 2017).
4. Иммуногистохимия (ИГХ): [Электронный ресурс] // BioVitrum: URL: <http://www.biovitrum.ru/product/morfologiya/immunogistohimiya/> (дата обращения 10. 05. 2016).
5. Бабиченко И.И., Ковязин В.А. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста: учеб. Пособие. М.: РУДН, 2008 – 109 с.
6. Zhang, R. L. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. Zhang, R. L. [at al.] J. Neuroscience. – Vol. 105, 2012. – P. 33-41.
7. Zhang, R. L. Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. Zhang, R. L. [at al.] J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – Vol. 29, 2012. –P. 1240–1250.
8. Yoshida S. Free fatty acids and energy metabolites in ischemic cerebral cortex with noradrenaline depletion. Yoshida S. [at al.] J. of Neurochemistry. – Vol. 42, 1984. – P. 711-717.

9. Wolswijk G. Identification of an adult-specific glial progenitor cell. Wolswijk G. [at al.] J. Development. – Vol. 105, 1989. – P. 387-400.
10. Wen H. Thigh muscle function in stroke patients revealed by velocity-encoded cine phase-contrast magnetic resonance imaging. / Wen H. [at al.] Muscle Nerve- Vol. 37, 2008. – P. 736–744.
11. Wang, L. The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. Wang, L [at al.] J. of Biological Chemistry. – Vol. 282, 2007. – 237-254.
12. Wang J. Ischemic stroke and repair: current trends in research and tissue engineering treatments. // J. Wang [at al.] Regenerative Medicine Research. – 2014. – Vol . 53, 2004. – P. 354-364.
13. Vaughan J.E. A third neuroglial cell types. Vaughan J.E. J. Comparative Neurology – Vol. 133, 1968. – P. 269–287.
14. Valeriani V. Quantitative Assessment of Ischemic Pathology in Axons, Oligodendrocytes, and Neurons: Attenuation of Damage after Transient Ischemia. / Valeriani V. [at al.] // J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism. - 2000. - №5. – P. 256-263.
15. Tang D.G. Long-Term Culture of Purified Postnatal Oligodendrocyte Precursor Cells. Tang D.G. [at al.] J. Cell Biology. – Vol. 216, 2000. – P. 971.
16. Susan A. Oligodendrocytes and Microglia Are Selectively Vulnerable to Combined Hypoxia and Hypoglycemia Injury in Vitro. / Susan A. [at al.] // J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1998. - №5. P. 521–530.
17. Siemkowicz E, Post-ischemic coma in rat: Effect of different preischemic blood glucose levels on cerebral metabolic recovery after ischemia. Siemkowicz E [at al.] J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – Vol. 110, 1980. – P. 225-232.

18. Shibata M. Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. / Shibata M. [at al.] // J. of Clinical Investigation. – 2000. - №5. P. 643-653.
19. Salford L.G. Graded hypoxia-oligemia in rat brain. I. Biochemical alterations and their implications. Salford L.G. [at al.] J. Archives of neurology. – Vol. 29, 1973. – P. 227-233.
20. Reyners H. The beta astrocyte: a newly recognized radiosensitive glial cell type in the cerebral cortex. Reyners H. [at al.] J. of Neurocytology. - Vol.11, 1982. –P. 967–983.
21. Ortega, F. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. Ortega, F. [at al.] Nature Cell Biology. – Vol. 15, 2013. – P. 602–613.
22. Mendelow AD. The distribution of ischaemic damage and cerebral blood flow after unilateral carotid occlusion and hypotension in the rat. Mendelow AD [at al.] J. Stroke. – Vol. 15, 1984. – P. 704-710.
23. Mandai K. Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in focal cerebral ischemia. Mandai K. [at al.] Neuroscience- Vol. 77, 1997. P. 849–861.
24. Levine J. Development and differentiation of glial precursor cells in the rat cerebellum. Levine J. [at al.] J. Glia. – Vol. 7, 1993. – P. 263–336.
25. Laura L. Excitotoxic injury in Hypoxia-Ischemia. Laura L [at al.] J. Basic Neurochemistry. – Vol. 115, 1999. – P. 195-203.
26. Keirstead, H.S. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord. Keirstead, H.S. [at al.] J. Glia. – Vol. 22, 1998. – P. 161–170
27. Jin, K. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Jin, K. [at al.] Proceedings of the National Academy of Sciences. – Vol. 98, 2007. – P. 4710–4715.

28. James E. V. A third neuroglial cell types. An electron microscopic study. James E. Vaughan. [at al.] J. of Comparative Neurology. – Vol.133, 1968. – P. 113–287.
29. Gregersen, R. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain Gregersen, R. [at al.] J. Brain Ischemia. – Vol. 138, 2012. – P. 384–392.
30. Gensert J. M. Endogenous Progenitors Remyelinate Demyelinated Axons in the Adult CNS. Gensert J. M. [at al.] J. Neuron. - Vol. 19, 1997. – P. 197–203.
31. Fancy, S. P. Myelin regeneration: a recapitulation of development. Fancy, S. P [at al.] Neuroscience. – Vol. 34, 2013. – P. 24-31.
32. Eugene Gusev. The Glutamate—Calcium Cascade. Eugene Gusev [at al.] J. Brain Ischemia. – Vol. 102, 2003. – P. 39-93.
33. Donald J. DeGracia. Cerebral ischemia and the unfolded protein response. Donald J. DeGracia [at al.] J. of Neurochemistry. - Vol. 2004. – P. 91 1–8,.
34. Dewar D. Oligodendrocytes and Ischemic Brain Injury. Dewar D. [at al.] J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism- Vol. 23, 2003. - P. 263-274.
35. Dawson R.L. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. Dawson R.L. [at al.] Molecular and Cellular Neuroscience. – Vol.24, 2003. – P. 476–488.
36. Dawson R.L. NG2-Expressing Cells in the Central Nervous System: Are They Oligodendroglial Progenitors. Dawson R.L. [at al.] J. Neuroscience Research. – Vol. 61, 2000. – P. 471–479.
37. Carroll W. M. Identification of the adult resting progenitor cell by autoradiographic tracking of oligodendrocyte precursors in experimental CNS demyelination. Carroll W. M. [at al.] J. Brain. – Vol. 121, 1998. – P. 293-302.

38. Busto R. Graded focal cerebral ischemia in the rat by unilateral carotid artery occlusion and elevated intracranial pressure: Hemodynamic and biochemical characterization. Busto R. [et al.] J. Stroke. – Vol. 16, 1985. – P. 466-476.
39. Bani-Yaghoob M. Neuroregenerative strategies in the brain: emerging significance of bone morphogenetic protein 7 (BMP7). / Bani-Yaghoob M. [et al.] Biochem Cell Biol. – Vol. 37, 2008. – P. 361–369.
40. Abe K, Alpha-tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. Abe K [et al.] J. Brain. – Vol. 273, 1983. – P. 166-169.
41. 10 ведущих причин смерти в мире [Электронный ресурс]: информационный бюллетень №310/ ВОЗ, май 2014, <http://www.who.int> (дата обращения 21.02.2017)
42. Dalton W. D. Histopathological and Hemodynamic Consequences of Complete versus Incomplete Ischemia in the Rat. Dalton W. D. [et al.] J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – Vol. 7, 1987. – P. 43-54.

Поиск заимствований в научных текстах^β
[\(index.php/ru/\)](#) [\(index.php/en/\)](#)

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран...

Выбрать файл...

Укажите год публикации: 2017 ▼

Выберите коллекции

Все

Рефераты

Авторефераты

Иностранные конференции

PubMed

Википедия

Российские конференции

Иностранные журналы

Российские журналы

Энциклопедии

Англоязычная википедия

Анализировать

 Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст (<http://text.rucont.ru/like>)

Год публикации: 2017.

Оценка оригинальности документа - 90.56%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 9.44%

Просмотр заимствований в документе

Время выполнения: 12 с.

Документы из базы

Источники заимствования

1. Ишемический инсульт (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1792727>)

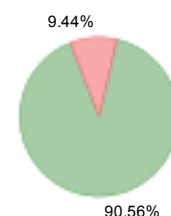
Год публикации: 2016. Тип публикации: статья википедии.

<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1792727> (<https://ru.wikipedia.org/wiki?curid=1792727>)

[Показать заимствования \(16\)](#)
2. Риск развития инфаркта мозга у больных с артериальными аневризмами головного мозга по данным компьютерно-томографической ангиографии (<http://cyberleninka.ru/article/n/risk-razvitiya-infarkta-mozga-u-bolnyh-s-arterialnymi-anevrizmami-golovnogo-mozga-po-dannym-kompyuterno-tomograficheskoy-angiografii>)

Авторы: Сытый Ю. В., Зотова О. В..

Год публикации: 2012. Тип публикации: статья научного журнала.

<http://cyberleninka.ru/article/n/risk-razvitiya-infarkta-mozga-u-bolnyh-s-arterialnymi-anevrizmami-golovnogo-mozga-po-dannym-kompyuterno-tomograficheskoy-angiografii>
<http://cyberleninka.ru/article/n/risk-razvitiya-infarkta-mozga-u-bolnyh-s-arterialnymi-anevrizmami-golovnogo-mozga-po-dannym-kompyuterno-tomograficheskoy-angiografii>
<http://cyberleninka.ru/article/n/risk-razvitiya-infarkta-mozga-u-bolnyh-s-arterialnymi-anevrizmami-golovnogo-mozga-po-dannym-kompyuterno-tomograficheskoy-angiografii>
[Показать заимствования \(8\)](#)

 В списке литературы
 Источники
 Заимствования

5.96%

2.37%

3. Дипломная работа: Свободно-радикальные процессы при экспериментальной ишемии головного мозга
(<http://www.bestreferat.ru/files/24/bestreferat-139824.docx>)

Год публикации: 2016. Тип публикации: реферат.
<http://www.bestreferat.ru/files/24/bestreferat-139824.docx>
<http://www.bestreferat.ru/files/24/bestreferat-139824.docx>
[Показать заимствования \(4\)](#)

 1.97%

4. Особенности восстановления NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата у больных с постинсультной эпилепсией в условиях улучшения мозгового кровотока.
(http://www.microcirculation.ru/down/Number49_p28-34.pdf)

Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.
http://www.microcirculation.ru/down/Number49_p28-34.pdf
http://www.microcirculation.ru/down/Number49_p28-34.pdf
[Показать заимствования \(3\)](#)

 1.51%

5. Фармакологическая коррекция ишемического поражения головного мозга крыс при окклюзии средней мозговой артерии
(<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01002659844?get=pdf>)

Авторы: Поварова, Оксана Викторовна.
 Год публикации: 2003. Тип публикации: автореферат диссертации.
<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01002659844?get=pdf> (<http://dlib.rsl.ru/loader/view/01002659844?get=pdf>)
[Показать заимствования \(3\)](#)

 1.12%

Дополнительно

[Общеизвестные фрагменты](#)

Значимые оригинальные фрагменты

[Библиографические ссылки](#)

Искать в Интернете