

На правах рукописи



Кисель Алена Андреевна

**ДЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА
У КРЫС**

03.03.01 – Физиология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Томск – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет».

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Ходанович Марина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Мошкин Михаил Павлович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», отделение генетики животных и человека, главный научный сотрудник

Жданкина Анна Александровна, доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины»

Защита состоится 04 декабря 2019 года в 12 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.267.10, созданного на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36 (корпус НИИ ББ, конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на официальном сайте федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» www.tsu.ru.

Материалы по защите диссертации размещены на официальном сайте ТГУ: <http://www.ams.tsu.ru/TSU/QualificationDep/co-searchers.nsf/newpublicationn/KiselAA04122019.html>

Автореферат разослан « ____ » октября 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Носков Юрий Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы. Головной мозг является одним из самых энергоёмких органов и нуждается в адекватном кровоснабжении. Несмотря на свой относительно небольшой размер (около 2 % от массы тела), головной мозг поглощает порядка 50 % всей утилизируемой глюкозы [Fehm et al., 2006] и требует в среднем 700 мл/мин крови, что составляет более 15 % общего минутного сердечного выброса [Partington et al., 2014]. Нарушения мозгового кровообращения ведут за собой недостаточную доставку кислорода и энергетических субстратов, что приводит к патологическим изменениям мозговой ткани. Нарушения мозгового кровообращения включают в себя некоторые из самых распространённых и разрушающих расстройств: ишемический и геморрагический инсульты, а также различные цереброваскулярные аномалии. Частота возникновения данных нарушений увеличивается с возрастом, а количество инсультов ожидаемо возрастает вместе с увеличением доли пожилого населения [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Инсульт поражает более 15 миллионов человек в год по всему миру, из которых 6 миллионов погибают, а 5 миллионов остаются инвалидами [Mackey et al., 2004]. Среди тех, кто выжил после первичного поражения, многие сталкиваются с долгосрочной утратой работоспособности и умственным снижением, требующими серьёзной реабилитации и оказания поддержки в ежедневной жизни [Feigin et al., 2014 ; Langlois et al., 2006]. Несмотря на это, нервная система имеет потенциал к восстановлению и компенсации утраченных функций, в частности, с помощью реструктуризации сохранившихся нервных волокон и механизмов нейропластичности [Bach-y-Rita, 2001 ; Balbinot et al., 2019 ; Hylin et al., 2017].

Демиелинизация в условиях ишемии мозга редко становится предметом исследований по сравнению с гибелью нейронов и воспалением. В то же время миелин, участвуя в проведении нервных импульсов, является важным компонентом нормального функционирования нервной системы, а восстановление миелина после какого-либо воздействия может иметь потенциал для функционального улучшения состояния [Hylin et al., 2017 ; Po et al., 2012]. При некоторой имеющейся информации о том, что белое вещество мозга чувствительно к ишемическому повреждению [Benarroch, 2009], данных о демиелинизации при ишемии мозга вообще и в сером веществе, в частности, обнаруживается крайне мало. В то же время, демиелинизация очагов ишемического поражения в различных экспериментальных моделях может иметь свои особенности и динамику. Исследования повреждения миелина в эксперименте на животных могут быть выполнены с использованием гистологических и иммуногистохимических методов, однако для применения в клинике необходимы неинвазивные методы визуализации и количественной оценки содержания миелина, апробированные и валидированные на животных.

В настоящее время наиболее информативными и востребованными в клинике являются методы магнитно-резонансной томографии (МРТ). Несмотря на то, что методы неинвазивной визуализации с помощью МРТ развиваются с 1973-го года, на сегодняшний момент в клинике отсутствуют стандартные методы количественной оценки миелина, поэтому значительные усилия направлены на разработку таких МРТ методов [Laule et al., 2007]. Метод количественной оценки содержания миелина в мозге с помощью картирования макромолекулярной протонной фракции (macromolecular proton fraction, MPF) был разработан относительно недавно [Underhill et al., 2011 ; Yarnykh, 2016]. Данный метод основан на эффекте переноса намагниченности между протонами макромолекул и протонами воды. Метод картирования MPF уже был гистологически валидирован на здоровом мозге крыс [Underhill et al., 2011], модели купризоновой демиелинизации у мышей [Khodanovich et al., 2017 ; Thiessen et al., 2013] и демиелинизации у щенков (shaking pup) [Samsonov et al., 2012] и продемонстрировал высокую точность определения содержания миелина, однако в условиях ишемического повреждения мозга изменение значений MPF было исследовано впервые. Актуальность данной работы состоит в несомненной важности исследований процессов физиологической деградации и восстановления миелинизации мозга на модели ишемического повреждения, а также количественное неинвазивное исследование данных процессов с использованием современных методов магнитно-резонансной томографии, в частности MPF-картирования мозга.

Цель: исследовать динамику процесса демиелинизации на модели ишемического повреждения головного мозга крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить повреждение миелина на моделях тотальной и локальной ишемии головного мозга крыс.
2. Сопоставить локализацию повреждения миелина с зонами гибели нейронов и активации микроглии.
3. Апробировать и гистологически валидировать метод картирования макромолекулярной протонной фракции для количественной оценки миелина на модели локальной ишемии головного мозга у крыс.
4. Оценить специфичность метода картирования макромолекулярной протонной фракции в отношении миелина по сравнению со стандартными методами магнитно-резонансной томографии, таких как PD, T_1 , T_2 , ADC, а также по сравнению с другими иммуногистохимическими маркерами, такими как количество нейронов и микроглии.

Научная новизна. Научной новизной обладают следующие результаты проведенного исследования:

1. Впервые детально исследована демиелинизация гиппокампа на трёхсосудистой модели тотальной ишемии головного мозга у крыс. Установлен факт демиелинизации слоёв гиппокампа stratum oriens и stratum radiatum, прилегающих к наиболее повреждаемому ишемией полю CA1.

2. Впервые детально исследована динамика демиелинизации на модели локальной ишемии головного мозга. Повреждения миелина обнаруживаются с первых суток после операции, усиливаются на более поздних сроках наблюдения, а через месяц после операции наблюдается разделение ишемического очага на зоны демиелинизации и увеличения плотности миелина.

3. Впервые проведено сравнение моделей тотальной и локальной ишемии головного мозга по динамике, степени демиелинизации и её соотношения с процессами гибели нейронов и воспаления. Установлено, что более выраженная демиелинизация наблюдается при локальной ишемии, причём первоначально однородный очаг поражения, соответствующий зоне гибели нейронов, разделяется на зоны снижения и увеличения плотности миелина. В модели тотальной ишемии демиелинизация менее выражена и её динамические изменения на длительных сроках наблюдения не выявлены.

4. Впервые применён и гистологически валидирован неинвазивный количественный метод оценки миелинизации мозга при помощи картирования MPF на модели ишемии головного мозга. Установлено, что параметр MPF обнаруживает сильную корреляционную связь с содержанием миелина, оцениваемого гистологическим и иммуногистохимическим методами.

5. Впервые с помощью метода картирования MPF исследована динамика демиелинизации на модели локальной ишемии головного мозга. Установлено, что очаг ишемии на картах MPF визуализируется как зона гипоинтенсивности, степень которой увеличивается с течением времени. На 30-е сутки после ишемии очаг разделяется на зоны гипо- и гиперинтенсивности, соответствующие определяемым иммуногистохимически зонам продолжающейся демиелинизации и увеличения плотности миелина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты дополняют имеющиеся знания о закономерностях демиелинизации структур головного мозга в разных моделях церебральной ишемии. Обнаруженное увеличение плотности миелина в очаге локальной ишемии ставит новые вопросы перед исследователями о потенциале нервной системы к восстановлению и реорганизации.

Часть результатов данного исследования послужила базой для изучения действия биологически активных веществ в условиях моделирования ишемии головного мозга у крыс.

Валидация метода картирования MPF в модели локальной ишемии даёт возможность использовать данный метод магнитно-резонансной томографии в доклинических и клинических исследованиях для изучения степени изменения содержания миелина при ишемических повреждениях мозга. Гистологическая валидация метода, выполненная в данной работе, показала, что MPF может служить уникальным инструментом для мониторинга потери и восстановления миелина при инсульте, что в дальнейшем позволит

включить данный метод магнитно-резонансной томографии в стандартный протокол клинических исследований.

Методология и методы исследования. Исследование выполнено на базе лаборатории нейробиологии (заведующий лабораторией – доктор биологических наук, доцент М. Ю. Ходанович) Научно-исследовательского института биологии и биофизики Национального исследовательского Томского государственного университета (г. Томск), лаборатории фармакологии кровообращения отдела фармакологии (заведующий отделом – доктор биологических наук, профессор М. Б. Плотников) Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук (г. Томск) и на базе SPF-вивария (заведующий виварием – кандидат биологических наук Е. Л. Завьялов) Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск).

Эксперименты были проведены в соответствии с правилами Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Исследование было одобрено Биоэтическими комитетами НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга ТНИМЦ, Института цитологии и генетики СО РАН и Томского государственного университета.

Исследование включало в себя две экспериментальные серии, посвящённые изучению процессов демиелинизации в условиях двух различных типов ишемии головного мозга. В первой серии изучалась демиелинизация в условиях тотальной ишемии головного мозга, во второй серии – в условиях локальной ишемии головного мозга. В каждой серии были сформированы группы, соответствующие разным временным точкам исследования, а также группы контрольных животных.

Основные методы исследования:

1. Моделирование ишемии головного мозга с помощью окклюзии трёх магистральных сосудов, снабжающих кровью головной мозг (для моделирования тотальной ишемии) и с помощью окклюзии средней мозговой артерии (для моделирования локальной ишемии), а также проведение ложных операций у контрольных животных.

2. Изучение выживаемости и неврологического дефицита животных после проведения операций по моделированию ишемии и после ложной операции.

3. Контроль развития ишемии головного мозга с помощью иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания срезов мозга к специфичным белкам зрелых нейронов (NeuN) и микроглии (Iba1).

4. Изучение изменения степени миелинизации наиболее подверженных действию тотальной или локальной ишемии структур головного мозга с помощью ИГХ окрашивания срезов мозга к основному белку миелина (MBP) и определения процента MBP-позитивной площади.

5. Изучение изменения степени миелинизации структур головного мозга в очаге локальной ишемии с помощью окрашивания срезов мозга люксомем быстрым синим (LFB) и определения межполушарной разницы оптической плотности LFB.

6. Изучение изменений, происходящих в структурах головного мозга в очаге локальной ишемии, с помощью методов магнитно-резонансной томографии, а именно картирования параметров T_1 , T_2 , PD, ADC и MPF.

7. Анализ плотности миелина в очаге локальной ишемии головного мозга методом картирования MPF и оценка корреляционных связей с гистологическими параметрами.

8. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Снижение содержания миелина наблюдается как при тотальной, так и при локальной ишемии головного мозга, однако характеризуется различной локализацией, динамикой и выраженностью.

2. Метод картирования макромолекулярной протонной фракции MPF позволяет с высокой точностью и специфичностью количественно оценить содержание миелина в условиях ишемического повреждения мозга.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов, представленных в диссертации, подтверждается достаточным объёмом выборок в обеих сериях эксперимента, использованием высокотехнологического сертифицированного оборудования, современных стандартизированных методик. Результаты исследований подвергнуты тщательному анализу с применением адекватных методов математической статистики.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на: 5-й Международной научной конференции «Новые оперативные технологии» (Томск, 29–30 сентября 2015 г.); Научно-практической конференции с международным участием «Новые технологии восстановления деятельности сердца и других органов в эксперименте и клинике» (Томск, 21–23 апреля 2016 г.); XII, XIII Международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 01–11 июня 2016 г., 30 мая – 10 июня 2017 г.); 141-м, 142-м, 143-м Ежегодных съездах Американской неврологической ассоциации (Балтимор, США, 16–18 октября 2016 г.; Сан-Диего, США, 15–17 октября 2017 г.; Атланта, США, 21–23 октября 2018 г.); III, IV Международных конференциях с элементами молодёжной школы «Магнитно-резонансная томография в биомедицинских исследованиях» (Новосибирск, 23–26 ноября 2016 г., 25–26 октября 2018 г.); XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных России «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 25–28 апреля 2017 г.); Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (Томск, 01–03 ноября 2017 г.); 26-м Объединённом ежегодном съезде Международного общества магнитного резонанса в медицине и

Европейского общества магнитного резонанса в медицине и биологии (Париж, Франция, 16–21 июня 2018 г.); Ежегодном съезде Общества нейронаук (Сан-Диего, США, 03–07 ноября 2018 г.).

Финансовая поддержка исследования. Работа выполнена в рамках проекта РНФ №14-45-00040 «Неинвазивное количественное картирование миелинизации серого вещества головного мозга у человека и животных» 2014–2018 гг., проекта по Программе повышения конкурентоспособности ТГУ СИ4 (тема «Комплексное исследование механизмов регенерации мозга на моделях тотальной ишемии мозга и рассеянного склероза» 2015–2016 гг.), и государственного задания Минобрнауки России №18.2583.2017/4.6 «Неинвазивное количественное картирование миелинизации на основе магнитно-резонансной томографии для клинической диагностики неврологических заболеваний и аномалий развития головного мозга» 2017–2019 гг.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертаций (из них 2 статьи в зарубежных научных журналах, входящих в Web of Science; 2 статьи в российском научном журнале, переводная версия которого входит в Web of Science), 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных, 14 публикаций в сборниках материалов международных конференций (из них 7 публикаций в сборниках, входящих в Web of Science).

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, список сокращений, список литературы. Работа проиллюстрирована 20 рисунками и содержит 9 таблиц. Список литературы содержит 5 отечественных и 298 зарубежных первоисточников.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы диссертации рассмотрены механизмы повреждения головного мозга в условиях тотальной и локальной ишемии. Особое внимание уделено механизмам влияния ишемии на олигодендроциты и миелин. Проведён обзор методов МРТ для диагностики и наблюдения ишемии головного мозга, а также экспериментальных методов МРТ для визуализации и количественной оценки содержания миелина в мозге.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Первая экспериментальная серия была выполнена на 37 крысах-самцах линии Wistar с массой тела 250–300 г, полученных из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга СО РАМН (г. Томск). Животные содержались в стандартных условиях вивария при световом режиме 12/12, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности 60 %, со свободным доступом к пище и воде.

Вторая экспериментальная серия была выполнена на 41 крысах-самцах линии Sprague-Dawley с массой тела 250–270 г, полученных из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Животные содержались в условиях SPF-вивария в индивидуальных вентилируемых клетках при световом режиме 10/14, температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности 40–50 %, со свободным доступом к пище и воде.

Несмотря на разные линии крыс, использованные в исследовании, показано, что крысы линий Wistar и Sprague-Dawley близки в отношении чувствительности к ишемии, и результаты, полученные на данных линиях при моделировании ишемии, существенно не различаются [O'Collins et al., 2013].

В обеих экспериментальных сериях животные из контрольных групп подвергались ложным операциям с выполнением всех тех же манипуляций, что и экспериментальные животные, за исключением самого ишемического эпизода.

Схема исследования

Исследование состояло из двух экспериментальных серий, дизайн и основные использованные методы указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Дизайн исследования и используемые методы

Серия	Группа	Временная точка	Прооперировано	Выжило	Используемые методы исследования
Тотальная ишемия	Контроль	10 суток	10	5	Оценка выживаемости, оценка неврологического дефицита (по McGrow Stroke Index), ИГХ окрашивание к MBP, NeuN и Iba1.
		30 суток		5	
	Ишемия	10 суток	27	5	
		30 суток		5	
Локальная ишемия	Контроль	3 суток	10	5	Оценка выживаемости, оценка неврологического дефицита (по Longa NSS), сканирование на магнитно-резонансном томографе, ИГХ окрашивание к MBP, NeuN и Iba1, гистологическое окрашивание LFB.
		30 суток		5	
	Ишемия	1 сутки	31	5	
		3 суток		5	
		10 суток		5	
		30 суток		5	

Животных выводили из экспериментов в соответствии с временными точками под эфирным наркозом путём транскардиальной перфузии 4 % параформальдегидом. После извлечения мозга проводилась криопротекция и

заморозка в парах жидкого азота для дальнейшей гистологической и ИГХ обработки.

Моделирование ишемии головного мозга

В обеих сериях в качестве контроля служили ложнооперированные животные. Кроме контрольных животных при моделировании локальной ишемии в качестве дополнительного контроля использовались значения исследуемых параметров в симметричном регионе контралатерального полушария. В течение операций температура тела животных поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Моделирование тотальной ишемии головного мозга (ТИГМ) осуществлялось под хлоралгидратным общим наркозом (в/б, 450 мг/кг) при подключении к аппарату ИВЛ. ТИГМ вызывалась путём 7-минутной окклюзии трёх магистральных сосудов, снабжающих кровью головной мозг, с последующей реперфузией [Chernysheva et al, 2014 ; Atochin et al, 2017]. Контрольные животные подвергались тем же манипуляциям за исключением лигирования сосудов.

Моделирование локальной ишемии головного мозга проводилось под общим ингаляционным изофлурановым наркозом (1,5–2 % в кислороде). Для моделирования был выбран метод окклюзии средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion, MCAO) с помощью внутрисосудистого филамента (Doccol, США) в модификации Longa E. Z. с соавторами [Longa et al, 1989]. Через надрез на внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию вводился нейлоновый филамент для перекрытия кровотока в средней мозговой артерии на 60 минут. Контрольные животные подвергались тем же манипуляциям за исключением введения филамента.

МРТ исследование

Животных из второй серии сканировали до проведения операции для исключения отклонений в развитии головного мозга, сразу после проведения операции для подтверждения наступления ишемии и на 1/3/10/30-е сутки для групп, соответствующих выбранным временным точкам. Сканирование животных с MCAO проводилось под изофлурановым наркозом на магнитно-резонансном томографе для мелких животных Bruker BioSpec 117/16USR с напряжённостью магнитного поля 11.7 Т и длилось 35 минут. Протокол включал в себя T_1 -взвешенную последовательность, MT-взвешенную последовательность, PD-взвешенную последовательность, FieldMap последовательность для картирования поля B_0 и AFI последовательность для картирования поля B_1 . Из исходных данных были реконструированы параметрические карты T_1 , T_2 , PD, MPF и ADC.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Криосрезы мозга толщиной 10 мкм получали на криотоме HM525 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Для изучения миелинизации срезы мозга животных окрашивали люксолом быстрым синим (luxol fast blue, LFB) и первичными антителами к основному белку миелина MBP (goat anti-MBP, sc-13914, Santa Cruz Biotechnology, США). Для мечения зрелых нейронов

использовалось окрашивание первичными антителами к белку NeuN (rabbit anti-NeuN, ABN78; Merck Millipore, США), для мечения микроглии – к белку Iba1 (rabbit anti-Iba1, 019-19741; Wako Pure Chemical Industries, Япония). Вторичные антитела, использованные в исследовании: donkey anti-rabbit, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 488 (711-545-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), и donkey anti-goat, конъюгированные с флуорохромом AlexaFluor 594 (715-585-150; 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, США).

Срезы мозга фотографировали на микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с модулем MosaiX с помощью программного обеспечения AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Германия). Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ.

Для оценки содержания миелина по окрашиванию LFB рассчитывали оптическую плотность LFB (LFB optical density, LFB OD) [Khodanovich et al, 2017] с коррекцией на фоновые значения по формуле:

$$LFB\ OD = \left(1 - \frac{Mean}{Background}\right) \times 100\%$$

где *Mean* – среднее значение интенсивности данного региона интереса, *Background* – среднее значение интенсивности фоновых регионов интереса.

Содержание миелина по окрашиванию к МБП оценивали с помощью порогового метода Отсу [Khodanovich et al, 2019] как процент МБП-позитивной площади. Гибель нейронов и пролиферация/активация микроглии оценивали путём визуального подсчёта специфически окрашенных NeuN+ или Iba1+ клеток.

Подсчёт различных параметров (МБП-позитивная площадь, LFB OD, количество NeuN+ и Iba1+ клеток осуществлялся в границах нескольких областей – регионов интереса (region of interest, ROI) размером 100×100 мкм² внутри исследуемой структуры мозга (рисунок 1). Для подсчёта использовали не менее 3-х ROI и не менее 3-х фотографий, полученные значения усредняли, определяя средние значения и стандартные ошибки среднего для каждого гистологического параметра и животного. Полученные значения включали в статистический анализ.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ всех данных проводился в программе Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Для оценки различий между группами по шкале неврологического дефицита в обеих сериях использовали непараметрический критерий Манна-Уитни.

Для серии с ТИГМ значимость различий между группами и регионами мозга оценивали с двухвходового дисперсионного анализа с повторными измерениями и коррекцией Greenhouse-Gesser на множественность

измерений. Модель включала факторы «группа» (контроль и экспериментальные группы согласно временным точкам) и «структура» (структуры гиппокампа для нейронов и микроглии, исследуемые слои гиппокампа для миелина). Значимость попарных различий между группами проявляли с помощью последующего post-hoc анализа с использованием критерия LSD Fisher.

Для серии с МСАО в разных видах анализа в качестве контроля использовали как значения симметричного очагу ишемии участка среза в контралатеральном полушарии, так и значения, полученные от контрольных животных.

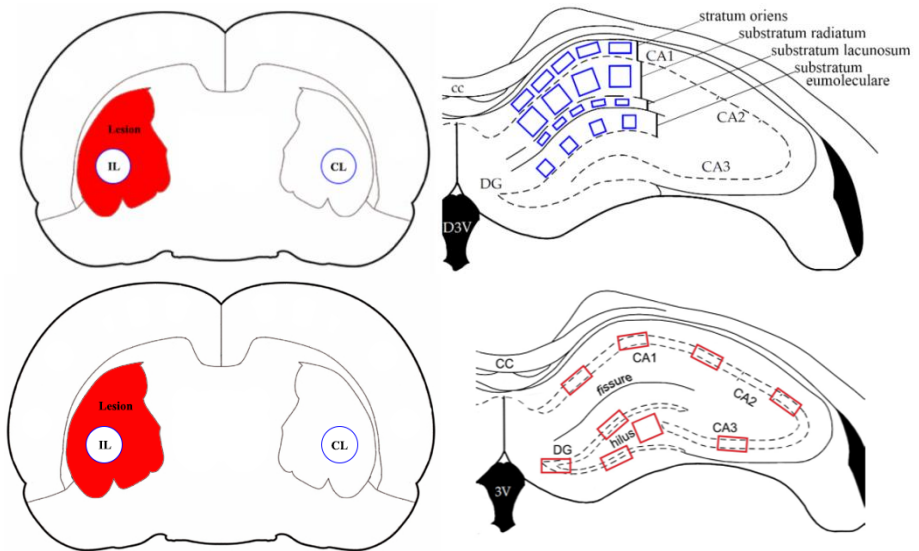


Схема расположения ROI для оценки миелинизации при МСАО (сверху слева, целый срез мозга) и ТИГМ (сверху справа, гиппокамп). Схема расположения ROI для подсчёта NeuN+ и Iba1+ при МСАО (снизу слева, целый срез мозга) и ТИГМ (снизу справа, гиппокамп). IL – ипсилатеральное полушарие, CL – контралатеральное полушарие, Lesion - очаг локальной ишемии, DG – зубчатая извилина
Рисунок 1 – Схемы расстановки ROI для проведения различных типов анализа (обработка MPT карт, фотографий гистологических и ИГХ срезов)

Значимость различий между полушариями и между зонами в пределах ишемического очага для экспериментальных групп, как и для модели ТИГМ, оценивали с помощью двухвходового дисперсионного анализа с повторными измерениями и коррекцией Greenhouse-Geisser на множественность измерений. Модель включала факторы «группа» (контроль и экспериментальные группы согласно временным точкам) и «полушарие» (ипси- и контралатеральное относительно ишемического очага). Значимость

попарных различий между группами проясняли с помощью последующего post-hoc анализа с использованием критерия LSD Fisher.

Кроме того, для измеренных МРТ, гистологических и ИГХ параметров были определены процентные изменения (percentage changes, PC) по формуле:

$$PC = \frac{(CL - IL)}{CL} \times 100\%$$

где CL – значение параметра в регионе интереса контралатерального полушария,

IL – значение параметра в регионе интереса ипсилатерального полушария.

Полученные значения были проанализированы с помощью дисперсионного и корреляционно-регрессионного анализа. Для оценки различий динамических изменений гистологических и томографических параметров проводили однофакторный дисперсионный анализ с фактором «группа» (контроль и экспериментальные группы согласно временным точкам) с последующим post-hoc анализом попарных различий с помощью критерия LSD Fisher. Взаимосвязь между томографическими и гистологическими переменными была проанализирована с помощью коэффициента корреляции Пирсона (R). Кроме того, с помощью алгоритма пошагового удаления переменных были протестированы множественные регрессионные модели для определения комбинации количественных МРТ параметров, обеспечивающих наилучшее предсказание PC LFB OD. Различия и коэффициенты корреляции считались значимыми при $p < 0,05$.

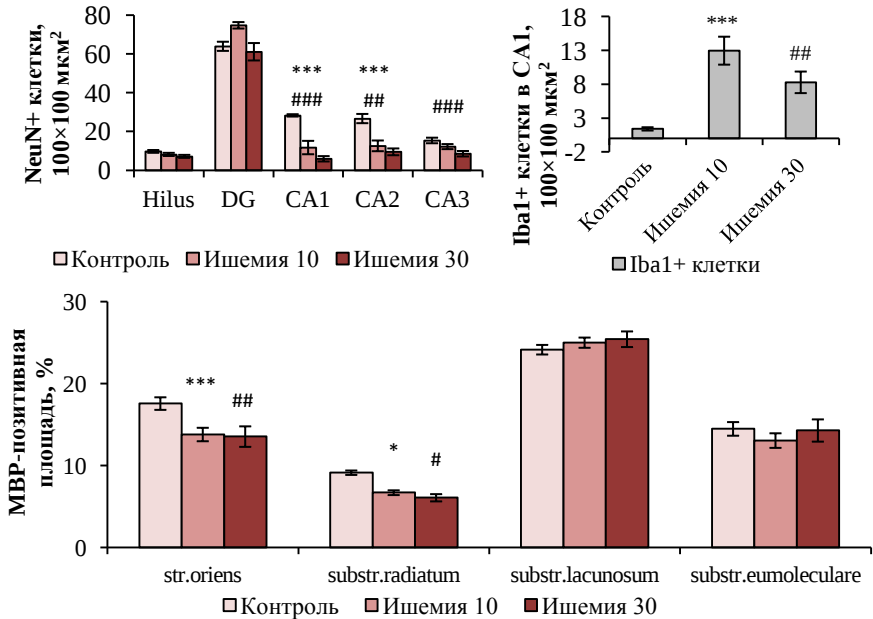
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности демиелинизации в моделях тотальной и локальной ишемии головного мозга

В серии с ТИГМ на 10-й день после операции выжило 40,7 %, а к 30-му дню – 37 % от числа прооперированных животных. Наблюдался серьёзный неврологический дефицит (5 (2–9) баллов), который незначительно уменьшался к 30-м суткам (4 (1–5) балла). Наиболее выраженная гибель нейронов наблюдалась в поле CA1 гиппокампа (в меньшей степени – в поле CA2), там же обнаружена наибольшая активация и пролиферация микроглии, отражающее воспаление (6-кратное увеличение числа Iba1+ клеток) вследствие ишемии (рисунок 2). К 30-м суткам также повреждаются пирамидные нейроны поля CA3 (80 %-, 55 %- и 50 %-ная потеря нейронов в полях CA1, CA2 и CA3 соответственно). Активация микроглии к 30-м суткам слегка снижается, но остается высоким по сравнению с контролем. Результаты полностью согласуются с литературными данными [Sadelli et al, 2017 ; Wahul et al, 2018 ; Surinkaew et al, 2018].

Обнаружена значимая демиелинизация в слоях substratum radiatum и stratum oriens гиппокампа, непосредственно прилегающих к наиболее повреждённому полю CA1, в котором наблюдается практически полная

гибель нейронов и максимальная активация микроглии вследствие ишемии, и в то же время не наблюдается в прочих, более отдалённых слоях. На фоне продолжающейся с 10-ых по 30-е сутки гибели нейронов и небольшого уменьшения количества активированной микроглии не было обнаружено значимой динамики по степени демиелинизации между 10-ми и 30-ми сутками после моделирования ТИГМ.



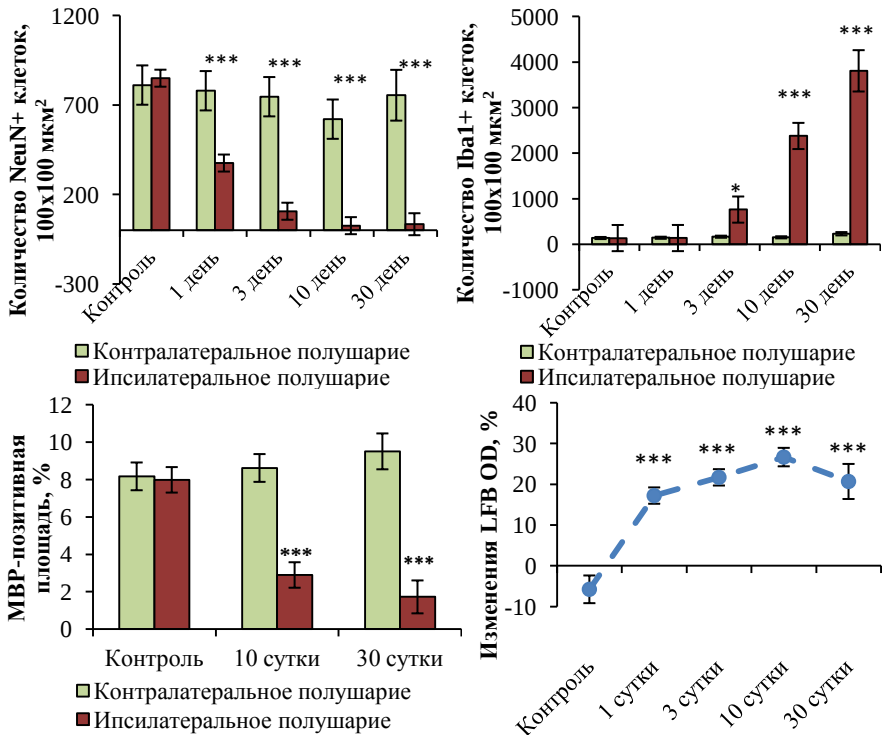
Количество зрелых нейронов (сверху слева), микроглии (сверху справа), демиелинизация (снизу). Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий по сравнению с контролем на 10-е сутки: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, на 30-е сутки: # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$

Рисунок 2 – Изменения в гиппокампе после моделирования ТИГМ

Во второй серии экспериментов выживаемость после МСАО составляла 74,2 % на 1-е сутки и 67,7 на 3-й и все дальнейшие дни наблюдения. Наблюдался лёгкий неврологический дефицит (2 (1-3) балла), значительно снижавшийся к 30-м суткам после моделирования ишемии (0,5 (0-1) балла). МСАО приводила к существенной гибели нейронов стриатума в границах очага ишемии уже с 1-х суток (рисунок 3), как и в ряде других исследований [Li et al, 2000 ; Shah et al, 2019]. К 10-м суткам гибель нейронов достигает максимума, и в границах очага наблюдаются только единичные NeuN+ клетки.

При этом увеличение количества микроглии начинается немного позднее (с 3-х суток) и постоянно усиливается вплоть до 30-х суток, достигая 27-кратного увеличения плотности Iba1+ клеток в границах очага ишемии.

Такой невероятный рост числа Iba1+ клеток объясняется, вероятно, инфильтрацией макрофагов из кровеносной системы [Benakis et al, 2015 ; Fumagalli et al, 2015 ; Imai et al, 1997 ; Sawada et al, 1998].



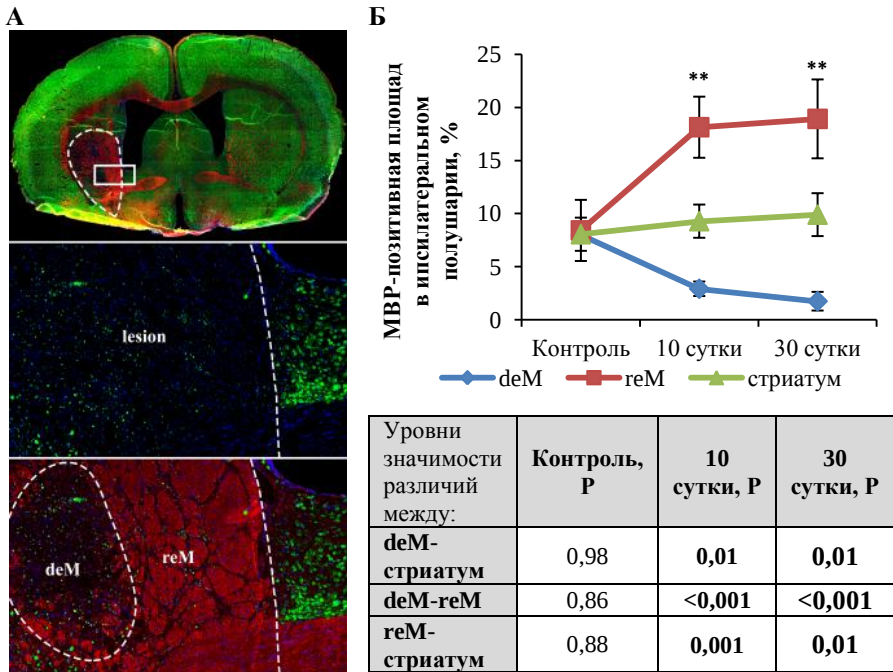
Количество зрелых нейронов (сверху слева), микроглии (сверху справа), демиелинизация (снизу). Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$

Рисунок 3 – Изменения в стриатуме после МСАО

При МСАО наблюдалась нарастающая значимая демиелинизация в очаге ишемии в стриатуме с 1-х по 30-е сутки по сравнению как с контралатеральным полушарием, так и с ложнооперированными животными. Согласно LFB окрашиванию, на 1-е сутки после МСАО выявляется бледность миелина без видимого разрушения крупных проводящих путей. На 3-и сутки наблюдается вакуолизация и частичное разрушение миелиновых волокон, к 10-м суткам в очаге ишемии миелиновые волокна полностью разрушены, наблюдаются фрагменты миелиновых волокон. В условиях МСАО демиелинизация в стриатуме начинается одновременно с гибелью нейронов, с 1-х суток после моделирования ишемии, однако, при практически 100 %-ной гибели нейронов к 10-м суткам, потеря миелина достигает лишь 40 % и сохраняется до 30-х суток. Оценка степени демиелинизации с помощью

окрашивания к MBP оказывается менее чувствительной, чем LFB OD, и обнаруживает разрушение миелина только с 10-х суток.

При сравнении очага локальной ишемии, определяемого по зоне гибели нейронов и по зоне разрушения миелина, на 30-е сутки обнаруживается несовпадение границ очага (рисунок 4).



А – Репрезентативная микрофотография. Окрашивание к MBP (красный), NeuN (зелёный), DAPI (синий). Б – Значения MBP-позитивной площади в ипсилатеральном полушарии. Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий в зоне reM между 10-ми и 30-ми сутками: ** – $p < 0,01$. Прочие уровни значимости указаны в таблице.

Рисунок 4 – Демиелинизация (deM) и «ремиелинизация» (reM) в очаге локальной ишемии (lesion)

В границах очага выделяются две подзоны, характеризующиеся разной динамикой изменения содержания миелина: зона продолжающейся демиелинизации и зона увеличения плотности миелина («зона ремиелинизации»). Количественная оценка содержания MBP в этих зонах показала, что значимые различия появляются уже с 10-х суток. Подобные наблюдения были описаны ранее [Po et al, 2012 ; Jiang et al, 2006], однако без количественной оценки.

Обобщение полученных нами результатов, касающихся сравнения моделей ишемии головного мозга по параметрам демиелинизации, потери нейронов и увеличение количества микроглии, представлены в таблице 2.

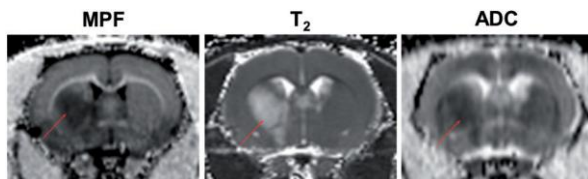
Таблица 2 – Сравнительная характеристика моделей ишемии головного мозга по параметрам демиелинизации, гибели нейронов и активации микроглии

Параметры сравнения		Тотальная ишемия	Локальная ишемия
Гибель нейронов	Локализация	Двустороннее поражение полей CA1, CA2 и CA3 гиппокампа	Ишемический очаг - одностороннее поражение caudoputamen (стриатум)
	Временные характеристики	Гибель 59 % нейронов в поле CA1 на 10-е сутки, 80 % нейронов на 30-е сутки	Гибель 56 % нейронов стриатума на 1-е сутки, 96 % к 10-м суткам, к 30-м суткам процент гибели не увеличивается
Активация микроглии	Локализация	Поле CA1 и окружающие регионы	Ишемический очаг в стриатуме
	Временные характеристики	6-кратное превышение контрольных значений на 10-е сутки сменяется 4-кратным превышением к 30-м суткам	Начинается с 3-х суток (превышение контрольных значений в 5,5 раз) и усиливается к 30-м суткам (27-кратное увеличение)
Демиелинизация	Локализация	Слои stratum oriens и substratum radiatum непосредственно, прилегающие к полю CA1	Ишемический очаг в стриатуме
	Временные характеристики	Не наблюдается динамики между 10-ми и 30-ми сутками (снижение на 21,5 % и 23 % для stratum oriens и на 27 % и 33,5 % для substratum radiatum)	Начинается с 1-х суток (снижение на 17 %) и достигает максимума к 10-м суткам (27 %); С 10-х суток очаг ишемии подразделяется на зону демиелинизации и зону повышения плотности миелина

В обеих моделях ишемии наблюдается значимая демиелинизация в специфических регионах, соответствующих структурам с максимальным повреждением нейронов и активацией микроглии: гиппокамп при ТИГМ и очаг локальной ишемии в стриатуме. В условиях ТИГМ демиелинизация происходит в слоях гиппокампа, прилегающих непосредственно к полю CA1, наиболее уязвимому к действию ишемии, и содержащих отростки находящихся в поле CA1 пирамидных нейронов. Демиелинизация в очаге локальной ишемии затрагивает как отростки нейронов, находящихся непосредственно в очаге, так и нейронов, не затронутых ишемией. При этом степень демиелинизации в очаге локальной ишемии значительно больше, чем в stratum oriens и substratum radiatum в гиппокампе при ТИГМ. Кроме того, через 30 суток после МСАО наблюдается увеличение плотности миелина по периферии в границах очага локальной ишемии.

Апробация и гистологическая валидация метода картирования MPF

Демиелинизация в ишемическом очаге обнаруживается как гипоинтенсивность параметра на картах MPF. Кроме MPF, очаг локальной ишемии хорошо визуализируется на картах T_2 (как зона гиперинтенсивности) и ADC (как зона гипоинтенсивности в острой фазе развития ишемии и зона гиперинтенсивности в хроническую фазу) (рисунок 5).



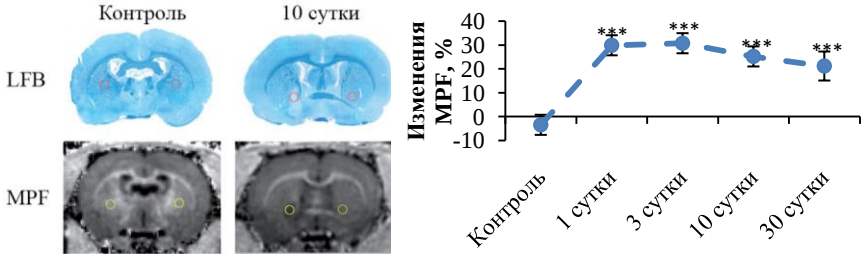
Стрелка указывает на очаг локальной ишемии.

Рисунок 5 – Репрезентативные карты MPF, T_2 и ADC мозга крысы на 1-е сутки после MCAO [Khodanovich et al., 2018]

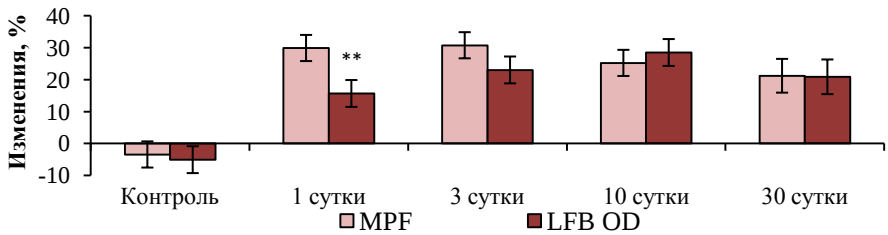
Изменения MPF в очаге локальной ишемии относительно контралатерального полушария обнаружили динамику, сходную с динамикой демиелинизации, детектируемой по LFB OD (рисунок 6). При этом на 1-е сутки выявлены значимые различия между динамикой снижения содержания миелина согласно LFB OD и MPF, которые мы связываем с развитием цитотоксического отёка после MCAO [Thrane et al, 2014 ; Lin et al, 2000].

Анализ показал, что PC MPF и LFB OD обнаруживают сильную корреляционную связь ($R = 0,81$, $p < 0,001$). Для того, чтобы определить комбинацию количественных магнитно-резонансных параметров, позволяющих наиболее точно предсказать установленную по LFB OD демиелинизацию в очаге ишемии и скорректировать ошибку, вызванную цитотоксическим отёком, была проведена серия регрессионных анализов. Включение в уравнение регрессии поправки на отёк в виде значений T_2 в качестве независимой переменной улучшает степень соответствия значений MPF по отношению к LFB OD ($R = 0,89$) (рисунок 7). Для количественного определения содержания миелина в исследованиях используются и другие методы MPT, такие как MTR [Thiessen et al, 2013 ; Rausch et al, 2009], MWF [West et al, 2018 ; Laule et al, 2006] и FA [Dijkhuizen et al, 2012 ; Shemesh, 2018], однако они демонстрируют корреляцию с гистологически определяемым содержанием миелина меньшей силы, чем MPF [Underhill et al, 2013 ; Thiessen et al, 2013].

А

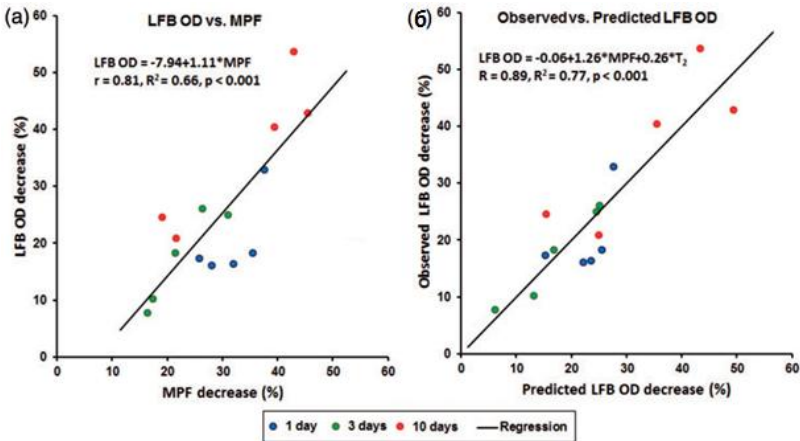


Б



А – Репрезентативные фотографии срезов мозга, окрашенного LFB, карты MPF (слева, окружности соответствуют ROI, [Khodanovich et al., 2018]), и изменения MPF в очаге по сравнению с контрольным полушарием (справа). Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: *** – $p < 0,001$. Б – PC MPF и LFB OD в очаге ишемии по сравнению с контралатеральным полушарием. Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий по сравнению с LFB OD: ** – $p < 0,01$

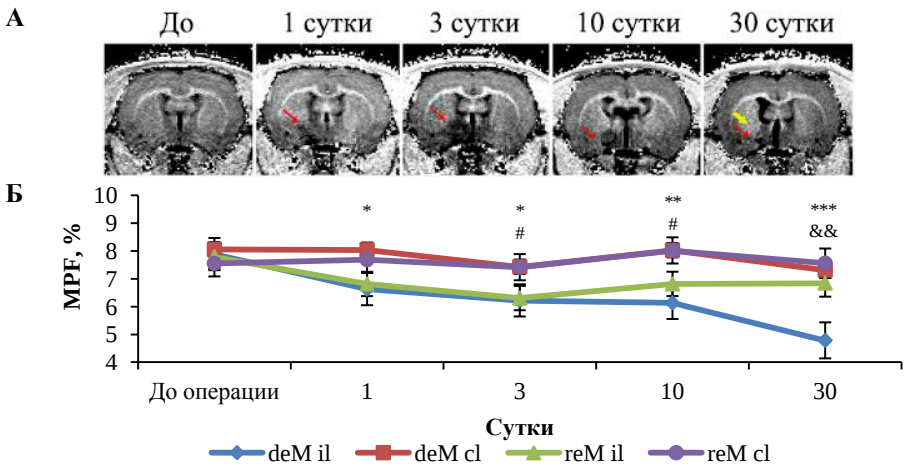
Рисунок 6 – Изменение MPF и LFB OD в очаге ишемии



А – PC LFB OD как функции от PC MPF. Б – PC LFB OD, рассчитанные с использованием двухфакторной регрессионной модели на основании PC MPF и T_2 в качестве независимых переменных

Рисунок 7 – Линейная регрессия PC LFB OD в очаге ишемии по отношению к контралатеральному региону [Khodanovich et al., 2018]

Аналогично окрашиванию тканей LFB, на картах MPF к 30-м суткам в пределах очага выделяются зоны демиелинизации и увеличения плотности миелина, которые визуализируются как зоны гипо- и гиперинтенсивности соответственно (рисунок 8). Количественный анализ данных показал, что данные различия значимы на 30-е сутки после операции. В некоторых исследованиях такая «зона ремиелинизации», определяемая с помощью гистологического окрашивания также была обнаружена по периферии очага локальной ишемии с помощью картирования фракционной анизотропии [Po et al, 2012; Jiang et al, 2006], однако авторы не проводили корреляционный анализ для установления связи между изменениями гистологических и МР-параметров.



А – Пример карт MPF на разные сроки после МСАО. Красная стрелка указывает на зону гипоинтенсивности, жёлтая – на зону гиперинтенсивности. Б – Динамика MPF в очаге ишемии и контралатеральном полушарии (il – ипсилатеральное полушарие, cl – контралатеральное полушарие). Средние $\pm$ SE. Уровень значимости различий между полушариями в зоне демиелинизации deM: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$; между полушариями в зоне увеличения плотности миелина reM: # – $p < 0,05$, между зонами deM и reM в границах очага: && – $p < 0,01$

Рисунок 8 – Изменения MPF в зоне очага ишемии

Корреляционный анализ между изменениями различных МР-параметров и изменением LFB OD показал (таблица 3), что корреляция с изменениями LFB OD наблюдается только для MPF ($R = 0,81$ без коррекции на отёк).

Таким образом, метод картирования MPF позволяет с высокой точностью и специфичностью количественно оценить содержание миелина в условиях МСАО, и ни один из стандартных методов магнитно-резонансной томографии не может быть использован для количественной оценки потери миелина в условиях МСАО.

Таблица 3 – Корреляции между процентными изменениями LFB OD и количественных параметров магнитно-резонансной томографии [Khodanovich et al., 2018]

МРТ параметр	Коэффициент корреляции Пирсона R	Уровень значимости P
MPF	0,81	<0,001
PD	-0,24	0,38
T ₁	-0,24	0,39
T ₂	0,12	0,67
ADC	-0,48	0,07

Исследованы возможные корреляционные связи между показателями, полученными неинвазивно, на основе МРТ, и другими ИГХ количественными показателями, а именно, гибелью нейронов и количеством активированной микроглии. Коэффициенты корреляции между РС MPF и ИГХ показателей представлены в таблице 4. Отсутствие значимых корреляций между MPF и NeuN и Iba1 свидетельствует о том, что на значения данного магнитно-резонансного параметра не оказывает влияния ни гибель нейронов, ни увеличение количества микроглии в очаге локальной ишемии.

Таблица 4 – Корреляции между процентными изменениями ИГХ показателей и МРТ параметров [Khodanovich et al., 2018]

Процентные изменения	MPF	PD	T₁	T₂	ADC
Количество NeuN+ клеток	-0,07 (0,80)	0,45 (0,09)	0,20 (0,47)	0,68 (0,006)	-0,54 (0,04)
Количество Iba1+ клеток	-0,34 (0,21)	-0,09 (0,75)	-0,17 (0,55)	-0,42 (0,12)	0,74 (0,002)
Данные отражают коэффициенты корреляции Пирсона (R) и уровни значимости (P) в скобках. Значимые корреляции выделены.					

Таким образом, метод картирования MPF позволяет с высокой точностью и специфичностью относительно прочих клеточных компонентов центральной нервной системы количественно оценивать потерю миелина при МСАО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования были сделаны следующие выводы:

1. Ишемия головного мозга приводит к демиелинизации структур мозга, наиболее уязвимых к действию ишемии. В условиях тотальной ишемии значимая демиелинизация наблюдается в слоях substratum radiatum и stratum oriens гиппокампа без заметной динамики между 10-ми и 30-ми сутками после ишемического воздействия. В условиях локальной ишемии значимая демиелинизация происходит лишь в ишемическом очаге, начинаясь на 1-е сутки и достигая максимума к 10-м суткам. К концу месяца наблюдений степень демиелинизации при моделировании локальной ишемии более чем в два раза превышает потерю миелина при тотальной ишемии головного мозга.

2. При моделировании тотальной ишемии головного мозга демиелинизация происходит в слоях гиппокампа, прилегающих к полю СА1, где наблюдается максимальная гибель нейронов и активация микроглии. На фоне продолжающейся гибели нейронов поля СА1 содержание миелина в указанных слоях значимо не изменяется во времени. При моделировании локальной ишемии гибель нейронов и активация микроглии в целом соответствует зоне повреждения миелина, но характеризуются различной динамикой. В очаге локальной ишемии, определяемой по зоне гибели нейронов, к 30-м суткам чётко выделяется зона демиелинизации и зона повышения плотности миелина.

3. Динамика изменения значений MPF в очаге в условиях локальной ишемии сходна с динамикой демиелинизации, определяемой с помощью гистологического и иммуногистохимического методов. На картах MPF чётко выделяются зоны гипо- и гиперинтенсивности, соответствующие зонам демиелинизации и повышения плотности миелина. MPF демонстрирует сильную корреляцию с содержанием миелина, степень которой увеличивается при введении в регрессионную модель параметра T_2 для коррекции погрешностей, вызванных отёком.

4. MPF демонстрирует высокую специфичность в отношении миелина по сравнению с остальными количественными магнитно-резонансными параметрами, включая PD, T_1 , T_2 и ADC, и не зависит от плотности клеточных компонентов нервной системы, не связанных с миелином, таких как количество нейронов и микроглии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включённых в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук:

1. Ходанович М. Ю. Влияние флуоксетина на нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа после тотальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс / М. Ю. Ходанович, **А. А. Кисель**, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, Р. Р. Савченко, М. Б. Плотников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, № 3. – С. 325–329. – 0,31 / 0,05 а.л.

в переводной версии журнала, входящей в Web of Science:

Khodanovich M. Yu. Effect of Fluoxetine on Neurogenesis in Hippocampal Dentate Gyrus after Global Transient Cerebral Ischemia in Rats / M. Yu. Khodanovich, **A. A. Kisel'**, G. A. Chernysheva, V. I. Smol'yakova, R. R. Savchenko, M. B. Plotnikov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 161, is. 3. – P. 351–354. – DOI: 10.1007/s10517-016-3412-4.

2. Ходанович М. Ю. Восстановительный постишемический нейрогенез: перспективы клинического применения / М. Ю. Ходанович, **А. А. Кисель** // Трансляционная медицина (Translational medicine). – 2016. – Т. 3, № 6. – С. 21–31. – 0,69 / 0,34 а.л.

3. Khodanovich M. Effects of Fluoxetine on Hippocampal Neurogenesis and Neuroprotection in the Model of Global Cerebral Ischemia in Rats [Electronic resource] / M. Khodanovich, **A. Kisel**, M. Kudabaeva, G. Chernysheva, V. Smolyakova, E. Krutenkova, I. Wasserlauf, M. Plotnikov, V. Yarnykh // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, is. 1. – Article number 162. – 15 p. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/162> (access date: 30.08.2019). – DOI: 10.3390/ijms19010162. – 0,93 / 0,1 а.л. (*Web of Science*).

4. Khodanovich M. Y. Quantitative assessment of demyelination in ischemic stroke in vivo using macromolecular proton fraction mapping / M. Y. Khodanovich, **A. A. Kisel**, A. E. Akulov, D. N. Atochin, M. S. Kudabaeva, V. Y. Glazacheva, M. V. Svetlik, Ya. A. Medvednikova, L. R. Mustafina, V. L. Yarnykh // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2018. – Vol. 38, is. 5. – P. 919–931. – DOI: 10.1177/0271678X18755203. – 0,76 / 0,08 а.л. (*Web of Science*).

5. Ходанович М. Ю. Усиление продукции новых нейронов в поле СА1 гиппокампа крыс под воздействием п-тирозола на модели тотальной транзиторной ишемии головного мозга / М. Ю. Ходанович, **А. А. Кисель**, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, М. С. Кудабеева, Е. П. Крутенкова, Я. А. Тюменцева, М. Б. Плотников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 8. – С. 176–180. – 0,31 / 0,04 а.л. (*переводная версия журнала входит в Web of Science*).

Свидетельство о государственной регистрации базы данных:

6. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2018620973. База данных карт молекулярной протонной фракции нормальной миелинизации мозга крыс и мышей / В. Л. Ярных (RU), М. Ю. Ходанович (RU), М. В. Светлик (RU), Е. П. Крутенкова (RU), А. О. Пищелко (RU), М. С. Кудабеева (RU), В. Ю. Глазачева (RU), **А. А. Кисель** (RU) ; правообладатель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (RU). Заявка № 2018620600 ; заявл. 18.05.2018 ; опубли. 03.07.2018, Бюл. № 7. – 1 с.

Публикации в сборниках материалов конференций, представленных в изданиях, входящих в Web of Science:

7. **Kisel A. A.** Hippocampal Neurogenesis in the New Model of Global Cerebral Ischemia [Electronic resource] / A. A. Kisel, G. A. Chernysheva, V. I. Smol'yakova, R. R. Savchenko, M. B. Plotnikov, M. Yu. Khodanovich // AIP Conference Proceedings. – 2015. – Vol. 1688 : 5th International Scientific Conference «New Operational Technologies» (NewOT'2015). Tomsk, September 29–30, 2015. – Article number 030004. – 5 p. – URL: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.4935999?class=pdf> (access date: 30.08.2019). – DOI: 10.1063/1.4935999. – 0,31 / 0,05 а.л.

8. Khodanovich M. Y. Animal Models of Cerebral Ischemia [Electronic resource] / M. Y. Khodanovich, **A. A. Kisel** // AIP Conference Proceedings. – 2015. – Vol. 1688 : 5th International Scientific Conference «New Operational

Technologies» (NewOT'2015). Tomsk, September 29–30, 2015. – Article number 030037. – 8 p. – URL: <https://aip.scitation.org/doi/pdf/10.1063/1.4936032?class=pdf> (access date: 30.08.2019). – DOI: 10.1063/1.4936032. – 0,5 / 0,25 а.л.

9. Khodanovich M. Yu. Modulation of Hippocampal Neurogenesis in the Global Brain Ischemia Model: Effects of p-tyrosol and Fluoxetine / M. Yu. Khodanovich, **A. A. Kisel**, G. A. Chernyshova, V. I. Smol'yakova, R. R. Savchenko, M. B. Plotnikov, V. L. Yarnykh // *Annals of Neurology*. – 2016. – Vol. 80, suppl. 20: 141st Annual Meeting of the American Neurological Association. Baltimore, USA, October 16–18 2016. – P. S101–S102. – DOI : 10.1002/ana.24759. – 0,06 / 0,01 а.л.

10. **Kisel A.** Dynamics of myelin content decrease in the rat stroke model / A. Kisel, M. Khodanovich, D. Atochin, L. Mustafina, V. Yarnykh [Electronic resource] // *Journal of Physics : Conference series*. – 2017. – Vol. 886, is. 1 : Magnetic Resonance Imaging in Biomedical Research (MRIBiomed 2016) : the 3rd International Conference and Young Scientist School. Novosibirsk, November 23–26, 2016. – Article number 012008. – 4 p. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/886/1/012008/pdf> (access date: 30.08.2019). – DOI: 10.1088/1742-6596/886/1/012008. – 0,19 / 0,04 а.л.

11. Khodanovich M. Yu. Macromolecular Proton Fraction (MPF) Mapping Correlates with Histologically Assessed Demyelination in the Rat Stroke Model / M. Yu. Khodanovich, **A. A. Kisel**, A. E. Akulov, D. N. Atochin, V. L. Yarnykh // *Annals of Neurology*. – 2017. – Vol. 82, suppl. 21 : 142nd Annual Meeting of the American Neurological Association. San Diego, USA, October 15–17, 2017. – P. S135–S136. – DOI: 10.1002/ana.25024. – 0,06 / 0,01 а.л.

12. Kudabaeva M. The increase in number of astrocytes in the total cerebral ischemia model in rats / M. Kudabaeva, **A. Kisel**, G. Chernysheva, V. Smol'yakova, M. Plotnikov, M. Khodanovich [Electronic resource] // *Journal of Physics : Conference series*. – 2017. – Vol. 886, is. 1 : Magnetic Resonance Imaging in Biomedical Research (MRIBiomed 2016) : 3rd International Conference and Young Scientist School. Novosibirsk, November 23–26, 2016. – Article number 012009. – 3 p. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/886/1/012009/pdf> (access date: 30.08.2019). – DOI: 10.1088/1742-6596/886/1/012009. – 0,19 / 0,03 а.л.

13. Khodanovich M. Abnormal Migration of Immature Neurons in the Global Cerebral Ischemia Model / M. Khodanovich, **A. Kisel**, M. Kudabaeva, G. Chernyshova, V. Smolyakova, V. Glazacheva, I. Wasserlauf, A. Pishchelko, M. Plotnikov, V. Yarnykh // *Annals of Neurology*. – 2018. – Vol. 84, suppl. 22 : 143rd Annual Meeting of the American Neurological Association. Atlanta, USA, October 21–23, 2018. – P. S154–S155. – DOI: 10.1002/ana.25331. – 0,06 / 0,01 а.л.

Публикации в прочих сборниках материалов конференций:

14. **Кисель А. А.** Влияние флуоксетина и паратриптола на нейрогенез в условиях тотальной ишемии головного мозга у крыс / А. А. Кисель, М. Ю. Ходанович, М. Б. Плотников, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, Р. Р. Савченко // *Новые технологии восстановления деятельности сердца*

и других органов в эксперименте и клинике : материалы научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 150-летию со дня рождения А. А. Кулябко. Томск, 21–22 апреля 2016 г. – Томск, 2016. – С. 42–44. – 0,19 / 0,03 а.л.

15. **Кисель А. А.** Влияние паратирозола и флуоксетина на нейрогенез в гиппокампе в условиях тотальной ишемии у крыс / А. А. Кисель, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, Р. Р. Савченко, М. Б. Плотников, М. Ю. Ходанович // Нейронаука для медицины и психологии : труды 12-го Международного междисциплинарного конгресса. Судак, 01–11 июня 2016 г. – М., 2016. – С. 204–205. – 0,06 / 0,01 а.л.

16. **Кисель А. А.** Динамика снижения содержания миелина после моделирования локальной ишемии головного мозга у крыс // Перспективы развития фундаментальных наук : сборник научных трудов XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Томск, 25–28 апреля 2017 г. – Томск, 2017. – Т. 4 : Биология и фундаментальная медицина. – С. 76–78. – 0,19 а.л.

17. **Кисель А. А.** Оценка миелинизации головного мозга крыс в модели ишемического инсульта / А. А. Кисель, М. Ю. Ходанович, Л. Р. Мустафина, Д. Н. Аточин // Нейронаука для медицины и психологии : сборник трудов 13-го Международного междисциплинарного конгресса. Судак, 30 мая – 10 июня 2017 г. – М., 2017. – С. 200–201. – 0,06 / 0,02 а.л.

18. **Кисель А. А.** Корреляция между количественными параметрами МРТ при моделировании локальной ишемии головного мозга у крыс / А. А. Кисель, Д. Н. Аточин, А. Е. Акулов, Л. Р. Мустафина, М. Ю. Ходанович, В. Л. Ярных // Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии (МСДТ 2017) : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета. Томск, 01–03 ноября 2017 г. – Томск, 2017. – С. 16. – 0,06 / 0,01 а.л.

19. **Kisel A. A** Macromolecular proton fraction closely correlates with myelin loss in the rat ischemic stroke model [Electronic resource] / A. A. Kisel, M. Yu. Khodanovich, D. N. Atochin, A. E. Akulov, L. R. Mustafina, A. V. Naumova, V. L. Yarnykh // Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB : proceedings. Paris, France, June 16–21, 2018. – Paris, 2018. – 3 p. – URL: <http://archive.ismrm.org/2018/0369.htm> (access date: 30.08.2019). – 0,06 / 0,01 а.л.

20. Khodanovich M. Neurogenesis and migration of new neurons in the model of global cerebral ischemia in rats / M. Khodanovich, **A. Kisel**, M. Kudabaeva, G. Chernyshova, V. Glazacheva, I. Wasserlauf, M. Plotnikov. // Society for Neuroscience : 2018 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, USA, November 03–07, 2018. – San Diego, 2018. – P. 637. – 0,06 / 0,01 а.л.

Издание подготовлено в авторской редакции.
Отпечатано на участке цифровой печати
Издательского Дома Томского государственного университета
Заказ № 4012 от «03» октября 2019 г. Тираж 100 экз.
г. Томск Московский тр.8 тел. 53-15-28