Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи

Кисель Алена Андреевна

ДЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ В УСЛОВИЯХ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

03.03.01 – Физиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, доцент
Ходанович Марина Юрьевна

Томск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. 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 проведённого исследования:

1. Впервые детально исследована демиелинизация гиппокампа на трёхсосудистой модели тотальной ишемии головного мозга у крыс. Установлен факт демиелинизации слоёв гиппокампа stratum oriens и substratum 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 количественной метод оценки миелинезации 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. Доказательство развития ишемии головного мозга с помощью иммуногистохимического 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 иммуногистохимического 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 люксолем 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 результатов. Основные положения и выводы, представленные в диссертации, основаны на двух экспериментальных сериях с достаточным объёмом выборки в каждой. При проведении исследования использовано высокотехнологическое сертифицированное оборудование, современные стандартизированные методики, а также новая методика оценки содержания миелина с помощью магнитно-резонансной томографии. Результаты исследований подвергнуты тщательному анализу с применением адекватных методов математической статистики. Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакета статистических программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены и обсуждены на ряде международных научных конференций: 5-я Международная научная конференция «Новые оперативные технологии» (Томск, 29–30 сентября 2015 г.); Научно-практическая конференция с международным участием «Новые технологии восстановления деятельности сердца и других органов в эксперименте и клинике» (Томск, 21–23 апреля 2016 г.); XII, XIII Международные междисциплинарные конгрессы «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 01–11 июня 2016 г., 30 мая – 10 июня 2017 г.); 141-й, 142-й, 143-й Ежегодные съезды 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 Международные конференции с элементами молодёжной школы «Магнитно-резонансная томография в биомедицинских исследованиях» (Новосибирск, 23–26 ноября 2016 г., 25–26 октября 2018 г.); XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных

России «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 25–28 апреля 2017 г.); Международная научно-практическая конференция «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии» (Томск, 01–03 ноября 2017 г.); 26-й Объединённый ежегодный съезд Международного общества магнитного резонанса в медицине и Европейского общества магнитного резонанса в медицине и биологии (Париж, Франция, 16–21 июня 2018 г.); Ежегодный съезд 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 конкурентноспособности 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ишемия головного мозга

1.1.1 Типы ишемии головного мозга

Наиболее встречаемым типом ишемии головного мозга, как и вообще нарушений мозгового кровообращения, является ишемический инсульт. По данным исследований [Стаховская и др., 2013], в России отношение ишемических инсультов к геморрагическим инсультам постепенно растёт и, например, составило 5:1 в 2009–2010 гг. по сравнению с 3,5:1 в 2001–2003 гг. Инсульт, или острое локальное нарушение мозгового кровообращения, определяется по неожиданному появлению неврологического дефицита, свойственного конкретному локальному сосудистому источнику. Клинические проявления инсульта крайне вариабельны в связи со сложной анатомией мозга и его сосудистой сетью [Muir, 2008, 2013]. Локальная ишемия головного мозга вызывается снижением тока крови в сосудах мозга, которое длится больше нескольких секунд, тромбами, образовавшихся в самих сосудах, или эмболами из проксимальных артерий или сердца. Неврологические симптомы появляются в течение секунд, поскольку нейроны содержат недостаточно гликогена, и вскоре после прекращения кровоснабжения наступает энергетический дефицит. Если остановка тока крови длится более нескольких минут, возникает инфаркт, или отмирание ткани мозга. Инсульт диагностируют в случаях, когда неврологические признаки и симптомы длятся больше 24 часов [Harrison’s Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Когда кровоток восстанавливается быстро, нервная ткань может полностью восстановиться, и симптомы проявляются только временно: это называется транзиторная ишемическая атака (ТИА) [Durukan et al., 2017 ; Muir, 2013]. Стандартное определение ТИА требует разрешения всех неврологических проявлений и симптомов в течение 24 часов независимо от того, обнаружены ли при сканировании мозга новые постоянные очаги повреждения или нет. В то же время, новое предложенное определение классифицирует такое нарушение мозгового кровообращения как ишемический инсульт, если обнаруживается появление нового инфаркта мозга независимо от сохранения симптомов [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Генерализованное снижение мозгового кровообращения из-за системной гипотензии (связанной, например, с аритмией сердца, инфарктом миокарда, геморрагическим шоком) обычно вызывает обморок [Harukuni et al., 2006 ; Neumann et al., 2013]. Если мозговой кровоток остаётся низким в течение длительного времени, впоследствии может развиться инфаркт в пограничных зонах между областями васкуляризации главных мозговых артерий. В более серьёзных случаях тотальная гипоксия-ишемия вызывает обширное повреждение мозга, а совокупность факторов когнитивных последствий, наступающих при этом, называется гипоксически-ишемическая энцефалопатия [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Поскольку два этих типа ишемического повреждения головного мозга являются наиболее распространёнными, для их изучения были разработаны соответствующие экспериментальные модели на животных. Для моделирования тотальной ишемии головного мозга наиболее часто используют 2-сосудистую (2-VO) и 4-сосудистую (4-VO) окклюзию магистральных сосудов, снабжающих кровью головной мозг. Обе эти модели имеют как свои преимущества, так и недостатки [Ginsberg et al., 1989 ; Khodanovich et al., 2015 ; O'Neill et al., 2000]. Недавно была разработана модель 3-сосудистой окклюзии (3-VO), которая лишена недостатков обеих этих моделей, однако она весьма сложна в выполнении [Atochin et al., 2017 ; Shcherbak et al., 2012].

Локальная ишемия может быть вызвана гораздо большим разнообразием моделей, включающих в себя введение внутрисосудистого филамента, введение в сосуд тромба (тромбоэмболическая модель), фотоэмболизацию с помощью бенгальского розового. Выбор модели зависит от целей исследования: так, тромбоэмболическая и фотоэмболизационная модели больше подходят для изучения тромболитических препаратов, а модель окклюзии средней мозговой артерии с помощью внутрисосудистого филамента привлекательна для исследователей своей высокой повторяемостью и стандартизованностью [Canazza et al., 2014 ; Ginsberg et al., 1989 ; Khodanovich et al., 2015 ; Fluri et al., 2015]. Длительность ишемического воздействия в данных моделях также может варьироваться и составлять от 30 минут до двух часов [Braeuninger et al., 2009 ; Longa et al., 1989], а использование очень коротких ишемических воздействий (до 10 минут) является хорошей моделью ТИА [Durukan et al., 2017 ; Pedrono et al., 2010].

1.1.2 Механизмы ишемического повреждения головного мозга

1.1.2.1 Глутаматная эксайтотоксичность и апоптоз

Эксайтотоксичность подразумевает смерть нервных клеток, вызванную активацией рецепторов возбуждающих аминокислот. Убедительные доказательства роли эксайтотоксичности в ишемическом повреждении нейронов были получены из экспериментов с использованием моделей на животных [Mayor et al., 2018]. Экспериментальные модели инсульта ассоциированы с повышенной внеклеточной концентрацией возбуждающей глутаминовой аминокислоты, которая выполняет в мозге роль нейротрансмиттера, а повреждение нейронов ослабляется при денервации глутамат-экспрессирующих нейронов или при введении антагонистов рецепторов глутамата. Распространение клеток, чувствительных к влиянию ишемии, хорошо согласуется с распространением рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) [Alix et al., 2009 ; Mayor et al., 2018] (за исключением клеток Пуркинье в мозжечке, которые уязвимы к гипоксии-ишемии, но не имеют большого числа NMDA-рецепторов), а конкурентные и неконкурентные NMDA-антагонисты эффективны в предотвращении локальной ишемии. Экспериментальное повреждение мозга, вызванное гипогликемией, также смягчается антагонистами NMDA-рецепторов [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Эксайтотоксичность – это не единственное событие, а скорее каскад клеточного повреждения. Эксайтотоксичность вызывает активный транспорт кальция внутрь клетки, и большая его часть быстро захватывается митохондриями [Kumar et al., 2016 ; Yang et al., 2018]. Повышение цитоплазматического кальция вызывает метаболическую дисфункцию и продукцию свободных радикалов, активацию протеинкиназ, фосфолипаз, NO-синтазы, протеаз и эндонуклеаз, ингибирует синтез белков. Активированная NO-синтаза начинает вырабатывать оксид азота (NO), который может прореагировать с супероксидом (O_2^-) с образованием пероксинитрита ($ONOO^-$), который, в свою очередь, может играть важнейшую роль в повреждении нервных клеток [Atochin et al., 2017 ; Mayor et al., 2018 ; Shvedova et al., 2018]. Другой ключевой путь заключается в активации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, которая происходит в ответ на повреждение ДНК свободными радикалами [Mayor et al., 2018]. В экспериментах мыши, нокаутные по генам нейрональной NO-синтазы или поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, либо же с избыточной экспрессией супероксиддисмутазы, оказывались устойчивыми к действию локальной ишемии [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Хотя эксайтотоксичность явным образом участвует в патогенезе клеточной смерти при инсульте, к настоящему времени нет доказательств, что лечение NMDA-антагонистами имело положительный эффект в клиническом применении [Baltan, 2016 ; Zhou et al., 2018]. Транзиторные рецепторные потенциалы в кальциевых каналах запускаются как эксайтотоксическим сигнальным путём, так и окислительным стрессом одновременно [Butt et al., 2014 ; Matute, 2010]. Помимо всего прочего, независимо от действия глутамата обнаружен транспорт кальция внутрь клеток через кислото-чувствительные ионные каналы [Barros et al., 2002]. Эти каналы переносят кальций при ацидозе и истощении субстрата, и их фармакологическая блокада заметно смягчает ишемическое повреждение мозга, поэтому они представляют собой потенциальную новую мишень для лечения инсульта [Harrison’s Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Апоптоз, или запрограммированная клеточная смерть, играет важную роль как в физиологических, так и в патологических состояниях. В процессе эмбриогенеза апоптоз задействуется в удалении тех нервных клеток, которые не смогли должным образом дифференцироваться либо достичь предполагаемой цели. При этом появляется всё большее число свидетельств о повышенной интенсивности апоптотической клеточной смерти в патогенезе различных острых и хронических неврологических заболеваний [Doyle et al., 2008 ; Eizenberg et al., 1996 ; Giffard et al., 2005 ; Wang et al., 2018]. Апоптоз характеризуется сморщиванием нервных клеток, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК, в то время как смерть клеток от некроза ассоциирована с цитоплазматическим и митохондриальным набуханием с последующим растворением клеточной мембраны [Hu et al., 2017 ; Wang et al., 2018]. Апоптотическая и некротическая клеточные смерти могут сосуществовать или следовать друг за другом в зависимости от тяжести запускающего их инсульта. Клеточные запасы энергии играют, по всей видимости, важную роль в двух этих формах клеточной смерти, делая апоптоз более предпочтительной формой в условиях сохранения уровня АТФ [Harrison’s Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Митохондрии являются ключевым компонентом в контроле специфического апоптоза (specific apoptosis pathways). Перераспределение цитохрома С, также как и апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ) из митохондрий в рамках апоптоза приводит к активации каскада внутриклеточных протеаз, известных как каспазы [MacDougall et al., 2019 ; Thal et al., 2011]. Каспаза независимый апоптоз запускается после повреждения ДНК, активации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и перемещения АИФ в ядро. Перераспределению цитохрома С препятствует сверхпродукция апоптотического белка BCL2 и способствует проапоптотический белок Bax [Sanchez-Gomez et al., 2011]. Все эти механизмы могут быть запущены открытием больших пор во внутренней мембране митохондрий, известных как поры переходной проницаемости, хотя в других обстоятельствах возникают независимо друг от друга [Yang et al., 2018]. Недавние исследования свидетельствуют, что блокирование митохондриальных пор снижает как гипогликемическую, так и ишемическую клеточные смерти. Кроме апоптотического пути, ишемия запускает гибель клеток и по механизму некроза. Мыши, дефицитные по циклофилину D, ключевому протеину, вовлечённому в открытие пор переходной проницаемости, оказываются устойчивы к некрозу, вызванному локальной ишемией мозга [Harrison’s Neurology in Clinical Medicine, 2010].

1.1.2.2 Воспаление и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера

Ишемия головного мозга приводит к инфильтрации воспалительных клеток от неспецифических иммунологических реакций, миграции периферических лейкоцитов в мозг и активации микроглии [Zheng et al., 2003]. Выброс воспалительных цитокинов (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли α) нейронами и глией в условиях ишемии вызывает образование адгезивных молекул (селектины, интегрины, молекула межклеточной адгезии) в сосудах мозга, что в конце концов ведёт к нарушению целостности гематоэнцефалического барьера и формированию отёка [Danton et al., 2003 ; Han et al., 2003]. Усиленная секреция цитокинов и протеаз, таких как металлопротеиназы, вызывают дальнейшее разрушение внеклеточного матрикса и гематоэнцефалического барьера. Хотя действие интерлейкина-1 и является пагубным в повреждениях при церебральной ишемии, роль интерлейкина-6, провоспалительного цитокина, и интерлейкина-10, противовоспалительного цитокина, до сих пор не совсем ясна. Фактор некроза опухоли α, по всей видимости, играет двоякую роль в ишемическом мозге, так как он вовлечён как в формирование ишемической толерантности [Ginis et al., 2002], так и в распространение ишемического повреждения головного мозга [Bruce et al., 1996 ; Gary et al., 1998].

Нарушение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и изменение проницаемости ГЭБ являются ключевыми компонентами среди процессов вторичного повреждения, следующего после инсульта. ГЭБ является высокоспециализированным полупроницаемым барьером, стоящим между мозгом и кровью и служащим для поддержания гомеостаза в церебральном микроокружении путём ограничения перемещения различных соединений и токсинов внутрь центральной нервной системы [Ballabh et al., 2004]. Структурно этот барьер состоит из множества компонентов, включая эндотелиальные клетки с плотными контактами (ПК) и адгезивными контактами (АК), астроциты, перициты и базальную мембрану [Ballabh et al., 2004]. Вместе эти компоненты обеспечивают структурную интеграцию, необходимую барьеру для поддержания фундаментальной роли, в том числе: снабжение мозга жизненно важными питательными веществами, такими как кислород и глюкоза, опосредование удаления продуктов жизнедеятельности и облегчение движения нутриентов и белков плазмы [Begley et al., 2003].

В нормальных физиологических условиях питательные вещества и белки плазмы проникают через ГЭБ двумя основными транспортными механизмами: межклеточный и трансцеллюлярный транспорт [Sorby-Adams et al., 2017]. Межклеточный транспорт обеспечивает перенос небольших молекул (< 800 Да) через просвет между эндотелиальными клетками, чему способствуют ПК [Komarova et al., 2010]. В противовес этому, трансцеллюлярный транспорт используется для переноса крупных молекул белков плазмы, таких как альбумин, через ГЭБ опосредованным кавеолами эндоцитозом. Везикулярный перенос альбумина происходит после отпочковывания кавеол в виде везикул, которые мигрируют к противоположной плазматической мембране, чтобы слиться с ней и выбросить своё содержимое [Komarova et al., 2010]. Каждый из этих механизмов транспорта занимают важное место в поддержании и функционировании барьера [Sorby-Adams et al., 2017].

Нарушение целостности ГЭБ после инсульта является хорошо задокументированной чертой ишемического повреждения, однако временные характеристики и степень подобных изменений проницаемости варьируются в зависимости от тяжести и длительности ишемического эпизода. Тем не менее, общепринято, что инсульт ассоциирован как с ранними, так и с отдалёнными изменениями в проницаемости ГЭБ [Turner et al., 2016], с первичными изменениями проницаемости ГЭБ, происходящими в течение первых часов после наступления инсульта, и вторичными, начинающимися на 24–48 часов позднее [Rosenberg et al., 1998]. Например, экспериментальные модели инсульта показали, что повышенная проницаемость ГЭБ, наблюдаемая через 4–12 часов после инсульта, может быть обусловлена усиленной экспрессией кавеолина-1, приводящей к изменениям трансцеллюлярного транспорта, за чем через 24–48 часов следовало разрушение в связи с дисрегуляцией белков ПК окклюдина, клаудина-5 и зона окклюдинов-1, которая запускает изменения межклеточного транспорта [Gu et al., 2012 ; Nag et al., 2007]. Более того, увеличенная активность системы матриксных металлопротеаз (MMP) также вовлечена в постинсультные изменения проницаемости ГЭБ [Turner et al., 2016]. В частности, очень ранние изменения проницаемости ГЭБ объясняют активностью MMP-2, которая ослабляет плотные контакты [Lakhan et al., 2013], хотя отложенные изменения проницаемости между 4 часами и 4 сутками после инсульта связана с выраженной деградацией базальной мембраны, опосредованной MMP-9 [Mun-Bryce et al., 2017], и компонентов плотных контактов [Asahi et al., 2001 ; Clark et al., 1997]. Полученные результаты согласуются с данными клинических наблюдений пациентов с ишемическим инсультом, обнаруживающими похожий подъём уровня матричных металлопротеаз [Anthony et al., 1997 ; Montaner et al., 2003 ; Ning et al., 2006 ; Rosell et al., 2008].

1.1.2.3 Отёк: цитотоксический и вазогенный

Отёк мозга может быть грубо поделён на две категории на основании целостности ГЭБ и места накопления жидкости: цитотоксический отёк и вазогенный отёк [Ayata et al., 2002]. Цитотоксический отёк возникает немедленно после инсульта и характеризуется внутриклеточным накоплением жидкости, в частности в сером веществе мозга [Ayata et al., 2002 ; Battey et al., 2014]. Например, после ишемического инсульта недостаток кислорода и глюкозы в нервных клетках как следствие сосудистой окклюзии стремительно приводит к нехватке АТФ [Battey et al., 2014]. Это вызывает нарушение работы Na^+/K^+-АТФ-азы, необходимой для поддержания ионного гомеостаза [Marmarou, 2007]. Это нарушение приводит к неспособности клетки поддерживать ионный градиент и ведёт к внутриклеточному накоплению натрия, создавая таким образом осмотический потенциал для движения воды из межклеточного пространства. Такое внутриклеточное накопление жидкости приводит к набуханию клетки и, в конце концов, к её разрыву, который вызывает воспаление и косвенное повреждение соседних клеток [Barros et al., 2002 ; Brogan et al., 2015].

Вазогенный отёк возникает в условиях нарушения целостности ГЭБ и, в отличие от цитотоксического отёка, который начинается сразу после начала инсульта, обычно достигает своего пика на 3–5 сутки после начала заболевания [Battey et al., 2014 ; Hacke et al., 1996]. Эндотелиальная дисфункция, потеря целостности плотных контактов (ПК) и усиленный трансцеллюлярный транспорт являются компонентами патологического выхода из сосудов белков плазмы и крупных молекул, хотя их движение через барьер в нормальных условиях строго ограничивается [Simard et al., 2007]. Перемещение этих молекул из внутрисосудистого компартмента в межклеточное пространство изменяет осмотическое давление, способствуя возникновению движущей силы для притока воды в паренхиму мозга [Battey et al., 2014]. Повышенное и стойкое движение жидкости из сосудов в мозг приводит к массивному накоплению воды в нервной ткани, в частности в структурах белого вещества, приводя таким образом к увеличению общего объёма мозга и, как следствие, внутричерепного давления (ВЧД) [Ayata et al., 2002]. С учётом того, что цитотоксический отёк вызывает лишь перемещение воды из внеклеточного пространства во внутриклеточное и, таким образом, не влияет на увеличение общего объёма мозга [Simard et al., 2007], именно вазогенный отёк является основной мишенью для лечения отёка мозга.

1.1.3 Особенности основных типов ишемии головного мозга

1.1.3.1 Локальная ишемия

Острая окклюзия внутричерепного сосуда вызывает снижение мозгового кровотока в участке, снабжаемом этим сосудом. Величина снижения тока крови является функцией от тока крови по коллатералям и зависит от индивидуальной анатомии сосудистой сети и региона окклюзии. Снижение мозгового кровотока до 0 вызывает смерть ткани мозга в течение 4–10 минут [Muir, 2013]. Значения < 16–18 мл/100 г ткани в минуту вызывают инфаркт в течение часа, а значения < 20 мл/100 г ткани в минуту вызывают ишемию без инфаркта кроме тех случаев, когда снижение кровотока длится в течение нескольких часов или дней [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010]. Если кровоток восстанавливается раньше гибели значительного числа клеток, возможно появление только преходящих симптомов, т.е. ТИА [Durukan et al., 2017 ; Muir, 2008, 2013]. Ткань, окружающая центральный регион инфаркта, также является ишемизированной, но обратимо дисфункциональной и относится к ишемической полутени. Полутень может быть определена с помощью перфузионно-диффузионного изображения МРТ. В конечном счёте, если не произойдёт никаких изменений в величине кровотока, ишемическая полутень трансформируется в зону инфаркта, следовательно, сохранение ишемической полутени является целью реваскуляризационной терапии [Paciaroni et al., 2009 ; Ramos-Cabrer et al., 2011].

Локальный церебральный инфаркт возникает двумя отдельными путями: 1) некротический, в котором происходит быстрое разрушение цитоскелета из-за дефицита энергии в клетке, и 2) апоптотический, в котором клетки запускают механизм запрограммированной смерти [Hu et al., 2017]. Ишемия вызывает некроз путём лишения нейронов глюкозы, которое, в свою очередь, приводит к сбою в митохондриальной продукции АТФ. Без АТФ мембранные ионные насосы перестают функционировать, и нейрональная мембрана деполяризуется, приводя к повышению внутриклеточного кальция.

Деполяризация клеточной мембраны также вызывает выброс глутамата в синаптическую щель. Избыток внеклеточного глутамата является нейротоксичным путём активации постсинаптических глутаминовых рецепторов, что увеличивает поступление кальция внутрь клеток. Деградация мембранных липидов и митохондриальная дисфункция приводят к образованию свободных радикалов, которые вызывают каталитическое разрушение мембран и, судя по некоторым данным, нарушают другие жизненные функции клеток. Менее выраженная степень ишемии, наблюдаемая в ишемической полутени, способствует апоптотической клеточной смерти, наступающей до недели позднее. Гипотермия смягчает ишемию [Li et al., 2012], в то время как гипергликемия – отягчает (глюкоза > 11,1 ммоль/л (200 мг/дл)), поэтому целесообразным является подавление гипертермии и предупреждение гипергликемии насколько это возможно. Индуцированная умеренная гипотермия для смягчения последствий инсульта является предметом продолжающихся клинических исследований [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Ишемический инсульт у человека обычно происходит в бассейне средней мозговой артерии, поэтому модели окклюзии данной артерии у животных наиболее точно отражают клиническую картину [Longa et al., 1989 ; Macrae, 1992]. Окклюзия средней мозговой артерии у крыс приводит к развитию инфаркта в стриатуме и коре головного мозга, но возможны варианты с формированием очага только в коре или только в стриатуме [Mitchell et al., 2016]. С момента появления первых моделей локальной ишемии в 1970–1980-х годах было предложено множество модификаций, некоторые из которых не используют краниотомию [Boyko et al., 2010 ; Macrae, 1992]: внутрисосудистая модель [Liu et al., 2011 ; O'Collins et al., 2017] обычно используется в > 40 % всех исследований [O'Collins et al., 2017]. Альтернативу ей представляют тромбоэмболическая [Macrae et al., 1993 ; Sharkey et al., 1993], коагуляционная [Canazza et al., 2014 ; Durukan et al., 2007] и другие модели [Canazza et al., 2014 ; O'Collins et al., 2017].

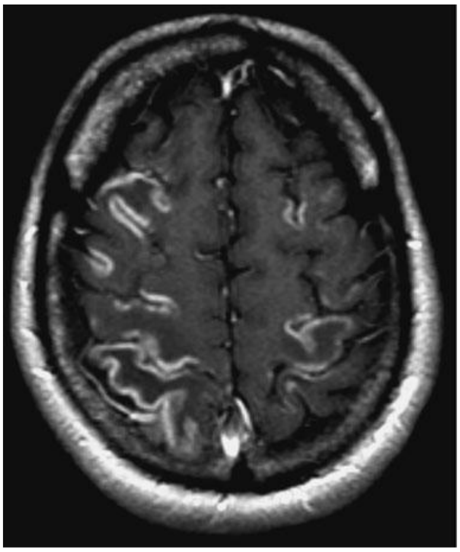
1.1.3.2 Тотальная ишемия головного мозга

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия возникает при недостаточности поступления кислорода к мозгу в связи с понижением давления или остановкой дыхания. Причины включают в себя инфаркт миокарда, остановка сердца, шок, асфиксия, паралич дыхания и отравление монооксидом углерода или цианидом. При отравлениях монооксидом углерода или цианидом говорят о гистотоксической гипоксии, поскольку они вызывают прямое нарушение дыхательной цепи [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Тотальная ишемия головного мозга является ведущей причиной смерти после эпизодов остановки сердца [Atochin et al., 2017]. Внутрибольничная смертность среди успешно реанимированных пациентов составляет 70 %, в то время как у 2/3 выживших пациентов в течение 3 месяцев после остановки сердца развиваются умеренные или серьёзные неврологические симптомы [Mangus et al., 2014]. Даже краткие перебои в мозговом кровообращении приводят к серьёзным повреждениям мозга [Flynn et al., 2008] и необратимым нарушениям когнитивных и исполнительных функций [Karanjia et al., 2011].

При тотальной ишемии головного мозга активируются не-NMDA-рецепторы глутамата (AMPA- и каинатные), а их антагонисты оказывают защитное влияние [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].

Важнейшими гистологическими отклонениями являются обширные многоочаговые или диффузные ламинарные некрозы (рисунок 1) с практически неизменным затрагиванием гиппокампа. Нейроны поля CA1 гиппокампа уязвимы даже для кратких эпизодов гипоксии-ишемии [Petito et al., 1984], что, вероятно, объясняет, почему после кратких остановок сердечной деятельности может возникать селективный постоянный дефицит памяти. Разрозненные небольшие участки инфаркта или гибели нейронов могут располагаться в базальных ганглиях, гипоталамусе или стволе мозга. В некоторых случаях обширное билатеральное рубцевание таламуса может повлиять на пути, опосредующие реакцию активации, и такая патология может привести к вегетативному состоянию. Специфичные формы гипоксическо-ишемической энцефалопатии, так называемые инфаркты водораздела, возникают в дистальных регионах между основными мозговыми артериями и могут вызвать когнитивные нарушения, включая визуальную агнозию и слабость, более выраженную в проксимальной группе мышц, чем в дистальной (рисунок 1) [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010].



T_1-взвешенная постконтрастная МРТ

Рисунок 1 – Корковые ламинарные некрозы при гипоксически-ишемической энцефалопатии с лакунарными некрозами [Harrison's Neurology in Clinical Medicine, 2010]

Тотальная ишемия из-за остановки сердечной деятельности приводит к предсказуемому паттерну гистологических повреждений, которым подвержены специфические популяции нейронов (избирательный ишемический некроз) [Kaplan et al., 1991 ; Petito et al., 1984 ; Pulsinelli, 1985]. Хотя реперфузия восстанавливает мозговое кровоснабжение, она может вызвать вторичное повреждение мозга через миграцию нейтрофилов и повышение активных форм кислорода (АФК), отёк мозга и геморрагию. Повышенный уровень АФК может приводить к повреждению внутриклеточных белков и ДНК путём окисления и активации большого числа путей, приводящих к гибели клетки [Harukuni et al., 2006].

В исследованиях на различных животных моделях тотальной ишемии головного мозга к повреждению оказывались чувствительны определённые нейронные популяции мозга, включая пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа [Ходанович и др., 2016a, 2019], нейроны среднего размера из стриатума и мозжечковые клетки Пуркинье [Fonnum, 1984]. Чувствительность данных популяций нейронов варьируется и зависит от длительности и тяжести ишемии [Zhu et al., 2017], а типичный временной профиль наблюдается после остановки сердца. Нейроны поля CA1 гиппокампа являются наиболее уязвимыми к воздействию деполяризующей ишемии (требуется всего 3–5 минут для запуска апоптоза и некроза клеток), в то время как среднеразмерные нейроны стриатума более устойчивы (15–20 минут) [Cardiac arrest : the science and practice of resuscitation medicine, 2007]. После успешной реанимации и восстановления мозгового кровотока развитие необратимого повреждения нейронов также различается у разных нейрональных популяций (например, повреждение наблюдается уже через 3 часа после восстановления кровотока в среднеразмерных нейронах стриатума, но отложено до 48–72 часов и даже более [Neumann et al., 2013 ; Rashad et al., 2018 ; Wahul et al., 2018] в нейронах поля CA1 гиппокампа: феномен, названный «отложенная клеточная смерть») [Cardiac arrest: the science and practice of resuscitation medicine, 2007].

1.2 Томографические методы диагностики ишемии мозга

Методы магнитно-резонансной томографии существенно расширили понимание процессов, происходящих при ишемии головного мозга. Это широко распространённый и используемый в клинической практике инструмент, который часто применяется для диагностики и наблюдения за пациентами с ишемическим инсультом. МРТ особенно полезен для диагностики пациентов с симптоматикой инсульта крупных сосудов, вызванной окклюзией крупных артерий фронтального отдела головного мозга, поскольку это наиболее точный метод для определения пациентов, которые с наибольшей вероятностью извлекут выгоду из эндоваскулярной тромбоэктомии [González, 2017].

Стандартный МРТ протокол для исследования инсульта состоит из T_2/FLAIR-, T_2*, диффузионного (DWI) и перфузионного (PWI) изображений, а также включает магнитно-резонансную ангиографию (МРА). Данный протокол может быть выполнен менее чем за 30 минут. Он обеспечивает достоверную информацию о зоне сосудистой окклюзии и величине потенциально восстанавливаемой ткани мозга [Leiva-Salinas et al., 2010].

1.2.1 Диффузионная МРТ

Диффузионная МРТ, обычно называемая DWI (diffusion-weighted imaging, диффузионно-взвешенное изображение), наиболее чувствительна и специфична для детекции острого ишемического инсульта на ранних сроках, когда компьютерная томография и стандартные МР последовательности являются недостоверными [González et al., 1999]. Ранний очаг на DWI является маркером тяжёлой ишемии и развития инфаркта даже при раннем начале реперфузии. Объём первоначального диффузионного поражения в высокой степени коррелирует с итоговым объёмом инфаркта, так же как и с острой и хронической неврологической оценкой. Стандартные методы компьютерной томографии и МРТ не способны достоверно определять инфаркт на ранних стадиях. Для данных методов визуализации в течение первых 6 часов после начала инсульта чувствительность составляет менее 50 %. Чувствительность же и специфичность DWI составляет более 90 % [Schaefer et al., 2000].

Острая ишемия приводит к уменьшению коэффициенту диффузии воды в тканях, и это является главным источником определения очага на DWI. Биофизическая основа этого изменения сложна и не полностью изучена. Механизмы включают в себя: нарушение работы ионных насосов с притоком воды из внеклеточного во внутриклеточное пространство; уменьшение объёма внеклеточного пространства и увеличение извилистости межклеточных проводящих путей; увеличение внутриклеточной вязкости из-за диссоциации микротрубочек и фрагментации прочих внутриклеточных компонентов;

увеличение неравномерности внутриклеточного пространства; уменьшение подвижности цитоплазмы; снижение температуры и увеличение проницаемости клеточных мембран.

В исследованиях на животных после окклюзии средней мозговой артерии следовало снижение коэффициента диффузии воды уже через 10 минут после начала окклюзии. Коэффициенты диффузии псевдонормализуются спустя около 48 часов и в дальнейшем увеличиваются. У людей сниженная диффузия наблюдается в ишемизированных тканях мозга уже через 11 минут после окклюзии сосуда. Измеряемый коэффициент диффузии (apparent diffusion coefficient, ADC) снижается, достигая минимальных значений на 1–4-й дни. Данное снижение диффузии обнаруживается как гиперинтенсивность на DWI (которое сочетает в себе T_2 и измерение диффузии) и гипоинтенсивность на ADC изображениях. ADC возвращается к первоначальным значениям через 1–2 недели. На данном этапе инфаркт определяется как зона лёгкой гиперинтенсивности на изображениях DWI и изоинтенсивности на ADC изображениях. Затем, в то время как DWI может быть различным (немного гипоинтенсивным, изоинтенсивным или гиперинтенсивным, в зависимости от относительной интенсивности T_2 против диффузионных компонентов), ADC оказывается повышенным из-за увеличения содержания воды в размягчённой ткани мозга. Время развития этих явления зависит от множества факторов, включая тип и размер инфаркта [Copen et al., 2001].

У подавляющего большинства пациентов с инсультом отклонения DWI отображают те ткани, в которых разовьётся инфаркт. Итоговый объём инфаркта обычно включает в себя первоначальный очаг, определяемый по DWI, и окружающие ткани, куда расширился инфаркт. Однако может наблюдаться по крайней мере частичное восстановление DWI после ранней реперфузии. Исследования, проведённые на приматах, продемонстрировали, что временная окклюзия церебральных артерий менее, чем на час, обычно приводит к истинному восстановлению DWI, в то время как окклюзия на 3 часа и более с последующей реперфузией вызывает лишь временную псевдонормализацию. Возвращение к нормальным значениям при окклюзии между 1 и 3 часами может варьироваться. Подобные результаты были получены и для людей. После 3-часовой окклюзии церебральной артерии отклонения DWI отражают необратимые повреждения тканей независимо от псевдонормализации, которая может наблюдаться после реперфузии [González, 2017].

1.2.2 Изображения магнитной восприимчивости

Последовательности, чувствительные к локальным отклонениям магнитного поля, позволяют идентифицировать продукты крови, включая тромбы, которые вызывают окклюзию сосудов, паренхимальные гематомы и хронические микрогеморрагии. Такие продукты крови вызывают гипоинтенсивность МРТ сигнала на T_2*-взвешенных изображениях, полученных с помощью последовательностей градиентного эха, или могут обнаружить внутрисосудистый тромб (поскольку он содержит большое количество парамагнитного дезоксигемоглобина) в гиперострую фазу формирования инфаркта как регион линейного снижения сигнала магнитной восприимчивости. Последовательность, взвешенная по магнитной восприимчивости (susceptibility-weighted imaging, SWI) является вариантом T_2*-взвешенного изображения, который использует информацию о фазе и амплитуде сигнала. Результирующее изображение выделяет различия в магнитной восприимчивости. SWI также демонстрирует сниженный сигнал в тех регионах вен, в которых снижена перфузия из-за увеличения внутрисосудистого дезоксигемоглобина [Halefoglu et al., 2018].

1.2.3 FLAIR/T_2- и T_1-взвешенные изображения

На T_2-взвешенных МРТ изображениях наблюдается потеря сигнала крови в окклюзированной артерии. На T_2 FLAIR изображениях (fluid-attenuated inversion recovery, режим с подавлением сигнала свободной воды) в регионах потенциального инфаркта обычно наблюдается высокий внутрисосудистый сигнал на фоне окружающего низкоинтенсивного сигнала субарахноидального пространства. Предполагается, что это происходит из-за медленного тока в венах. Существенная гиперинтенсивность МРТ сигнала в паренхиме наблюдается при использовании последовательности T_2/FLAIR, в то время как интенсивность сигнала паренхимы снижается на T_1-взвешенных изображениях, вследствие увеличения содержания воды в тканях. Это происходит в первую очередь в связи с развитием вазогенного отёка. В то время как первичный механизм контраста, идентифицирующего инфаркт, один и тот же (увеличение содержания воды), видимость очага различается: отклонения на FLAIR идентифицируются более явно, чем на T_2, и оба этих метода существенно более точно изображают зону инфаркта, чем T_1-взвешенные изображения. Важно, что увеличенное содержание воды также приводит к сглаживанию борозд, которое помогает в идентификации инфаркта тканей. Ни один из стандартных протоколов МРТ не надёжен для диагностики инсульта в первые 6 часов после наступления симптомов, но высоко достоверны после 24 часов [González, 2017].

В подострой фазе инфаркта мозга (от 1 дня до 2 недель) развивающийся отёк приводит к увеличению T_2 и FLAIR гиперинтенсивности, большей T_1 гипоинтенсивности, лучшему определению инфаркта, набуханию вместе с утоньшением извилин, сглаживанию борозд и полостей, утоньшению прилежащих желудочков, сдвигу средней линии и образованию грыжи мозга. Набухание обычно достигает пика примерно через 3 дня и разрешается к 7–10-му дню. Усиленный сигнал T_2 и FLAIR обычно сохраняется после первой недели, однако может возникать «затемнение МР-сигнала», когда интенсивность сигнала от повреждённой ткани становится сходной с интенсивностью от нормальной ткани. Считается, что это происходит из-за инфильтрации лимфоцитов из периферической крови и из-за других механизмов, которые приводят к локальному увеличению содержания воды, подобному нормальным тканям.

Через 2 недели объёмное воздействие снижается, начинается потеря ткани паренхимы и глиоз. В течение хронической стадии развития инфаркта (более 6 недель) некротическая ткань и отёк разрешаются, завершается реакция глиоза и восстанавливается гематоэнцефалический барьер. Больше не обнаруживается паренхимального, менингиального и сосудистого усиления МРТ сигнала. Возникает потеря ткани и возможно увеличение желудочков, борозд и полостей. Наблюдается FLAIR/T_2-гиперинтенсивность и T_1-гипоинтенсивность в связи с увеличенным содержанием воды, ассоциированным с энцефаломаляцией. Валлерова дегенерация характеризуется T_2-гиперинтенсивностью и потерей ткани в ипсилатеральном кортикоспинальном тракте после инфаркта в бассейне средней мозговой артерии [González, 2017 ; Leiva-Salinas et al., 2010 ; Choi et al., 2018].

1.2.4 Перфузионная МРТ

Перфузионно-взвешенные изображения (PWI, perfusion-weighted imaging) позволяют измерить капиллярную перфузию в мозге. Прохождение дозы парамагнитного контрастного вещества через капилляры мозга вызывает нелинейную потерю сигнала на T_2* изображениях [Grandin, 2003]. Эта динамика контрастной техники отслеживает изменения тканевого сигнала, вызванные эффектом восприимчивости для создания гемодинамической кривой зависимости интенсивности сигнала от времени [Rosen et al., 1990].

Изображения церебральной гемодинамики могут быть выполнены с помощью МРТ и могут быть полезными в некоторых случаях. Перфузионные МРТ изображения используют с тех случаях, когда требуется подтвердить, что симптоматика инсульта возникла именно из-за гемодинамических факторов. Наиболее часто это возникает у пациентов без идентифицируемого на DWI очага [González, 2017].

Ранее была выдвинута гипотеза, что DWI отражает необратимо повреждённую ткань, в то время как PWI отражает общую зону гипоперфузии [Jansen et al., 1999]. Объёмные различия между ними, называемое PWI/DWI-несоответствие, отражает магнитно-резонансный коррелят ишемической полутени. В то же время, если между размерами зоны очага на PWI и DWI изображениях нет различий, или существует даже негативное различие (когда размер зоны очага на PWI меньше зоны на DWI), это называется PWI/DWI-соответствие. Такой «дефект соответствия» наблюдается у пациентов, у которых нет ткани полутени как из-за нормализации первичной гипоперфузии, так и из-за завершения инфаркта и полной утраты полутени [Jansen et al., 1999 ; Parsons et al., 2002 ; Schellinger et al., 2003]. Можно обсуждать тот факт, что такая модель на принимает во внимание то, что очаг повреждения на PWI также учитывает зону олигемии, которая не находится в опасности, и что нарушения визуализируемые на DWI не обязательно развиваются в инфаркт [Fiehler et al., 2004 ; Kidwell et al., 2003]. До сих пор не до конца понятно, какой параметр лучше предсказывает зону критической гипоперфузии и позволяет дифференцировать зону инфаркта от зоны полутени. Большинство авторов, однако, соглашаются с тем, что в современной клинической практике T_{max} и среднее время прохождения, по всей видимости, дают наилучшие результаты [Leiva-Salinas et al., 2010].

1.3. Повреждение олигодендроцитов и миелина при ишемии головного мозга

1.3.1 Механизмы чувствительности олигодендроцитов и миелина к повреждающим факторам

Олигодендроциты являются самыми многочисленными клетками белого вещества, составляя примерно 60 % всех глиальных клеток [Baltan, 2014 ; Nave et al., 2008 ; Tekkök et al., 2001], однако они также представлены и в сером веществе, преимущественно как спутники тел нейронов.

Помимо подробно описанных первично демиелинизирующих заболеваний, таких как рассеянный склероз, демиелинизация может происходить в рамках разнообразных повреждений и патологий центральной нервной системы. Это отчасти связано с высокой восприимчивостью олигодендроцитов к окислительному стрессу, эксайтотоксическому повреждению и воспалительным цитокинам, которые зачастую идут рука об руку с различными травмами, повреждениями и инфекциями.

Непосредственные функции олигодендроцитов вносят большой вклад в высокую подверженность данного типа клеток различного рода повреждающим факторам. Действительно, олигодендроциты демонстрируют наибольшую скорость обмена веществ среди всех клеток головного мозга, которая необходима им как для образования, так и для поддержания крайне большого объёма мембран, масса которых может превышать массу самой клетки практически в 100 раз [Morell et al., 1984]. Также сообщается, что клеточное дыхание олигодендроцитов в два раза интенсивнее, чем у нейронов [Cammer, 1984]. Более того, в олигодендроцитах содержится парадоксально мало глутатиона [Thorburne et al., 1996], являющегося одним из основных антиоксидантов. Таким образом олигодендроциты предрасположены к клеточной смерти в условиях метаболического стресса [Connor et al., 1996].

Олигодендроциты также подвержены воздействию эксайтотксичности в связи с тем, что мембрана как самих клеток, так и миелина имеет множество рецепторов глутамата, таких как AMPA-/каинатные [Gallo et al., 2000 ; Li et al., 2000 ; Sánchez-Gómez et al., 1999] и NMDA-рецепторы [Káradóttir et al., 2005 ; Micu et al., 2006]. И хотя эти рецепторы крайне важны для взаимодействия аксонов и глии, они также делают олигодендроциты мишенью для эксайтотоксического повреждения. Имеются данные, что эти рецепторы более проницаемы для кальция [Benarroch, 2009]. Было показано, что GluN1, обязательная субъединица NMDA-рецептора, демонстрирует возрастной паттерн экспрессии, характеризующийся преимущественной локализацией на телах олигодендроцитов в молодом возрасте и на миелиновых отростках – в стареющем белом веществе. Это отчасти может свидетельствовать о том, что возрастные паттерны локализации NMDA-рецептора могут, по-видимому, модулировать уязвимость или пластичность олигодендроцитов и миелина в ответ на ишемию в белом веществе в зависимости от возраста. Примечательно, что подобное перераспределение экспрессии GluN1 наблюдается в период развития, но оно происходит в обратном направлении: с астроцитов на P4–11 иммунореактивность GluN1 перемещается на миелиновые отростки (P12–18) и на олигодендроциты (P19–21) [Baltan, 2016].

Аксоны могут высвобождать глутамат Ca^{2+}-зависимым и -независимым образом [Butt et al., 2014 ; Micu et al., 2018]. Глутамат, вышедший из аксонов, активирует глутаматные рецепторы, расположенные на миелине, что дало начало идее аксомиелинового «синапса» по аналогии с классической синаптической передачей между нейронами [Micu et al., 2018]. Таким образом, деполяризация аксолеммы миелинизированного аксона во время распространения потенциала действия может приводить к выбросу глутамата путём изменения его транспорта и/или экзоцитоза, вызванного Ca^{2+}-зависимым высвобождением Ca^{2+} из аксоплазматического ретикулума [Fern et al., 2019]. Глутамат в периаксональном пространстве активирует AMPA- и NMDA-рецепторы миелиновой оболочки, которые привлекают переносчики глюкозы к мембране олигодендроцитов, увеличивая тем самым захват глюкозы, гликолиз и, в конце концов, образование пирувата и лактата данным типом клеток [Saab et al., 2016]. Пируват служит источником энергии для митохондрий в олигодендроцитах и миелине, в то время как лактат перемещается переносчиками монокарбоксилата к аксону в качестве энергетического субстрата для аэробного метаболизма для обеспечения потребности Na^{+}/K^{+}-АТФазы в молекулах АТФ [Saab et al., 2016]. Примечательно, что такой глутаматергический аксомиелиновый «синапс» может работать как переключатель питания для снабжения аксона энергией, требующейся для контролирования метаболического взаимодействия между олигодендроцитами и аксоном.

Передача сигнала в аксомиелиновом «синапсе» может иметь и патологические последствия в острых и хронических состояниях [Micu et al., 2018]. Так, дефицит глюкозы во время ишемии нарушает поставку лактата из олигодендроцитов к митохондриям в аксонах и, следовательно, вызывает снижение содержание аксонального АТФ, что может ухудшить функционирование ионных транспортёров, вызывая деполяризацию и переизбыток Ca^{2+} в цитозоле. Выброс глутамата может происходить также и из истощённых аксонов и, таким образом, вносить вклад в избыточную активацию рецепторов глутамата на обвёртывающем миелине и приводить к Ca^{2+}-зависимой активации протеаз, фосфолипаз и деиминаз, которые разрушают миелиновую оболочку с образованием липидного мусора и запуском адаптивного иммунного ответа. Недавние данные показали ишемический выброс глутамата из аксоплазматических везикул, приводящий к накоплению нейротрансмиттеров под миелином и во внеклеточном пространстве [Doyle et al., 2018]. Этот путь особенно важен при патогенной активации миелиновых NMDA-рецепторов и быстром повреждении миелина. Вместе эти результаты свидетельствуют, что передача между аксонами и миелином имеет много общих черт с классическими химическими синапсами, обнаруживаемыми в сером веществе. Важно, что эти контакты актуальны как для переноса энергетических метаболитов в качестве источников энергии для более электрически активных волокон, так и для патофизиологии аксонов и миелина [Fern et al., 2019].

Гибель олигодендроцитов, ассоциированная с рецепторами глутамата, обычно вызывается эксайтотоксичностью и очевидным образом вовлечена в ишемическое повреждение серого и белого вещества [Matute, 2011 ; Ransom et al., 2009]. Так, сверхактивация AMPA- и каинатных рецепторов вызывает гибель олигодендроцитов и первичное и/или вторичное разрушение миелина как следствие существенного поступления Ca^{2+}, который вызывает митохондриальную деполяризацию, усиленную продукцию активных форм кислорода и высвобождение проапоптотических факторов, которые, в свою очередь, активируют каспаза-зависимую и -независимую гибель олигодендроцитов [Sanchez-Gomez et al., 2011]. Олигодендроцитарная эксайтотоксичность подвержена влиянию нарушенного гомеостаза глутамата в период нейровоспаления, поскольку функционирование переносчиков глутамата изменяется в сторону увеличения внеклеточной концентрации данного нейротрансмиттера [Butt et al., 2014]. В свою очередь, избыточная активация интернодальных аксональных рецепторов глутамата может вызвать высвобождение существенного количества Ca^{2+} из аксоплазматического ретикулума и активировать Ca^{2+}-зависимые ферменты, которые в конце концов спровоцируют разрушение аксона [Stirling et al., 2010].

Олигодендроциты составляют большинство клеточной популяции во взрослом белом веществе, и повреждение белого вещества вызывает функциональную инвалидность при развитии цереброваскулярных заболеваний, включая гипоксия-ишемические повреждения при перивентрикулярной лейкомаляции у новорождённых, инсульт и остановку сердечной деятельности у взрослых и сосудистую деменцию у пожилых пациентов. Ишемический инсульт обычно приводит к падению трансмембранного ионного градиента и деполяризации мембраны, оканчиваясь в конечном счёте токсической перегрузкой кальцием. Итогом становится активация Ca^{2+}-зависимых ферментов (кальпаины, фосфолипазы и другие), приводящая к необратимому повреждению аксонов и глии в белом веществе [Hamner et al., 2011 ; Stys et al., 1992 ; Tsutsui et al., 2013].

Незрелые и менее зрелые олигодендроциты крайне чувствительны к кратковременной кислородной и глюкозной депривации [Fern et al., 2000]. Например, моделирование ишемии у молодых животных вызывает входящие токи в олигодендроцитах, которые отчасти опосредованы NMDA- и AMPA-/каинатными рецепторами [Káradóttir et al., 2005] и которые напрямую токсичны для клеточных отростков [Salter et al., 2005]. Кроме того, уровень Ca^{2+} поднимается при ишемии в самом миелине (этот эффект устраняется антагонистами NMDA-рецепторов широкого спектра), вызывая ультраструктурные повреждения миелиновой оболочки [Micu et al., 2006].

Взрослое белое вещество приобретает свойственную ему уязвимость к ишемии с возрастом, и механизмы опосредованного глутаматом повреждения меняются [Baltan et al., 2008]. В частности, ишемическое повреждение белого вещества у старых мышей в первую очередь опосредовано выбросом глутамата через обратный транспорт глутамата (вероятно, из астроцитов) и последующей активацией AMPA-/каинатных рецепторов глутамата [Baltan et al., 2008]. Весьма любопытен тот факт, что блокада NMDA-рецепторов ухудшает восстановление после ишемии у старых животных [Baltan et al., 2008].

Повреждение предшественников олигодендроцитов, вызванное отчасти глутаматом, вносит свой вклад в патогенез нарушения миелинизации при перивентрикулярной лейкомаляции [Back et al., 2004]. В незрелом мозге человека подверженность развивающихся олигодендроцитов к гипоксии-ишемии корреллирует с экспрессией ими рецепторов глутамата подтипа AMPA [Talos et al., 2006], а системное введение антагонистов AMPA-рецепторов смягчает повреждения на крысиной модели перивентрикулярной лейцомаляции [Follett et al., 2004]. Кроме того, развивающиеся олигодендроциты также экспрессируют NMDA-рецепторы, и их блокада мемантином снижает потерю олигодендроцитов и долговременное уменьшение толщины коры головного мозга, которое наблюдается в экспериментальной перивентрикулярной лейкомаляции [Manning et al., 2008].

Ишемическое повреждение аксонов также характерно для перивентрикулярной лейкомаляции, возникая локально и диффузно [Haynes et al., 2008]. Интересно, что экспериментальная ишемия в незрелых аксонах вызывает нарушение потенциала действия и локальное разрушение аксолеммы у небольших премиелинизированных аксонов в местах их контактов с олигодендроцитарными отростками, которые также разрушаются [Alix et al., 2009]. Повреждение аксонов предотвращается блокаторами NMDA- и AMPA-/каинатных рецепторов, давая основания предполагать, что опосредованное рецепторами глутамата повреждение отростков олигодендроцитов в месте их контакта с премиелинизированным аксоном предваряет повреждение этого аксона [Alix et al., 2009].

Многочисленные исследования, проведённые на клеточных и животных моделях рассеянного склероза, также, как и на постмортальных образцах пациентов, говорят, что эксайтотоксичность, опосредованная проницаемыми для Ca^{2+} рецепторами глутамата, вносит вклад в гибель олигодендроцитов, демиелинизацию и повреждение тканей при рассеянном склерозе [Matute et al., 2001 ; Srinivasan et al., 2005 ; Vallejo-Illarramendi et al., 2006]. В частности, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, мышиная модель заболевания, которая демонстрирует клинические и патологические особенности рассеянного склероза, облегчается антагонистами AMPA- и каинатных рецепторов [Pitt et al., 2000]. Напротив, блокада NMDA-рецепторов с помощью МК-801 не смягчала симптомов экспериментального аллергического энцефаломиелита [Matute, 2010]. Примечательно, что блокада этих рецепторов в комбинации с противовоспалительными препаратами является эффективной даже на поздней стадии неремиттирующего экспериментального аллергического энцефаломиелита, что оценивали по повышенной выживаемости олигодендроцитов и ремиелинизации и, соответственно, снижению паралича, воспаления, апоптоза и аксонального повреждения [Kanwar et al., 2004].

Глутамат играет важнейшую роль в заболеваниях белого вещества. Например, концентрация глутамата повышена как в границах очагов, так и в здоровом белом веществе у пациентов с рассеянным склерозом [Srinivasan et al., 2005 ; Werner et al., 2001]. В условиях истощения энергии смена направления работы переносчиков возбуждающих аминокислот может привести к выбросу глутамата, отягчая глутамат-индуцированную цитотоксичность через зависимый от кальция синтез NO и O_2^-, продукцию пероксинитрита и, в конце концов, апоптоз олигодендроцитов [Benarroch, 2009].

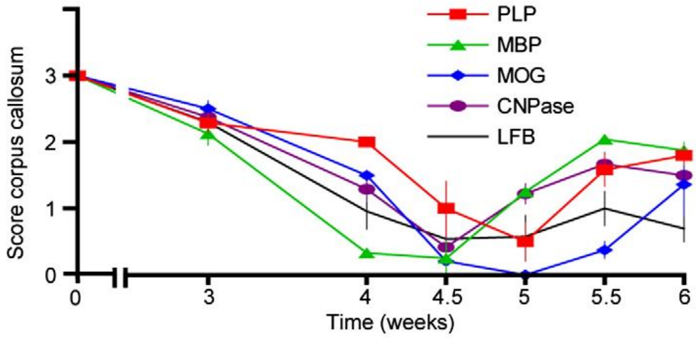
Уровень глутамата может быть повышен в мозге человека [Srinivasan et al., 2005] как следствие сниженной экспрессии переносчиков глутамата GLAST и GLT-1 [Pampliega et al., 2008 ; Vallejo-Illarramendi et al., 2006]. Другой механизм, объясняющий нарушения гомеостаза глутамата, – генетическая вариация в промоторе главного переносчика глутамата, GLT-1, которая приводит более низкой экспрессии транспортёра [Pampliega et al., 2008]. В свою очередь, повышение экспрессии xCT в линии моноцит-макрофаг-микроглия ассоциировано с активацией иммунитета как при рассеянном склерозе, так и в экспериментальном аллергическом энцефаломиелите [Pampliega et al., 2008]. Любопытен факт, что исследования с перфузионно-взвешенными изображениями продемонстрировали наличие обширной гипоперфузии в мозге пациентов с рассеянным склерозом, которая обнаруживается как в начале заболевания, так и в более поздних стадиях заболевания как следствие повышенного уровня мощного вазоспастического белка эндотелина-1 в мозговом кровотоке [D'Haeseleer et al., 2015]. Таким образом, церебральная гипоперфузия при рассеянном склерозе связана с хронической гипоксией/ишемией, которая может лежать в основе нарушения гомеостаза глутамата и эксайтотоксичности в этом заболевании [Fern et al., 2019].

В состояниях патологии в увеличенную эксайтотоксичность также вносит вклад активированная микроглия, секретирующая глутамат, пероксинитрит и TNFα (который, в свою очередь, ингибирует активность переносчиков возбуждающих аминокислот и активирует апоптоз) [Li et al., 2005 ; McTigue et al., 2008]. В исследованиях на мышах после моделирования ишемического инсульта наблюдалась инфильтрация B-лимфоцитов в мозг, вызывающая когнитивное ухудшение между 1-й и 7-й неделями [Doyle et al., 2015]. У пациентов, переживших ишемический инсульт в крови были обнаружены антитела к антигенам из мозга [Bornstein et al., 2001 ; Dambinova et al., 2003 ; Kalev-Zylinska et al., 2013 ; Shibata et al., 2012] и B-клетки в очаге инсульта в случае умственного снижения [Doyle et al., 2015]. В добавок к гуморальному ответу также возникает и клеточный ответ против антигенов мозга, и оба, по-видимому, предсказывают функциональный исход болезни [Becker et al., 2005, 2011 ; Shibata et al., 2012]. Среди различных изученных антител только титр анти-MBP антител в сыворотке крови значимо предсказывал когнитивные ухудшения [Shibata et al., 2012]. Кроме того, воспаление белого вещества наблюдается и в отдалённых от зоны инсульта участках [Weishaupt et al., 2016].

1.3.2 Повреждение олигодендроцитов и миелина при ишемии

Подобная чувствительность олигодендроцитов отчасти объясняет обилие патологических ситуаций, которые могут повлиять на олигодендроциты и привести к демиелинизации. На основании описанных механизмов уязвимости олигодендроцитов возможно предсказать, что олигодендроциты могут быть крайне чувствительны к ишемии. Ишемия ведёт к гипоксия-индуцированной клеточной смерти в головном мозге. Ишемия, возникающая в подкорковом белом веществе, представляет собой до 25 % всех подтипов ишемических инсультов [Bamford et al., 1991 ; Schneider et al., 2004], а встречаемость данного типа инсультов увеличивается с возрастом [Ay et al., 2005 ; Vernooij et al., 2007]. При этом набухание олигодендроцитов и вакуолизация возникает уже через 3 часа после окклюзии средней мозговой артерии, за чем в пределах 24 часов следует ретракция отростков и клеточная смерть [Baltan, 2014 ; McIver et al., 2010 ; Pantoni et al., 2006].

В условиях хронической тотальной гипоксии головного мозга у пациентов с сердечной недостаточностью с помощью методов МРТ было показано разрушение миелина, возникающее в мозолистом теле, поясной извилине, а также височной, теменной, затылочной и лобной областях [Kumar et al., 2011]. При этом в экспериментах с моделированием хронической гипоксии/ишемии на животных было показано значимое снижение числа GST-π позитивных олигодендроцитов в мозолистом теле ко 2-й неделе ишемии с постепенным восстановлением до контрольного уровня уже к 8-й неделе. Экспрессия MBP при этом оставалась снижена на протяжении всего эксперимента (до 12 недель) [Chida et al., 2011]. При моделировании же 10-минутной тотальной ишемии головного мозга демиелинизация начинает наблюдаться уже на 7-й день после операции, однако интенсивность окрашивания тканей LFB начинала постепенно восстанавливаться уже к 4-й неделе. Эта динамика снова не совпадала с изменениями основного белка миелина: содержание мРНК основного белка миелина последовательно снижалось на протяжении всего эксперимента (со 2-го по 28-й день), а концентрация самого белка была снижена лишь первые две недели, возвращаясь к контрольному уровню на 14-й день [Chen et al., 2013]. Такие несовпадения в динамике различных показателей говорят о том, что повреждение и, в дальнейшем, восстановление миелина после воздействия ишемии необходимо оценивать совместно с изменениями в олигодендроцитах. При этом для общей характеристики демиелинизации можно воспользоваться окрашиванием LFB, поскольку было показано, что изменение данного параметра является средним по отношению к изменениям прочих маркеров миелинизации (рисунок 2) [Gudi et al., 2009].



0 баллов отражают полную потерю миелина, 3 балла – нормальное содержание миелина

Рисунок 2 – Динамика экспрессии белков миелина PLP, MBP, MOG, CNP-азы и окрашивания LFB в мозолистом теле [Gudi et al., 2009]

При ближайшем рассмотрении патологии очагов инсульта белого вещества в постмортальных исследованиях обнаруживаются характерные признаки повреждения, включая разрушение белого вещества, активацию микроглии, астроглиоз, инфильтрацию миелоидных клеток и дегенерацию аксонов [Bailey et al., 2012 ; Wardlaw, 2008 ; Wardlaw et al., 2015]. Интересно, что изучение разрушения архитектуры миелина и аксонов в постмортальных образцах людей с инсультом белого вещества демонстрирует относительную сохранность аксонов в границах периинфарктной зоны, периферических регионах, окружающих ядро ишемии. При этом, по всей видимости, происходит специфичное разрушение миелина и перехватов Ранвье и ассоциированных с ними перинодальных участков в зоне до 150 % превышающей размер инфаркта [Marin et al., 2019]. В более отдалённых от инфаркта регионах миелин остаётся интактным, но перехваты и перинодальные участки заметно повреждены [Hinman et al., 2015].

Повреждение миелина вследствие воздействия ишемии также связано с ухудшением некоторых функций. В частности, было показано, что асимметрия миелиновой водной фракции (одного из методов визуализации миелина с помощью МРТ) в прецентральной извилине коррелирует с нарушениями двигательных функций, но не с двигательной активностью, верхней конечности у пациентов с ишемическим инсультом в хронической стадии [Feng et al., 2015 ; Lakhani et al., 2017]. При этом было показано, что постоянная потеря миелина наблюдается у пациентов с хроническим ишемическим инсультом и в контралатеральном полушарии [Borich et al., 2013 ; Dacosta-Aguayo et al., 2014]. При моделировании хронической тотальной ишемии у крыс наблюдалось ухудшение когнитивных функций при сохранении нейронной популяции и разрушении миелина [Chida et al., 2011].

1.4 Картирование миелина с помощью МРТ

1.4.1 Картирование T_1

T_1-взвешенные МРТ последовательности позволяют получить хороший контраст между белым и серым веществом (рисунок 3), что обеспечивается большим содержанием воды в сером веществе по сравнению с белым, и является главной причиной удлинения времени продольной релаксации T_1 [Dortch et al., 2013b]. При обсуждении механизмов контраста уже хорошо известный биохимический состав ткани мозга был условно поделён на метаболиты и макромолекулы. Однако пионерные работы [Koenig et al., 1990 ; Koenig, 1991 ; Kucharcyk et al., 1994] показали, что большое различие T_1 между серым и белым веществом может быть почти целиком объяснено большей концентрацией миелина в белом веществе. В дальнейшем было показано, что причиной различий являются не белки и фосфолипиды миелина, а часто встречающиеся в мембране липиды холестерол и цереброзид [Turner, 2015].

T_1 релаксация по определению является рассеянием энергии, которая была привнесена в спиновую систему радиочастотным возбуждающим импульсом. Эта энергия рассеивается через спаренные спины воды в «решётку» – большой тепловой резервуар, состоящий из сравнительно больших статичных или медленно движущихся молекул с широким спектром ядерного магнитного резонанса. В ткани мозга, особенно в белом веществе, «решётка» включает в себя в основном мембраны, большинство из которых состоят из миелина. Скорость, с которой спины релаксируют в этой «решётке», зависит от времени нахождения молекул воды на поверхности мембраны, во время которого они могут потерять намагниченность спина и, следовательно, энергию, и от эффективности взаимодействия молекулярного окружения на поверхности мембран [Ceckler et al., 1992]. В пользу этого говорит тот факт, что концы молекул холестерола и цереброзида, к которым имеют доступ молекулы воды, на поверхности мембран обеспечивают исключительно эффективные сайты для релаксации водных спинов. Неслучайно подобные сайты также обеспечивают превосходное взаимодействие и для обратного процесса переноса намагниченности от молекул мембраны к несвязанной воде [Turner, 2015].

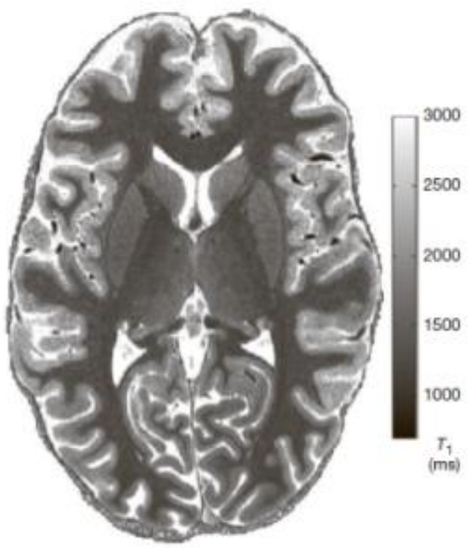


Рисунок 3 – T_1 карта нормального человеческого мозга, Институт когнитивистики и нейробиологии Общества Макса Планка, Лейпциг [Turner, 2015]

Не вся продольная (T_1) релаксация может быть легко объяснена таким образом. Парамагнитные контрастные агенты, такие как хлорид марганца и ферритин, теряют спиновую намагниченность через локальные изменяющиеся магнитные поля с частотными компонентами на уровне ларморовой частоты, которые обеспечиваются благодаря тепловым колебаниям. Там, где подобные вещества встречаются в норме в тканях мозга (например, ферритин в базальных ганглиях и корковом миелине [Fukunaga et al., 2010]), они всегда будут вносить свой вклад в T_1 релаксацию.

Недавняя работа C. Stüber с соавторами [Stüber et al., 2014], сравнивающая количественные МРТ T_1 и T_2* с протонно-лучевой микроскопией элементного состава одних и тех же постмортальных срезов мозга, показала, что T_1 сильно зависит от содержания миелина и весьма слабо – от содержания железа. Авторы использовали общую линейную модель, чтобы определить вклад миелина и железа в релаксационные свойства тканей. Данная стратегия, но без учёта достоверных данных о составе тканей, также была использована W. D. Rooney с соавторами [Rooney et al., 2007] и M. F. Callaghan с соавторами [Callaghan et al., 2015]. Вывод, который можно сделать из этих наблюдений – скорость релаксации R_1 ($R_1 = 1/T_1$) предоставляет весьма надёжные данные о содержании миелина, представленного в вокселе здоровой корковой ткани или белого вещества, и гораздо менее достоверную информацию в богатых железом глубоких структурах мозга, таких как скорлупа, красные ядра и чёрная субстанция [Turner, 2015].

Необходимо заметить, что, несмотря на запутанную номенклатуру, так называемые «T_2-взвешенные» изображения, получаемые с помощью последовательности турбо-спинового эха, в основном не являются T_2-взвешенными вовсе [Microstructural parcellation of the human cerebral cortex, 2013]. На самом деле превосходный контраст между белым и серым веществом, который они показывают, демонстрирует их взвешенность по скорости переноса намагниченности (magnetization transfer rate (MTR)), T_1 и протонной плотности PD. Изображения, использованные для корковой сегментации M. F. Glasser и D. C. Van Essen [Glasser et al., 2011], использующие соотношение между T_1-взвешенными и «T_2-взвешенными» изображениями, по большей части являются T_1-взвешенными и на самом деле определяют корковый миелин, о чём авторы и заявляют [Turner, 2015]. Кроме того, очевидно, что отношение сигналов не позволяет количественно оценить собственно уровень миелинизации. Ещё более важным обстоятельством является тот факт, что соотношение сигналов отражает релаксационные свойства ткани и, следовательно, очень сильно зависит от содержания железа.

1.4.2 Картирование миелиновой водной фракции MWF

В последние годы наибольшее внимание исследователей привлекает возможность оценки плотности миелина с использованием техники MTR и получения изображений миелиновой водной фракции (MWF). MTR использует феномен, открытый в 1989 году S. D. Wolff и R. S. Balaban [Wolff et al., 1989], при котором возбуждение протонов больших молекул в тканях вызывает более быструю релаксацию спинов протонов соседних свободных молекул воды. Поскольку этот процесс также зависит от связывания соответствующих макромолекул и свободных молекул воды, можно ожидать пространственное распределение, очень сходное с T_1. Высоко релаксирующие молекулы холестерола и цереброзида снова, по всей видимости, доминируют в этом процессе [Ceckler et al., 1992 ; Koenig, 1991]. Карты MTR [Dortch et al., 2013b] представляются практически идентичными картам R_1 [Weiskopf et al., 2013]. Одно важное отличие может возникать из-за нечувствительности MTR к присутствию парамагнитных контрастных агентов. Таким образом можно ожидать, что линейная зависимость между значениями R_1 и MTR будет нарушаться в регионах мозга, богатых железом. Оптимальное MTR картирование активно развивалось G. Helms, H. Dathe и P. Dechent [Helms et al., 2010], но соотношение сигнала к шуму, доступное в единицу времени, было неизменно ниже, чем получаемое с помощью методов картирования количественного T_1 [Marques et al., 2010].

Однако оба этих метода могут оказаться менее точными в плане оценки содержания миелина, чем третий – MWF [MacKay et al., 1994 ; Zhang et al., 2015]. Картирование миелиновой водной фракции использует T_2 релаксометрию, когда изображения спинового эха получаются в большом диапазоне времён эхо. Данные анализируются для выявления спектра значений T_2, легко разделяющихся на относительно узкие пики, которые могут быть идентифицированы как возникающие, соответственно, из относительно свободной внеклеточной и цитоплазматической воды и из воды, удерживаемой между слоями миелиновых оболочек. Отдельные объёмы этих компартментов могут быть вычислены достаточно точно, и можно быть практически уверенными, что водная фракция миелина совпадает с почти полным количеством миелина [Turner, 2015].

При этом, когда всеми этими методами получаются, а затем сравниваются карты, которые должны соответствовать плотности миелина, возникают проблемы. Карты MWF показывают более выраженную неоднородность белого вещества, чем карты T_1 или MTR. Гистограммы T_1 и MTR имеют очень острые пики значений, соответствующих белому веществу, с дисперсией порядка 20 %, а значения MWF могут систематически варьироваться в два раза от региона к региону [Zhang et al., 2015]. Очевидно, что эти методы измеряют различные компоненты миелина.

Для того, чтобы разрешить это расхождение, можно предположить, что MWF измеряет весь миелин в данном вокселе, в то время как T_1 и MTR карты замеряют только тот миелин, который находится в непосредственной близости от относительно свободной внутриклеточной жидкости, то есть миелин, прилежащий к полости аксона или окружающий внешний слой миелиновой оболочки. Уже существует свидетельство, что время обмена воды между компартментами белого вещества составляет больше 0,5 секунды [Kalantari et al., 2011]. Это намного дольше, чем предполагаемое время удержания молекул воды на мембранных оптимальных сайтах релаксирования (концевые группы холестерола и цереброзида). В данной модели, таким образом, процессы, приводящие в итоге к T_1 релаксации и переносу намагниченности, происходят только в поверхностных слоях миелина, внутренние же слои имеют недостаточно быстрый взаимообмен (что перенос спинов, что химический обмен) для взаимодействия со свободной водой. Если эта модель корректна, комбинирование результатов MWF и T_1/MTR картирований может предложить простую возможность для расчёта карт других компонентов миелина белого вещества, таких как среднее число оборотов или, возможно, средний диаметр аксонов [Turner, 2015].

Недостатком картирования MWF является длительность сканирования для сбора данных. Хотя недавно скорость данного метода была увеличена применением более эффективных методов сбора данных, таких как GRASE [Prasloski et al., 2012], требуемое время всё ещё более чем в два раза превышает время, необходимое для получения карт T_1 с эквивалентным пространственным разрешением. Также необходимо упомянуть, что быстрые методы сбора данных, такие как mcDESPOT, которые требуют многомерного подбора данных с предварительной оценкой нескольких переменных, обеспечивают нереалистичные значения MWF [Lankford et al., 2013 ; Zhang et al., 2015].

1.4.3 Диффузионно-тензорные изображения DTI

Ещё одна попытка разработать способ оценки содержания миелина была основана на использовании параметров диффузионной тензорной визуализации (DTI), таких как фракционная анизотропия и радиальная диффузия [Klawiter et al., 2011 ; Song et al., 2002]. Этот подход впоследствии был подвергнут критике, так как количественные параметры, основанные на диффузии, чувствительны к направлению, в связи с чем их невозможно использовать для оценки содержания миелина в областях, содержащих разнонаправленные волокна. Также необходимо принимать во внимание, что направленные свойства диффузии неизбежно зависят от факторов, не связанных с плотностью миелина, такими, как диаметр и число аксонов, а также проницаемость мембран. Данные других исследований [Mädler et al., 2008 ; Wheeler-Kingshott et al., 2009 ; Wu et al., 2011] также показывают спорность интерпретации DTI измерений в тканях мозга и невозможность их использования в качестве миелинового маркера. Кроме того, низкое пространственное разрешение DTI исключает использование этого метода для изучения коры головного мозга.

1.4.4 Картирование макромолекулярной протонной фракции MPF

В последнее десятилетие большой интерес как потенциальный маркер миелина привлекла макромолекулярная протонная фракция (macromolecular proton fraction, MPF), также известная как «связанная фракция» (bound pool fraction) или «ограниченная протонная фракция» (restricted proton fraction), поскольку несколько исследовательских групп обнаружили сильные корреляции между MPF и содержанием миелина в нервных тканях [Dula et al., 2010 ; Janve et al., 2013 ; Odrobina et al., 2005 ; Ou et al., 2009a, 2009b ; Rausch et al., 2009 ; Samsonov et al., 2012 ; Schmierer et al., 2007 ; Thiessen et al., 2013 ; Underhill et al., 2011]. Сильная положительная корреляция между MPF и миелином была продемонстрирована на различных моделях и объектах, на таких как демиелинизация периферического нерва *ex vivo* [Odrobina et al., 2005], посмертные исследования мозга при рассеянном склерозе [Schmierer et al., 2007], экспериментальный аллергический энцефаломиелит [Rausch et al., 2009], купризоновая [Thiessen et al., 2013] и липополисахаридная [Janve et al., 2013] модели рассеянного склероза, мутантные модели демиелинизации на мышах (shiverer mouse) [Ou et al., 2009a, 2009b] и собаках (shaking pup) [Samsonov et al., 2012], а также на нормальном спинном [Dula et al., 2010] и головном мозге [Underhill et al., 2011]. Согласно оценкам A. Samsonov с соавторами [Samsonov et al., 2012] миелин вносит, по меньшей мере, 75 % вклад в величину MPF в белом веществе. Группой V. L. Yarnykh продемонстрировано высокое разрешение (сопоставимое с гистологическим методом) визуализации миелина методом MPF в мозге здоровых крыс [Underhill et al., 2011]. Визуализация с помощью метода MPF обладает рядом преимуществ по сравнению с другими существующими на данный момент методами. В отличие от параметров диффузионной тензорной томографии (DTI) (фракционная анизотропия и радиальная диффузия), MPF нечувствителен к анизотропии и пространственной организации тканей мозга. В отличие от многокомпонентных методов релаксации, MPF нечувствителен к ошибкам, вызванными накоплением железа [Yarnykh et al., 2018].

Проблема в клиническом применении MPF связана с технической сложностью оценки этого параметра. Как параметр эффекта переноса намагниченности в двухкомпонентной системе [Morrison et al., 1995], MPF связан с другими параметрами этой модели. В сочетании с другими параметрами MPF может быть измерена с помощью ряда методов [Cercignani et al., 2005 ; Gloor et al., 2008, 2010 ; Gochberg et al., 2003, 2007 ; Helms et al., 2009 ; Ramani et al., 2002 ; Ropele et al., 2003 ; Sled et al., 2001 ; Soellinger et al., 2011 ; Yarnykh, 2002 ; Yarnykh et al., 2004]. Все эти методы используют медленный процесс многоточечного сбора данных и алгоритмы подгонки со многими параметрами для реконструкции параметрических карт. Такие способы оценки не пригодны для клинической практики из-за длительности процедуры, низкого разрешения, пространственного ограничения и низкого отношения сигнал/шум. В 2012-м году доктором V. L. Yarnykh был предложен принципиально новый способ одноточечного картирования MPF [Yarnykh, 2012], который преодолевает вышеуказанные ограничения: обладает приемлемым для клиники временем сканирования, высокой количественной точностью и высоким качеством изображения. Этот метод допускает измерение MPF независимо от других параметров двухкомпонентной модели и для реконструкции карты MPF требует только одно изображение с переносом намагниченности, референтное изображение и независимо полученную карту скорости продольной релаксации R_1. Таким образом, в настоящее время MPF видится самым надёжным методом прижизненной визуализации миелина. Последние разработки V. L. Yarnykh с соавторами позволяют проводить быстрое картирование всего мозга в доклинической и клинической практике. Тем не менее, метод визуализации MPF в своём нынешнем состоянии всё ещё имеет два ограничения. Одним из них является относительно низкое пространственное разрешение, обусловленное необходимостью поддержания клинически допустимого времени сканирования. Второе ограничение состоит в чувствительности к изменениям в содержании воды в тканях (эффект разбавления миелина), который может быть связан с отёком, воспалением или с изменениями в развивающемся мозге, напрямую не связанными с миелином [Yarnykh, 2012].

Таким образом, ишемия головного мозга является одним из самых разрушительных и социально значимых заболеваний. Существует много данных о механизмах повреждения нейронов и сопутствующих процессов. Несмотря на это, демиелинизация в условиях ишемии изучалась крайне мало, хотя и существуют некоторые данные о том, что олигодендроциты и миелин подвержены её влиянию не меньше, а порой и больше, чем нейроны. Существующие на сегодня стандартные техники МРТ позволяют оценивать разнообразные параметры, такие как перфузия в паренхиме головного мозга, развитие геморрагической трансформации или отёка, однако ни один из них не способен отразить содержание миелина в условиях ишемии головного мозга, что необходимо для наблюдения демиелинизации и реструктуризации белого вещества. Эти данные могут быть необходимы для разработки соответствующей терапии и программы восстановления после ишемического инсульта.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

В эксперименте с моделированием тотальной ишемии головного мозга использовались 37 самцов крыс линии Wistar в возрасте 8 недель и массой 250–300 грамм на момент начала эксперимента. Животные содержались в стандартных условиях вивария при световом режиме 12/12 (свет с 8:00 часов до 20:00 часов), температуре 22±2°С и влажности 60 %, со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось на базе лаборатории фармакологии кровообращения НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга СО РАН (г. Томск) и лаборатории нейробиологии НИИ биологии и биофизики ТГУ (г. Томск).

В эксперименте с моделированием локальной ишемии головного мозга использовался 41 самец крыс линии Sprague-Dawley в возрасте 8 недель и массой 250–270 грамм. Животные содержались в условиях SPF-вивария в индивидуальных вентилируемых клетках при световом режиме 10/14 (свет с 6:00 часов до 16:00 часов), температуре 23±1°С и влажности 40–50 %, со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось на базе SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и лаборатории нейробиологии НИИ биологии и биофизики ТГУ (г. Томск).

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., 2017].

2.2 Моделирование ишемии головного мозга

2.2.1 Моделирование тотальной ишемии

Моделирование тотальной ишемии головного мозга осуществлялось методом 3-сосудистой окклюзии [Atochin et al., 2017]. Под общим наркозом (хлоралгидрат, 450 мг/кг внутрибрюшинно) выделялись и единовременно накладывались лигатуры на три магистральных сосуда, снабжающих кровью головной мозг: левая общая сонная артерия, левая подключичная артерия, правый плечеголовной ствол. Во время окклюзии животные были подключены к аппарату искусственной вентиляции лёгких, температура тела поддерживалась на уровне 37±0,5°С. Окклюзия длилась 7 минут, после чего кровоток восстанавливали. Время окклюзии было подобрано в соответствии с проведёнными ранее исследованиями [Atochin et al., 2017]. Животные из контрольной группы подвергались тем же манипуляциям за исключением окклюзии сосудов.

После моделирования тотальной ишемии головного мозга животных случайным образом делили на группы в соответствии с временными точками: 10 и 30 суток после ишемии. В качестве контрольной группы выступали ложнооперированные животные, которые подвергались всем тем же манипуляциям, что и экспериментальная группа, за исключением лигатирования сосудов. Среди контрольных животных были выделены аналогичные группы.

Моделирование тотальной ишемии головного мозга вне зависимости от выбираемой модели приводит к наиболее выраженным изменениям в гиппокампе, в первую очередь в полях СА1–СА3 [Ходанович и др., 2016а, 2019 ; Atochin et al., 2017 ; Chernysheva et al., 2014 ; Raval et al., 2009].

2.2.2 Моделирование локальной ишемии

Моделирование локальной ишемии головного мозга осуществлялось методом внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion, MCAO) в модификации E. Z. Longa с соавторами [Longa et al., 1989], который является наиболее широко используемым методом моделирования ишемического инсульта. Под общим газовым наркозом (изофлуран в кислороде, 4 % для введения в наркоз, 1,5–2 % для поддержания, 0,5 л/мин) при перевязанной левой общей сонной артерии через надрез на левой внешней сонной артерии в левую внутреннюю сонную артерию вводился монофиламент (4037910, Doccol, USA), который, дойдя до ответвления от Виллизиева круга средней мозговой артерии, перекрывал в ней кровоток. Ишемический эпизод длился 60 минут, в течение которых животное находилось на подогреваемом столике для поддержания температуры тела на оптимальном уровне 37±0,5°C. По истечении 60 минут филамент извлекался, в течение последующих 15 минут поступление крови в среднюю мозговую артерию осуществлялся через Виллизиев круг (частичная реперфузия), после чего снималась лигатура с общей сонной артерии, и реперфузия считалась полной. Ложнооперированные животные из контрольной группы подвергались тем же манипуляциям за исключением введения филамента в сосуд.

После моделирования локальной ишемии головного мозга животных случайным образом делили на группы в соответствии с временными точками: 1, 3, 10 и 30 суток. Все контрольные животные относились к группе 3 или 30 суток.

Основными структурами, подверженными воздействию локальной ишемии, вызванной путём окклюзии средней мозговой артерии, являются стриатум и кора. Возможно развитие очага как в обеих этих структурах, так и только в одной из них [Khodanovich et al., 2015 ; Mitchell et al., 2016].

2.3 Методы прижизненной оценки состояния животных

2.3.1 Оценка выживаемости

Для оценки степени тяжести повреждения головного мозга при ишемии главным показателем являлась выживаемость животных на различных временных точках после осуществления моделирования. Выживаемость оценивали по временным точкам: 10 и 30 суток после моделирования ишемии для обеих моделей, а также 1-е и 3-и сутки после операции для модели локальной ишемии.

2.3.2 Оценка неврологического дефицита

На 10-е и 30-е сутки после моделирования тотальной ишемии головного мозга или ложной операции всем животным проводили оценку неврологического статуса. Для оценки неврологического статуса использовали стандартную шкалу McGraw, приведённую в таблице 1.

Для оценки состояния животного после моделирования локальной ишемии головного мозга использовалась стандартная шкала тяжести неврологического повреждения, разработанная E. Z. Longa с соавторами [Longa et al., 1989] и представленная таблице 2. В данном тесте баллы не суммируются, а начисляются в соответствии с самым тяжёлым проявлением повреждения головного мозга.

2.3.3 Магнитно-резонансная томография

При моделировании локальной ишемии головного мозга проводилось сканирование на МР-томографе для мелких животных Bruker BioSpec 117/16USR с напряжённостью магнитного поля 11.7 T (Bruker Biospin, Germany) под газовой изофлурановой анестезией (1,5–2% изофлуран в кислороде). Сканирование осуществлялось до проведения операции для исключения уже имеющихся патологий головного мозга, сразу после моделирования ишемии для подтверждения успешности операции и в последний день эксперимента, а также на всех временных точках (1-й, 3-й, 10-й и 30-й дни) для животных из групп 30 суток.

Таблица 1 – Оценка неврологического статуса, McGraw Stroke Index

<table>
<tr><th>Показатель</th><th>Возможные значения</th></tr>
<tr><td>Спонтанная двигательная активность</td><td rowspan="14">0 – норма
1 – слабые отклонения от нормы
2 – сильные отклонения от нормы

Баллы ставятся для каждого показателя отдельно.</td></tr>
<tr><td>Расстройства походки</td></tr>
<tr><td>Рефлекс отдёргивания хвоста</td></tr>
<tr><td>Рефлекс отдёргивания задней левой лапы</td></tr>
<tr><td>Рефлекс отдёргивания задней правой лапы</td></tr>
<tr><td>Рефлекс отдёргивания передней левой лапы</td></tr>
<tr><td>Рефлекс отдёргивания передней правой лапы</td></tr>
<tr><td>Реакция на звук</td></tr>
<tr><td>Тремор</td></tr>
<tr><td>Подёргивание</td></tr>
<tr><td>Судороги</td></tr>
<tr><td>Тонус мышц конечностей</td></tr>
<tr><td>Тонус мышц туловища</td></tr>
<tr><td>Птоз</td></tr>
<tr><td>Степень неврологического дефицита (вычисляется как сумма всех оценок):</td><td>< 2 баллов - лёгкая
3-5 баллов – средняя
> 6 баллов - тяжёлая</td></tr>
</table>

Таблица 2 – Шкала тяжести неврологического повреждения (NSS по E. Z. Longa [Longa et al., 1989])

Показатель	Баллы
Отсутствие неврологического дефицита.	0
Неспособность полностью вытянуть переднюю правую лапу (при левосторонней MCAO). Это говорит о лёгком локальном неврологическом дефиците.	1
Закручивание направо (при левосторонней MCAO). Это говорит об умеренном локальном неврологическом дефиците.	2
Заваливание на правый бок (при левосторонней MCAO). Это говорит о серьёзном локальном неврологическом дефиците.	3
Отсутствие спонтанной двигательной активности и «снижающийся уровень осознанности».	4
Смерть от ишемии головного мозга.	5

Протокол сканирования включал кросс-релаксационную томографию, диффузионно-взвешенную томографию, T_1- и T_2-взвешенные изображения. Для картирования MPF использовались следующие импульсные последовательности:

1. MT-взвешенная последовательность: TR = 25 мс, TE = 2,6 мс, угол поворота 9°, для насыщения макромолекулярных протонов используется внерезонансный радиочастотный импульс гауссовой формы с длительностью 10 мс, отстройкой частоты 5 кГц и номинальным углом поворота 900°.

2. T_1-взвешенная последовательность: TR = 16 мс, TE = 2,6 мс, угол поворота 16°.

3. PD-взвешенная последовательность: TR = 16 мс, TE = 2,6 мс, угол поворота 3°.

4. FieldMap последовательность для картирования поля B_0 (метод двойного эха) [Skinner et al., 1997]: TR = 16 мс, TE_1 = 2,4 мс, TE_2 = 4,1 мс, угол поворота 7º.

5. AFI последовательность для картирования поля B_1 (метод двойного TR) [Yarnykh, 2007]: TR_1 = 12 мс, TR_2 = 60 мс, TE = 3,6 мс, угол поворота 60°, инкремент угла сдвига фазы 39°.

Трёхмерные карты MPF были реконструированы с использованием одноточечного алгоритма с синтетическим референтным изображением [Naumova et al., 2017 ; Yarnykh, 2016]. Данный метод основан на трёх первоначальных изображениях (MT-, T_1- и PD-взвешенные изображения) с коррекцией неоднородностей B_0 [Skinner et al., 1997] и B_1 [Yarnykh, 2007] полей [Yarnykh, 2012] с рассчитанным синтетическим референтным изображением для нормализации данных [Naumova et al., 2017 ; Yarnykh, 2016].

Трёхмерные карты MPF целого мозга получены с пространственным разрешением 200×200×400 мкм^3 и общим временем сканирования 35 минут с использованием протокола, описанного ранее [Khodanovich et al., 2017 ; Naumova et al., 2017].

T_1-взвешенные и PD-взвешенные изображения были получены с помощью вышеописанных последовательностей, которые также были использованы для реконструкции T_1 и PD карт в соответствии с методом переменного угла поворота с коррекцией поля B_1 [Yarnykh, 2007].

T_2 карты были получены с использованием последовательности множественное спин-эхо (multiple spin-echo, MSME) последовательности с TR = 3000 мс, 16 эхо с TE в диапазоне 10–160 мс, толщина среза 0,8 мм, разрешение в плоскости 200×200 мкм^2, время сканирования 6 мин 50 с.

Для картирования ADC была использована диффузионно-взвешенная эхопланарная последовательность с со следующими параметрами: TR = 1500 мс, TE = 15,4 мс, три действительных значения b = 4,5, 484,2 и 946,5 с/мм^2, время сканирования 6 мин 40 с.

T_2 и ADC карты были реконструированы с помощью одноэкспоненциальных моделей с тремя параметрами с уровнем шума в качестве улучшаемого параметра с использованием стандартного программного обеспечения МР-томографа. Все параметрические карты были получены во фронтальной проекции.

2.4 Выведение из эксперимента, фиксация тканей, пробоподготовка

В обеих сериях выведение животных из эксперимента осуществлялось путём транскардиальной перфузии под эфирным наркозом. Первым этапом по большому кругу кровообращения инфузировали PBS (из расчёта 1 мл на 1 г массы тела животного), вторым – 4 % параформальдегид для быстрой фиксации тканей. Мозг извлекали, сутки фиксировали в 4 % параформальдегиде при +4°C, затем проводили криопротекцию в 10 % и 20 % сахарозе последовательно при +4°C, после чего замораживали в парах жидкого азота и хранился при температуре -80°C.

Для гистологического и иммуногистохимического окрашивания изготавливали криосрезы мозга (Microm HM525, Thermo Fisher Scientific, Germany) толщиной 10 мкм от -2,64 мм до -3,60 мм от линии брегма при тотальной ишемии головного мозга и от -1,92 мм до +1,74 мм от линии брегма [Paxinos et al., 2009] при локальной ишемии головного мозга в соответствии с локализацией наибольшего повреждения тканей, определённого по МРТ-картам. Срезы помещали на предметные стёкла с поли-L-лизиновым адгезивным покрытием и хранили до окрашивания при -20°C.

2.5 Окрашивание срезов мозга

2.5.1 Окрашивание срезов мозга для детекции миелина

2.5.1.1 Окрашивание на липиды миелина люксолевым быстрым синим LFB

Одним из маркеров демиелинизации является снижение интенсивности окрашивания липидов на срезах мозга люксолем быстрым синим (luxol fast blue, LFB) [Gudi et al., 2009].

Протокол окрашивания криосрезов мозга на липиды с помощью LFB включал следующие этапы:

1. Поместить препараты в 0,01 % раствор люксолевого быстрого синего на 2 часа при температуре 56–60 ºС градусов (в термостате).

2. Промыть препараты последовательно в 96 % и 70 % спирте по 1 минуте в каждом.

3. Промыть в 2 порциях дистиллированной воды – по 3 минуты в каждой.

4. Поместить препараты в 0,05 % водный раствор углекислого лития на 6–7 минут.

5. Промыть в дистиллированной воде – 5 минут.

6. 70 % спирт – 5 минут.

7. 96 % спирт – 5 минут.

8. Три порции ксилола, по 3 минуты в каждом.

9. Заключить в бальзам.

Общее время: 2 часа 40 минут – 3 часа.

Цель использования реактивов при окрашивании:

- Люксоль быстрый синий – окрашивание миелиновых волокон;
- 96 % этиловый спирт – удаление избытка красителя;
- 70 % этиловый спирт – отмывка «неспецифики»;
- Li_2CO_3 – отмывка «неспецифики»;
- Дистиллированная вода – отмывка;
- 70 %, 96 % этиловые спирты, ксилол – обезвоживание.

2.5.1.2 Окрашивание к основному белку миелина MBP

Другим способом детектировать разрушение миелина является иммуногистохимическое окрашивание криосрезов мозга к основному белку миелина (myelin basic protein, MBP). Протокол окрашивания включал в себя следующие этапы:

День 1

1. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

2. Инкубация препаратов с блокирующим буфером (из расчёта на 1 мл PBS: Triton X100 – 5 мкл, NaN_3 – 0,2–0,3 мкг, нормальная ослиная сыворотка – 1,5 мг, бычий сывороточный альбумин – 0,05 г) при комнатной температуре под парафиновой плёнкой – 1 час.

3. 100 мкл раствора первичных антител (1 мкл козлиных анти-MBP антител (sc-13914, Santa Cruz Biotechnology, USA) в 500 мкл блокирующего буфера) нанести на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать во влажной камере при температуре +4°C – ночь.

День 2

4. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

5. 100 мкл раствора вторичных антител (1 мкл ослиных анти-козлиных антител, конъюгированных с флуорохромом AlexaFluor 594 (715-585-150; 1:500;

Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA), в 500 мкл блокирующего буфера) нанести на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать при комнатной температуре в темноте – 3 часа.

6. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

7. Нанести среду VECTASHIELD (Vector Laboratories, USA) с DAPI (40,6-диамидино-2-фенилиндол) для мечения ядер и накрыть покровным стеклом.

2.5.2 Окрашивание срезов мозга для детекции зрелых нейронов

Для оценки потери зрелых нейронов при ишемии использовали иммуногистохимическое окрашивание криосрезов мозга на маркер зрелых нейронов NeuN. Протокол окрашивания включал в себя следующие этапы:

День 1

1. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

2. Инкубация препаратов с блокирующим буфером (из расчёта на 1 мл PBS: Triton X100 – 5 мкл, NaN_3 – 0,2–0,3 мкг, нормальная ослиная сыворотка – 1,5 мг, бычий сывороточный альбумин – 0,05 г) при комнатной температуре под парафиновой плёнкой – 1 час.

3. 100 мкл раствора первичных антител (1 мкл кроличьих анти-NeuN антител (ABN78; Merck Millipore, USA) в 500 мкл блокирующего буфера) нанести на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать во влажной камере при температуре +4ºC – ночь.

День 2

4. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

5. 100 мкл раствора вторичных антител (1 мкл ослиных анти-кроличьих антител, конъюгированных с флуорохромом AlexaFluor 488 (711-545-152; Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA), в 500 мкл блокирующего буфера) нанести

на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать при комнатной температуре в темноте – 3 часа.

6. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

7. Нанести среду VECTASHIELD (Vector Laboratories, USA) с DAPI (40,6-диамидино-2-фенилиндол) для мечения ядер и накрыть покровным стеклом.

2.5.3 Окрашивание срезов мозга для детекции воспаления

Для оценки воспаления мозга, опосредованного активированной микроглией, использовали иммуногистохимическое окрашивание криосрезов мозга на маркер микроглии Iba1 – ионизированную кальций-связывающую молекулу 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1). Протокол окрашивания включал в себя следующие этапы:

День 1

1. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

2. Инкубация препаратов с блокирующим буфером (из расчёта на 1 мл PBS: Triton X100 – 5 мкл, NaN_3 – 0,2–0,3 мкг, нормальная ослиная сыворотка – 1,5 мг, бычий сывороточный альбумин – 0,05 г) при комнатной температуре под парафиновой плёнкой – 1 час.

3. 100 мкл раствора первичных антител (1 мкл кроличьих анти-Iba1 антител (019-19741; Wako Pure Chemical Industries, Japan) нанести на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать во влажной камере при температуре +4ºС – ночь.

День 2

4. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

5. 100 мкл раствора вторичных антител (1 мкл ослиных анти-кроличьих антител, конъюгированных с флуорохромом AlexaFluor 488 (711-545-152; Jackson

ImmunoResearch Laboratories, USA) нанести на препарат, накрыть парафиновой плёнкой и инкубировать при комнатной температуре в темноте – 3 часа.

6. Последовательная инкубация препаратов в трёх растворах PBS при комнатной температуре – по 5 минут в каждом.

7. Нанести среду VECTASHIELD (Vector Laboratories, USA) с DAPI (40,6-диамидино-2-фенилиндол) для мечения ядер и накрыть покровным стеклом.

2.6 Обработка изображений

Фотографии целых срезов мозга и очагов ишемического повреждения (в случае локальной ишемии) и гиппокампов (в случае тотальной ишемии) получали с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany) с модулем MozaiX и программным обеспечением AxioVision 4.8. Срезы, окрашенные LFB, фотографировали на проходящем свете. Для всех флуоресцентных фотографий были установлены идентичные параметры фотографирования (вольтаж лампы микроскопа и время экспозиция). Увеличенные изображения срезов, окрашенных к белкам MBP, NeuN и Iba1, были получены на лазерном конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Germany) с увеличением ×200.

2.6.1 Оценка содержания миелина в срезах мозга

2.6.1.1 Оценка содержания миелина по оптической плотности LFB

Для оценки содержания миелина в зоне локальной ишемии на фотографиях срезов, окрашенных LFB, вручную помещали круглые регионы интереса в очаг и в симметричную область контралатерального полушария (рисунок 4А). Локализацию очага инсульта на гистологических срезах определяли по картам МРТ (в первую очередь по картам MPF и T_2), а также корректировали в соответствии с качеством среза и зоной нетипичного окрашивания LFB.

Оценку содержания миелина проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Для статистической обработки данных использовали показатель оптической плотности (optical density, OD) LFB. Он был рассчитан из интенсивности красного канала на RGB изображениях с коррекцией фоновой интенсивности [Khodanovich et al., 2017 ; Underhill et al., 2011] по формуле:

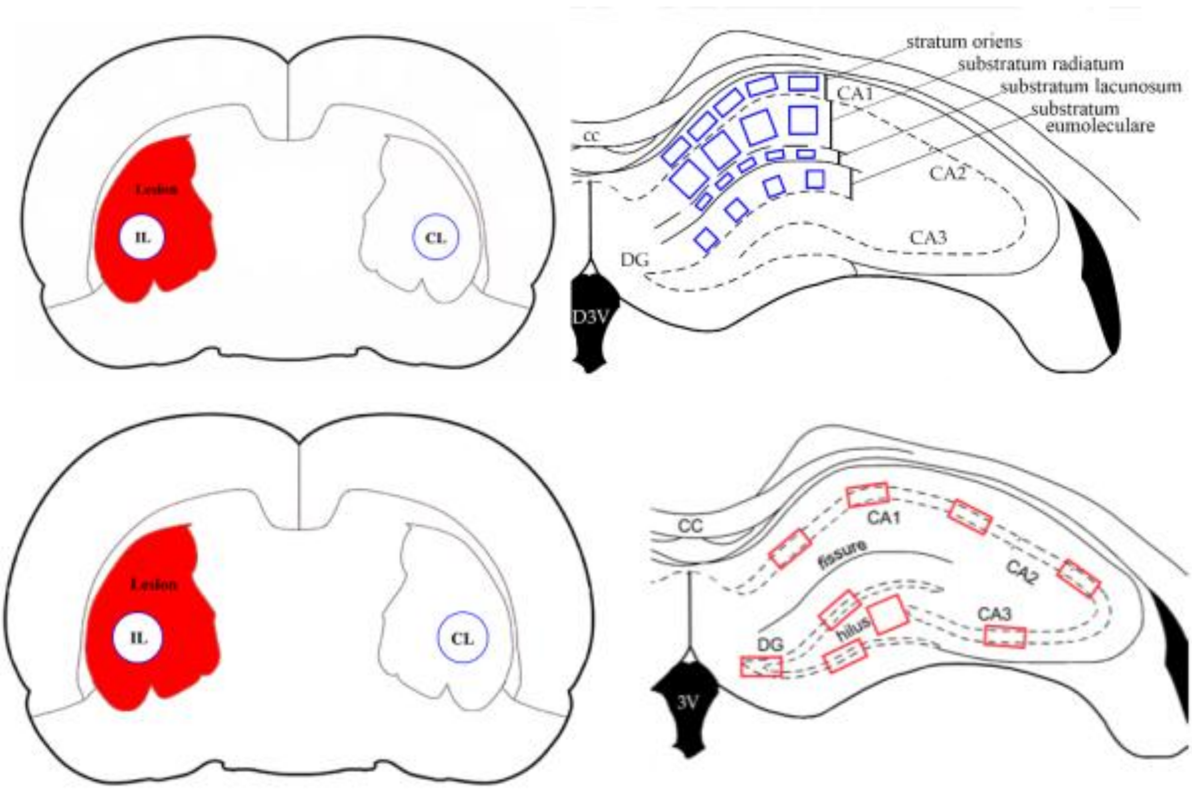
$$\boldsymbol{LFB\ OD} = \left(\mathbf{1} - \frac{\boldsymbol{Mean}}{\boldsymbol{Background}}\right) \times \mathbf{100\%} \qquad (1)$$

где *Mean* - среднее значение интенсивности данного региона интереса,

Background - среднее значение интенсивности фоновых регионов интереса.

А

Б



А – Схема расположения регионов интереса для оценки миелинизации при локальной (слева, целый срез мозга) и тотальной (справа, гиппокамп) ишемии. Б – Схема расположения регионов интереса для подсчёта NeuN+ и Iba1+ при локальной (слева, целый срез мозга) и тотальной (справа, гиппокамп) ишемии. IL – ипсилатеральное полушарие, CL – контралатеральное полушарие, Lesion – очаг локальной ишемии, CC – мозолистое тело, DG – зубчатая извилина

Рисунок 4 – Схемы расстановки регионов интереса для проведения различных типов анализа (обработка МРТ карт, фотографий гистологических и иммуногистохимических срезов)

2.6.1.2 Оценка содержания миелина по проценту MBP-позитивной площади

При изучении демиелинизации головного мозга по микрофотографиям срезов, окрашенных антителами к MBP, использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Плотность расположения миелиновых волокон оценивали с помощью порогового метода Отсу, определяя процент площади региона интереса, занятой окрашенными волокнами. На микрофотографиях гиппокампов срезов мозга животных после моделирования тотальной ишемии регионы интереса размещали в границах 4 слоёв гиппокампа на уровне поля CA1: stratum oriens, substratum radiatum, substratum lacunosum и substratum eumoleculare. На микрофотографиях срезов мозга животных с локальной ишемией регионы интереса размещались в центре очага и в симметричной зоне контралатерального полушария (рисунок 4А).

2.6.2 Оценка степени гибели нейронов и воспаления в срезах мозга

Подсчёт NeuN+ и Iba1+ клеток проводили с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Для количественной оценки тяжести поражения при тотальной ишемии проводился визуальный подсчёт NeuN+ клеток в DG, хилусе, CA1, CA2, и CA3 полях гиппокампа по схеме, представленной на рисунке 4Б. Для оценки микроглиальной активации в условиях тотальной ишемии подсчитывали Iba1+ клетки в поле CA1 в соответствии с той же схемой. Клетки подсчитывали в регионах интереса стандартного размера (200×200 мкм^2 для хилуса, 100×200 мкм^2 для других регионов) и затем нормализовали на зону размером 100×100 мкм^2. Для каждого животного было проанализировано от 5 до 20 срезов левого и правого полушарий в зависимости от общего числа клеток и размеров структуры.

В связи с особенностями локальной ишемии количество NeuN+ и Iba1+ клеток подсчитывалось в зоне ишемического инсульта и в симметричном регионе контралатерального полушария с помощью круглых регионов интереса стандартного размера (рисунок 4Б). Размер региона интереса подбирался в соответствии с наименьшей зоной поражения, обнаруживаемой на срезе. Для контрольных животных регионы интереса размещали примерно в центре стриатума. Количество нейронов определяли подсчётом NeuN+ клеток, колокализованных с DAPI, в пределах регионов интереса и затем нормализованных на площадь 1 мм^2. Активацию микроглии оценивали подобным образом по Iba1+ окрашиванию, учитывая количество клеток, их размер и форму.

2.6.3 Обработка карт магнитно-резонансных параметров

Для определения пост-ишемических изменений в тканях мозга, отражённых на картах МРТ, использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). В центре ядра очага инсульта на картах MPF, PD, T_1, T_2, ADC помещали круглый регион интереса стандартного размера (рисунок 4). Размер региона интереса подбирался в соответствии с наименьшей зоной поражения, обнаруживаемой на срезе. Зона очага определялась как участок гипоинтенсивности на MPF картах и зона гиперинтенсивности на T_2 картах. Для статистической обработки данных получали средние значения параметров в границах регионов интереса. Расположение данных регионов соответствовало регионам интересов на гистологических срезах.

2.7 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 использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для всех регионов гиппокампа определяли средние значения и стандартные ошибки среднего каждого типа клеток в пересчёте на 100×100 мкм^2. Количество клеток между группами контрольных животных и животных с тотальной ишемией сравнивали двумерным факторным дисперсионным анализом (факторы «группа» и «дни»), после чего применяли ретроспективный анализ с поправкой Фишера.

При моделировании локальной ишемии различия между ишемическим очагом в левом полушарии и соответствующей зоной в контралатеральном полушарии были оценены с помощью парного t-теста. В измеренных МРТ, гистологических и иммуногистохимических параметрах были определены процентные изменения (percentage changes, PC) по формуле:

$$\boldsymbol{PC} = \frac{(\boldsymbol{CL}-\boldsymbol{IL})}{\boldsymbol{CL}} \times \mathbf{100\%} \quad (2)$$

где *CL* – значение параметра в регионе интереса контралатерального полушария,

IL – значение параметра в регионе интереса ипсилатерального полушария.

Для оценки взаимосвязей между демиелинизацией и другими иммуногистохимическими и томографическими параметрами процентные изменения в LFB OD сравнивали с процентными изменениями этих параметров в серии дисперсионных анализов с повторными измерениями. Модель включала фактор группы (1-, 3-, 10-дневные группы), фактор повторных измерений (LFB OD либо любой другой измеренный параметр) и их взаимодействие с последующими post-hoc попарными анализами LSD Fisher. Для множественных сравнений использовалась коррекция Greenhouse-Gesser. Взаимосвязь между томографическими и гистологическими переменными была оценена 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 процентных изменений LFB OD.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Выживаемость и неврологический дефицит

3.1.1 Выживаемость и неврологический дефицит при тотальной ишемии головного мозга

Выживаемость и результаты исследования неврологического статуса после операции приведены в таблице 3. На 10-й день после операции выжило только 11 крыс из 27 с моделированием тотальной ишемии головного мозга (40,7 %). На 30-й день после операции количество выживших снизилось до 37 %. Наибольшая смертность наблюдалась в течение первого часа после моделирования тотальной ишемии головного мозга, а выжившие животные демонстрировали серьёзный неврологический дефицит с такими проявлениями, как отсутствие рефлексов, спастический паралич и тоническое напряжения мышц туловища. Серьёзный неврологический дефицит продолжался вплоть до 10-го дня после тотальной ишемии головного мозга. На 30-й день неврологический дефицит у животных в ишемической группе немного снизился, но не значимо по сравнению с временной точкой 10 суток. У ложнооперированных животных наблюдалась 100 % выживаемость после операции и отсутствовали какие-либо нарушения функций ЦНС [Khodanovich et al., 2018a].

Таблица 3 – Выживаемость животных и неврологический статус (по McGrow Stroke Index) [Khodanovich et al., 2018a]

Группа	N	Выживаемость (%)		Неврологический статус	
		10 дней	30 дней	10 дней	30 дней
Контроль	10	100	100	0	0
Тотальная ишемия	27	40,7	37,0	5,0 (2–9) **	4 (1–5) **

Примечание: N – общее количество прооперированных животных. Неврологический статус представлен как медиана (минимальное значение – максимальное значение). Уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой: ** – $p < 0{,}01$

3.1.2 Выживаемость и неврологический дефицит при моделировании локальной ишемии

Выживаемость и результаты исследования неврологического дефицита по методу E. Z. Longa с соавторами [Longa et al., 1989] приведены в таблице 4. Через 1 день после моделирования локальной ишемии из 31 прооперированного животного умерло 8, к 3-м суткам осталась 21 крыса, после чего гибели, вызванной локальной ишемией головного мозга, не наблюдалось. Все животные с моделированием локальной ишемии демонстрировали лёгкий и средний неврологический дефицит, характеризующийся асимметрией в использовании передних конечностей, закручивание при ходьбе в одну сторону и птоз. В течение 10 суток неврологический дефицит значимо не улучшался, к 30-м суткам происходило практически полное восстановление функций. Проведение ложной операции не вызывало гибели животных и неврологического дефицита.

Таким образом, моделирование тотальной ишемии вызывает более выраженные повреждения головного мозга с меньшей выживаемостью по сравнению с моделью локальной ишемии. Особенностью неврологического дефицита при локальной ишемии является асимметрия в проявлении симптоматики, связанная с повреждением только одного полушария.

Таблица 4 – Выживаемость животных и неврологический дефицит (Neurological Severity Score по E. Z. Longa [Longa et al., 1989])

Группа	**N**	**Выживаемость (%)**				**Неврологический дефицит**			
		1 день	**3 дня**	**10 дней**	**30 дней**	**1 день**	**3 дня**	**10 дней**	**30 дней**
Контроль	10	100	100	100	100	0	0	0	0
Локальная ишемия	31	74,2	67,7	67,7	67,7	2 (1-3)***	2 (0-2)*	2 (0-2)**	0,5 (0-1)

Примечание: N – общее количество прооперированных животных. Неврологический дефицит представлен как медиана (минимальное значение – максимальное значение). Уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$

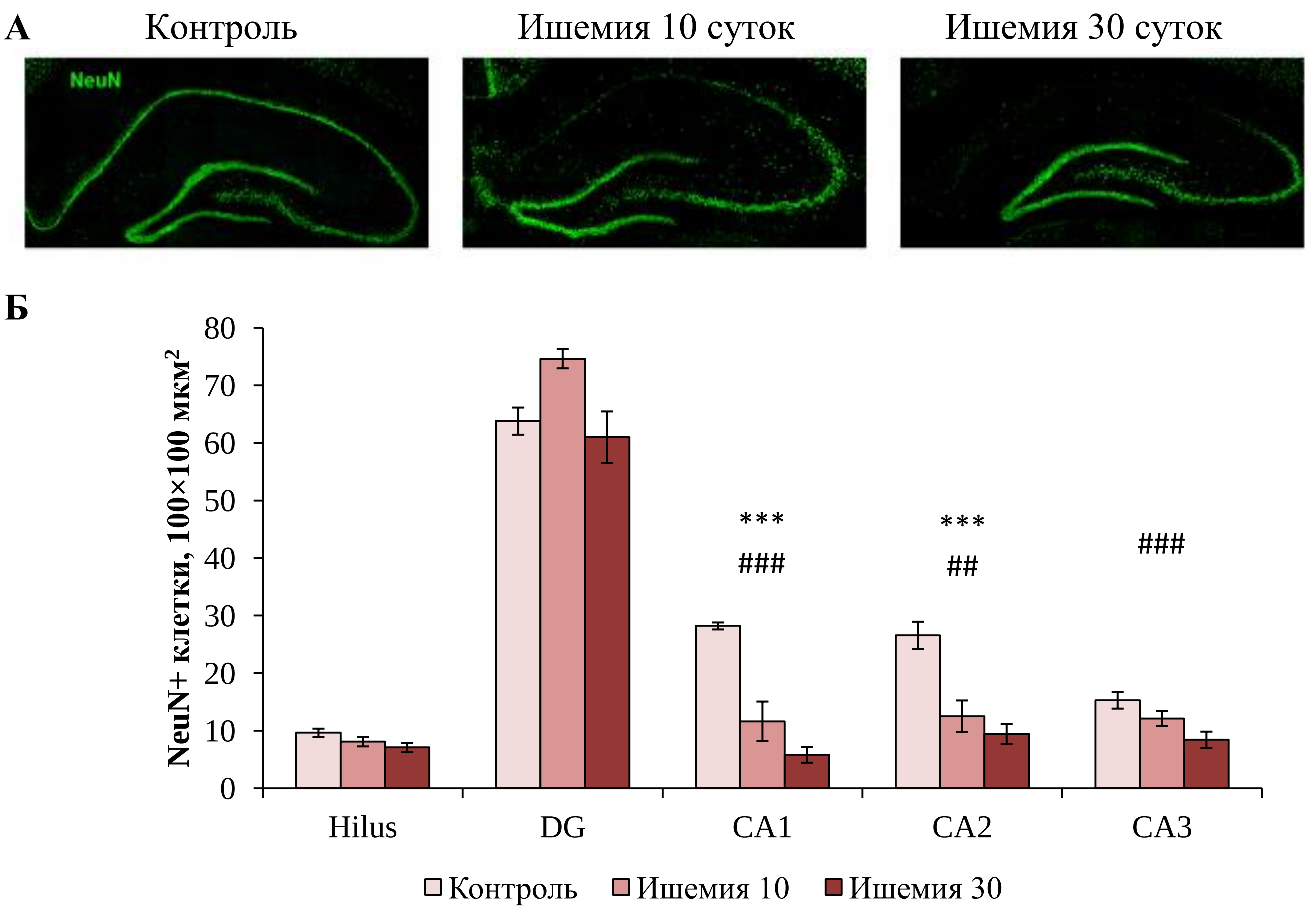
3.2 Гибель нейронов и активация микроглии при моделировании ишемии

3.2.1 Гибель нейронов и активация микроглии в гиппокампе при тотальной ишемии головного мозга

Анализ микрофотографий срезов мозга, полученных на 10-й и 30-й дни после операций по моделированию тотальной ишемии головного мозга, выявил существенную (59 %) потерю NeuN+ клеток в поле CA1 гиппокампа (таблица 5, рисунок 5). Количественный анализ подтвердил более чем двукратное снижение плотности нейронов в CA1, CA2 и CA3 к 30-му дню после ишемии (80 %, 55 % и 50 % потеря нейронов соответственно), хотя нейроны зубчатой извилины DG и хилуса не пострадали (таблица 5, рисунок 5). Снижение количества нейронов в полях CA1 и CA2 чётко различимо на рисунке 5 [Khodanovich et al., 2018a].

Таблица 5 – Плотность NeuN+ клеток в поле CA1 гиппокампа после моделирования тотальной ишемии [Khodanovich et al., 2018a]

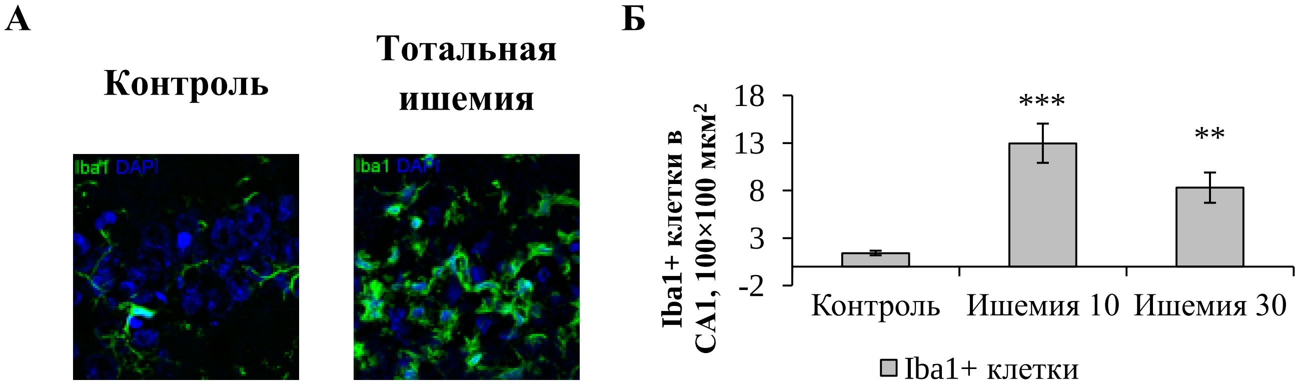
Зона	**Плотность NeuN+ клеток через 10 дней после операции, клеток в 100×100 мкм^2**		**Плотность NeuN+ клеток через 30 дней после операции, клеток в 100×100 мкм^2**	
	Контроль	**Тотальная ишемия**	**Контроль**	**Тотальная ишемия**
Хилус	9,66±0,72	8,11±0,81	9,09±0,54	7,11±0,77
DG	63,8±2,36	74,6±1,66	66,8±4,91	61,0±4,49
CA1	28,22±0,61	**11,64±3,44** ***	30,07±2,30	**5,85±1,38** ***
CA2	26,58±2,38	**12,52±2,76** ***	21,04±0,69	**9,44±1,75** **
CA3	15,3±1,43	12,1±1,29	16,9±0,72	**8,5±1,40** ***
Примечание: уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой: ** – p < 0,01, *** – p < 0,001				



А – Микрофотографии срезов мозга, окрашивание NeuN, 100× увеличение. Б – График содержания нейронов в различных зонах гиппокампа. Уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой на 10 сутки: *** – $p < 0{,}001$. Уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой на 30 сутки: ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$

Рисунок 5 – Потеря нейронов гиппокампа после моделирования тотальной ишемии головного мозга [Khodanovich et al., 2018a]

Тотальная ишемия головного мозга вызвала обширное воспаление в гиппокампе, которое определялось как пролиферация, активация и увеличение количества микроглии в поле CA1. Морфология микроглии изменялась характерным образом: увеличивалось тело клетки и укорачивались (вплоть до полной редукции) отростки (рисунок 6А). После моделирования тотальной ишемии на 10-е сутки количество микроглии увеличилось более чем в 6 раз по сравнению с контролем (таблица 6). К 30-м суткам количество микроглии остаётся значимо, более чем в 4 раза, выше контроля [Khodanovich et al., 2018a].



А – Микрофотографии участка поля CA1 гиппокампа на 10-й день после операции. 630× увеличение. Зелёный – Iba1, синий – DAPI. Б – Плотность Iba1+ клеток в поле CA1. Уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой: ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$

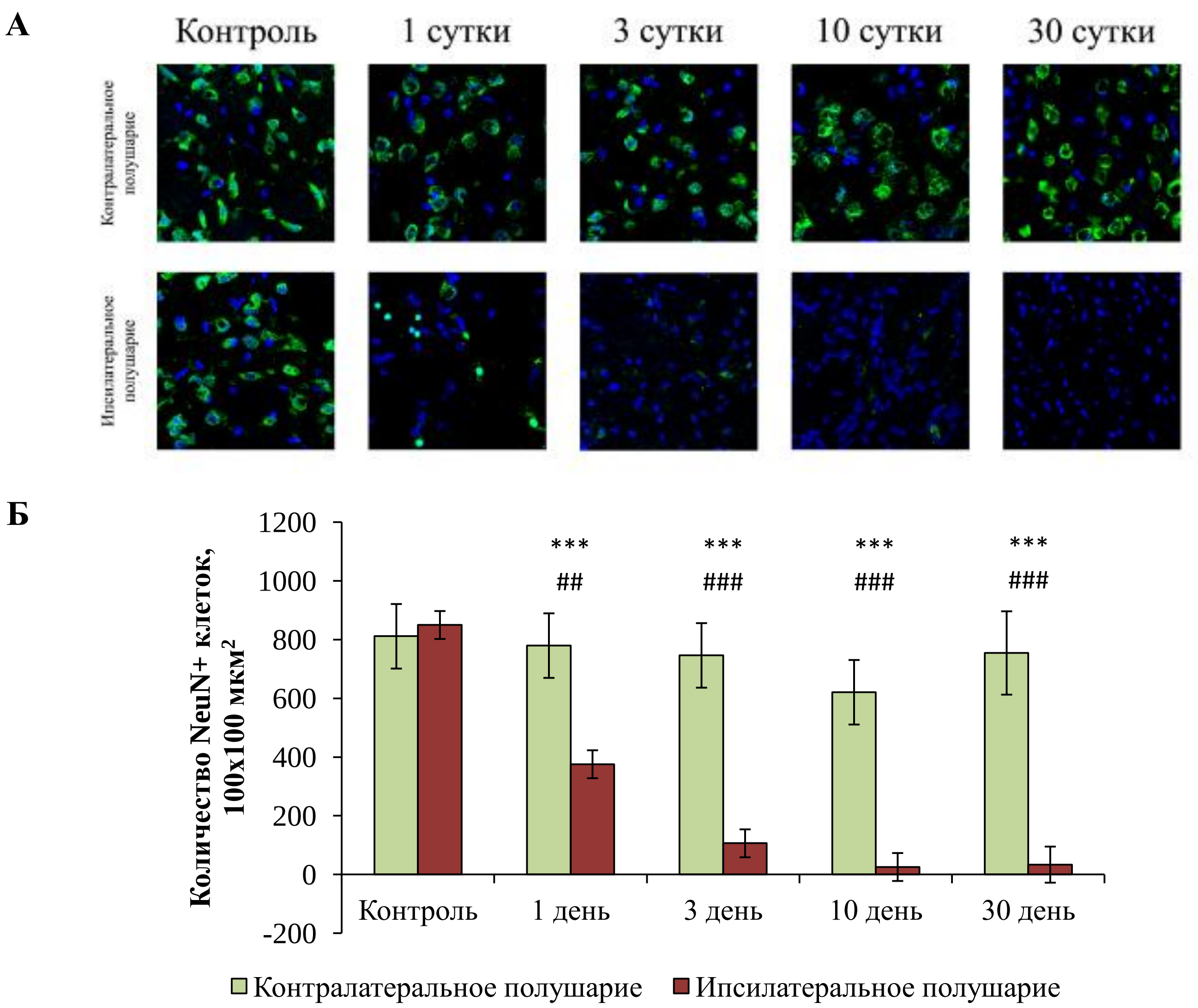
Рисунок 6 – Пролиферация клеток микроглии [Khodanovich M. et al., 2018a]

Таблица 6 – Плотность Iba1+ клеток в поле CA1 гиппокампа в условиях тотальной ишемии головного мозга [Khodanovich et al., 2018a]

Маркер	**Зона**	**Плотность Iba1+ клеток через 10 дней после операции, клеток в 100×100 мкм²**		**Плотность Iba1+ клеток через 30 дней после операции, клеток в 100×100 мкм²**	
		Контроль	**Тотальная ишемия**	**Контроль**	**Тотальная ишемия**
Iba1+ клетки, 100×100 мкм²	CA1	1,43±0,24	**12,98±2,06 *****	1,50±0,19	**8,30±1,59 ****
Примечание: уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$					

3.2.2 Гибель нейронов и активация микроглии в очаге локальной ишемии головного мозга

На рисунке 7А представлены участки ишемического очага и здоровых участков контралатерального полушария. Срез мозга животного после моделирования локальной ишемии демонстрирует значительное снижение количества NeuN-позитивных нейронов в пораженной зоне стриатума крысы уже на первые сутки после операции. Потеря нейронов усугубляется со временем, и уже к 3-м суткам зрелых нейронов в зоне поражения практически не остаётся. В контралатеральном полушарии значительных изменений количества нейронов по сравнению с ложнооперированным контролем не наблюдается [Khodanovich et al., 2018b].

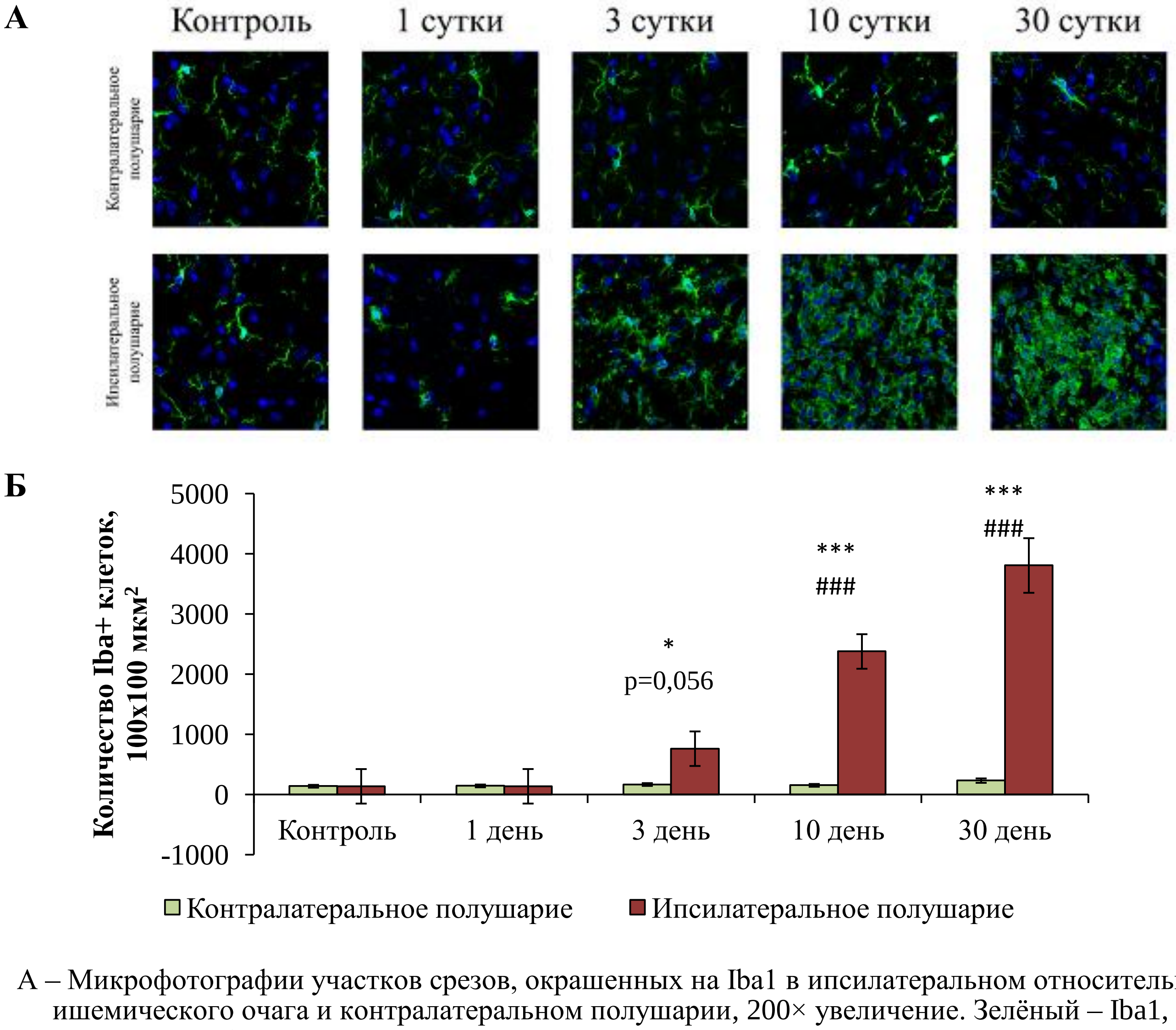


А – Микрофотографии нейронов в стриатуме ипсилатерального относительного очага поражения и контралатерального полушария после моделирования локальной ишемии головного мозга, 200× увеличение. Синий – DAPI, зелёный – NeuN. Б – Количество зрелых нейронов после моделирования локальной ишемии. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: *** – $p < 0{,}001$, уровень значимости различий по сравнению с контралатеральным полушарием: ## – $p < 0{,}01$, ### – $p < 0{,}001$

Рисунок 7 – Потеря нейронов в стриатуме пораженного полушария после моделирования локальной ишемии головного мозга [Khodanovich et al., 2018b]

Количественная оценка потери нейронов в очаге локальной ишемии показала, что количество NeuN+ клеток значимо снижается по сравнению со здоровым стриатумом на каждой временной точке, и потери нейронов составляют 55 % уже через сутки после моделирования ишемии, 87 % к 3-м суткам и 96 % на 10-е и 30-е сутки, в то время как у контрольных животных различий между полушариями не наблюдается. Данные представлены на рисунке 7Б [Khodanovich et al., 2018b].

Иммуноокрашивание срезов мозга к Iba1 у животных с моделированием локальной ишемии показало значительное увеличение количества и выраженную активацию микроглии в очаге локальной ишемии уже на 3-и (в 5 раз) и особенно на 30-е сутки (27-кратное увеличение) после операции (рисунок 8). Морфология микроглиальных клеток изменялась характерным для процессов активации образом, сходным с изменением морфологии микроглии при тотальной ишемии [Khodanovich et al., 2018b].



А – Микрофотографии участков срезов, окрашенных на Iba1 в ипсилатеральном относительно ишемического очага и контралатеральном полушарии, 200× увеличение. Зелёный – Iba1, синий – DAPI. Б – Плотность клеток микроглии в очаге ишемического инсульта и в контралатеральном полушарии. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, уровень значимости различий по сравнению с контралатеральным полушарием: ### – $p < 0,001$

Рисунок 8 – Увеличение количества активированной микроглии в очаге ишемического инсульта [Khodanovich et al., 2018b]

Таким образом, при локальной ишемии гибель нейронов в очаге достигает максимума уже к 10 суткам, в то время как потеря нейронов поля CA1 гиппокампа происходит медленнее и даже через месяц не достигает тех же значений, что и при локальной ишемии. Воспаление в модели локальной ишемии также намного интенсивнее, чем в гиппокампе при тотальной ишемии головного мозга.

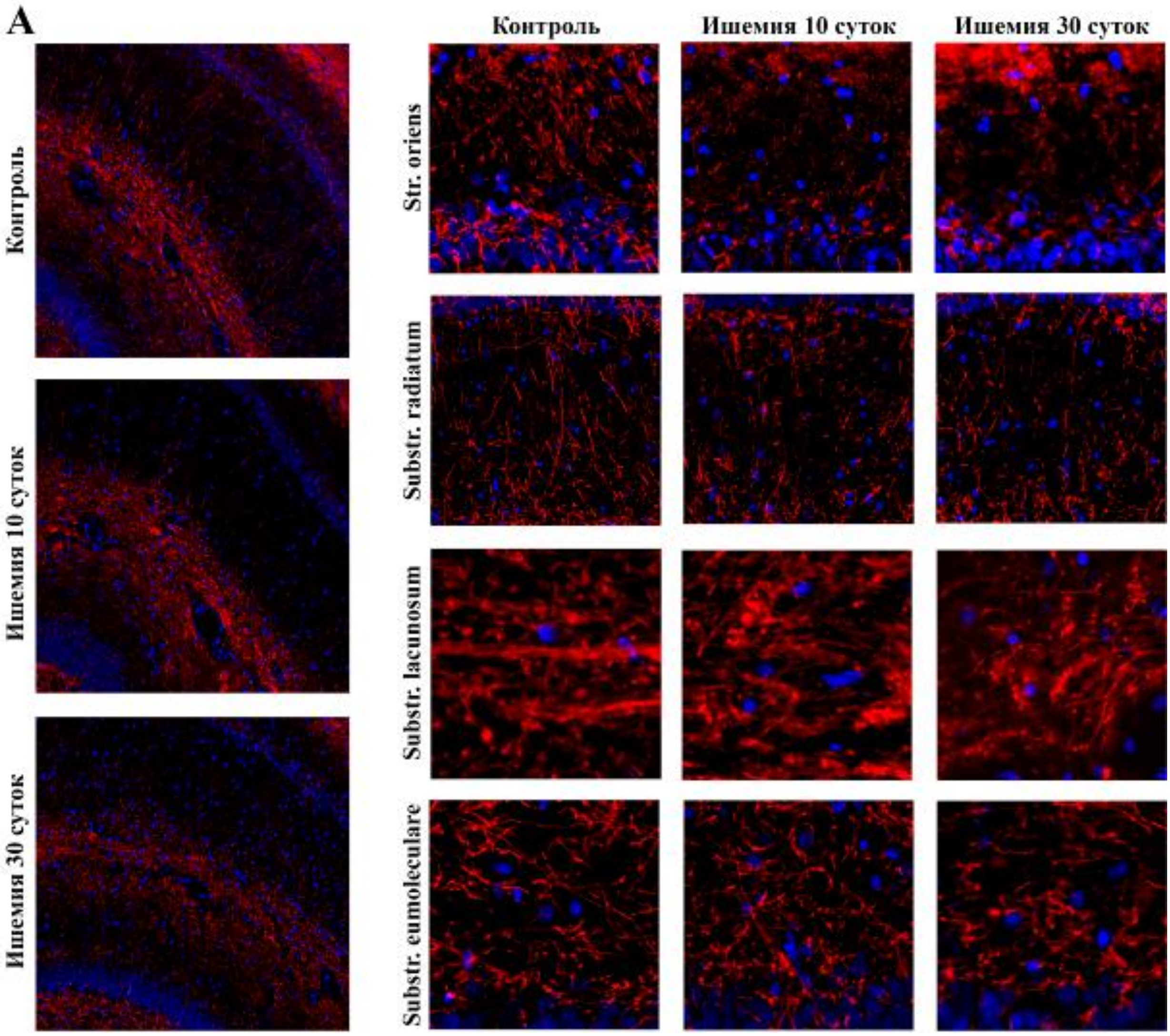
3.3 Демиелинизация в условиях ишемии головного мозга

3.3.1 Изменения миелина, детектируемые по MBP

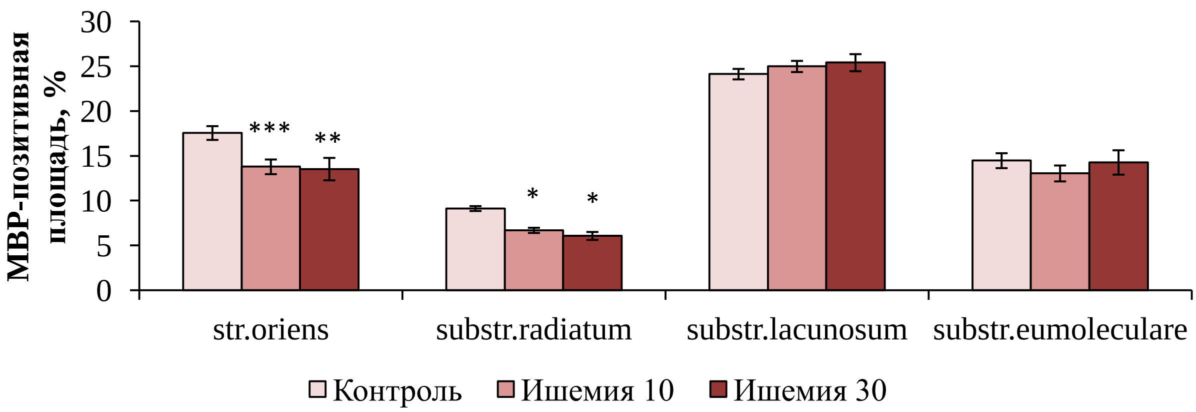
3.3.1.1 Изменения миелина, детектируемые по MBP при моделировании тотальной ишемии

Репрезентативные микрофотографии срезов мозга, окрашенных к MBP, для серии с моделированием тотальной ишемии и результаты количественного сравнения групп животных по проценту MBP-позитивной площади срезов в слоях гиппокампа представлены на рисунке 9. Обнаружена значимая демиелинизация в слоях stratum oriens и substratum radiatum (к 30-м суткам достигающая 23 % и 34 % соответственно), непосредственно прилегающих к полю CA1, где наблюдается наиболее выраженная и наиболее быстрая гибель пирамидных нейронов в условиях тотальной ишемии головного мозга. Миелиновые волокна в substratum radiatum после воздействия ишемии фрагментированные, редко располагаются пучками, в отличие от миелиновых волокон у ложнооперированных животных. При этом не было выявлено значимых различий между 10-ми и 30-ми сутками после моделирования ишемии. Изменения в слоях substratum lacunosum и substratum eumoleculare не являются статистически значимыми.

А



Б



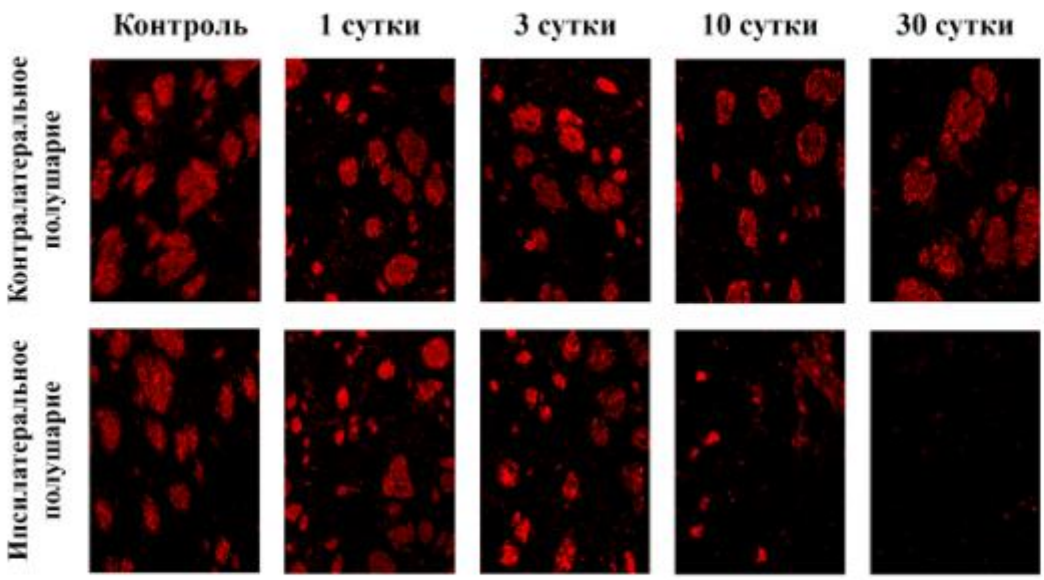
А – Репрезентативные микрофотографии, 200× увеличение. Б – Влияние тотальной ишемии на содержание миелина в слоях гиппокампа. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001

Рисунок 9 – Демиелинизация слоёв гиппокампа после моделирования тотальной ишемии головного мозга. Процент MBP-позитивной площади

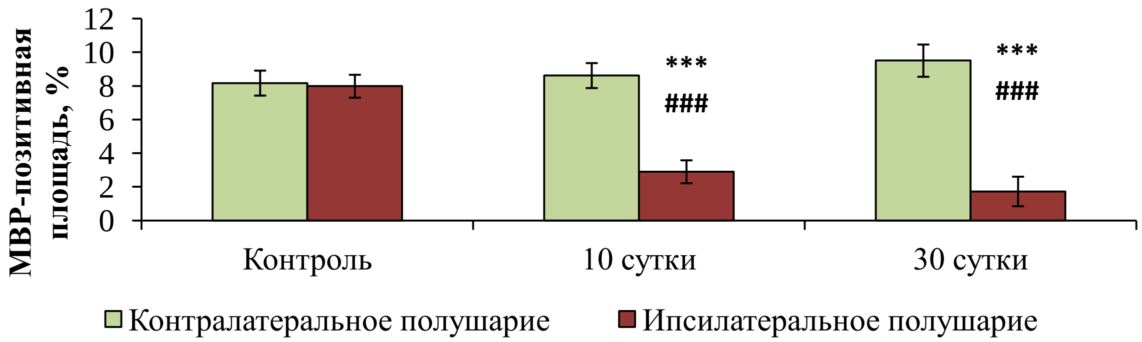
3.3.1.2 Изменения миелина, детектируемые по МВР при моделировании локальной ишемии

В очаге локальной ишемии наблюдается медленная, но длительная демиелинизация, детектируемая по окрашиванию к МВР, как показано на рисунке 10А. Визуально и количественно заметное разрушение миелиновых волокон обнаруживается на 10-е сутки и продолжает усугубляться до 30-х суток, достигая потери 78 % миелина согласно окрашиванию к МВР (рисунок 10Б). Различия оказываются значимы как по сравнению с контрольной группой, так и по сравнению со здоровым контралатеральным полушарием.

А



Б

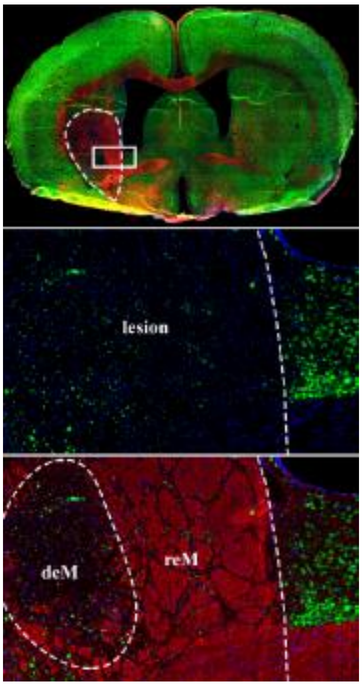


А – Репрезентативные микрофотографии срезов мозга, окрашенных к МВР, 200× увеличение. Б – Количественное сравнение процента МВР-позитивной площади в очаге поражения и симметричных зонах контралатерального полушария для исследуемых групп. Уровень значимости различий с контролем: *** – $p < 0,001$. Уровень значимости различий между полушариями: ### – $p < 0,001$

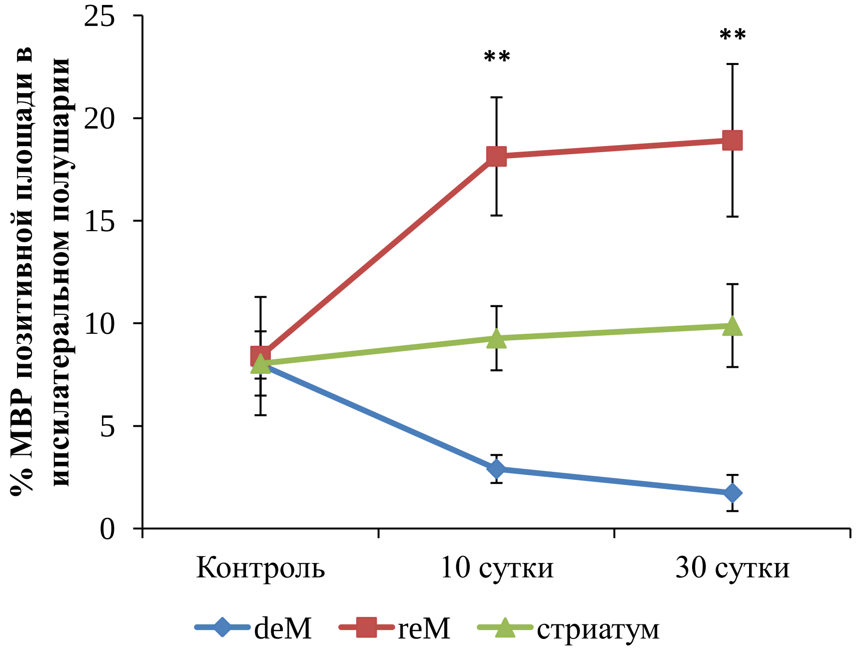
Рисунок 10 – Демиелинизация в очаге локальной ишемии согласно окрашиванию к МВР

Анализ микрофотографий срезов мозга, окрашенных на зрелые нейроны (NeuN) и миелин (MBP) с моделированием локальной ишемии на 30-е сутки показал, что внутри границ очага, выявляемого по окрашиванию зрелых нейронов (NeuN), по периферии появляются миелиновые волокна, отсутствующие на более ранних сроках после моделирования локальной ишемии (рисунок 11А). При более детальном анализе микрофотографий обнаружено, что на 30-е сутки после моделирования локальной ишемии на данном участке при отсутствии нейронов наблюдается увеличение плотности миелина. Таким образом, область ишемического очага можно разделить на две подзоны, в одной из которых содержание миелина снижается, а в другой наблюдается увеличение его плотности. Условно эти зоны были обозначены как «зона демиелинизации» и «зона ремиелинизации» соответственно. Анализ микрофотографий показал заметные различия динамики содержания миелина и плотности зрелых нейронов как в зоне ремиелинизации, так и в зоне демиелинизации (рисунок 11). В зоне демиелинизации гибель значительной части нейронов наблюдается уже на 1–3-и сутки, в то время как изменения содержания миелина происходят более медленно, нарастая к 10–30-м суткам. В зоне ремиелинизации наблюдается медленное восстановление миелина к 30-м суткам после моделирования ишемии, в то время как заметного увеличения количества нейронов в эти сроки не наблюдается. Количественный анализ динамики изменений процента MBP-позитивной площади в зонах демиелинизации и ремиелинизации внутри ишемического очага демонстрирует рисунок 11Б. Отмечаются различия динамики изменения содержания миелина в зонах де- и ремиелинизации, нарастающие к 30-м суткам после локальной ишемии.

А

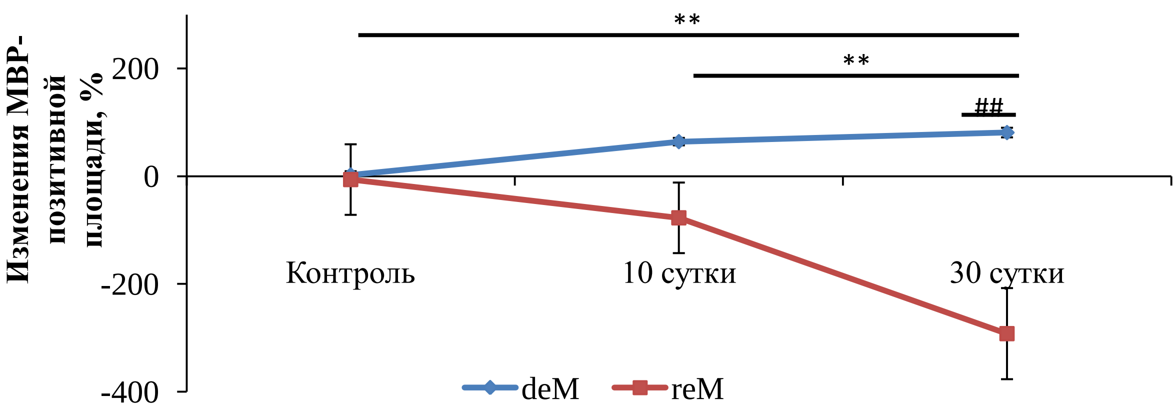


Б



Уровни значимости различий между:	Контроль, Р	10 день, Р	30 день, Р
deM и стриатумом	0,98	**0,01**	**0,01**
deM и reM	0,86	**<0,001**	**<0,001**
reM и стриатумом	0,88	**0,001**	**0,01**

В



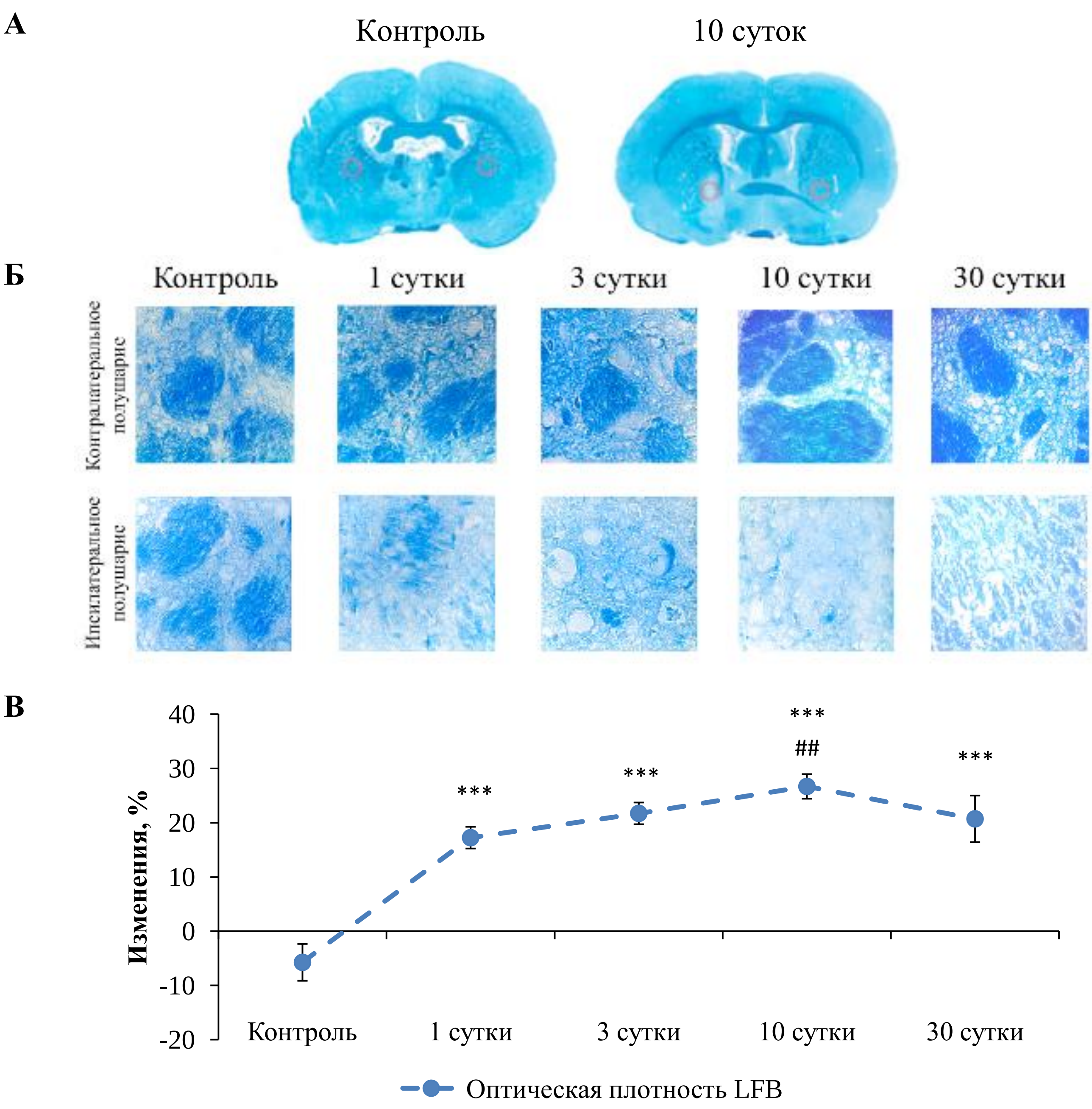
А – Репрезентативные микрофотографии, окрашивание к основному белку миелина MBP (красный), NeuN (зелёный), DAPI (синий), 200× увеличение. Б – Абсолютные значения процента MBP-позитивной площади в ипсилатеральном полушарии (значения для стриатума взяты из здоровой ткани обоих полушарий). Уровень значимости различий в зоне «ремиелинизации» между группами: ** – p < 0,01. Прочие уровни значимости указаны в таблице. В –Процентные изменения MBP-позитивной площади в зонах демиелинизации и «ремиелинизации» между полушариями. Уровень значимости различий в «зоне ремиелинизации» между группами: ** – p < 0,01. Уровень значимости различий через 30 суток после моделирования локальной ишемии между зонами демиелинизации и «ремиелинизации»: ## – p < 0,01

Рисунок 11 – Зоны демиелинизации (deM) и увеличения плотности миелина (reM) в очаге локальной ишемии (lesion)

Таким образом, в обеих моделях ишемии наблюдается значимая демиелинизация в специфических регионах, соответствующих структурам с максимальным повреждением: гиппокамп при тотальной ишемии и очаг локальной ишемии в стриатуме. В условиях тотальной ишемии демиелинизация происходит в слоях гиппокампа, прилегающих непосредственно к полю CA1, наиболее уязвимому к действию ишемии, и содержащих отростки находящихся в поле CA1 пирамидных нейронов. В то же время 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 тотальной ишемии головного мозга. Кроме того, через 30 суток после моделирования локальной ишемии наблюдается увеличение плотности миелина по периферии в границах очага локальной ишемии.

3.3.2 Изменения миелина, детектируемые по LFB при моделировании локальной ишемии

Для серии с моделированием локальной ишемии было проведено дополнительное гистологическое окрашивание срезов на LFB срезов мозга животных этой серии. Известно, что значения оптической плотности окрашивания срезов LFB представляют собой среднее значение между всеми маркерами миелина (PLP, MBP, MOG, CNP-аза) [Gudi et al., 2009], поэтому данное окрашивание могло дать дополнительную информацию о динамике демиелинизации для этой модели. Микрофотографии срезов, окрашенных LFB, представлены на рисунке 12.



А – Примеры срезов мозга контрольного животного и животного через 10 суток после моделирования локальной ишемии, окрашенные LFB. Красным обозначены области, в границах которых определялась оптическая плотность LFB. Б – Микрофотографии срезов мозга, окрашенных LFB, 10× увеличение. В – Изменения оптической плотности LFB по сравнению с контролатеральным полушарием. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: *** – $p < 0,001$; уровень значимости различий по сравнению с 1-ми сутками после моделирования ишемии: ## – $p < 0,01$

Рисунок 12 – Потеря миелина при локальной ишемии. Оптическая плотность LFB [Khodanovich et al., 2018b]

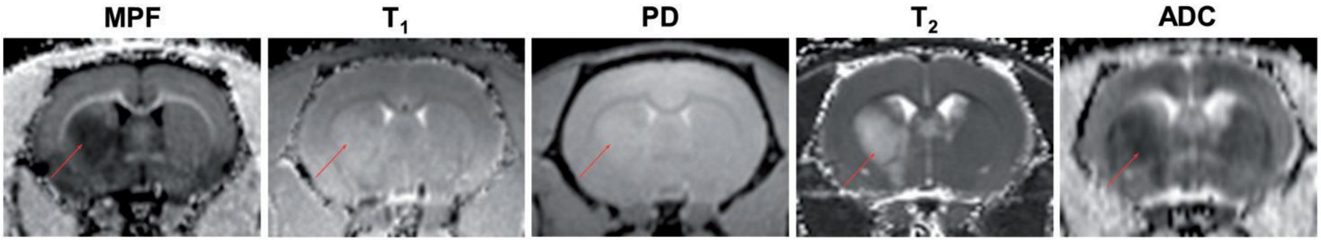
Срез мозга ложнооперированного животного демонстрирует плотные пучки миелиновых волокон в зоне стриатума, что соответствует нормальному состоянию белого вещества в этой зоне. После моделирования локальной ишемии интенсивность окрашивания тканей в зоне поражения снижается, разница с контралатеральным полушарием усиливается к 10-м суткам. На большем разрешении видно, что на 1-й день после инсульта в формирующемся очаге наблюдается бледность миелина с увеличенным межклеточным пространством, но без видимого разрушения нервных волокон. Через 3 дня после операции обнаруживается заметная вакуолизация и частичное разрушение миелиновых оболочек. К 10-м суткам ядро ишемического очага содержит лишь остатки разрушенного миелина и разрозненные фрагменты остаточных миелиновых оболочек. Количественно содержание миелина в очаге ишемии значимо падает, начиная с 1-х суток и достигает максимума различий с нормой к 10-м суткам. При этом на 10-е сутки разница между ипсилатеральным и контралатеральным полушариями значимо выше и по сравнению с 1-ми сутками после операции [Khodanovich et al., 2018b].

Таким образом, результаты, полученные с помощью окрашивания LFB в целом соответствуют динамике изменений, обнаруженных при окрашивании на MBP, однако метод LFB окрашивания оказывается более чувствительным для детекции демиелинизации, чем MBP. При определении с помощью окрашивания LFB демиелинизация в условиях локальной ишемии обнаруживается уже в первых суток, достигая максимума к 10-му дню.

3.4 Апробация и гистологическая валидация метода картирования MPF

3.4.1 Анализ динамики значений MPF при моделировании локальной ишемии

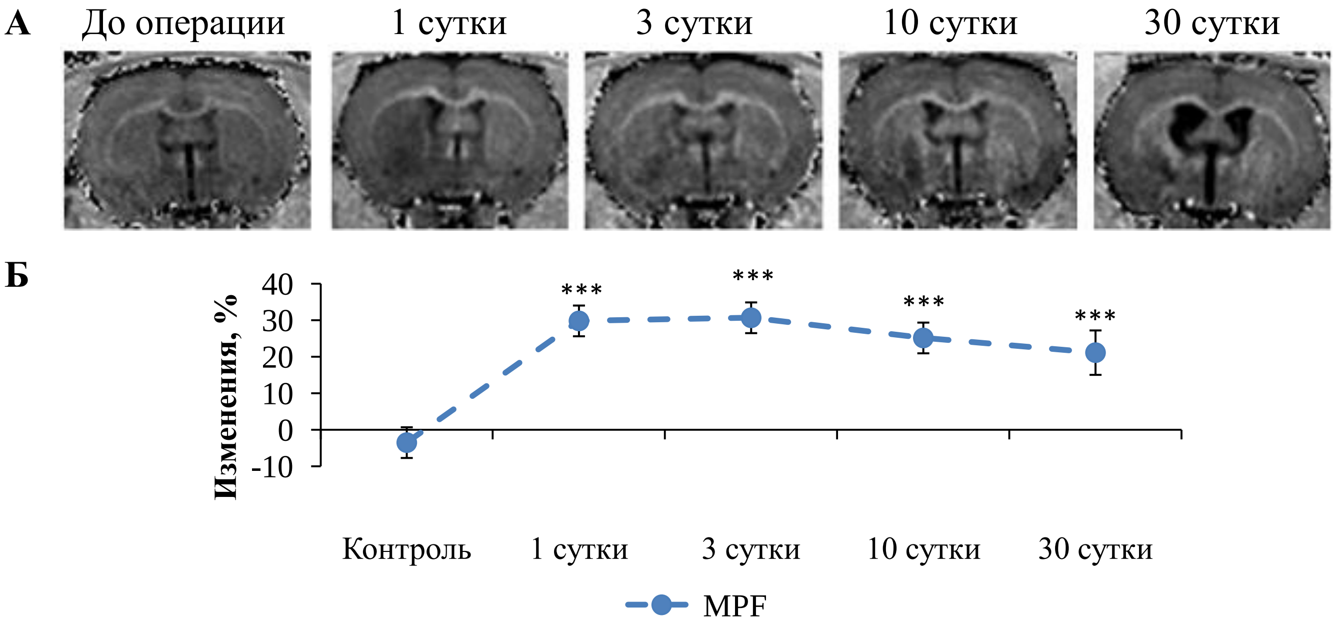
Апробация и валидация метода MPF картирования проводилась на модели локальной ишемии как модели с наиболее выраженным очагом демиелинизации. На рисунке 13 представлены примеры МРТ карт мозга животного с моделированием локальной ишемии. Как видно из рисунка, ишемический очаг наиболее чётко визуализируется на картах MPF, T_2 и ADC [Khodanovich et al., 2018b].



Стрелки указывают на очаг локальной ишемии

Рисунок 13 – Примеры МРТ карт мозга крысы на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии [Khodanovich et al., 2018b]

Пример динамики MPF карт с 1-х по 30-е сутки после моделирования локальной ишемии приведен на рисунке 14. На картах MPF формирующийся очаг визуализируется как зона со сниженными значениями параметра (рисунок 14А), едва заметная на ранних сроках после ишемии и всё более выделяющаяся к 10-м и 30-м суткам. Размер очага при этом наоборот уменьшается Снижение интенсивности данного параметра в зоне очага по сравнению с симметричной зоной контралатерального полушария значимо на всех временных точках, что представлено на рисунке 14Б.

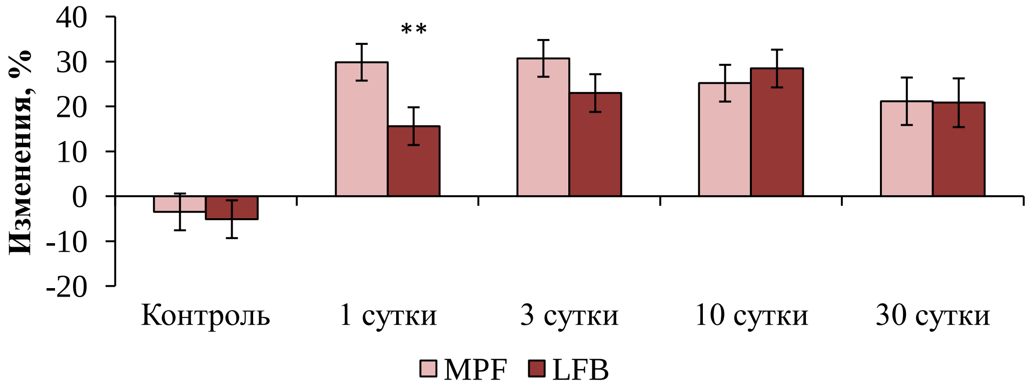


А – Формирование очага локальной ишемии после моделирования локальной ишемии на картах MPF. Б – Изменения нативных значений MPF в очаге по сравнению с контрольным полушарием. Уровень значимости различий по сравнению с контролем: *** – $p < 0{,}001$

Рисунок 14 – Изменение степени миелинизации в очаге ишемии

3.4.2 Гистологическая валидация MPF картирования на модели локальной ишемии

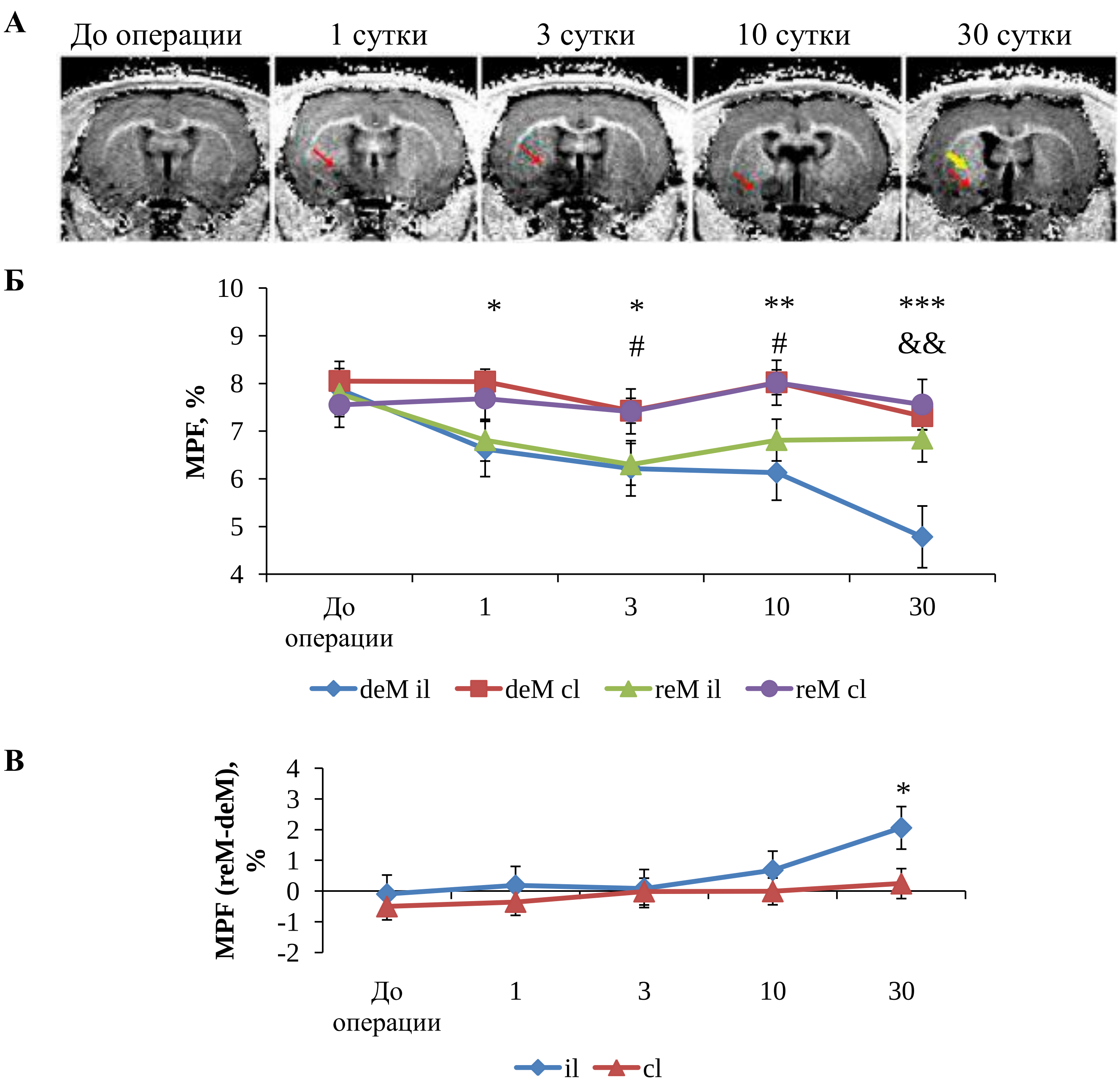
Динамика изменений значений MPF во времени очень схожа с динамикой снижения оптической плотности окрашивания срезов LFB, что подтверждает возможность использования картирования MPF в качестве неинвазивного метода оценки содержания миелина в мозге. Несмотря на это, процентные изменения MPF значимо отличались от процентных изменений оптической плотности LFB на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии (рисунок 15) [Khodanovich et al., 2018b].



Уровень значимости различий по сравнению с оптической плотностью LFB: ** – $p < 0{,}01$

Рисунок 15 – Процентные изменения MPF и LFB в ипсилатеральном полушарии по сравнению с контралатеральным полушарием

На рисунке 16А представлена динамика изменений MPF в зоне очага ишемии в течение 1 месяца после моделирования локальной ишемии. На 1–10-е сутки после проведения операции ишемический очаг хорошо заметен по снижению значений MPF и максимальным объемом очага на 10-е сутки. Начиная с 30-х суток в зоне ишемического очага на картах MPF чётко выделяются зона гипоинтенсивности (зона демиелинизации, deM), в которой наблюдается дальнейшее снижение значений MPF, и зона гиперинтенсивности («зона ремиелинизации», reM), в которой значения MPF повышаются и могут достигать, а иногда и превышать значения MPF в симметричной зоне контралатерального полушария.



А – Пример динамики изменений MPF в очаге в разные сроки после моделирования ишемии. Б – Динамика изменений MPF в зоне инсульта и в контрольном полушарии (il – ипсилатеральное полушарие, cl – контралатеральное полушарие). Уровень значимости различий между полушариями в зоне демиелинизации: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$. Уровень значимости различий между полушариями в зоне увеличения плотности миелина: # – $p < 0,05$. Уровень значимости различий между зонами демиелинизации и ремиелинизации в границах очага: && – $p < 0,01$. В – Динамика различий MPF в зонах демиелинизации и увеличения плотности миелина между полушариями после моделирования локальной ишемии. Уровень значимости различий: * – $p < 0,05$

Рисунок 16 – Динамика изменений MPF в зоне ишемического очага в течение месяца после моделирования локальной ишемии

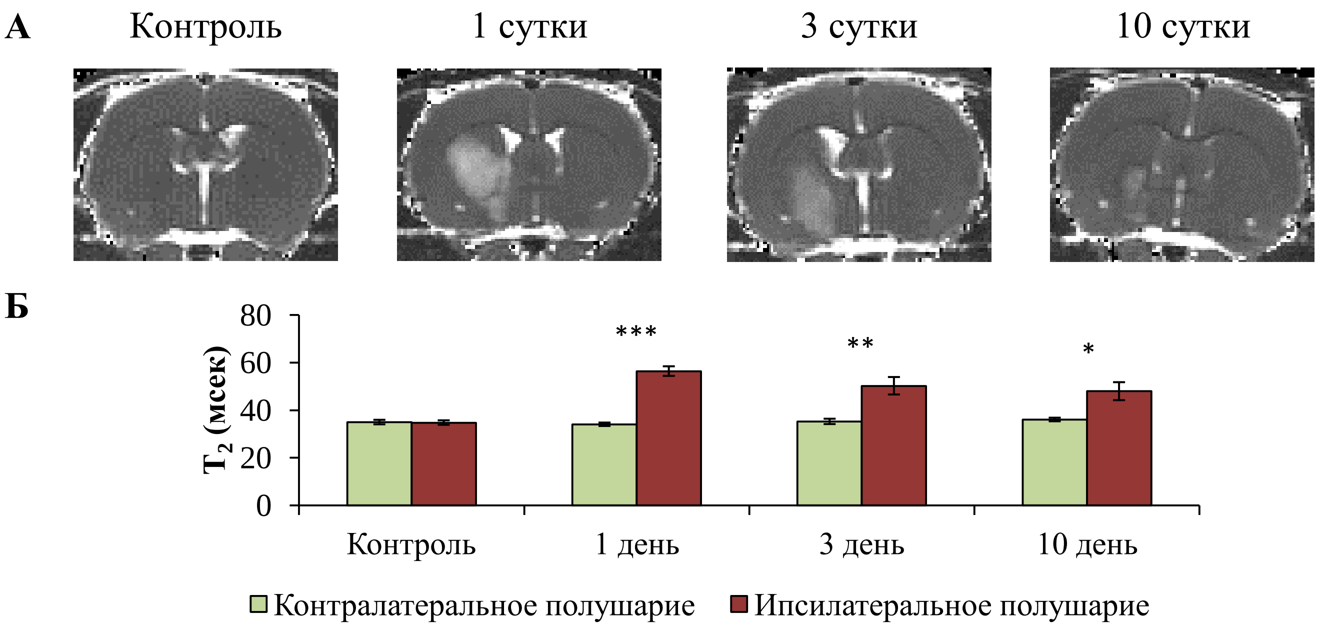
Количественный анализ изменений MPF (рисунок 16Б, В) подтвердил значимость различий между зонами де- и ремиелинизации на 30-е сутки, а также значимость различий между ипсилатеральным и контралатеральным полушариями в зоне демиелинизации на протяжении всего периода наблюдений. В зоне ремиелинизации на 1-е сутки после моделирования ишемии нет значимых различий между здоровым и повреждённым полушарием.

Таким образом, динамика изменений значений MPF в очаге локальной ишемии, а также разделение очага на картах MPF на зону демиелинизации и зону увеличения плотности миелина, повторяют динамику изменений оптической плотности LFB и процента MPB-позитивной площади.

3.4.3 Исследование специфичности метода картирования MPF для количественной оценки содержания миелина по сравнению с другими методами МРТ

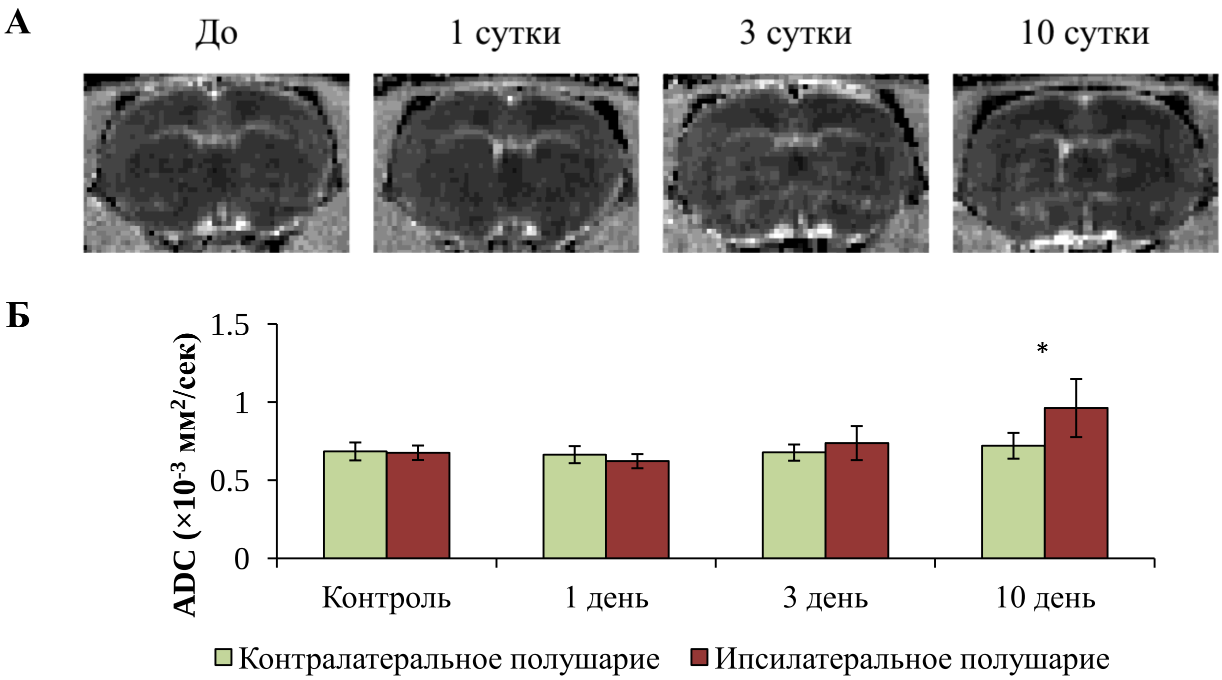
Поскольку на картах T_2 очаг ишемического инсульта визуализируется как зона гиперсинтенсивности сигнала и, поскольку в наибольшей степени данный параметр зависит от содержания молекул воды, T_2 косвенно отражает отёк в зоне поражения. Примеры карт T_2 представлены на рисунке 17. Различий между полушариями у ложнооперированных животных не наблюдалось. Повышение сигнала в зоне инсульта по сравнению с контралатеральным полушарием было значимо на всех временных точках, но максимальное превышение наблюдалось на 1-е сутки после операции [Khodanovich et al., 2018b].

В зависимости от сроков локальной ишемии очаг на картах ADC может визуализироваться как зона гипоинтенсивности (в гипеостлый и острый периоды) и как зона гиперинтенсивности (в хронический период) с псевдонормализацией в подостром периоде [Allen et al., 2012]. При обработке данных (рисунок 18) полученные значение указывают на подострый период развития очага локальной ишемии с переходом в хронический период к 10-м суткам, когда значения параметра в очаге возрастают и становятся значимо больше, чем в контралатеральном полушарии.



А – Репрезентативные карты T_2 в зоне ишемического поражения. Б – Изменения нативных значений T_2 при моделировании локальной ишемии. Уровень значимости различий по сравнению с контралатеральным полушарием: * – $p < 0{,}05$, ** – $p < 0{,}01$, *** – $p < 0{,}001$

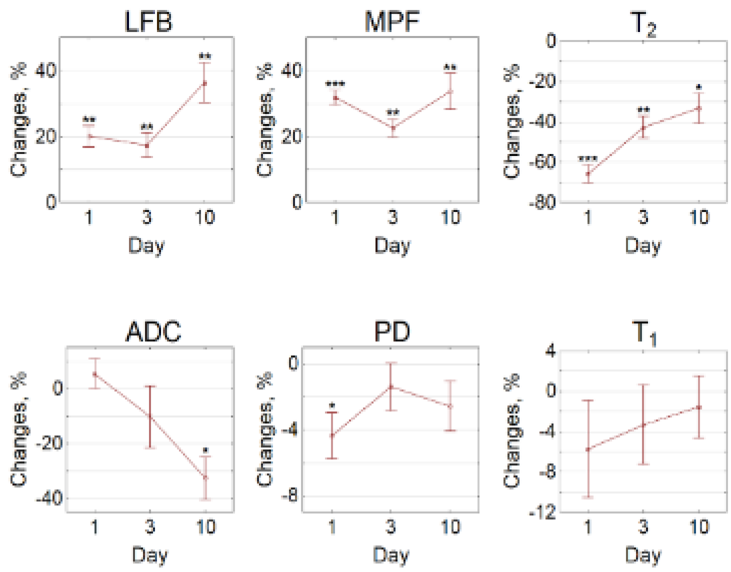
Рисунок 17 – Изменение T_2 при моделировании локальной ишемии [Khodanovich et al., 2018b]



А – Репрезентативные карты ADC в зоне ишемического поражения. Б – Изменения нативных значений ADC при моделировании локальной ишемии. Уровень значимости различий по сравнению с контралатеральным полушарием: * – $p < 0{,}05$

Рисунок 18 – Изменение ADC при моделировании локальной ишемии

С целью поиска возможных корреляций изменений оптической плотности LFB с различными количественными параметрами МРТ использовались данные первых 10 дней наблюдений. Графики, отражающие динамику процентных изменений оптической плотности LFB, а также MPF, T_2, ADC, PD и T_1, представлены на рисунке 19 [Khodanovich et al., 2018b].



Уровень значимости различий между полушариями: * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001

Рисунок 19 – Средние процентные изменения количественных параметров МРТ, вычисленные для зоны ишемического очага по отношению к симметричной зоне контралатерального полушария [Khodanovich et al., 2018b]

Значения изменений протонной плотности PD в повреждённом полушарии оказываются значимы только на первые сутки после ишемии, что, вероятно, связано с развитием отёка. График с изменениями в T_1 не показывает значимых различий между здоровой и поражённой тканью. Изменения значений T_1 являются неспецифичными, поскольку подвержены влиянию самых разных факторов, таких как отёк, демиелинизация, воспаление, возможные микрогеморрагии [Khodanovich et al., 2018b].

Степень корреляции значений процентных изменений оптической плотности LFB с процентными изменениями стандартных количественных параметров МРТ и MPF представлена в таблице 7. Среди стандартных количественных параметров МРТ ни один значимо не коррелирует с гистологическим окрашиванием, следовательно, ни один из них не отражает изменений в содержании миелина. Корреляция изменений MPF с изменениями оптической плотности LFB оказалась значимой [Khodanovich et al., 2018b].

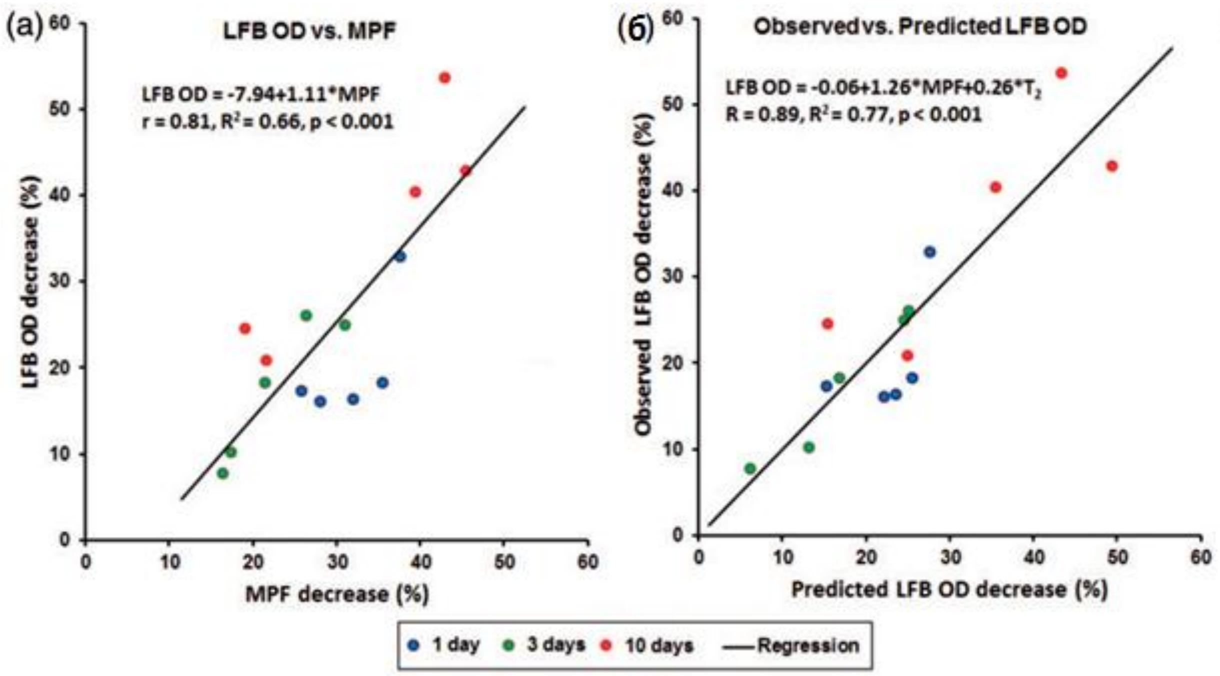
Таблица 7 – Корреляции между процентными изменениями оптической плотности LFB и количественных параметров МРТ [Khodanovich et al., 2018b]

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

Таким образом, метод картирования MPF позволяет с высокой точностью и специфичностью количественно оценить содержание миелина в условиях ишемического повреждения головного мозга, и ни один из стандартных методов МРТ не может быть использован для количественной оценки потери миелина в условиях локальной ишемии головного мозга.

3.4.4 Линейная регрессионная модель количественной оценки миелина после ишемии с MPF в качестве независимого параметра и коррекцией на отёк

Сравнение оптической плотности LFB с MPF показало существенное сходство паттернов изменений данных параметров (пункт 3.4.2), однако обнаружены значимые различия между ними на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии ($p < 0,01$). Для того, чтобы определить комбинацию количественных МРТ параметров, позволяющих наиболее точно предсказать установленную по оптической плотности LFB демиелинизацию в очаге ишемии, была проведена серия регрессионных анализов. Результаты отражены на рисунке 20. Процентные изменения MPF ожидаемо наиболее точно предсказывали процентные изменения оптической плотности LFB в очаге в рамках однофакторной модели ($R = 0,81$). Значения свободного члена были незначимы, хотя существенно отличались от нуля (–7,84 %, p = 0,26). При пошаговом множественном регрессионном анализе в качестве значимых предикторов изменений оптической плотности LFB были включены только процентные изменения MPF и T_2. Полученная таким образом модель обеспечивает значительное улучшение R^2 по сравнению с однофакторной моделью с изменением R^2 равным 0,14 (p = 0,02). Структура данной модели отражает ведущий эффект MPF в качестве показателя изменений оптической плотности LFB со следующими значениями: R = 0,89, скорректированный $R^2 = 0,76$, β(MPF) = 0,92 (P < 0,001) и $\beta(T_2) = 0,38$ (P = 0,02). В случае двухфакторной модели свободный член был незначимым и близким к нулю (–0,66 %, p = 0,99) [Khodanovich et al., 2018b].



А – Процентные изменения оптической плотности LFB как функции от процентных изменений MPF. Б – Процентные изменения оптической плотности LFB, рассчитанные с использованием двухфакторной регрессионной модели на основании процентных изменений MPF и T_2 в качестве независимых переменных

Рисунок 20 – Графики линейной регрессии процентных изменений оптической плотности LFB в очаге ишемии по отношению к симметричным контралатеральным регионам [Khodanovich et al., 2018b]

Таким образом, введение в регрессионную модель параметра T_2 в качестве второй независимой переменной обеспечивает улучшение степени корреляции значений MPF и оптической плотности LFB за счёт коррекции значений на влияние цитотоксического отёка.

3.5 Исследование специфичности MPF для количественной оценки миелина по сравнению с другими гистологическими показателями

Исследованы возможные корреляционные связи между показателями, полученными неинвазивно, на основе МРТ, и другими гистологическими количественными показателями, а именно, гибелью нейронов и воспалением. Коэффициенты корреляции между процентными изменениями MPF и иммуногистохимических показателей показаны в таблице 8. Отсутствие значимых корреляций между MPF и маркерами зрелых нейронов и микроглии свидетельствует о том, что на значение данного МРТ параметра не оказывает влияния ни гибель нейронов, ни активация микроглии в очаге локальной ишемии [Khodanovich et al., 2018b].

Таблица 8 – Корреляции между процентными изменениями иммуногистохимических показателей и МРТ параметров [Khodanovich et al., 2018b]

Процентные изменения	MPF	PD	T_1	T_2	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)**
Примечание: данные отображают коэффициенты корреляции Пирсона (R) и уровни значимости P в скобках. Значимые корреляции выделены.					

Процентные изменения T_2 значимо коррелировали с изменениями числа NeuN+ клеток. Для процентных изменений ADC были обнаружены значимые корреляции с процентными изменениями числа NeuN+ и Iba1+ клеток (таблица 8). Кроме того, была обнаружена слабая корреляция между изменениями оптической плотности LFB и числа Iba1+ клеток ($R = -0,55$, $P = 0,04$), а также между изменениями T_1 и PD ($R = 0,72$, $P = 0,002$), что может быть обусловлено как отёком, так и свойством математической модели, поскольку PD и T_1 получены методом переменного угла поворота из одного набора данных [Khodanovich et al., 2018b].

Таким образом, метод картирования макромолекулярной протонной фракции MPF позволяет с высокой точностью и специфичностью относительно прочих клеточных компонентов ЦНС количественно оценивать потерю миелина при моделировании локальной ишемии головного мозга. Коррекция ошибки, вызванной цитотоксическим отёком на ранних стадиях развития ишемического повреждения, осуществляется путём включения в регрессионную модель параметра T_2, что приводит к увеличению коэффициента корреляции.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Сравнение экспериментальных моделей тотальной и локальной ишемии мозга по параметрам нейрональной гибели, воспаления и демиелинизации

Как следует из полученных результатов, экспериментальные модели тотальной и локальной ишемии мозга существенно отличаются локализацией и динамикой нейрональной гибели, воспаления и демиелинизации (таблица 9).

Таблица 9 – Сравнительная характеристика моделей ишемии головного мозга по параметрам демиелинизации, гибели нейронов и воспалению

Параметры сравнения		**Тотальная ишемия**	**Локальная ишемия**
Гибель нейронов	Локализация	Двустороннее поражение полей CA1, CA2 и CA3 гиппокампа	Ишемический очаг – одностороннее поражение стриатума (caudoputamen)
	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
Воспаление	Локализация	Поле CA1 гиппокампа и окружающие регионы	Ишемический очаг в стриатуме
	Временные характеристики	6-кратное превышение контрольных значений на 10-е сутки сменяется 4-кратным превышением контрольных значений 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

Несмотря на то, что в своих исследованиях мы использовали разные линии крыс: линию Wistar для моделирования тотальной ишемии и линию Sprague-Dawley для моделирования локальной ишемии, – полученная локализация ишемического повреждения является стандартной для данных моделей [Ginsberg et al., 1989] и не может быть обусловлена различиями в выбранных линиях животных. Использованные модели ишемии изначально характеризуются различной локализацией и выраженностью повреждений, свойственной конкретному типу ишемии (тотальная или локальная) [Canazza et al., 2014 ; Raval et al., 2009]. В различных исследованиях были продемонстрированы результаты, сходные как с полученными нами, так и при использовании различных линий крыс. Для модели тотальной ишемии при использовании линий Sprague-Dawley [Sadelli et al., 2017], Wistar [Raval et al., 2009] и других [Hazelton et al., 2010] была получена сходная локализация и выраженность ишемического очага. Для модели локальной ишемии сходные результаты были получены для линий Sprague-Dawley [Shah et al., 2019], Wistar [Coert et al., 1999], Long-Evans [Allred et al., 2010] и других [O'Collins et al., 2017]. Для модели локальной ишемии, как наиболее широко используемой модели, существует ряд исследований, в которых сравниваются разные линии крыс, в первую очередь Wistar и Sprague-Dawley как наиболее часто используемые в силу того, что они не имеют предрасположенности к каким-либо заболеваниям. Обширный метанализ большого числа исследований с использованием модели локальной ишемии, проведённых на разных линиях крыс, свидетельствует, что наибольший разброс характерен для Hooded Listar, а средние объёмы очага у Sprague-Dawley и Wistar практически не различаются (26 % и 32 % от объёма полушария соответственно) и близки к среднему значению среди всех линий крыс (30 %) [O'Collins et al., 2017]. Кроме того стоит заметить, что даже среди крыс одной линии, полученных из разных питомников, обнаруживаются различия в 2 и более раза в размере очага локальной ишемии [Nikolova et al., 2014], на фоне которых различия между здоровыми линиями крыс оказываются менее существенными [O'Collins et al., 2017].

Согласно как нашим результатам, так и литературным данным [Harukuni et al., 2006], при моделировании тотальной ишемии гибель нейронов, в основном, наблюдается в поле CA1 гиппокампа в первые 10 суток после проведения операции. Известно, что нейроны этого поля наиболее уязвимы к действию ишемии из-за большого числа глутаматных рецепторов, и гибель данных нейронов достигает 95 % после моделирования тотальной ишемии [Sadelli et al., 2017]. В несколько меньшей степени значимая гибель нейронов, согласно нашим результатам, обнаруживается в полях CA2 и CA3 гиппокампа. Согласно литературным данным, потеря нейронов поля CA1 гиппокампа может составлять от 35 % [Wahul et al., 2018] до 96 % [Sadelli et al., 2017] в зависимости от таких параметров модели, как полнота и длительность прекращения кровоснабжения мозга. Так, в 2-сосудистой модели с перекрытием только сонных артерий на 10 минут к 7-му дню после моделирования ишемии гибель нейронов составила 80 % всех пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа [Raval et al., 2009], в то время в как полное перекрытие всех 4 сосудов на 12–15 минут приводило к гибели от 86 % до 96 % всех нейронов поля CA1 [Sadelli et al., 2017 ; Vosler et al., 2011]. В нашем исследовании потеря нейронов составила 59 % на 10-е сутки и 80 % на 30-е сутки относительно контрольного уровня, что соответствует результатам исследований, полученным на моделях с наиболее полным перекрытием мозгового кровотока [Sadelli et al., 2017].

Зона активации и значительного увеличения численности микроглии, по результатам наших и ранее проведённых [Surinkaew et al., 2018] исследований, соответствует основной зоне гибели нейронов – полю CA1 гиппокампа. В нашем исследовании мы обнаружили увеличение количества активированной микроглии в поле CA1 в 6 раз относительно контроля на 10-е сутки после операции. В то же время, в исследовании J. L. Hazelton с соавторами было продемонстрировано воспаление, в 2 раза превышающее полученное нами [Hazelton et al., 2010]. Эти отличия могут быть связаны с использованием отличной от выбранной нами 2-сосудистой модели тотальной ишемии в исследовании J. L. Hazelton с соавторами, которая подразумевает неполное прекращение мозгового кровотока и понижение артериального давления. Такая модель не вызывает полного прекращения кровоснабжения головного мозга, что в большей мере, чем 3-сосудистая и 4-сосудистая модели, способствует выживанию микроглии, поскольку известно, что клетки микроглии, так же как и нейроны, олигодендроциты и астроглия уязвимы к действию ишемии [Fumagalli et al., 2015]. Таким образом, менее серьёзные нарушения мозгового кровообращения могут вызывать воспаление большей степени, чем, например, перманентная ишемия или черепно-мозговая травма [Davalos et al., 2005]. Известно, что воспаление в различных моделях тотальной ишемии также может сильно различаться в зависимости от параметров модели. Исследователи сходятся во мнении, что активация микроглии зависит, во-первых, от времени самого ишемического эпизода и реперфузии [Surinkaew et al., 2018], и, во-вторых, от степени насыщения крови кислородом в процессе реперфузии [Hazelton et al., 2010 ; Surinkaew et al., 2018]. Кроме того, в нашем исследовании тотальной ишемии количество Iba1+ клеток снижается к 30-м суткам по сравнению с 10-ми, хотя и не значимо, что, возможно, связано с постепенным завершением процессов повреждения ткани гиппокампа и утилизации разрушенных клеток к этому сроку. Было показано, что активированная микроглия проявляет фагоцитарную активность и способствует утилизации погибших клеток и восстановлению тканей [Benakis et al., 2015], как, например, в поле CA1 гиппокампа после моделирования тотальной ишемии наблюдается восстановление пирамидных нейронов за счёт эндогенного нейрогенеза [Ходанович и др., 2016а, 2016б, 2019 ; Nakatomi et al., 2002].

Нами обнаружено, что при моделировании тотальной ишемии происходит демиелинизация слоёв stratum oriens и substratum radiatum, непосредственно прилегающих к пирамидному слою поля CA1, где наблюдается наибольшая потеря нейронов и воспаление. В то же время мы не обнаружили значимых различий между временными точками 10 и 30 суток после операции, вероятно, из-за эффекта «отсроченной гибели» нейронов, когда, в отличие от локальной ишемии, основная потеря нейронов в условиях тотальной ишемии происходит на 2–7-е сутки [Neumann et al., 2013]. Stratum oriens содержит в себе базальные ветвления дендритов пирамидных нейронов полей CA, лежащих ниже. Substratum radiatum является подслоем молекулярного слоя и содержит нервные волокна, соединяющие нейроны полей CA1 и CA3 [Бонь и др., 2018]. Таким образом, эти два слоя гиппокапма наиболее тесно связаны с нейронами поля CA1. Их гибель, вероятно и вызывает разрушение миелина именно в этих двух слоях.

При моделировании локальной ишемии головного мозга была использована модель окклюзии средней мозговой артерии, которая является наиболее распространённой моделью для исследования ишемического инсульта [Canazza et al., 2014]. В данной модели ишемический очаг может быть локализован как в кортексе, так и в стриатуме, либо включать обе эти структуры [Mitchell et al., 2016]. Согласно нашим результатам, ишемический очаг, главным образом, располагался в стриатуме, гибель нейронов в котором начиналась с 1-х суток, и уже на 3-и сутки достигала практически 100 %. Подобные результаты были получены в исследовании H. Li с соавторами, где было показано снижение количества зрелых нейронов в модели MCAO уже через 24 часа от 24 % [Li et al., 2000] до 80 % в коре и стриатуме [Shah et al., 2019]. В целом гибель нейронов при моделировании локальной ишемии начинается намного раньше, чем при моделировании тотальной ишемии: через 3 часа в очаге локальной ишемии против 48–72 часов «отсроченной гибели» пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа при тотальной ишемии головного мозга [Harukuni et al., 2006].

Как и в модели тотальной ишемии, мы обнаружили активацию и значимое увеличение численности микроглии в месте наибольшей гибели нейронов, в случае моделирования локальной ишемии – в стриатуме. При этом воспаление, определяемое по количеству Iba1+ клеток, неизменно росло с первых суток вплоть до месяца после операции. В наших исследованиях этот рост составил 17-кратное увеличение относительно контрольного уровня на 10-е сутки и 27-кратное увеличение – на 30-е сутки. Можно предположить, что рост числа Iba1+ клеток обусловлен не только пролиферацией, активацией и миграцией микроглии к очагу ишемии, но и инфильтрацией иммунных клеток из периферической крови в связи с нарушением целостности гематоэнцефалического барьера [Benakis et al., 2015 ; Doyle et al., 2008], поскольку известно, что последние также экспрессируют данный маркер [Fumagalli et al., 2015]. Принято считать, что инфильтрация иммунных клеток из периферической крови характерна только для локальной ишемии головного мозга [Imai et al., 1997 ; Sawada et al., 1998], хотя существуют немногочисленные данные, свидетельствующие об инфильтрации макрофагов через гематоэнцефалический барьер при тотальной ишемии головного мозга [Lees, 1993]. Этим и объясняется, по всей видимости, такая существенная разница между воспалением в использованных нами моделях: 4-кратное увеличение числа Iba1+ клеток к 30-м суткам после моделирования тотальной ишемии головного мозга и 27-кратное – после моделирования локальной ишемии.

Предполагается также, что направленная миграция лимфоцитов к очагу локальной ишемии может быть вызвана попаданием антигенов мозга в периферическую кровь [Doyle et al., 2008]. Ранее в исследованиях было показано наличие в крови антител к основному белку миелина MBP и протеолипидного протеина PLP после ишемического инсульта у людей [Becker et al., 2016]; более того, титр антител к MBP значимо коррелировал с отложенным ухудшением когнитивных функций, что, возможно, свидетельствует о длительном участии иммунных клеток крови в повреждении нервной системы после локальной ишемии (теория воспалительной полутени [Gauberti et al., 2014, 2016]). В противовес этому существуют данные, что, поскольку инфильтрация иммунных клеток из крови в мозг длится неделями, ранняя инфильтрация приводит к усилению неврологического дефицита и усугублению повреждения тканей мозга, в то время как последующие влияния носят положительный характер. Например, фагоцитоз омертвевших тканей и выброс цитокинов способствует формированию глиального рубца, который крайне важен для заживления тканей [Doyle et al., 2008].

Как и для модели тотальной ишемии, мы обнаружили значимую демиелинизацию в основной зоне гибели нейронов при моделировании локальной ишемии. В то же время, в отличие от модели тотальной ишемии, содержание миелина в области ишемического очага характеризовалось выраженной динамикой от 1-х суток к 30-м суткам после операции и разделением очага демиелинизации на две зоны с различной динамикой. Выявленные нами сроки начала демиелинизации в очаге локальной ишемии различаются в зависимости от применяемого метода окрашивания срезов мозга (гистологическое окрашивание на липиды миелина LFB или иммуногистохимическое окрашивание к основному белку миелина MBP). Если оптическая плотность LFB значимо снижается уже на 1-е сутки после моделирования ишемии, то на срезах, окрашенных к основному белку миелина MBP демиелинизация значима только с 10-х суток. Вероятно, эти расхождения связаны с разными скоростями снижения синтеза, деградации и утилизации различных специфичных белков миелина, в том числе MBP, и липидов миелина, детектируемых с помощью окрашивания LFB, в процессе демиелинизации [Gudi et al., 2009]. Кроме того, необходимо отметить, что оптическая плотность LFB и MBP-позитивная площадь отражают разные характеристики миелинизации, и для более точного описания процессов разрушения миелина в очаге ишемии необходим целый набор различных маркеров. Согласно исследованиям V. Gudi с соавторами [Gudi et al., 2009], выполненным на специфической купризоновой модели демиелинизации, окрашивание LFB является усредненной характеристикой содержания миелина по сравнению с другими детектируемыми маркерами миелина, поэтому, вероятно, оценка LFB является наиболее чувствительной и точной в отношении изменений миелина. Как и большинство гистологических окрашиваний, окрашивание LFB подвержено ограничениям фонового окрашивания, неравномерности окрашивания и неустранимых вариаций интенсивности окрашивания, связанных с многочисленными факторами лабораторной работы. Использование нормализации к контралатеральному полушарию в нашем исследовании сглаживает эти проблемы. Подобным же образом решались ограничения при окрашивании срезов к MBP, поскольку процент позитивной площади указывает лишь на суммарную толщину пучков и не даёт никакой информации о состоянии миелина в их границах. Совмещение этих двух окрашиваний даёт лучшее представление о процессах демиелинизации, происходящих в очаге локальной ишемии.

Повреждение миелина в условиях ишемии происходит несколькими путями. В острой фазе интрамиелиновый отёк нарушает внутреннюю структуру миелиновой оболочки, что на гистологических срезах проявляется как бледность миелина [Han et al., 2017]. Далее этот процесс развивается в формирование вакуолей и разрушение миелиновой оболочки, за которой следует удаление нежизнеспособных остатков миелина микроглией и макрофагами [Burda et al., 2014 ; Han et al., 2017 ; Tanaka et al., 2008]. Параллельно на самых ранних стадиях развития ишемического инсульта начинается повреждение олигодендроцитов, которое препятствует последующей ремиелинизации [Dewar et al., 2003 ; McIver et al., 2010 ; Pantoni et al., 1996]. Вторичные механизмы потери миелина включают в себя антероградную (Валлерову) и ретроградную аксональную дегенерацию, которая возникает в хронической стадии инсульта [Hinman, 2014 ; Qin et al., 2012]. Наши наблюдения полностью согласуются с многочисленными исследованиями, которые демонстрируют снижение содержания миелина в ишемическом очаге с первых часов [Dewar et al., 2003 ; Han et al., 2017 ; Jing et al., 2013 ; Pantoni et al., 1996] после моделирования локальной ишемии у животных. Более того, слабая, но значимая корреляция между снижением оптической плотности LFB и увеличением количества Iba1+ клеток, по всей вероятности, отражает роль воспаления в деградации миелина [Benarroch, 2009 ; Burda et al., 2014 ; Han et al., 2017 ; Tanaka et al., 2008].

Хотя, в соответствии с нашими данными, потеря миелина и нейронов происходила в ядре ишемического очага одновременно, эти процессы характеризуются различной скоростью и степенью завершённости в тех временных рамках, в которых проводился эксперимент. В частности, демиелинизация, вероятно, является более медленным процессом по сравнению с гибелью нейронов, поскольку содержание миелина, обнаруженное на 10-е и 30-е сутки, значительно больше по сравнению с процентом сохранившихся нейронов. Обобщение полученных нами результатов, касающихся сравнения моделей ишемии головного мозга по параметрам демиелинизации, потери нейронов и воспалению, представлены в таблице 9.

Неожиданным для нас результатом оказалось разделение очага локальной ишемии на зону продолжающейся демиелинизации и зону увеличения плотности миелина. Разделение очага начиналось с 10-х суток после моделирования ишемии и локализовалось по периферии очага внутри зоны гибели нейронов, что доказывает, что данные изменения происходили именно в повреждённой нервной ткани, а не в здоровом околоочаговом окружении. Это явление было обнаружено и при окрашивании срезов антителами к основному белку миелина, и при окрашивании срезов LFB. Немногочисленные литературные данные свидетельствуют о подобных изменениях миелина в ишемическом очаге или около него [Jiang et al., 2006 ; Po et al., 2012]. C. Po с соавторами [Po et al., 2012] сообщают, что у крыс с моделированием локальной ишемии также наблюдалось увеличение плотности миелина, но не в самом очаге, а между зоной инфаркта и боковым желудочком того же полушария, причём это увеличение наблюдалось только при поражении caudoputamen вне зависимости от наличия коркового инсульта. МРТ данные авторов позволяют судить о том, что наблюдаемое увеличение плотности миелина связано с реорганизацией белого вещества, а именно внутренней капсулы, волокна которой предположительно из-за формирующегося в течение первой недели отёка были смещены ростральнее. Такая реорганизация могла включать в себя, в том числе, ремоделирование аксонов и их последующую ремиелинизацию [Po et al., 2012]. Поскольку внутренняя капсула непосредственно связана с мозолистым телом, важным оказывается и тот факт, что спонтанное функциональное восстановление наблюдалось только у крыс, у которых наблюдалось увеличение числа межполушарных волокон, лежащих в мозолистом теле [Po et al., 2012]. Таким образом, исходя из данных C. Po с соавторами, реорганизация белого вещества внутренней капсулы не настолько важна для функционального восстановления, как появление новых межполушарных связей. При этом существуют данные и о том, что подобное увеличение волокон мозолистого тела может негативно сказываться на функциональном восстановлении. S. Y. Kim с соавторами сообщают не только об уменьшении зоны представительства передней конечности в околоочаговой моторной коре, но и об увеличении числа аксодендритных синапсов и множественных синаптических уплотнений после преимущественного усиленного использования «здоровой» конечности в контралатеральном полушарии [Kim et al., 2015]. Эта синаптическая плотность негативно коррелировала с функциональным восстановлением, давая основания предполагать, что аберрантный синаптогенез, вероятно, межполушарных проекций в мозолистом теле, может вносить свой вклад в плохое функциональное восстановление. Примечательно, что животные с рассечением мозолистого тела не демонстрировали такого эффекта, и усиленное использование «здоровой» конечности не оказывало влияния на восстановление «повреждённой» конечности [Allred et al., 2010]. Исходя из литературных данных, однозначного вывода о природе обнаруженного нами феномена сделать нельзя, и для исследования механизмов такого структурного изменения тканей требуются дополнительные масштабные эксперименты.

4.2 Обсуждение результатов гистологической валидации и оценки специфичности MPF картирования в качестве маркера неинвазивной оценки содержания миелина

Наши исследования свидетельствуют о том, что MPF обнаруживает сильную корреляцию с гистологически определяемым содержанием миелина в тканях мозга в очаге ишемического инсульта на модели локальной ишемии. Коэффициент корреляции между оптической плотностью LFB и значениями MPF составил 0,81, а при введении в уравнение регрессии поправки на отёк на основе T_2-взвешенных изображений, коэффициент корреляции составил 0,89. Подобно предыдущим исследованиям картирования MPF здорового мозга крыс [Underhill et al., 2011] и демиелинизованного мозга мышей [Khodanovich et al., 2017], щенков с генетически обусловленной дисмиелинизацией [Samsonov et al., 2012] мы обнаружили сильную корреляцию между MPF и гистологически определяемым содержанием миелина в тканях мозга. Подобное исследование на модели ишемического инсульта было проведено впервые. Основываясь на наиболее быстрой на данный момент технологии картирования MPF, использующей реконструкцию синтетического референтного изображения [Naumova et al., 2017 ; Yarnykh, 2016], стало возможным создать протокол МРТ с общим временем сканирования в несколько минут, что подходит для клинических исследований ишемического инсульта.

Несмотря на сильную корреляцию между значениями MPF и оптической плотностью LFB, есть существенное и значимое различие между этими двумя показателями на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии. Было высказано предположение, что это может быть связано с влиянием накопления жидкости в очаге ишемии в связи с развитием цитотоксического отёка [Thrane et al., 2014], поскольку содержание воды в повреждённом полушарии достигает своего максимума именно на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии [Slivka et al., 1995]. Влияние отёка на значения MPF может быть количественно определено как разбавление макромолекулярного содержимого. Например, локальное увеличение содержания воды на 10 % (что является обычным для модели MCAO [Lin et al., 2000 ; Young et al., 1987]) может снизить абсолютные значения MPF примерно на 1 % от первоначальных 10 %. В переводе на процентные изменения, эффект 10 % разбавления полностью объясняет различия между MPF (около 30 %) и оптической плотностью LFB (около 20 %), наблюдаемые на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии. В то же время, MPF и гистология демонстрируют практически идентичную оценку потери миелина на более поздних стадиях формирования очага. Для того, чтобы подобрать комбинацию МР-параметров, которая обеспечивала бы максимально точное предсказание изменение оптической плотности LFB, то есть изменение содержания миелина, с коррекцией влияния отёка, был проведён множественный регрессионный анализ, который показал, что включение в регрессионную модель T_2 в качестве независимой переменной улучшает степень соответствия значений MPF оптической плотности LFB ($R = 0,89$). В то же время данное наблюдение должно быть предварительно рассмотрено и принято с осторожностью по двум причинам. Во-первых, данное исследование проверки концепции не было запланировано для точного тестирования модели множественной регрессии, и поэтому толщина срезов на картах T_2 может быть неподходящей для того, чтобы делать объективные заключения из данной регрессии. Во-вторых, наши результаты были получены с использованием высокопольного МРТ сканера и нуждаются в подтверждении на клинических аппаратах. В то время как MPF нечувствительна к величине магнитного поля, T_2 имеет сильную зависимость от магнитного поля [Naumova et al., 2017]. С учётом многокомпонентной природы T_2 в тканях и различной зависимости от поля этих компонент [Naumova et al., 2017], T_2, измеренный в разных магнитных полях, может демонстрировать разную чувствительность к отёку. Измерение T_2 с использованием режима «множественное эхо» также достаточно затратный по времени метод для рутинного клинического использования. Например, в исследовании K. L. West с соавторами [West et al., 2018] сканирование мозга мыши для получения мультиэкспоненционального T_2 изображения занимало около 6 часов.

Картирование MPF также позволило обнаружить разделение ишемического очага на зоны гипо- и гиперинтенсивности, соответствующие зоне продолжающейся демиелинизации и зоне увеличения плотности миенина – «зоне ремиелинизации», – обнаруживаемым по иммуногистохимическому окрашиванию к основному белку миелина MBP. В некоторых исследованиях такая «зона ремиелинизации», определяемая в последствие с помощью гистологического окрашивания (гематоксилин-эозин, LFB) также была обнаружена по периферии очага локальной ишемии с помощью картирования генерализованной фракционной анизотропии, определяемой с помощью DTI [Jiang et al., 2006 ; Po et al., 2012], однако авторы не проводили корреляционный анализ для установления связи между изменениями гистологических и МРТ параметров. Методы DTI и фМРТ часто используются для изучения реорганизации нервных волокон в головном мозге после локальной ишемии как у людей [Carter et al., 2010 ; Wang et al., 2010], так и на моделях с использованием животных [Kannurpatti et al., 2008 ; Liu et al., 2007 ; Abo et al., 2003 ; Sotak, 2002], однако они не дают однозначной информации о том, насколько сильна корреляция между изменениями МРТ данных и изменением содержания миелина [Ding et al., 2008 ; Jiang et al., 2006 ; van der Zijden et al., 2008].

Интересно, что в нашей работе не наблюдается различий между значениями MPF в разных полушариях в зоне ремиелинизации на 1-е сутки, что, возможно, свидетельствует о том, что данная зона формируется при расширении ядра ишемического очага, поскольку повреждается позднее. Поскольку расширение зоны очага обнаруживается между 1-и и 3-и сутками после моделирования ишемии, оно может быть обусловлено как дальнейшим повреждением зоны ишемической полутени, так и развитием зоны воспалительной полутени [Gauberti et al., 2014, 2016].

Таким образом, данное исследование демонстрирует применимость неинвазивной количественной оценки повреждения миелина в условиях локальной ишемии и обеспечивает гистологическую валидацию метода картирования MPF как инструмента визуализации и количественной оценки миелина на разных этапах формирования очага. Важно отметить, что, согласно результатам нашего исследования, MPF картирование является нечувствительным к различным патологическим процессам, протекающим в очаге ишемии, таким как потеря нейронов и воспаление, поскольку не обнаружена корреляция между изменениями значений MPF и изменениями в количестве определяемых клеток, что было продемонстрировано в более ранних исследованиях [Underhill et al., 2011]. Это подтверждает, что изменения содержания миелина являются главным патологическим субстратом изменений MPF. Отсутствие корреляции между MPF и пролиферацией и активацией микроглии и инфильтрацией макрофагов даёт основания утверждать, что MPF определяется, в первую очередь, глобальными изменениями в композиции ткани мозга в отношении миелина и содержания воды, а не специфичными клеточными компонентами, вызывающими эти изменения [Underhill et al., 2011]. Подобным же образом потеря нейронов оказывает пренебрежимо малое влияние на содержание макромолекул, определяемое с помощью MPF, по сравнению с демиелинизацией. Едва различимые изменения MPF, ассоциированные с насыщенностью клетками нервной ткани, также могли быть скомпенсированы замещением гибнущих нейронов и олигодендроцитов пролиферирующей микроглией и мигрирующими макрофагами.

Кроме метода картирования MPF существует ряд других магнитно-резонансных методов, применяемых исследователями для неинвазивной количественной оценки миелина. Так, например, MTR демонстрирует сильную корреляцию с содержанием миелина в структурах белого и серого вещества ($r = 0,96$, $p < 0,001$) и в структурах серого вещества ($r = 0,93$, $p = 0,021$), но не в белом веществе отдельно ($r = 0,21$, $p = 0,79$) [Underhill et al., 2011]. Кроме того на крысиной модели аллергического энцефаломиелита было показано, что MTR демонстрирует сниженную чувствительность к миелину на ранних этапах демиелинизации [Rausch et al., 2009]. В купризоновой модели демиелинизации MTR значимо коррелировал с толщиной миелиновых оболочек ($r = 0,72$, $p < 0,05$), однако степень корреляции этого же гистологического параметра с MPF была гораздо выше ($r = 0,93$, $p < 0,001$) [Thiessen et al., 2013].

Другой метод количественной оценки содержания миелина MWF – миелиновая водная фракция, – также демонстрирует существенную корреляцию с гистологически измеренным миелином (r^2 в разных исследованиях может варьироваться от 0,66 [West et al., 2018] до 0,79 [Laule et al., 2008]), однако имеются данные, что MWF может зависеть от водного обмена между компартментами, и, например, меньшие аксоны с более тонкой миелиновой оболочкой могут привести к заниженному значению MWF по сравнению с истинным содержанием миелина [Dortch et al., 2013a ; Dula et al., 2010 ; Harkins et al., 2012]. Высокая чувствительность MWF к содержанию тканевой жидкости также была показана в крысиной модели внутримиелинового отёка, когда увеличение водной фракции отёка (EWF) при отсутствии уменьшения содержания миелина (определённого гистологическими методами) приводило к значимому снижению MWF [Harkins et al., 2013]. Подобно этому, мы наблюдали снижение значений MPF относительно оптической плотности LFB на 1-е сутки после моделирования локальной ишемии в связи с развитием цитотоксического отёка.

Ещё один метод, который, как принято считать, может использоваться для оценки миелинизации – DTI и фракционная анизотропия [Aung et al., 2013 ; Dijkhuizen et al., 2012 ; Shemesh, 2018]. При этом одна часть исследований, определяющих корреляционную связь между диффузионными параметрами и содержанием миелина, основываются на сравнении DTI и MWF или других неинвазивных методов оценки содержания миелина [De Santis et al., 2014 ; Shemesh, 2018 ; Uddin et al., 2019]. Другая же часть исследований, оценивающая корреляцию DTI уже с гистологическими параметрами, оценивает содержание миелина исключительно в структурах белого вещества [Aung et al., 2013 ; Herrera et al., 2008 ; Song et al., 2005 ; Sun et al., 2006a, 2006b ; Xie et al., 2010] и почти везде – в привязке к аксонам. Тщательный анализ показывает, что, вероятно, корреляция между DTI и миелинизацией объясняется не непосредственной связью данных параметров, а связью их с нервными волокнами, и диффузия оказывается значимым показателем структуры нервной ткани, а не миелина как такового [Thiessen et al., 2013].

Ни один другой магнитно-резонансный показатель в нашем исследовании не коррелировал со снижением оптической плотности LFB окрашивания, что свидетельствует о высокой специфичности MPF в отношении миелина в отличие от других стандартных количественных магнитно-резонансных параметров, которые не коррелировали с оптической плотностью LFB и, следовательно, не могут оценивать демиелинизацию в условиях ишемии. С другой стороны, изменение значений MPF не было скоррелировано ни с гибелью нейронов, ни с активацией микроглии, что свидетельствует о независимости значений MPF от данных процессов, идущих параллельно с демиелинизацией в очаге ишемии [Khodanovich et al., 2018b].

Кроме основных выводов данного исследования необходимо упомянуть и несколько значимых корреляций между магнитно-резонансными и гистологическими параметрами, которые не связаны с содержанием миелина. В частности, процентные изменения T_2 и числа нейронов были скоррелированы между собой. Процентные изменения ADC коррелировали негативно с изменениями числа нейронов и позитивно – с изменениями числа Iba1+ клеток. В рамках единообразного определения процентных изменений по отношению к контралатеральному полушарию, использованного в данном исследовании, негативные изменения отражают в действительности увеличение параметра в очаге, и наоборот. Таким образом, наблюдаемые корреляции дают основание предположить, что с увеличением степени гибели нейронов снижается T_2 и увеличивается ADC, и, помимо этого, ADC увеличивается вместе с увеличением числа активированной микроглии и макрофагов в ядре ишемического очага. Возможным объяснением наблюдаемых закономерностей может быть относительная синхронность процессов развития и разрешения отёка, продолжающейся гибели нейронов, глиоза, воспаления и некроза, которые вызывают сходный комплекс изменений компартментализации воды в тканях. Временные рамки эксперимента соответствуют практически монотонным трендам снижения T_2 и увеличения ADC после достижения ими максимальных и минимальных значении, соответственно, в течение 24 часов после наступления ишемии мозга [Knight et al., 1994 ; Welch et al., 1995]. Более специфичным оказалось наблюдение примерного выравнивания ADC с контролем, связанного с одновременным существованием в мозге цитотоксического и вазогенного отёков [Knight et al., 1994 ; Pierpaoli et al., 1993 ; Welch et al., 1995]. Дальнейшее увеличение ADC является типичным атрибутом массивного некроза [Knight et al., 1994 ; Pierpaoli et al., 1993 ; Welch et al., 1995], что совпадает с выраженной потерей нейронов, наблюдаемой в данной работе. Падение T_2, вероятно, отражает снижение содержания воды в тканях в процессе разрешения вазогенного отёка от пиковых значений, появляющихся около 1-х суток после моделирования ишемии [Knight et al., 1994 ; Welch et al., 1995].

Данное исследование демонстрирует особенности демиелинизации в различных моделях ишемии головного мозга, взаимоотношения этого процесса с процессами гибели нейронов и воспаления, а также возможность картирования макромолекулярной протонной фракции MPF достоверно и точно количественно оценивать повреждение миелина в MCAO модели локальной ишемии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена экспериментальному исследованию демиелинизации при ишемии головного мозга. В первой части работы впервые были сопоставлены две принципиально разные модели ишемии головного мозга по выраженности, локализации и временным характеристикам потери миелина. В модели тотальной ишемии головного мозга демиелинизация обусловлена гибелью пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа, поскольку слои stratum oriens и substratum radiatum, подверженные демиелинизации (потеря миелина составляет 21,5 % и 27 % соответственно на 10-е сутки после операции), содержат откростки именно этих нервных клеток. Однако при продолжающейся гибели нейронов поля CA1 (с 59 % на 10-е сутки до 80 % на 30-е сутки), демиелинизация вышеуказанных слоев гиппокампа значимо не усиливается. Это согласуется с результатами, полученными в нашей работе относительно воспаления после моделирования тотальной ишемии головного мозга: количество активированной микроглии в этот период не увеличивается и даже несколько снижается. При моделировании локальной ишемии степень повреждения миелина значительно выше, чем при моделировании тотальной ишемии, начинается с первых суток и достигает 78 % к 30-м суткам после ишемического воздействия. Мы также обнаружили, что содержание миелина негативно коррелировало с количеством активированной микроглии в модели локальной ишемии. Этот факт ещё раз подтверждает предположение о том, что микроглия принимает непосредственное участие в процессах разрушения миелина в условиях ишемии головного мозга.

Одним из важных результатов является обнаруженный нами феномен разделения очага локальной ишемии с 10-х суток после операции на две зоны, существенно различающиеся по содержанию миелина. В одной из этих зон продолжается выраженная демиелинизация, в то время как в другой происходит увеличение плотности миелина. Указанные различия усиливаются к 30-м суткам наблюдений. Изучение зоны увеличения плотности миелина по периферии ишемического очага представляется перспективным направлением будущих исследований: мы предполагаем, что формирование зоны усиления плотности миелина может отражать функциональное восстановление связей между нейронами и, в конечном итоге, частичное восстановление утраченных в результате ишемического инсульта функций мозга.

Вторая часть работы посвящена апробации и гистологической валидации недавно разработанного магнитно-резонансного метода картирования макромолекулярной протонной фракции (MPF) для количественной оценки содержания миелина на модели локальной ишемии головного мозга. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что параметр MPF обнаруживает сильную корреляцию с гистологически определяемым содержанием миелина при локальной ишемии. Данный параметр является высокоспецифичным в отношении миелина, поскольку не зависит от изменения прочих клеточных компонентов нервной системы, таких как нейроны или микроглия, и, в то же время параметры других стандартных методов магнитно-резонансной томографии (T_1, T_2, PD и ADC) не обнаружили значимой корреляции с содержанием миелина в тканях. При этом необходимо отметить, что в условиях ишемии, особенно в острую фазу формирования очага, целесообразным представляется корректировка значений макромолекулярной протонной фракции с помощью параметра T_2, поскольку таким образом можно достичь наибольшей точности в определении содержания миелина даже при формировании отёка. Способность метода картирования макромолекулярной протонной фракции визуализировать зону демиелинизации ишемического очага и зону увеличения плотности миелина может оказаться весьма полезной для мониторинга пациентов с инсультом в подострую и хроническую фазы заболевания, особенно в контексте возможной реструктуризации белого вещества головного мозга в процессе функционального восстановления.

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 CA1, где наблюдается максимальная гибель нейронов и активация микроглии. На фоне продолжающейся гибели нейронов поля CA1 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.

Таким образом, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы результаты существенно расширяют представления о процессах демиелинизации в условиях ишемического повреждения головного мозга, а валидация метода картирования макромолекулярной протонной фракции позволяет рекомендовать её к использованию для наблюдения пациентов с ишемическим инсультом в клинике.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор

АК – адгезивные контакты

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЧД – внутричерепное давление

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

КТ – компьютерная томография

КТА – компьютерная томография-ангиография

МРА – магнитно-резонансная ангиография

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПК – плотные контакты

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

ТИА – транзиторная ишемическая атака

ТКД – транскраниальное Допплеровское обследование

ЦНС – центральная нервная система

ADC – apparent diffusion coefficient, измеряемый коэффициент диффузии

AFI – actual flip angle imaging, визуализация актуального угла поворота

AMPA – α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

BCL2 – B-cell lymphoma 2, B-клеточная лимфома 2 (ген)

CNP – 2’,3’-cyclic nucleotide 3’-phosphodiesterase, фосфодиэстераза циклических нуклеотидов

DG – dentate gyrus, зубчатая извилина

DTI – diffusion tensor imaging, диффузионно-тензорное изображение

DWI – diffusion weighted imaging, диффузионно-взвешенное изображение

EWF – edema water fraction, водная фракция отёка

FRAIR – fluid-attenuated inversion recovery, режим с подавлением сигнала свободной воды

GLAST – glutamate aspartate transporter, глутамат-аспартатный переносчик

GLT-1 – glutamate transporter 1, переносчик глутамата 1

GluN1 – N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1, субъединица NR1 рецептора NMDA

GRASE – gradient and spin echo, градиентно-спиновое эхо

Iba1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1, ионизированная кальций-связывающая молекула 1

LFB – luxol fast blue, люксоль быстрый синий

LFB OD – LFB optical density, оптическая плотность окрашивания LFB

MBP – myelin basic protein, основной белок миелина

MCAO – middle cerebral artery occlusion, окклюзия средней мозговой артерии

mcDESPOT – multicomponent driven equilibrium single pulse observation of T_1 and T_2, многокомпонентное равновесное одноимпульсное наблюдение T_1 и T_2

MMP – matrix metalloproteinases, матриксные металлопротеазы

MOG – myelin oligodendrocyte glycoprotein, миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин

MPF – macromolecular proton fraction, макромолекулярная протонная фракция

MSME – multiple spin-echo, множественное спин-эхо

MT – magnetization transfer, перенос намагниченности

MTR – magnetization transfer rate, скорость переноса намагниченности

MWF – myelin water fraction, миелиновая водная фракция

NeuN – neuronal nuclei, нейрональный ядерный антиген

NMDA – N-метил-D-аспартат

NSS – neurology severity score, шкала тяжести неврологического повреждения

PBS – phosphate-buffered saline, фосфатный буфер

PC – percentage changes, процентные изменения

PD – proton density, протонная плотность

PLP – proteolipid protein, протеолипидный протеин

PWI – perfusion weighted imaging, перфузионно-взвешенное изображение

SPF – specific pathogen free, свободные от патогенов животные

SWI – susceptibility-weighted imaging, последовательность, взвешенная по магнитной восприимчивости

TE – time echo, время отклика

TNFα – tumor necrosis factor α, фактор некроза опухоли α

TR – time repetition, время повторения

xCT – cystine glutamate exchanger, цистин-глутаматный обменник

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонь Е. И. Строение и развитие гиппокампа крысы / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 132–138.

2. Стаховская Л. В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009–2010) / Л. В. Стаховская, О. А. Клочихина, М. Д. Богатырева, В. В. Коваленко // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2013. – № 5. – С. 4–10.

3. 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. – 2016а. – Т. 161, № 3. – С. 325–329.

4. Ходанович М. Ю. Восстановительный постишемический нейрогенез : перспективы клинического применения / М. Ю. Ходанович, А. А. Кисель // Трансляционная медицина. – 2016б. – Т. 3, № 6. – С. 21–31.

5. Ходанович М. Ю. Усиление продукции новых нейронов в поле CA1 гиппокампа крыс под воздействием n-тирозола на модели тотальной транзиторной ишемии головного мозга / М. Ю. Ходанович, А. А. Кисель, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, М. С. Кудабаева, Е. П. Крутенкова, Я. А. Тюменцева, М. Б. Плотников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 8. – С. 176–180.

6. Abo M. Functional recovery after brain lesion-contralateral neuromodulation : an fMRI study / M. Abo, Z. Chen, L.-J. Lai, T. Reese, B. Bjelke // Neuroreport. – 2001. – Vol. 12, № 7. – P. 1543–1547.

7. Alix J. J. P. Glutamate receptor-mediated ischemic injury of premyelinated central axons / J. J. P. Alix, R. Fern // Annals of Neurology. – 2009. – Vol. 66, № 5. – P. 682–693.

8. Allen L. M. Sequence-specific MR imaging findings that are useful in dating ischemic stroke / L. M. Allen, A. N. Hasso, J. Handwerker, H. Farid // RadioGraphics. – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 1285–1297.

9. Allred R. P. The «good» limb makes the «bad» limb worse : experience-dependent interhemispheric disruption of functional outcome after cortical infarcts in rats / R. P. Allred, C. H. Cappellini, T. A. Jones // Behavioral Neuroscience. – 2010. – Vol. 124, № 1. – P. 124–132.

10. Anthony D. C. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke / D. C. Anthony, B. Ferguson, M. K. Matyzak, K. M. Miller, M. M. Esiri, V. H. Perry // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 1997. – Vol. 23, № 5. – P. 406–415.

11. Asahi M. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia / M. Asahi, X. Wang, T. Mori, T. Sumii, J. C. Jung, M. A. Moskowitz, M. E. Fini, E. H. Lo // The Journal of Neuroscience. – 2001. – Vol. 21, № 19. – P. 7724–7732.

12. Atochin D. N. An improved three-vessel occlusion model of global cerebral ischemia in rats / D. N. Atochin, G. A. Chernysheva, O. I. Aliev, V. I. Smolyakova, A. N. Osipenko, S. V. Logvinov, A. A. Zhdankina, T. M. Plotnikova, M. B. Plotnikov // Brain Research Bulletin. – 2017. – Vol. 132. – P. 213–221.

13. Atochin D. Role of eNOS in water exchange index maintenance-MRI studies [Electronic resource] / D. Atochin, M. Litvak, S. Huang, Y. R. Kim, P. Huang // Journal of Physics: Conference Series. – 2017. – Vol. 886 : 3rd International Conference and Young Scientist School «Magnetic Resonance Imaging in Biomedical Research». Novosibirsk, November 24–26, 2016. – Atricle number 012002. – 4 p. – URL : https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/886/1/012002/pdf (access date : 15.07.2019).

14. Aung Y. W. Diffusion tensor imaging as biomarker in axonal and myelin damage / Y. W. Aung, S. Mar, T. L. Benzinger // Imaging in Medicine. – 2013. – Vol. 5, № 5. – P. 427–440.

15. Ay H. Conversion of ischemic brain tissue into infarction increases with age / H. Ay, W. J. Koroshetz, M. Vangel, T. Benner, C. Melinosky, M. Zhu, N. Menezes, C. J. Lopez, A. G. Sorensen // Stroke. – 2005. – Vol. 36, № 12. – P. 2632–2636.

16. Ayata C. Ischaemic brain oedema / C. Ayata, A. H. Ropper // Journal of Clinical Neuroscience. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 113–124.

17. Bach-y-Rita P. Theoretical and practical considerations in the restoration of function after stroke / P. Bach-y-Rita // Topics in Stroke Rehabilitation. – 2001. – Vol. 8, № 3. – P. 1–15.

18. Back S. A. Emerging concepts in periventricular white matter injury / S. A. Back, S. A. Rivkees // Seminars in Perinatology. – 2004. – Vol. 28, № 6. – P. 405–414.

19. Bailey E. L. Pathology of lacunar ischemic stroke in humans – a systematic review / E. L. Bailey, C. Smith, C. L. M. Sudlow, J. M. Wardlaw // Brain Pathology. – 2012. – Vol. 22, № 5. – P. 583–591.

20. Balbinot G. Compensatory relearning following stroke : cellular and plasticity mechanisms in rodents [Electronic resource] / G. Balbinot, C. P. Schuch // Frontiers in Neuroscience. – 2019. – Vol. 12. – Article number 1023. – 22 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.01023/full (access date : 15.07.2019).

21. Ballabh P. The blood–brain barrier : an overview. Structure, regulation, and clinical implications / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard // Neurobiology of Disease. – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 1–13.

22. Baltan S. Age-specific localization of NMDA receptors on oligodendrocytes dictates axon function recovery after ischemia / S. Baltan // Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 110, pt. B. – P. 626–632.

23. Baltan S. Excitotoxicity and mitochondrial dysfunction underlie age-dependent ischemic white matter injury / S. Baltan // Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain / ed. V. Parpura, A. Schousboe, A. Verkhratsky. – Cham, 2014. – Chap. 8. – P. 151–170.

24. Baltan S. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity / S. Baltan, E. F. Besancon, B. Mbow, Z. Ye, M. A. Hamner, B. R. Ransom // Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28, № 6. – P. 1479–1489.

25. Bamford J. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction / J. Bamford, P. Sandercock, M. Dennis, J. Burn, C. Warlow // Lancet. – 1991. – Vol. 337, № 8756. – P. 1521–1526.

26. Barros L. F. Ion movements in cell death : from protection to execution / L. F. Barros, J. Castro, C. X. Bittner. // Biological Research. – 2002. – Vol. 35, № 2. – P. 209–214.

27. Battey T. W. K. Brain edema predictsoutcome after non-lacunar ischemic stroke / T. W. K. Battey, M. Karki, A. B. Singhal, O. Wu, S. Sadaghiani, B. C. V. Campbell, S. M. Davis, G. A. Donnan, K. N. Sheth, W. T. Kimberly // Stroke. – 2014. – Vol. 45, № 12. – P. 3643–3648.

28. Becker K. J. Antibodies to myelin basic protein are associated with cognitive decline after stroke / K. J. Becker, P. Tanzi, D. Zierath, M. S. Buckwalter // Journal of Neuroimmunology. – 2016. – Vol. 295–296. – P. 9–11.

29. Becker K. J. Autoimmune responses to the brain after stroke are associated with worse outcome / K. J. Becker, A. J. Kalil, P. Tanzi, D. K. Zierath, A. V. Savos, J. M. Gee, J. Hadwin, K. T. Carter, D. Shibata, K. C. Cain // Stroke. – 2011. – Vol. 42, № 10. – P. 2763–2769.

30. Becker K. J. Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide / K. J. Becker, D. L. Kindrick, M. P. Lester, C. Shea, Z. C. Ye // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2005. – Vol. 25, № 12. – P. 1634–1644.

31. Begley D. J. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier / D. J. Begley, M. W. Brightman // Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System. Progress in Drug Research / ed. L. Prokai, K. Prokai-Tatrai. – Basel, 2003. – P. 39–78. – (Progress in Drug Research; vol. 61).

32. Benakis C. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia [Electronic resource] / C. Benakis, L. Garcia-Bonilla, C. Iadecola,

J. Anrather // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2015. – Vol. 8. – Article number 461. – 16 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00461/full (access date : 15.07.2019).

33. Benarroch E. E. Oligodendrocytes : susceptibility to injury and involvement in neurologic disease / E. E. Benarroch // Neurology. – 2009. – Vol. 72, № 20. – P. 1779–1785.

34. Borich M. R. Evaluation of white matter myelin water fraction in chronic stroke / M. R. Borich, A. L. MacKay, I. M. Vavasour, A. Rauscher, L. A. Boyd // NeuroImage : Clinical. – 2013. – Vol. 2. – P. 569–580.

35. Bornstein N. M. Antibodies to brain antigens following stroke / N. M. Bornstein, B. Aronovich, A. D. Korczyn, S. Shavit, D. M. Michaelson, J. Chapman // Neurology. – 2001. – Vol. 56, № 4. – P. 529–530.

36. Boyko M. An experimental model of focal ischemia using an internal carotid artery approach / M. Boyko, A. Zlotnik, B. F. Gruenbaum, S. E. Gruenbaum, S. Ohayon, T. Goldsmith, R. Kotz, A. Leibowitz, E. Sheiner, Y. Shapira, V. I. Teichberg // Journal of Neuroscience Methods. – 2010. – Vol. 193, № 2. – P. 246–253.

37. Braeuninger S. Rodent models of focal cerebral ischemia : procedural pitfalls and translational problems [Electronic resource] / S. Braeuninger, C. Kleinschnitz // Experimental and Translational Stroke Medicine. – 2009. – Vol. 1. – Article number 8. – 11 p. – URL : https://etsmjournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/2040-7378-1-8 (access date : 15.07.2019).

38. Brogan M. E. Treatment of malignant brain edema and increased intracranial pressure after stroke [Electronic resource] / M. E. Brogan, E. M. Manno // Current Treatment Options in Neurology. – 2015. – Vol. 17, № 1. – Article number 327. – 11 p. – URL : https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11940-014-0327-0.pdf (access date : 15.07.2019).

39. Bruce A. J. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors / A. J. Bruce, W. Boling, M. S. Kindy, J. Peschon, P. J. Kraemer, M. K. Carpenter, F. W. Holtsberg, M. P. Mattson // Nature Medicine. – 1996. – Vol. 2, № 7. – P. 788–794.

40. Burda J. E. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease / J. E. Burda, M. V. Sofroniew // Neuron. – 2014. – Vol. 81, № 2. – P. 229–248.

41. Butt A. M. Neurotransmitter signaling in white matter / A. M. Butt, R. F. Fern, C. Matute // Glia. – 2014. – Vol. 62, № 11. – P. 1762–1779.

42. Callaghan M. F. A general linear relaxometry model of R1 using imaging data / M. F. Callaghan, G. Helms, A. Lutti, S. Mohammadi, N. Weiskopf // Magnetic Resonance in Medicine. – 2015. – Vol. 73, № 3. – P. 1309–1314.

43. Cammer W. Carbonic anhydrase in oligodendrocytes and myelin in the central nervous system / W. Cammer // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1984. – Vol. 429. – P. 494–497.

44. Canazza A. Experimental models of brain ischemia : a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies [Electronic resource] / A. Canazza, L. Minati, C. Boffano, E. Parati, S. Binks // Frontiers in Neurology. – 2014. – Vol. 5. – Article number 19. – 15 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2014.00019/full (access date : 15.07.2019).

45. Cardiac arrest : the science and practice of resuscitation medicine / ed. N. A. Paradis, H. R. Halperin, K. B. Kern, V. Wenzel, D. A. Chamberlain. – 2nd edit. – New York : Cambridge university press, 2007. – 1338 p.

46. Carter A. R. Resting interhemispheric functional magnetic resonance imaging connectivity predicts performance after stroke / A. R. Carter, S. V. Astafiev, C. E. Lang, L. T. Connor, J. Rengachary, M. J. Strube, D. L. W. Pope, G. L. Shulman, M. Corbetta // Annals of Neurology. – 2010. – Vol. 67, № 3. – P. 365–375.

47. Ceckler T. L. Dynamic and chemical factors affecting water proton relaxation by macromolecules / T. L. Ceckler, S. D. Wolff, V. Yip, S. A. Simon, R. S. Balaban // Journal of Magnetic Resonance. – 1992. – Vol. 98, № 3. – P. 637–645.

48. Cercignani M. Three-dimensional quantitative magnetisation transfer imaging of the human brain / M. Cercignani, M. R. Symms, K. Schmierer, P. A. Boulby, D. J. Tozer, M. Ron, P. S. Tofts, G. J. Barker // NeuroImage. – 2005. – Vol. 27, № 2. – P. 436–441.

49. Chen Y. Cerebral white matter injury and damage to myelin sheath following whole-brain ischemia / Y. Chen, Q. Yi, G. Liu, X. Shen, L. Xuan, Y. Tian // Brain Research. – 2013. – Vol. 1495. – P. 11–17.

50. Chernysheva G. A. Evaluation of survival and neurological deficit in rats in the new model of global transient cerebral ischemia / G. A. Chernysheva, V. I. Smol'yakova, A. N. Osipenko, M. B. Plotnikov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 158, № 2. – P. 197–199.

51. Chida Y. The alterations of oligodendrocyte, myelin in corpus callosum, and cognitive dysfunction following chronic cerebral ischemia in rats / Y. Chida, Y. Kokubo, S. Sato, A. Kuge, S. Takemura, R. Kondo, T. Kayama // Brain Research. – 2011. – Vol. 1414. – P. 22–31.

52. Choi S. Magnetic resonance imaging characteristics of ischemic brain infarction over time in a canine stroke model / S. Choi, D. Noh, Y. Kim, I. Jeong, H. Choi, Y. Lee, K. Lee // Journal of Veterinary Science. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 137–143.

53. Clark A. W. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia / A. W. Clark, C. A. Krekoski, S. S. Bou, K. R. Chapman, D. R. Edwards // Neuroscience Letters. – 1997. – Vol. 238, № 1–2. – P. 53–56.

54. Coert B. A. Reproducibility of cerebral cortical infarction in the Wistar rat after middle cerebral artery occlusion / B. A. Coert, R. E. Anderson, F. B. Meyer // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 1999. – Vol. 8, № 6. – P. 380–387.

55. Connor J. R. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination / J. R. Connor, S. L. Menzies // Glia. – 1996. – Vol. 17, № 2. – P. 83–93.

56. Copen W. A. Ischemic stroke : effects of etiology and patient age on the time course of the core apparent diffusion coefficient / W. A. Copen, L. H. Schwamm, R. G. Gonza, C. B. Harmath, P. W. Schaefer, W. J. Koroshetz, A. G. Sorensen // Radiology. – 2001. – Vol. 221, № 1. – P. 27–34.

57. D'Haeseleer M. Cerebral hypoperfusion : a new pathophysiologic concept in multiple sclerosis? / M. D'Haeseleer, S. Hostenbach, I. Peeters, S. El Sankari,

G. Nagels, J. De Keyser, M. B. D'Hooghe // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2015. – Vol. 35, № 9. – P. 1406–1410.

58. Dacosta-Aguayo R. Structural integrity of the contralesional hemisphere predicts cognitive impairment in ischemic stroke at three months [Electronic resource] / R. Dacosta-Aguayo, M. Graña, M. Fernández-Andújar, E. López-Cancio, C. Cáceres, N. Bargalló, M. Barrios, I. Clemente, P. T. Monserrat, M. A. Sas, A. Dávalos, T. Auer, M. Mataró // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 1. – Article number e86119. – 11 p. – URL : https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086119 (access date : 15.07.2019).

59. Dambinova S. A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke / S. A. Dambinova, G. A. Khounteev, G. A. Izykenova, I. G. Zavolokov, A. Y. Ilyukhina, A. A. Skoromets // Clinical Chemistry. – 2003. – Vol. 49, № 10. – P. 1752–1762.

60. Danton G. H. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke / G. H. Danton, W. D. Dietrich // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. – 2003. – Vol. 62, № 2. – P. 127–136.

61. Davalos D. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo / D. Davalos, J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin, W. B. Gan // Nature Neuroscience. – 2005. – Vol. 8, № 6. – P. 752–758.

62. De Santis S. Why diffusion tensor MRI does well only some of the time : variance and covariance of white matter tissue microstructure attributes in the living human brain / S. De Santis, M. Drakesmith, S. Bells, Y. Assaf, D. K. Jones // NeuroImage. – 2014. – Vol. 89. – P. 35–44.

63. Dewar D. Oligodendrocytes and ischemic brain injury / D. Dewar, S. M. Underhill, M. P. Goldberg // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2003. – Vol. 23, № 3. – P. 263–274.

64. Dijkhuizen R. M. Functional MRI and diffusion tensor imaging of brain reorganization after experimental stroke / R. M. Dijkhuizen, K. van der Marel, W. M. Otte, E. I. Hoff, J. P. van der Zijden, A. van der Toorn, M. P. A. van Meer // Translational Stroke Research. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 36–43.

65. Ding G. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats / G. Ding, Q. Jiang, L. Li, L. Zhang, Z. G. Zhang, K. A. Ledbetter, S. Panda, S. P. N. Davarani, H. Athiraman, Q. Li, J. R. Ewing, M. Chopp // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2008. – Vol. 28, № 8. – P. 1440–1448.

66. Dortch R. D. Characterizing inter-compartmental water exchange in myelinated tissue using relaxation exchange spectroscopy / R. D. Dortch, K. D. Harkins, M. R. Juttukonda, J. C. Gore, M. D. Does // Magnetic Resonance in Medicine. – 2013a. – Vol. 70, № 5. – P. 1450–1459.

67. Dortch R. D. Quantitative magnetization transfer imaging of human brain at 7 T / R. D. Dortch, J. Moore, K. Li, M. Jankiewicz, D. F. Gochberg, J. A. Hirtle, J. C. Gore, S. A. Smith // NeuroImage. – 2013b. – Vol. 64. – P. 640–649.

68. Doyle K. P. B-lymphocyte-mediated delayed cognitive impairment following stroke / K. P. Doyle, L. N. Quach, M. Sole, R. C. Axtell, T.-V. V. Nguyen, G. J. Soler-Llavina, S. Jurado, J. Han, L. Steinman, F. M. Longo, J. A. Schneider, R. C. Malenka, M. S. Buckwalter // Journal of Neuroscience. – 2015. – Vol. 35, № 5. – P. 2133–2145.

69. Doyle K. P. Mechanisms of ischemic brain damage / K. P. Doyle, R. P. Simon, M. P. Stenzel-Poore // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 310–318.

70. Doyle S. Vesicular glutamate release from central axons contributes to myelin damage [Electronic resource] / S. Doyle, D. B. Hansen, J. Vella, P. Bond, G. Harper, C. Zammit, M. Valentino, R. Fern // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9. – Article number 1032. – 15 p. – URL : https://www.nature.com/articles/s41467-018-03427-1.pdf (access date : 15.07.2019).

71. Dula A. N. Multiexponential T_2, magnetization transfer, and quantitative histology in white matter tracts of rat spinal cord / A. N. Dula, D. F. Gochberg, H. L. Valentine, W. M. Valentine, M. D. Does // Magnetic Resonance in Medicine. – 2010. – Vol. 63, № 4. – P. 902–909.

72. Durukan A. Acute ischemic stroke : overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia / A. Durukan, T. Tatlisumak // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 179–197.

73. Durukan T. A. TIA model is attainable in Wistar rats by intraluminal occlusion of the MCA for 10 min or shorter / T. A. Durukan, E. Tatlisumak, E. Pedrono, U. Abo-Ramadan, T. Tatlisumak // Brain Research. – 2017. – Vol. 1663. – P. 166–173.

74. Eizenberg O. P53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells / O. Eizenberg, A. Faber-Elman, E. Gottlieb, M. Oren, V. Rotter, M. Schwartz // Molecular and Cellular Biology. – 1996. – Vol. 16, № 9. – P. 5178–5185.

75. Fehm H. L. The selfish brain : competition for energy resources / H. L. Fehm, W. Kern, A. Peters // Hypothalamic Integration of Energy Metabolism / ed. A. Kalsbeek, E. Fliers, M. A. Hofman, D. F. Swaab, E. J. W. van Someren, R. M. Buijs – Amsterdam, 2006. – Chap. 7. – P. 129–140. – (Progress in Brain Research; vol. 153).

76. Feigin V. L. Global and regional burden of stroke during 1990–2010 : findings from the global burden of disease study 2010 / V. L. Feigin, M. H. Forouzanfar, R. Krishnamurthi, G. A. Mensah, M. Connor, D. A. Bennett, A. E. Moran, R. L. Sacco, L. Anderson, T. Truelsen, M. O'Donnell, N. Venketasubramanian, S. Barker-Collo, C. M. M. Lawes, W. Wang, Y. Shinohara, E. Witt, M. Ezzati, M. Naghavi, C. Murray // Lancet. – 2014. – Vol. 383, № 9913. – P. 245–254.

77. Feng W. Corticospinal tract lesion load : an imaging biomarker for stroke motor outcomes / W. Feng, J. Wang, P. Y. Chhatbar, C. Doughty, D. Landsittel, V. A. Lioutas, S. A. Kautz, G. Schlaug // Annals of Neurology. – 2015. – Vol. 78, № 6. – P. 860–870.

78. Fern R. Glutamate receptors and white matter stroke / R. Fern, C. Matute // Neuroscience Letters. – 2019. – Vol. 694. – P. 86–92.

79. Fern R. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes : a fatal glutamate release feedback loop / R. Fern, T. Möller // The Journal of Neuroscience. – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 34–42.

80. Fiehler J. Predictors of apparent diffusion coefficient normalization in stroke patients / J. Fiehler, K. Knudsen, T. Kucinski, C. S. Kidwell, J. R. Alger, G. Thomalla, B. Eckert, O. Wittkugel, C. Weiller, H. Zeumer, J. Röther // Stroke. – 2004. – Vol. 35, № 2. – P. 514–519.

81. Fluri F. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research / F. Fluri, M. Schuhmann, C. Kleinschnitz // Drug Design, Development and Therapy. – 2015. – Vol. 9. – P. 3445–3454.

82. Flynn R. W. V. The cost of cerebral ischaemia / R. W. V. Flynn, R. S. M. MacWalter, A. S. F. Doney // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 250–256.

83. Follett P. L. Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia : a protective role for topiramate / P. L. Follett, W. Deng, W. Dai, D. M. Talos, L. J. Massillon, P. A. Rosenberg, J. J. Volpe, F. E. Jensen // Journal of Neuroscience. – 2004. – Vol. 24, № 18. – P. 4412–4420.

84. Fonnum F. Glutamate : a neurotransmitter in mammalian brain / F. Fonnum // Journal of Neurochemistry. – 1984. – Vol. 42, № 1. – P. 1–11.

85. Fukunaga M. Layer-specific variation of iron content in cerebral cortex as a source of MRI contras / M. Fukunaga, T.-Q. Li, P. van Gelderen, J. A. de Zwart, K. Shmueli, B. Yao, J. Lee, D. Maric, M. A. Aronova, G. Zhang, R. D. Leapman, J. F. Schenck, H. Merkle, J. H. Duyn // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107, № 8. – P. 3834–3839.

86. Fumagalli S. The ischemic environment drives microglia and macrophage function [Electronic resource] / S. Fumagalli, C. Perego, F. Pischiutta, E. R. Zanier, M. G. De Simoni // Frontiers in Neurology. – 2015. – Vol. 6. – Article 81. – 19 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2015.00081/full (access date : 15.07.2019).

87. Gallo V. Glutamate receptors in glia : new cells, new inputs and new functions / V. Gallo, C. A. Ghiani // Trends in Pharmacological Sciences. – 2000. – Vol. 21, № 7. – P. 252–258.

88. Gary D. S. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor / D. S. Gary, A. J. Bruce-Keller, M. S. Kindy, M. P. Mattson // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 1998. – Vol. 18, № 12. – P. 1283–1287.

89. Gauberti M. Molecular magnetic resonance imaging of brain-immune interactions [Electronic resource] / M. Gauberti, A. Montagne, A. Quenault, D. Vivien // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – Article number 389. – 20 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00389/full (access date : 15.07.2019).

90. Gauberti M. The «inflammatory penumbra» in ischemic stroke : from clinical data to experimental evidence / M. Gauberti, S. M. De Lizarrondo, D. Vivien // European Stroke Journal. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 20–27.

91. Giffard R. G. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes / R. G. Giffard, R. A. Swanson // Glia. – 2005. – Vol. 50, № 4. – P. 299–306.

92. Ginis I. TNF-α-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kB transactivation : the role of NF-kB association with p300 adaptor / I. Ginis, R. Jaiswal, D. Klimanis, J. Liu, J. Greenspon, J. M. Hallenbeck // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2002. – Vol. 22, № 2. – P. 142–152.

93. Ginsberg M. D. Rodent models of cerebral ischemia / M. D. Ginsberg, R. Busto // Stroke. – 1989. – Vol. 20, № 12. – P. 1627–1642.

94. Glasser M. F. Mapping human cortical areas in vivo based on myelin content as revealed by T_1- and T_2-weighted MRI / M. F. Glasser, D. C. Van Essen // Journal of Neuroscience. – 2011. – Vol. 31, № 32. – P. 11597–11616.

95. Gloor M. Nonbalanced SSFP-based quantitative magnetization transfer imaging / M. Gloor, K. Scheffler, O. Bieri // Magnetic Resonance in Medicine. – 2010. – Vol. 64, № 1. – P. 149–156.

96. Gloor M. Quantitative magnetization transfer imaging using balanced SSFP / M. Gloor, K. Scheffler, O. Bieri // Magnetic Resonance in Medicine. – 2008. – Vol. 60, № 3. – P. 691–700.

97. Gochberg D. F. Quantitative imaging of magnetization transfer using an inversion recovery sequence / D. F. Gochberg, J. C. Gore // Magnetic Resonance in Medicine. – 2003. – Vol. 49, № 3. – P. 501–505.

98. Gochberg D. F. Quantitative magnetization transfer imaging via selective inversion recovery with short repetition times / D. F. Gochberg, J. C. Gore // Magnetic Resonance in Medicine. – 2007. – Vol. 57, № 2. – P. 437–441.

99. González R. G. Diffusion-weighted MR imaging : diagnostic accuracy in patients imaged within 6 hours of stroke symptom onset / R. G. González, P. W. Schaefer, F. S. Buonanno, L. H. Schwamm, R. F. Budzik, G. Rordorf, B. Wang, A. G. Sorensen, W. J. Koroshetz // Radiology. – 1999. – Vol. 210, № 1. – P. 155–162.

100. González R. G. MRI and MRA of ischemic stroke / R. G. González // Primer on Cerebrovascular Diseases / ed. L. R. Caplan, J. Biller, M. C. Leary, E. H. Lo, A. J. Thomas, M. Yenari, J. H. Zhang. – London , 2017. – P. 695–702.

101. Grandin C. B. Assessment of brain perfusion with MRI : methodology and application to acute stroke / C. B. Grandin // Neuroradiology. – 2003. – Vol. 45, № 11. – P. 755–766.

102. Gu Y. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury / Y. Gu, G. Zheng, M. Xu, Y. Li, X. Chen, W. Zhu, Y. Tong, S. K. Chung, K. J. Liu, J. Shen // Journal of Neurochemistry. – 2012. – Vol. 120, № 1. – P. 147–156.

103. Gudi V. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination / V. Gudi, D. Moharregh-Khiabani, T. Skripuletz, P. N. Koutsoudaki, A. Kotsiari, J. Skuljec, C. Trebst, M. Stangel // Brain Research. – 2009. – Vol. 1283. – P. 127–138.

104. Hacke W. «Malignant» middle cerebral artery territory infarction : clinical course and prognostic signs / W. Hacke, S. Schwab, M. Horn, M. Spranger, M. De Georgia, R. von Kummer // Archives of Neurology. – 1996. – Vol. 53, № 4. – P. 309–315.

105. Halefoglu A. M. Susceptibility weighted imaging : clinical applications and future directions / A. M. Halefoglu, D. M. Yousem // World Journal of Radiology. – 2018. – Vol. 10, № 4. – P. 30–45.

106. Hamner M. A. Anaerobic function of CNS white matter declines with age / M. A. Hamner, T. Möller, B. R. Ransom // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2011. – Vol. 31, № 4. – P. 996–1002.

107. Han C.-W. An experimental infarct targeting the internal capsule : histopathological and ultrastructural changes / C.-W. Han, K.-H. Lee, M. G. Noh, J.-M. Kim, H.-S. Kim, H.-S. Kim, R. G. Kim, J. Cho, H.-I. Kim, M.-C. Lee // Journal of Pathology and Translational Medicine. – 2017. – Vol. 51, № 3. – P. 292–305.

108. Han H. S. Cellular targets of brain inflammation in stroke / H. S. Han, M. A. Yenari // Current Opinion in Investigational Drugs. – 2003. – Vol. 4, № 5. – P. 522–529.

109. Harkins K. D. Effect of intercompartmental water exchange on the apparent myelin water fraction in multiexponential T_2 measurements of rat spinal cord / K. D. Harkins, A. N. Dula, M. D. Does // Magnetic Resonance in Medicine. – 2012. – Vol. 67, № 3. – P. 793–800.

110. Harkins K. D. In-vivo multi-exponential T_2, magnetization transfer and quantitative histology in a rat model of intramyelinic edema / K. D. Harkins, W. M. Valentine, D. F. Gochberg, M. D. Does // NeuroImage : Clinical. – 2013. – Vol. 2. – P. 810–817.

111. Harrison’s Neurology in Clinical Medicine / ed. A. S. Fauci, D. L. Kasper, D. L. Longo, E. Braunwald, S. L. Hauser, J. L. Jameson, J. Loscalzo. – 2nd edit. – New York : The McGraw-Hill Companies, Inc, 2010. – 765 p.

112. Harukuni I. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia / I. Harukuni, A. Bhardwaj // Neurologic Clinics. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 1–21.

113. Haynes R. L. Diffuse axonal injury in periventricular leukomalacia as determined by apoptotic marker fractin / R. L. Haynes, S. S. Billiards, N. S. Borenstein, J. J. Volpe, H. C. Kinney // Pediatric Research. – 2008. – Vol. 63, № 6. – P. 656–661.

114. Hazelton J. L. Hyperoxic reperfusion after global cerebral ischemia promotes inflammation and long-term hippocampal neuronal death / J. L. Hazelton, I. Balan, G. I. Elmer, T. Kristian, R. E. Rosenthal, G. Krause, T. H. Sanderson, G. Fiskum // Journal of Neurotrauma. – 2010. – Vol. 27, № 4. – P. 753–762.

115. Helms G. In vivo quantification of the bound pool T_1 in human white matter using the binary spin-bath model of progressive magnetization transfer saturation / G. Helms, G. E. Hagberg // Physics in Medicine and Biology. – 2009. – Vol. 54, № 23. – P. N529–N540.

116. Helms G. Modeling the influence of TR and excitation flip angle on the magnetization transfer ratio (MTR) in human brain obtained from 3D spoiled gradient echo MRI / G. Helms, H. Dathe, P. Dechent // Magnetic Resonance in Medicine. – 2010. – Vol. 64, № 1. – P. 177–185.

117. Herrera J. J. Histological correlation of diffusion tensor imaging metrics in experimental spinal cord injury / J. J. Herrera, T. Chacko, P. A. Narayana // Journal of Neuroscience Research. – 2008. – Vol. 86, № 2. – P. 443–447.

118. Hinman J. D. Molecular disorganization of axons adjacent to human lacunar infarcts / J. D. Hinman, M. D. Lee, S. Tung, H. V. Vinters, S. T. Carmichael // Brain. – 2015. – Vol. 138, pt. 3. – P. 736–745.

119. Hinman J. D. The back and forth of axonal injury and repair after stroke / J. D. Hinman // Current Opinion in Neurology. – 2014. – Vol. 27, № 6. – P. 615–623.

120. Hu B. R. Mechanisms of neuron death (necrosis, apoptosis, autophagy) after brain ischemia / B. R. Hu, C. L. Liu // Primer on Cerebrovascular Diseases / ed. L. R. Caplan, J. Biller, M. C. Leary, E. H. Lo, A. J. Thomas, M. Yenari, J. H. Zhang. – London , 2017. – P. 209–215.

121. Hylin M. J. Understanding the mechanisms of recovery and/or compensation following injury [Electronic resource] / M. J. Hylin, A. L. Kerr, R. Holden // Neural Plasticity. – 2017. – Vol. 2017. – Article number 7125057. – 12 p. – URL : https://www.hindawi.com/journals/np/2017/7125057/ (access date : 15.07.2019).

122. Imai F. Migration activity of microglia and macrophages into rat brain / F. Imai, M. Sawada, H. Suzuki, N. Kiya, M. Hayakawa, T. Nagatsu, T. Marunouchi, T. Kanno // Neuroscience Letters. – 1997. – Vol. 237, № 1. – P. 49–52.

123. Jansen O. Early recanalisation in acute ischaemic stroke saves tissue at risk defined by MRI / O. Jansen, P. Schellinger, J. Fiebach, W. Hacke, K. Sartor // Lancet. – 1999. – Vol. 353, № 9169. – P. 2036–2037.

124. Janve V. A. The radial diffusivity and magnetization transfer pool size ratio are sensitive markers for demyelination in a rat model of type III multiple sclerosis (MS) lesions / V. A. Janve, Z. Zu, S. Y. Yao, K. Li, F. L. Zhang, K. J. Wilson, X. Ou, M. D. Does, S. Subramaniam, D. F. Gochberg // NeuroImage. – 2013. – Vol. 74. – P. 298–305.

125. Jiang Q. MRI detects white matter reorganization after neural progenitor cell treatment of stroke / Q. Jiang, Z. G. Zhang, G. L. Ding, B. Silver, L. Zhang, H. Meng, M. Lu, S. Pourabdillah-Nejed-D., L. Wang, S. Savant-Bhonsale, L. Li, H. Bagher-Ebadian, J. Hu, A. S. Arbab, P. Vanguri, J. R. Ewing, K. A. Ledbetter, M. Chopp // NeuroImage. – 2006. – Vol. 32, № 3. – P. 1080–1089.

126. Jing L. Temporal profile of astrocytes and changes of oligodendrocyte-based myelin following middle cerebral artery occlusion in diabetic and non-diabetic rats / L. Jing, Q. He, J. Z. Zhang, P. A. Li // International Journal of Biological Sciences. – 2013. – Vol. 9, № 2. – P. 190–199.

127. Kalantari S. Insight into in vivo magnetization exchange in human white matter regions / S. Kalantari, C. Laule, T. A. Bjarnason, I. M. Vavasour, A. L. MacKay // Magnetic Resonance in Medicine. – 2011. – Vol. 66, № 4. – P. 1142–1151.

128. Kalev-Zylinska M. L. Stroke patients develop antibodies that react with components of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in proportion to lesion size / M. L. Kalev-Zylinska, W. Symes, K. C. E. Little, P. Sun, D. Wen, L. Qiao, D. Young, M. J. During, P. A. Barber // Stroke. – 2013. – Vol. 44, № 8. – P. 2212–2219.

129. Kannurpatti S. S. Spatio-temporal characteristics of low-frequency BOLD signal fluctuations in isoflurane-anesthetized rat brain / S. S. Kannurpatti, B. B. Biswal, Y. R. Kim, B. R. Rosen // NeuroImage. – 2008. – Vol. 40, № 4. – P. 1738–1747.

130. Kanwar J. R. Simultaneous neuroprotection and blockade of inflammation reverses autoimmune encephalomyelitis / J. R. Kanwar, R. K. Kanwar, G. W. Krissansen // Brain. – 2004. – Vol. 127, № 6. – P. 1313–1331.

131. Kaplan B. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia / B. Kaplan, S. Brint, J. Tanabe, M. Jacewicz, X. J. Wang, W. Pulsinelli // Stroke. – 1991. – Vol. 22, № 8. – P. 1032–1039.

132. Káradóttir R. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia / R. Káradóttir, P. Cavelier, L. H. Bergersen, D. Attwell // Nature. – 2005. – Vol. 438, № 7071. – P. 1162–1166.

133. Karanjia N. Post-cardiac arrest syndrome : update on brain injury management and prognostication / N. Karanjia, R. G. Geocadin // Current Treatment Options in Neurology. – 2011. – Vol. 13, № 2. – P. 191–203.

134. 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. – 2018a. – Vol. 19. – Article number 162. – 15 p. – URL : https://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/162/htm (access date : 15.07.2019).

135. 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 on 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 (access date : 15.07.2019).

136. Khodanovich M. Y. Histological validation of fast macromolecular proton fraction mapping as a quantitative myelin imaging method in the cuprizone demyelination model [Electronic resource] / M. Y. Khodanovich, I. V. Sorokina, V. Y. Glazacheva, A. E. Akulov, N. M. Nemirovich-Danchenko, A. V. Romashchenko, T. G. Tolstikova, L. R. Mustafina, V. L. Yarnykh // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Article number 46686. – 12 p. – URL : https://www.nature.com/articles/srep46686.pdf (access date : 15.07.2019).

137. 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, Y. A. Medvednikova, L. R. Mustafina, V. L. Yarnykh // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2018b. – Vol. 38, № 5. – P. 919–931.

138. Kidwell C. S. Beyond mismatch : evolving paradigms in imaging the ischemic penumbra with multimodal magnetic resonance imaging / C. S. Kidwell, J. R. Alger, J. L. Saver // Stroke. – 2003. – Vol. 34, № 11. – P. 2729–2735.

139. Kim S. Y. Experience with the «good» limb induces aberrant synaptic plasticity in the perilesion cortex after stroke / S. Y. Kim, R. P. Allred, D. L. Adkins, K. A. Tennant, N. A. Donlan, J. A. Kleim, T. A. Jones // The Journal of Neuroscience. – 2015. – Vol. 35, № 22. – P. 8604–8610.

140. Klawiter E. C. Radial diffusivity predicts demyelination in ex vivo multiple sclerosis spinal cords / E. C. Klawiter, R. E. Schmidt, K. Trinkaus, H. F. Liang, M. D. Budde, R. T. Naismith, S. K. Song, A. H. Cross, T. L. Benzinger // NeuroImage. – 2011. – Vol. 55, № 4. – P. 1454–1460.

141. Knight R. A. Magnetic resonance imaging assessment of evolving focal cerebral ischemia. comparison with histopathology in rats / R. A. Knight, M. O. Dereski, J. A. Helpern, R. J. Ordidge, M. Chopp // Stroke. – 1994. – Vol. 25, № 6. – P. 1252–1261.

142. Koenig S. H. Cholesterol of myelin is the determinant of gray-white contrast in MRI of brain / S. H. Koenig // Magnetic Resonance in Medicine. – 1991. – Vol. 20, № 2. – P. 285–291.

143. Koenig S. H. Relaxometry of brain: why white matter appears bright in MRI / S. H. Koenig, R. D. Brown, M. Spiller, N. Lundbom // Magnetic Resonance in Medicine. – 1990. – Vol. 14, № 3. – P. 482–495.

144. Komarova Y. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways / Y. Komarova, A. B. Malik // Annual Review of Physiology. – 2010. – Vol. 72, № 1. – P. 463–493.

145. Kucharcyk W. Relaxivity and magnetization transfer of white matter lipids at MR imaging : importance of cerebrosides and pH / W. Kucharcyk, M. Macdonald, G. Stanisz, H. R. Mark // Radiology. – 1994. – Vol. 192, № 2. – P. 521–529.

146. Kumar R. Brain axonal and myelin evaluation in heart failure / R. Kumar, M. A. Woo, P. M. MacEy, G. C. Fonarow, M. A. Hamilton, R. M. Harper // Journal of the Neurological Sciences. – 2011. – Vol. 307, № 1–2. – P. 106–113.

147. Kumar R. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia / R. Kumar, M. J. Bukowski, J. M. Wider, C. A. Reynolds, L. Calo, B. Lepore, R. Tousignant, M. Jones, K. Przyklenk, T. H. Sanderson // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2016. – Vol. 76. – P. 68–75.

148. Lakhan S. E. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke [Electronic resource] / S. E. Lakhan, A. Kirchgessner, D. Tepper, A. Leonard // Frontiers in Neurology. – 2013. – Vol. 4. – Article number 32. – 15 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2013.00032/full (access date : 15.07.2019).

149. Lakhani B. Hemispheric asymmetry in myelin after stroke is related to motor impairment and function / B. Lakhani, K. S. Hayward, L. A. Boyd // NeuroImage : Clinical. – 2017. – Vol. 14. – P. 344–353.

150. Langlois J. A. The epidemiology and impact of traumatic brain injury / J. A. Langlois, W. Rytland-Brown, M. M. Wald // Journal of Head Trauma and Rehabilitation. – 2006. – Vol. 21, № 5. – P. 375–378.

151. Lankford C. L. On the inherent precision of mcDESPOT / C. L. Lankford, M. D. Does // Magnetic Resonance in Medicine. – 2013. – Vol. 69, № 1. – P. 127–136.

152. Laule C. Magnetic resonance imaging of myelin / C. Laule, I. M. Vavasour, S. H. Kolind, D. K. B. Li, T. L. Traboulsee, G. R. W. Moore, A. L. MacKay // Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2007. – Vol. 4, № 3. – P. 460–484.

153. Laule C. Myelin water imaging of multiple sclerosis at 7 T : quantitative correlations with histopathology / C. Laule, E. Leung, D. K. B. Li, A. L. Traboulsee, D. W. Patya, A. L. MacKay, G. R. W. Moore // Multiple Sclerosis. – 2006. – Vol. 12, № 6. – P. 747–753.

154. Lees G. J. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia / G. J. Lees // Journal of the Neurological Sciences. – 1993. – Vol. 114, № 2. – P. 119–122.

155. Leiva-Salinas C. Imaging of ischemic stroke / C. Leiva-Salinas, M. Wintermark // Neuroimaging Clinics of North America. – 2010. – Vol. 20, № 4. – P. 455–468.

156. Li H. CoQ10 fails to protect brain against focal and global ischemia in rats / H. Li, G. Klein, P. Sun, A. M. Buchan // Brain Research. – 2000. – Vol. 877, № 1. – P. 7–11.

157. Li S. Cold-inducible RNA binding protein inhibits H_2O_2-induced apoptosis in rat cortical neurons / S. Li, Z. Zhang, J. Xue, A. Liu, H. Zhang // Brain Research. – 2012. – Vol. 1441. – P. 47–52.

158. Li S. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter / S. Li, P. K. Stys // The Journal of Neuroscience. – 2000. – Vol. 20, № 3. – P. 1190–1198.

159. Li W. W. Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination / W. W. Li, A. Setzu, C. Zhao, R. J. M. Franklin // Journal of Neuroimmunology. – 2005. – Vol. 158, № 1–2. – P. 58–66.

160. Lin W. An absolute measurement of brain water content using magnetic resonance imaging in two focal cerebral ischemic rat models / W. Lin, R. Venkatesan, K. Gurleyik, Y. Y. He, W. J. Powers, C. Y. Hsu // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 37–44.

161. Liu F. Middle cerebral artery occlusion model in rodents : methods and potential pitfalls [Electronic resource] / F. Liu, L. D. McCullough // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – Vol. 2011. – Article number 464701. – 9 p. – URL : https://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/464701/ (access date : 15.07.2019).

162. Liu Y. Serial diffusion tensor MRI after transient and permanent cerebral ischemia in nonhuman primates / Y. Liu, H. E. D’Arceuil, S. Westmoreland, J. He, M. Duggan, R. G. Gonzalez, J. Pryor, A. J. De Crespigny // Stroke. – 2007. – Vol. 38, № 1. – P. 138–145.

163. Longa E. Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins // Stroke. – 1989. – Vol. 20, № 1. – P. 84–91.

164. MacDougall G. Mitochondria and neuroprotection in stroke : cationic arginine-rich peptides (CARPs) as a novel class of mitochondria-targeted neuroprotective therapeutics / G. MacDougall, R. S. Anderton, F. L. Mastaglia, N. W. Knuckey, B. P. Meloni // Neurobiology of Disease. – 2019. – Vol. 121. – P. 17–33.

165. MacKay A. In vivo visualization of myelin water in brain by magnetic resonance / A. MacKay, K. Whittall, J. Adler, D. Li, D. Paty, D. Graeb // Magnetic Resonance in Medicine. – 1994. – Vol. 31, № 6. – P. 673–677.

166. Mackey J. The atlas oh heart disease and stroke / J. Mackey, G. Mensah, S. Mendis, K. Greenlund ; ed. A. Hayley. – Geneva : Myriad Editions Limited, 2004. – 112 p.

167. Macrae I. M. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow : dose dependency, time course, and neuropathological consequences / I. M. Macrae, M. J. Robinson, D. I. Graham, J. L. Reid, J. McCulloch // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 1993. – Vol. 13, № 2. – P. 276–284.

168. Macrae I. M. New models of focal cerebral ischaemia / I. M. Macrae // British Journal of Clinical Pharmacology. – 1992. – Vol. 34. – P. 302–308.

169. Mädler B. Is diffusion anisotropy an accurate monitor of myelination? Correlation of multicomponent T_2 relaxation and diffusion tensor anisotropy in human brain / B. Mädler, S. A. Drabycz, S. H. Kolind, K. P. Whittall, A. L. MacKay // Magnetic Resonance Imaging. – 2008. – Vol. 26, № 7. – P. 874–888.

170. Mangus D. B. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (Part I - Protection via specific pathways) [Electronic resource] / D. B. Mangus, L. Huang, P. M. Applegate, J. W. Gatling, J. Zhang, R. L. Applegate // Medical Gas Research. – 2014. – Vol. 4. – Article number 9. – 14 p. – URL : https://medicalgasresearch.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/2045-9912-4-9 (access date : 15.07.2019).

171. Manning S. M. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia / S. M. Manning, D. M. Talos, C. Zhou, D. B. Selip, H.-K. Park, C.-J. Park, J. J. Volpe, F. E. Jensen // Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28, № 26. – P. 6670–6678.

172. Marin M. A. Mechanisms of demyelination and remyelination in the young and aged brain following white matter stroke / M. A. Marin, S. T. Carmichael // Neurobiology of Disease. – 2019. – Vol. 126. – P. 5–12.

173. Marmarou A. A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema [Electronic resource] / A. Marmarou // Neurosurgical Focus. – 2007. – Vol. 22. – № 5. – Article number E1. – 10 p. – URL : https://thejns.org/focus/view/journals/neurosurg-focus/22/5/foc.2007.22.5.2.xml (access date : 15.07.2019).

174. Marques J. P. MP2RAGE, a self bias-field corrected sequence for improved segmentation and T_1-mapping at high field / J. P. Marques, T. Kober, G. Krueger, W. van der Zwaag, P. F. Van de Moortele, R. Gruetter // NeuroImage. – 2010. – Vol. 49, № 2. – P. 1271–1281.

175. Matute C. Calcium dyshomeostasis in white matter pathology / C. Matute // Cell Calcium. – 2010. – Vol. 47, № 2. – P. 150–157.

176. Matute C. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology / C. Matute // Journal of Anatomy. – 2011. – Vol. 219, № 1. – P. 53–64.

177. Matute C. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases / C. Matute, E. Alberdi, M. Domercq, F. Pérez-Cerdá, A. Pérez-Samartín, M. V. Sánchez-Gómez // Trends in Neurosciences. – 2001. – Vol. 2, № 4. – P. 224–230.

178. Mayor D. Neurotransmitters in the mediation of cerebral ischemic injury / D. Mayor, M. Tymianski // Neuropharmacology. – 2018. – Vol. 134, pt. B. – P. 178–188.

179. McIver S. R. Oligodendrocyte degeneration and recovery after focal cerebral ischemia / S. R. McIver, M. Muccigrosso, E. R. Gonzales, J. M. Lee, M. S. Roberts, M. S. Sands, M. P. Goldberg // Neuroscience. – 2010. – Vol. 169, № 3. – P. 1364–1375.

180. McTigue D. M. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS / D. M. McTigue, R. B. Tripathi // Journal of Neurochemistry. – 2008. – Vol. 107, № 1. – P. 1–19.

181. Microstructural parcellation of the human cerebral cortex / ed. S. Geyer, R. Turner. – Berlin : Springer Science+Business Media, 2013. – 257 p.

182. Micu I. Axo-myelinic neurotransmission : a novel mode of cell signalling in the central nervous system / I. Micu, J. R. Plemel, A. V. Caprariello, K. A. Nave, P. K. Stys // Nature Reviews Neuroscience. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 49–58.

183. Micu I. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia / I. Micu, Q. Jiang, E. Coderre, A. Ridsdale, L. Zhang, J. Woulfe, X. Yin, B. D. Trapp, J. E. McRory, R. Rehak, G. W. Zamponi, W. Wang, P. K. Stys // Nature. – 2006. – Vol. 439, № 7079. – P. 988–992.

184. Mitchell E. J. Is remodelling of corticospinal tract terminations originating in the intact hemisphere associated with recovery following transient ischaemic stroke in the rat? [Electronic resource] / E. J. Mitchell, D. Dewar, D. J. Maxwell // PloS one. – 2016. – Vol. 11, № 3. – Article number e0152176. – 18 p. – URL : https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0152176&type=printable (access date : 16.07.2019).

185. Montaner J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke / J. Montaner, C. A. Molina, J. Monasterio, S. Abilleira, J. F. Arenillas, M. Ribó, M. Quintana, J. Alvarez-Sabín // Circulation. – 2003. – Vol. 107, № 4. – P. 598–603.

186. Morell P. In vivo metabolism of oligodendroglial lipids / P. Morell, A. D. Toews // Oligodendroglia / ed. W.T. Norton. – New York, 1984. – Chap. 2. – P. 47–86. – (Advances in Neurochemistry; vol. 5).

187. Morrison C. A model for magnetization transfer in tissues / C. Morrison, R. M. Henkelman // Magnetic Resonance in Medicine. – 1995. – Vol. 33, № 4. – P. 475–482.

188. Muir K. W. Stroke / K. W. Muir // Medicine. – 2008. – Vol. 37, № 2. – P. 109–114.

189. Muir K. W. Stroke / K. W. Muir // Medicine. – 2013. – Vol. 41, № 3. – P. 169–174.

190. Mun-Bryce S. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation / S. Mun-Bryce, G. A. Rosenberg // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2017. – Vol. 274, № 5. – P. R1203–R1211.

191. Nag S. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown / S. Nag, R. Venugopalan, D. J. Stewart // Acta Neuropathologica. – 2007. – Vol. 114, № 5. – P. 459–469.

192. Nakatomi H. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors / H. Nakatomi, T. Kuriu, S. Okabe, S. ichi Yamamoto, O. Hatano, N. Kawahara, A. Tamura, T. Kirino, M. Nakafuku // Cell. – 2002. – Vol. 110, № 4. – P. 429–441.

193. Naumova A. V. High-resolution three-dimensional macromolecular proton fraction mapping for quantitative neuroanatomical imaging of the rodent brain in ultra-high magnetic fields / A. V. Naumova, A. E. Akulov, M. Y. Khodanovich, V. L. Yarnykh // NeuroImage. – 2017. – Vol. 147. – P. 985–993.

194. Nave K.-A. Axon-glial signaling and the glial support of axon function / K.-A. Nave, B. D. Trapp // Annual Review of Neuroscience. – 2008. – Vol. 31. – P. 535–561.

195. Neumann J. T. Global cerebral ischemia : synaptic and cognitive dysfunction / J. T. Neumann, C. H. Cohan, K. R. Dave, C. B. Wright, M. A. Perez-Pinzon // Current Drug Targets. – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 20–35.

196. Nikolova S. The severity of ischemia varies in Sprague-Dawley rats from different vendors [Electronic resource] / S. Nikolova, T.-Y. Lee, R. Bartha // ISRN Stroke. – 2014. – Vol. 2014. – Article number 919652. – 9 p. – URL : https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/919652/ (access date : 16.07.2019).

197. Ning M. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke / M. Ning, K. L. Furie, W. J. Koroshetz, H. Lee, M. Barron, M. Lederer, X. Wang, M. Zhu, A. G. Sorensen, E. H. Lo, P. J. Kelly // Neurology. – 2006. – Vol. 66, № 10. – P. 1550–1555.

198. O’Collins V. E. Animal models of stroke versus clinical stroke : comparison of infarct size, cause, location, study design, and efficacy of experimental therapies / V. E. O’Collins, G. A. Donnan, M. R. Macleod, D. W. Howells // Animal Models for the Study of Human Disease / ed. M. P. Conn. – 2nd edit. – London, 2017. – Chap. 20. – P. 481–523.

199. O’Neill M. J. Rodent models of global cerebral ischemia / M. J. O’Neill, J. A. Clemens // Current Protocols in Neuroscience. – 2000. – Vol. 12, № 1, suppl. 12. – Chap. 9, unit 9.5. – P. 9.5.1–9.5.25.

200. Odrobina E. E. MR properties of excised neural tissue following experimentally induced demyelination / E. E. Odrobina, T. Y. J. Lam, T. Pun, R. Midha, G. J. Stanisz // NMR in Biomedicine. – 2005. – Vol. 18, № 5. – P. 277–284.

201. Ou X. Quantitative magnetization transfer measured pool-size ratio reflects optic nerve myelin content in ex vivo mice / X. Ou, S. W. Sun, H. F. Liang, S. K. Song, D. F. Gochberg // Magnetic Resonance in Medicine. – 2009a. – Vol. 61, № 2. – P. 364–371.

202. Ou X. The MT pool size ratio and the DTI radial diffusivity may reflect the myelination in shiverer and control mice / X. Ou, S. W. Sun, H. F. Liang, S. K. Song, D. F. Gochberg // NMR in Biomedicine. – 2009b. – Vol. 22, № 5. – P. 480–487.

203. Paciaroni M. The concept of ischemic penumbra in acute stroke and therapeutic opportunities / M. Paciaroni, V. Caso, G. Agnelli // European Neurology. – 2009. – Vol. 61, № 6. – P. 321–330.

204. Pampliega O. Association of an EAAT2 polymorphism with higher glutamate concentration in relapsing multiple sclerosis / O. Pampliega, M. Domercq, P. Villoslada, J. Sepulcre, A. Rodríguez-Antigüedad, C. Matute // Journal of Neuroimmunology. – 2008. – Vol. 195, № 1–2. – P. 194–198.

205. Pantoni L. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia / L. Pantoni, J. H. Garcia, J. A. Gutierrez // Stroke. – 1996. – Vol. 27, № 9. – P. 1641–1647.

206. Pantoni L. Postmortem examination of vascular lesions in cognitive impairment : a survey among neuropathological services / L. Pantoni, C. Sarti, I. Alafuzoff, K. Jellinger, D. G. Munoz, J. Ogata, V. Palumbo // Stroke. – 2006. – Vol. 37, № 4. – P. 1005–1009.

207. Parsons M. W. Diffusion- and perfusion-weighted MRI response to thrombolysis in stroke / M. W. Parsons, P. A. Barber, J. Chalk, D. G. Darby, S. Rose, P. M. Desmond, R. P. Gerraty, B. M. Tress, P. M. Wright, G. A. Donnan, S. M. Davis // Annals of Neurology. – 2002. – Vol. 51, № 1. – P. 28–37.

208. Partington T. Intracranial pressure and cerebral blood flow / T. Partington, A. Farmery // Anaesthesia and Intensive Care Medicine. – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 189–194.

209. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates : compact 6th edition / G. Paxinos, C. Watson. – 6th edit. – San Francisco : Elsevier Inc., 2009. – 340 p.

210. Pedrono E. An optimized mouse model for transient ischemic attack / E. Pedrono, A. Durukan, D. Strbian, I. Marinkovic, S. Shekhar, M. Pitkonen, U. Abo-Ramadan, T. Tatlisumak // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. – 2010. – Vol. 69, № 2. – P. 188–195.

211. Petito C. K. Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia : possible relationship to abnormalities in neuronal processes / C. K. Petito, W. A. Pulsinelli // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 1984. – Vol. 4, № 2. – P. 194–205.

212. Pierpaoli C. Histologic correlates of abnormal water diffusion in cerebral ischemia : diffusion-weighted MR imaging and light and electron microscopic study / C. Pierpaoli, A. Righini, I. Linfante, J. H. Tao-Cheng, J. R. Alger, G. Di Chiro // Neuroradiology. – 1993. – Vol. 189, № 2. – P. 439–448.

213. Pitt D. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis / D. Pitt, P. Werner, C. S. Raine // Nature Medicine. – 2000. – Vol. 6, № 1. – P. 67–71.

214. Po C. White matter reorganization and functional response after focal cerebral ischemia in the rat [Electronic resource] / C. Po, D. Kalthoff, Y. B. Kim, M. Nelles, M. Hoehn // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 9. – Article number e45629. – 10 p. – URL : https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0045629&type=printable (access date : 16.07.2019).

215. Prasloski T. Rapid whole cerebrum myelin water imaging using a 3D GRASE sequence / T. Prasloski, A. Rauscher, A. L. MacKay, M. Hodgson, I. M. Vavasour, C. Laule, B. Mädler // NeuroImage. – 2012. – Vol. 63, № 1. – P. 533–539.

216. Pulsinelli W. A. Selective neuronal vulnerability : morphological and molecular characteristics / W. A. Pulsinelli // Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage / ed. K. Kogure, K.-A. Hossmann, B. K. Siesjö, F. A. Welsh. – Amsterdam, 1985. – P. 29–37. – (Progress in Brain Research; vol. 63).

217. Qin W. Wallerian degeneration in central nervous system : dynamic associations between diffusion indices and their underlying pathology [Electronic resource] / W. Qin, M. Zhang, Y. Piao, D. Guo, Z. Zhu, X. Tian, K. Li, C. Yu // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 7. – Article number e41441. – 10 p. – URL : https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0041441&type=printable (access date : 16.07.2019).

218. Ramani A. Precise estimate of fundamental in-vivo MT parameters in human brain in clinically feasible times / A. Ramani, C. Dalton, D. H. Miller, P. S. Tofts, G. J. Barker // Magnetic Resonance Imaging. – 2002. – Vol. 20, № 10. – P. 721–731.

219. Ramos-Cabrer P. Targeting the ischemic penumbra / P. Ramos-Cabrer, F. Campos, T. Sobrino, J. Castillo // Stroke. – 2011. – Vol. 42, suppl. 1. – P. S7–S11.

220. Ransom B. R. Axons get excited to death / B. R. Ransom, S. B. Baltan // Annals of Neurology. – 2009. – Vol. 65, № 2. – P. 120–121.

221. Rashad S. Intracellular S1P levels dictate fate of different regions of the hippocampus following transient global cerebral ischemia / S. Rashad, K. Niizuma, D. Saigusa, X. Han, M. Sato-Maeda, R. Saito, A. Uruno, M. Fujimura, S. Ikawa, M. Yamamoto, T. Tominaga // Neuroscience. – 2018. – Vol. 384. – P. 188–202.

222. Rausch M. Characterization of white matter damage in animal models of multiple sclerosis by magnetization transfer ratio and quantitative mapping of the apparent bound proton fraction f* / M. Rausch, P. Tofts, P. Lervik, A. Walmsley, A. Mir, A. Schubart, T. Seabrook // Multiple Sclerosis. – 2009. – Vol. 15, № 1. – P. 16–27.

223. Raval A. P. Rat model of global cerebral ischemia : the two-vessel occlusion (2VO) model of forebrain ischemia / A. P. Raval, C. Liu, B. R. Hu // Animal Models of Acute Neurological Injuries / ed. J. Chen, Z. C. Xu, X.-M. Xu, J. H. Zhang. – New York, 2009. – Chap. 7. – P. 77–86.

224. Rooney W. D. Magnetic field and tissue dependencies of human brain longitudinal ^1H_2O relaxation in vivo / W. D. Rooney, G. Johnson, X. Li, E. R. Cohen, S. G. Kim, K. Ugurbil, C. S. Springer // Magnetic Resonance in Medicine. – 2007. – Vol. 57, № 2. – P. 308–318.

225. Ropele S. Method for quantitative imaging of the macromolecular ^1H fraction in tissues / S. Ropele, T. Seifert, C. Enzinger, F. Fazekas // Magnetic Resonance in Medicine. – 2003. – Vol. 49, № 5. – P. 864–871.

226. Rosell A. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke / A. Rosell, E. Cuadrado, A. Ortega-Aznar, M. Hernández-Guillamon, E. H. Lo, J. Montaner // Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 4. – P. 1121–1126.

227. Rosen B. R. Perfusion imaging with NMR contrast agents / B. R. Rosen, J. W. Belliveau, J. M. Vevea, T. J. Brad // Magnetic Resonance in Medicine. – 1990. – Vol. 14, № 2. – P. 249–265.

228. Rosenberg G. A. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain / G. A. Rosenberg, E. Y. Estrada, J. E. Dencoff // Stroke. – 1998. – Vol. 29, № 10. – P. 2189–2195.

229. Saab A. S. Oligodendroglial NMDA receptors regulate glucose import and axonal energy metabolism / A. S. Saab, I. D. Tzvetavona, A. Trevisiol, S. Baltan, P. Dibaj, K. Kusch, W. Möbius, B. Goetze, H. M. Jahn, W. Huang, H. Steffens, E. D. Schomburg, A. Pérez-Samartín, F. Pérez-Cerdá, D. Bakhtiari, C. Matute, S. Löwel, C. Griesinger, J. Hirrlinger, F. Kirchhoff, K. A. Nave // Neuron. – 2016. – Vol. 91, № 1. – P. 119–132.

230. Sadelli K. Global cerebral ischemia in rats leads to amnesia due to selective neuronal death followed by astroglial scar formation in the CA1 layer / K. Sadelli, J. C. Stamegna, S. D. Girard, N. Baril, G. Escoffier, M. Brus, A. D. Véron, M. Khrestchatisky, F. S. Roman // Neurobiology of Learning and Memory. – 2017. – Vol. 141. – P. 168–178.

231. Salter M. G. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury / M. G. Salter, R. Fern // Nature. – 2005. – Vol. 438, № 7071. – P. 1167–1171.

232. Samsonov A. Quantitative MR imaging of two-pool magnetization transfer model parameters in myelin mutant shaking pup / A. Samsonov, A. L. Alexander, P. Mossahebi, Y. C. Wu, I. D. Duncan, A. S. Field // NeuroImage. – 2012. – Vol. 62, № 3. – P. 1390–1398.

233. Sánchez-Gómez M. V. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures / M. V. Sánchez-Gómez, C. Matute // Neurobiology of Disease. – 1999. – Vol. 6, № 6. – P. 475–485.

234. Sanchez-Gomez M. V. Bax and calpain mediate excitotoxic oligodendrocyte death induced by activation of both AMPA and kainate receptors / M. V. Sanchez-Gomez, E. Alberdi, E. Perez-Navarro, J. Alberch, C. Matute // Journal of Neuroscience. – 2011. – Vol. 31, № 8. – P. 2996–3006.

235. Sawada M. Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain / M. Sawada, F. Imai, H. Suzuki, M. Hayakawa, T. Kanno, T. Nagatsu // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 433, № 1–2. – P. 37–40.

236. Schaefer P. W. Diffusion-weighted MR imaging of the brain / P. W. Schaefer, P. E. Grant, R. G. Gonzalez // Radiology. – 2000. – Vol. 217, № 2. – P. 331–345.

237. Schellinger P. D. Imaging-based decision making in thrombolytic therapy for ischemic stroke : present status / P. D. Schellinger, J. B. Fiebach, W. Hacke // Stroke. – 2003. – Vol. 34, № 2. – P. 575–583.

238. Schmierer K. Quantitative magnetization transfer imaging in postmortem multiple sclerosis brain / K. Schmierer, D. J. Tozer, F. Scaravilli, D. R. Altmann, G. J. Barker, P. S. Tofts, D. H. Miller // Journal of Magnetic Resonance Imaging. – 2007. – Vol. 26, № 1. – P. 41–51.

239. Schneider A. T. Ischemic stroke subtypes. A population-based study of incidence rates among blacks and whites / A. T. Schneider, B. Kissela, D. Woo,

D. Kleindorfer, K. Alwell, R. Miller, J. Szaflarski, J. Gebel, J. Khoury, R. Shukla, C. Moomaw, A. Pancioli, E. Jauch, J. Broderick // Stroke. – 2004. – Vol. 35, № 7. – P. 1552–1556.

240. Shah F. A. Melatonin protects MCAO-induced neuronal loss via NR2A mediated prosurvival pathways [Electronic resource] / F. A. Shah, G. Liu, L. T. Al Kury, A. Zeb, M. Abbas, T. Li, X. Yang, F. Liu, Y. Jiang, S. Li // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – Article number 297. – 11 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00297/full (access date : 16.07.2019).

241. Sharkey J. Perivascular microapplication of endothelin-1 : a new model of focal cerebral ischaemia in the rat / J. Sharkey, I. M. Ritchie, P. A. T. Kelly // Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 865–871.

242. Shcherbak N. S. A new rat model of reversible global cerebral ischemia / N. S. Shcherbak, M. M. Galagudza, A. N. Kuzmenkov, D. A. Ovchinnikov, L. B. Mitrofanova, E. R. Barantsevich, E. V. Shlyakhto // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2012. – Vol. 152, № 5. – P. 656–658.

243. Shemesh N. Axon diameters and myelin content modulate microscopic fractional anisotropy at short diffusion times in fixed rat spinal cord [Electronic resource] / N. Shemesh // Frontiers in Physics. – 2018. – Vol. 6. – Article number 49. – 15 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphy.2018.00049/full (access date : 16.07.2019).

244. Shibata D. Myelin basic protein autoantibodies, white matter disease and stroke outcome / D. Shibata, K. Cain, P. Tanzi, D. Zierath, K. Becker // Journal of Neuroimmunology. – 2012. – Vol. 252, № 1–2. – P. 106–112.

245. Shvedova M. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury [Electronic resource] / M. Shvedova, Y. Anfinogenova, E. N. Atochina-Vasserman, I. A. Schepetkin, D. N. Atochin // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – Vol. 9. – Article number 715. – 18 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00715/full (access date : 16.07.2019).

246. Simard J. M. Brain oedema in focal ischaemia : molecular pathophysiology and theoretical implications / J. M. Simard, T. A. Kent, M. Chen, K. V. Tarasov, V. Gerzanich // Lancet. Neurology. – 2007. – Vol. 6, № 3. – P. 258–268.

247. Skinner T. E. An extended two-point Dixon algorithm for calculating separate water, fat, and B_0 images / T. E. Skinner, G. H. Glover // Magnetic Resonance in Medicine. – 1997. – Vol. 37, № 4. – P. 628–630.

248. Sled J. G. Quantitative imaging of magnetization transfer exchange and relaxation properties in vivo using MRI / J. G. Sled, G. B. Pike // Magnetic Resonance in Medicine. – 2001. – Vol. 46, № 5. – P. 923–931.

249. Slivka A. Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat / A. Slivka, E. Murphy, L. Horrocks // Stroke. – 1995. – Vol. 26, № 6. – P. 1061–1066.

250. Soellinger M. Fast bound pool fraction mapping using stimulated echoes / M. Soellinger, C. Langkammer, T. Seifert-Held, F. Fazekas, S. Ropele // Magnetic Resonance in Medicine. – 2011. – Vol. 66, № 3. – P. 717–724.

251. Song S.-K. Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain / S.-K. Song, J. Yoshino, T. Q. Le, S.-J. Lin, S.-W. Sun, A. H. Cross, R. C. Armstrong // NeuroImage. – 2005. – Vol. 26, № 1. – P. 132–140.

252. Song S.-K. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water / S.-K. Song, S.-W. Sun, M. J. Ramsbottom, C. Chang, J. Russell, A. H. Cross // NeuroImage. – 2002. – Vol. 17, № 3. – P. 1429–1436.

253. Sorby-Adams A. J. The role of neurogenic inflammation in blood-brain barrier disruption and development of cerebral oedema following acute central nervous system (CNS) injury [Electronic resource] / A. J. Sorby-Adams, A. M. Marcoionni, E. R. Dempsey, J. A. Woenig, R. J. Turner // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18, № 8. – Article number E1788. – 24 p. – URL : https://www.mdpi.com/1422-0067/18/8/1788/htm (access date : 16.07.2019).

254. Sotak C. H. The role of diffusion tensor imaging in the evaluation of ischemic brain – a review / C. H. Sotak // NMR in Biomedicine. – 2002. – Vol. 15, № 7–8. – P. 561–569.

255. Srinivasan R. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T / R. Srinivasan, N. Sailasuta, R. Hurd, S. Nelson, D. Pelletier // Brain. – 2005. – Vol. 128, pt. 5. – P. 1016–1025.

256. Stirling D. P. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation / D. P. Stirling, P. K. Stys // Trends in Molecular Medicine. – 2010. – Vol. 16, № 4. – P. 160–170.

257. Stüber C. Myelin and iron concentration in the human brain : a quantitative study of MRI contrast / C. Stüber, M. Morawski, A. Schäfer, C. Labadie, M. Wähnert, C. Leuze, M. Streicher, N. Barapatre, K. Reimann, S. Geyer, D. Spemann, R. Turner // NeuroImage. – 2014. – Vol. 93, pt. 1. – P. 95–106.

258. Stys P. K. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian role of Na^{+} channels and Na^{+}-Ca^{2+} exchanger / P. K. Stys, G. Waxman, R. Ransom // Journal of Neuroscience. – 1992. – Vol. 12, № 2. – P. 430–439.

259. Sun S.-W. Differential sensitivity of in vivo and ex vivo diffusion tensor imaging to evolving optic nerve injury in mice with retinal ischemia / S.-W. Sun, H.-F. Liang, T. Q. Le, R. C. Armstrong, A. H. Cross, S.-K. Song // NeuroImage. – 2006a. – Vol. 32, № 3. – P. 1195–1204.

260. Sun S.-W. Noninvasive detection of cuprizone induced axonal damage and demyelination in the mouse corpus callosum / S.-W. Sun, H.-F. Liang, K. Trinkaus, A. H. Cross, R. C. Armstrong, S.-K. Song // Magnetic Resonance in Medicine. – 2006b. – Vol. 55, № 2. – P. 302–308.

261. Surinkaew P. Role of microglia under cardiac and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury / P. Surinkaew, P. Sawaddiruk, N. Apaijai, N. Chattipakorn, S. C. Chattipakorn // Metabolic Brain Disease. – 2018. – Vol. 33, № 4. – P. 1019–1030.

262. Talos D. M. Developmental regulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor subunit expression in forebrain and relationship to regional susceptibility to hypoxic/ischemic injury. II. Human cerebral white matter and cortex / D. M. Talos, P. L. Follett, R. D. Folkerth, R. E. Fishman, F. L. Trachtenberg, J. J. Volpe, F. E. Jensen // The Journal of Comparative Neurology. – 2006. – Vol. 497, № 1. – P. 61–77.

263. Tanaka Y. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation / Y. Tanaka, H. Imai, K. Konno, T. Miyagishima, C. Kubota, S. Puentes, T. Aoki, H. Hata, K. Takata, Y. Yoshimoto, N. Saito // Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 1. – P. 205–212.

264. Tekkök S. B. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter / S. B. Tekkök, M. P. Goldberg // The Journal of Neuroscience. – 2001. – Vol. 21, № 12. – P. 4237–4248.

265. Thal S. E. Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice / S. E. Thal, C. Zhu, S. C. Thal, K. Blomgren, N. Plesnila // Neuroscience Letters. – 2011. – Vol. 499, № 1. – P. 1–3.

266. Thiessen J. D. Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination / J. D. Thiessen, Y. Zhang, H. Zhang, L. Wang, R. Buist, M. R. Del Bigio, J. Kong, X. M. Li, M. Martin // NMR in Biomedicine. – 2013. – Vol. 26, № 11. – P. 1562–1581.

267. Thorburne S. K. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress / S. K. Thorburne, B. H. Juurlink // Journal of Neurochemistry. – 1996. – Vol. 67, № 3. – P. 1014–1022.

268. Thrane A. S. Drowning stars: reassessing the role of astrocytes in brain edema / A. S. Thrane, V. Rangroo Thrane, M. Nedergaard // Trends in Neurosciences. – 2014. – Vol. 37, № 11. – P. 620–628.

269. Tsutsui S. Metabolic injury to axons and myelin / S. Tsutsui, P. K. Stys // Experimental Neurology. – 2013. – Vol. 246. – P. 26–34.

270. Turner R. Myelin imaging / R. Turner // Acquisition Methods, Methods and Modeling / ed. A. W. Toga. – Oxford, 2015. – P. 137–142. – (Brain mapping : an encyclopedic reference; vol. 1).

271. Turner R. J. Implications of MMP9 for blood brain barrier disruption and hemorrhagic transformation following ischemic stroke [Electronic resource] / R. J. Turner, F. R. Sharp // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2016. – Vol. 10. –

Article number 56. – 13 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2016.00056/full (access date : 16.07.2019).

272. Uddin M. N. Comparisons between multi-component myelin water fraction, T_1w/T_2w ratio, and diffusion tensor imaging measures in healthy human brain structures [Electronic resource] / M. N. Uddin, T. D. Figley, K. G. Solar, A. S. Shatil, C. R. Figley // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9, № 1. – Article number 2500. – 17 p. – URL : https://www.nature.com/articles/s41598-019-39199-x.pdf (access date : 16.07.2019).

273. Underhill H. R. Fast bound pool fraction imaging of the in vivo rat brain: association with myelin content and validation in the C6 glioma model / H. R. Underhill, R. C. Rostomily, A. M. Mikheev, C. Yuan, V. L. Yarnykh // NeuroImage. – 2011. – Vol. 54, № 3. – P. 2052–2065.

274. Vallejo-Illarramendi A. Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis / A. Vallejo-Illarramendi, M. Domercq, F. Pérez-Cerdá, R. Ravid, C. Matute // Neurobiology of Disease. – 2006. – Vol. 21, № 1. – P. 154–164.

275. van der Zijden J. P., A. van der Toorn, K. van der Marel, R. M. Dijkhuizen. Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic stroke in rats / J. P. van der Zijden, A. van der Toorn, K. van der Marel, R. M. Dijkhuizen // Experimental Neurology. – 2008. – Vol. 212, № 1. – P. 207–212.

276. Vernooij M. W. Incidental findings on brain MRI in the general population / M. W. Vernooij, M. A. Ikram, H. L. Tanghe, A. J. P. E. Vincent, A. Hofman, G. P. Krestin, W. J. Niessen, M. M. B. Breteler, A. van der Lugt // The New England Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 357, № 18. – P. 1821–1828.

277. Vosler P. S. Ischemia-induced calpain activation causes eukaryotic (translation) initiation factor 4G1 (eIF4GI) degradation, protein synthesis inhibition, and neuronal death / P. S. Vosler, Y. Gao, C. S. Brennan, A. Yanagiya, Y. Gan, G. Cao, F. Zhang, S. J. Morley, N. Sonenberg, M. V. L. Bennett, J. Chen // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108, № 44. – P. 18102–18107.

278. Wahul A. B. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in bilateral common carotid arterial occlusion (BCCAo) mouse model / A. B. Wahul, P. C. Joshi, A. Kumar, S. Chakravarty // Journal of Chemical Neuroanatomy. – 2018. – Vol. 92. – P. 1–15.

279. Wang L. Dynamic functional reorganization of the motor execution network after stroke / L. Wang, C. Yu, H. Chen, W. Qin, Y. He, F. Fan, Y. Zhang, M. Wang, K. Li, Y. Zang, T. S. Woodward, C. Zhu // Brain. – 2010. – Vol. 133, pt. 4. – P. 1224–1238.

280. Wang P. Autophagy in ischemic stroke / P. Wang, B. Z. Shao, Z. Deng, S. Chen, Z. Yue, C. Y. Miao // Progress in Neurobiology. – 2018. – Vol. 163–164. – P. 98–117.

281. Wardlaw J. M. What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment [Electronic resource] / J. M. Wardlaw, M. C. Valdés Hernández, S. Muñoz-Maniega // Journal of the American Heart Association. – 2015. – Vol. 4, № 6. – Article number 001140. – 19 p. – URL : https://www.ahajournals.org/doi/pdf/10.1161/JAHA.114.001140 (access date : 16.07.2019).

282. Wardlaw J. M. What is a lacune? / J. M. Wardlaw // Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 11. – P. 2921–2922.

283. Weishaupt N. Prefrontal ischemia in the rat leads to secondary damage and inflammation in remote gray and white matter regions [Electronic resource] / N. Weishaupt, A. Zhang, R. A. Deziel, R. A. Tasker, S. N. Whitehead // Frontiers in Neuroscience. – 2016. – Vol. 10. – Article number 81. – 9 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00081/full (access date : 16.07.2019).

284. Weiskopf N. Quantitative multi-parameter mapping of R_1, PD*, MT, and R_2* at 3 T : a multi-center validation / N. Weiskopf, J. Suckling, G. Williams, M. M. Correia M., B. Inkster, R. Tait, C. Ooi, E. T. Bullmore T., A. Lutti // Frontiers in Neuroscience. – 2013. – Vol. 7. – Article number 95. – 11 p. – URL : https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2013.00095/full (access date : 16.07.2019).

285. Welch K. M. A model to predict the histopathology of human stroke using diffusion and T_2-weighted magnetic resonance imaging / K. M. Welch, J. Windham, R. A. Knight, V. Nagesh, J. W. Hugg, M. Jacobs, D. Peck, P. Booker, M. O. Dereski, S. R. Levine // Stroke. – 1995. – Vol. 26, № 11. – P. 1983–1989.

286. Werner P. Multiple sclerosis : altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage / P. Werner, D. Pitt, C. S. Raine // Annals of Neurology. – 2001. – Vol. 50, № 2. – P. 169–180.

287. West K. L. Myelin volume fraction imaging with MRI / K. L. West, N. D. Kelm, R. P. Carson, D. F. Gochberg, K. C. Ess, M. D. Does // NeuroImage. – 2018. – Vol. 182. – P. 511–521.

288. Wheeler-Kingshott C. A. M. About «axial» and «radial» diffusivities / C. A. M. Wheeler-Kingshott, M. Cercignani // Magnetic Resonance in Medicine. – 2009. – Vol. 61, № 5. – P. 1255–1260.

289. Wolff S. D. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo / S. D. Wolff, R. S. Balaban // Magnetic Resonance in Medicine. – 1989. – Vol. 10, № 1. – P. 135–144.

290. Wu Y. C. High b-value and diffusion tensor imaging in a canine model of dysmyelination and brain maturation / Y. C. Wu, A. S. Field, I. D. Duncan, A. A. Samsonov, Y. Kondo, D. Tudorascu, A. L. Alexander // NeuroImage. – 2011. – Vol. 58, № 3. – P. 829–837.

291. Xie M. Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features / M. Xie, J. E. Tobin, M. D. Budde, C. I. Chen, K. Trinkaus, A. H. Cross, D. P. McDaniel, S. K. Song, R. C. Armstrong // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. – 2010. – Vol. 69, № 7. – P. 704–716.

292. Yang J. L. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke / J. L. Yang, S. Mukda, S.-D. Chen // Redox Biology. – 2018. – Vol. 16. – P. 263–275.

293. Yarnykh V. L. Actual flip-angle imaging in the pulsed steady state : a method for rapid three-dimensional mapping of the transmitted radiofrequency field / V. L. Yarnykh // Magnetic Resonance in Medicine. – 2007. – Vol. 57, № 1. – P. 192–200.

294. Yarnykh V. L. Cross-relaxation imaging reveals detailed anatomy of white matter fiber tracts in the human brain / V. L. Yarnykh, C. Yuan // NeuroImage. – 2004. – Vol. 23, № 1. – P. 409–424.

295. Yarnykh V. L. Fast macromolecular proton fraction mapping from a single off-resonance magnetization transfer measurement / V. L. Yarnykh // Magnetic Resonance in Medicine. – 2012. – Vol. 68, № 1. – P. 166–178.

296. Yarnykh V. L. Iron-insensitive quantitative assessment of subcortical gray matter demyelination in multiple sclerosis using the macromolecular proton fraction / V. L. Yarnykh, E. P. Krutenkova, G. Aitmagambetova, P. Repovic, A. Mayadev, P. Qian, L. K. Jung Henson, B. Gangadharan, J. D. Bowen // American Journal of Neuroradiology. – 2018. – Vol. 39, № 4. – P. 618–625.

297. Yarnykh V. L. Pulsed Z-spectroscopic imaging of cross-relaxation parameters in tissues for human MRI : theory and clinical applications / V. L. Yarnykh // Magnetic Resonance in Medicine. – 2002. – Vol. 47, № 5. – P. 929–939.

298. Yarnykh V. L. Time-efficient, high-resolution, whole brain three-dimensional macromolecular proton fraction mapping / V. L. Yarnykh // Magnetic Resonance in Medicine. – 2016. – Vol. 75, № 5. – P. 2100–2106.

299. Young W. Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia / W. Young, Z. H. Rappaport, D. J. Chalif, E. S. Flamm // Stroke. – 1987. – Vol. 18, № 4. – P. 751–759.

300. Zhang J. Comparison of myelin water fraction from multiecho T_2 decay curve and steady-state methods / J. Zhang, S. H. Kolind, C. Laule, A. L. MacKay // Magnetic Resonance in Medicine. – 2015. – Vol. 73, № 1. – P. 223–232.

301. Zheng Z. Stroke : molecular mechanisms and potential targets for treatment / Z. Zheng, J. E. Lee, M. A. Yenari // Current Molecular Medicine. – 2003. – Vol. 3, № 4. – P. 361–372.

302. Zhou Z. Advances in stroke pharmacology / Z. Zhou, J. Lu, W. W. Liu, A. Manaenko, X. Hou, Q. Mei, J. L. Huang, J. Tang, J. H. Zhang, H. Yao, Q. Hu // Pharmacology and Therapeutics. – 2018. – Vol. 191. – P. 23–42.

303. Zhu L. Reversible recovery of neuronal structures depends on the degree of neuronal damage after global cerebral ischemia in mice / L. Zhu, L. Wang, F. Ju, A. Khan, X. Cheng, S. Zhang // Experimental Neurology. – 2017. – Vol. 289. – P. 1–8.