

**ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЯЦЕНКО КАТЕРИНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК 616.831:615.841

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ І МЕТОДИ ЇХ КОРЕКЦІЇ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело _____ К. В. Яценко

Науковий консультант: Скибо Галина Григорівна,
член-кореспондент НАН України,
доктор медичних наук,
професор

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Яценко К. В. *Механізми органічного ураження головного мозку і методи їх корекції*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія». – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

У дисертаційній роботі представлений детальний аналіз патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та досліджений вплив комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації на морфофункціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку.

У роботі були використані експериментальні моделі ішемічного ушкодження головного мозку: глобальна короткотривала ішемія, *in vivo* модель перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ). Була створена *in vitro* модель ПВЛ з використанням органотипової культури зрізів головного мозку 7-денних мишей лінії FVB. Також у роботі були використані такі методи: біохімічні, імуноцито- та гістохімія на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях, транскраніальна мікрополяризація, електроенцефалографія, електронейроміографія, транскраніальна доплерографія судин мозку, клініко-неврологічні, статистичні. Отримані результати були оброблені методами варіаційної статистики. Різницю між показниками визначали за допомогою *t*-тесту Стьюдента (різниця вважалась достовірною при $P < 0,05$).

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей продемонстровано, що одним із клітинних механізмів, відповідальних за нейропластичність нервової тканини у відповідь на органічні ураження головного мозку, зокрема ішемічне ушкодження, може бути активація ендогенного нейрогенезу в субгранулярній зоні зубчастої звивини.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) показано, що ПВЛ призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і, відповідно, олігодендроцитів та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.

Для з'ясування патогенетичних механізмів ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції, а також для дослідження шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології створено нову експериментальну *in vitro* модель цієї патології на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

Уперше на створеній нами *in vitro* моделі ПВЛ показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації (КГД) та ліпополісахаридів (ЛПС) має найбільш пошкодуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. Спільна дія КГД та ЛПС призводить до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдагідрогенази у культуральне середовище, деградації основного білка мієліну, що свідчить про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняє виражений реактивний астро- та мікрогліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

На використаній експериментальній моделі нейрозапалення (короткострокова культура дисоційованих клітин гіпокампа з додавання ліпополісахариду у культуральне середовище) показано, що

ЛПС у концентрації 10 мкг/мл призводить до пошкодження культивованих клітин.

Уперше на короткостроковій культурі дисоційованих клітин гіпокампа показано, що мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та запобігає їх ушкодженню при моделюванні процесу нейрозапалення. Отримані дані розширюють уявлення про нейропротекторні механізми, які задіяні в умовах використання мікрополяризації. Активація клітинного метаболізму підвищує здатність нервових клітин протистояти впливу негативних факторів нейрозапалення.

Уперше на моделі короткострокової культури дисоційованих клітин гіпокампа виявлена здатність мікрополяризації впливати безпосередньо на нейритогенез та стабілізувати стан нервових клітин. У початковий період культивування, мікрополяризація значно підвищує ефективність формування нервових відростків, у тому числі в присутності фактору запалення – ліпополісахаридів. В умовах довгострокової культури, коли нейромережі добре розвинені, вплив мікрополяризації на нейритогенез менш виражений, але стабілізуючий ефект мікрополяризації, також проявляється в присутності ліпополісахаридів.

Аналіз даних електроенцефалографічного дослідження у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку групи порівняння та основної до і після лікування продемонстрував, що у хворих основної групи, в комплексне лікування яких додавалася транскраніальна мікрополяризація, спостерігалася більш виражена позитивна динаміка параметрів ЕЕГ.

Показано, що позитивна динаміка електронейроміографічних показників після курсу комплексного лікування з застосуванням методу мікрополяризації свідчить про поліпшення функціонального стану нейром'язового апарату, який відбувається завдяки оптимізації впливів на нього надсегментарних структур рухового аналізатора.

Продемонстровано, що включення транскраніальної мікрополяризації до лікувально-реабілітаційного комплексу пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови.

Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про клітинні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, яка є однією з причин прогресуючого зростання частоти органічних ураженнях головного мозку, до наслідків яких належать ДЦП, симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія.

Практичне значення отриманих результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування органічних уражень головного мозку за допомогою неінвазивних методів нейростимуляції.

Розроблену в дисертаційній роботі нову експериментальну *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також для пошуку шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології.

За результатами проведених досліджень отримано патент №142371 "Система для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури *in vitro*".

На підставі інструментально-нейрофізіологічних і клініко-неврологічних досліджень показано, що комплексна реабілітація з використанням транскраніальної мікрополяризації дозволяє досягти вірогідно більш вираженого позитивного ефекту у порівнянні з загальноприйнятою технологією лікування органічних уражень головного мозку. Встановлено, що застосування мікрополяризації в комплексній реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку дає можливість знизити об'єм медикаментозного навантаження, що особливо важливо для сучасної педіатрії й дитячої неврології.

Впровадження технології комплексної реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку з використанням методу транскраніальної мікрополяризації в "Неврологічній клініці доктора Яценко" (м. Київ) є практичною реалізацією виконаних досліджень. Ефективність реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку у цій клініці контролювали як за загальноприйнятими методиками, так і за допомогою визначення характеру адаптаційних реакцій.

Одержані результати дають підстави стверджувати про доцільність використання транскраніальної мікрополяризації в комплексній реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку.

Ключові слова: органічні ураження ЦНС, перивентрикулярна лейкомаляція, ішемія, нейрозапалення, транскраніальна мікрополяризація.

SUMMARY

Yatsenko K.V. Mechanisms of organic brain damages and methods to correct them. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis for obtaining of the doctor of medical sciences degree by the specialty 14.03.04 – Pathological physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

We analyzed the pathogenetic mechanisms of periventricular (PVL) leukomalacia and studied the effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) on the morpho-functional state of the child's CNS in organic brain damages. The following experimental models of ischemic brain injury were used in this work: global short-term ischemia and *in vivo* model of periventricular leukomalacia (PVL). An *in vitro* PVL model was developed using an organotypic culture of brain slices of 7-day-old mice. The following methods were also used: biochemical, immunocyto- and histochemistry at the light and electron microscopic levels, transcranial direct current stimulation (tDCS), electroencephalography, electroneuromyography, transcranial Doppler flowmetry, clinical and neurological, statistical. The results were analyzed for statistical significance using Student's *t*-test (results were considered significant when $P < 0.05$).

On a model of global short-term cerebral ischemia in mice, it has been shown that one of the cellular mechanisms responsible for neuroplasticity of nervous tissue in response to organic brain damages, in particular ischemic injury, may be an activation of endogenous neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus.

On *in vivo* model of periventricular leukomalacia we showed that PVL causes damage to the myelin sheath that surrounds nerve fibers (degradation of the myelin basic protein) and, accordingly, oligodendrocytes and also reactive gliosis - an activation of astrocytes and microglial cells.

To find out the pathogenetic mechanisms of white matter damage in the brain - periventricular leukomalacia, as well as to study the pathways of neuroprotection of the brain in this pathology, a new experimental *in vitro* model of PVL has been developed on an organotypic culture of murine brain slices.

For the first time, on the developed *in vitro* model of PVL we showed that the combined action of oxygen-glucose deprivation (OGD) and lipopolysaccharides (LPS) has the most damaging effect on nervous tissue compared to each of these factors alone. The combined action of OGD and LPS leads to a significant release of lactate dehydrogenase into the culture medium, degradation of the myelin basic protein, which indicates damage to cerebral white matter, and causes severe reactive astro- and microgliosis in organotypic culture of brain slices.

The experimental model of neuroinflammation used (short-term culture of dissociated hippocampal cells with the applying of lipopolysaccharide to the culture medium) showed that LPS at a concentration of 10 µg/ml leads to damage to cultured hippocampal cells.

For the first time, in short-term culture of dissociated hippocampal cells, direct current stimulation has been shown to increase normal metabolic activity of nerve cells and prevent their damage in modeling the neuroinflammation, as well as directly affect neuritogenesis and stabilize the state of nerve cells. The obtained data expand the idea of neuroprotective mechanisms that are involved in the use of direct current

stimulation. Activation of cellular metabolism increases the ability of neural cells to resist the effects of negative neuroinflammatory factors.

For the first time, in short-term culture of dissociated hippocampal cells, the ability of direct current stimulation to directly affect neuritogenesis and stabilize the neural cells was revealed. In the initial period of cell culturing, direct current stimulation significantly increased the efficiency of the formation of neuronal processes, in particular in the presence of an inflammatory factor - lipopolysaccharides. In long-term culture, when neuronal networks were well developed, the effect of direct current stimulation on neuritogenesis was less pronounced, but the stabilizing effect of direct current stimulation was also revealed in the presence of lipopolysaccharides.

Analysis of EEG data from patients with organic brain damages showed that the transcranial direct current stimulation leads to pronounced positive dynamics of EEG parameters.

It is shown that the positive dynamics of electroneuromyographic parameters after the course of tDCS indicates an improvement in the functional state of the neuromuscular apparatus, which occurs due to the optimization of the effects on it of suprasegmental structures of the motor analyzer.

It is demonstrated that tDCS in patients with organic brain damages provides a positive dynamics of transcranial Doppler of the brain blood vessels.

The results of this study have primarily fundamental importance since they significantly expand the existing knowledge about the cellular mechanisms of periventricular leukomalacia, which is one of the reasons for the progressive increase in the frequency of organic brain damages,

such as cerebral palsy, symptomatic epilepsy and perinatal hypoxic ischemic encephalopathy.

The practical significance of the obtained results is to find new approaches for the treatment of organic brain damages using non-invasive methods of neurostimulation.

The developed experimental *in vitro* model of periventricular leukomalacia can be used for the study of pathogenetic mechanisms of PVL development, as well as for searching for a new strategy to protect the brain at this pathology.

According to the results of the research, the patent №142371 "System for studying the effect of the direct current stimulation on cell cultures *in vitro*" was obtained.

By using of neurophysiological and clinical researches it is shown that transcranial direct current stimulation in the complex rehabilitation of children with organic brain damages probably have a more positive effect than the standard treatment of organic brain damages.

It is established that the use of transcranial direct current stimulation in the complex rehabilitation of children with organic brain damages makes it possible to reduce the harmful drug load, which is especially important for modern pediatrics and pediatric neurology.

The implementation of the transcranial direct current stimulation in the complex rehabilitation of children with organic brain damages in the "Neurological Clinic of Dr. Yatsenko" (Kyiv) is a practical significance of this study. The effectiveness of rehabilitation of children with organic brain damages in this clinic was monitored both by conventional methods and by determining the nature of the adaptive responses.

The obtained results give grounds to assert the expediency of using transcranial direct current stimulation in the complex rehabilitation of children with organic brain damages.

Keywords: organic brain damages, periventricular leukomalacia, ischemia, neuroinflammation, transcranial direct current stimulation.

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Tsupukov OM, Kyryk VM, Ustyomenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant.* 2015;3(1):68–73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
2. Яценко КВ. Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія та експериментальні підходи до її корекції. *Укр неврол жур.* 2016;38(1):7–11. *(Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо ППЕ, оформлення статті).*
3. Tsupukov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustyomenko AM, Kyryk VM, Butenko GM, Skibo GG. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant.* 2016;4(2):188–193. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
4. Tsupukov O, Ustyomenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech.* 2016;79(6):557–64. *(Особисто дисертантом проведені*

експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

5. Яценко КВ, Тараненко ТВ, Юрченко ФВ, Скибо ГГ. Вплив комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг у пацієнтів, які хворі на дитячий церебральний параліч. Запорозж мед жур. 2017;19(1):81–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
6. Яценко КВ, Надоненко ОМ. Динаміка електроенцефалографічних показників у пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, під впливом комплексного лікування з використанням методу. Здоб клін експер мед. 2017;2:101-7. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
7. Tsupukov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. Cell Organ Transplant. 2017;5(1):28–32. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
8. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. ScienceRise. Medical Science. 2017;14(6):32–6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*

9. Яценко ЕВ, Криворучко ВС. Анализ электронейромиографических показателей у пациентов с ДЦП после комплексного лечения с использованием микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2017;7(3):464–9. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, оформлення статті).*
10. Tsurykov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia. Фізіол журн. 2017;63(5):3–12. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
11. Яценко КВ. Вплив комплексної терапії з використанням мікрополяризації на електроенцефалографічні показники у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію. Укр неврол журн. 2017;44(3):21–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
12. Яценко ЕВ. Динамика электроэнцефалографических показателей у пациентов с перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатией под влиянием комплексного лечения с использованием метода транскраниальной микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2018;8(2):178–85. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
13. Яценко ЕВ. Эффективность использования метода СИ-терапии у постинсультных пациентов с двигательными нарушениями в

- паретичної верхньої кінцівки. Неврол Нейрохірург Вост Европа. 2018;8(3):392–8. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
14. Яценко КВ. Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. Здоб клін експер мед. 2018;3:151-6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
15. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Дослідження впливу мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*. Укр неврол журн. 2018;47(2):69–73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
16. Яценко КВ. Мозкова гемодинаміка та електроенцефалограма у хворих на симптоматичну епілепсію при комплексному лікуванні з використанням транскраніальної мікрополяризації. Фізіол журн. 2018;64(1):52–58. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
17. Kyryk VM, Kuchuk OV, Mamchur AA, Ustylenko AM, Lutsenko TM, Tsupykov OM, Yatsenko KV, Skibo GG, Bilko DI, Bilko NM. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. Cell Organ Transplant. 2018;6(2):195–201. *(Особисто дисертантом проведені статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

18. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Ефекти слабого постійного електричного струму на нейритогенез у модельних експериментах *in vitro*. Фізіол журн. 2019;65(4):41–49. (Особисто дисертантом проведені статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
19. Яценко КВ. Симптоматична епілепсія: причини виникнення та перспективні методи лікування. Здоб клін експер мед. 2019;1:7–13. (Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо симптоматичної епілепсії, оформлення статті).
20. Яценко ЕВ. Микрополяризация - эффективный неинвазивный метод нейростимуляции при органических поражениях головного мозга у детей. Art of medicine. 2019;2(10):123–127. (Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо мікрополяризації при органічних ураженнях мозку, оформлення статті).
21. Yatsenko K., Lushnikova L., Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I., Kyryk V, & Tsupykov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. J Pers Med. 2020;10(2):66. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
22. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ, Цупиков ОМ. Патент України на корисну модель №142371 А61N 1/18. "Система для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури *in vitro*" № u 2020 0159; Заяв. 05.03.2020; Опубл. 25.05.2020 – Бюл. № 12. (Особистий внесок: проведення досліджень, обробка отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:

23. Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Мамчур АА, Устименко АМ, Яценко КВ, Бутенко ГМ, Скибо ГГ. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє», Київ. 2014:37. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
24. Яценко КВ. Дитяча нейрореабілітація при органічних ураженнях мозку. Збірник тез міжнар наук практ конф «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичного виховання та валеології - 2018», Одеса. 2018:167-168. *Публікація тез, усна доповідь.*
25. Яценко КВ. Ефективний метод відновлення рухових функцій паретичної верхньої кінцівки у постінсультних пацієнтів. Матеріали IV національного конгресу "Інсульт та судинно-мозкові захворювання-2018", Київ. 2018:94. *Публікація тез, усна доповідь.*
26. Яценко КВ. Використання транскраніальної мікрополяризації у нейрореабілітації пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч. Матеріали IV всеукраїнського з'їзду «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичної та реабілітаційної медицини - 2019», Дніпро. 2019:217. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
27. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Вплив мікрополяризації на нейрони гіпокампа під час моделювання запального процесу *in vitro*. Збірник тез 20-го з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня

- народження академіка П. Г. Костюка, Київ. Фізіол жур. 2019;65(3):56. *Публікація тез.*
28. Яценко КВ. Оцінка функціонального стану ЦНС пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, після комплексного лікування з використанням мікрополяризації. Збірник тез 20-го з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка, Київ. Фізіол жур. 2019;65(3):56-57. *Публікація тез.*
29. Yatsenko K. Clinical application of transcranial direct current stimulation for neurorehabilitation of patients with cerebral palsy. Збірник тез конгресу RehabWeek 2019, Торонто. 2019:INRS87. *Публікація тез.*
30. Яценко КВ. Використання мікрополяризації у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. Матеріали конференції Школа клінічних нейронаук "Карпатські читання", Ужгород. 2019:30. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
31. Yatsenko K, Tsurykov O, Skibo G. The protective effects of multipotent mesenchymal stromal cells in *in vivo* and *in vitro* models of neuroinflammation. Abstracts of I International Scientific and Practical Conference "EURASIAN SCIENTIFIC CONGRESS", Барселона. 2020:93-95. *Публікація тез.*
32. Yatsenko K. Effect of transcranial direct current stimulation on cerebral blood flow in patients with cerebral palsy. 34th European Neurology Congress, Цюрих, 2020: *Публікація тез, онлайн доповідь.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	37
1.1. ОРГАНІЧНІ УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ДИТИНИ.....	37
1.1.1. Перивентрикулярна лейкомаляція.....	39
1.1.2. Дитячий церебральний параліч.....	46
1.1.3. Симптоматична епілесія	63
1.1.4. Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія.....	72
1.2. МЕТОДИ КОРЕКЦІЇ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦНС ДИТИНИ ПРИ ОРГАНІЧНИХ УРАЖЕННЯХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ	74
1.2.1. Мікрополяризація – неінвазивний метод нейростимуляції.....	87
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	90
2.1. ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	90
2.2. ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН.....	91
2.2.1. <i>Культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК)</i>	<i>91</i>
2.2.2. <i>Отримання нейральних прогеніторних клітин.....</i>	<i>92</i>
2.2.3. <i>Дисоційована культура нейронів гіпокампа</i>	<i>93</i>
2.3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ	95
2.3.1. <i>Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) in vivo.....</i>	<i>96</i>
2.3.2. <i>Створення моделі ПВЛ in vitro</i>	<i>96</i>
2.3.3. <i>Аналіз лактатдегідрогенази в культуральному середовищі..</i>	<i>99</i>
2.3.4. <i>MTS/формазановий тест.....</i>	<i>100</i>
2.3.5. <i>Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку...101</i>	<i>101</i>

2.4. ТРАНСПЛАНТАЦІЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН	102
2.4.1. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин	102
2.4.2. Трансплантація нейральних прогеніторів	103
2.4.3. Ін'єкція 5-бромдезоксіуридину	104
2.5. МОРФОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	104
2.5.1. Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку	104
2.5.2. Електронно-мікроскопічний аналіз культури стовбурових клітин	105
2.6. ХІМІЧНІ РЕАКТИВИ І РОЗЧИНИ	106
2.7. КЛІНІЧНИЙ МЕТОД ОБСТЕЖЕННЯ	108
2.8. МЕТОД ЕЛЕКТРОЕНЦЕФАЛОГРАФІЇ	111
2.9. МЕТОД ЕЛЕКТРОНЕЙРОМІОГРАФІЇ	114
2.10. МЕТОД ТРАНСКРАНІАЛЬНОЇ ДОПЛЕРОГРАФІЇ СУДИН ГОЛОВИ.....	115
2.11. МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ	117
2.12. МЕТОДИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ	119

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ КЛІТИННИХ МЕХАНІЗМІВ

ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА *IN*

***VIVO* ТА *IN VITRO* МОДЕЛЯХ**

3.1. Дослідження клітинних механізмів нейропластичності головного мозку на <i>IN VIVO</i> моделі ішемічного ушкодження ЦНС.....	121
3.2. Вивчення клітинних механізмів гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку на <i>IN VIVO</i> моделі перивентрикулярної лейкомаляції	128
3.3. Дослідження клітинних механізмів гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку на <i>IN VITRO</i> моделі перивентрикулярної лейкомаляції	132

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ НА <i>IN VITRO</i> МОДЕЛІ ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ	171
4.1. Дія мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу <i>IN VITRO</i>	171
4.2. Вплив мікрополяризації на нейритогенез при моделюванні запального процесу <i>IN VITRO</i>	176
РОЗДІЛ 5. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ З ДИТЯЧИМ ЦЕРЕБРАЛЬНИМ ПАРАЛІЧЕМ...	187
5.1. Вплив транскраніальної мікрополяризації на електроенцефалографічні показники пацієнтів з ДЦП.....	188
5.2. Дія транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з ДЦП.....	198
5.3. Аналіз електронейроміографічних показників пацієнтів з ДЦП після транскраніальної мікрополяризації.....	206
РОЗДІЛ 6. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ З СИМПТОМАТИЧНОЮ ЕПІЛЕПСІЄЮ.....	219
6.1. Аналіз електроенцефалографічних показників у пацієнтів з симптоматичною епілепсією після транскраніальної мікрополяризації	219
6.2. Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з симптоматичною епілепсією..	224

РОЗДІЛ 7. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ З ПЕРИНАТАЛЬНОЮ ГІПОКСИЧНО- ІШЕМІЧНОЮ ЕНЦЕФАЛОПАТІЄЮ (ПГІЕ)	231
7.1. Вплив транскраніальної мікрополяризації на електроенцефалографічні показники пацієнтів з ПГІЕ	231
7.2. Дія транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з ПГІЕ	238
 РОЗДІЛ 8. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ....	245
 ВИСНОВКИ	284
 СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	288
 ДОДАТОК 1. СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ..	326

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

- БА – базилярна артерія
- ГВ – гіпервентиляція
- ДЦП – дитячий церебральний параліч
- ЕЕГ – електроенцефалографія
- КА – коефіцієнт асиметрії
- КГД – киснево-глюкозна депривація
- ЛДГ – лактатдегідрогенеза
- ЛПС – ліпополісахариди
- ММСК – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини
- МП – мікрополяризація
- НПК – нейральні прогеніторні клітини
- ПВЛ – перивентрикулярна лейкомаляція
- ПГІЕ – перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія
- ПМА – передня мозкова артерія
- СМА – середня мозкова артерія
- СШК – середня швидкість кровообігу
- СЦП – спектральна щільність потужності
- ТДГ – транскраніальна доплерографія
- ТМП – транскраніальна мікрополяризація
- ФБ – фосфатний буфер
- ФС – фотостимуляція
- BrdU – 5-бромдезоксіуридин
- DCX – doublecortin
- GFP – green fluorescent protein
- MTS – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-
2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
- PBS – phosphate-buffered saline

ВСТУП

Актуальність теми. Актуальним завданням сучасної патологічної фізіології є з'ясування патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, ураження білої речовини головного мозку, яка є однією з причин прогресуючого зростання частоти органічних уражень головного мозку. Органічні ураження головного мозку новонароджених - це група розладів неврологічного характеру, які проявляються дистрофічними змінами нервової тканини і порушенням роботи нейронів у результаті загибелі нервових клітин. До наслідків органічних уражень головного мозку, в етіопатогенезі яких перивентрикулярна лейкомаляція відіграє провідну роль, належать дитячий церебральний параліч (ДЦП), симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія [14, 84].

Показано, що генетичні програми і регуляція формоутворення нервової системи контролюються, перш за все, перивентрикулярною зоною. З нею пов'язані мітоз, міграція нейронів до кори і підкіркових структур, а також, що, особливо важливо в період онтогенезу, аксональний синаптогенез з клітинами-мішенями і формування функціональних систем [260].

Існує декілька патогенетичних механізмів пошкодження перивентрикулярної зони. Найбільш відомий - гіпоксичний вплив. Гіпоксичні та ішемічні зміни в перивентрикулярній зоні призводять до деструкції нервової тканини і лейкомаляції з незворотними наслідками [148].

Останнім часом активно вивчається стан імунної системи, нейробиохімічні маркери нейродеструктивних і репаративних механізмів при органічних ушкодженнях головного мозку.

Серед маркерів нейродеструктивних змін широку увагу отримали цитокіни. Дослідження підтверджують гіпотезу про те, що прозапальні цитокіни (наприклад, IL-6 і TNF- α), швидко з'являються в ушкодженому мозку. Вони відповідають за прогресуючу загибель нейронів, і є важливими пусковими факторами нейропротективних механізмів після гострого періоду пошкодження мозку [138].

Досі ведеться пошук немедикаментозних методів корекції ушкоджених функцій ЦНС, які дозволили б підвищити ефективність терапії шляхом стимуляції природних механізмів саногенезу, легко комбінувалися б з іншими, традиційно застосовуваними методиками й не спричиняли небажаних наслідків.

Одним із перспективним напрямків корекції функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку.

Мікрополяризація – це неінвазивний електротерапевтичний метод нейростимуляції головного мозку, який успішно застосовується при лікуванні різноманітних неврологічних захворювань [279].

Стимуляція структур ЦНС слабким постійним електричним струмом (до 1 мА) широко використовується як допоміжний метод для підвищення ефективності когнітивних функцій, зокрема пам'яті та при таких патологіях як інсульт, хвороби Альцгеймера та Паркінсона, нейрозапалення та ін. [167].

Клінічний ефект мікрополяризації визначається як спрямованим на зони ушкодження впливом постійного струму, так і загальною нормалізацією клітинного та тканинного гомеостазу. Відмічають певні особливості анодних і катодних ефектів мікрополяризації [279].

Незважаючи на широке використання у неврологічній практиці, механізми, які лежать в основі протекторних ефектів мікрополяризації значною мірою не з'ясовані і потребують експериментальних досліджень.

Маловивченими є питання щодо безпосереднього впливу мікрополяризації на морфо-функціональні властивості нервових клітин за нормальних і патологічних умов.

Експериментальні моделі з використанням клітинних культур, які зберігають свої функції в умовах культивування, надають можливість дослідити ефекти мікрополяризації на клітинному рівні.

Використання моношарових культур надає можливість підведення електродів для пропускання слабого постійного електричного струму до шару нервових клітин, що імітує умови терапії з використанням мікрополяризації [267].

Оскільки ще не до кінця встановлені патогенетичні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також механізми нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції, виникає необхідність дослідження можливості корекції функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку за допомогою мікрополяризації.

Враховуючи вищевикладене, ми вважали за доцільне виявити патогенетичні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та дослідити вплив комплексного лікування з застосуванням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції на морфо-функціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Дослідження регенеративного потенціалу мезенхімальних стовбурових клітин при перинатальній патології ЦНС» (2015-2019 рр.) №00115U003633, «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012-2016 рр.) №0112U001475, «Клітинні та молекулярні механізми нейродегенерації та шляхи її корекції» (2014-2018 рр.) №0113U007273; у рамках спільного проекту НАН України та Українського науково-технологічного центру «Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини при перинатальній патології ЦНС» (2014-2016 рр.) № 0114U006119.

Мета дослідження

Виявлення патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та дослідження механізмів нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції, а також дослідження можливості корекції

функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку.

Завдання дослідження:

1. З'ясувати клітинні механізми розвитку гіпоксично-ішемічного ураження перинатальної ЦНС на *in vivo* моделі ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ), яка є однією з причин розвитку органічних уражень ЦНС дитини (ДЦП, симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія).

2. Охарактеризувати вплив органічного ураження головного мозку, зокрема ішемічного ушкодження, на нейропластичність та оцінити можливий вплив трансплантації стовбурових клітин на стимуляцію ендogenous нейрогенезу.

3. Створити *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

4. Визначити вплив трансплантації стовбурових клітин на стан нервової тканини на створеній *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції.

5. З'ясувати механізми нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку на дисоційованій культурі клітин гіпокампа миші.

6. Оцінити можливість терапевтичного впливу комплексного лікування із застосуванням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції на мозковий кровообіг у пацієнтів з органічними ураженнями ЦНС.

7. З'ясувати вплив неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції на динаміку електронеуроміографічних показників

пацієнтів з органічним ураженнями ЦНС.

8. Визначити за допомогою електроенцефалографії терапевтичну ефективність додавання неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції у комплекс лікувально-профілактичних засобів дітям з органічним ураженням ЦНС.

Об'єкт дослідження: патогенетичні механізми розвитку гіпоксично-ішемічного ураження перинатальної ЦНС та механізми нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції.

Предмет дослідження: структурно-функціональні зміни в головному мозку експериментальних тварин, викликані гіпоксично-ішемічним ураженням і запаленням, та динаміка стану ЦНС і мозкового кровообігу в дітей з органічними ураженнями головного мозку під впливом мікрополяризації.

Методи дослідження. Для досягнення мети цієї роботи були використані такі методи: моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* та *in vitro*, імуноцитохімія та гістохімія на світловому та електронно-мікроскопічному рівнях, біохімічні, транскраніальна мікрополяризація, електроенцефалографія, електронейроміографія, транскраніальна доплерографія судин мозку, клініко-неврологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі представлені оригінальні результати дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та механізмів нейропротекторної

дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції, а також можливостей корекції функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей продемонстровано, що одним із клітинних механізмів, відповідальних за нейропластичність нервової тканини у відповідь на органічні ураження головного мозку, зокрема ішемічне ушкодження, може бути активація ендогенного нейрогенезу в субгранулярній зоні зубчастої звивини.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції показано, що перивентрикулярна лейкомаляція призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і, відповідно, олігодендроцитів та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.

Для з'ясування патогенетичних механізмів ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції, а також для дослідження шляхів нейропротекції головного мозку створено нову експериментальну *in vitro* модель цієї патології на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

Уперше на створеній нами *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпополісахаридів має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. Спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпополісахаридів призводить до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдагідрогенази в культуральне середовище, degradaції основного білка мієліну, що свідчить про пошкодження білої

речовини головного мозку, та спричиняє виражений реактивний астро- та мікрогліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

На використаній експериментальній моделі нейрозапалення (короткострокова культура дисоційованих клітин гіпокампа з додаванням ліпополісахариду в культуральне середовище) показано, що ліпополісахарид у концентрації 10 мкг/мл призводить до пошкодження культивованих клітин.

Уперше на короткостроковій культурі дисоційованих клітин гіпокампа показано, що мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та запобігає їх ушкодженню при моделюванні процесу нейрозапалення. Отримані дані розширюють уявлення про нейропротекторні механізми, які задіяні в умовах використання мікрополяризації. Активація клітинного метаболізму підвищує здатність нервових клітин протистояти впливу негативних факторів нейрозапалення.

Уперше на моделі короткострокової культури дисоційованих клітин гіпокампа виявлена здатність мікрополяризації впливати безпосередньо на нейритогенез та стабілізувати стан нервових клітин. У початковий період культивування, мікрополяризація значно підвищує ефективність формування нервових відростків, у тому числі в присутності фактору запалення – ліпополісахаридів. В умовах довгострокової культури, коли нейромережі добре розвинені, вплив мікрополяризації на нейритогенез менш виражений, але стабілізуючий ефект мікрополяризації, також проявляється в присутності ліпополісахаридів.

Аналіз даних електроенцефалографічного дослідження у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку групи

порівняння та основної до і після лікування продемонстрував, що у хворих основної групи, в комплексне лікування яких додавалася транскраніальна мікрополяризація, спостерігалася більш виражена позитивна динаміка параметрів електроенцефалограми.

Показано, що покращення електронейроміографічних показників після курсу комплексного лікування з застосуванням методу мікрополяризації свідчить про поліпшення функціонального стану нейром'язового апарату, який відбувається завдяки оптимізації впливів на нього надсегментарних структур рухового аналізатора.

Продемонстровано, що включення транскраніальної мікрополяризації до лікувально-реабілітаційного комплексу пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови.

Практичне значення роботи. Результати дослідження мають передусім фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про клітинні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, яка є однією з причин прогресуючого зростання частоти органічних ураженнях головного мозку дитини, до наслідків яких належать дитячий церебральний параліч, симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія.

Практичне значення отриманих результатів полягає в знаходженні нових підходів для лікування органічних уражень головного мозку за допомогою неінвазивних методів нейростимуляції.

Розроблену в дисертаційній роботі нову експериментальну *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також для пошуку шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології.

За результатами проведених досліджень отримано патент №142371 "Система для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури *in vitro*".

На підставі проведених інструментально-нейрофізіологічних і клініко-неврологічних досліджень показано, що комплексна реабілітація з використанням транскраніальної мікрополяризації дозволяє досягти вірогідно більш вираженого позитивного ефекту в порівнянні з загальноприйнятою технологією лікування органічних уражень головного мозку.

Встановлено, що застосування мікрополяризації в комплексній реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку дає можливість знизити об'єм медикаментозного навантаження, що особливо важливо для сучасної педіатрії й дитячої неврології.

Впровадження результатів досліджень. Впровадження технології комплексної реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку з використанням методу транскраніальної мікрополяризації в "Неврологічній клініці доктора Яценко" (м. Київ) є практичною реалізацією виконаних досліджень. Ефективність реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку в цій клініці контролювали як за загальноприйнятими методиками, так і за допомогою визначення характеру адаптаційних реакцій.

Одержані результати дають підстави стверджувати про доцільність використання транскраніальної мікрополяризації у комплексній реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто обрано і обґрунтовано напрямок і схему наукової роботи, проведено критичний аналіз літературних джерел відповідно до сучасних уявлень про патогенетичні механізми розвитку гіпоксично-ішемічного ураження перинатальної ЦНС та механізми нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції. Сформульовані мета, основні завдання дисертаційної роботи, визначено репрезентативний об'єм наукових досліджень та комплекс методів, організовано і проведено основну частину експериментів, аналіз отриманих результатів, статистичну обробку фактичного матеріалу, його наукову інтерпретацію, узагальнення результатів і формулювання висновків.

Особисто здобувачем була виконана більшість представлених у роботі експериментів з моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo*, транскраніальної мікрополяризації, проаналізовано дані електроенцефалографічних, електронейроміографічних, доплерографічних досліджень у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку.

Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України д.мед.н. О. М. Цупиковим та д.б.н. І. В. Лушніковою, співробітниками ДУ «Інститут генетичної та

регенеративної медицини НАМН України» к.мед.н. В. М. Кириком та к.б.н. А. М. Устименко.

Автор щиро вдячний науковому консультанту роботи чл.-кор. НАНУ, д.мед.н., проф. Г. Г. Скибо за корисні поради під час планування експериментів та обговорення результатів.

Апробація результатів дисертації. Усі матеріали дисертації доповідалися на семінарах Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наукових симпозиумах і з'їздах:

- науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє», 2014, Київ, (Україна);
- міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичного виховання та валеології - 2018», 2018, Одеса (Україна);
- конгресі "Інсульт та судино-мозкові захворювання-2018", 2018, Київ (Україна);
- з'їзді «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичної та реабілітаційної медицини - 2019», 2019, Дніпро (Україна);
- 20-му з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченому 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка, 2019, Київ (Україна);
- школі клінічних нейронаук «Карпатські читання», 2019, Ужгород (Україна);
- Congress RehabWeek2019, 2019, Toronto (Canada);

- I International Scientific and Practical Conference "EURASIAN SCIENTIFIC CONGRESS", 2020, Barcelona (Spain);
 - 34th European Neurology Congress, 2020, Zurich (Switzerland);
- а також на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 32 наукові роботи, з яких 21 стаття у вітчизняних та іноземних наукових журналах фахового спрямування, 1 патент та 10 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація складається із вступу, восьми розділів, висновків та списку використаної літератури.

У першому розділі наведено критичний аналіз сучасних наукових літературних джерел щодо стану вивчення органічного ураження головного мозку та методів корекції функціонального стану ЦНС дитини при цій патології.

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» описані експериментальні *in vivo* та *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції, методи виділення та культивування клітин різного генезу, методи імуногістохімії, методи електроенцефалографії, електронейроміографії, транскраніальної доплерографії судин голови, методи лікування.

У третьому-сьомому розділах наведено результати експериментальних досліджень і статистичний аналіз отриманих даних.

У восьмому розділі «Обговорення результатів» здійснено аналіз і узагальнення отриманих результатів дослідження.

На основі отриманих результатів зроблено висновки.

Список використаної літератури налічує 325 джерел.

Обсяг дисертації – 333 сторінок, із них основного тексту – 265 сторінок.

Дисертаційна робота ілюстрована 48 рисунками і 25 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Органічні ураження головного мозку дитини

Однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем сучасної педіатрії та неврології є органічні ураження головного мозку новонароджених, оскільки саме завдяки цим пацієнтам збільшується кількість дітей з обмеженими можливостями [6]. Органічні ураження мозку в дітей найчастіше пов'язані з перинатальним пошкодженням головного мозку. Це ціла група патологічних станів, викликаних негативним впливом несприятливих факторів на плід або вже новонароджену дитину [14].

Розрізняють такі ступені тяжкості ураження головного мозку:

- легкий ступінь, коли дистрофічних змін зазнали 5 - 20 % нервової тканини, як правило, не вимагає особливих медичних впливів;

- середній ступінь - 20 - 50 % деструкції тканини мозку, проявляється різними порушеннями діяльності нервової системи і вимагає медичного втручання;

- тяжкий ступінь - 50 - 70 % нервової тканини пошкоджено, спостерігаються важкі нервово-психічні розлади, медичне втручання дає лише відносний і короткочасний позитивний ефект [14].

Причини формування органічних уражень головного мозку можуть бути вродженими або набутими.

До вроджених причин належать: алкоголь, куріння, сильні стреси, інфекції під час вагітності, приймання лікарських або токсичних речовин, різкі перепади артеріального тиску і температури тіла, вплив радіоактивного й рентгенівського випромінювання,

кисневе голодування плода або зтяжні пологи, передчасне відшарування плаценти та інші порушення [14].

Набуті причини формування органічного ураження головного мозку містять групу найрізноманітніших патологій, які сприяють формуванню дистрофічних змін мозкової речовини, які отримані людиною вже після народження: спадково-дегенеративні захворювання і хвороби, зумовлені порушеннями обміну речовин, захворювання нервової системи, зумовлені первинним ураженням внутрішніх органів або кісток скелета, інфекційні захворювання, нейродегенеративні захворювання, пухлини, судинні захворювання мозку, інтоксикації алкоголем, наркотичними речовинами і отрутами [14].

Результатами органічного ураження головного мозку можуть бути: 1) неповне одужання (відсутність яких-небудь помітних дефектів, людина може повернутися до повноцінного життя); 2) прояви, які не становлять небезпеки для життя, але в тій чи іншій мірі обмежують трудову діяльність і самообслуговування; 3) грубі порушення (людина прикута до ліжка, потребує постійного стороннього догляду).

Високий рівень пластичності головного мозку у новонародженого дозволяє подолати ці патологічні зміни, тому в деяких випадках у дитини не залишається ніяких симптомів після такого ушкодження. Але в більшості випадків залишаються резидуальні явища, які можуть бути минуцями або переростати в більш важку патологію [14].

Однією з важливих ланок патогенезу органічних уражень головного мозку новонароджених є перивентрикулярна лейкомаляція.

1.1.1. Перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ)

Перивентрикулярна лейкомаляція (ПВЛ) - це форма ураження білої речовини головного мозку в перивентрикулярних ділянках, яка характеризується некрозом (найчастіше коагуляційним) [68].

Вогнища перивентрикулярної лейкомаляції проходять крізь три стадії: 1) некроз, 2) розсмоктування і 3) утворення гліальних рубців або кіст [253].

Навколо вогнищ перивентрикулярної лейкомаляції спостерігається ділянка інших уражень білої речовини мозку - загибель незрілих олігодендроцитів, проліферація мікроглії і астроцитів, набряки, кровотечі, втрата капілярів та ін. (так званий «дифузний компонент перивентрикулярної лейкомаляції»). Однак дифузні ураження без некрозу - це не перивентрикулярна лейкомаляція [148].

Кісти виникають на місці великих і злитих вогнищ перивентрикулярної лейкомаляції при змішаному некрозі (коліквация в центрі і коагуляційна облямівка на периферії).

Розрізняють дві форми перивентрикулярної лейкомаляції [148]:

- кістозна, при якій вогнищеві некрози макроскопічні та еволюціонують до множинних кіст;
- некістозна, при якій вогнищеві некрози мікроскопічні і еволюціонують головним чином до гліальних рубців.

Кістозна і некістозна перивентрикулярна лейкомаляція чітко пов'язана з подальшим неврологічним дефіцитом .

Сьогодні некістозна форма перивентрикулярної лейкомаляції становить більшу частину серед ушкоджень травми білої речовини головного мозку в недоношених дітей [121].

Завдяки покращенню догляду за новонародженими кістозна перивентрикулярна лейкомаляція зараз трапляється нечасто [108].

З іншого боку, некістозна, переважно дифузна форма перивентрикулярної лейкомаляції, переважає в дуже недоношених дітей [27].

Показано, що магнітно-резонансна томографія неонатального мозку (МРТ) є більш чутливою, ніж краніальне ультразвукове дослідження (УЗД) для виявлення некістозної форми перивентрикулярної лейкомаляції, і тому вважається золотим стандартним методом нейровізуалізації для виявлення та кількісної оцінки дифузної перивентрикулярної лейкомаляції в недоношених [310].

Однак магнітно-резонансна томографія є дорогим діагностичним методом, який вимагає транспортування та в деяких випадках використання седативних засобів.

Отже, нейровізуалізація ускладнюється, особливо у важко хворих немовлят. Крім того, доступ до магнітно-резонансної томографії часто обмежений, що ускладнює серійне сканування, а виконання одного МРТ може бути недостатнім і занижувати ступінь тяжкості перивентрикулярної лейкомаляції [178].

Краніальне ультразвукове дослідження має перевагу в тому, що воно є більш доступним методом, який дозволяє забезпечити безпечно, надійне отримання серійних зображень у динаміці [295]. Це дає змогу оцінити еволюцію пошкодження у часі, а також ріст та дозрівання мозку. Краніальне ультразвукове дослідження

залишається дуже корисним для виявлення кістозної перивентрикулярної лейкомаляції (**Рис. 1.1**).

Незважаючи на те, що МРТ перевершує УЗД в оцінці більш легких форм перивентрикулярної лейкомаляції, за останні десятиліття якість неонатальних УЗД значно покращилася з точки зору роздільної здатності та швидкості обробки зображень.

Це розширило спектр можливостей діагностики пошкоджень білої речовини головного мозку в недоношених дітей, які можна виявити сьогодні шляхом ретельного сканування за допомогою сучасних систем УЗД [295].

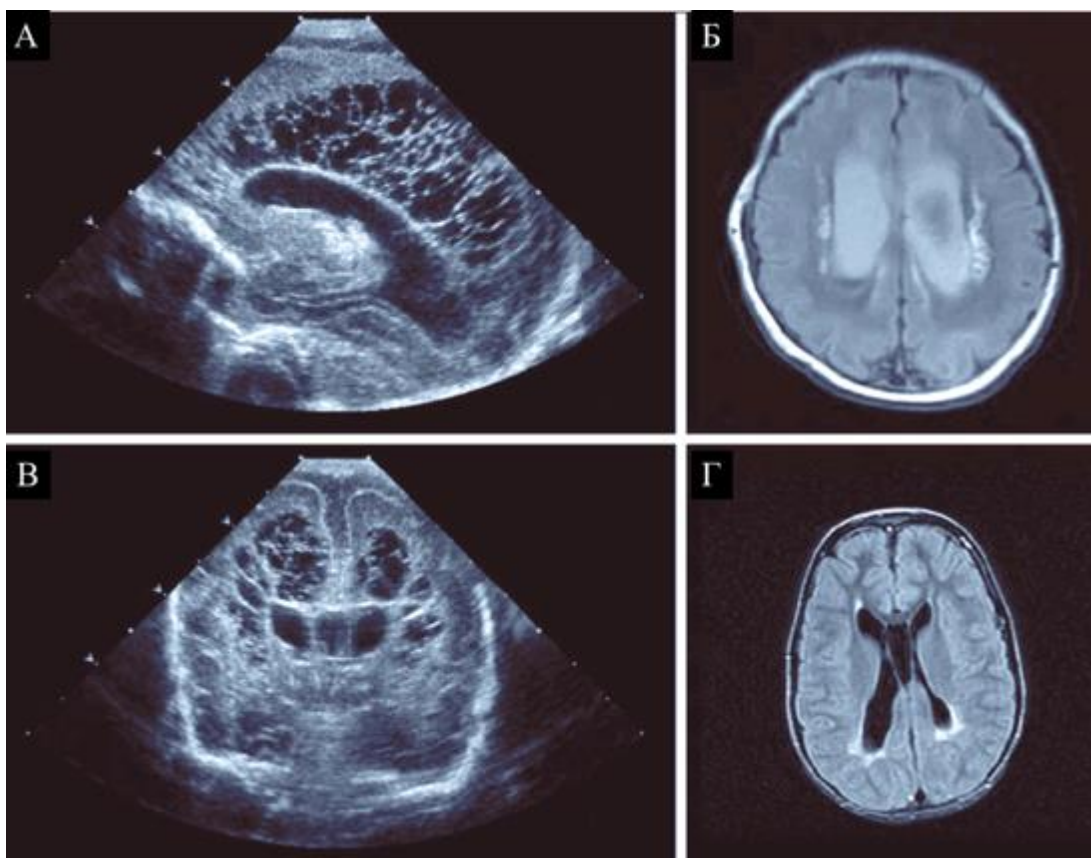


Рис. 1.1. *Нейровізуалізація перивентрикулярної лейкомаляції за допомогою магнітно-резонансної томографії та краніального ультразвукового дослідження. Сагітальні (А) та корональні (В) краніальні ультрасонограми, отримані у віці 2 доби. Зображення*

ілюструють значну двосторонню кістозну перивентрикулярну лейкомаляцію. Б - магнітно-резонансне зображення, отримане у віці 10 днів у немовля, народженого на 34 тиждні гестації. Зображення показує двосторонні розширені, заповнені кров'ю, шлуночки та значні двосторонні перивентрикулярні зони підвищеного сигналу в білій речовині латерально до шлуночків, що відповідає перивентрикулярній лейкомаляції. Г - T2-зважене магнітно-резонансне зображення у 9-річної дівчини з неконтрольованими судомою з дитинства. Помітні перитригональні зони підвищеного сигналу, що відповідають перивентрикулярній лейкомаляції. Модифіковано з [68].

Дані краніального ультразвукового дослідження на різних етапах захворювання дають можливість оцінити результати лікування та визначити подальші дії щодо терапії, а також ці дані використовуються для диспансерного спостереження за дітьми першого року життя з перивентрикулярною лейкомаляцією [68].

Хоча зв'язок між результатами ультразвукового дослідження та клінічною картиною не завжди закономірний - при наявності змін на ультрасонограмі (ультразвукові ознаки крововиливів, лейкомаляції) можливі нормальні неврологічні наслідки [295].

На сьогодні краніальне ультразвукове дослідження розглядається здебільшого як скринінговий метод, за допомогою якого виділяється група дітей, яка підлягає подальшому глибшому обстеженню за допомогою магнітно-резонансної або комп'ютерної томографії [295].

Крім клінічних досліджень перивентрикулярної лейкомаляції широко проводяться експериментальні дослідження на тваринах для розкриття патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та можливих методів лікування цієї патології.

Два способи викликають селективні перивентрикулярні ураження білої речовини в передньому мозку незрілих експериментальних тварин: гіпоксично-ішемічне ушкодження (зазвичай це поєднання односторонньої оклюзії сонних артерій та зниження рівня атмосферного кисню) та активація імунної системи шляхом введення бактеріального ліпополісахариду.

Обидва підходи призводять до дифузної активації мікрогліальних клітин, надсекреції прозапальних цитокінів і активних видів кисню та ушкодження перивентрикулярної незрілої олігодендроглії [68].

На відміну від людей, у яких зрілі олігодендроглії починають з'являтися в передньому мозку та ініціювати мієлінізацію в третьому триместрі гестації, термінальна олігодендрогліальна диференціація та мієлінізація у мишей та щурів починаються постнатально.

Більшість олігодендрогліальних клітин у неонатальних мишей та щурів є премієлінованими (незрілими) олігодендроцитами [68].

Як і премієліновані олігодендроцити людини, ці клітини вийшли з мітотичного циклу, утворили численні відростки та синтезували галактоліпіди, характерні для мієліну, але ще не почали синтезувати значну кількість структурних білків мієліну, таких як протеоліпіди та основний білок мієліну.

Премієлінізовані олігодендроцити більш чутливі, ніж олігодендрогліальні прогенітори або зрілі олігодендроцити, до глутаматної ексайтотоксичності [123].

Олігодендрогліальні прогенітори зберігаються також у третьому триместрі вагітності людини і в неонатальному теленцефалоні щурів і мишей.

Ці рухливі, активно мітотичні клітини, хоча і менш чутливі до токсичної дії глутамату, ніж премієлінізовані олігодендроцити, але особливо вразливі до токсичного впливу прозапальних цитокінів, що продукуються активованою мікроглією [115].

Експериментальна перивентрикулярна лейкомаляція, як і ПВЛ у людини, має пошкоджуючий вплив не лише на глію, а також і на нейрони. Підпластинчасті нейрони неонатальних гризунів, які зазнали ішемічного пошкодження, гинуть шляхом апоптозу [182].

Крім того, хоча зображення, отримані за допомогою звичайного магнітного резонансу, у цих тварин демонструють лише двосторонні перивентрикулярні ураження, зображення магнітного резонансу, посиленого марганцем, виявляють також невеликі кортикальні ураження, іпсилатеральні до сонних артерій, які були перетиснуті. Ці коркові ураження при гістологічному аналізі виявляються пошкодженими нейронами [316].

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції на гризунах є простим і недорогим у порівнянні з терапевтичними дослідженнями перивентрикулярної лейкомаляції на великих тварин, таких як ягнята або новонароджені поросята. Зокрема, моделі перивентрикулярної лейкомаляції на мишах мають важливу перевагу в тому, що внесок конкретних генів у розвиток захворювання може бути легко досліджений за допомогою нокаутування та надекспресії.

Однак суттєвим обмеженням моделювання перивентрикулярної лейкомаляції на гризунах є те, що біла речовина головного мозку в щурів і мишей становить менше 15 % від об'єму мозку, тоді як біла речовина у людини або приматів становить більше 50 % об'єму мозку [68].

Для адекватного доклінічного моделювання нових терапевтичних втручань при перивентрикулярній лейкомаляції, таких як антагоністи рецепторів глутамату, інгібітори мікрогліальної активації та олігодендротрофні білки, в ідеалі обрана експериментальна тварина повинна мати достатньо великий об'єм білої речовини півкулі головного мозку, щоб можна було вивчити вогнищеві та дифузні компоненти перивентрикулярної лейкомаляції на різних фазах розвитку хвороби, оскільки патогенетичні механізми, що грають на кожному етапі, можуть бути різними.

Крім того, функціональні дослідження експериментальних тварин з моделлю перивентрикулярної лейкомаляції повинні кількісно оцінити руховий та перцептивний дефіцити, щоб стверджувати про придатність моделі.

Лише за умов наявності цих характеристик ми можемо бути впевнені, що результати, отримані на конкретній тваринній моделі, можна буде транслювати на недоношених дітей з ризиком виникнення перивентрикулярної лейкомаляції [68].

Зміни в перивентрикулярній зоні призводять до деструкції нервової тканини і лейкомаляції з незворотними наслідками, які можуть переростати в більш важку патологію - дитячий церебральний параліч, перинатальну гіпоксично-ішемічну енцефалопатію, епілепсію та інші [84, 269].

1.1.2. Дитячий церебральний параліч (ДЦП)

Термін "дитячий церебральний параліч" об'єднує групу захворювань, які проявляються в першу чергу порушеннями рухів, рівноваги та постави. Церебральний параліч є однією з найчастіших причин дитячої інвалідності.

Поширення дитячого церебрального паралічу в Європі становить 2,0–3,5 на 1000 живих новонароджених (в Україні - 2,56), співвідношення захворюваності на дитячий церебральний параліч серед чоловіків і жінок становить 1,4:1 [196]. Випадки церебрального паралічу були задокументовані протягом всієї історії, але перші відомі згадки трапляються ще в творчості Гіппократа в V столітті до нашої ери [227].

Уперше церебральний параліч був описаний британським хірургом Джоном Літтлом.

У 1861 році на засіданні Лондонського товариства акушерів Літтл заявив що асфіксія, яка спричинена патологією під час пологів, призводить до пошкодження спинного мозку та розвитку спастичності і плегії в ногах [227].

Отже, він уперше описав те, що зараз відомо як одна з форм спастичного дитячого церебрального паралічу - спастична диплегія.

Протягом тривалого дитячий церебральний параліч називали хворобою Літтла і основною причиною дитячого церебрального паралічу вважалася асфіксія під час пологів.

У кінці 19 століття Зигмунд Фройд та сер Вільям Ослер почали робити важливі дослідження щодо церебрального паралічу [258].

Зигмунд Фройд вважав, що патологія під час пологів є лише симптомом більш ранніх порушень розвитку плода. Фройд зауважив

зв'язок між дитячим церебральним паралічем і деякими варіантами розумової відсталості та епілепсії.

Вільям Ослер уперше ввів термін «дитячий церебральний параліч» (нім. zerebrale Kinderlähmung), об'єднавши різні порушення, викликані ненормальним постнеонатальним розвитком головного мозку [227].

З середини 1940-х років засновники Американської академії церебрального паралічу та медицини розвитку (Карлсон, Кротерс, Дівер, Фей, Перлштайн та Фелпс) та Мак Кіт, Полані, Бакс та Інграм у Великобританії були одними з лідерів, які просували концепцію церебрального паралічу вперед і сприяли тому, що дитячий церебральний параліч ставав центром уваги наукових досліджень та лікувальних закладів [258].

Завжди було складно дати визначення церебральному паралічу. Задokumentовано численні спроби, які були зроблені протягом багатьох років. Наприклад, у 1959 Мак Кіт і Полані визначали церебральний параліч як "стійкі, але незмінні порушення рухів і постави, які проявляються в перші роки життя, і мають непрогресуючий характер" [166].

У 1964 році Бакс повідомив визначення церебрального паралічу, яке було запропоноване міжнародною робочою групою і стало класичним визначенням, яке використовувалося тривалий час [31]. У тому визначенні зазначалося, що церебральний параліч - це порушення рухів та постави через дефект або ураження незрілого мозку.

До такого короткого визначення, яке цитувалося багатьма авторами, Бакс додав свої коментарі: "з точки зору практичних цілей треба виокремлювати від церебрального паралічу ті порушення

постави та руху, які є нетривалими, спричинені прогресуючим захворюванням, спричинені виключно через психічну недостатність".

Група, на розгляд якої Бакс виніс свої коментарі, вважала, що краще залишити те просте визначення дитячого церебрального паралічу без додаткових коментарів, яке можна було б легко перекласти на інші мови та сподіватися, що воно може стати загальновизнаним.

Таке визначення концепції церебрального паралічу акцентувало увагу виключно на рухових аспектах, а також наголошувало на специфічних наслідках раннього, на відміну від пізнього набутого ураження мозку.

У таке визначення дитячого церебрального паралічу не були внесені сенсорні, когнітивні, поведінкові та інші, пов'язані з цим, порушення, які дуже поширені серед людей з «невпорядкованим рухом і поставою через дефект або ураження незрілого мозку».

Неоднорідність розладів, що охоплюються терміном дитячий церебральний параліч, а також прогрес у розумінні розвитку немовлят з ранніми пошкодженнями мозку, змусили Мутча та його колег змінити визначення дитячого церебрального паралічу в 1992 р. таким чином: "Дитячий церебральний параліч - це об'єднуючий термін, що охоплює групу непрогресуючих, але часто мінливих, синдромів рухових порушень, які є вторинними пошкодженнями або аномаліями мозку, що виникають на ранніх стадіях розвитку" [199].

Це визначення продовжувало підкреслювати рухові порушення та визнавало їх мінливість і виключало прогресуючий характер хвороби, який додавав у своїх коментарях Бакс.

11–13 липня 2004 року в Бетесді (США) відбувся Міжнародний семінар із визначення та класифікації церебрального паралічу у відповідь на виниклу потребу оцінити стан інформації щодо церебрального паралічу та переглянути визначення, яке для нього використовувалося на той момент [258].

І лише у квітні 2006 році міжнародна колегія дійшла до консенсусу щодо визначення дитячого церебрального паралічу: "Дитячий церебральний параліч - це група стійких порушень розвитку рухів та постави, що спричиняють обмеження активності, які викликані непрогресуючими пошкодженнями, що виникли в мозку плода, що розвивається, або немовляти. Рухові порушення при церебральних паралічах часто супроводжуються дефектами чутливості, сприйняття, пізнання, спілкування та поведінки, епілепсією та вторинними проблемами опорно-рухового апарату." [258]. У цьому визначенні формулювання "стійкі порушення" виключає тимчасові порушення, але визнає, що у дітей та дорослих спостерігаються мінливі форми клінічних проявів. Термін "непрогресуючі пошкодження" у визначенні використано для позначення того, що патофізіологічні механізми, що призводять до церебрального паралічу, вважаються такими, що виникають з однієї, ініціюючої події або дискретного ряду подій, які на момент постановки діагнозу вже неактивні. Ця ініціююча подія спричиняє порушення нормальної структури та функції мозку, яке в майбутньому може бути пов'язане зі змінами або додатковими проявами [258].

Дитячий церебральний параліч - це неоднорідний стан як за етіологією, так і за руховими порушеннями та тяжкістю захворювання.

Дитячий церебральний параліч описується з використанням різних систем класифікації, насамперед залежно від типу рухових порушень, топографії та ступеня тяжкості ушкоджень [258].

Топографічний розподіл рухових розладів при дитячому церебральному паралічу описується або як геміплегія, диплегія, тетраплегія, або залежно від пошкодженої ділянки головного мозку, такої як кора (спастичність), базальні ганглії (дистонічна/дискінетична) або мозочок (атаксія) (Рис. 1.2) [302].

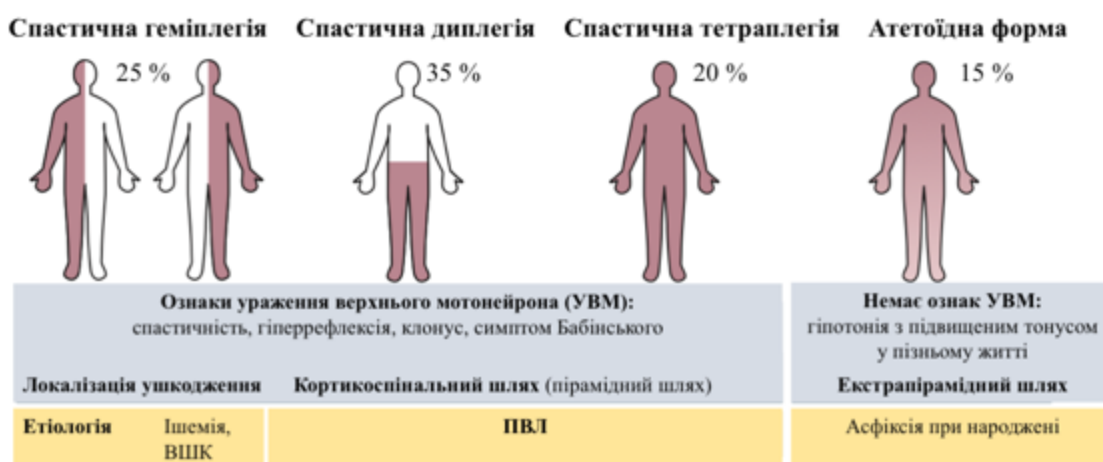


Рис. 1.2. Основні форми дитячого церебрального паралічу залежно від порушень м'язового тону та уражених частин тіла. УВМ – ураження верхнього мотонейрона, ВШК - внутрішньо-шлуночкові крововиливи. Модифіковано з [205].

Найбільш поширеною формою ДЦП є спастична, вона становить 80 % усіх випадків. Для спастичної диплегії характерний підвищений тонус м'язів, які постійно перебувають у стані скорочення. При такій формі спостерігається раннє формування контрактур, деформацій хребта й суглобів, еквіноварусної або вальгусної деформації стоп. Патологія черепних нервів, слуху діагностується в 30 - 40 % дітей, хворих на таку форму ДЦП. У 70 -

80 % хворих зі спастичною формою дитячого церебрального паралічу спостерігається порушення мови у вигляді затримки її розвитку, псевдобульбарної дизартрії, у 30 - 40 % дітей відзначається зниження інтелекту [205].

За тим, яка частина тіла уражена, розрізняють такі форми ДЦП (**Рис. 1.2**):

- Геміплегія (уражена одна половина тіла – ліва або права).
- Диплегія (уражені обидві половини тіла, але здебільшого ноги).
- Тетраплегія (уражені ноги та руки).

Атетодна форма характеризується повільними або швидкими неконтрольованими рухами, які можуть спостерігатися в будь-якій частині тіла, зокрема в обличчі, роті та язиці.

Дискінетичні, атаксичні та гіпотонічні предомінантні типи рухових порушень не класифікуються топографічно.

При атонічно-астатичній формі дитячого церебрального паралічу рухові розлади проявляються в нездатності дитини втримувати вертикальну позу внаслідок дефекту механізмів постурального контролю. Такі діти не ходять самостійно або починають ходити після 7-9 років. У 87 - 90 % дітей з такою формою ДЦП відзначається виражене зниження інтелекту, яке сполучається з негативізмом. Хворі діти характеризуються грубим недорозвиненням мови з елементами мозочкової дизартрії. Прогноз відносно рухових можливостей і соціальної адаптації при атонічно-астатичній формі є несприятливим [205].

Гіперкінетична форма дитячого церебрального паралічу характеризується руховими розладами, які представлені гіперкінезами - атетозом, хореоатетозом, хореїформними рухами. У більшості хворих при такій формі дитячого церебрального паралічу

мова порушена за типом екстрапірамідної дизартрії. У 60 - 73 % випадків діти навчаються самотійно ходити, однак довільна рухова активність, особливо тонка моторика, у значній мірі порушені, що унеможливорює процес навчання у низці випадків [205].

Однією з найбільш важких форм дитячого церебрального паралічу є тетраплегія (подвійна геміплегія), для якої характерна симетричне ураження рук і ніг. У 35 - 45 % дітей з такою формою ДЦП рухові розлади супроводжуються патологією черепних нервів. У 90 % дітей спостерігається зниження інтелекту. Прогноз рухових можливостей при тетраплегії є несприятливим. Важкі відхилення в психічному розвитку таких дітей перешкоджають їх соціальній адаптації та навчанню [205].

Крім наведених форм дитячого церебрального паралічу, у клінічній практиці трапляються змішані форми, коли сполучаються два або більше типів церебральних паралічів (спастико-атактична, спастико-гіперкінетична і атактико-гіперкінетична форми). Такі змішані типи дитячого церебрального паралічу формуються зазвичай у старшому віці на основі спастичної, гіперкінетичної, атактичної або атонічно-астатичної форм [205].

Тяжкість ушкоджень при дитячому церебральному паралічу у дітей віком до двох років характеризується за допомогою системи класифікації великих рухових функцій (Gross Motor Function Classification System - GMFCS), яка була розроблена співробітниками McMaster University і на сьогодні є загальноприйнятим стандартом [257].

Система класифікації великих рухових функцій розроблена, як описова система класифікації, яку можна швидко і легко застосовувати для об'єктивної оцінки рівня рухових порушень у

дітей з церебральним паралічем, базуючись на їх функціональних можливостях, потребі у допоміжних пристроях та можливостях пересування [256].

Особлива увага під час оцінки рівня рухових порушень за цією класифікацією приділяється сидінню (контролю тулуба) та ходьбі.

Класифікація GMFCS має п'ять рівнів рухових можливостей. Такий поділ на рівні ґрунтується на функціональних можливостях дитини, потребі у допоміжному обладнанні, включно з обладнанням для пересування (ходунки, милиці, палички, візочок тощо) і меншою мірою на якості рухів дитини.

«Рівню I» за класифікацією GMFCS відповідають діти, які можуть ходити без обмежень, але не справляються зі складнішими руховими завданнями.

«Рівень V» - дуже обмежені можливості самостійного пересування навіть із допоміжним обладнанням, слабкий контроль положення тулуба та голови [256].

Класифікація рухових порушень та топографії використовується в протоколах доказової терапії [181].

Ці класифікації також використовуються в реєстрах дитячого церебрального паралічу для опису когорт [286].

Попри те, що рухові порушення є основною ознакою дитячого церебрального паралічу, труднощі з мисленням, навчанням, почуттями, спілкуванням та поведінкою також часто виникають.

Частка хворих на дитячий церебральний параліч, які мають епілепсію, становить 28 %. Цей показник може варіюватися від 16 % при спастичній диплегії до 50 % при спастичній тетраплегії.

Встановлено, що 58 % хворих на дитячий церебральний параліч мають труднощі з спілкуванням, принаймні 42 % мають проблеми із зором, 7 % - проблеми із слухом, а 23–56 % мають проблеми із навчанням (Рис. 1.3) [30].



Рис. 1.3. Схематичне представлення порушень нейророзвитку. Модифіковано з [30].

У розвитку дитячого церебрального паралічу важливу роль надають впливу факторів ризику на формування нервової системи дитини в антенатальний, перинатальний та постнатальний періоди.

Серед факторів ризику розвитку дитячого церебрального паралічу 70-80 % виникають антенатально, 10 % - перинатально і 10-20 % - постнатально (Рис. 1.4) [104, 280].

Серед етіопатогенетичних факторів дитячого церебрального паралічу традиційно виділяють такі: недоношеність і низька маса тіла при народженні [277], внутрішньоутробні інфекції [136], асфіксія при народженні [40], передчасні пологи [241], генетичні причини [58], морфологічні зміни мозкових структур, а також фактор багатоплідної вагітності [230] (Рис. 1.4).

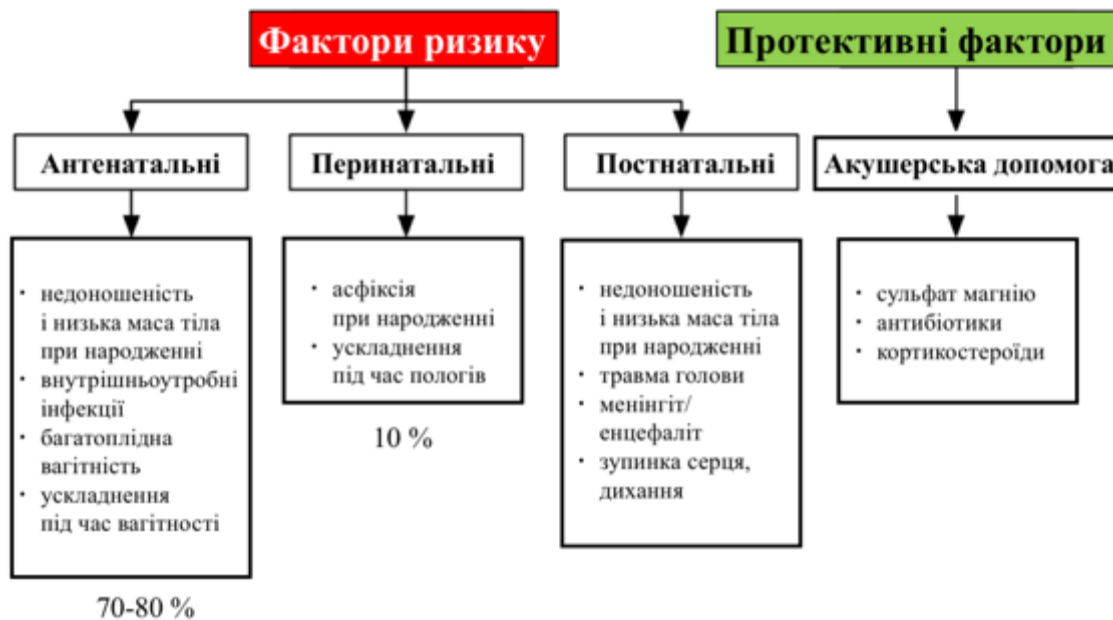


Рис. 1.4. Фактори ризику і причини розвитку дитячого церебрального паралічу. Модифіковано з <http://www.pathophys.org/cerebralpalsy/>

Протягом десятиліть асфіксія при народженні вважалася основним етіологічним фактором ризику розвитку дитячого церебрального паралічу. Але зараз показано, що численні антенатальні фактори є ймовірними причинами виникнення ДЦП як у недоношених, так і в доношених дітей, при цьому асфіксія при народженні відіграє незначну роль [302].

У 2004 році Якобссон та Хагберг припустили, що асфіксія при народженні може бути не таким важливим фактором розвитку дитячого церебрального паралічу, але може бути одним з елементів багатофакторних причин і більшість патогенетичних механізмів розвитку дитячого церебрального паралічу, ймовірно, починаються антенатально [125].

Як наслідок цього, численні дослідження розглядали антенатальні фактори ризику, пов'язані з дитячим церебральним паралічем, як у доношених, так і у недоношених немовлят. Ці роботи частіше містять ретроспективний аналіз випадків та когортні дослідження, оскільки важко провести рандомізоване дослідження через характер та тяжкість захворювання.

Добре відомо, що як недоношені, так і немовлята з низькою вагою при народженні мають особливо високий ризик розвитку дитячого церебрального паралічу [125].

Етіологічним фактором ризику розвитку дитячого церебрального паралічу в недоношених дітей, особливо у народжених вкрай передчасно, вважається внутрішньоутробна інфекція (кір, краснуха, токсоплазмоз, цитомегалія та ін.).

Відомо, що мікроорганізми з нижніх статевих шляхів можуть заразити плаценту, навколоплідні оболонки та плід. Фетоплацентарна та маткова інфекція/запалення відіграють певну роль у ініціюванні передчасних пологів та сприяють розвитку пошкодження ЦНС та розвитку дитячого церебрального паралічу [63]. Чим менший гестаційний вік новонародженого в момент пологів, тим менша маса при народженні, що сприяє розвитку ДЦП. Передчасно народжених дітей розділяють на кілька гестаційних груп залежно від терміну вагітності: менше 28 тижнів (народжені вкрай передчасно), 28 - 31 тижні (дуже недоношені діти), 32 - 36 тижнів (помірно недоношені діти), 37 і більше (доношені діти).

Поширеність ДЦП серед недоношених дітей зросла завдяки поліпшенню інтенсивної терапії новонароджених та акушерської допомоги протягом останніх кількох десятиліть, що призвело до збільшення виживання недоношених дітей [104].

Прийнято вважати, що низький термін гестації є найважливішим фактором ризику для розвитку ДЦП [147]. У 1993 році Левітон розширив гіпотезу про те, що материнська інфекція під час вагітності сприяє неврологічному порушенню та розвитку дитячого церебрального паралічу через цитокіни, припускаючи, що цитокіни сприяють не лише неврологічному пошкодженню, але й передчасним пологам [159]. Ця пренатальна гіпотеза щодо етіології ДЦП згодом стала відомою як цитокінова гіпотеза (запалення).

Далі Левітон припустив, що фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) є одним з цитокінів, які опосередковують передчасні пологи та розвиток ДЦП, вказуючи на те, що чим менше дозріває мозок плода, тим він більш чутливий до пошкодження [159]. Мікроорганізми отримують доступ до плоду через навколоплідні води і стимулюють вироблення цитокінів. Ці цитокіни підвищують проникність гематоенцефалічного бар'єру та полегшують проходження продуктів життєдіяльності мікробів та цитокінів у мозок [254].

Інші прозапальні маркери, такі як інтерлейкін-6 та інтерлейкін-8 у навколоплідних водах пов'язані з порушенням нейророзвитку та передчасними пологами, але не встановлено, чи можуть ці цитокіни перетинати плаценту і яка частина того, що досягає кровообігу плода, має материнське походження [125]. Цей зв'язок між прозапальними цитокінами в амніотичній рідині та ДЦП спостерігався як у недоношених, так і у доношених дітей [254].

Насправді, рівень прозапальних цитокінів у крові новонароджених, у яких розвивається ДЦП, значно вище, ніж у здорових дітей [311]. У недоношених дітей спостерігається позитивний зв'язок між прозапальними цитокінами в амніотичній

рідині та розвитком ДЦП [320]. Підвищений рівень цитокінів може не проявлятися клінічно при народженні, але натомість викликає значну патологію в подальшому житті дитини у вигляді затримки розвитку, дитячого церебрального паралічу або сенсоневральної втрати слуху [147]. Зв'язок, виявлений між інфекцією/запаленням та ДЦП, не є доказом прямого впливу, але, швидше за все, інфекція/запалення може відігравати роль посередника між розвитком ДЦП та іншими невідомими факторами [124].

Наявність інфекції/запалення, внутрішньоутробної чи позаутробної, не є достатнім фактором, який призводить до розвитку ДЦП. Вважається, що необхідна ще наявність інших факторів, окрім інфекції/запалення та підвищеного рівня цитокінів, щоб викликати пошкодження головного мозку та розвиток ДЦП.

Іншими потенційними факторами, що зумовлюють пошкодження головного мозку за наявності внутрішньоутробної інфекції, можуть бути ранній гестаційний вік, порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру, вразливість ЦНС плода, швидкість зараження плода, а також характер та інтенсивність імунної відповіді плода [320]. Значення кожного з цих додаткових факторів та їх внесок у розвиток ДЦП за наявності інфекції/запалення вимагає подальшого дослідження.

Іншим етіопатогенетичним фактором розвитку дитячого церебрального паралічу є багатоплідна вагітність. Багатоплідна вагітність може призводити до антенатальних ускладнень, таких як передчасні пологи, смерть одного з плодів, обмеження росту та вроджені вади одного або кількох плодів [222].

Усі ці антенатальні ускладнення можуть бути пов'язані з дитячим церебральним паралічем. Крім того, відомо, що у близнюків

більший ризик розвитку дитячого церебрального паралічу, ніж при одноплідній вагітності.

Петтерсон та ін., користуючись реєстром хворих на дитячий церебральний параліч у Західній Австралії з 1980 по 1989 рік, показали, що близнюки мають більш високий ризик розвитку дитячого церебрального паралічу, ніж немовлята з одноплідної вагітності, при цьому ризик виникнення ДЦП становить 0,2%, 1,3% та 7,6% для одноплідної, двоплідної та триплідної вагітностей відповідно [239].

У всіх трійнят та у 78% близнюків, у яких розвинувся дитячий церебральний параліч, була спастична диплегія або геміплегія, або поєднання цих двох форм [239]. Розглядаючи такі показники, як маса тіла при народженні та вік гестації при багатоплідній вагітності, Бонеллі та ін. встановили, що різниця у масі між немовлятами, яка перевищує або дорівнює 30%, пов'язана зі збільшенням ризику виникнення дитячого церебрального паралічу в п'ять разів, при цьому не має значення чи це легший та важчий близнюк [39]. Висловлено припущення, що більший ризик виникнення дитячого церебрального паралічу при багатоплідній вагітності, ймовірно, пов'язаний із низькою масою тіла при народженні, яка обумовлена передчасними пологами, аномаліями росту або комбінацію цих двох факторів [239]. Вагітності, в яких наступила внутрішньоутробна смерть одного з близнюків або трійнят, пов'язана з ризиком розвитку ДЦП - 10% для близнюків та 29% для трійнят [239]. Смерть одного з близнюків може спричинити нейропатологічний процес, який в кінцевому підсумку призведе до розвитку дитячого церебрального паралічу в іншого близнюка, який вижив. Було показано, що у близнюка, який вижив, з вірогідністю

20% розвинуться неврологічні порушення після внутрішньоутробної смерті близнюка [147].

Ці дані представляють значну клінічну проблему при супроводі багатоплідної вагітності, особливо під час смерті одного з плодів, яка виникає на початку вагітності. Вчасна акушерська допомога при прееклампсії (сульфат магнію), інфекціях (антибіотики) та передчасних пологах (кортикостероїди) може допомогти зменшити ризик виникнення дитячого церебрального паралічу (Рис. 1.4).

Використання антенатальних кортикостероїдів у жінок, які мають ризик передчасних пологів, не тільки знижує ризик виникнення ускладнень у недоношених новонароджених та/або немовлят із низькою масою тіла, але також, ймовірно, знижує ризик виникнення дитячого церебрального паралічу.

Кент та ін. повідомили, що кортикостероїди пригнічують вироблення цитокінів та потенційно запобігають пошкодженню білої речовини головного мозку при наявності внутрішньоутробної інфекції/запалення, таким чином знижуючи смертність та захворюваність у немовлят з гестацією менше 30 тижнів, які отримували повний курс кортикостероїдів [146]. Також ця група дослідників зауважила, що значно був підвищений рівень внутрішньопаренхіматозної ехогенності, якщо курс прийому антенатальних кортикостероїдів при внутрішньоутробній інфекції був неповним. І, навпаки, при проходженні повного курсу прийому стероїдів підвищенна ехогенність зникла [146]. Використання антенатальних кортикостероїдів, зокрема бетаметазону, спричиняє зменшення ризику виникнення ДЦП у недоношених дітей [124].

Сульфат магнію використовується як токолітик для запобігання передчасним пологам, так і при прееклампсії у вагітних і може знизити ризик виникнення ДЦП. У ретроспективному дослідженні Нельсон та Гретер повідомили про зниження ризику виникнення ДЦП у немовлят при передчасних пологах або прееклампсії, якщо вагітні отримували сульфату магнію [204].

Кроутер та ін. продемонстрували, що дитяча смертність була нижчою в групі, яка отримувала сульфат магнію порівняно із контрольною групою (13,8 % проти 17,1 %), а також був нижчим ризик розвитку ДЦП у тих, хто вижив (6,8% проти 8,2%), хоча відмінності не були статистично значущими, однак велика рухова дисфункція була значно зменшеною у групі, яка отримувала сульфат магнію (3,4% проти 6,6%) [61]. Ця група дослідників уперше застосувала сульфат магнію як нейропротекторний засіб при передчасних пологах.

Отже, три акушерські втручання для запобігання розвитку дитячого церебрального паралічу заслуговують на увагу.

Перше - це використання антибіотиків. Для лікування хоріоамніоніту, передчасного розриву плідних оболонок (ПРПО), урогенітальної інфекції, пієлонефриту тощо застосовуються різні комбінації антибіотиків. Відомо, що лікування вагітних із бактеріальним вагінозом може знизити ризик виникнення передчасних пологів та зменшити частоту неврологічних дисфункцій, пов'язаних із інфекцією [254]. Крім того, застосування антибіотиків у жінок із передчасним розривом плідних оболонок значно знижує розвиток хоріоамніоніту.

По-друге, дані щодо використання токолітиків при передчасних пологах та їх зв'язок із ДЦП обмежені. Такахаші та ін.

повідомили, що жодні токолітики у їх дослідженні не були пов'язані зі зниженням ризику виникнення ДЦП, а використання ритодрину, схоже, не збільшувало ризик виникнення дитячого церебрального паралічу [289]. Однак довготривале приймання ритодрину було пов'язане із виникненням ДЦП при вагітності близнюками [289].

На сам кінець, треба враховувати, що прогрес у репродуктивних технологіях сприяє збільшенню кількості багатоплідних вагітностей, тим самим збільшуючи ризик виникнення ДЦП у цих дітей. Розуміння факторів, які сприяють багатоплідній вагітності, яка виникла за допомогою допоміжної репродуктивної технології, може допомогти запобіганню розвитку не лише ДЦП, але й інших несприятливих наслідків багатоплідної вагітності [237].

Незважаючи на те, що численні дослідження щодо антенатальних факторів, пов'язаних із ДЦП, та потенційних профілактичних і лікувальних заходів досі тривають, існує кілька основних питань, які потребують вирішення, щоб зробити результати таких досліджень більш прийнятними для застосування [56].

Перше питання - це розробка стандартизованого визначення ДЦП. Існує не тільки кілька визначень дитячого церебрального паралічу, але й у різних дослідженнях використовують різні визначення.

Крім того, необхідно визначити найбільш відповідний вік, у якому остаточно ставиться діагноз, оскільки разом з віком змінюються прояви клінічних симптомів. Аналогічно, визначення клінічного або субклінічного хоріоамніоніту не лише варіюється в різних дослідженнях, але часто навіть не згадується якщо цей діагноз був діагностований [56]. Для того, щоб мати можливість

застосовувати результати отриманих даних у клінічній практиці, необхідно вирішити це коло питань та висловити консенсусну думку.

1.1.3. Симптоматична епілепсія

ВООЗ на своєму сайті www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy визначає епілепсію як хронічне неінфекційне захворювання мозку, яким страждають близько 50 мільйонів людей у всьому світі. Для епілепсії характерні періодичні напади, які є короткими епізодами мимовільного руху, які можуть залучати частину тіла (часткові) або все тіло (генералізовані), а іноді супроводжуються втратою свідомості та контролю над функцією кишечника або сечового міхура.

Основною причиною виникнення епілепсії є наявність патологічного вогнища активності нейронів головного мозку з пароксизмальними розрядами, і достатньо часто епілепсія трапляється в дитячому та підлітковому віці.

Епілептичні напади у дитячому віці приблизно в 30 % випадків призводять до розвитку хронічної епілепсії [36].

Погляди на природу епілепсії еволюціонували від сприйняття її як «демонічної», «священної» «божественної» хвороби до затвердження епілепсії як окремої нозологічної одиниці [309]. Досить тривалий час епілепсію вважали психічним захворюванням з прогресивним перебігом і наростаючими змінами психіки.

У 1985 р. епілепсія вже характеризувалася як складний комплекс симптомів, де психічні розлади тісно переплітаються з неврологічними і соматичними проявами [309].

У 2005 році Цільова Група Міжнародної Протиепілептичної Ліги (International League Against Epilepsy - ILAE) сформулювала визначення понять "епілепсія" і "епілептичний напад":

Епілепсія - це розлад головного мозку, який характеризується стійкою схильністю викликати епілептичні напади, а також нейробіологічними, когнітивними, психологічними та соціальними наслідками цього стану. Визначення епілепсії вимагає виникнення хоча б одного епілептичного нападу.

Епілептичний напад - тимчасове виникнення клінічних проявів та/або симптомів унаслідок патологічної надмірної або синхронної нейрональної діяльності мозку [90].

Щоб підкреслити, що епілепсія складається з багатьох різних захворювань і станів, епілепсію традиційно визначають як розлад або групу розладів, а не як хворобу.

Термін «розлад» означає функціональне порушення, яке не обов'язково є тривалим; а термін «хвороба», навпаки, може (але не завжди) означати більш тривале порушення нормального функціонування.

Тому Міжнародна Протиепілептична Ліга (ILAE) та Міжнародне Бюро з Епілепсії (IBE) дійшли до висновку, що епілепсію краще розглядати як захворювання [90].

Цільова Група ILAE запропонувала вважати епілепсію хворобою головного мозку, яку визначатимуть за будь-якою із таких умов:

- принаймні два неспровоковані (або рефлексорні) напади, що розвиваються з проміжком > 24 години один від одного;
- один неспровокований (або рефлексорний) напад та ризик його подальшого повторення, подібний до загального ризику

- рецидиву (щонайменше 60%) після двох неспровокованих нападів, упродовж наступних 10 років;
- діагностований синдром епілепсії [90].

Загальноприйнятим критерієм епілепсії є повторювані епілептичні напади, що виникають у результаті порушення процесів гальмування і збудження в нейронах головного мозку [91].

Одиночні або випадкові епілептичні напади не розглядаються як епілепсія, а є різновидом реакції мозку при зниженні порога судомної готовності.

Епілептичні напади класифікуються як фокальні (вогнищеві) та генералізовані, залежно від місця їх виникнення та структури поширення (**Рис. 1.5**).

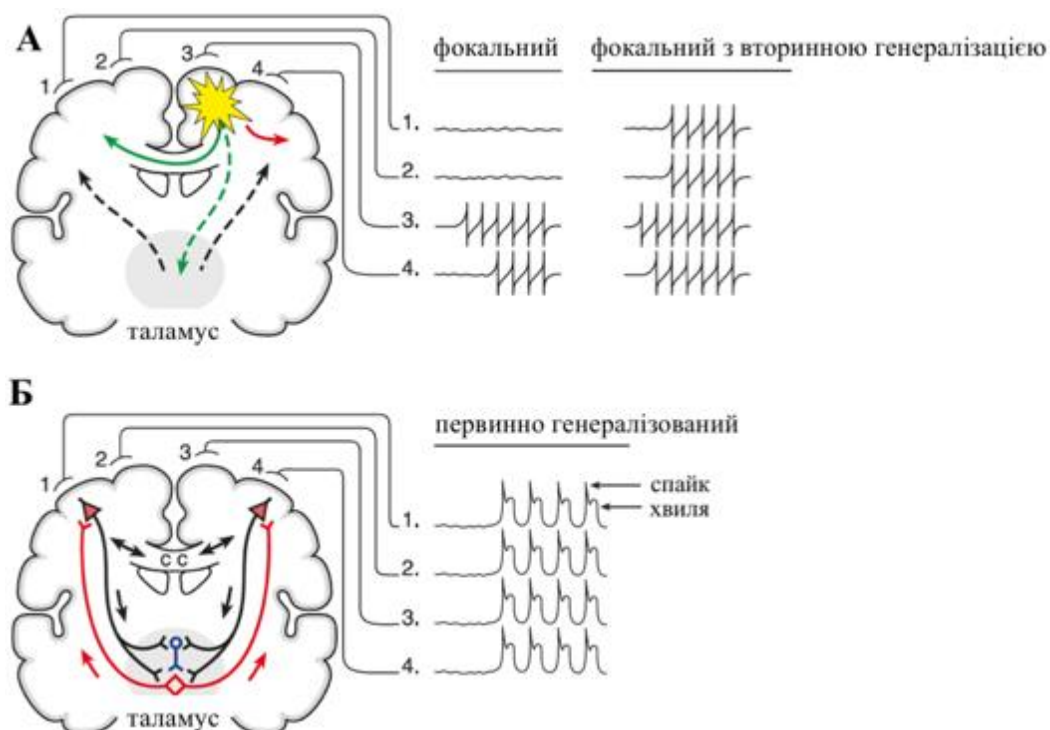


Рис. 1.5. Схематичне зображення типів епілептичних нападів та потенційних шляхів їх розповсюдження. А - з вогнища

підвищеної збудливості (жовтий колір) патологічні розряди можуть поширюватися на сусідній неокортекс (червона стрілка), через мозолисте тіло до контралатеральної півкулі головного мозку (суцільна зелена стрілка) або підкорковими шляхами (наприклад, таламус, стовбур мозку) при вторинній генералізації (пунктирна зелена лінія). Супутні електроенцефалографічні записи демонструють електричну активність мозку під пронумерованими електродами. Фокальна епілептиформна активність (спайки) максимальна під 3 і 4 електродами. Якщо напади вторинно генералізуються, то активність може спостерігатися синхронно на всіх електродах після затримки. Б - Первинний генералізований напад починається одночасно в обох півкулях. Характерний двосторонній синхронний спайкоподібний хвильовий малюнок на електроенцефалограмі породжується взаємодією кори та таламуса, при цьому швидке поширення через мозолисте тіло (сс) сприяє швидкій двосторонній синхронії. Один з типів таламічного нейрона (синього кольору) - це гальмівний ГАМК-ергічний нейрон, який має специфічний тип кальцієвих каналів, що дозволяє цим клітинам модулювати довготривалу збудливу кортикоталамічну активність, що спричиняє спайкові хвилі на електроенцефалограмі. Коркові нейрони направляють імпульси як до збуджувальних таламічних нейронів (червоний колір), так і до гальмівних нейронів (синій колір), сприяючи коливанням збудливої та гальмівної активності, що спричиняє утворення ритмічних спайкових хвиль на електроенцефалограмі. Модифіковано з [278].

Фокальні напади виникають у локалізованій ділянці головного мозку із клінічними проявами, які залежать від зони мозку,

в якій вони виникли, та настільки далеко поширюються розряди з цього «вогнища» [278]. Наприклад, вогнище у лівій моторній корі може спричинити поштовхи правої руки. Якщо розряди поширюватимуться на ділянку мозку, яка контролює обличчя та рот, тоді клінічними проявами будуть посмикування обличчя, сльозливість та, можливо, зупинка мовлення.

Генералізовані напади починаються з аномальних електричних розрядів, що відбуваються в обох півкулях одночасно. На електроенцефалограмі первинний генералізований напад характеризується двосторонніми синхронними спайкоподібними хвилями розряду, які реєструються одразу по всьому мозку, відображаючи зворотне збудження між корою та таламусом (**Рис. 1.5Б**). Генералізовані напади також можуть поширюватися і синхронізуватися через мозолисте тіло. Прояви генералізованого нападу можуть варіюватися від короткочасного порушення свідомості до ритмічного поштовху всіх кінцівок, що супроводжується втратою постави та свідомості (генералізований тонічно-клонічний напад) [278].

Різні типи епілепсії обумовлені різними причинами. Залежно від причини розрізняють такі види епілепсії:

- 1) симптоматична, що спричинена наявністю органічного пошкодження нервової тканини внаслідок первинного захворювання;
- 2) ідіопатична, яка виникає без явних причин у певному віці і найчастіше має спадковий характер;
- 3) криптогенна, що має нез'ясований характер.

До 19-го століття симптоматична епілепсія (раніше відома як органічна епілепсія) взагалі не вважалася "справжньою епілепсією". З середини 20 століття всі або майже всі епілепсії

відносили до симптоматичних - в тому сенсі, що епілепсію вважали симптомом захворювання, навіть якщо причину захворювання не завжди можливо було визначити [309]. До основних причин симптоматичної епілепсії належать: черепно-мозкові травми, церебро-васкулярні захворювання, нейроінфекції, перивентрикулярна лейкомаляція, хромосомні синдроми, метаболічно-гіпоксичні розлади, нейродегенеративні захворювання, пухлини мозку [84, 273].

Поліетіологічність та незвичайна різноманітність клінічних проявів епілепсії визначають труднощі в створенні класифікації. Пропонується така класифікація симптоматичної епілепсії залежно від причин її виникнення (Табл. 1.1):

Таблиця 1.1.

*Етіологічна класифікація симптоматичної епілепсії**

Етіологія	Підкатегорія	Приклади
Переважаючі генетичні причини або вади розвитку	Епілептичні синдроми у дітей	<i>Синдром Веста, синдром Леннокса-Гасто</i>
	Прогресуючі міоклонічні епілепсії	<i>Хвороба Унферріхта-Лундборга, денмато-рубро-паллідольюісова атрофія, хвороба тілець Лафора, мітохондріальна цитопатія, сіалідоз, нейрональний цероїдний ліпофусциноз</i>
	Нейрокутанні синдроми	<i>Туберозний склероз, нейрофіброматоз, синдром Стерджа-</i>

		Вебера
	Інші моногенні неврологічні захворювання	Синдром Ангельмана, лізосомні хвороби, нейроакантоцитоз, органічні ацидурії та пероксисомні хвороби, синдром Ретта, хвороба Вільсона
	Хромосомні захворювання	Синдром Дауна, синдром хромосоми 4р-, синдром кільцевої хромосоми 20
	Вроджені вади розвитку мозку	<i>Гемімегаленцефалія, фокальна кортикальна дисплазія, Агірія, пахігірія, агенезія мозолистого тіла, полімікрогірія</i>
Переважно набуті причини	Склероз гіпокампа	Склероз гіпокампа
	Перинатальні ураження головного мозку	Неонатальні судоми, постнеонатальні судоми, дитячий церебральний параліч
	Черепно-мозкова травма мозку	Відкрита травма голови, закрита травма голови, випадкові травми голови у немовлят
	Пухлина мозку	Гліома, гангліогліома і гамартома, дизембріопластична нейро-епітеліальна пухлина, гіпоталамічна гамартома, менінгіома
	Нейроінфекції	Вірусний менінгіт та

		енцефаліт, бактеріальний менінгіт і абсцес, малярія, нейроцистицеркоз, туберкульоз, ВІЛ
	Церебро-васкулярні захворювання	<i>Крововилив у мозок або субарахноїдальний простір, артеріовенозна мальформація, кавернозна гемангіома</i>
	Імунологічні захворювання	Енцефаліт Расмуссена, лімбічний енцефаліт
	Нейродегенеративні захворювання	Хвороба Альцгеймера, розсіяний склероз та демієлінізуючі захворювання; гідроцефалія і поренцефалія

*Модифіковано з [273].

За діагностичними стандартами Міжнародної протиепілептичної лігії електроенцефалограма (ЕЕГ) є обов'язковим методом обстеження при епілепсії [36]. У діагностиці також використовується магнітно-резонансна томографія (МРТ), хоча під час проведення МРТ не візуалізуються структурні зміни нервової тканини майже в половині випадків у хворих з чітко фокальними формами епілепсії [151]. Такі ж складнощі у діагностиці можуть виникати і під час обстеження за допомогою електроенцефалограми.

Епілептиформні порушення не спостерігаються на електроенцефалограмі у 40%-50% хворих після першого епілептичного нападу, а в 10% вони взагалі можуть не реєструватись

впродовж хвороби [275]. Незважаючи на це, електроенцефалограма залишається основним методом у діагностиці епілепсії та моніторингу ефективності її лікування [188].

Для встановлення характеру нападу (епілептичний чи неепілептичний) у хворих пропонується проведення таких досліджень з урахуванням сучасних міжнародних рекомендацій [207]:

1. ЕЕГ-дослідження, яке повинно відповідати мінімальним стандартам Міжнародної протиепілептичної ліги (ILAE).

2. Нейровізуалізація (МРТ головного мозку) для виявлення структурних змін нервової тканини. При негативному результаті МРТ-дослідження повинні проводитися в динаміці.

3. Ультразвукова доплерографія для диференціювання деяких пароксизмальних станів, а також скринінгу патології судинного русла.

4. Моніторинг артеріального тиску.

5. Електрокардіографія при підозрі на кардіогенні пароксизми.

6. Оцінка даних отоневрологічного обстеження для діагностики низки неепілептичних нападів.

7. Ендокринологічне обстеження за наявності показань.

8. Нейропсихологічне та психодіагностичне дослідження.

Незважаючи на значні досягнення у дослідженні цієї патології і розробці методів її лікування, епілепсія, тим не менше, лишається значною медичною та соціальною проблемою [234].

1.1.4. Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія

Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (ПГІЕ) – це поширена патологія нервової системи як серед доношених, так і серед недоношених новонароджених. ПГІЕ зумовлена недостатнім надходженням кисню в тканини мозку, що пов'язане як зі зниженням вмісту кисню в артеріальній крові, так і зі зменшенням мозкового кровообігу [79, 272]. Це призводить до каскаду патологічних процесів у ішемізованій тканині мозку: глутамат-кальцієвої ексайтотоксичності, запалення та оксидативного стресу [211].

Такі несприятливі події в мозку новонародженого впливають на подальший розвиток дитини і призводять до тривалих тяжких неврологічних дефектів, таких як розумова недостатність, мовні порушення, труднощі у навчанні, рухові розлади тощо [78].

ПГІЕ зазвичай клінічно виявляється в перші дні життя новонародженого і має такі прояви: складність ініціювання і підтримки дихання, нестабільність температури тіла, зміна м'язового тону, пригнічення фізіологічних рефлексів та зміна рівня свідомості [78]. У новонароджених ПГІЕ спричиняє судоми різного характеру [300].

Досі недостатньо досліджені способи запобігання або зменшення ушкоджень при ПГІЕ [23].

Серед перинатальних чинників ризику розвитку ПГІЕ найбільше значення мають гіпоксія та ішемія головного мозку як наслідок системної гіпоксемії і зниження мозкового кровообігу, внаслідок чого виникають структурні ушкодження головного мозку.

Зменшення мозкової перфузії спричиняє ураження білої речовини перивентрикулярної ділянки у недоношених дітей і кори

головного мозку - у доношених. Гіперфузія мозку призводить до лактат-ацидозу та розвитку енергетичного дефіциту [23].

Виділяють декілька фаз енергетичної недостатності при ПГІЕ [73].

Фаза первинної енергетичної недостатності (0-6 год після епізоду ішемії-гіпоксії) відбувається внаслідок зниження мозкового кровотоку, що призводить до зменшення надходження кисню і глюкози до клітин. Через нестачу кисню клітини нервової тканини переходять до анаеробного метаболізму. Це призводить до накопичення молочної кислоти і зменшення кількості АТФ [155]. Порухнення клітинного гомеостазу спричиняє накопичення всередині клітини йонів натрію, кальцію, води і збуджувальних нейромедіаторів, що запускає «ексайтотоксично-окисний каскад». Підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію також відбувається в результаті надмірного стимулювання рецепторів нейромедіаторами та деполяризації мембрани [137]. Подальше надходження в клітину йонів кальцію активує ліпази, що призводить до збільшення пулу вільних жирних кислот, підвищеної активації нейрональної синтази оксиду азоту, надлишкової продукції вільних радикалів та дисфункції мітохондрій [134]. Унаслідок мітохондріальної дисфункції запускається апоптоз або некроз клітин. Припускають, що клітини гинуть шляхом апоптозу, якщо енергетичні запаси неповністю вичерпані, а некротична загибель клітин відбувається тоді, коли запас енергії повністю вичерпано [155].

Фаза вторинної енергетичної недостатності відбувається через 6-48 год після гіпоксично-ішемічного епізоду і також призводить до надмірного вивільнення збуджувальних нейротрансмітерів та вільних радикалів, виснаження запасів АТФ,

але відрізняється від первинної фази тим, що не залежить від церебрального ацидозу [170]. Особливо шкідливим для головного мозку новонароджених є окисний стрес через низьку концентрацію антиоксидантів і високе споживанням кисню під час переходу від плода до неонатального життя [44]. Новонароджені також мають високі концентрації ненасичених жирних кислот, які розщеплюються з утворенням значної кількості вільних радикалів [268]. Низька здатність головного мозку новонароджених усувати вільні радикали і підвищена чутливість до них призводять до пошкодження нервової тканини [44].

Протягом третьої фази пошкоджувальні чинники спричиняють подальше ушкодження нервової тканини. Під час цієї фази запускаються механізми запалення та епігенетичні зміни, які призводять до порушення росту аксонів, нейрогенезу та синаптогенезу [137].

Стратегії, спрямовані на лікуванні наслідків ПГІЕ, мають передбачати застосування агентів, які впливають на вільнорадикальні процеси, переривають реакції глутамат-кальцієвого каскаду, блокують дію прозапальних цитокинів, гальмують прооксидантні ферменти, посилюють трофічне забезпечення та стабілізують процеси апоптозу.

1.2. Методи корекції функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку

Діти з органічними ураженнями головного мозку мають високий ризик розвитку фізичних, інтелектуальних та емоційних порушень. Найбільш позитивний ефект матимуть реабілітаційні та

лікувальні заходи, які будуть проведені в перші місяці життя таких немовлят [213]. Використання фармацевтичних препаратів у терапії ЦНС, особливо на ранніх стадіях захворювання, здатне порушити складний взаємозв'язок компенсаторно-приспосувальних процесів у організмі дитини і нерідко призводить до виникнення ускладнень, що унеможлиблює подальше проведення медикаментозної терапії.

Тому більшість авторів вважає, що при розробці нових методів у реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку необхідно враховувати час пошкодження головного мозку, вік дитини та наявність супутніх симптомів [213].

Наприклад, під час реабілітації дітей з ДЦП прийнятим є принцип раннього, комплексного та безперервного лікування. Проте досі не існує єдиної схеми лікування таких хворих.

Серед методів лікування ДЦП важливе місце посідають методи лікування спастичності. Спастичність м'язів у дитини з церебральним паралічем може порушувати певні функції, або, навпаки, може полегшувати деякі функції. Тому під час лікування спастичності слід враховувати її функціональний вплив та інші фактори [38, 187, 212, 220]. Для лікування спастичності у хворих із дитячим церебральним паралічем застосовують різні методи: фармакологічні (баклофен, фенол, ботулотоксин, валіум, тизанідин, клонідин, дантролен та ін.); нефармакологічні (фізіотерапія, трудотерапія, корегуючі засоби та ортози, селективна дорзальна ризотомія) [38, 220, 212].

Рішення про використання будь-якого втручання в лікуванні залежить від конкретної мети лікування. У деяких випадках метою може бути зменшення локальної спастичності, тоді як в інших - генералізованої.

Також слід враховувати ризики та переваги будь-якого конкретного втручання. Було показано, що фізіотерапія та трудотерапія у віці 4–5 років виявилися ефективнішими, ніж якщо почати ці процедури в пізньому віці [41].

Встановлено, що ін'єкція ботулотоксину застосовується для лікування локальної спастичності з оптимальною ефективністю від 1 до 6 років для лікування спастичності нижніх кінцівок та від 5 до 15 років для спастичної геміплегії [38, 212, 220].

У дітей з ДЦП також розвиваються множинні вторинні, часто прогресуючі захворювання опорно-рухового апарату, які можуть потребувати ортопедичних хірургічних втручань [114]. Тип і тяжкість цих станів залежать від типу та тяжкості ДЦП.

Слід враховувати низку чинників при плануванні будь-якого з хірургічних втручань, такі як: вік дитини, важкість захворювання і характер (прогресуючий або непрогресуючий), систему післяопераційної підтримки та тривалого спостереження і догляду, потенціал функціонального покращення та попередження ускладнень.

Поширеною практикою вважається виконання більшості хірургічних процедур як одноразова багаторівнева хірургія (SEMLS), щоб уникнути багаторазового впливу наркозу та інших операційних ризиків [220]. Також такий підхід дозволяє запланувати курс післяопераційної реабілітації.

Іншим важливим і ефективним методом, який застосовується для реабілітації дітей з ДЦП є фізіотерапія. Показано, що фізіотерапія покращує силу м'язів, м'язову витривалість і збільшує діапазон руху в дітей з ДЦП [64]. Фізіотерапевтичні вправи застосовуються для запобігання або зменшення контрактур суглобів;

це досягається за допомогою пасивних м'яких рухових вправ і розтягування щодо головних суглобів. Підвищення сили м'язів досягається виконанням регулярних вправ із прогресивним збільшенням опору із залученням всіх основних груп м'язів.

Такі вправи покращують локальну м'язову витривалість. Існують спеціальні фізіотерапевтичні вправи призначені для покращення рівноваги, постурального контролю, ходи, а також сприяють рухливості та переносу (наприклад, з ліжка на інвалідний візок).

Функціональні силові тренування в поєднанні з пліометричними вправами та тренуванням на утримання рівноваги використовуються для покращення рухових функцій у дітей з ДЦП [144]. Пліометричні вправи використовують рухи для розвитку м'язової сили та швидкості [64]. Що стосується функціональних силових тренувань, то дослідження продемонстрували, що орієнтація на конкретні м'язи є найбільш ефективною для активації цих м'язів [144].

Дослідження показало, що 12-ти тижнева програма адаптивного бамбукового батута покращила силу м'язів нижніх кінцівок [100]. Ця програма бамбукового батута містила підстрибування, стрибки, стрибки із закритими очима та різні ігри, такі як додзбол.

Іншим ефективним підходом, спрямованим на покращення рухових функцій кінцівок пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку, зокрема з ДЦП, є СІ терапія (Constraint-Induced Movement Therapy) [126]. СІ терапія містить низку процедур, під час виконання яких на неушкоджену руку пацієнта одягається спеціальна рукавицю, завдяки чому всі рухи виконуються пошкодженою рукою

[198]. Пацієнт намагається підсвідомо робити рухи неушкодженою рукою, але через одягнену рукавицю він не може цього зробити і йому доводиться використовувати більш слабку руку. Активація ураженої руки призводить до широкого збудження в головному мозку. Задіюючи всі більші ділянки кори, мозок змушує працювати ті структури, які раніше не працювали через те, що була задіяна неушкоджена рука. Таке широке збудження під час СІ терапії допомагає утворитися новим нейронним зв'язкам у головному мозку [291]. Це сприяє пластичній реорганізації моторної кори головного мозку і, як наслідок, помітно покращує рухову активність ураженої кінцівки.

Застосування кондуктивного навчання засноване на концепції, що діти з руховим дефіцитом або без нього навчаються однаково [201]. Спеціаліст з кондуктивного навчання повинен уніфікувати сфери розвитку, зокрема емоційні, когнітивні, рухові та комунікативні сфери, з метою покращення інтеграції та глобальної функціональності учасників [201]. Але ефективність кондуктивного навчання для покращення функціональних можливостей дітей з ДЦП досі чітко не встановлена [201].

Ще одним ефективним методом, спрямованим на покращення рівноваги, а також симетрії нижньої кінцівки в дітей з ДЦП, є тренування на біговій доріжці [173]. Цей метод сприяє розвитку розуміння того, як ходити самостійно. Конкретні протоколи тренування на біговій доріжці різняться залежно від швидкості тренувань, використання або відсутності засобів підтримки тіла, а також періодичності і тривалості занять [173]. Дослідження показали, що 3 – 4 сеанси на тиждень протягом 3 – 4 місяців тренувань на біговій доріжці у дітей до 6 років покращили швидкість ходи та

посилення крокових рухів, а також підвищили можливість самостійної ходи [173]. Тренування на біговій доріжці - це тривалий і трудомісткий метод. Показано, що тренування ходи з використанням робототехніки зменшують час і трудові навантаження, пов'язані з традиційними тренуваннями на біговій доріжці [48].

Робототехнічний пристрій може задіяти дитину належним чином і може бути запрограмований для імітації нормальної ходи. Рандомізовані контрольовані дослідження показали збільшення швидкості ходьби та витривалості у дітей із ДЦП із застосуванням роботизованих тренувань [48].

Трудова терапія є невід'ємним компонентом багатопрофільного лікування дітей з ДЦП і має довготривалий вплив на покращення функціональної моторики [74]. Основним напрямком трудотерапії є вдосконалення дрібної моторики верхніх кінцівок, щоб допомогти дитині в більш ефективному виконанні побутових рухів у щоденному житті. Трудотерапевт також допомагає організовувати дитячі ігрові зони, надаючи адаптивне обладнання, а також модифікує навчальне середовище дитини для покращення її уваги та обробки інформації [74].

У довготривалому догляді за дітьми, які страждають на ДЦП, важливо визначити, яка кількість щоденної допомоги потрібна їй для оптимального функціонування.

Ортози, пристосувальне обладнання та допоміжні засоби використовуються для покращення функціональних можливостей дитини та полегшення її повсякденного життя [71]. Асистентні технології відіграють важливу роль у догляді за людьми, які мають ДЦП та інші порушення розвитку.

Багато інших лікувальних та реабілітаційних заходів використовуються при ДЦП; однак ефективність та рекомендації щодо рутинного використання таких методів є неоднозначними та обмеженими. Деякі з цих втручань або підходів містять голкорексфлексотерапію, тренінги з нейророзвитку (Бобат-терапія), сенсорну інтеграцію, електричну стимуляцію, костюмотерапію, іппотерапію, музикотерапію, терапію відеоіграми та терапію із використанням стовбуровими клітинами [141, 162, 177, 214, 262, 263, 293].

Також досі лишається значною медичною та соціальною проблемою і симптоматична епілепсія. Дві третини хворих з активною формою епілепсії контролюють свій стан за допомогою протиепілептичних препаратів (ПЕП), які мають широкий спектр побічних ефектів. Крім того, протиепілептичні препарати лише пригнічують виникнення епілептичних нападів, а не лікують епілепсію як захворювання [82].

Усі протиепілептичні препарати можна поділити на препарати першої і другої генерації (або традиційні) та третього покоління (або нові препарати), синтезовані після 1990 р. [19]. До традиційних протиепілептичних препаратів належать барбітурати - фенобарбітал, гексамідин, бензобарбітал, а також карбамазепін, фенітоїн, препарати вальпроєвої кислоти. До протиепілептичних препаратів третього покоління, які зареєстровані в Україні, належать ламотриджин, габапентин, леветирацетам, окскарбазепін, топірамат та ін. Нові протиепілептичні препарати входять в групу ліків першої лінії вибору відповідно до певних типів епілептичних нападів і вважаються більш безпечними та з меншою кількістю побічних явищ [235].

Незважаючи на лікування навіть протиепілептичними препаратами нового покоління, приблизно третина хворих на епілепсію всеодно мають неконтрольовані напади, тобто мають фармакорезистентне захворювання [233]. Лише незначній кількості пацієнтів із фармакорезистентною епілепсією можна рекомендувати оперативне втручання, яке бажано застосовувати не пізніше двох років від встановлення діагнозу з метою запобігання фармакорезистентності захворювання [82].

Більшість пацієнтів із симптоматичною фармакорезистентною епілепсією підлягають тривалому, іноді життєвому, використанню протиепілептичних препаратів [21]. Досі обговорюється питання, чи властива фармакорезистентність захворювання пацієнтам із самого початку, чи вона генетично детермінована, чи набута внаслідок тривалої неправильної терапії [47].

Останнім часом ведеться пошук методів лікування, які усувають причину патологічних нейронних розрядів і допомогли б прогнозувати можливий розвиток епілепсії після первинного пошкодження головного мозку [140]. Інші підходи у лікуванні епілепсії (стимуляція блукаючого нерву, кетогенна дієта, нейрохірургічні втручання) також здебільшого мають негативні наслідки [308].

Тому досі триває пошук оптимального лікування, яке б покращувало загальний стан хворого на епілепсію, а також допомогло мінімізувати інші, часто шкідливі, наслідки для соціальної адаптації такої дитини.

Незважаючи на розширення уявлень про молекулярні механізми гіпоксично-ішемічного пошкодження нервової тканини та

виявлення потенційно можливих нейропротекторних шляхів, також тривають пошуки засобів, які б могли ефективно запобігати розвитку ПГІЕ [133].

Як зазначено вище, найбільш шкідливий чинник для головного мозку новонароджених – окисний стрес, спричинений надлишковим виробництвом активних форм кисню (АФК) [98]. Для протидії токсичним ефектам АФК існують такі антиоксидантні ферменти: супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГПО), тіоредоксинредуктаза (ТР) і каталаза, які підтримують баланс АФК у ЦНС, особливо в неонатальному мозку [161].

Одним із методів нейропротекції при ПГІЕ може бути переривчаста нормобарична гіпокситерапія, яка активує СОД і ГПО, не пошкоджуючи нейрони, а також спричиняє експресію еритропоетину і гіпоксія-індукованого фактора-1а (HIF-1a) – білків, які захищають нейрони від апоптозу або некрозу [168].

На практиці переривчаста нормобарична гіпокситерапія – це імітування високогірних умов з парціальним тиском кисню в повітрі в умовах нормального атмосферного тиску [319].

В експериментальних і клінічних дослідженнях доведено, що переривчаста нормобарична гіпокситерапія мобілізує механізми транспорту та утилізації кисню та енергії, активує синтез нуклеїнових кислот і білків (зокрема, у ЦНС), збільшує резервну потужність симпатичної нервової системи, активує стреслімітуючі системи (антиоксидантну, ГАМК-ергічну, серотонінергічну, систему ендогенних опіоїдних пептидів), сприяє централізації кровообігу, індукує активність ендотеліальних клітин, стимулює утворення нових капілярів [319].

Гіпоксичне посткондиціонування значно знижує кількість загиблих нейронів і розмір зони інфаркту при експериментальній церебральній ішемії [321]. Також показано, що гіпоксичне посткондиціонування після неонатального гіпоксично-ішемічного ушкодження мозку у щурів зменшувало активацію мікроглії та астроцитів і знижувало активність каспаз і запальних маркерів [294].

В експериментальних дослідженнях також проаналізовані різні нейропротекторні молекули, які мають терапевтичний потенціал при перинатальній гіпоксично-ішемічній енцефалопатії: мелатонін, остеопонтин, інтерферон- β , едаравон тощо [24, 49, 186, 206, 215].

Показано, що мелатонін (N-ацетил-5-метоксітріптамін), ендогенний індоламін, має антиоксидантні, протизапальні та анти-апоптотичні властивості [184].

Мелатонін вільно проникає крізь плаценту і гематоенцефалічний бар'єр, що робить його привабливим для нейропротекції при ПГІЕ.

Ефективним та доцільним виявилось внутрішньовенне введення мелатоніну і терапевтична гіпотермія всього тіла новонародженого з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією [24]. Як свідчать результати багатьох досліджень, комбінована терапія має більший ефект, тому перспективним є використання мелатоніну як додаткового агента при лікуванні ПГІЕ як у доношених, так і у недоношених новонароджених [270].

Однак до впровадження у клінічну практику необхідно дослідити оптимальні дози і тривалість прийому мелатоніну.

Остеопонтин – багатофункціональний глікопротеїн, який має як про-, так і протизапальні властивості [89]. Показано, що

максимальна ендогенна експресія остеопонтину у мозку новонароджених спостерігається у першу добу і поступово зменшується до 21-ї доби постнатального періоду.

При ПГІЕ ендогенна експресія остеопонтину збільшується і досягає максимуму через 48 год. Введення екзогенного остеопонтину зменшує зону інфаркту та поліпшує неврологічні показники через 7 тиж після перинатальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії [51]. Остеопонтин відновлює структуру головного мозку після гіпоксично-ішемічного ушкодження новонароджених шляхом регулювання проліферації клітин мозку, виживання клітин та диференціювання олігодендроцитів [299].

Запалення відіграє важливу роль у патології ПГІЕ, тому заходи, спрямовані на зменшення запалення, можуть бути корисними при лікуванні цієї патології [87].

На моделі оклюзії середньої мозкової артерії показано, що ін'єкції в стріатум інтерферону- β зменшують розмір зони ішемії і блокують проникнення клітин, які спричиняють запалення [303].

Інші дані отримано на моделі фокальної ішемії [172]. Внутрішньовенне введення у хвостову вену щурів інтерферону- β не мало позитивного ефекту, що може свідчити про його неспроможність проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр.

Цей факт слід ураховувати при використанні інтерферону- β для лікування перинатальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії [172].

Едаравон – акцептор вільних радикалів, який взаємодіє з перекисними і гідроксильними радикалами, формуючи стабільні продукти окиснення [210].

Продемонстровано ефективне застосування едаварону як потужного антиоксиданта при перинатальній гіпоксично-ішемічній енцефалопатії [206].

Показано, що системне введення едаварону через 30 хв після реанімаційних заходів при перинатальній гіпоксично-ішемічній енцефалопатії може врятувати нейрони смугастого тіла на моделі ПГІЕ [40].

Установлено, що внутрішньочеревне введення едаварону в гострій фазі ПГІЕ поліпшувало пам'ять і здатність до навчання протягом декількох днів після ПГІЕ [209].

Складна етіологія ПГІЕ потребує методів лікування, які б впливали на декілька ланок патогенетичного процесу, тому перспективним напрямом у лікуванні і реабілітації пацієнтів з ПГІЕ є вивчення можливостей застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин різного генезу [128, 322].

Багатим джерелом стовбурових клітин є пуповинна кров, яку використовують в експериментальних моделях неврологічних захворювань [266].

Аутотрансплантація клітин пуповинної крові має переваги перед іншими джерелами стовбурових клітин: мінімальні *ex vivo* маніпуляції, не потребує імуносупресії, відносно прості умови отримання та зберігання. Пуповинна кров містить різні типи стовбурових клітин, переважно мононуклеари, і не має плюрипотентних чи ембріональних стовбурових клітин [163].

Обнадійливі результати отримано в дослідженнях, в яких проаналізували ризики і переваги автогенної трансплантації пуповинної крові новонародженим з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією та дітям з церебральним паралічем [285].

Проводяться також клінічні випробування інфузії аутологічної пуповинної крові доношеним новонародженим з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією [59].

Через труднощі з виявленням та діагностикою перинатальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії у недоношених новонароджених, клінічні випробування клітинної терапії проводять здебільшого на доношених немовлятах [102].

Для розробки найкращої стратегії використання клітинної терапії для лікування перинатальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії необхідні подальші дослідження оптимальної дози стовбурових клітин, типу клітин, терміну та способу трансплантації клітин [163].

Тривають також дослідження факторів, які виділяють стовбурові клітини, таких як, гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF), гліальний нейротрофічний фактор тощо [80].

Незважаючи на значні успіхи щодо створення нових нейропротекторних засобів для лікування перинатальної гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, недостатньо досліджено її патофізіологію, а також нейрогенеративні механізми та ендогенні нейропротектори. Необхідно дослідити біомаркери при ППЕ, які можна було б використовувати разом з методами нейровізуалізації головного мозку [78].

В основі пластичності головного мозку лежить здатність нервової системи реагувати на та патологічні зміни зовнішнього або/і внутрішнього середовища шляхом активації нейрогенезу, синаптогенезу, зміни нейрональних зв'язків та гліальних елементів [42].

Дедалі більшої популярності набувають підходи до лікування перинатальної патології ЦНС, спрямовані на максимально можливе відновлення порушених функцій завдяки використанню потенціалу нейропластичності мозку [251].

Існують спеціальні програми ВООЗ та Міжнародної педіатричної асоціації, такі як «Care for Child Development», «Child Feeding Modules», «Early Childhood Development International Pediatric Association Program», які сприяють проведенню наукових досліджень для розробки ефективних методів лікування дітей, а також спрямовані на роботу із сім'ями для поліпшення здоров'я та розвитку дітей [307].

Отже, результати експериментальних досліджень органічних уражень головного мозку свідчать про наявність перспективних напрямів і можливостей для корекції та лікування цієї патології. Необхідні подальші дослідження з метою пошуку безпечних та ефективних засобів для лікування наслідків органічних уражень головного мозку.

1.2.1. Мікрополяризація – неінвазивний метод нейростимуляції

Перспективним напрямком корекції морфофункціонального стану ЦНС дитини при різних органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку.

Особливий інтерес для лікування різних неврологічних розладів представляє такий терапевтичний підхід, як

мікрополяризація [314]. Мікрополяризація – це неінвазивний і безпечний лікувальний метод, що дозволяє змінювати функціональний стан різних ланок ЦНС під дією малого постійного струму (до 1 мА) [167, 229].

Існує два види мікрополяризації: транскраніальна, під час якої електроди накладають на певні проекції кіркових структур головного мозку, і трансвертебральна, коли електроди застосовують у сегментарних проекціях спинного мозку [279, 244].

Показано, що мікрополяризація має високу клініко-фізіологічну ефективність використання як у гострий період уражень ЦНС, так і у випадках віддалених наслідків при патологічних станах різного генезу [101].

Спрямованість впливу мікрополяризації досягається завдяки використанню малих площ (100-600 мм²) електродів.

Мікрополяризація може бути використана як окремий терапевтичний метод, так і в поєднанні зі стандартною фізіотерапією для корекції збудливості кори головного мозку і покращення рухової активності в пацієнтів з різними неврологічними розладами [101].

Силу постійного струму, яка використовується під час мікрополяризації, можна порівняти з біопотенціалами нейронів, і було показано, що транскраніальна мікрополяризація інтенсивністю 1 мА протягом 10 хв не викликає патологічних осциляцій і епілептиформної активності у дітей, і, отже, може бути використана як метод лікування в педіатричній практиці [193].

Висновок

Незважаючи на широке використання мікрополяризації у неврологічній практиці, механізми дії, що лежать в основі позитивних

ефектів мікрополяризації значною мірою невідомі і потребують кращого розуміння для оптимізації умов використання у лікувальній практиці при органічних ураженнях ЦНС.

В основі нейродегенерації клітин лежать численні зміни на клітинному та молекулярному рівні. Мікрополяризація розглядається як нейропротекторний фактор, що впливає на електричні властивості клітинної мембрани.

Особливий інтерес має вивчення безпосереднього впливу мікрополяризації на функціональний стан нервових клітин.

Отже, враховуючи вищевикладене, ми вважали за доцільне виявити патогенетичні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та дослідити вплив комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації на морфо-функціональний стан ЦНС при органічних ураженнях головного мозку.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [86], статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятими в установах Національної академії наук України.

Комітет з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України схвалив план дисертаційної роботи та дійшов до висновку, що дисертаційна робота повністю відповідає принципам біомедичної етики (витяг з протоколу засідання Комітету з біомедичної етики №2/20 від 26.02.2020).

В експериментах використовували:

- новонароджених (P3) щурів Wistar;
- 6-денних (P6), 7-денних (P7) та 3-4-місячних самців мишей лінії FVB "дикого типу" (генотип H-2q);
- 4-місячних самок та плоди 18-19 доби ембріонального розвитку мишей лінії FVB-C-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (GFP),

яких утримували за стандартних умов та раціону харчування з вільним доступом до гранульованого комбікорму та води, циклом світло/темрява 12:12 та температурі 24 ± 1 °C.

2.2. Виділення та культивування клітин

2.2.1. *Культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК)*

Для отримання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) була використана жирова клітковина мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за геном GFP.

Клітинна суспензія культивувалась у повному поживному середовищі DMEM-LG, яке містило:

- 15 % фетальну бичачу сироватку,
- антибіотики (пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)),
- 1:100 замінні амінокислоти (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини культивували в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C.

Для трансплантації використовували мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини 2-3 пасажів.

При досягненні 80 % конфлюентності моношару проводили пасажування. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини 2–3 пасажів використовували для трансплантації.

Для отримання 3D культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин готували карбомерний гідрогель.

Для приготування гідрогелю було використано карбомер 974Р у комбінації з гліцеролом, пропіленгліколем, триетиламіном і агарозою в оригінальних пропорціях.

Гель нагрівали до 83-85 °С та заливали у пластикові форми діаметром 10 мм та висотою 5 мм з подальшим охолодженням до кімнатної температури.

Отримані носії були ліофілізовані та стерилізовані під ультрафіолетом протягом 2 годин в умовах ламінарного боксу.

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини наносили на регідратовані в поживному середовищі гідрогелі за допомогою піпетки, а також вводили за допомогою мікроін'єкцій інсуліновим шприцом по всій площині носія в кількості $4 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$ та $1 \cdot 10^6$ клітин на 1 гідрогель.

Культивування проводили в повному поживному середовищі DMEM з додаванням 10 % фетальної сироватки корів за стандартних умов CO₂ інкубатора.

Середовище замінювали кожні 3-4 доби.

2.2.2. Отримання нейральних прогеніторних клітин

З мозку плодів 18–19 доби ембріонального розвитку від мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP, виділяли гіпокампи у стерильних умовах.

Фетальну нервову тканину механічно дисоціювали за допомогою Пастерівських піпеток різного діаметру в середовищі Neurobasal (Gibco).

Отриману суспензію клітин пропускали через нейлонові клітинні фільтри («Falcon», США) з діаметром пор 40 мкм.

Очищену фракцію нейральних прогеніторних клітин (НПК) отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22 % розчині Percoll).

Отриману суспензію нейральних прогеніторних клітин висівали з щільністю 4×10^5 клітин на 35-мм культуральну чашку Петрі, вкриту Matrigel (1:500, Thermofisher, Cat. N. 356234).

Нейральні прогеніторні клітини культивували в середовищі Neurobasal (Invitrogen, Carlsbad, CA), з додаванням:

- 20 нг/мл FGF-2 людини (SigmaAldrich, Cat. N. SRP6159),
- 2 % B27 Supplement (Thermofisher, Cat. N. 17504044),
- 2 мМ Gluta MAX (Thermofisher, Cat. N. 35050038),
- 1 мМ пірувату натрію (SigmaAldrich, Cat. N. P5280),
- 2 мМ N-Acetyl-L-cysteine (SigmaAldrich, Cat. N. A9165),
- 1 % пеніциліну-стрептоміцину (SigmaAldrich, Cat. N. P4333).

Нейральні прогеніторні клітини культивували в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C.

Відсоток життєздатних клітин у суспензії визначали методом проточної цитометрії за допомогою лазерного цитофлюориметра-сортера FACSAria («Becton Dickinson», США) після інкубації суспензії клітин з 7-аміноактиноміцином (7-AAD).

2.2.3. Дисоційована культура нейронів гіпокампа

Дисоційовану культуру нейронів гіпокампа отримували з новонароджених щурів.

Тканину гіпокампа подрібнювали, трипсинізували (10 хвилин), ресуспендували Пастерівською піпеткою та відокремлювали від поруйнованих клітин за допомогою центрифугування (200 g) у розчині Кребса з 20 ммоль Нерес та 0,3 % бичачого сироваткового альбуміну.

Клітини наносили на оброблені полі-L-лізином скельця круглої форми (15000 клітин/см²) та культивували при 37 °С в атмосфері з 5 % CO₂. Середовище культивування містило (всі складові від Thermofisher, SigmaAldrich, США):

- 100% DMEM;
- 2 % B27 Supplement;
- 20 ммоль/л HEPES;
- 0,5 ммоль/л Gluta MAX;
- 100 од./мл пеніциліну, 100 мг/мл стрептоміцину.

Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень. Протягом 12 днів нейрони в культурі стабілізувалися, досягали зрілого стану та утворювали нейронні мережі. Прижиттєвий візуальний контроль культур гіпокампа проводили за допомогою світлооптичного інвертованого мікроскопа Zeiss (збільшення $\times 200$) (Рис. 2.1, Б).

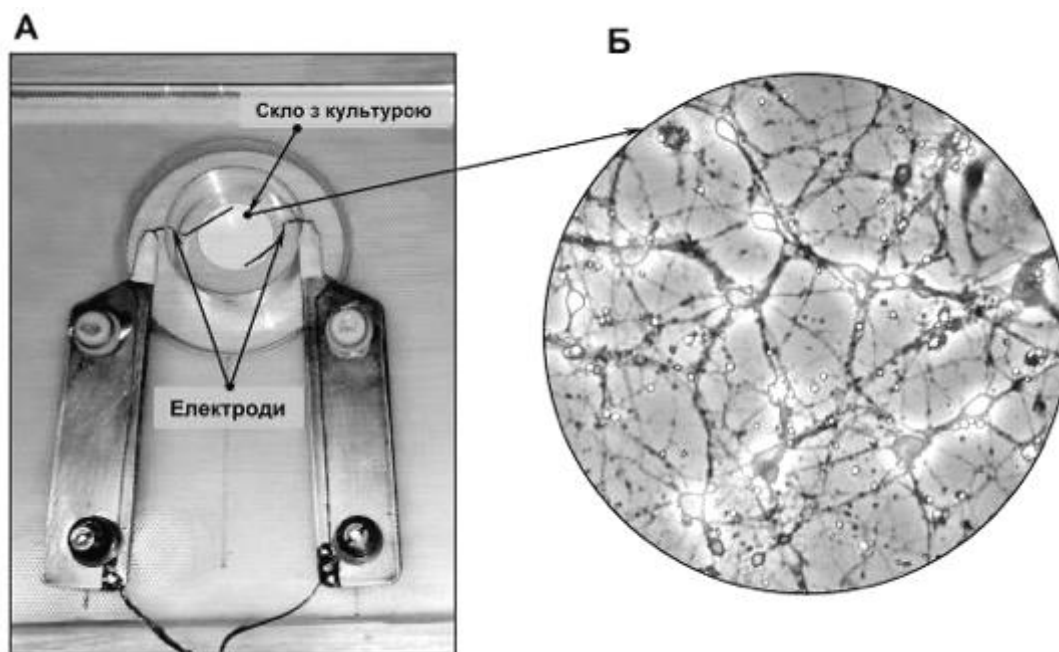


Рис. 2.1. Фото пристрою для проведення мікрополяризації культивованих клітин гіпокампа (А) та фазово-контрастне зображення культур (збільшення $\times 200$) (Б).

Процес запалення моделювали шляхом додавання в культуральне середовище основного чинника процесу запалення – ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) (L4130, Sigma-Aldrich, США) у трьох концентраціях з метою виявлення оптимальної дози-ефекту для дисоційованих нейрональних культур, зокрема: 0.1, 1, 10 мкг/мл.

Нами розроблений спеціальний пристрій для вивчення впливу мікрополяризації на клітинні культури (Рис. 2.1, А), використовуючи сертифікований пристрій «Реамед-Полярис» (Росія) для генерації слабого постійного струму [17].

Розроблений нами пристрій запатентовано і отримано патент №142371 на систему для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури *in vitro*.

Електроди занурювали в культуральне середовище з протилежних сторін скла, де були розташовані культивовані клітини гіпокампа.

Для виявлення оптимальних умов впливу слабого постійного струму на культури використовували силу струму 0,25 мА та варіювали часом: 3-разово 30 хв з інтервалом 1 год, 6-разово 40 хв з інтервалом 1 год та безперервно протягом 4 год.

Вплив здійснювали за нормальних умов чи в присутності ліпополісахариду (10 мг/мл).

2.3. Експериментальні моделі ішемічного ушкодження мозку

У роботі були використані експериментальні моделі ішемічного ушкодження мозку, а саме: глобальна короткотривала ішемія головного мозку та перивентрикулярна лейкомаляція.

2.3.1. Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) *in vivo*

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції здійснювалося шляхом однобічної коагуляції загальної сонної артерії на мишах лінії FVB шостої доби після народження (P6), що відповідає перинатальному періоду людини.

Під час коагуляції анестезували тварин ізофлураном. Ізофлуран забезпечує відмінну глибоку анестезію, стабільну частоту серцевих скорочень та швидке прокидання тварин після анестезії. Ізофлуран подавався в суміші кисню і азоту: 3,0 % для індукції і 1,5 % під час операції з використанням маски для носа. Тривалість анестезії була менше, ніж 5 хвилин. При такому інгаляційному наркозі з використанням ізофлурану летальність тварин становила 3 %.

Через годину після коагуляції тварин поміщали в герметичну камеру з 6,0 % O₂ протягом 35 хвилин.

Для створення гіпоксично-ішемічного ушкодження у поєднанні із запаленням, тваринам було введено внутрішньочеревно 0,015 мл ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС, 1 мг/кг).

2.3.2. Створення моделі ПВЛ *in vitro*

Для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* використовували органотипову культуру зрізів головного мозку, яку отримували з мишей лінії FVB 7-денного віку.

Після швидкої декапітації виділяли мозок, розділяли його на дві частини по серединній лінії та за допомогою автоматичного чоппера (McIlwain, Англія) нарізали зрізи завтовшки 350 мкм.

Зрізи культивували у 6-лункових планшетах на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах (Millicell-CM, Millipore, MA), розміщених у CO₂-інкубаторі при 35 °C на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO₂) та рідкого середовища:

- 50 % MEM,
 - 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса,
 - 25 % інактивованої кінської сироватки,
 - 10 мМ Трис,
 - 2 мМ NaHCO₃,
 - 12,5 мМ HEPES,
 - 15 мМ глюкози,
 - 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину,
- pH 7,2.

Середовище культивування змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень.

Перивентрикулярну лейкомаляцію моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду для імітації процесу запалення.

Киснево-глюкозна депривація створювалась у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 % азоту (N₂) і 5 % CO₂, а рідке середовище – PBS, 12,5 ммоль HEPES з додаванням сахарози (яка не метаболізується клітинами в культурі) замість глюкози.

КГД-розчин містив:

- 124 ммоль/л NaCl,
 - 1,6 ммоль/л KCl,
 - 2,5 ммоль/л CaCl₂,
 - 1,5 ммоль/л MgCl₂,
 - 24 ммоль/л NaHCO₃,
 - 1,2 ммоль/л KН₂PO₄,
 - 2 ммоль/л аскорбинової кислоти,
 - 12,5 ммоль/л Hepes,
 - 15 ммоль/л D-сахарози,
 - 2,5 ммоль/л CaCl₂,
- pH - 7,2.

Розчин для киснево-глюкозної депривації кип'ятили незадовго до проведення експерименту, для вивільнення з нього кисню.

Контрольний сольовий розчин містив 15 ммоль/л глюкози та був насичений киснем повітря.

Перед киснево-глюкозною депривацією експериментальні культури відмивали у КГД-розчині від глюкози, яка входить у склад середовища культивування. Далі вкладиші з культурами переносили в чашку Петрі з 1 мл КГД-розчину та розміщали її без кришки у спеціальній термостатованій камері (+35 °C), де в газовому середовищі кисень був замінений на азот.

Тривалість киснево-глюкозної депривації становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивалися і поверталися до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація протягом 24 та 48 годин).

Після киснево-глюкозної депривації в культуральне середовище додавали ліпополісахарид (L4130, Sigma-Aldrich, США).

Перед додаванням ліпополісахариду досліджували концентраційну залежність впливу ліпополісахариду на стан нервової тканини органотипових зрізів мозку.

Для цього використовували три різні концентрації ліпополісахариду: 10, 100 та 1000 нг/мл.

2.3.3. Аналіз лактатдегідрогенази в культуральному середовищі

Визначення змін відносної кількості лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі проводилося колориметричним методом за допомогою тест-системи CytoTox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA).

Цитозольний фермент лактатдегідрогеназа при пошкодженні клітинної мембрани вивільняється у культуральне середовище та характеризує ступінь ушкодження клітин.

Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості ферменту лактатдегідрогенази у середовищі культивування та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі [67].

Після проведення експериментів, відбирали 200 мкл культурального середовища в 24-лунковий планшет.

У кожному лунку додавали 200 мкл субстрату для визначення лактатдегідрогенази.

Проби інкубували при кімнатній температурі в темряві протягом 30 хв. Потім додавали 200 мкл розчину, що зупиняв реакцію (набір G1780).

Оптичну щільність проб вимірювали за допомогою спектрофотометру uniSPEC 2 (LLG, Німеччина) у мікрокуветах при довжині хвилі 492 нм.

Проби відбиралися через 24 та 48 годин після експериментальних впливів (коли ефекти на життєздатність були достатньо виражені) у дублях та визначали середнє значень для кожної лунки.

Як контроль використовували:

1 – середовище культивування з лунки, де не було органотипової культури (значення оптичної щільності якого віднімалося від показників, отриманих з експериментальних лунок);

2 – середовище культивування з лунки, де були необроблені культури ліпополісахаридом та киснево-глюкозною депривацією.

Зміни відносної кількості лактатдегідрогенази у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину, нормалізованим до площі тканини у відповідній лунці.

2.3.4. MTS/формазановий тест

MTS/формазановий тест (Promega, Німеччина) виявляє метаболічно активні клітини, оскільки жовтий тетразолій MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) відновлюється до пурпурного водорозчинного формазанового продукту завдяки активності мітохондріальних ферментів.

Для проведення MTS-тесту культури відмивали фізіологічним фосфатно-сольовим розчином (HBSS, Sigma),

інкубували з MTS-реактивом (140 мкл/700 мкл) 60 хв. при 37 °С та спектрофотометрично визначали оптичну густина розчину при довжині хвилі 450 нм (спектрофотометр uniSREC 2, LLG, Німеччина).

Кількість формазанового продукту прямо пропорційна кількості активних клітин.

Результати виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину.

2.3.5. Моделювання ішемічного ушкодження головного мозку

Ішемічне ушкодження головного мозку викликали у наркотизованих (2,2,2-трибромостанол – 125–240 мг/кг, інтраперитонеально) тварин лінії FVB "дикого" типу перетисканням (оклюзія) обох загальних сонних артерій протягом 20 хв з подальшим зняттям затискачів і відновленням кровопостачання (реперфузія).

Псевдооперованим тваринам контрольної групи було виконано лише препарування артерії і вони перебували під наркозом протягом 20 хв. без накладання затискачів.

Оцінку регіонального мозкового кровотоку (РМК) та підтвердження ішемічного стану проводили за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії (moor-VMS-LDF-1, Moor Instruments, Великобританія) до і під час оклюзії, і відразу ж після реперфузії.

Отримані дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення moorLAB (Moor Instruments, Великобританія).

Надалі використовували лише тварин, регіонального мозкового кровотоку яких опускався нижче 15 % від нормального базового рівня до оклюзії (Рис. 2.2).

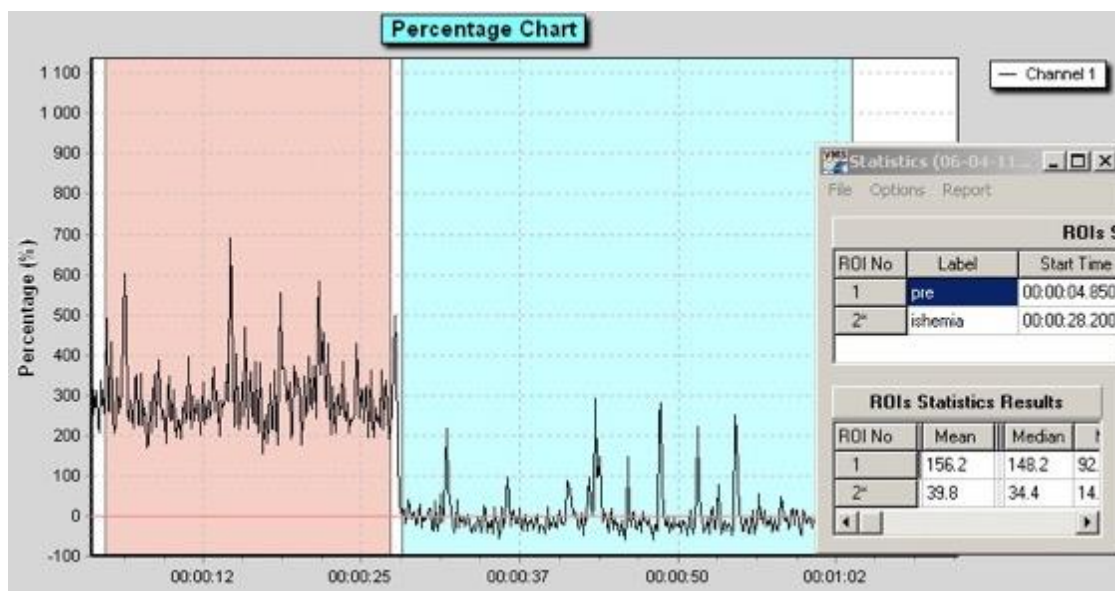


Рис. 2.2. Оцінка регіонального мозкового кровотоку за допомогою лазерної доплерівської флоуметрії у мишей під час оклюзії обох загальних сонних артерій.

2.4. Трансплантація стовбурових клітин

2.4.1. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин

Трансплантація суспензії GFP-позитивних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) семиденним (P7) тваринам з моделлю перинатального ушкодження головного мозку виконувалася стереотаксично (координати: А: 1,5 мм каудально, L: 2,0 мм латерально щодо брегми; і V: 2,0 мм

вентрально відносно поверхні черепа) монолатерально в праву півкулю головного мозку під інтраперитонеальним каліпсолаксілазиновим наркозом через 24 години після перивентрикулярної лейкомаляції.

Стереотаксично трансплантували 5×10^5 GFP-позитивних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у 2 мкл середовища.

Життєздатність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин після переведення адгезивної культури в суспензію для трансплантації становила 92,4 %.

Тваринам контрольної групи вводили лише середовище культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у відповідному об'ємі.

2.4.2. Трансплантація нейральних прогеніторів гіпокампа

Суспензію GFP-позитивних нейральних прогеніторних клітин (НПК) ($2-2,5 \times 10^5$ клітин у 2 мкл середовища Neurobasal) стереотаксично трансплантували в гіпокамп експериментальних тварин (координати від брегми: lateral $\pm 1,5$ мм, posterior – 2,0 мм, dorsoventrally 1,7 мм) під комбінованим 2,2,2-трибромостаноловим наркозом (125 мг/кг, інтраперитонеально) через 24 години після ішемії/реперфузії.

Несправжньо-оперованим тваринам робили ін'єкцію 2 мкл середовища культивування Neurobasal у такі ж координати.

2.4.3. Ін'єкція 5-бромдезоксіуридину

Для виявлення клітин, що проліферують, тваринам перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили 5-бромдезоксіуридин (BrdU).

Ін'єкції BrdU (50 мг/кг) робили внутрішньоочеревинно протягом 2 діб перед забором матеріалу двічі на день.

2.5. Морфологічні методи дослідження

2.5.1. Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку

Перед забором матеріалу для імуногістохімічного аналізу мишей наркотизували внутрішньом'язовим введенням каліпсолу (75 мг/кг) та інгаляційно – ефіром.

Фіксацію нервової тканини у тварин виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4%-м розчином формальдегіду на 0,1 М фосфатному буфері (ФБ) з рН 7,4. За допомогою вібратора VT1000A (Leica, Німеччина) виготовляли фронтальні зрізи мозку завтовшки 40 мкм.

Після промивки у 0,1 М ФБ зрізи блокували у розчині 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4) з додаванням 0,5 % бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та 0,3 % Тритон X-100.

Для виявлення астроцитів використовували антитіла проти GFAP, для донорських клітин – GFP, для попередників нейронів – DCX, для проліферуючих клітин – BrdU.

Перед імуногістохімічним фарбуванням антитілами проти BrdU, зрізи інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C у 2N HCl для денатурація ДНК, а далі за стандартним протоколом.

Візуалізацію первинних антитіл (Табл. 2.1) проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa Fluor 488 та 555 (1:1000, Molecular Probes Inc., США). Пофарбовані зрізи покривали середовищем Immu-MOUNT (Thermo Scientific, США).

Імуногістохімічно забарвлені зрізи мозку досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-BX61WI (Olympus, Японія).

2.5.2. Електронно-мікроскопічний аналіз культури стовбурових клітин

Для ультраструктурного аналізу мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини фіксували за допомогою 4 % розчину формальдегіду і 2,5 % розчину глутаральдегіду (Sigma-Aldrich, США). Поміщення культур в епоксидні смоли виконували за таким протоколом:

- промивка у 0,1 моль/л ФБ, рН 7,4;
- постфіксація в 1 % розчині OsO₄ на 0,1 моль/л ФБ протягом 1 год при кімнатній температурі;
- поступова дегідратація в спиртах (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, абсолютний спирт) протягом 1 год;
- додаткова дегідратація в 100 % ацетоні протягом 1 год;
- поміщення в епоксидну смолу (kit 45359, Fluka: Epon 812 (Cat. 45345) – 52 %; DDSA (Cat. 44160) – 18,5 %; MNA (Cat. 45347) – 29,3 %; DMP-30 (Cat. 45348) – 0,2 %) проводили ступінчасто

- протягом 2 год у суміші 100 % ацетону та епоксидної смоли у співвідношенні один до одного, дві години у співвідношенні один до трьох, 24 години в чистій епоксидній смолі;
- завершували поміщення в епоксидну смолу полімеризацією між двома пластиковими листами (пласка заливка) при 56 °C протягом 48 год;
 - прикріплення поміщених у смолу препаратів до пласкої поверхні епоксидних блоків за допомогою клею;
 - напівтонкі зрізи нарізалися на ультрамікротомі LKB Bromma 8800 (Sweden).

Напівтонкі зрізи (1-2 мкм) виготовляли за допомогою скляного ножа на ультрамікротомі Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія) і фарбували 1% метиленовим синім.

Ультратонкі зрізи (60-70 нм завтовшки) нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю і ураніл ацетатом.

Зрізи досліджували на електронному мікроскопі JEOL 100-SX (JEOL, Японія) при 80 кВ.

2.6. Хімічні реактиви і розчини

Реагенти для культурального середовища для НПК:

Neurobasal medium (Invitrogen, 21103-049), B27 supplement (Invitrogen, 17504-044), GlutaMAX (Invitrogen, 35050-038), Na pyruvate (Sigma, P2256), N-Acetyl-L-cysteine (Sigma, A9165), PenStrep (Gibco, 15140-122), фактор росту фібробластів FGF-2 (Sigma, F0291), Hanks' balanced salt solution (Sigma, H4641), Percoll (GE HealthCare,

17-0891-01), Matrigel (BD Biosciences, 354234), PBS (phosphate buffered saline) (Gibco, 10010031).

Таблиця 2.1

Первинні антитіла, що використовувалися для імуноцитота імуногістохімічного аналізу

	Назва	Виробник	Розведення
1	Rat anti-BrdU, clone BU175	Oxford Biotech	1:100
2	Goat anti-DCX	Santa Cruz	1:100
3	Rabbit anti-GFAP	DakoCytomation	1:1500
4	Goat anti-GFP	Novus Biologicals	1:5000
5	Rabbit anti-Iba-1	Wako	1:750
6	Mouse anti-MBP	SigmaAldrich	1:200
7	Mouse anti-NeuN, clone A60	Chemicon	1:500
8	Mouse anti-Rip	Abcam	1:1000

Абревіатури, використані в таблиці:

BrdU - bromodeoxyuridine,

DCX - doublecortin,

GFAP - glial fibrillary acidic protein,

GFP - green fluorescent protein,

Iba-1 - ionized calcium binding adaptor molecule 1,

MBP - myelin basic protein,

NeuN - neuronal nuclear antigen,

Rip - receptor interacting protein.

2.7. Клінічний метод обстеження

Метою обстеження та аналізу неврологічного статусу є визначення наявності чи відсутності патологічних симптомів у діяльності нервової системи; поєднання патологічних симптомів у синдромологічному діагнозі; визначення рівня ушкодження нервової системи (топічний діагноз); визначення етіології та характеру (функціональний, органічний) патологічного процесу (клінічний або нозологічний діагноз) [10].

Клінічне обстеження дітей з проявами органічних уражень головного мозку полягало в зборі скарг за загальноприйнятою методикою, вивчення анамнезу, фізико-неврологічне обстеження пацієнтів.

Діти також проходили комплексне обстеження суміжними спеціалістами (оториноларинголог, логопед, психолог-дефектолог, дитячий ортопед та ін.) за загальноприйнятими методиками.

Для встановлення діагнозу дитячого церебрального паралічу (ДЦП) у нашій роботі використовували клінічну класифікацію ДЦП, яка запропонована К. О. Семеновою [12].

Згідно з цією класифікацією виділяють: спастичну диплегію, подвійну геміплегію (тетрапарез), геміплегічну форму (геміпаретична форма), гіперкінетичну та атонічно-астатичну форми.

Руховий статус дітей, хворих на дитячий церебральний параліч, оцінювали за такими характеристиками рухового статусу:

- парез,
- гіпертонус,
- обмеження обсягу активних рухів,
- патологічні установки,

- патологічні рефлекси,
- гіперкінези,
- дискоординаторні розлади.

Кожен із цих параметрів оцінювали в балах (від одного до п'яти) залежно від ступеня виразності патології: один бал - норма, п'ять балів - наявність максимальної дисфункції [7]:

1) характеристика парезу: 5 балів - відсутність активних рухів; 4 - ледь помітне скорочення м'язів; 3 - є можливість активних рухів; 2 - легке зниження сили; 1 - відсутність зниження сили (норма);

2) характеристика гіпертонусу: 5 балів - динамічна контрактура; 4 - різке підвищення тонусу; 3 - помірне підвищення тонусу; 2 - легке підвищення тонусу; 1 - відсутність підвищення тонусу (норма);

3) оцінка характеру обмеження обсягу активних рухів: 5 балів - відповідає 10% нормального обсягу; 4 - 25 % нормального обсягу; 3 - 50 % нормального обсягу; 2 - 75 % нормального обсягу; 1 - відповідає нормі;

4) характеристика патологічних установок: 5 балів - стійке збереження патологічної установки; 4 - можливо активне, але не повне виведення сегмента у фізіологічне положення; 3 - можливо активне повне виведення сегмента у фізіологічне положення, але без утримання його при рухах; 2 - можливо активне повне виведення сегмента у фізіологічне положення з утриманням його при рухах тільки в умовах постійного свідомого контролю; 1 - відсутність патологічних установок;

5) характеристика патологічних рефлексів: 5 балів - збережені всі тонічні рефлекси періоду новонародженості, що

формують патологічний руховий стереотип; 4 - збережені окремі тонічні рефлексі, частково переборюються впливи тонічних рефлексів на верхні кінцівки; 3 - збережені окремі тонічні рефлексі, переборюються впливи тонічних рефлексів на верхні й нижні кінцівки на протязі тривалого часу; 2 - збережений один з основних тонічних рефлексів, що переборюється хворим; 1 - тонічних нередукованих рефлексів немає (норма);

б) характеристика гіперкінезів: 5 балів - виражені розповсюджені гіперкінези, які не загальмовуються хворим; 4 - довільна можливість знижувати виразність гіперкінезів; 3 - довільне пригнічення гіперкінезів тільки у стані спокою протягом тривалого часу (не придавлюються при рухах); 2 - довільне пригнічення гіперкінезів у стані спокою й при довільних рухах; 1 - відсутність гіперкінезів;

7) характеристика дискоординаторних розладів: 5 балів - виражена атаксія кінцівок і тулуба; 4 - значна дискоординація рук і ніг; 3 - помірна дискоординація; 2 - легка дискоординація у руках; 1 - відсутність дискоординації (норма).

Діагноз епілепсія встановлювали за клінічними проявами судомних нападів та за результатами електроенцефалографічного дослідження [296].

За осередковими проявами виділяли фокальні (парціальні) напади і генералізовані. Серед генералізованих розрізняли такі: тоніко-клонічні, абсанси, міоклонічні, клонічні, тонічні й атонічні напади.

Усі пацієнти, які були залучені у дослідження, дали згоду на обробку персональних даних.

2.8. Метод електроенцефалографії

Електроенцефалографія (ЕЕГ) – це неінвазійний метод обстеження головного мозку. В основу метода покладений принцип підсилення за допомогою спеціальної електронної апаратури малих за значенням сумарних соматодендритних потенціалів головного мозку (рівня 100 мкВ).

Потенціали головного мозку реєструються зазвичай на поверхні голови за допомогою електродів і спостерігаються в аналоговому форматі у вигляді кривої електроенцефалограції або підлягають цифровому перетворенню [8].

Електроенцефалографія є методом прямого відображення функціонування головного мозку та важливим інструментом оцінки нейрофізіологічних процесів з визначенням критеріїв розвитку і специфічних ознак ураження ЦНС.

Амбулаторне моніторингове електроенцефалографічне обстеження в активному стані і під час сну дозволяє отримати максимальну інформацію про стан біоелектричної активності головного мозку [8].

За допомогою електроенцефалографії у нашому дослідженні оцінювали біоелектричну активність головного мозку в динаміці двічі – до початку лікування та через 3 місяці після закінчення терапевтичного курсу.

Розміщення електродів здійснювали за Міжнародною системою 10-20 при скальповій референції в проміжку Fz-Cz.

Реєстрацію електроенцефалограми здійснювали на енцефалографі ДХ-500 (DX-systems, Україна, м. Харків) за такою

схемою запису біоелектричних потенціалів головного мозку з проведенням функціональних проб:

- фоновий запис 1-2 хв;
- проба на відкривання й закривання очей;
- ритмічна фотостимуляція при частоті від 0,5 до 20 Гц по десять секунд;
- гіпервентиляція 2-3 хв (для дітей старше 3-х років);
- запис після припинення функціональних навантажень 2-3 хв.

Постійна часу становила 0,1, фільтр високих частот - 35 Гц, чутливість - 100 мкВ, частота опитування становила 256 Гц.

4-х секундні інтервали візуально вибраних ритмічних фрагментів електроенцефалограми в умовах, адекватних їх виникненню, піддавалися спектральному аналізу за допомогою швидкого перетворення Фур'є.

Результати відображались у вигляді значень спектральної щільності потужності (СЩП) визначених діапазонів частот: дельта (1-3 Гц), тета-1 (3-5 Гц), тета-2 (5-7 Гц), альфа-1 (7-9 Гц), альфа-2 (9-12 Гц), бета (12-35 Гц).

Аналіз електроенцефалограм здійснювався за допомогою системи картування Brain Atlas (Biologic Inc.).

Застосовували Фур'є аналіз, який дозволяє об'єктивізувати отримані за допомогою електроенцефалографії дані, оскільки відомо, що знижені величини альфа- і бета- та збільшені величини дельта- і тета-частот електроенцефалограми є свідченням порушення біоелектричної активності головного мозку та його функціонування [2, 3].

Електроенцефалограма, як і будь-який коливальний процес, описується за критеріями частоти, амплітуди та фази. Комбінація ритмів і окремих неритмічних груп або хвиль формують складну динамічну картину електроенцефалограми. Вона узагальнює дистантний вплив збуджувальних та гальмівних структур головного мозку і дозволяє робити висновки про його функціонування.

Принципове значення в розшифровці електроенцефалограми має вік і стан дитини під час запису.

Тому в оцінці електроенцефалограм дітей з органічними ураженнями головного мозку ми відзначали:

- адекватність електрографічного нейрофізіологічного дозрівання;
- наявність неартефактної асиметрії, що є за межами функціональної вікової особливості;
- наявність типової або атипової генералізованої чи локальної епілептичної активності;
- наявність локального, регіонального чи дифузного сповільнення;
- загальний рівень пароксизмальності електроенцефалограми за даними частоти і характеру спалахової синхронізації електроенцефалограми.

Під час запису для інтерпретації електроенцефалограми дитини з урахуванням її віку і поведінки використовували такі характеристики:

- частотна і топографічна організація ритмічних складових лінійного формату фонові активності (синхронність, градієнтність, стабільність, поліморфність і гетерогенність, насамперед, альфа-ритму);

- специфічна реактивність основних сенсорно і когнітивно залежних ритмічних складових електроенцефалограми при зміні стану та їх динаміка при функціональних пробах;
- спектрально-амплітудне математичне перетворення аналогової електроенцефалограми для динамічного спостереження за спектральними потужностями визначених частотних діапазонів, або окремих функціонально вагомих частот (ритмічні складові електроенцефалограми);
- стан міжпівкульової і внутрішньопівкульової синхронії за даними когерентності;
- у динаміці моніторингової електроенцефалограми: виявлення і порівняння спеціальних ЕЕГ-патернів (важливо для діагностики епілепсії серед неепілептичних пароксизмальних станів та виявлення особливостей у формуванні вікової електроенцефалограми).

Електроенцефалограма в дітей характеризується більшою сумішню хвильових форм і частот, меншою організацією ритмічної структури електроенцефалограми, ніж у дорослих.

Тому має місце значима суб'єктивна варіабельність завдяки індивідуально-специфічному рівню зрілості.

Утім, електроенцефалограма дитячого віку має чітко сформований патерн вікових особливостей, який ми враховували при оцінці даних електроенцефалографічного дослідження [8].

2.9. Метод електронейроміографії

Електронейроміографічне (ЕНМГ) обстеження хворим дітям проводилося на комп'ютеризованому електронейроміографі М-

TEST до лікування і після комплексної терапії з використанням транскраніальної мікрополяризації.

Під час виконання стимуляційної електронейроміографії реєстрували показники з *musculus gastrocnemius* за допомогою поверхневих електродів при стимуляції нервів віддалено від реєструючих електродів.

Досліджували показники Н-рефлексу і F-хвилі. Під час аналізу Н-рефлексу оцінювали максимальні амплітуди Н-рефлексу ($H_{\text{макс}}$) і М-відповіді ($M_{\text{макс}}$).

Також оцінювали співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$, виражене у відсотках, яке характеризує функціональний стан сегментарного апарату.

Для аналізу F-хвилі використовували співвідношення $F_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$, виражене у відсотках.

2.10. Метод транскраніальної доплерографії судин голови

Транскраніальна доплерографія судин голови (ТДГ) є частиною традиційного обстеження дітей у неврологічній практиці. Це один з найінформативніших із доступних неінвазивних методів дослідження мозкової гемодінаміки.

Метод транскраніальної доплерографії заснований на застосуванні ефекту Доплера: зміна частоти коливання при відбитті від об'єкта, що рухається [11].

Метод транскраніальної доплерографії дозволяє за допомогою ультразвукового дослідження визначити швидкість

мозкового кровообігу та резистентність в інтракраніальних артеріях та венах голови для виявлення гемодинамічно значущих змін [5].

Показаннями до проведення транскраніальної доплерографії є внутрішньоутробна гіпоксія, асфіксія при народженні, порушення свідомості, кома, судоми та розлади з боку серцево-судинної системи, структурні зміни ішемічного, геморагічного або інфекційного генезу.

Усі ці патологічні зміни є факторами ризику, тому транскраніальна доплерографія має велику діагностичну цінність під час дослідження хворих з органічними ураженнями головного мозку.

Доплерографічне дослідження дітей проводили в положенні лежачи (голова - по середній лінії) у стані спокою на аналізаторі «Ангіодин» («БИОСС», Росія) за стандартною методикою з використанням імпульсного режиму і транскраніального зонда з частотою випромінювання 2 МГц.

Підлягали локації магістральні судини голови: середня (СМА), передня (ПМА) мозкові артерії та базиллярна артерія (БА).

Для оцінки мозкової гемодинаміки та стану кровообігу в магістральних артеріях голови у дітей аналізували максимальну систолічну швидкість кровообігу, кінцеву діастолічну швидкість, середню швидкість кровообігу за цикл (СШК) та коефіцієнт асиметрії (КА), який розраховували за формулою:

$$КА = ((V2 - V1) / V1) \times 100\%$$

де V1 і V2 - середня швидкість кровообігу в парних артеріях.

Базиллярну артерію (БА) і інтракраніальні сегменти хребетних артерій досліджували в положенні, лежачи на боці або на животі, з наведеним до грудей підборіддям.

Метод транскраніальної доплерографії судин голови використовували для дослідження мозкової гемодинаміки дітей з органічними ураженнями головного мозку до та після комплексного лікування з застосуванням методу транскраніальної мікрополяризації.

2.11. Методи лікування

Обстежені діти з органічними ураженнями головного мозку були розподілені на дві групи, рандомізовані за віком та статтю.

Пацієнти порівняльної групи (71 дитина) отримували базисний лікувально-реабілітаційний комплекс.

Діти основної групи (96 пацієнтів), поряд із базисною терапією, додатково проходили курс транскраніальної мікрополяризації (Табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

Розподіл пацієнтів за групами

Діагноз	ДЦП		Симптоматична епілепсія		Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія	
	порівняльна	основна	порівняльна	основна	порівняльна	основна
Кількість дітей	42	51	14	15	15	30
Усього	167					

Базисна терапія містила традиційний комплекс лікувально-реабілітаційних заходів, які комбінувались між собою залежно від індивідуальних потреб пацієнта: кінезіотейпування; біомеханічна стимуляцію м'язів; педагогічна та логопедична корекція; масаж та лікувальна фізкультура.

Діти основної групи отримували комплексне лікування: поряд з базисною терапією вони додатково проходили курс транскраніальної мікрополяризації.

Розподіл пацієнтів основної та порівняльної груп за віком і статтю наведений у Табл. 2.3.

Таблиця 2.3.

Розподіл пацієнтів основної та порівняльної груп за віком і статтю

Група	Стать	До 1 року	1-5 років	5-10 років	Старші 10 років	Усього	Усього, %
Порівняльна	Хлопці	4	27	6	1	38	54
	Дівчата	3	25	5	0	33	46
	Усього	7	52	11	1	71	
	Усього, %	10	73	16	1		100
Основна	Хлопці	4	40	5	1	50	52
	Дівчата	6	31	7	2	46	48
	Усього	10	71	12	3	96	
	Усього, %	10	74	13	3		100

Як видно із **Табл. 2.3** серед обстежених пацієнтів частка хлопців становила 52 % в основній групі та 54 % у групі порівняння, дівчат - 48 % в основній групі та 46% у групі порівняння.

Серед обстежених дітей найбільше було у віковій групі від 1 до 5 років – 74 % в основній групі та 73 % у групі порівняння. Частка дітей віком до 1 року становила 10 % в основній та 10 % у групі порівняння, від 5 до 10 років - 13% в основній групі та 16 % у групі порівняння, старші 10 років - 3 % та 1 % відповідно.

Транскраніальна мікрополяризація в дітей основної групи виконувалася за допомогою сертифікованого апарату для мікрополяризації «Реамед-Полярис» (Санкт-Петербург, Росія).

Електроди розташовували на шкірі голови згідно з розробленими індивідуальними схемами лікування.

При спостереженні на електроенцефалограмі до лікування генералізованої судомної активності електроди розташовувалися на одній або обох півкулях.

Курс лікування становив 10 щоденних 40-хвилинних сеансів.

2.12. Методи статистичного аналізу

Для обробки та статистичного аналізу результатів використовували такі програми: Statistica (версія 5, Statsoft, США) та XLSTAT 2009.4.06 (Addinsoft, США). Для аналізу вибірок визначали середнє значення, стандартну похибку середнього, стандартне відхилення середнього.

t-тест Стьюдента використовували для визначення достовірності різниці у експериментальних групах, що відповідали

нормальному розподілу. Нормальність розподілу всіх рядів отриманих значень в експериментах з трансплантацією фетальної нервової тканини перевіряли з використанням тесту Шапіро-Віллка.

Значення наведені у вигляді середнє \pm стандартне відхилення. Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ КЛІТИННИХ МЕХАНІЗМІВ ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА *IN VIVO* ТА *IN VITRO* МОДЕЛЯХ

У нашій роботі ми досліджували клітинні механізми розвитку гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС на *in vivo* та *in vitro* моделях ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ).

Перивентрикулярна лейкомаляція є однією з причин розвитку органічних уражень ЦНС дитини (дитячий церебральний параліч, симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія).

3.1. Дослідження клітинних механізмів нейропластичності головного мозку на *in vivo* моделі ішемічного ушкодження ЦНС

Нейрогенез є одним із механізмів пластичності мозку дорослого організму, які проявляються в збільшенні кількості нейронів, структурній перебудові нейронних мереж та утворенні нових синапсів.

У дорослому організмі нейрогенез відбувається, головним чином, у двох ділянках головного мозку: субвентрикулярній зоні (СВЗ), в якій генеруються нейрони для нюхової цибулини, та субгранулярній зоні (СГЗ) зубчастої звивини [260].

На нейрогенез можуть впливати різні фізичні, фармакологічні та патологічні стани, зокрема, ішемічний інсульт [54].

Було показано, що ішемічне ушкодження мозку посилює нейрогенез і це може сприяти відновленню втрачених функцій

шляхом утворення нових нейронів, які здатні замінити загиблі нейрони [175, 176].

Незважаючи на такий ішемія-індукований нейрогенез, пошкоджений мозок ссавців має низьку здатність до регенерації.

Однією із причин такого низького регенеративного потенціалу дорослого мозку є зменшення кількості нейральних стовбурових клітин у зонах нейрогенезу в процесі старіння організму [154].

Тому, зараз активно досліджується можливість застосування трансплантації стовбурових клітин різного генезу для лікування ішемічних і дегенеративних захворювань нервової системи [129, 297].

Було продемонстровано, що стереотаксична трансплантація нейральних прогеніторних клітин (НПК) сприяє відновленню просторової пам'яті у експериментальних тварин після ішемічного ушкодження мозку [130].

Можливий позитивний ефект такої трансплантації може полягати в заміні популяції пошкоджених або загиблих клітин новими, підтримці процесів відновлення нейронів реципієнта, поповненні запасів біологічно активних речовин та стимуляції ендогенного нейрогенезу [77].

З огляду на зазначене вище, цікаво було дослідити дію ішемічного ушкодження мозку на нейропластичність, а також вплив трансплантації нейральних прогеніторних клітин на ендогенний нейрогенез у гіпокампі мишей після ішемічного ушкодження мозку.

У нашій роботі для виявлення проліферуючих клітин тваринам з усіх експериментальних груп перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили 5-бромдезоксіуридин (BrdU) – синтетичний нуклеозид, здатний замінювати тимідин у процесі

реплікації ДНК, вбудовуючись в нову ДНК.

У нашому дослідженні кількість BrdU-позитивних клітин підраховували в зубчастій звивині в кожному п'ятому фронтальному зрізі мозку (координати: від 1,7 мм до 2,3 мм *posterior* від брегми). Було досліджено по 5 зрізів на тварину, сумарна кількість BrdU-імунопозитивних клітин наведена у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка середнього.

На 14-у добу після трансплантації НПК за допомогою імуногістохімічного фарбування з використанням антитіл проти BrdU проліферуючі клітини було легко візуалізувати завдяки чіткій ядерній локалізації BrdU-мічення (Рис. 3.1).

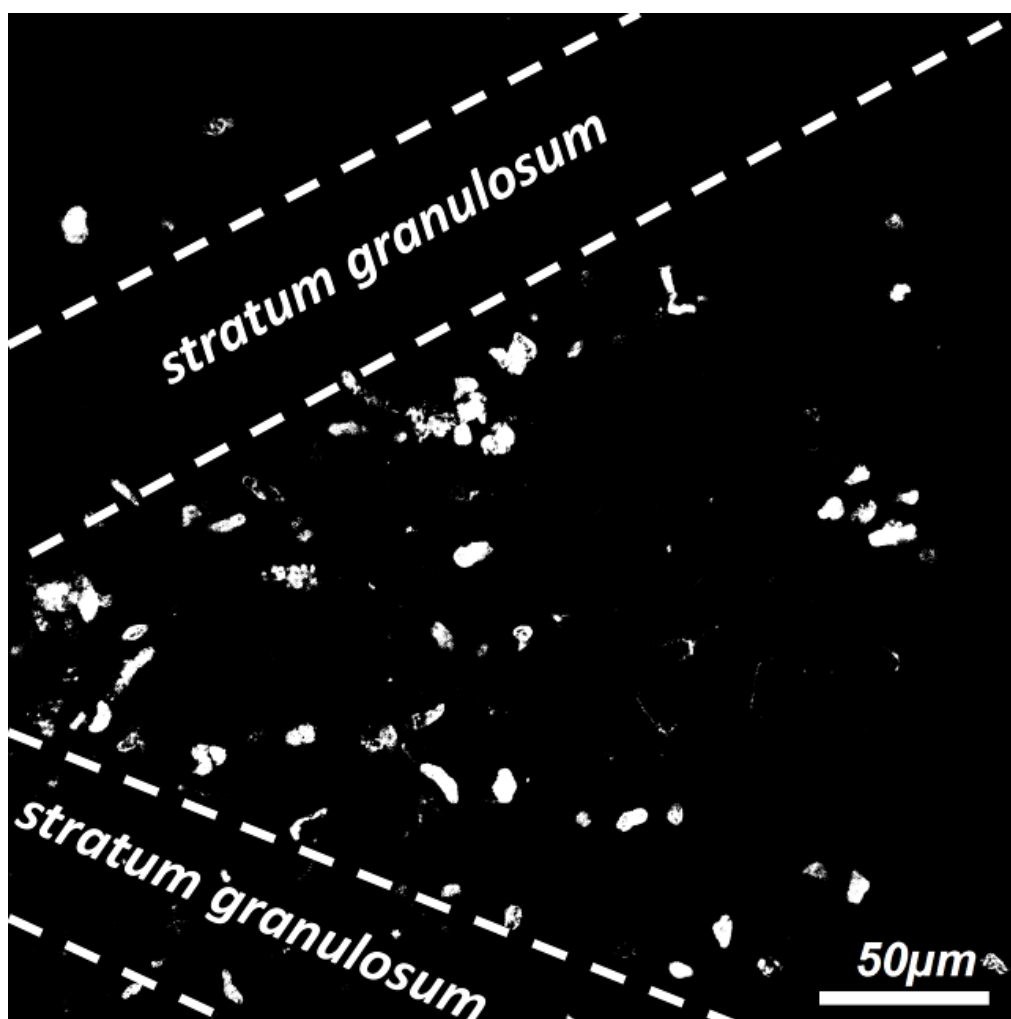


Рис. 3.1. Імуногістохімічне фарбування на BrdU (білий

колір, ядерна локалізація) зубчастій звивині гіпокампа тварини з ішемією мозку та трансплантацією НПК на 14-у добу після трансплантації. Штриховою лінією виділені межі гранулярного шару зубчастій звивини (*stratum granulosum*). Шкала = 50 мкм

Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку з використанням антитіл проти BrdU показав, що у тварин контрольної групи кількість BrdU-мічених клітин на зріз становила $24,33 \pm 2,06$ (Табл. 3.1).

Ішемія-реперфузія головного мозку мишей спричиняла збільшення кількості BrdU-позитивних ядер і їх кількість сягала $37,66 \pm 2,33$ ($P < 0,05$ порівняно із контролем) (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Кількість BrdU-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа мишей контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували нейральні прогеніторні клітини

Групи	Кількість BrdU-мічених клітин, (середнє значення \pm стандартна похибка середнього)
Контроль	$24,33 \pm 2,06$
Ішемія	$37,66 \pm 2,33^*$
Ішемія+НПК	$76,4 \pm 3,33^{**,\#}$

Примітки: * – статистично вірогідна відмінність порівняно із контролем ($P < 0,05$), ** – статистично вірогідна відмінність порівняно із контролем $P < 0,001$), # – статистично вірогідна відмінність порівняно із ішемією ($P < 0,001$).

Трансплантація нейральних прогеніторних клітин у гіпокамп ішемізованих тварин збільшувала кількість BrdU-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини вдвічі порівняно із 2-ою групою тварин і становила $76,4 \pm 3,33$ ($P < 0,001$) (Табл. 3.1).

У мишей усіх експериментальних груп BrdU-позитивні клітини утворювали проліферативні кластери в субгранулярній зоні (Рис. 3.1), що є характерним для клітин-попередників зубчастої звивини [60].

З метою з'ясування фенотипу клітин, які утворювали проліферативні кластери в зубчастій звивині гіпокампа, було проведене імуногістохімічне фарбування зрізів головного мозку на фосфопротеїн даблкортин (DCX), який асоційований із мікротрубочками та експресується в незрілих нейронах і використовується як маркер нейрогенезу [60].

Імуногістохімічне фарбування зрізів головного мозку на фосфопротеїн даблкортин показало, що на 14 добу після трансплантації нейральних прогеніторів DCX-позитивні клітини спостерігалися в субгранулярній зоні зубчастої звивини гіпокампа (Рис. 3.2).

DCX-позитивні клітини утворювали численні кластери в субгранулярній зоні зубчастої звивини гіпокампа та мали добре розвинені відростки, які були спрямовані в молекулярний шар зубчастої звивини гіпокампа (Рис. 3.2).

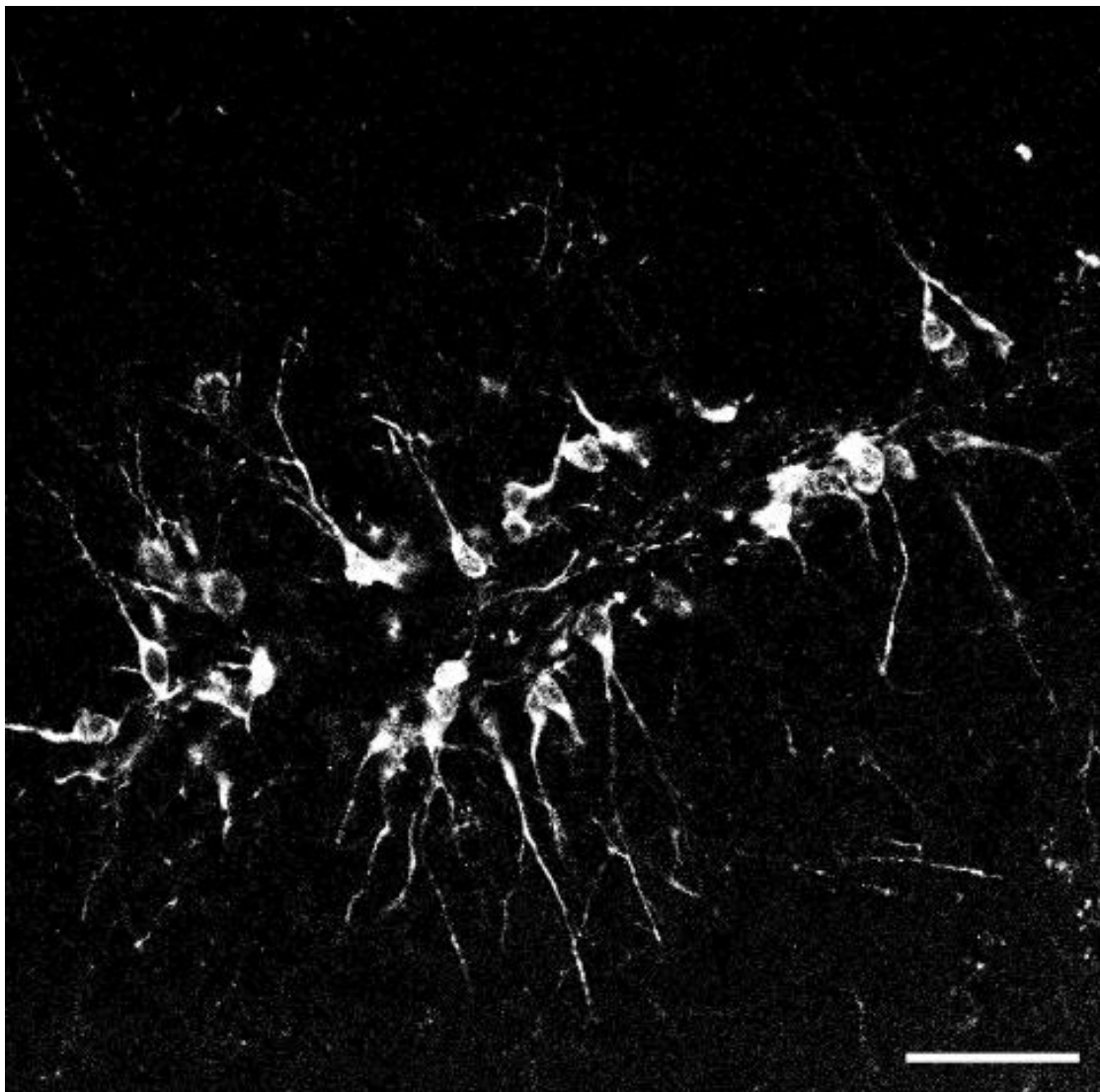


Рис. 3.2. Імуногістохімічне фарбування на DCX (білий колір) зубчастої звивини гіпокампа тварин з ішемією мозку і трансплантацією нейральних прогеніторних клітин на 14 добу після трансплантації. Шкала = 50 мкм.

Імуногістохімічний аналіз показав, що після ішемії-реперфузії спостерігалось збільшення кількості DCX-позитивних клітин ($227,67 \pm 10,27$) у тварин другої групи (ішемія мозку + введення культурального середовища) у порівнянні з контрольною групою, в якій кількість DCX-позитивних клітин становила $136,33 \pm$

6,36 (Табл. 3.2) .

Таблиця 3.2.

Кількість DCX-мічених клітин у зубчастій звивині гіпокампа мишей контрольної групи, ішемічної та групи ішемізованих тварин, яким трансплантували нейральні прогеніторні клітини

Групи	Кількість DCX-мічених клітин, (середнє значення \pm стандартна похибка середнього)
Контроль	136,33 \pm 6,36
Ішемія	227,676 \pm 10,27*
Ішемія+НПК	362,6 \pm 18,56 ^{**,#}

*Примітки: * – статистично вірогідна відмінність порівняно із контролем ($P < 0,05$), ** – статистично вірогідна відмінність порівняно із контролем $P < 0,001$), # – статистично вірогідна відмінність порівняно із ішемією ($P < 0,001$).*

У ішемізованих тварин після трансплантації трансплантація нейральних прогеніторів кількість DCX-позитивних клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини гіпокампа збільшувалася в 1,6 рази в порівнянні з другою групою тварин і становила $362,6 \pm 18,56$ (Табл. 3.2).

Отже, отримані дані показали, що трансплантація нейральних прогеніторних клітин після ішемічного ушкодження мозку в мишей достовірно збільшувала кількість BrdU-імунопозитивних проліферуючих клітин у субгранулярній зоні

зубчастої звивини гіпокампа, а також сприяла диференціації ендогенних нейральних прогеніторних клітин у нейрогенному напрямку.

Ми продемонстрували, що одним з клітинних механізмів, відповідальних за нейропластичність нервової тканини у відповідь на органічні ураження головного мозку, зокрема ішемічне ушкодження, може бути активація ендогенного нейрогенезу в субгранулярній зоні зубчастої звивини.

Трансплантація нейральних прогеніторних клітин у гіпокамп після ішемії-реперфузії, яка стимулює ендогенний нейрогенез, може бути корисною стратегією для лікування наслідків органічних уражень головного мозку.

3.2. Вивчення клітинних механізмів гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку на *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції здійснювалося шляхом однобічної коагуляції загальної сонної артерії на мишах шостої доби після народження з подальшим розміщенням тварин у гіпоксичній камері протягом 35 хвилин.

Для створення гіпоксичного-ішемічного ушкодження у поєднанні із запаленням, тваринам було введено внутрішньочеревно ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС).

Після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції миші відставали в розвитку в порівнянні з контрольними неоперованими тваринами.

Миші з моделлю перивентрикулярної лейкомаляції мали меншу вагу і зріст та розлади статокінетичного рефлексу, що забезпечує збереження рівноваги тіла при активному чи пасивному зміщенні його в просторі.

Основною ознакою перивентрикулярної лейкомаляції є пошкодження білої речовини головного мозку біля бокових шлуночків. Тому ми вирішили дослідити стан олігодендроцитів та мієліну за допомогою імуногістохімічного аналізу.

У контрольних тварин кожен олігодендроцит формував один сегмент мієліну для кількох сусідніх аксонів, загортаючи приблизно 1 мкм мієлінової оболонки навколо кожного аксона (Рис. 3.3А).

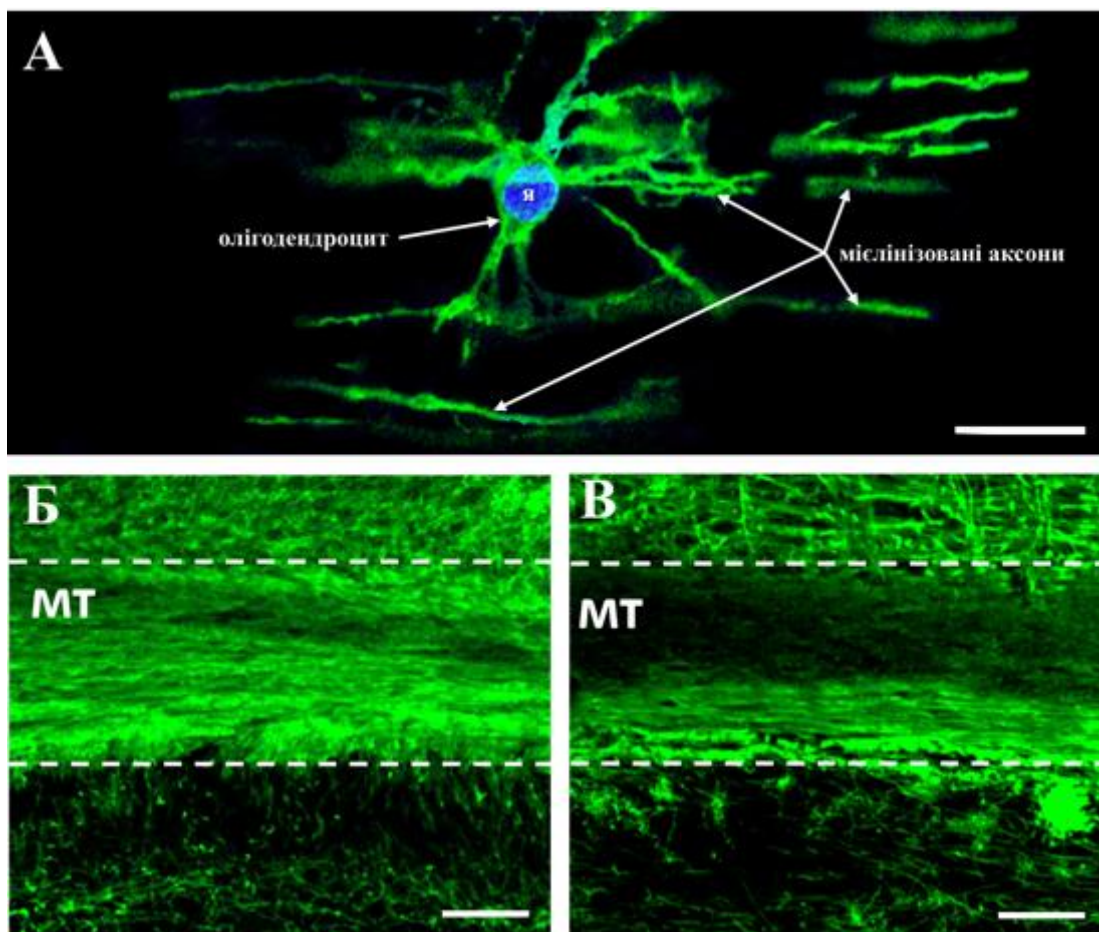


Рис. 3.3. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер олігодендроцитів Rip

(А) та основний білок мієліну МВР (Б, В). А, Б - контрольна тварина, В - тварина з перивентрикулярною лейкомаляцією. Штриховою лінією показано межі мозолистого тіла (mt). я - ядро олігодендроцита, пофарбоване флуоресцентним барвником DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Шкала: А = 20 мкм, Б, В = 50 мкм.

Ми також використовували імуногістохімічне фарбування зрізів головного мозку на основний білок мієліну (МВР), який утворюється олігодендроцитами, для оцінки ступеня ушкодження, спричиненого перивентрикулярною лейкомаляцією.

Імуногістохімічне фарбування зрізів оцінювали за 5-ти бальною шкалою: "0" – інтенсивне зафарбовування зрізів, "5" – відсутність імунофарбування [271].

У контрольних тварин мозолисте тіло інтенсивно зафарбовувалося антитілами проти основного білка мієліну і за шкалою оцінки відповідало "0" (**Рис. 3.3Б**).

Моделювання перивентрикулярної лейкомаляції призводило до зменшення інтенсивності імунофарбування на МВР, що свідчило про пошкодження олігодендроцитів, і відповідало за шкалою оцінки пошкодження від "3" до "4" (**Рис. 3.3В**).

Імуногістохімічне дослідження фронтальних зрізів головного мозку миші показало, що після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції спостерігалось збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів та зміна їх морфології у мозолистому тілі (**Рис. 3.4Б**) у порівнянні із контрольною групою (**Рис. 3.4А**).

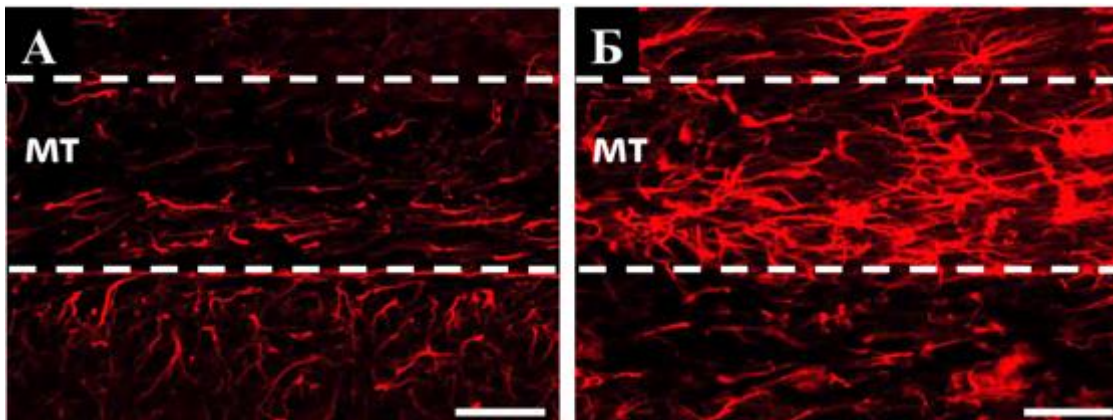


Рис. 3.4. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер астроцитів - GFAP. А - контрольна тварина, Б - тварина із змодельованою перивентрикулярною лейкомаляцією. Штриховою лінією показано межі мозолистого тіла (mt). Шкала = 50 мкм.

Також після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції спостерігалось збільшення інтенсивності забарвлення Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин (Рис. 3.5Б) у порівнянні із контрольною групою (Рис. 3.5А) та зміна їх морфології з розгалуженого фенотипу (Рис. 3.5А) в активований фенотип (Рис. 3.5Б).

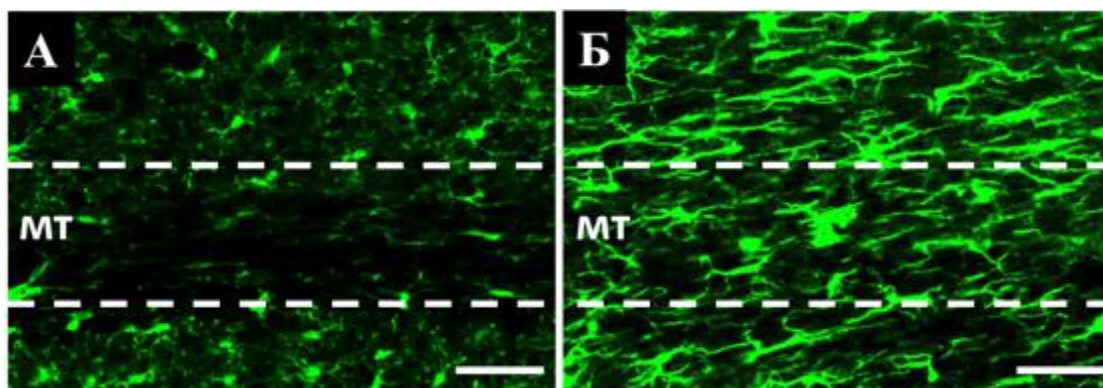


Рис. 3.5. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів

головного мозку миші, пофарбованих на маркер мікрогії - Iba-1. А - контрольна тварина, Б - тварина із змодельованою перивентрикулярною лейкомаляцією. Штриховою лінією показано межі мозолистого тіла (mt). Шкала = 50 мкм.

Таке збільшення інтенсивності імунозабарвлення можливо, було пов'язано з гіпертрофією соми гліальних клітин та їх відростків, а також, можливо, завдяки їх проліферації.

Отже, моделювання перивентрикулярної лейкомаляції призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і, відповідно, олігодендроцитів та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.

3.3. Дослідження клітинних механізмів гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку на *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції

У попередній серії експериментів на моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* ми показали, що олігодендроцити є найбільш чутливими клітинами до пошкоджуючого впливу перивентрикулярної лейкомаляції.

Саме тому культура олігодендроцитів або попередників олігодендроцитів із додаванням ендотоксину ліпополісахариду (індуктора нейрозапалення) у культуральне середовище найчастіше використовується як *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції [157].

Недоліками такої культури є те, що клітини більше не є складовою частиною первинної нейронної мережі, а також

змінюється їх морфологія, метаболізм та реакції на ті чи інші впливи [267].

Органотипові культури є найбільш прийнятними для моделювання патологічних процесів *in vitro* та розробки стратегій їх корекції.

Дедалі частіше органотипова культура зрізів головного мозку стає альтернативою експериментам *in vivo*. В органотиповій культурі головного мозку зберігаються типи клітин та шарів, їх цитоархітектоніка, синаптична організація, первинні міжклітинні зв'язки, розташування рецепторів тощо [183].

Перевагами органотипової культури зрізів головного мозку є можливість локальної електричної чи хімічної стимуляція певних частин нейронів (тіла, аксону, дендритів); тонка хірургічна маніпуляція зі зрізом (ізоляція окремих частин, розсічення аферентних шляхів, виділення відростків від тіл клітин).

В органотиповій культурі також присутній безпосередній доступ до позаклітинного простору, що дозволяє, з одного боку, легко контролювати умови життєдіяльності тканини, а з іншого – надає можливість прямого впливу на тканину різноманітними речовинами потрібної концентрації [117].

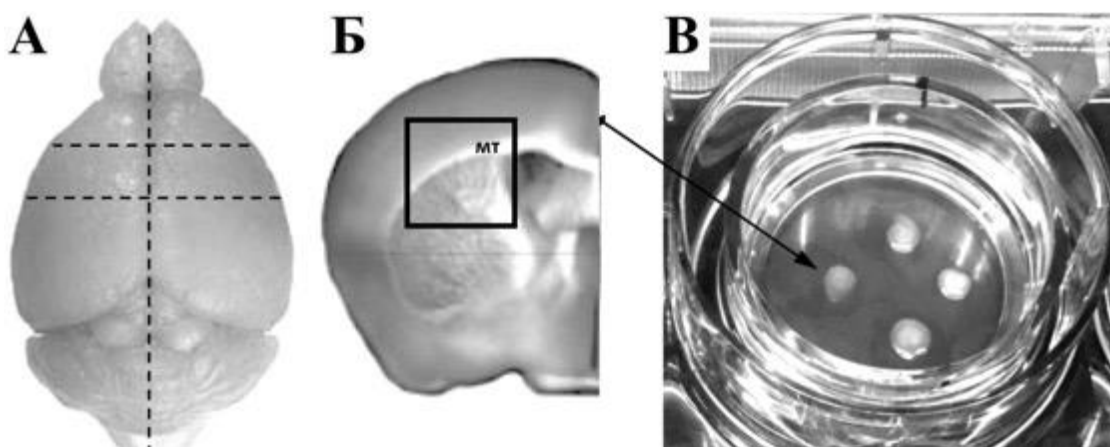
Виходячи з вищенаведеного, метою наших подальших досліджень була розробка моделі перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші.

Мишей лінії FVB 7-денного віку використовували для отримання органотипової культури зрізів головного мозку.

Виділяли головний мозок мишей, розділяли його на дві частини по серединній лінії та нарізали фронтальні зрізи (350 мкм) у передньо-задньому (anterior-posterior) напрямі: від брегма 1,10 до

брегма -0,10 (Рис. 3.6А).

Зрізи головного мозку миші, отримані з відповідної зони кожної півкулі (Рис. 3.6Б), переносили для культивування на пористі напівпроникні мембрани (Рис. 3.6В).



*Рис. 3.6. Органотипова культура зрізів головного мозку мишей. А – фото виділеного головного мозку миші. Штриховою лінією показано ділянки, з яких виготовляли фронтальні зрізи для органотипової культури головного мозку. Б – фото половини фронтального зрізу. Квадратом позначена зона, яку брали для імуногістохімічного аналізу; *mt* – мозолисте тіло. В – фото культивованих зрізів головного мозку на напівпроникній мембрані.*

Було показано, що при перивентрикулярній лейкомаляції найбільше пошкоджуються мієлінізовані нервові волокна мозолистого тіла, які сполучають великі півкулі головного мозку [68].

Виходячи з цього, після імуногістохімічного забарвлення зрізів головного мозку ми аналізували саме зону бокових шлуночків із мозолистим тілом (Рис. 3.6Б, позначена квадратом).

Ми показали в попередній серії експериментів, що для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo*, крім гіпоксично-ішемічного ушкодження нервової тканини додатково потрібно моделювання нейрозапалення.

Тому під час моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* ми, крім киснево-глюкозної депривації, також додавали ендотоксин ліпополісахарид для створення умов, що імітують нейрозапалення.

Ми провели пілотні дослідження щодо впливу декількох концентрацій ліпополісахариду на органотипову культуру зрізів головного мозку (10, 100, 1000 нг/мл).

Було встановлено, що доза ліпополісахариду 10 нг/мл мала слабкий вплив на відносну кількість лактатдегідрогенази в культуральному середовищі порівняно із контролем, а дози 100 і 1000 нг/мл мали подібний ефект на життєздатність культур (дані не показані).

Тому, надалі ми використовували дозування 100 нг/мл.

Надалі аналізували такі варіанти впливів на органотипову культуру зрізів головного мозку миші: киснево-глюкозна депривація, ліпополісахариди (100 нг/мл) та спільна дія киснево-глюкозної депривації і ліпополісахаридів.

Результати, отримані за допомогою спектрофотометричного аналізу, показали, що через 24 години після додавання ліпополісахариду в культуральне середовище збільшувалася відносна кількість лактатдегідрогенази і становила $0,76 \pm 0,05$ у.о. порівняно із контролем – $0,430 \pm 0,04$ у.о. (Табл. 3.3).

Киснево-глюкозна депривація мала ще більш пошкоджуючий ефект на тканину культивованих зрізів і відносна

кількість лактатдегідрогенази в культуральному середовищі становила $0,929 \pm 0,03$ у.о.

Спільна дія киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду призводила до ще більшого зростання відносної кількості лактатдегідрогенази і через 24 години вона сягала значення $1,299 \pm 0,07$ у.о.

Таблиця 3.3.

Відносна кількість лактатдегідрогенази у культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин після киснево-глюкозної депривації, додавання ліпополісахариду або спільної дії киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду

	Лактатдегідрогеназа, у.о.	
	24 години	48 годин
Контроль	$0,430 \pm 0,04$	$0,510 \pm 0,08$
Ліпополісахарид	$0,760 \pm 0,05^*$	$1,050 \pm 0,14^*$
Киснево-глюкозна депривація	$0,929 \pm 0,03^*$	$1,253 \pm 0,20^*$
Киснево-глюкозна депривація + ліпополісахарид	$1,299 \pm 0,07^*$	$2,164 \pm 0,49^*$

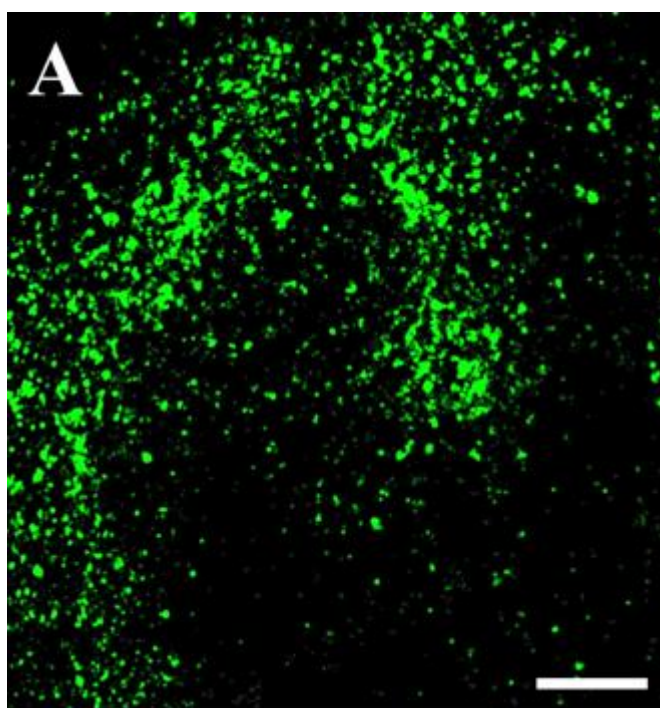
*Примітки: * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$); у.о. - умовні одиниці.*

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 48 годин показники кількості лактатдегідрогенази значно збільшувалися і

становили $1,050 \pm 0,14$ у.о. після додавання ліпополісахариду, $1,253 \pm 0,20$ у.о. після киснево-глюкозної депривації і $2,164 \pm 0,49$ у.о. після спільної дії киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду.

Отже, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що після спільної дії киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду пошкоджуючий вплив на органотипові зрізи суттєво більший, ніж при їх окремому використанні. Ефекти були виражені через 24 години і посилювалися через 48 годин.

Ураження білої речовини головного мозку біля бокових шлуночків є основною ознакою перивентрикулярної лейкомаляції. Тому ми вирішили дослідити олігодендроцити в органотиповій культурі зрізів головного мозку за допомогою імуногістохімічного аналізу. Наші попередні результати визначення відносної кількості лактатдегідрогенези свідчать про те, що ефекти на життєздатність були найбільш вираженими через 48 годин після впливів. Саме тому імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку також проводили через 48 годин після експериментальних впливів (Рис. 3.7).



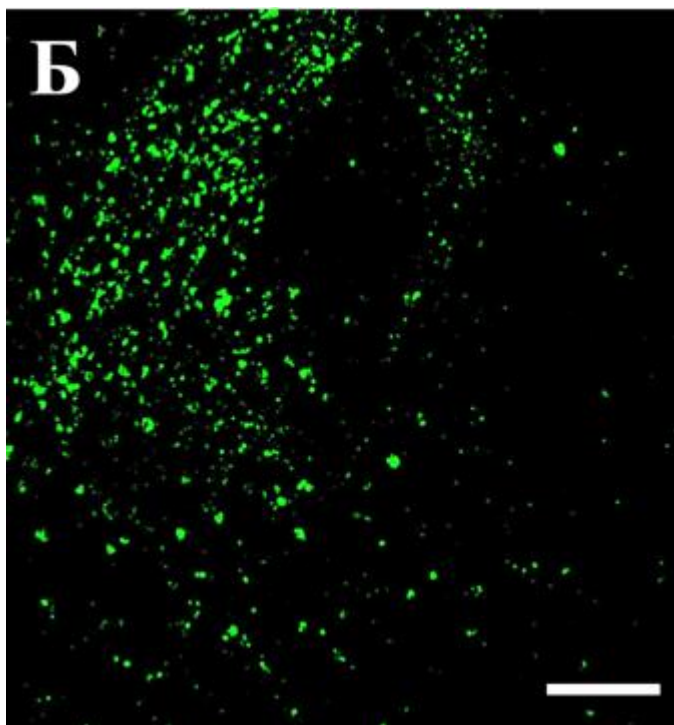


Рис. 3.7. Імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. А - конфокальне зображення зрізів, пофарбованих на маркер олігодендроцитів (Rip) у контролі. Б – конфокальне зображення зрізів через 48 год після спільної дії киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду. Шкала = 500 мкм.

Імуногістохімічний аналіз показав, що додавання ліпополісахариду в культуральне середовище зменшувало Rip-імунореактивність зрізів мозку порівняно із контролем ($5,92 \pm 1,05$ у.о.) і становила $2,67 \pm 0,28$ у.о. (Табл. 3.4).

Киснево-глюкозна депривація також мала негативний вплив на стан нервової тканини, інтегральна щільність флуоресценції дорівнювала $2,93 \pm 0,53$ у.о. (Табл. 3.4).

Але найнижчою Rip-імунореактивність зрізів мозку була в умовах спільної дії киснево-глюкозної депривації і ліпополісахариду

та становила $1,90 \pm 0,35$ у.о., що відповідає суттєвому пошкодженню білої речовини головного мозку при перивентрикулярній лейкомаляції (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4.

Інтегральна щільність флуоресценції Rir-позитивних олігодендроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші

	Інтегральна щільність флуоресценції, у.о.
Контроль	$5,92 \pm 1,05$
ЛПС	$2,67 \pm 0,28^*$
КГД	$2,93 \pm 0,53^*$
КГД/ЛПС	$1,90 \pm 0,35^*$

*Примітки: * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$); у.о. - умовні одиниці; ЛПС - ліпополісахарид; КГД - киснево-глюкозна депривація.*

Відомо, що реактивний гліоз – це реактивні зміни гліальних клітин (астроцитів і мікроглії) у відповідь на пошкодження нервової тканини, які зазвичай характеризуються проліферацією і/або гіпертрофією гліальних клітин [243].

У попередніх дослідженнях на моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* ми показали, що перивентрикулярна лейкомаляція супроводжується вираженим реактивним гліозом. Саме тому щоб оцінити реактивний гліоз на моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* ми провели імуногістохімічне дослідження зрізів мозку з використанням маркерів астроцитів (GFAP) та мікрогліальних клітин (Iba-1).

Імуногістохімічний аналіз органотипової культури зрізів мозку продемонстрував збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів та зміна їх морфології за активованим фенотипом після додавання ліпополісахариду та дії киснево-глюкозної депривації у порівнянні із контрольною групою (**Рис. 3.8**).

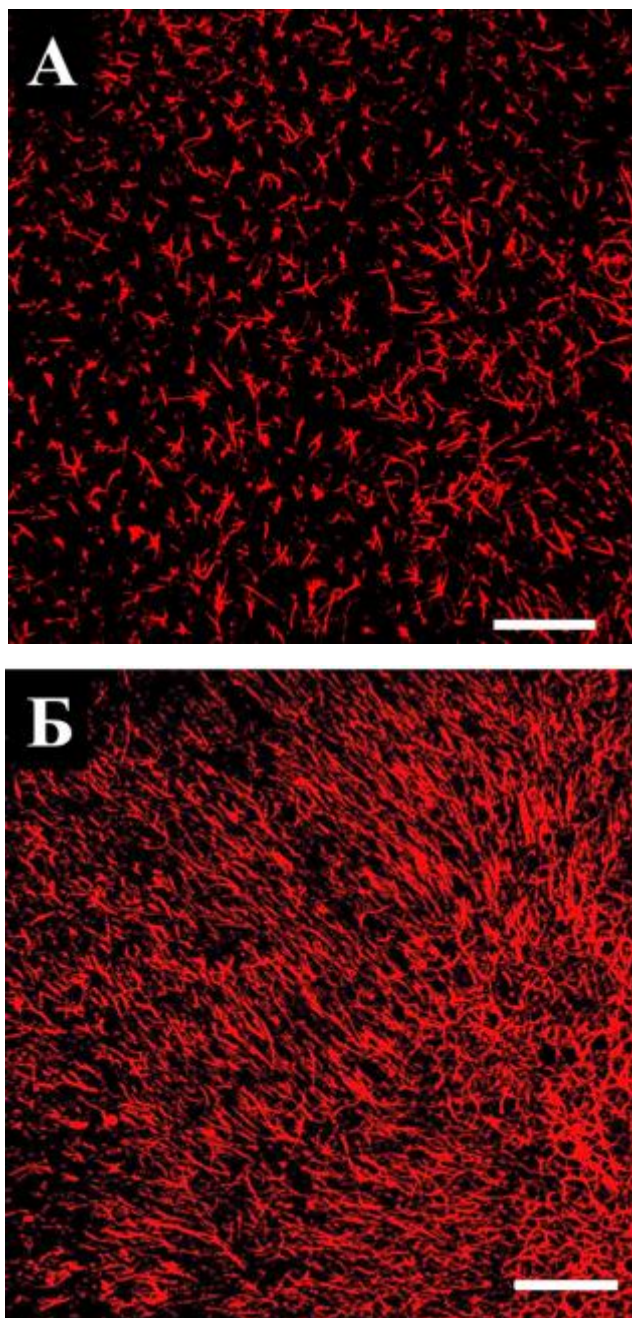


Рис. 3.8. Конфокальні зображення культивованих зрізів

головного мозку миші, імунозабарвлених на маркер астроцитів (GFAP). А – контроль. Б – через 48 годин після впливу киснево-глюкозної депривації та додавання ліпополісахариду. Шкала - 500 мкм.

Імуногістохімічний аналіз показав, що інтегральна щільність флуоресценції GFAP-позитивних астроцитів контрольної групи становила $5,82 \pm 0,65$ у.о., а після додавання ліпополісахариду або дії киснево-глюкозної депривації – $9,33 \pm 1,25$ та $10,86 \pm 1,20$ у.о. відповідно (Табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Інтегральна щільність флуоресценції GFAP-позитивних астроцитів в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші

	Інтегральна щільність флуоресценції, у.о.
Контроль	$5,82 \pm 0,65$
ЛПС	$9,33 \pm 1,25^*$
КГД	$10,86 \pm 1,20^*$
КГД/ЛПС	$15,81 \pm 0,74^*$

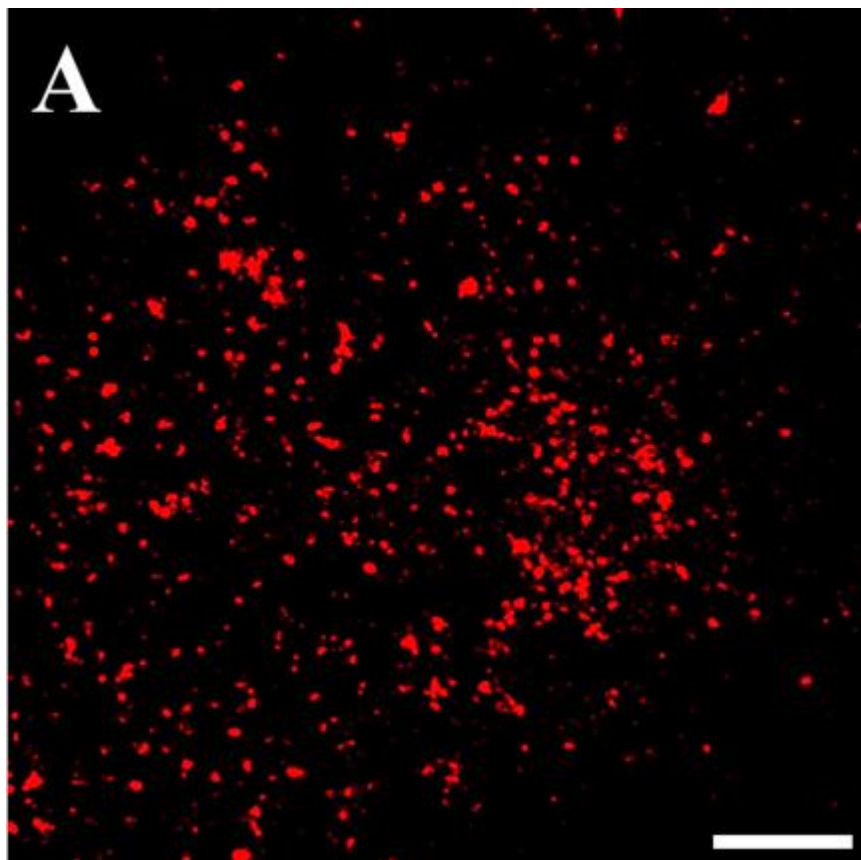
*Примітки: * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$); у.о. - умовні одиниці; ЛПС - ліпополісахарид; КГД - киснево-глюкозна депривація.*

Також було продемонстровано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпополісахариду призводила до ще

більшого реактивного астрогліозу і інтегральна щільність флуоресценції становила $15,81 \pm 0,74$ у.о. (Табл. 3.5).

Можна припустити, що таке збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів у порівнянні із контрольною групою, ймовірно, було пов'язано з гіпертрофією соми астроцитів та їх відростків, а також завдяки проліферації астроцитів.

Імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на наявність маркеру мікроглії Iba-1, показав, що після додавання ліпополісахариду або дії киснево-глюкозної депривації відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин (Рис. 3.9).



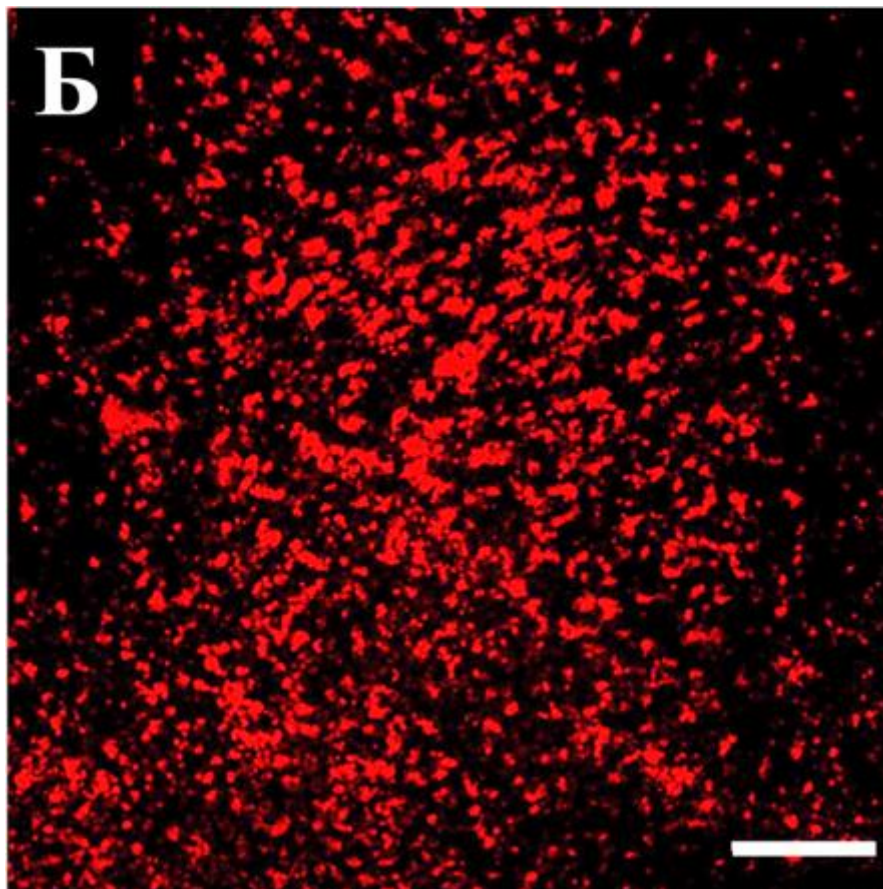


Рис. 3.9. Конфокальні зображення культивованих зрізів головного мозку миші, імунозabarвлених на маркер мікроглії (Iba-1). А – контроль. Б – через 48 годин після впливу киснево-глюкозної депривації та додавання ліпополісахариду. Шкала - 500 мкм.

Імуногістохімічний аналіз показав, що інтегральна щільність флуоресценції Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин після додавання ліпополісахариду або дії киснево-глюкозної депривації становила $11,93 \pm 0,91$ та $9,74 \pm 1,28$ у.о. відповідно, тоді як у контрольній групі лише $5,53 \pm 0,93$ у.о. (Табл. 3.6).

Таблиця 3.6.

Інтегральна щільність флуоресценції Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші

	Інтегральна щільність флуоресценції, у.о.
Контроль	5,53 ± 0,93
ЛПС	11,93 ± 0,91*
КГД	9,74 ± 1,28*
КГД/ЛПС	18,59 ± 1,07*

*Примітки: * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$); у.о. - умовні одиниці; ЛПС - ліпололісахарид; КГД - киснево-глюкозна депривація.*

Було також продемонстровано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ендотоксину ліпололісахариду збільшувала реактивний мікрогліоз і інтегральна щільність флуоресценції становила $18,59 \pm 1,07$ у.о. (Табл. 3.6).

Отже, у цій серії експериментів було розроблено модель перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Було продемонстровано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпололісахаридів мала найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо.

Також ми показали, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ендотоксину ліпололісахариду призводила до значного

вивільнення цитозольного ферменту лактатдегідрогенази в культуральне середовище, зменшувала Rip-імунореактивність, що свідчило про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняла виражений реактивний гліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

Ми вважаємо, що створену нами *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології, зокрема перспективних фармакологічних агентів та трансплантації стовбурових клітин.

Було показано, що перспективним клітинним агентом у регенеративній медицині є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які мають тропність до зони пошкодження, можуть пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи завдяки фізичній та/або хімічній взаємодії з клітинами імунної системи [20].

Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини забезпечують толерантність імунної системи реципієнта до алогенних клітин, власне для самих себе.

Використання аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [53].

Саме тому в наших подальших експериментах із моделюванням перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* ми вирішили використовувати мультипотентні мезенхімальні стромальні

клітини.

Мультіпотентні мезенхімальні стромальні клітини отримували з жирової клітковини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J.

В культурі мультіпотентних мезенхімальних стромальних клітин на 2-му пасажі переважали фібробластоподібні клітини з високою адгезивністю, діаметром до 80 мкм, що містили значну кількість вакуолей і гранул (**Рис. 3.10**).

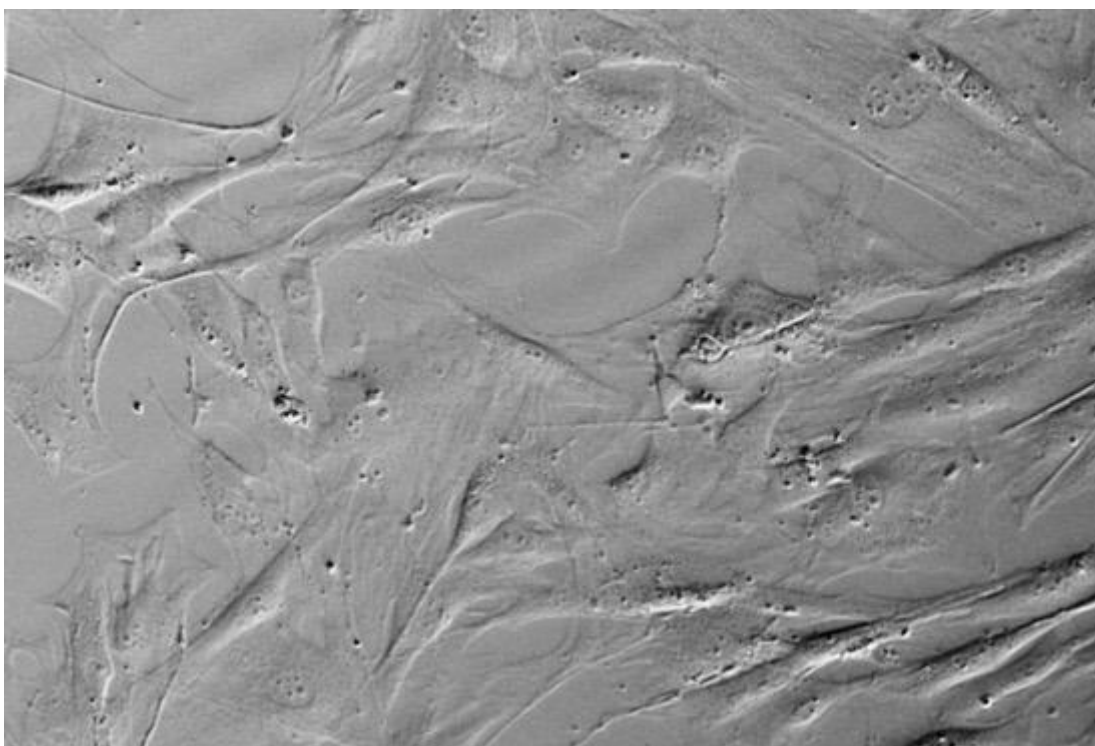


Рис. 3.10. Мікрофото культури мультіпотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової клітковини мишей, 2-й пасаж, фазовий контраст, $\times 100$.

Фенотипування культури мультіпотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини методом проточної цитометрії показало високий рівень експресії маркерів CD44, CD73, CD90, при цьому відносний вміст клітин з експресією гемопоетичних

маркерів CD45 та CD117 становив менше 2 %.

На ранніх пасажах експресія маркера CD34 коливалась в межах 8–12 %, що є типовим для мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини і може бути ознакою більш високого потенціалу диференціювання клітин в ендотеліальному напрямку.

Для стандартизації досліджень з використанням стовбурових клітин, Міжнародне товариство клітинної терапії (ISCT) запропонувало мінімальні критерії для ідентифікації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин:

- мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини повинні бути адгезивними до пластику при стандартних умовах культивування;
- мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини повинні експресувати CD105, CD73, CD90 та не експресувати CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79 α або CD19 та HLA-DR;
- мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини повинні мати здатність диференціюватися в остеогенному, адипогенному та хондрогенному напрямках в умовах *in vitro* [76].

У наших дослідженнях ми показали, що отримана нами культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин відповідала першим двом критеріям Міжнародного товариства клітинної терапії.

Надалі ми перевіряли третій критерій – здатність отриманої культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин до направлено диференціювання в остеогенному напрямку.

Цитохімічне фарбування препаратів культур мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин барвником Alizarine Red S для виявлення солей кальцію та ВСІР/NBT на лужну фосфатазу показало, що на 10-ту добу після додавання факторів остеогенного диференціювання в культуру мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, отриману з жирової клітковини мишей, відмічено відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі та продукцію лужної фосфатази окремими групами клітин.

На 21-у добу особливо виражене відкладання солей кальцію спостерігали навколо кластерів клітин і практично всі клітини в культурі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин експресували лужну фосфатазу.

Відомо, що ультраструктурний аналіз є важливим інструментом для морфологічних, фізіологічних і біохімічних досліджень мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин.

У наших дослідженнях з використанням ультраструктурного аналізу було продемонстровано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини мали еухроматичне ядро, нерівну поверхню мембрани через численні цитоплазматичні виступи (**Рис. 3.11**).

Цитоплазма мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин була надзвичайно багатою на ендосомальні елементи, як мали типові мультиламелярні та мултивезикулярні структури.

Також були виявлені ліпідні краплі в цитоплазмі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (**Рис. 3.11**).

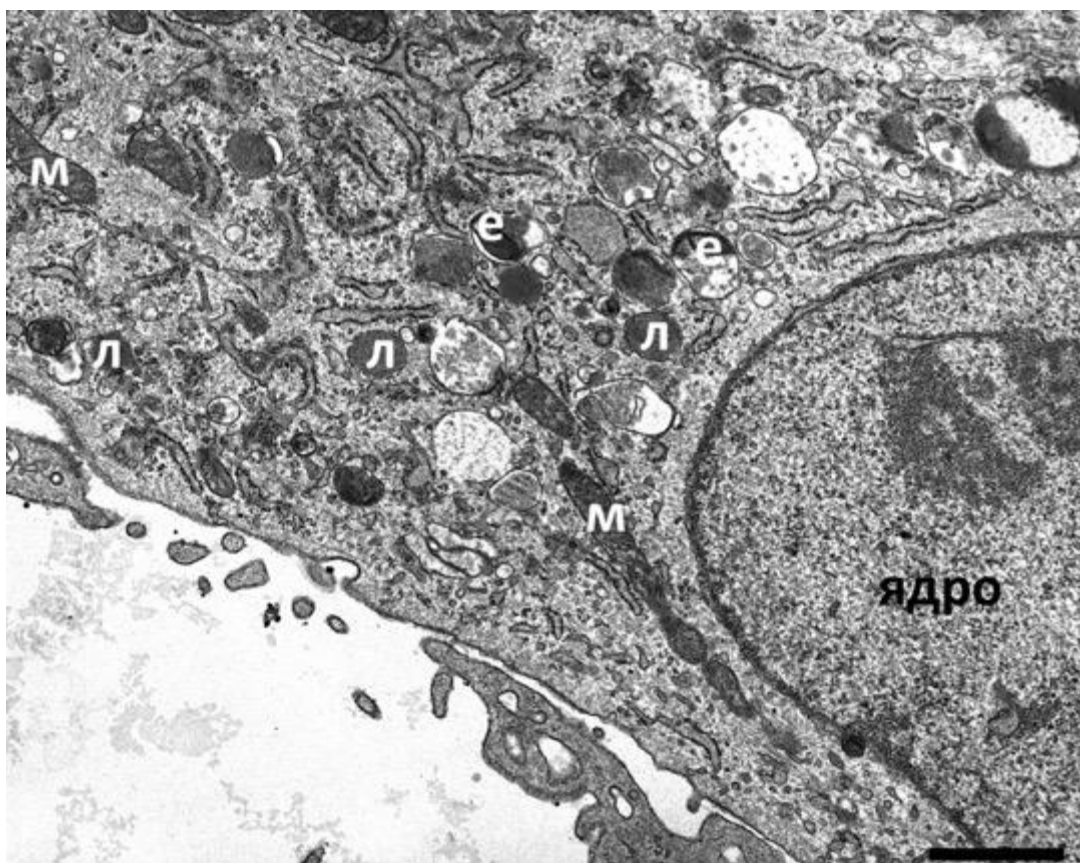


Рис. 3.11. Електронограма мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини у культурі, пасаж 2. Клітина з еухроматиновим ядром і нерівною поверхнею цитоплазматичної мембрани. Цитоплазма клітин містить велику кількість ендосомальних/везикулярних елементів і лізосом. е - ендосоми/везикулярні елементи, м - мітохондрії, л - лізосоми. Шкала = 0,5 мкм.

На ультраструктурному рівні в мультипотентних мезенхімальних стромальних клітинах чітко візуалізувалися дві цитоплазматичні ділянки: внутрішня була багата на органели (численні округлі і подовжені електронно-щільні мітохондрії, гранулярний ендоплазматичний ретикулум), тоді як периферійна – майже не містила органел (**Рис. 3.12**).

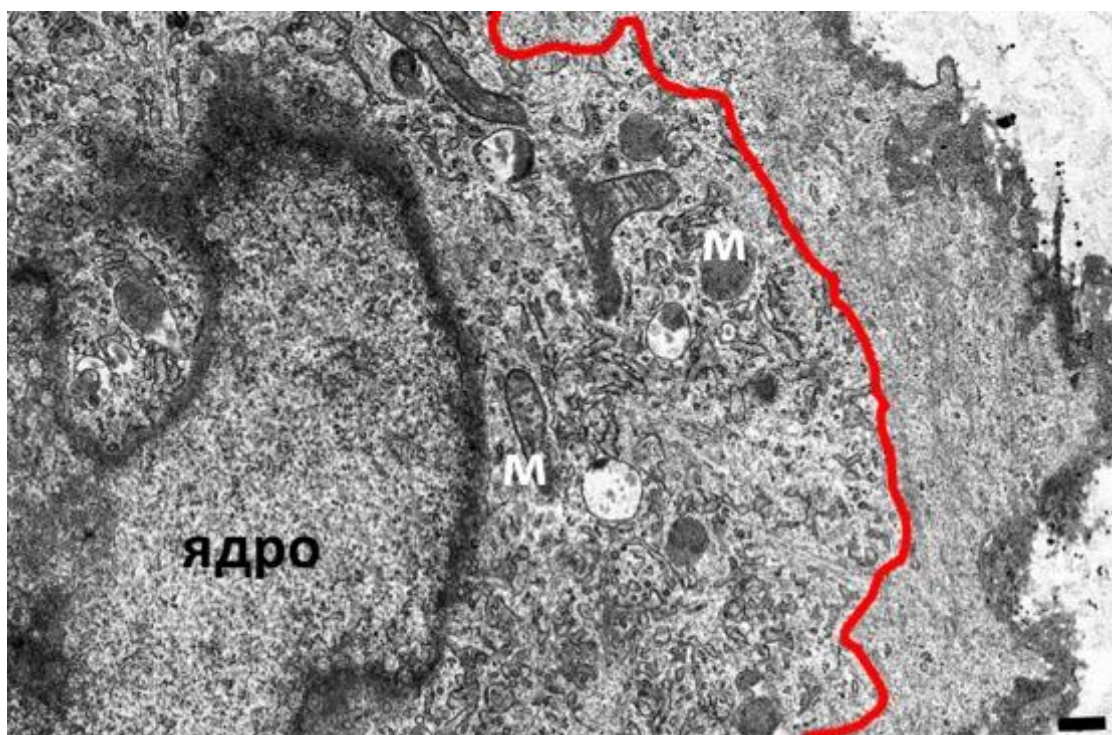


Рис. 3.12. Електронограма мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини у культурі, пасаж 2. Чітко візуалізуються дві цитоплазматичні ділянки (позначені червоною лінією): внутрішня – багата на органели, тоді як периферійна частин майже їх немає. м - мітохондрії, Шкала = 0,5 мкм.

Цитоплазма мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин виглядала гранульованою через велику кількість вільних рибосом і полірібосом (Рис. 3.13).

Гранулярний ендоплазматичний ретикулум часто був розширений і містив матеріал низької електронної щільності (Рис. 3.13).

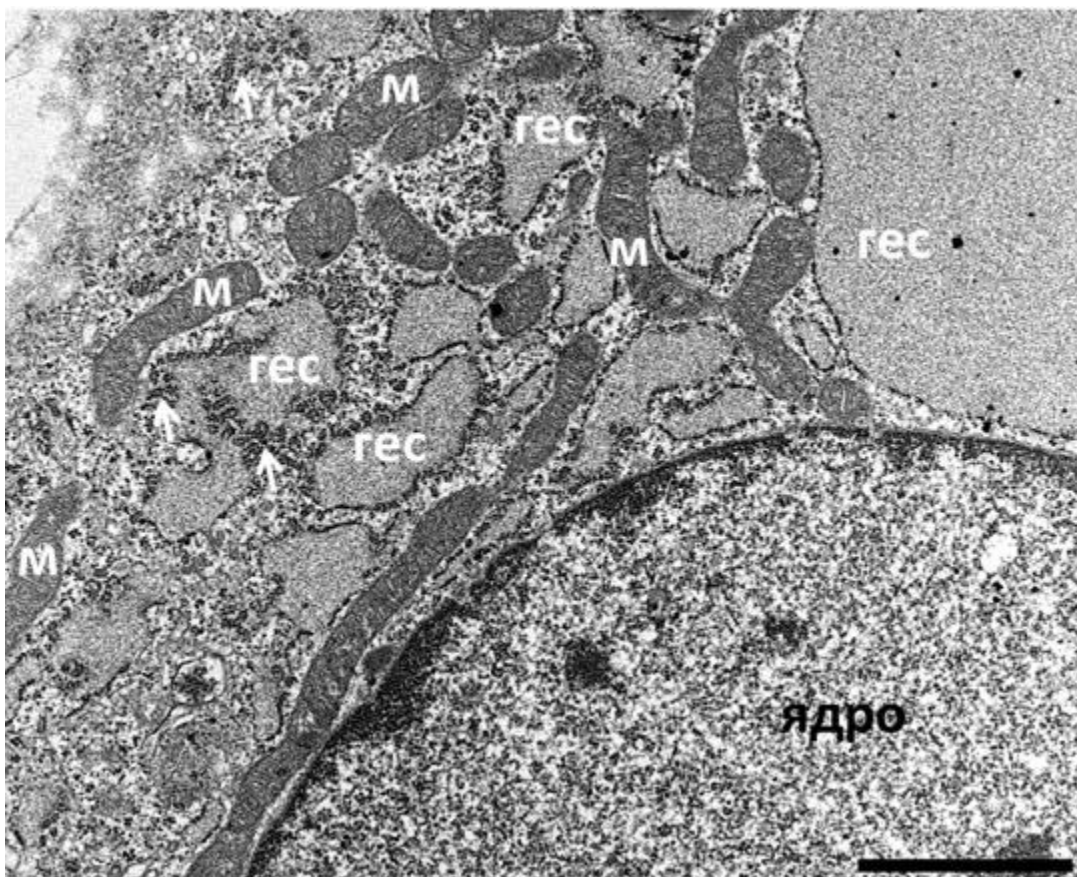


Рис. 3.13. Електронограма мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини у культурі, пасаж 2. Цитоплазма має велику кількість вільних рибосом і полірибосом (стрілки). Гранулярний ендоплазматичний ретикулум розширений і містить матеріал низької електронної щільності. гес – гранулярна ендоплазматична сітка, м - мітохондрії. Шкала = 0,5 мкм.

Отже, електронно-мікроскопічний аналіз показав, що недиференційовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини мали гранулярний ендоплазматичний ретикулум з розширеними цистернами, подовжені мітохондрії, ендосомальні елементи і ліпідні

гранули, що може свідчити про високу метаболічну активність клітин.

Культури клітин *in vitro* мають широкий спектр використання з фундаментальними та прикладними цілями – від наукових досліджень та біотехнологічного виробництва до клінічного застосування в регенеративній медицині.

Більшість досліджень щодо властивостей клітинних культур були виконані на двовимірних (2D) поверхнях через легкість, зручність і високу життєздатність клітин [83].

Такі моношарові культури суттєво поглибили розуміння основ клітинної біології. Проте, в організмі майже всі клітини оточені позаклітинним матриксом, який має складну 3D-волокнисту структуру, що забезпечує необхідний біохімічний і фізичний сигналінг між клітинами різних типів [149].

Тому останнім часом усе частіше використовуються 3D культивування клітин у складі різноманітних матриксів, і на сьогодні цей підхід вже застосований для дослідження понад 380 клітинних ліній [150].

Одним із перспективних варіантів створення тривимірних матриксів є гідрогелі на основі агарози та карбомерів. Завдяки своїм властивостям вони реалізують потенціал носіїв природного походження, забезпечуючи просторову структуру, подібну до живої тканини, залишаючись при цьому нетоксичними та неімуногенними.

З іншого боку, завдяки можливості регулювати фізико-хімічні параметри цих гідрогелів шляхом зміни пропорцій та модифікації складових компонентів, досягається необхідна кінетика деградації носія, що корелює з інтеграцією трансплантата в тканини реципієнта [111].

Тому надалі ми спробували оцінити ефективність 3D культивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини мишей в складі гідрогелю з карбомеру 974Р.

Для тривимірного культивування клітин було виготовлено гідрогелі на основі агарози та карбомеру 974Р. Використовуючи оригінальні пропорції вихідних компонентів та модифікації часу і температури їх процесингу можна досягти певної пластичності матеріалу для надання йому необхідної форми (**Рис. 3.14А**) та пружно-еластичних властивостей при подальшій регідратації поживним середовищем (**Рис. 3.14Б**).

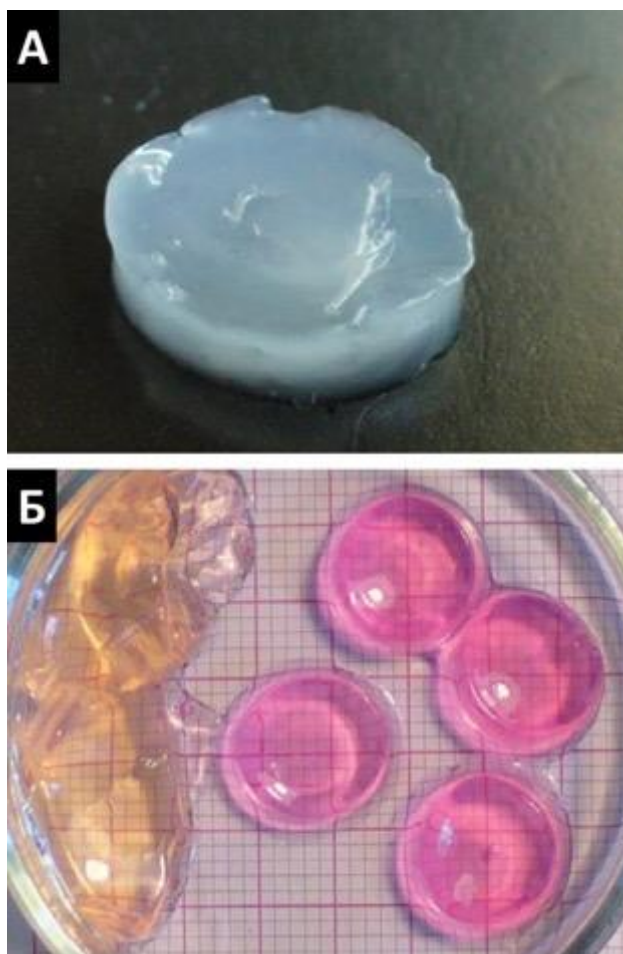


Рис. 3.14. Фото макропрепаратів гідрогелю на основі карбомеру та агарози: А – нативний гідрогель, Б – гідрогелі, регідратовані поживним середовищем DMEM/F12.

Було отримано 3D культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини мишей, заселених в регідратовані поживним середовищем гідрогелі.

Встановлено, що при нанесені піпеткою $4 \cdot 10^4$ клітин на гідрогель циліндричної форми діаметром 10 мм (об'єм 400 мм^3) через два тижні культивування лише поодинокі клітини проникали на глибину до 1,5 мм від поверхні гідрогелю та набували видовженої форми.

Більшість клітин зберігали округлу форму та були на поверхні стінок гідрогелю.

При нанесені піпеткою 10^6 клітин на гідрогель на ранніх етапах культивування (до 10 діб) клітини розташовувались на його поверхні та зберігали округлу форму.

Протягом наступних п'яти-семи діб клітини проникали в товщу гелю та набували видовженої форми, контактуючи між собою.

Через 7-14 діб після проникнення кількість міжклітинних контактів збільшувалась і вони утворювали кластери та мережу з сусідніх клітин, що свідчить про їх проліферацію (**Рис. 3.15**).

Було запропоновано ін'єкційний спосіб введення мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у товщу гідрогелю за допомогою шприца та проаналізовано залежність ефективності заселення карбомерних гідрогелів від початкової кількості клітин.

При ін'єкції $4 \cdot 10^4$ або $2 \cdot 10^5$ клітин у гідрогель на глибину 1-2 мм через 2 тижні культивування клітини розташовувались дифузно у всій товщі гідрогелю, набували видовженої форми, але не контактували між собою.

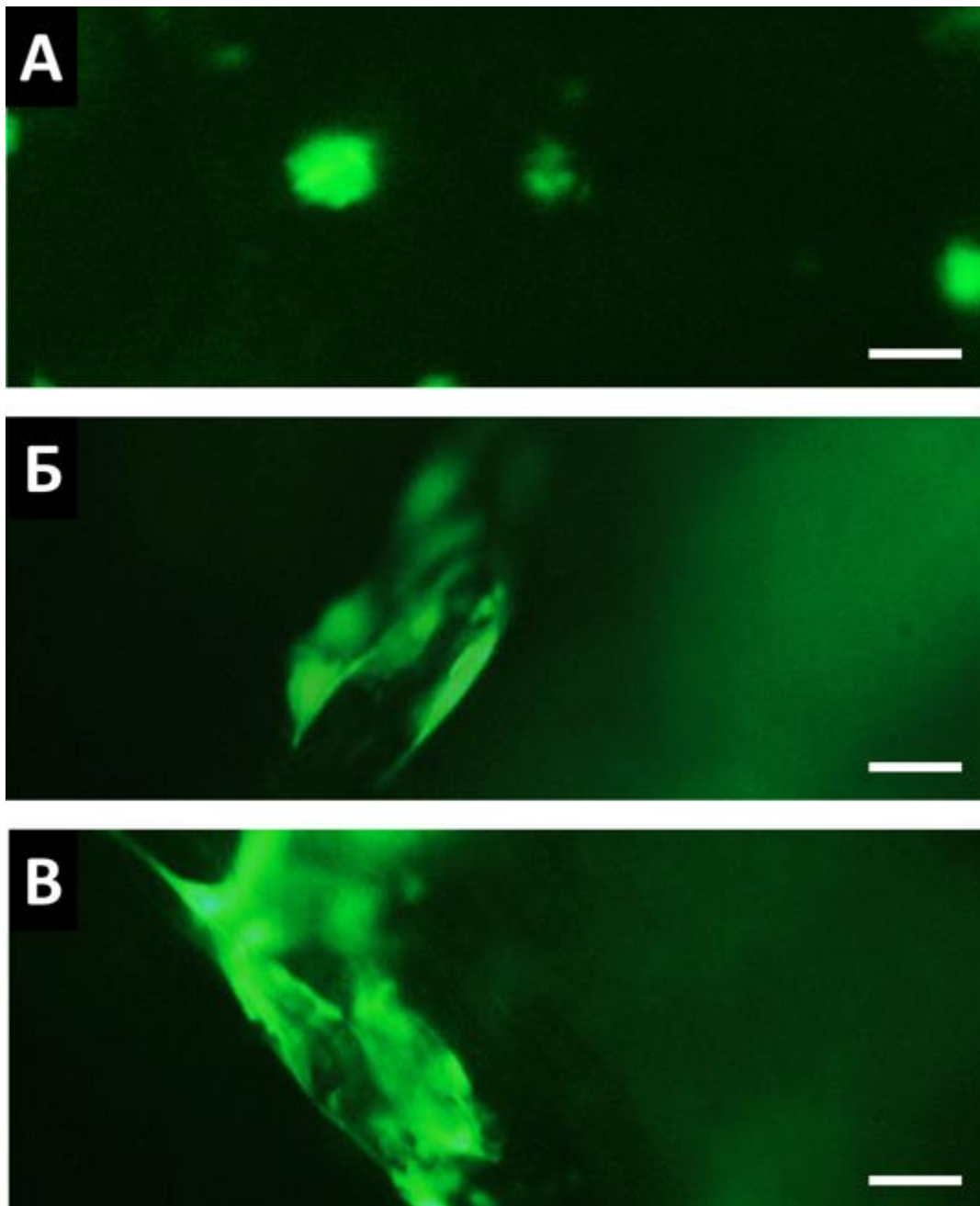


Рис. 3.15. Культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини в карбомерному гідрогелі: А – 8-а доба культивування; Б – 18-а доба культивування; В – 29-а доба культивування. Шкала = 50 мкм.

При ін'єкції 10^6 клітин у гідрогель на глибину 2-3 мм через 2 тижні культивування клітини набували полігональної форми

завдяки численним виростам, якими вони контактували між собою, формуючи мережу із сусідніх клітин (**Рис. 3.16**).

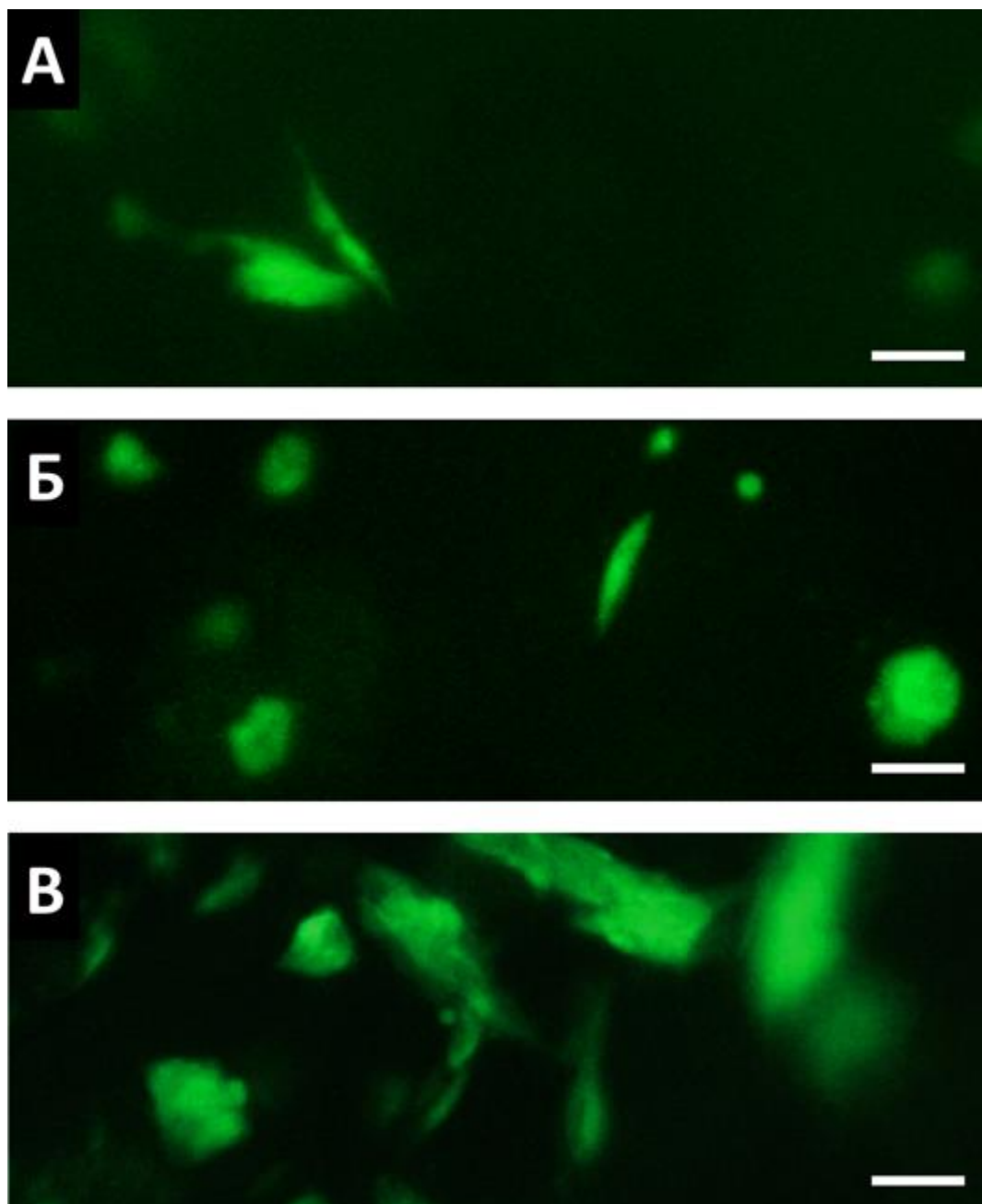


Рис. 3.16. Культура мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини в карбомерному гідрогелі, 14-а доба культивування, флуоресцентна мікроскопія: А – початкова доза $4 \cdot 10^4$ клітин; Б – $2 \cdot 10^5$ клітин; В – 10^6 клітин. Шкала = 50 мкм.

Отже, було підібрано оптимальну концентрацію клітин та метод заселення ними гідрогелів необхідної форми та розміру для подальших досліджень *in vitro*.

Для оцінки здатності до направленої диференціювання мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини в умовах тривимірних об'ємних культур розроблено методики їх направленої остеогенної диференціювання в гідрогелі.

При забарвленні Alizarin Red S та BCIP-NBT препаратів гідрогелів з клітинами в остеогенному середовищі вже на 14-у добу виявлено позитивну реакцію на солі кальцію та лужну фосфатазу, відповідно, по периферії гідрогелю та в його товщі у місцях локалізації клітин (**Рис. 3.17**).

Отримані результати свідчать, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової клітковини зберігають потенціал направленої диференціювання в умовах об'ємного тривимірного культивування, характерний для двовимірних моношарових культур.

Отже, об'ємні носії на основі гідрогелю з карбомеру 974P здатні здійснювати механічну підтримку клітин, забезпечувати необхідну цитоархітектоніку завдяки формуванню міжклітинних контактів, а також зберігають потенціал мультипотентних клітин до направленої диференціювання.

Вдосконалення технології заселення клітинами тривимірних матриксів на основі карбомеру 974P дозволить моделювати їх просторову організацію та підтримувати міжклітинні взаємодії, що в підсумку може сприяти довгостроковому виживанню та спеціалізації трансплантатів для більш ефективного відновлення пошкоджених тканин і органів.

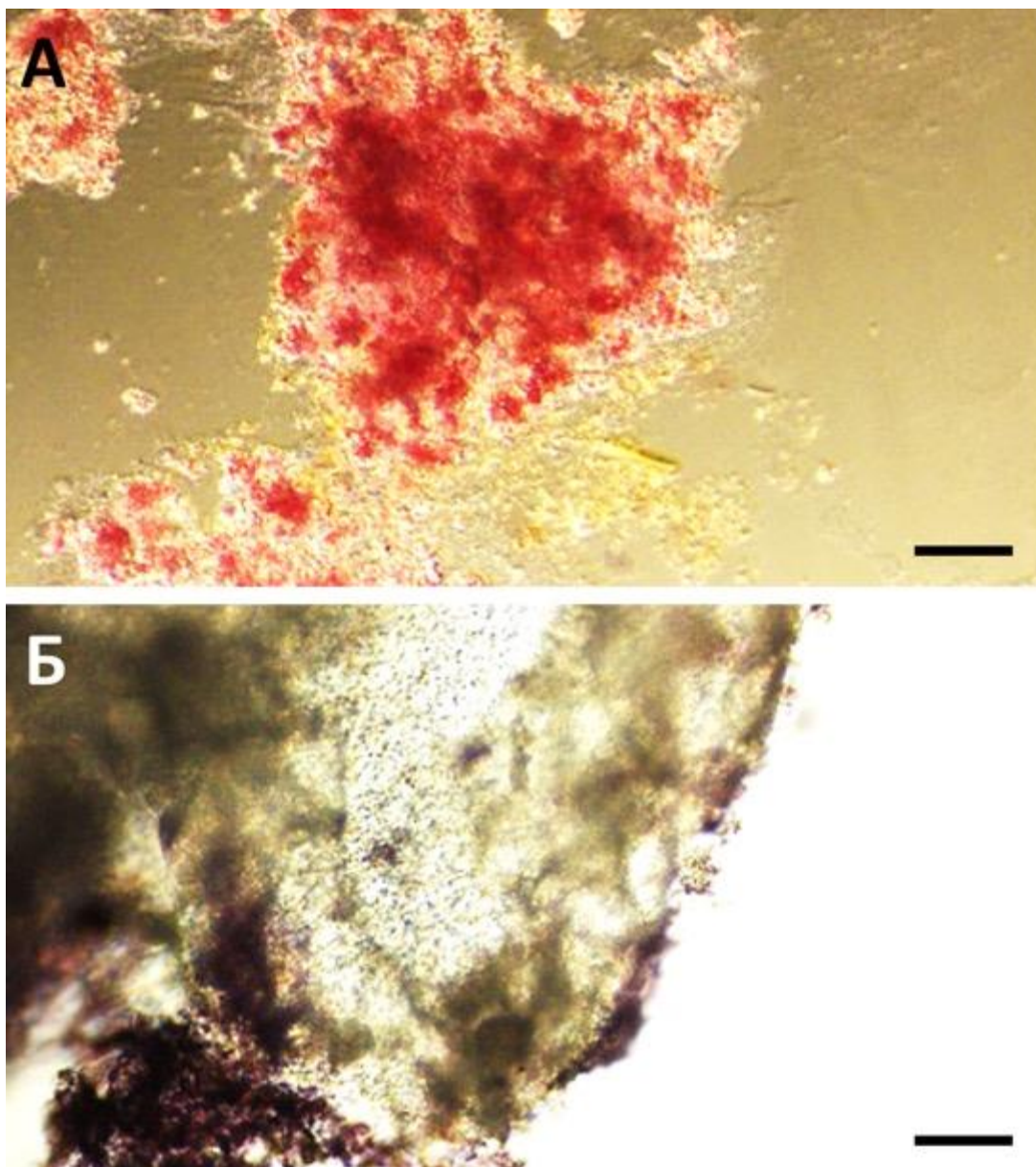


Рис. 3.17. Мікропрепарати гідрогелів, заселених мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини, диференційовані в остеогенному напрямку, забарвлення Alizarin Red S на солі кальцію, червоний колір (А) та BCIP-NBT на лужну фосфатазу, коричневий колір (Б). Шкала = 50 мкм.

У наступній серії експериментів ми досліджували вплив трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин

на стан нервової тканини головного мозку через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro*.

Для виконання такого дослідження перед моделюванням перивентрикулярної лейкомаляції культивовані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини переводили із адгезивного стану в суспензію та наносили безпосередньо на культивований зріз головного мозку (25 000 клітин на один зріз).

Імуногістохімічний аналіз показав, що близько 10 % нанесених на зріз GFP-позитивних клітин прикріплялися до культивованого зрізу, а решта мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин розподілялися на поверхні пористої мембрани.

З метою оцінки ступеня пошкодження нервової тканини в процесі моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* та ефекту контактного співкультивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин зі зрізами головного мозку на цій моделі використовували спектрофотометричний метод визначення рівня лактатдегідрогенази.

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 та 48 годин від початку моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* відносна кількість лактатдегідрогенази в культуральному середовищі збільшувалася порівняно із контрольними зрізами в 3,1 рази та 4,3 рази відповідно (**Рис. 3.18**).

Результати дослідження показали, що контактне співкультивування зрізів головного мозку з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами достовірно зменшувало кількість лактатдегідрогенази порівняно із перивентрикулярною лейкомаляцією, як після 24, так і після 48 годин (у 2,4 рази, та в 1,9 рази, відповідно) (**Рис. 3.18**).

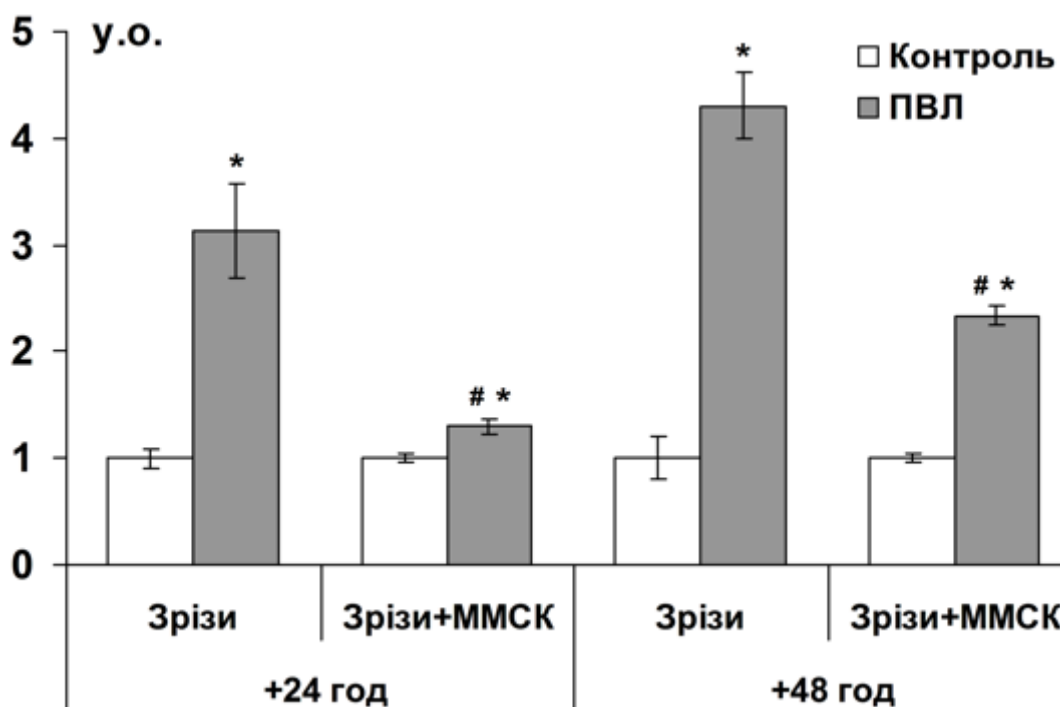
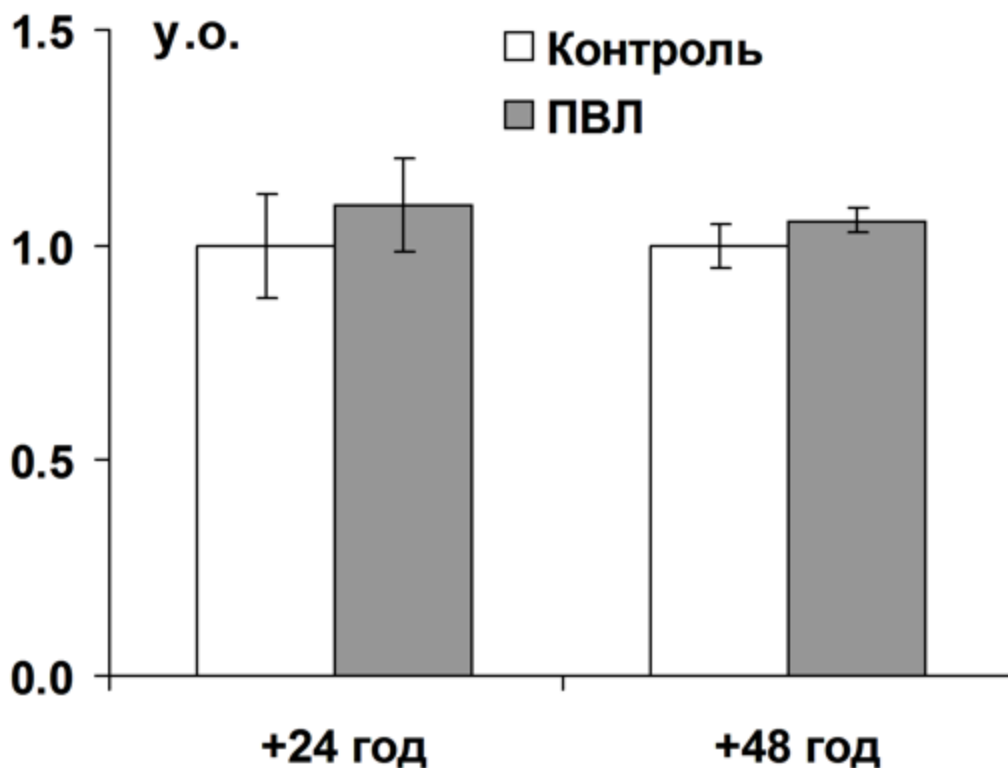


Рис. 3.18. Спектрофотометричне визначення відносної кількості лактатдегідрогенази в культуральному середовищі органотипових зрізів через 24 та 48 годин від початку моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) *in vitro* в умовах окремого культивування зрізів та спільно з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК). * - статистично достовірна відмінність порівняно з контролем, # - статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$).

Цікаво було дослідити вплив перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* на життєздатність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у культурі.

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 та 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* відносна кількість лактатдегідрогенази у культуральному середовищі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин достовірно не

змінювалася порівняно із контрольними значеннями (без моделювання ПВЛ *in vitro*) (Рис. 3.19).



*Рис. 3.19. Спектрофотометричне визначення відносної кількості лактатдегідрогенази в культуральному середовищі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) через 24 та 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) *in vitro*.*

Можна припустити, що моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* істотно не впливало на життєздатність мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин у культурі, що свідчить про високу стійкість цих клітин до пошкоджуючих чинників, використаних для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції в цьому експерименті.

Отже, результати спектрофотометричного аналізу продемонстрували, що контактне співкультивування органотипових зрізів з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами мало нейропротекторний характер і зменшувало пошкоджуючий вплив перивентрикулярної лейкомаляції на зрізи головного мозку.

Існує гіпотеза, що нейропротекторні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин також реалізуються й паракринно завдяки різноманітним факторам, які вони секретують.

Тому в наступній серії експериментів для перевірки цієї гіпотези ми аналізували вплив мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин на нервову тканину після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* в умовах безконтактного співкультивування.

Для виконання такого дослідження мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини 2-го пасажу переносили в 6-лункові культуральні планшети для подальшого безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку, які культивувалися на пористих напівпроникних мембранах (**Рис. 3.20**).

Через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції та безконтактного співкультивування зрізів мозку з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами виконували імуногістохімічний аналіз культивованих зрізів головного мозку на наявність маркеру олігодендроцитів Rip-1.

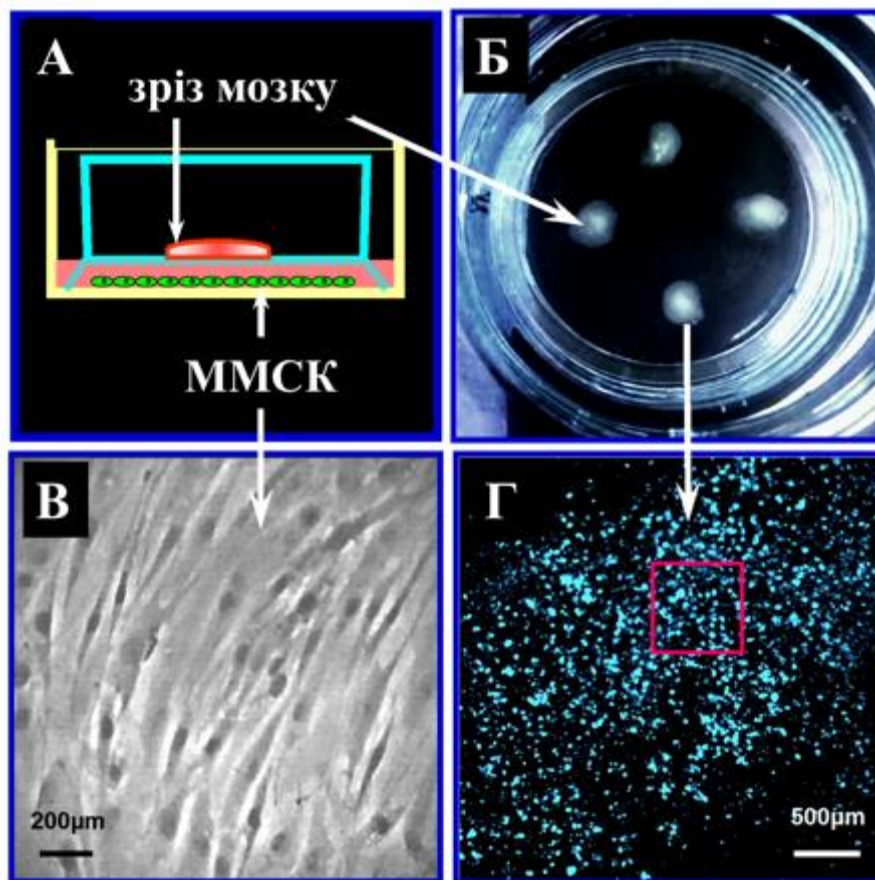


Рис. 3.20. Схеми безконтактного співкультивування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з органотиповою культурою зрізів головного мозку мишей. А – для безконтактного співкультивування вставки зі зрізами головного мозку поміщали в б-лункові планшети, які містили адгезивну культуру ММСК. Б – фото культивованих зрізів головного мозку на напівпроникній мембрані. В – фото культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, 2-й пасаж. Г – квадратом позначена зона на зрізі головного мозку, яку брали для імуногістохімічного аналізу. Ядра клітин контрастовані флуоресцентним барвником Hoechst 33342.

Аналіз показав, що через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції та безконтактного

співкультивування зрізів мозку з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами відбувалося збільшення інтенсивності забарвлення Rip-1-позитивних олігодендроцитів ($4,0 \pm 1,1$ у.о.) у порівнянні з групою ПВЛ ($1,9 \pm 0,4$ у.о.), але не сягало контрольного значення ($5,9 \pm 1,1$ у.о.) (Рис. 3.21).

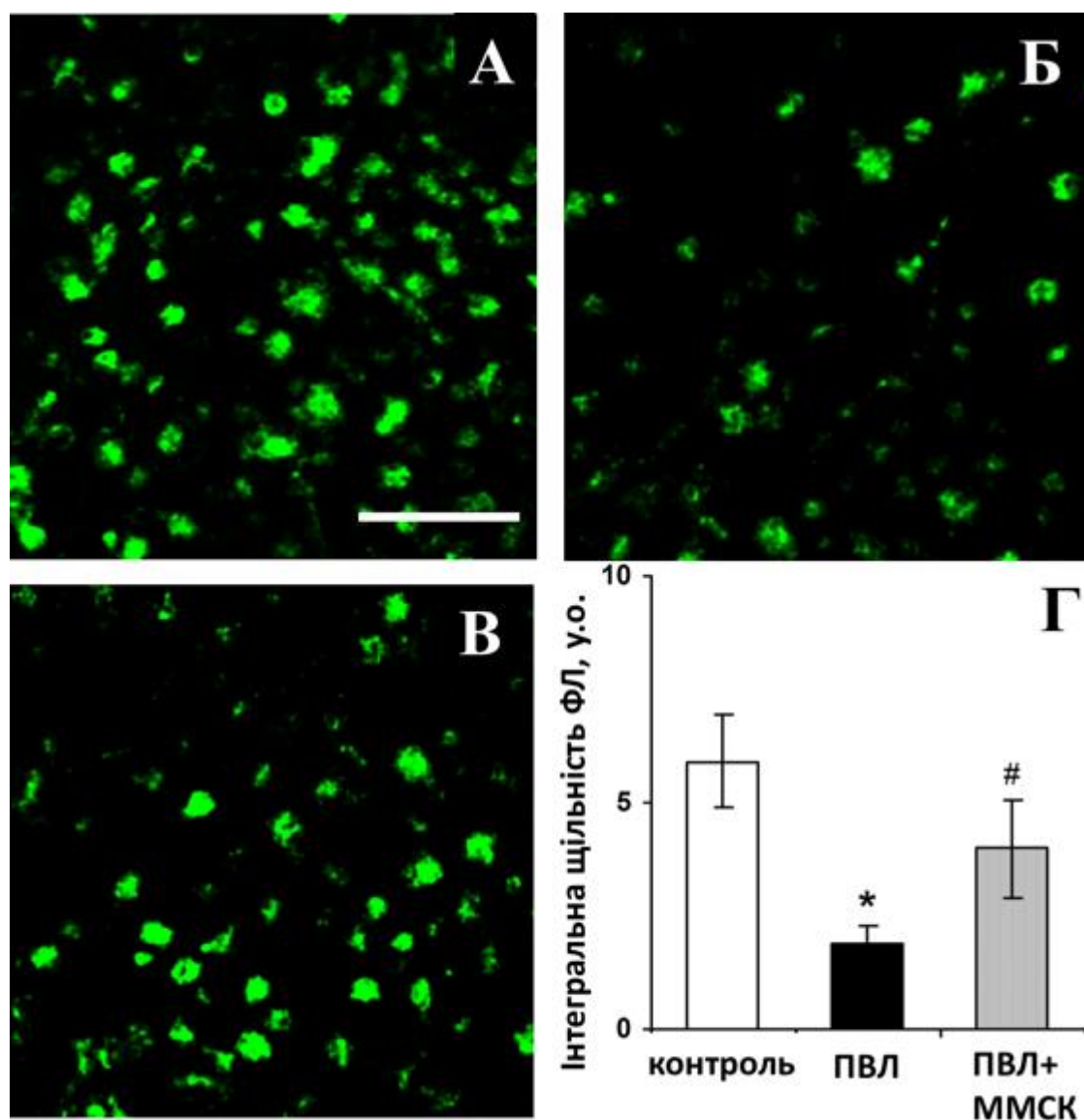


Рис. 3.21. Імуногістохімічний аналіз олігодендроцитів (маркер – Rip-1) в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після моделювання

*перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) (Б) та після ПВЛ за умов безконтактного співкультивування з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК) (В). Г – гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) Rip-1-імунопозитивних олігодендроцитів; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$). Шкала = 500 мкм.*

Імуногістохімічний аналіз органотипової культури зрізів мозку продемонстрував збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції в порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.22).

Інтегральна щільність флуоресценції GFAP-позитивного сигналу через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції збільшилася до $15,8 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контрольною групою ($5,8 \pm 0,7$ у.о.) (Рис. 3.22).

Було продемонстровано, що через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції та безконтактного співкультивування зрізів мозку з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами спостерігалось зменшення GFAP-імунопозитивного сигналу порівняно з групою перивентрикулярної лейкомаляції і становило $9,2 \pm 0,8$ у.о. (Рис. 3.22).

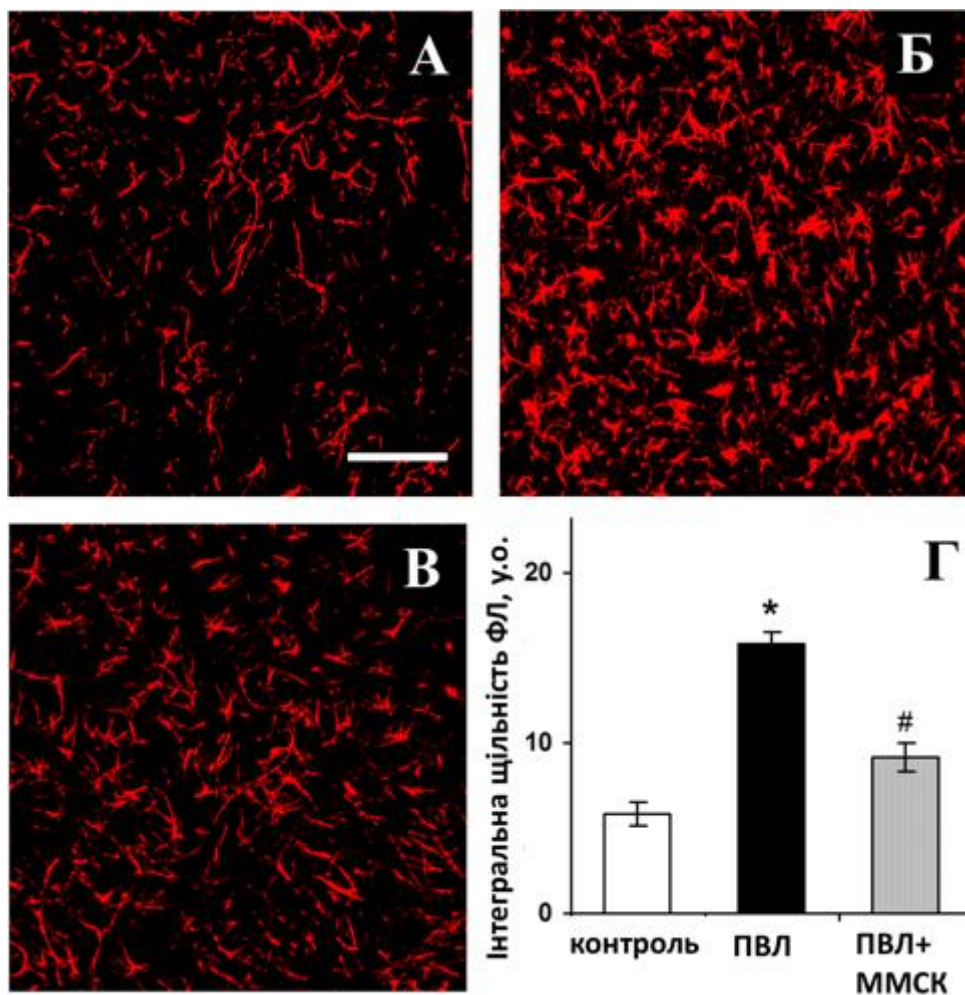


Рис. 3.22. Імуногістохімічний аналіз астроцитів (маркер – GFAP) в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) (Б) та після ПВЛ за умов безконтактного співкультивування з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК) (В). Г – гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) GFAP-імунопозитивних астроцитів; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$). Шкала = 500 мкм.

Імуногістохімічний аналіз зрізів мозку на наявність маркера мікроглії Іба-1, показав, що після моделювання перивентрикулярної

лейкомаляції відбувалося також збільшення інтенсивності забарвлення Iba-1-позитивних мікрогліальних клітин (Рис. 3.23).

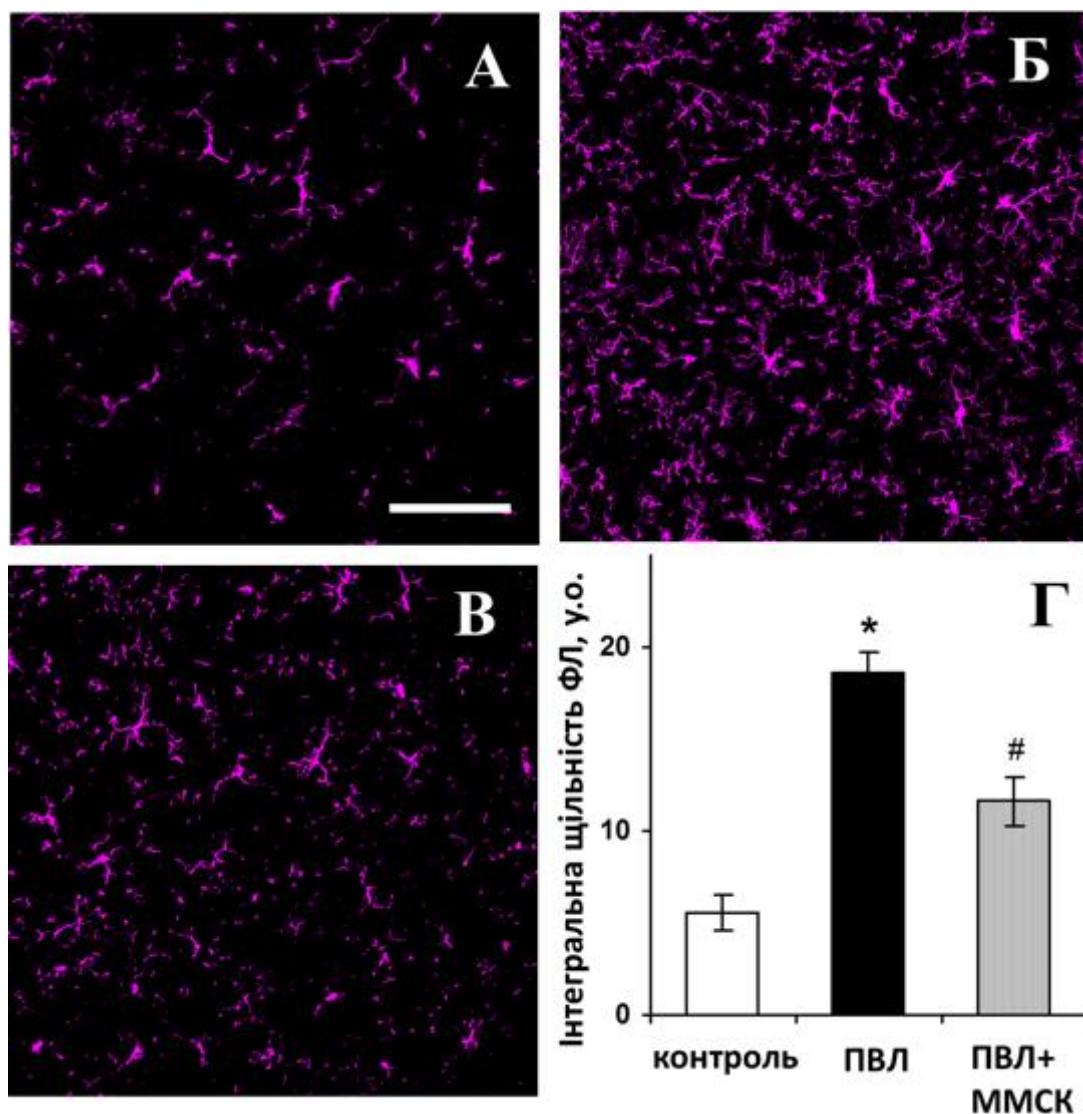


Рис. 3.23. Імуногістохімічний аналіз мікроглії (маркер – Iba-1) в органотиповій культурі зрізів головного мозку миші за контрольних умов (А), через 24 год після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) (Б) та після ПВЛ за умов безконтактного співкультивування з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами (ММСК) (В). Г – гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) Iba-1-

імунопозитивних мікрогліальних клітин; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$). Шкала = 500 мкм.

Інтегральна щільність флуоресценції Іба-1-позитивних мікрогліальних клітин у групі перивентрикулярної лейкомаляції збільшилася до $18,6 \pm 0,7$ у.о. порівняно із контролем – $5,5 \pm 0,9$ у.о. (Рис. 3.23).

Імуногістохімічний аналіз показав, що через 48 годин після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції та безконтактного співкультивування зрізів мозку з мультипотентними мезенхімальними стромальними клітинами спостерігалось зменшення Іба-1-імунопозитивного сигналу порівняно з групою перивентрикулярної лейкомаляції і становило $11,6 \pm 1,3$ у.о. (Рис. 3.23).

Отже, ми показали, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку мають нейропротекторний вплив на нервову тканину після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro*, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Рір-1-імунопозитивних олігодендроцитів.

Це може свідчити про те, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини реалізують свої нейропротекторні властивості паракринно завдяки секреції різноманітних факторів.

Основні результати розділу 3 опубліковані у таких статтях:

1. Tsupukov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant*. 2015;3(1):68–73.
2. Tsupukov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Butenko GM, Skibo GG. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant*. 2016;4(2):188–193.
3. Tsupukov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech*. 2016;79(6):557–64.
4. Tsupukov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. *Cell Organ Transplant*. 2017;5(1):28–32.
5. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. *ScienceRise. Medical Science*. 2017;14(6):32–6.
6. Tsupukov O, Lushnikova I, Ustymenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at

their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia. *Фізіол журн.* 2017;63(5):3–12.

7. Kyryk VM, Kuchuk OV, Mamchur AA, Ustyomenko AM, Lutsenko TM, Tsuprykov OM, Yatsenko KV, Skibo GG, Bilko DI, Bilko NM. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. *Cell Organ Transplant.* 2018;6(2):195–201.
8. Yatsenko K., Lushnikova L., Ustyomenko A, Patseva M, Govbakh I., Kyryk V, & Tsuprykov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. *J Pers Med.* 2020;10(2):66.

РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ НА *IN VITRO* МОДЕЛІ ОРГАНІЧНОГО УРАЖЕННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Досі ведеться пошук немедикаментозних методів корекції ушкоджених функцій ЦНС, які дозволили б підвищити ефективність терапії шляхом стимуляції природних механізмів саногенезу, легко комбінувалися б з іншими, традиційно застосовуваними методиками й не спричиняли небажаних наслідків.

Перспективним напрямком корекції функціонального стану ЦНС при органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку.

Тому, проаналізувавши клітинні механізми розвитку органічного ураження головного мозку, ми вирішили в нашій подальшій роботі дослідити нейропротекторну дію мікрополяризації на *in vitro* моделі запального процесу, як одного з патогенетичних факторів органічного ураження головного мозку.

4.1. Дія мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*

Об'єктом нашого дослідження у подальших дослідженнях була культура дисоційованих клітини гіпокампа, які на момент проведення експерименту (9-12 доба) відновлювали свій стан та формували нейронні мережі, зберігаючи нативну структуру та життєздатність.

Перевагами дисоційованої культури нервових клітин є можливість спостереження за змінами морфологічних і функціональних характеристик саме у нервових клітинах при безпосередній дії мікрополяризації.

Такі властивості дисоційованої культури особливо цінні для вивчення механізмів дії тих чи інших чинників та виявлення їх нейропротекторного потенціалу.

Відомо, що при багатьох патологіях ЦНС виникають запальні процеси, які згодом призводять до розвитку різних неврологічних захворювань.

В експериментах ми моделювали нейрозапальний процес, використовуючи ендотоксин ліпополісахарид (ЛПС), який додавали у культуральне середовище у трьох концентраціях (0.1, 1, 10 мкг/мл), для виявлення оптимальної дози-ефекту.

За даними лактатдегідрогеназного тесту, який виявляє ступінь життєздатності культивованих клітин, показано, що всі використані концентрації ліпополісахаридів мали односпрямований дозозалежний негативний вплив на культивовані клітини гіпокампа.

Цитозольний фермент лактатдегідрогеназа вивільняється у культуральне середовище при пошкодженні клітинної мембрани. Інтенсивність забарвлення позаклітинного середовища в результаті лактатдегідрогеназного тесту прямо пропорційна кількості ферменту лактатдегідрогенази та обернено пропорційна життєздатності клітин у культурі [67].

В умовах дослідження клітинних культур гіпокампа виявлено, що найбільш вираженим та достовірним ЛПС-ефект на життєздатність нервових клітин був у концентрації 10 мкг/мл (**Рис. 4.1**).

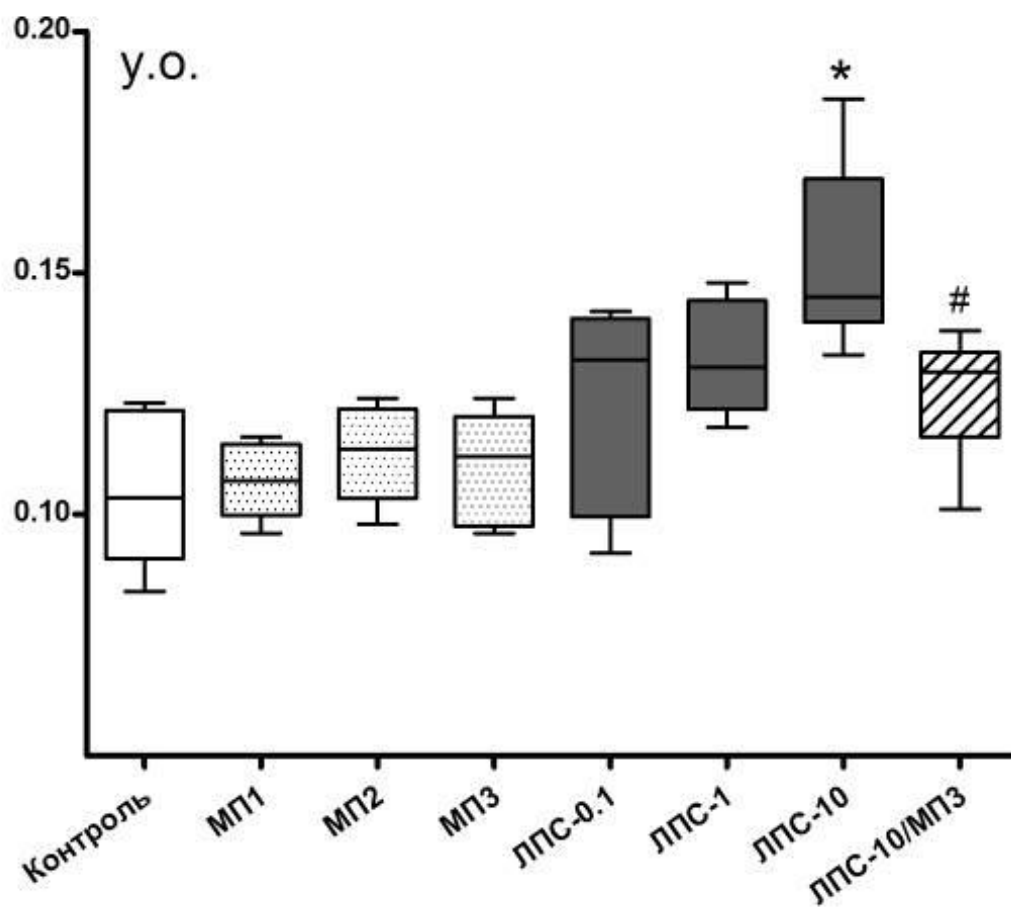


Рис. 4.1. Відносна кількість ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі клітинних культур гіпокампа через 24 год після проведення мікрополяризації у 3-х варіантах режимів (МП1, МП2, МП3), додавання ліпополісахаридів (ЛПС) у 3-х варіантах концентрацій та спільної дії ЛПС-10 та мікрополяризації в режимі МП3. Статистично достовірні відмінності: * – порівняно з контролем, # - порівняно з ЛПС-10 ($P < 0,05$).

Спектрофотометричний аналіз показав, що через 24 години після додавання ліпополісахариду (у концентрації 10 мкг/мл) в

культуральне середовище відносна кількість лактатдегідрогенази збільшувалася і становила $0,153 \pm 0,01$ у.о. порівняно із контролем – $0,105 \pm 0,01$ у.о., що свідчить про суттєве ушкодження клітин гіпокампа.

У концентраціях ліпополісахариду 0,1 і 1 мкг/мл ушкодження культивованих клітин гіпокампа проявлялося в меншій мірі.

Для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури, нами був розроблений спеціальний пристрій (**Рис. 2.1А**).

З метою оптимізації умов використання мікрополяризації в експериментах *in vitro*, нами були застосовані три режими, порівняні з тими, що використовуються з терапевтичною метою, зокрема, при силі струму 0,25 мА варіювали часом впливу:

МП1 – 3-разово 30 хв з інтервалом 1 год,

МП2 – 6-разово 40 хв з інтервалом 1 год,

МП3 – безперервно протягом 4 годин.

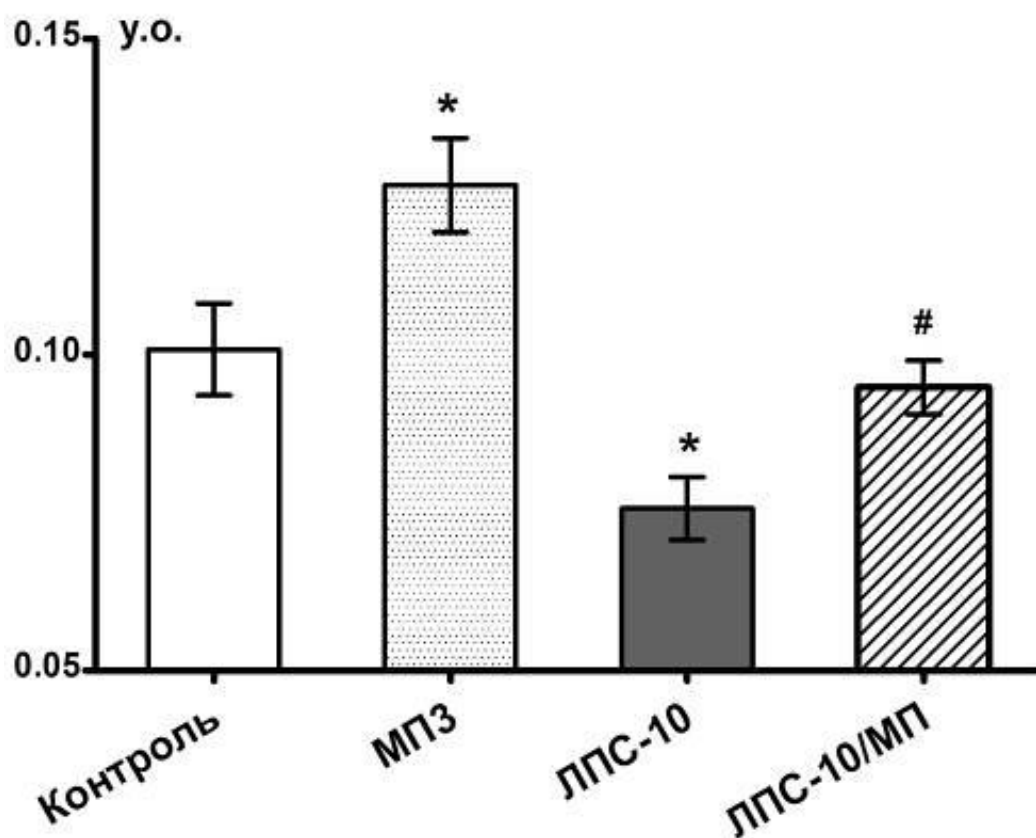
Мікрополяризація за нормальних умов не впливала на життєздатність культур в усіх використаних варіантах (**Рис. 4.1**), але у присутності ліпополісахаридів, спостерігалось достовірне зменшення кількості лактатдегідрогенази в культуральному середовищі в середньому на 31 % відносно групи з ліпополісахаридом, що вказує на нейропротекторний ефект мікрополяризації.

Було також досліджено мітохондріальну активність клітин гіпокампа в умовах найбільш виражених ефектів, згідно зі змінами життєздатності (лактатдегідрогеназний тест), а саме, при застосуванні МП3 та ЛПС-10 (у концентрації 10 мкг/мл).

За допомогою MTS-тесту показано, що мікрополяризація

підвищує мітохондріальну активність культивованих нервових клітин, як в нормі, так і при додаванні ліпополісахаридів у культуральне середовище (Рис. 4.2).

Ці дані свідчать як про активуючі, так нейропротекторні властивості мікрополяризації.



*Рис. 4.2. Результати аналізу мітохондріальної активності у культивованих клітинах гіпокампа при дії мікрополяризації у режимі МПЗ, ліпополісахаридів ЛПС-10 (у концентрації 10 мкг/мл) окремо та спільно за допомогою MTS-тесту. Статистично достовірні відмінності: * – порівняно з контролем, # – порівняно з ЛПС-10 ($P < 0,05$).*

Отримані нами дані вказують на здатність мікрополяризації

безпосередньо модулювати функціонування нервових клітин, зокрема активувати їх метаболізм за нормальних умов та підвищувати їх резистентність у присутності ліпополісахаридів.

Отже, використана експериментальна модель імітує події, які відбуваються в умовах запалення нервової тканини. Ліпополісахариди у концентрації 10 мкг/мл призводять до пошкодження культивованих клітин гіпокампа.

Мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та, у певній мірі, запобігає їх ушкодженню під час моделюванні процесу нейрозапалення.

Отримані нами дані розширюють уявлення про нейропротекторні механізми, які задіяні в умовах використання мікрополяризації. Активація клітинного метаболізму підвищує здатність нервових клітин протистояти впливу негативних факторів нейрозапалення.

4.2. Вплив мікрополяризації на нейритогенез при моделюванні запального процесу *in vitro*

З метою дослідження безпосередніх ефектів мікрополяризації на нервові клітини проводили стимуляцію культивованих (короткостроково та довгостроково) клітин гіпокампа слабким постійним електричним струмом за нормальних умов та при моделюванні запального процесу *in vitro* за допомогою ліпополісахариду (ЛПС).

Оцінювали вплив мікрополяризації (0,25 мкВ протягом 4 год) на нейритогенез у ранній період культивування (2-5 доба) та на стан нейронів і глії у довгостроковій культурі (10-12 доба) за

нормальних умов та у присутності ліпополісахариду.

В умовах тривалого (2 тижні) культивування клітини гіпокампа здатні відновлюватися та формувати нейронні мережі, зберігаючи специфічну структуру і життєздатність.

Використана модельна система дає можливість спостерігати за формуванням нейритів після дисоціації клітин гіпокампа та оцінити безпосередній вплив на цей процес мікрополяризації.

Показано, що в ранні терміни культивування дисоційованих клітин гіпокампа (2-5 доба), коли починається формування новоутворених нейритів, мікрополяризація суттєво підвищувала ефективність цього процесу (Рис. 4.3).

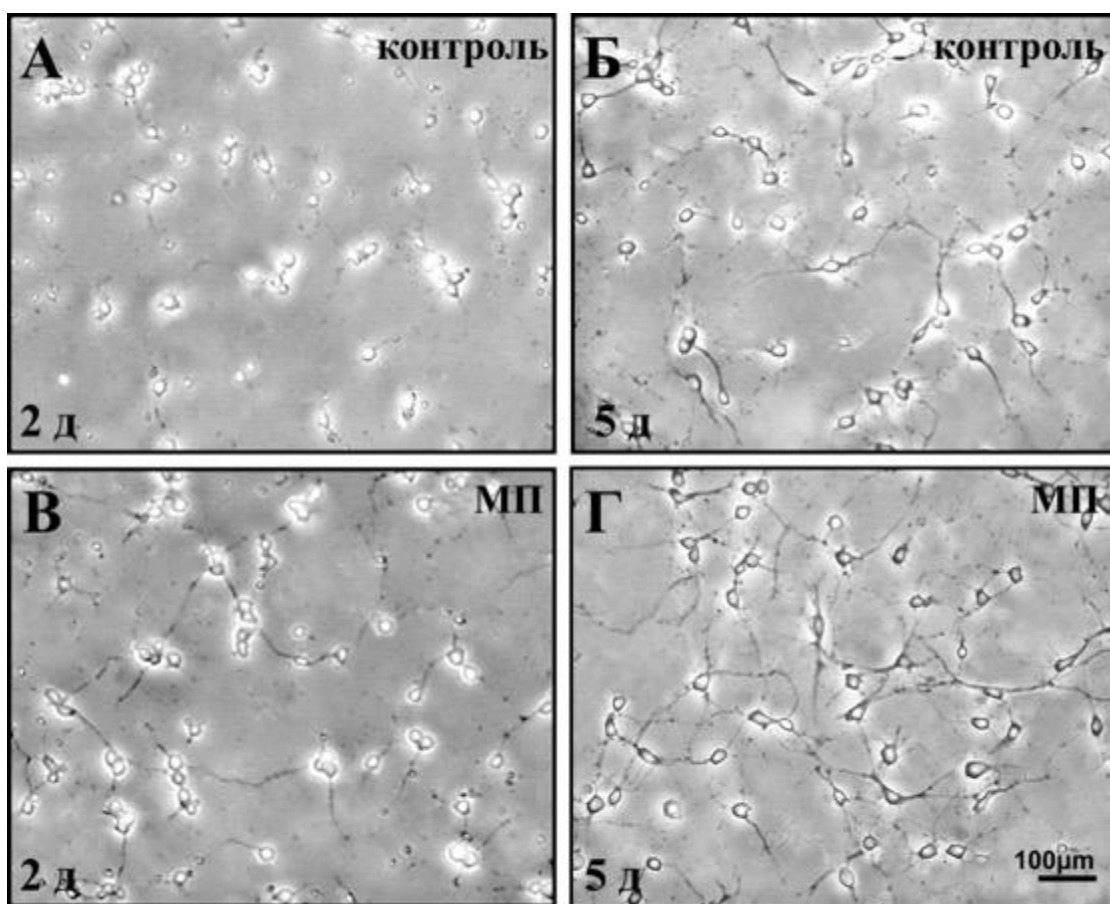


Рис. 4.3. Морфологічний аналіз ефективності формування нейритів у короткостроковій культурі дисоційованих клітинах

гіпокампа. Ілюстрація змін нейритогенезу в період 2 (А) і 5 (Б) доби за нормальних умов та 2 (В) і 5(Г) доби після дії мікрополяризації (МП). Шкала = 100 мкм.

На Рис. 4.3А,Б представлені фото, що ілюструють динаміку утворення відростків у цей період за нормальних умов в культурі та (Рис. 4.3В,Г) – після впливу мікрополяризації, відповідно.

В експериментах моделювали нейрозапальний процес, використовуючи ендотоксин ліпополісахарид (ЛПС), який додавали у культуральне середовище перед сесією мікрополяризації.

На Рис. 4.4 представлені результати кількісної оцінки динаміки нейритогенезу в короткостроковій культурі клітин гіпокампа за нормальних умов та при дії мікрополяризації та ЛПС окремо і спільно.

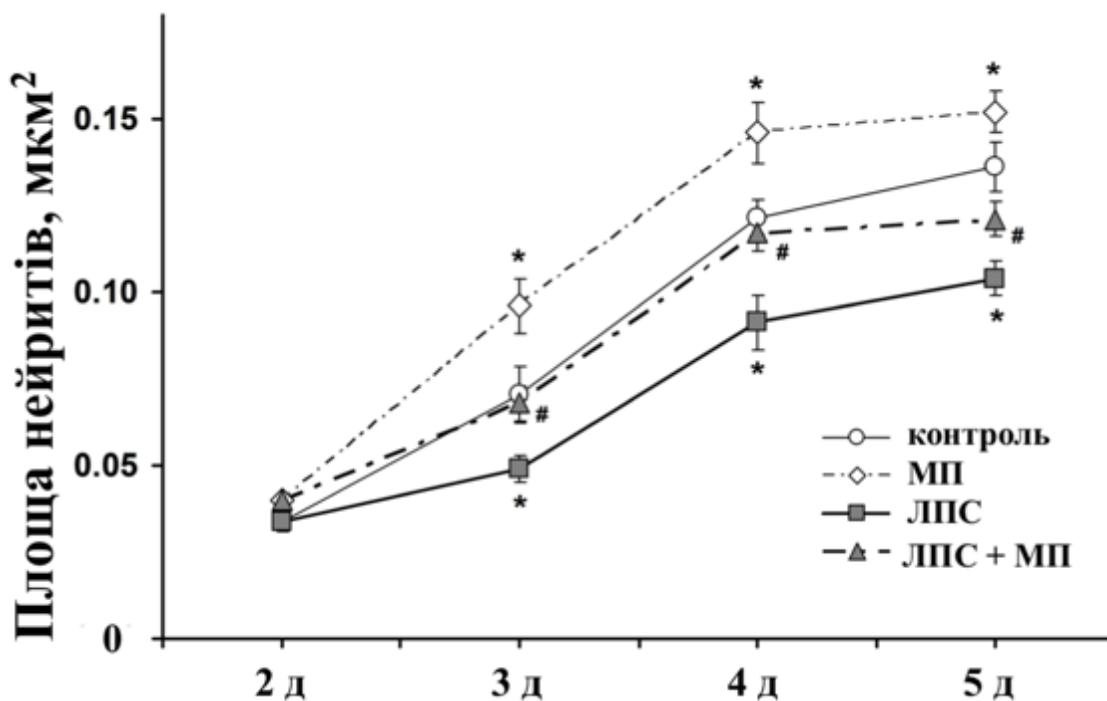


Рис. 4.4. Графічне зображення динаміки нейритогенезу при дії мікрополяризації (МП) і ліпополісахаридів (ЛПС) окремо та

спільно (ЛПС+МП). Статистично значима різниця: * – щодо контролю, # – щодо ЛПС; $n=40$ для кожної з 4-х груп культур; $P < 0,05$.

Виявлено, що присутність ліпополісахаридів у культуральному середовищі суттєво уповільнює нейритогенез, тоді як мікрополяризація прискорює утворення відростків за нормальних умов і на фоні ліпополісахаридів.

Аналогічні дослідження були проведені на довгостроковій (10-12 добовій) культурі клітин гіпокампа, в якій відростки були добре розвинені та мали виражені контури (Рис. 4.5).

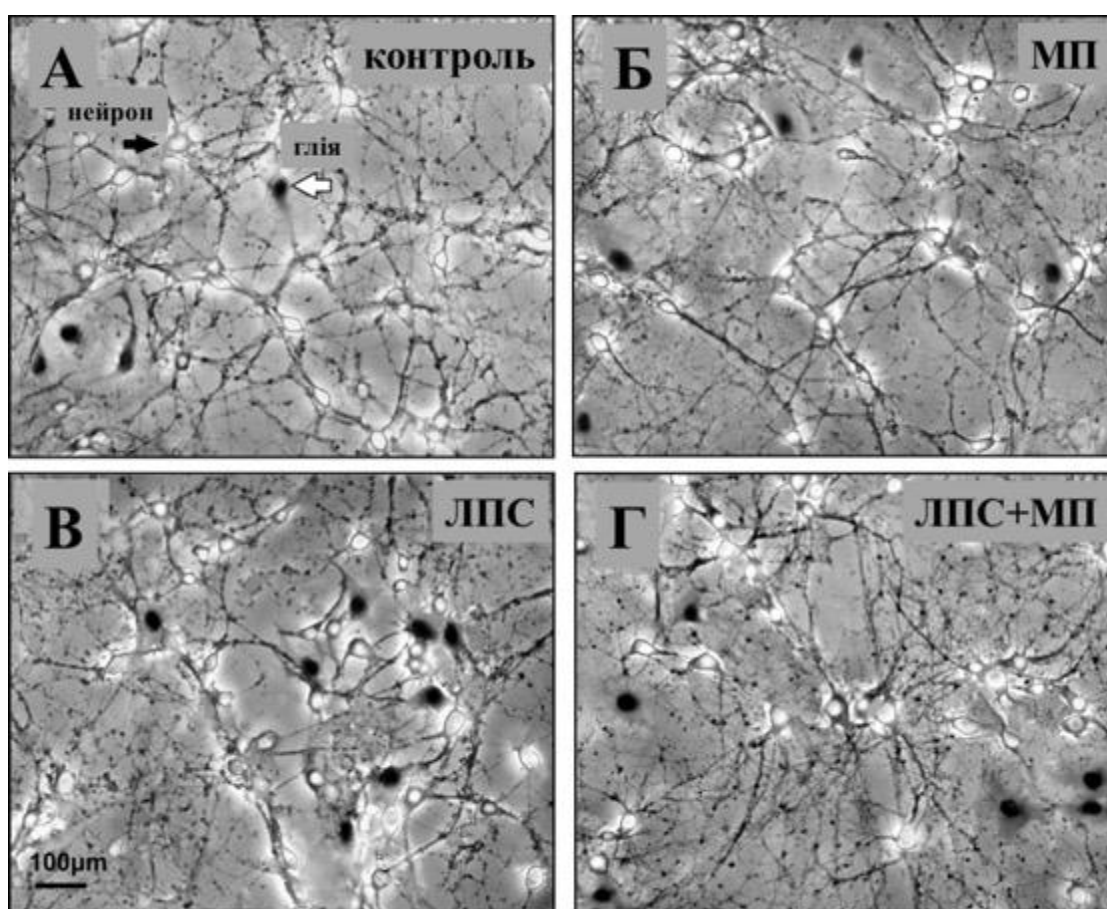


Рис. 4.5. Морфологічний аналіз стану нейритів та гліальних клітин у довгостроковій культурі. Ілюстрація змін

нейритогенезу на 12 добу культивування за нормальних умов (А) та при дії мікрополяризації (МП) (Б) і ліпополісахаридів (ЛПС) (В) окремо і спільно з МП (Г). На фото (А) відмічено сому нейрону (1 – чорна стрілка) та гліальної клітини (2 – біла стрілка). Шкала = 100 мкм.

Соми нейронів та їх нейритні мережі були об'ємними, добре заломлювали світло і у полі зору фазово-контрастного мікроскопу візуалізувалися як яскраво-виражені об'єкти (Рис. 4.5А, чорна стрілка).

У культурі також наявні гліальні клітини, які, на відміну від нейронів, мали сплюснену форму, слабо заломлювали світло і візуалізувалися як темні та тусклі (Рис. 4.5А, біла стрілка). За цими ознаками нейрони і гліальні клітини могли бути морфологічно диференційовані.

Прижиттєві спостереження і подальший морфометричний аналіз показав, що на 12 добу культури виявляють ознаки стабільності та стійкості, що стосується кількості клітин та їх цитоархітектоніки (Рис. 4.6Б).

У довгостроковій культурі не було виявлено суттєвих змін нейритогенезу при дії мікрополяризації. Ліпополісахариди в певній мірі знижували вираженість нейритів, призводили до виникнення нерівномірності у розташуванні відростків та виникненню незаповнених відростками місць (Рис. 4.5В).

Мікрополяризація проявляла певні тенденції до стабілізації стану нейритів у присутності ліпополісахаридів (Рис. 4.5Г, 4.6А).

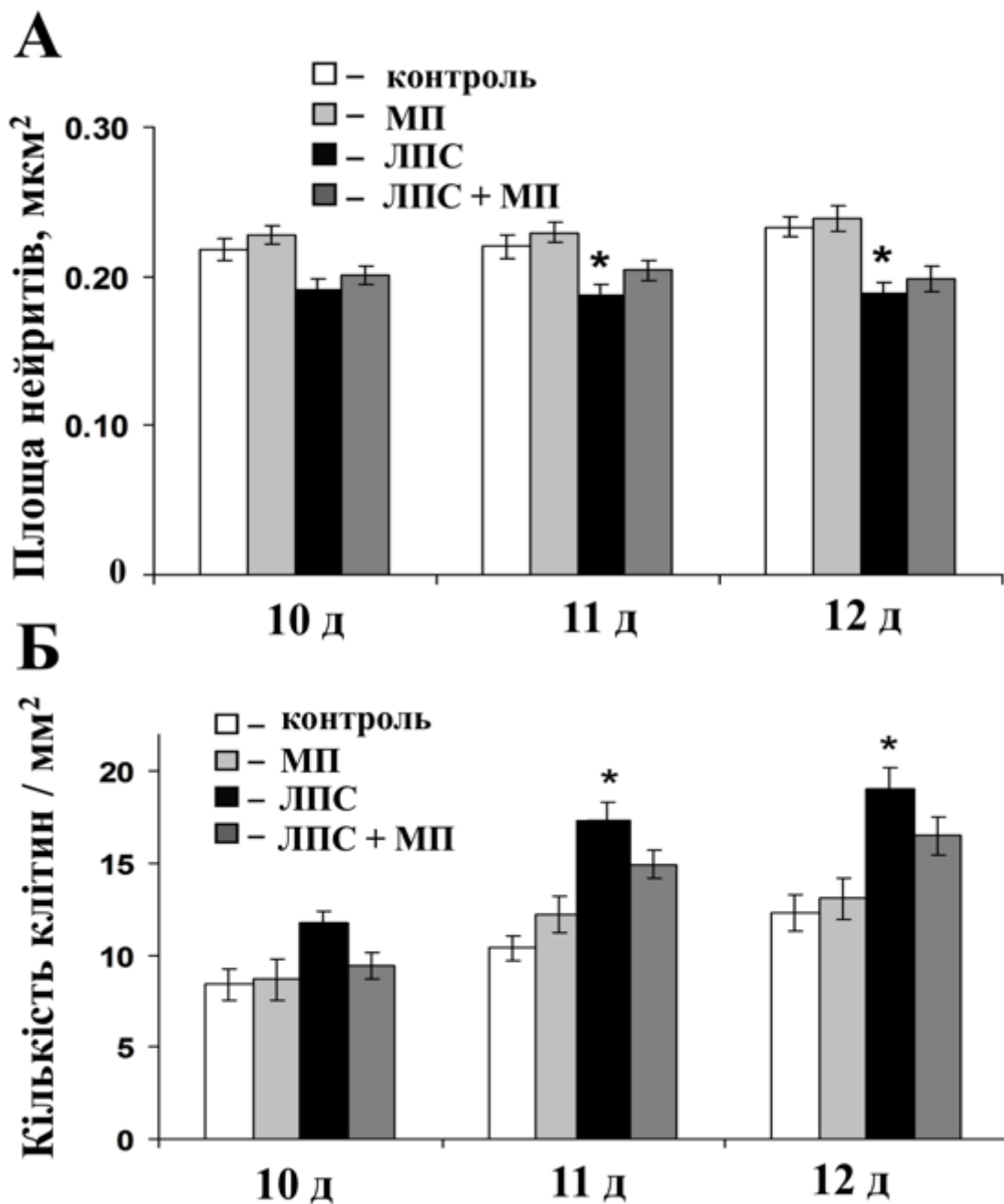


Рис. 4.6. (А) Гістограма змін площі нейритів. (Б) Гістограма змін кількості гліальних клітин. Статистично значуща різниця: * – щодо контролю, # – щодо дії ліпополісахаридів (ЛПС); $n=40$ для кожної з 4-х груп культур; $P < 0,05$.

Хотілося б відмітити цікаві особливості архітектури

нейромереж 12-добової культури клітин гіпокампа у варіанті впливу ліпополісахаридів та мікрополяризації (**Рис. 4.5Г**).

Візуалізація просторового розподілу нейритів в умовах мікрополяризації виявила ділянки односпрямованого розташування нейрональних відростків, яке було, вочевидь, не випадковим.

Ймовірно, що мікрополяризація в деякій мірі здатна спрямовувати спонтанну клітинну рухомість при виникненні такої потреби, зокрема, при певній розрідженості мережі нейритів після дії ЛПС.

У наших умовах культивування, нейрони не можуть проліферувати, але можуть проявляти рухливість і, ймовірно, мікрополяризація активує процеси відновлення порушених нейромереж у межах дії слабого електричного поля.

У довгостроковій культурі гліальні клітини досить чітко відрізнялися від нейронів, що дало можливість проаналізувати стан гліальних клітин у наших експериментальних умовах, зокрема, оцінити зміни їх кількості.

Показано, що ліпополісахариди викликають активацію цих клітин, що проявлялося у певному збільшенні їх числа (**Рис.4.6Б**).

Мікрополяризація у нормі не впливала на цей показник, але при дії ліпополісахаридів у деякій мірі відбувалася стабілізація стану глії.

Отримані результати підтверджують нейропротекторні властивості мікрополяризації.

Відомо, що при тривалому культивуванні нейрити відновлюються, крім того, формуються новоутворені синаптичні контакти.

З використанням двофотонної конфокальної мікроскопії у

попередніх дослідженнях були оцінені особливості морфофункціональних змін синапсів в аналогічних до наших умов культивування [276].

У нашій роботі, використання фазово-контрасного мікроскопу при збільшенні $\times 200$ уможливило, з певною ймовірністю, оцінку синаптоподібних структур, які візуалізувалися як чітко виражені темні точки на фоні виражених нейритів та видимих перетинів відростків (Рис. 4.7).

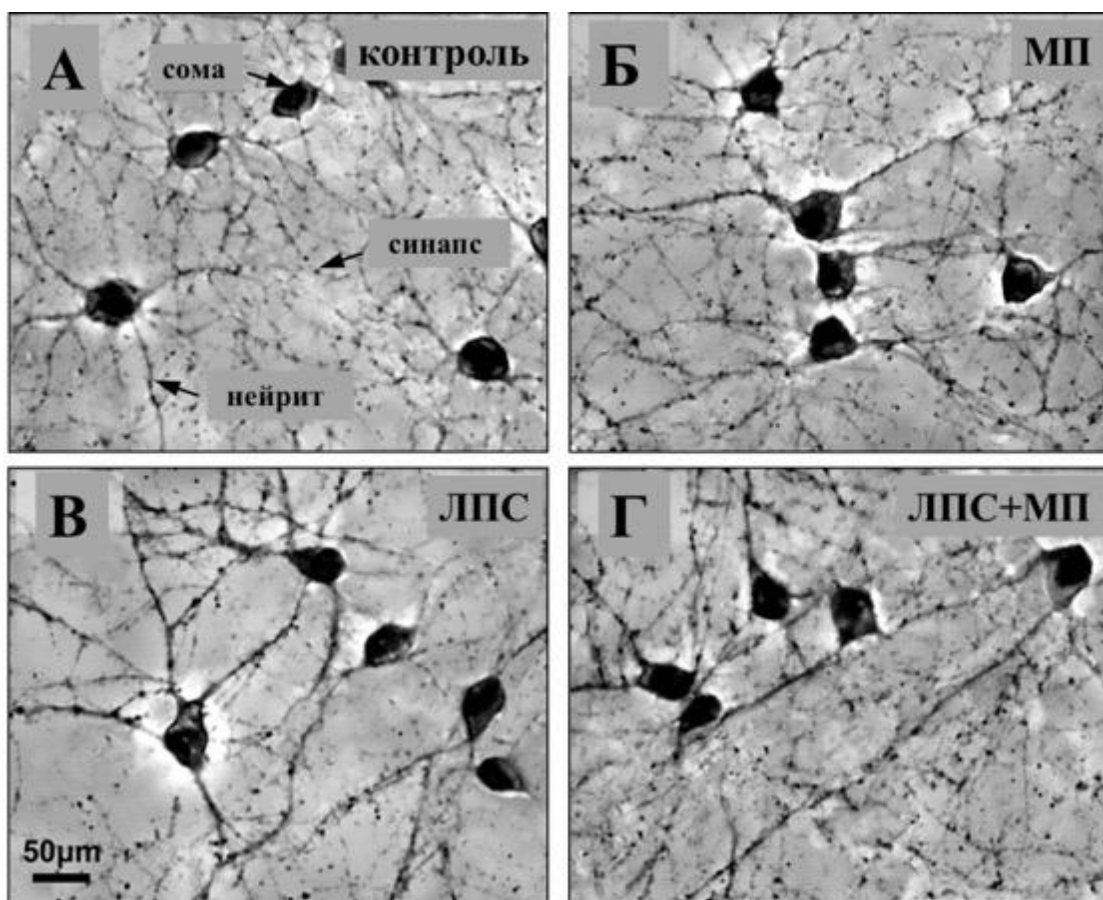


Рис. 4.7. Морфологічний аналіз синаптоподібних структур у довгостроковій (12 діб) культурі дисоційованих клітин гіпокампа. Ілюстрація вираженості синапсів за нормальних умов (А) та при дії мікрополяризації (Б) і ліпополісахаридів (ЛПС) (В) окремо і спільно

(Г). На фото А відмічено сому нейрону, нейрит та синаптоподібну структуру. Шкала = 50 мкм.

Виявлено, що дія ліпополісахаридів зменшувала щільність як нейритів, так і синапсів (Рис. 4.8).

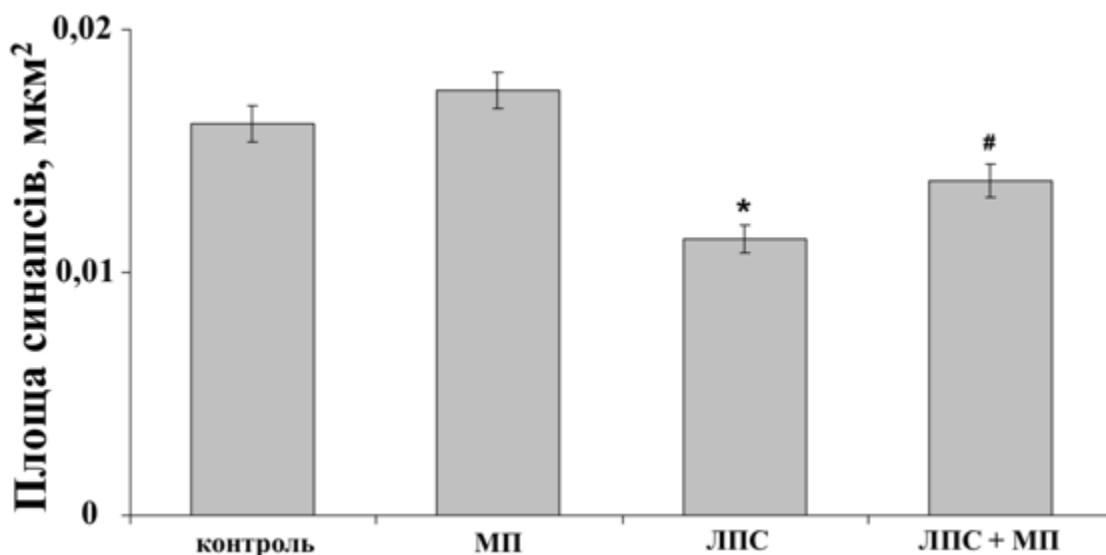


Рис. 4.8. Гістограма змін площі синапсів. МП - мікрополяризація, ЛПС - ліпополісахариди, ЛПС+МП - спільна дія ліпополісахаридів та мікрополяризації. Статистично значуща різниця: * – щодо контролю, # – щодо дії ліпополісахаридів (ЛПС); $n=50$ для кожної з 4-х груп культур; $P < 0,05$.

Мікрополяризація у значній мірі сприяла стабілізації їх стану. Щільність синаптоподібних структур була статистично більшою, у порівнянні з дією ліпополісахаридів.

За нормальних умов мікрополяризація суттєво не впливала на ці структури.

Отже, використана модель короткострокової культури дисоційованих клітин гіпокампа виявила здатність мікрополяризації впливати безпосередньо на нейритогенез та стабілізувати стан нервових клітин.

У початковий період культивування, мікрополяризація значно підвищує ефективність формування нервових відростків, у тому числі в присутності фактору запалення – ліпополісахаридів.

В умовах довгострокової культури, коли нейромережі добре розвинені, вплив мікрополяризації на нейритогенез менш виражений, але стабілізуючий ефект мікрополяризації, також проявляється в присутності ліпополісахаридів.

Отримані нами дані розширюють уявлення про нейропротекторні механізми, які задіяні під час дії мікрополяризації на нервову тканину.

Активация нейритогенезу може підвищити здатність нервових клітин до відновлення під час дії негативних факторів, зокрема, нейрозапалення.

Усе це вказує на широкі перспективи використання мікрополяризації як ефективного терапевтичного засобу при органічних ураженнях головного мозку.

Основні результати **розділу 4** опубліковані в таких статтях:

1. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Дослідження впливу мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*. Укр неврол жур. 2018;47(2):69–73.

2. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Ефекти слабого постійного електричного струму на нейритогенез у модельних експериментах *in vitro*. Фізіол журн. 2019;65(4):41–49.

РОЗДІЛ 5. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ З ДИТЯЧИМ ЦЕРЕБРАЛЬНИМ ПАРАЛІЧЕМ

У попередніх *in vivo* та *in vitro* експериментах ми досліджували патогенетичні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та продемонстрували позитивний вплив мікрополяризації на нервову тканину при моделюванні цієї патології.

Перивентрикулярна лейкомаляція є однією з причин прогресуючого зростання частоти органічних ураженнях головного мозку, до наслідків яких належать дитячий церебральний параліч (ДЦП), симптоматична епілепсія та перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія.

Тому цікаво було дослідити вплив комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації на морфо-функціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку.

Дитячий церебральний параліч є однією з найбільш актуальних проблем сучасної педіатрії та неврології і однією з найчастіших причин дитячої інвалідності.

Поширення дитячого церебрального паралічу в Європі становить від 2 до 3 на 1000 живих новонароджених, в Україні – 2,56 на 1000 [13, 153].

Попри велику кількість різноманітних методів лікування дітей з ДЦП, досі тривають пошуки медичних технологій для більш ефективного надання допомоги дітям, хворим на церебральний параліч [10].

Особливий інтерес для лікування різних неврологічних розладів викликає така терапевтична технологія, як мікрополяризація [314].

Мікрополяризація – це неінвазивний і безпечний лікувальний метод, що дозволяє змінювати функціональний стан різних ланок ЦНС під дією малого постійного струму (до 1 мА) [145, 167, 290].

Силу постійного струму, що використовується під час мікрополяризації, можна порівняти з біопотенціалами нейронів, що дозволяє застосовувати цей метод навіть у малюків [17]. Спрямованість впливу мікрополяризації досягається завдяки використанню малих площ (100-600 мм²) електродів.

Мікрополяризація може бути використана як окремий терапевтичний метод, так і в поєднанні зі стандартною фізіотерапією для корегування збудливості кори головного мозку і покращення рухової активності у пацієнтів із різними неврологічними розладами, зокрема при дитячому церебральному паралічу [101].

Було показано, що транскраніальна мікрополяризація (ТМП) інтенсивністю 1 мА не спричиняє патологічних осциляцій і епілептиформної активності у дітей, і, отже, може бути використана як метод лікування в педіатричній практиці [193].

5.1. Вплив транскраніальної мікрополяризації на електроенцефалографічні показники пацієнтів з дитячим церебральним паралічем

Не зважаючи на появу нових методів реєстрації, ідентифікації та відображення біоелектричних потенціалів головного мозку, електроенцефалографія (ЕЕГ) залишається одним із основних та інформативних методів об'єктивної оцінки функціонального стану центральної нервової системи, особливо в пацієнтів дитячого віку

[219].

Електроенцефалографія відображає не тільки функціональний стан кори великих півкуль, а й складні корково-підкіркові взаємозв'язки [1].

Цей метод рекомендований Міжнародною та Американською асоціаціями нейрофізіологів для клінічного використання у хворих на дитячий церебральний параліч [10].

На електроенцефалограмах пацієнтів із церебральним паралічем оптимальне співвідношення активуючих і гальмівних впливів порушено завдяки гіперактивації підкіркових мозкових структур і зниженню гальмівного впливу на них кори великих півкуль [16].

Відомо, що на картину електроенцефалограми та її спектри основний вплив має аферентна активність, що пов'язана з різного роду сенсорними впливами, переважно з руховою діяльністю [240].

Можна припустити, що у хворих на дитячий церебральний параліч у рисунку біоелектричної активності в першу чергу відбивається фонові аферентація, яка обумовлена патологічним руховим стереотипом.

Тому метою дослідження було визначення за допомогою електроенцефалографії терапевтичної ефективності додавання методу мікрополяризації у комплекс лікувально-профілактичних засобів дітям хворим на церебральний параліч.

Для оцінки ефективності проведеної комплексної терапії із курсом транскраніальної мікрополяризації (ТМП) використовували дані електроенцефалографічного дослідження.

Електроенцефалограми оцінювали відповідно до класифікації Е. А. Жирмунської [1] з огляду на тенденції формування

варіантів електроенцефалограми в дитячому віці [9].

За формалізованою оцінкою реєстрували такі варіанти біоелектричної активності головного мозку пацієнтів з дитячим церебральним паралічем:

- організований,
- дезорганізований з альфа-ритмом,
- дезорганізований без альфа-ритму,
- десинхронний,
- гіперсинхронний,
- епілептична активність,
- міжпівкульова асиметрія.

Загальна електроенцефалограма оцінювалась за рівнем структурної дезорганізації, міжпівкульової асиметрії і пароксизмальної активності.

При візуальному аналізі електроенцефалограми визначали стан альфа-ритму (домінантність, стабільність, асиметрія, реактивність, зональність, модуляторність, поліморфність), частоту і амплітуду альфа- і центрального ритмів, виразність повільнохвильової і бета-активності.

Визначався також стан синхронізації повільнохвильової активності в фоновій електроенцефалогамі й при функціональних пробах.

За допомогою спектрального аналізу визначалась щільна потужність основних частотних діапазонів спектру електроенцефалограми (дельта-, тета-, альфа-, бета-ритмів).

Спектральний аналіз альфа-активності в потиличних і центральних відведеннях важливий у динамічному спостереженні за сенсорнозалежними складовими альфа-діапазону вікової

електроенцефалограми (альфа- і мю-ритмів) [15].

Аналіз електроенцефалограм пацієнтів із дитячим церебральним паралічем до лікування свідчив про порушення біоелектричної активності мозку різного ступеня виразності.

У результаті проведеного електроенцефалографічного дослідження були отримані дані, що представлені в **Табл. 5.1**.

Таблиця 5.1

Динаміка розподілу патернів електроенцефалограми (ЕЕГ) у пацієнтів із дитячим церебральним паралічем (ДЦП) обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Патерни ЕЕГ	Група порівняння (12 пацієнтів)			Основна група (21 пацієнт)		
	До лікування, кількість дітей	Після лікування, кількість дітей, «+» означає кількість дітей з позитивною динамікою		До лікування, кількість дітей	Після лікування, кількість дітей, «+» означає кількість дітей з позитивною динамікою	
Організований	-	-	-	-	-	-
Дезорганізований з альфа-ритмом	5/12	5/12 (+2/5)	40,0 %	9/21	9/21 (+6/9)	66,7 %
Дезорганізований без альфа-ритму	2/12	2/12	-	5/21	5/21 (+3/5)	60,0 %
Десинхронний	2/12	2/12	-	4/21	4/12 (+1/4)	25,0 %

Гіперсинхронний	3/12	3/12 (+1/3)	33,3 %	3/21	3/21 (+3/3)	100 %
Епілептична активність	2/12	2/12	-	7/21	7/21	-
Міжпівкульова асиметрія	6/12	6/12	-	12/21	12/21 (+3/12)	25,0 %
Всього пацієнтів із позитивною динамікою		+3/12	25,0 %		+16/21	76,2 %

У межах загальної картини формування вікових патернів електроенцефалограми спостерігалась спрямована позитивна динаміка фонові біоелектричної активності мозку у 76,2 % пацієнтів основної групи, порівняно із 25,0 % дітей у групі порівняння (Табл. 5.1).

Загальні зміни стосувались стабілізації вікових прекурсорів центрального і альфа-ритмів і мали тенденції до зменшення структурної дезорганізації і дифузного сповільнення електроенцефалограми при відсутності збільшення пароксизмальної активності та міжпівкульової асиметрії.

Найбільш значима динаміка спостерігалась у групі дітей з дезорганізацією електроенцефалограми і збереженому альфа-ритмі (у 66,7% пацієнтів основної групи, порівняно із 40,0% дітей у групі порівняння): основним критерієм було підсилення амплітуди і спектральної потужності альфа-ритму і реактивності під час відкривання очей, реакції засвоєння фотостимуляції, підсилення зональної предомінатності і модуляторності альфа-ритму (Табл. 5.1).

Позитивна динаміка спостерігалась у дітей з дезорганізацією електроенцефалограми без альфа-ритму після проведеного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації (у 60,0% пацієнтів основної групи).

Зміни патерну вираженої дезорганізації електроенцефалограми з редукцією альфа і центрального ритмів мали тенденції зменшення потужності повільносколових у потиличних і скроневиx ділянках, підсилення синхронізації і потужності тета-діапазону в центрально-тім'яно-потиличній ділянці.

Мало місце зменшення загостреної дизритмії в лобно-центральных і скроневиx відділах.

Десинхронний варіант електроенцефалограми з дифузним сповільненням переважно низькоамплітудної активності був мало змінний (25% у дітей основної групи).

Спостерігались також тенденції до підсилення тета-діапазону в центральних відділах, фрагментарне підсилення альфа-активності в центральних і потиличних відділах пацієнта (**Табл. 5.1**).

У пацієнтів групи порівняння не спостерігали позитивних змін біоелектричної активності головного мозку з десинхронним варіантом електроенцефалограми.

Також виражена позитивна динаміка спостерігалась після проведеного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації у дітей із гіперсинхронним патерном електроенцефалограми (100%, порівняно із 33,3% дітей у групі порівняння) (**Табл. 5.1**).

Динаміка стабілізації альфа-ритму пов'язана з формуванням центрального ритму, зменшенням потужності дифузної синхронізації і повільної активності в лобно-скроневиx відділах.

Під час аналізу електроенцефалограми також оцінювали виразність змін:

- легкі (з ізольованими або регіональними змінами основних прекурсорів ритмічної ЕЕГ альфа- і «центрального» ритму);
- помірні (з частотно-просторовою дезорганізацією ЕЕГ, пароксизмальної активності і ознаками нейрофізіологічної незрілості);
- виражені (частотною перебудовою структури ЕЕГ з дифузним і регіональним сповільненням, патологічними феноменами, ознаками вираженої затримки електрогенезу).

Аналіз даних електроенцефалографічного обстеження в дітей основної групи з легкими дифузними змінами зі збереженням структурно-просторової організації в динаміці показав стабілізацію вікових прекурсорів ритмічної електроенцефалограми, підсилення альфа-ритму, зменшення синхронізації центрального ритму.

У дітей основної групи із помірними дифузними змінами регуляторного характеру з ознаками нейрофізіологічної незрілості (у вигляді підсилення потужності повільно хвильової складової спектру електроенцефалограми, нестабільності і сповільнення альфа-ритму, екзальтації центрального мю-ритму, підсилення спалахової синхронізуючої активності) в динаміці спостерігалось покращення структурної організації і реактивності альфа- і центрального ритмів після комплексного лікування із застосуванням ТМП.

Серед переважаючих загально мозкових змін і локальних акцентів з помірною міжпівкульовою асиметрією і епілептиформною активністю не спостерігалось підсилення вогнищевої патологічної активності, спалахів білатеральної синхронізації у фоновій електроенцефалограмі і при пробах фотостимуляції і гіпервентиляції.

У дітей основної групи з вираженими загально мозковими змінами і нейрофізіологічною незрілістю спостерігалася структурна перебудова вікової електроенцефалограми з домінуванням повільнохвильової активності і редукцією вікових прекурсорів центрального і альфа-ритму, спалахами дифузної синхронізації і локальними пароксизмальними змінами електроенцефалограми.

Пароксизмальна активність характеризувалася білатерально-синхронними спалахами тета-, дельта-хвиль амплітудою більше 120 мкВ (у однієї дитини) і наявністю комплексів гостра і пік-повільна хвиля, білатеральною синхронізацією епіактивності амплітудою вище фону (у 2 дітей).

У динаміці в дітей на фоні комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації на першому етапі спостерігались різнонаправлені зміни, які згодом мали ознаки стабілізації вікових прекурсорів ритмічної активності у формуванні відповідних вікових патернів електроенцефалограми.

У структурі біоелектричної активності головного мозку у дітей основної групи спостерігалася підсилення індексу потужності альфа-ритму (з 7,7 до 12,8) і також підсилення центрального мю-ритму (з 4,5 до 8,9), ймовірно, компенсаторного характеру.

Також у дітей основної групи після проведеного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації знижувалися синхронізуючі впливи серединних структур мозку (зменшувався індекс спалахової активності з 17 до 10,6), тоді як у групі порівняння така позитивна динаміка не спостерігалася.

Результати спектрально-амплітудного математичного перетворення аналогової електроенцефалограми основної групи та групи порівняння (результати Фур'є-аналізу вихідних даних ЕЕГ),

призначених для динамічного спостереження за спектральними потужностями визначених частотних діапазонів (ритмічні складові ЕЕГ), представлені в **Табл. 5.2.**

Таблиця 5.2.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограм пацієнтів із ДЦП обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Група порівняння, n=12	Діапазон, мкВ², (M±m)			
	альфа	бета	дельта	тета
до лікування	43,7±2,1	15,8±1,0	197,3±10,4	171,2±9,5
після лікування	49,3±1,9*	19,1±1,4*	177,1±11,1	148,2±9,7
Δ%	+11,4	+17,3	-10,2	-13,4
Основна група, n=21	альфа	бета	дельта	тета
до лікування	53,1±3,4	14,7±0,9	195,7±7,1	198,2±10,3
після лікування	70,0±2,7*	20,1±0,8*	128,4±7,8*	128,1±7,4*
Δ%	+24,1	+26,9	-34,4	-35,4

У дітей основної групи спектральна щільність потужності (СЩП) альфа-ритму статистично вірогідно збільшилася на 24,1%, тоді як у групі порівняння наростання СЩП альфа-ритму було лише 11,4%.

У пацієнтів обох груп спостереження спостерігалось статистично вірогідне збільшення спектральної щільності потужності бета-діапазону: в основній групі цей показник становив 26,9%, у

групи порівняння - 17,3%.

Повільнохвильова частина спектра електроенцефалограми під впливом проведеного лікування також мала позитивну динаміку у вигляді зменшення потужності.

Після комплексного лікування із використанням мікрополяризації у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем спектральна щільність потужності дельта-ритму на електроенцефалограмі статистично вірогідно знизилась на 34,4%, а СЦП тета-хвиль – на 35,4%.

У пацієнтів групи порівняння не спостерігалася статистично вірогідна динаміка зменшення спектральної щільності потужності цих діапазонів повільнохвильової частини спектра.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограми в пацієнтів з дитячим церебральним паралічем підтверджують більшу терапевтичну ефективність комплексного методу лікування з використанням мікрополяризації у порівнянні з традиційними лікувально-реабілітаційними заходами.

Отже, аналіз даних електроенцефалографічного дослідження у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем групи порівняння та основної до і після лікування свідчить про те, що у хворих основної групи, в комплексне лікування яких додавалася транскраніальна мікрополяризація, спостерігалася більш виражена позитивна динаміка параметрів електроенцефалограми.

Такі зміни в дітей з церебральним паралічем після комплексного лікування із додаванням методу транскраніальної мікрополяризації свідчать про позитивний розвиток функціональної організації головного мозку, що створює більш сприятливі умови для реалізації психофізіологічних функцій у даній групі пацієнтів.

Отримані дані дають підстави стверджувати, що включення до комплексного лікування дітей хворих на дитячий церебральний параліч методу транскраніальної мікрополяризації збільшує ефективність лікування та позитивно впливає на клінічний перебіг захворювання.

5.2. Дія транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з дитячим церебральним паралічем

Для оцінки терапевтичної ефективності комплексного методу лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації в основній групі аналізували клінічні дані, отримані до проведення терапії та після завершення лікувального процесу.

Згідно з даними первинного комплексного клініко-нейрофізіологічного обстеження, в обох групах дітей із церебральним паралічем було виявлено функціональні та органічні розлади стану ЦНС.

Результати транскраніальної доплерографії (ТДГ) судин голови дітей хворих на дитячий церебральний параліч обох груп спостереження свідчили про наявність патології мозкової гемодинаміки різного ступеня.

Практично у всіх хворих на дитячий церебральний параліч відзначали ті або інші порушення мозкового кровообігу у магістральних артеріях голови: гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по середній (СМА) і передній (ПМА) мозкових артеріях; високі швидкості кровообігу по базилярній (БА), СМА і ПМА; низькі швидкості кровообігу по БА, СМА і ПМА та інші.

Дані проведеного транскраніального доплерографічного обстеження показали, що діти з церебральним паралічем обох груп під впливом проведеної терапії у більшості випадків мали сприятливі зміни мозкової гемодинаміки.

Позитивні зміни мозкового кровообігу спостерігали у 87% пацієнтів основної групи і у 52% осіб групи порівняння.

Аналіз результатів доплерографічного обстеження судин голови проведено шляхом виділення специфічних ТДГ-патернів (Табл. 5.3):

1. Гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по середній мозковій артерії.

2. Гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по передній мозковій артерії.

3. Високі швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях.

4. Низькі швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях.

Таблиця 5.3.

Динаміка патернів транскраніальної доплерографії у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем порівняльної та основної груп спостереження під впливом курсу лікування

Показник, одиниці вимірювання	Група порівняння, n=30, кількість дітей (%)		Основна група, n=30, кількість дітей (%)	
	До	Після	До	Після

	лікування	лікування	лікування	лікування
Гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по СМА	40,7%	34,8%	39,0%	15,0%
Δ	5,9%		24,0%	
Гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по ПМА	16,9%	11,7%	17,4%	4,7%
Δ	5,2%		12,7%	
Високі швидкості кровообігу: - по БА	52,0%	40,0%	53,7%	17,3%
Δ	12,0%		36,4%	
- по СМА	20,1%	16,3%	20,7%	6,3%
Δ	3,8%		14,4%	

- по ПМА	12,4%	7,6%	12,9%	1,6%
Δ	4,8%		11,3%	
Низькі швидкості кровообігу: - по БА	40,9%	33,5%	41,2%	10,2%
Δ	7,4%		31,0%	
- по СМА	69,8%	52,7%	68,7%	21,7%
Δ	17,1%		47,0%	
- по ПМА	30,2%	23,7%	33,8%	9,7%
Δ	6,5%		24,1%	

Примітки: БА - базиллярна артерія, ПМА - передня мозкова артерія, СМА - середня мозкова артерія.

Для оцінки рівня порушень мозкової гемодинаміки та стану кровообігу в магістральних артеріях голови у пацієнтів із дитячим церебральним паралічем до та після комплексного лікування із транскраніальною мікрополяризацією застосовували коефіцієнт асиметрії (КА) кровообігу по середній та передній мозковим артеріях.

Результати аналізу коефіцієнту асиметрії кровообігу в мозкових артеріях у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем обох груп представлені в **Табл. 5.4**.

Таблиця 5.4.

Коефіцієнт асиметрії кровообігу по середній (СМА) і передній мозкових артеріях (ПМА) дітей із церебральним паралічем порівняльної та основної груп спостереження під впливом курсу лікування

Група	Коефіцієнт асиметрії кровообігу по СМА, %	Коефіцієнт асиметрії кровообігу по ПМА, %
Порівняльна, n=30: до лікування	17,3	13,2
після лікування,	14,8	12,4
Δ, %	2,5	0,8
Основна, n=30: до лікування	18,1	14,7
після лікування,	5,8	5,2
Δ, %	12,3	9,5

Після проведення комплексного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації у дітей основної групи спостерігали зменшення коефіцієнту асиметрії кровообігу по

середній мозковій артерії на 12,3%, тоді як у порівняльній групі лише на 2,5 %.

Позитивна динаміка була також зафіксована і відносно коефіцієнта асиметрії кровообігу по передній мозковій артерії.

У дітей основної групи, яким виконували транскраніальну мікрополяризацію у комплексі лікувально-реабілітаційних заходів, спостерігали зменшення коефіцієнта асиметрії кровообігу по передній мозковій артерії на 9,5%, а у групі порівняння цей показник становив 0,8%.

Для об'єктивної оцінки мозкової гемодинаміки у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем до та після комплексного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації використовували також такий показник доплерографії, як середня швидкість кровообігу (СШК) в базилярній артерії, середній та передній мозкових артеріях.

Оскільки стан мозкової гемодинаміки залежить від віку дитини, то для оцінки змін показника середньої швидкості кровообігу в базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях, враховували нормативні дані для різних вікових груп.

Показники середньої швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях, залежно від патерну транскраніальної доплерографії, представлені в **Табл. 5.5**.

У дітей основної групи, які проходили комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації, висока швидкість кровообігу по базилярній артерії статистично вірогідно зменшилась на 21,7%.

Таблиця 5.5.

Середня швидкість кровообігу у дітей із церебральним паралічем порівняльної та основної груп спостереження під впливом лікування

Патерн транскраніальної доплерографії, M±m, см/с	Група порівняння, n=30		Основна група, n=30	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Високі швидкості кровообігу: - по БА	65,9±1,23	62,4±1,02	67,3±1,04	52,7±0,74*
Δ, %	-5,3		-21,7	
- по СМА	97,9±1,06	92,4±1,32	99,6±0,9	81,4±1,02*
Δ, %	-5,6		-18,3	
- по ПМА	65,4±0,9	64,1±1,07	65,3±1,4	60,2±1,24*
Δ, %	-1,9		-7,8	
Низькі швидкості кровообігу: - по БА	39,7±1,07	42,1±1,24	37,0±0,49	52,6±1,03*
Δ, %	+5,7		+29,7	
- по СМА	56,1±1,06	62,3±1,37*	54,9±1,04	69,7±1,27*
Δ, %	+9,9		+21,2	
- по ПМА	50,4±0,78	52,3±0,75	51,4±0,49	56,9±1,22*
Δ, %	+3,6		+9,7	

*Примітки: * - статистично вірогідні відмінності ($P < 0,05$), n - кількість досліджених осіб у групі. БА - базилярна артерія, ПМА - передня мозкова артерія, СМА - середня мозкова артерія.*

У цій групі дітей також відзначено статистично вірогідне зменшення високих швидкостей кровообігу по середній і передній мозкових артеріях (на 18,3% та 7,8% відповідно).

Позитивну динаміку цього параметру відзначали і у пацієнтів групи порівняння, але вона не була статистично вірогідною.

У пацієнтів після проведення курсу із транскраніальної мікрополяризації спостерігали статистично вірогідне зростання низьких швидкостей кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (29,7%, 21,2%, 9,7% відповідно).

У дітей групи порівняння також відзначали позитивну динаміку цих патернів транскраніальної доплерографії, але статистично вірогідно зросла швидкість кровообігу лише по середній мозковій артерії (9,9%).

Отже, результати транскраніальної доплерографії судин голови пацієнтів хворих на дитячий церебральний параліч, яким проводили комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації, показали, що позитивна динаміка патернів ТДГ, характеризуючих середню швидкість кровообігу, була вірогідно вищою ніж у групі порівняння.

Дані проведеного транскраніального доплерографічного обстеження свідчать про більшу терапевтичну ефективність комплексного методу з використанням транскраніальної мікрополяризації в лікуванні пацієнтів із дитячим церебральним паралічем у порівнянні із традиційними лікувально-реабілітаційними

заходами.

Отже, включення транскраніальної мікрополяризації до лікувально-реабілітаційного комплексу хворих на дитячий церебральний параліч забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови у 87% пацієнтів основної групи на відміну від 52% у групі порівняння.

Транскраніальна мікрополяризація зменшувала коефіцієнт асиметрії кровообігу по середній мозковій артерії на 12,3%, тоді як у групі порівняння лише на 2,5 %; по передній мозковій артерії - на 9,5%, а у групі порівняння цей показник становив 0,8%.

Транскраніальна мікрополяризація вірогідно зменшувала високі середні швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (на 21,7%, 18,3% та 7,8% відповідно); у групі порівняння вірогідної динаміки не було відзначено.

Транскраніальна мікрополяризація вірогідно збільшувала низькі середні швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (на 29,7%, 21,2% та 9,7% відповідно); статистично вірогідне зростання середньої швидкості кровообігу на 9,9% було лише в середній мозковій артерії у пацієнтів групи порівняння.

5.3. Аналіз електронейроміографічних показників у пацієнтів з дитячим церебральним паралічем після транскраніальної мікрополяризації

Унаслідок різноманітних органічних уражень головного мозку, зокрема при дитячому церебральному паралічу, виникають рухові порушення за спастичним типом та у вигляді гіперкінетичного

синдрому.

Для оцінки стану нервово-м'язового апарату широко використовується метод електронейроміографії [32, 135].

Стимуляційна міографія є одним з різновидів електронейроміографічної діагностики. Як інтегративний тест, що відображає функціональний стан спінальних структур, використовують параметри Н-рефлексу (Hoffmann reflex) і F-хвилі [158].

Н-рефлекс - це рефлекторне збудження м'язів гомілки (*m. Gastrocnemius*, *m. Soleus*) у відповідь на електричне подразнення нерва [158]. Найранішою прямою відповіддю м'язів на стимуляцію нерва імпульсним електричним струмом є рухова відповідь, так звана М-хвиля [224].

При збільшенні сили електричного стимулу на 10-25% від вихідної максимальної М-відповіді, можна зареєструвати додаткове відхилення потенціалу - F-хвилю [224].

F-хвиля - це пізня відповідь, яка реєструється з м'язів, під час активації мотонейронів після ретроградного проходження стимулу, який наноситься на периферійний нерв.

Ці параметри електронейроміографії є важливими показниками для оцінки рухових порушень при різних захворюваннях, зокрема при дитячому церебральному паралічу [287].

У нашому дослідженні серед пацієнтів був такий розподіл форм дитячого церебрального паралічу (**Табл. 5.6.**):

Таблиця 5.6.

Розподіл пацієнтів основної та порівняльної груп за клінічними формами дитячого церебрального паралічу

Форми	Групи				Усього	
	Порівняльна		Основна			
	Кіл-ть	%	Кіл-ть	%	Кіл-ть	%
Спастична диплегія	19	45	18	35	37	40
Подвійна геміплегія	6	14	15	29	21	23
Геміплегічна форма	10	24	10	20	20	22
Гіперкінетична форма	1	2	1	2	2	2
Атонічно-астатична форма	6	14	7	14	13	14
Усього в групі	42	45	51	55	93	100

Із представлених у **Табл. 5.6** даних видно, що найбільшу частку становили діти зі спастичною диплегією – 35 % в основній групі та 45 % у групі порівняння; з подвійною геміплегією було 29 % в основній групі та 14 % у групі порівняння; з геміплегічною формою було 20 % в основній групі та 24 % у групі порівняння; з атонічно-астатичною формою – 14 % у групі порівняння та 14 % у групі порівняння; з гіперкінетичною формою – 2 % у групі порівняння та 2 % у групі порівняння.

Частка дітей зі спастичною диплегією становила 40 % від загальної кількості хворих на дитячий церебральний параліч обох груп спостереження. У дітей зі спастичною диплегією спостерігалось ураження обох половин тіла і в них більше страждали нижні кінцівки (від вираженого парезу до легкої дисфункції).

У дітей із спастичною диплегією спостерігали раннє формування контрактур, деформацію хребта й суглобів, еквіноварусну або вальгусну деформацію стоп (у 100% пацієнтів із цією формою дитячого церебрального паралічу).

У більшій половині пацієнтів з цією формою дитячого церебрального паралічу обох груп спостереження також виявляли патологію черепних нервів: атрофія зорових нервів, збіжна косоокість, порушення слуху.

У 90 % дітей із спастичною диплегією відзначали мовленеві порушення у вигляді затримки розвитку мовлення та псевдобульбарної дизартрії. У 60 % дітей зі спастичною диплегією спостерігали зниження інтелекту.

Найважчі рухові порушення ми спостерігали в дітей із подвійною геміплегією. Частка пацієнтів із такою важкою формою дитячого церебрального паралічу становила 23 % від загальної кількості дітей обох груп спостереження.

Для дітей із подвійною геміплегією характерним було раннє формування контрактур та деформацій тулуба й кінцівок, однакова вираженість рухових порушень у ногах та руках, або з переважним ураженням рук. Довільні рухи руками і функція хапання у таких дітей були сильно обмежені. Високий м'язовий тонус у дітей із подвійною геміплегією поєднувався з надмірною активністю лабіринтного та шийно-тонічного рефлексів.

У 90 % випадків подвійної геміплегії в основній та порівняльній групах рухові розлади супроводжувалися патологією черепних нервів: атрофією зорових нервів, косоокістю, порушенням слуху, псевдобульбарними розладами. Також у цих дітей спостерігали зниження інтелектуальних здібностей.

У 50 % дітей від загальної кількості пацієнтів із цією формою дитячого церебрального паралічу в обох групах спостереження подвійна геміплегія супроводжувалася судомою.

Частка обстежених пацієнтів, яким був встановлений діагноз – геміплегічна форма, становила 22 % від загальної кількості хворих на дитячий церебральний параліч обох груп спостереження.

Для цієї форми дитячого церебрального паралічу характерним було ураження кінцівок однієї сторони тіла, при чому верхні кінцівки частіше страждали, ніж нижні.

74 % дітей з геміплегією обох груп спостереження могли самостійно (або з допомогою) ходити. У переважній більшості пацієнтів з геміплегією спостерігали патологічну установку кінцівок й тулуба: сколіоз різних відділів хребту; перехил тазу; приведення плеча, згинання й пронація передпліччя, згинання й ульнарне відхилення кисті; еквіноварусна або вальгусна деформація стоп з укороченням п'яткового сухожилля.

У 40 % пацієнтів з геміплегічною формою дитячого церебрального паралічу обох груп спостереження відзначали розумову відсталість, яка варіювала від легкої затримки психічного розвитку до грубого інтелектуального дефекту. При цьому зниження інтелектуальних здібностей не завжди корелювало з важкістю рухових порушень.

У 80 % дітей із геміплегічною формою дитячого церебрального паралічу відзначали мовленеві порушення у вигляді псевдобульбарної або коркової дизартрії та дислалії.

У 8 % дітей з геміплегією обох груп спостереження були судоми в анамнезі.

Серед обстежених пацієнтів із дитячим церебральним паралічем була виявлена незначна частка пацієнтів (2 %) з гіперкінетичною формою, у яких рухові порушення були представлені гіперкінезами - хореоатетозом, атетозом, торсійними дистоніями, тіками.

У пацієнтів із гіперкінетичною формою дитячого церебрального паралічу була відсутня правильна постава тулуба й кінцівок, які були спричинені гіперкінезами та м'язовою дистонією.

Дрібна моторика та функція хапання у цих пацієнтів також були порушені.

У дітей з гіперкінетичною формою дитячого церебрального паралічу поряд з руховими розладами спостерігали псевдобульбарні розлади (слинотеча, труднощі при жуванні, ковтанні).

Ці пацієнти мали мовленеві порушення за типом екстрапірамідної дизартрії.

Частка дітей з атонічно-астатичною формою становила 14 % від загальної кількості хворих на дитячий церебральний параліч обох груп спостереження.

Для цієї форми дитячого церебрального паралічу характерним був понижений м'язовий тонус, причому в руках він був дещо вищий, ніж у ногах.

У дітей з атонічно-астатичною формою рухові розлади проявлялися в нездатності хворого втримувати вертикальну позу

внаслідок дефекту механізмів постурального контролю.

Також у цих дітей практично не були розвинути функція сидіння, стояння та ходіння, фіксація голови. Лише 30 % дітей від загальної кількості хворих із атонічно-астатичною формою дитячого церебрального паралічу могли утримувати позу сидячи, але вона всеодно залишалася нестабільною.

У 45 % дітей з атонічно-астатичною формою виявляли патологію черепних нервів, яка проявлялася атрофією зорових нервів, косоокістю, ністагмом.

Виражене зниження інтелектуальних здібностей, яке сполучалося з негативізмом, малою емоційністю та агресивністю, мали 70 % пацієнтів з цією формою дитячого церебрального паралічу.

У переважної більшості дітей (понад 90 %) спостерігали загальне грубе недорозвинення мовленевих функцій з елементами мозочкової дизартрії.

У 9 % пацієнтів із атонічно-астатичною формою дитячого церебрального паралічу обох груп спостереження відзначали судоми в анамнезі.

Проведене електронейроміографічне дослідження пацієнтів зі спастичною і гіперкінетичною формами дитячого церебрального паралічу до і після комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації виявило зміни електронейроміографічних показників (**Табл. 5.7**).

Результати аналізу параметрів Н-рефлексу показали достовірне зниження співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ у пацієнтів зі спастичними формами дитячого церебрального паралічу після комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації, що вказує на зниження раніше патологічно підвищеної рефлексорної

збудливості мотонейронів.

Таблиця 5.7.

Динаміка електронейроміографічних показників у дітей з церебральним паралічем до і після комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації

Показник, одиниця вимірювання	Спастичні форми		Гіперкінетичні форми	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Максимальна амплітуда Н- відповіді, мВ	8,72 ± 1,13	6,25 ± 0,37*	0,60 ± 1,35	2,88 ± 0,24*
Максимальна амплітуда М- відповіді, мВ	9,94 ± 3,42	31,50 ± 4,57*	14,20 ± 2,03	15,79 ± 1,38
$H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$, (%)	87,72 ± 6,22	19,84 ± 2,34*	4,22 ± 6,65	8,24 ± 1,74*
$F_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$, (%)	15,82 ± 1,24	8,15 ± 1,03*	0,26 ± 0,34	2,46 ± 1,15*

Позитивна динаміка електронейроміографічних показників в результаті застосування мікрополяризації в комплексній терапії пов'язана, в першу чергу, зі зниженням патологічно підвищеного м'язового тону у пацієнтів зі спастичними формами дитячого церебрального паралічу.

Зниження гіпертонусу м'язів, найімовірніше, обумовлено поліпшенням впливу на спинальний рівень з боку супраспинальних систем, відповідальних за руховий контроль.

У дітей з гіперкінетичними формами дитячого церебрального паралічу спостерігалось знижене в порівнянні з нормативними даними [4] співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ відповідей литкового м'яза.

Комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації достовірно підвищувало показник $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ (Табл. 5.7).

Комплексне лікування з використанням методу мікрополяризації також показало достовірне поліпшення показників F-хвилі у пацієнтів як із спастичними формами дитячого церебрального паралічу, так і гіперкінетичними (Табл. 5.7).

Отже, позитивна динаміка електронейроміографічних показників після курсу комплексного лікування з застосуванням методу мікрополяризації свідчить про поліпшення функціонального стану нейром'язового апарату, що відбувається завдяки оптимізації впливів на нього надсегментарних структур рухового аналізатора [127].

Механізм впливу транскраніальної мікрополяризації може здійснюватися як на центральному, так і на периферійному рівнях. Під впливом мікрополяризації може змінюватися стан сегментарних і центральних структур, відповідальних за регуляцію м'язового тонусу, що створює умови для поліпшення функціонування нейром'язового апарату [127].

Іншим ефективним підходом, спрямованим на поліпшення рухових функцій кінцівок пацієнтів з органічними ураженнями

головного мозку, зокрема з дитячим церебральним паралічем, є СІ терапія (Constraint-Induced Movement Therapy) [197].

Нейробіологи вважають СІ терапію одним з 10 найкращих досягнень нейронауки ХХ століття і одним з 10 найбільш перспективних напрямків у неврології [66].

СІ терапія також покращує регіональний кровообіг і метаболізм головного мозку [306].

Цю методику ми апробували для корекції функціонального стану паретичної кінцівки 12 пацієнтів (основна група) в резидуальному періоді мозкового інсульту (мінімум 6 місяців після перенесеного інсульту) на базі «Неврологічної клініки доктора Яценко» (м.Київ, Україна).

До групи контролю увійшло 14 пацієнтів.

Групи були порівнянні за статевими, віковими характеристиками, ступенем геміпарезу, давністю інсульту і т.д. Середній вік хворих становив 57,3 років, наймолодшій пацієнтці було 24 роки (6 років після геморагічного інсульту в басейні лівої середньої мозкової артерії).

У хворих обох груп в ході дослідження застосовувався комплекс відновлювальних заходів амбулаторного етапу: масаж і кінезитерапія.

Обстеження пацієнтів до проведення СІ терапії виявило суб'єктивні і об'єктивні ознаки порушення рухової функції верхньої кінцівки у вигляді помірного спастичного геміпарезу.

Основні труднощі у пацієнтів виникали під час виконання ними побутових і гігієнічних процедур, які вони роблять у повсякденному житті за допомогою верхньої кінцівки.

Оцінку функціональних можливостей верхньої паретичної

кінцівки виконували за допомогою анкети рухової активності (АРА).

АРА – це структурований опитувальник, спеціально розроблений для СІ терапії, який кількісно (КШ - кількісна шкала) і якісно (ЯШ - якісна шкала) оцінює за 5-бальною шкалою використання паретичної кінцівки пацієнтом у повсякденному житті [198].

Показники АРА є надійною, стабільною і достовірною оцінкою функціональних можливостей паретичної руки.

Повторне обстеження функціональної активності паретичної руки постінсультних пацієнтів після проходження курсу СІ терапії виявило покращення показників анкети рухової активності (Табл. 5.8).

Таблиця 5.8.

Показники анкети рухової активності руки до і після СІ терапії

	Основна група		Група контролю	
	КШ	ЯШ	КШ	ЯШ
До лікування	0,6 ± 0,14	0,80 ± 0,17	0,7 ± 0,21	0,87 ± 0,32
Після лікування	2,9 ± 0,35*	1,91 ± 0,25*	0,9 ± 0,40	1,01 ± 0,24
Δ, %	+ 79,31	+ 58,11	+ 22,22	+ 13,86

*Примітка: * - статистично достовірна різниця в порівнянні з показником до лікування ($P < 0,05$). КШ - кількісна шкала, ЯШ - якісна шкала.*

Як видно з **Таб. 5.8**, функціональна активність руки постінсультних пацієнтів після курсу СІ терапії статистично достовірно покращилася за кількісною шкалою на 79,31%, а за якісної шкалою - на 58,11%.

Аналогічні показники не мали статистично достовірного поліпшення у пацієнтів групи контролю.

Отже, результати дослідження свідчать про ефективність застосування реабілітаційного курсу СІ терапії в корекції функціонального стану паретичної кінцівки навіть у віддалені терміни (6 років) після перенесеного інсульту.

Отримані результати відкривають широкі можливості для застосування СІ терапії у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку, зокрема з дитячим церебральним паралічем.

Основні результати **розділу 5** опубліковані в таких статтях:

1. Яценко КВ, Тараненко ТВ, Юрченко ФВ, Скибо ГГ. Вплив комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг у пацієнтів, які хворі на дитячий церебральний параліч. Запорозж мед жур. 2017;19(1):81–5.
2. Яценко КВ, Надоненко ОМ. Динаміка електроенцефалографічних показників у пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, під впливом комплексного лікування з використанням методу. Здоб клін експер мед. 2017;2:101-7.
3. Яценко ЕВ, Криворучко ВС. Анализ электронейромиографических показателей у пациентов с ДЦП

после комплексного лечения с использованием микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2017;7(3):464–9.

4. Яценко ЕВ. Эффективность использования метода СИ-терапии у постинсультных пациентов с двигательными нарушениями в паретичной верхней конечности. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2018;8(3):392–8.

РОЗДІЛ 6. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ ІЗ СИМПТОМАТИЧНОЮ ЕПІЛЕПСІЄЮ

Дослідження механізмів, що лежать в основі впливу транскраніальної мікрополяризації на центральну нервову систему, проведені за допомогою електрофізіологічних, електронно-мікроскопічних та інших методів, підтвердили можливість управління функціональним станом глибоких структур мозку (мигдалеподібного тіла та хвостатого ядра), які відіграють роль модуляторів його цілісної діяльності (судомної готовності мозку, рівня емоційної напруги або уваги і т.п.) [255].

Також було показано, що застосування транскраніальної мікрополяризації значно зменшувало спонтанні та епілептичні збуджувальні постсинаптичні струми на бікукуліновій *in vitro* моделі у мишей [50].

Тому в нашій роботі було досліджено можливість застосування методу транскраніальної мікрополяризації для покращення електроенцефалографічних показників у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію.

6.1. Аналіз електроенцефалографічних показників у пацієнтів з симптоматичною епілепсією після транскраніальної мікрополяризації

Для оцінки ефективності проведеного комплексного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації використовували дані електроенцефалографічного дослідження.

Електроенцефалограми оцінювали відповідно до класифікації Е. А. Жирмунської [1] з огляду на тенденції формування варіантів електроенцефалограми в дитячому віці [9].

Перед початком курсу біоелектрична активність головного мозку хворих дітей характеризувалася різними змінами епілептичного типу: реєструвалися повільні множинні спайки, гострі хвилі, піки та епілептиформні комплекси (Рис. 6.1А).

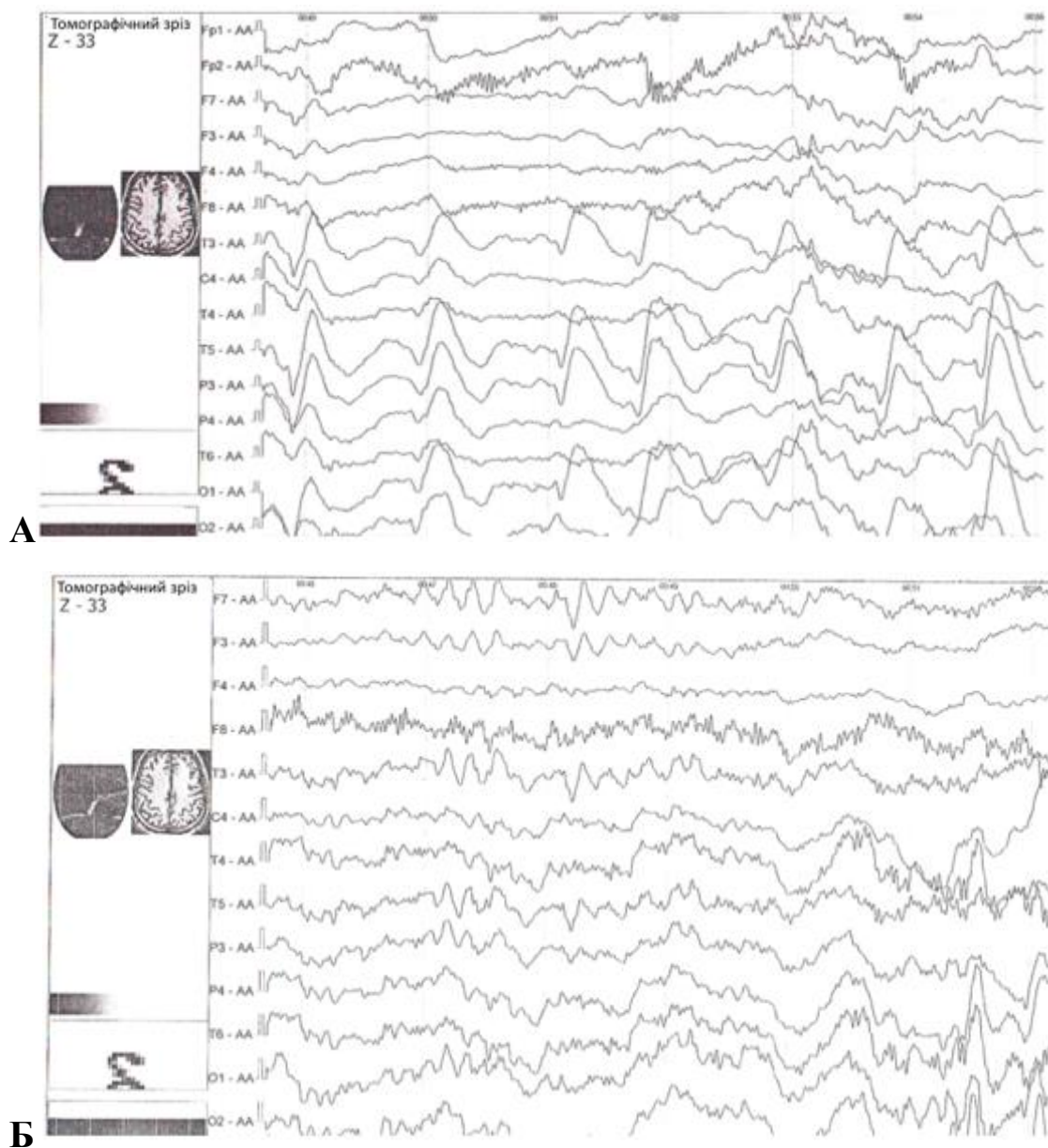


Рис. 6.1. Електроенцефалограма хворого з

симптоматичною епілепсією до (А) та після (Б) лікування із використанням мікрополяризації. Швидкість: 30,0 мм/с, підсилення: 100,0 мкВ/см.

Центральний ритм був слабо виражений або непостійним. Рівень пароксизмальної активності електроенцефалограми в таких дітей був високим.

У хворих також спостерігалася затримка формування коркової ритмічної активності (відсутність або недостатня вираженість альфа-ритму, його нерегулярність і т.п.).

Після закінчення курсу транскраніальної мікрополяризації у всіх дітей з симптоматичною епілепсією відзначалося виражене покращення електроенцефалографічної картини.

Відзначалося зменшення вираженості епілептиформних змін, що проявлялося в зниженні генералізованої пароксизмальної активності, а також кількості та амплітуди одиночних спайків і епілептичних комплексів.

На електроенцефалограмах реєструвалося збільшення частоти та амплітуди альфа- та бета-ритмів, а також зменшення амплітуди і частоти дельта- і тета-ритмів (**Рис. 6.1Б, Табл. 6.1**).

У дітей основної групи спектральна щільність потужності (СЩП) альфа-ритму статистично вірогідно збільшилася на 46,3% після комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації.

Таблиця 6.1.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограм пацієнтів із епілепсією обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Група порівняння, n=14	Діапазон, мкВ², (M±m)			
	альфа	бета	дельта	тета
до лікування	42,1±1,8	16,1±2,1	207,7±11,2	174,3±8,7
після лікування	50,7±2,1*	18,7±2,3*	188,1±10,4	151,1±9,2
Δ%	+16,9	+13,9	-9,4	-13,3
Основна група, n=15	альфа	бета	дельта	тета
до лікування	40,3±2,1	15,1±0,7	204,3±6,2	178,2±5,4
після лікування	75,1±1,4*	20,3±0,3*	136,1±5,7*	120,3±4,2*
Δ%	+46,3	+25,6	-33,4	-32,5

*Примітки: * - статистично вірогідні відмінності (P < 0,05), n - кількість досліджених осіб у групі.*

Позитивну динаміку цього діапазону відзначали і у пацієнтів групи порівняння.

На відміну від основної групи статистично вірогідне наростання спектральної щільності потужності альфа-ритму на повторних електроенцефалограмах групи порівняння становило лише 16,9%.

Відзначено статистично вірогідне збільшення спектральної щільності потужності бета-діапазону в пацієнтів обох груп спостереження: в основній групі цей показник становив 25,6%, тоді як

у пацієнтів групи порівняння - лише 13,9% (Табл. 6.1).

Мала місце позитивна динаміка у вигляді зменшення потужності повільнохвильової частини спектру.

Спектральна щільність потужності дельта-ритму на електроенцефалограмах дітей з симптоматичною епілепсією після проведення курсу транскраніальної мікрополяризації статистично вірогідно знизилась на 33,4% (Табл. 6.1).

Показник спектральної щільності потужності тета-хвиль на повторних енцефалограмах цієї групи спостереження також статистично вірогідно зменшився на 32,5%.

У пацієнтів групи порівняння не було виявлено статистично вірогідної динаміки зменшення спектральної щільності потужності цих діапазонів повільнохвильової частини спектру (Табл. 6.1).

Слід зазначити, що динаміка характеристик електроенцефалографічної картини відрізнялась у хворих основної та порівняльної груп.

Співставлення результатів, отриманих при проведенні енцефалографічного дослідження пацієнтів обох груп спостереження виявило, що у дітей, яким проводили транскраніальну мікрополяризацію, позитивна динаміка спектральних складових електроенцефалограми була вірогідно вищою.

Вище означені результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалографії є підтвердженням більшої терапевтичної ефективності комплексного методу лікування симптоматичної епілепсії з використанням мікрополяризації (основна група) у порівнянні із традиційними лікувально-реабілітаційними заходами (група порівняння) (Табл. 6.1).

Отже, застосування транскраніальної мікрополяризації у дітей з симптоматичною епілепсією сприяє покращенню електроенцефалографічної картини.

Транскраніальна мікрополяризація може стати перспективним методом у комплексному лікуванні хворих із симптоматичною епілепсією.

6.2. Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з симптоматичною епілепсією

Результати транскраніальної доплерографії судин голови дітей обох груп спостереження свідчили про наявність патології мозкової гемодинаміки різного ступеня.

Практично у всіх хворих на симптоматичну епілепсію відзначали ті або інші порушення мозкового кровообігу у магістральних артеріях голови:

- гемодинамічно значима (більше ніж 15 %) асиметрія кровообігу по середній (СМА) і передній мозкових артеріях (ПМА);
- високі швидкості кровообігу по базилярній артерії (БА), СМА і ПМА;
- низькі швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях та інші.

Під впливом проведеної терапії у більшості випадків спостерігалися сприятливі зміни мозкової гемодинаміки: у 84 % пацієнтів основної групи і у 58 % осіб групи порівняння (**Табл. 6.2**).

Таблиця 6.2.

Динаміка патернів (%) транскраніальної доплерографії у дітей із симптоматичною епілепсією під впливом курсу лікування

Показник	Група дітей					
	порівняння (n=14)		Δ, %	основна (n=15)		Δ, %
	до лікування	після лікування		до лікування	після лікування	
Гемодинамічно значима (понад 15%) асиметрія кровообігу по артеріях:						
середній мозковій	41,2	35,4	5,8	40,3	16,8	23,5
передній мозковій	17,1	12,2	4,9	16,8	5,1	11,7
Високі швидкості кровообігу по:						
базиллярній артерії	53,0	41,4	11,6	52,4	16,2	36,2
середній мозковій артерії	19,7	16,7	3,0	20,1	5,8	14,3
передній мозковій артерії	11,9	7,3	4,6	12,2	2,1	10,1
Низькі швидкості кровообігу по:						
базиллярній	41,2	32,7	8,5	40,7	11,2	29,5

артерії						
середній мозковій артерії	68,6	51,4	17,2	69,1	23,4	45,7
передній мозковій артерії	29,8	22,3	7,5	32,5	11,3	21,2

Для об'єктивної оцінки мозкової гемодинаміки у дітей, хворих на епілепсію, до та після комплексного лікування із транскраніальною мікрополяризацією використовували також такий показник, як середня швидкість кровообігу в базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях.

Оскільки стан мозкової гемодинаміки залежить від віку дитини, то для оцінки змін цього показника в базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях враховували нормативні дані для різних вікових груп (**Табл. 6.3**).

У дітей основної групи, які проходили комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації, висока швидкість кровообігу по базилярній артерії статистично вірогідно зменшилася на 20,5 %.

Також у них вірогідно зменшувалися високі швидкості кровообігу по середній і передній мозкових артеріях (на 17,2 та 7,9 % відповідно).

Позитивну динаміку цього показника відзначали і у пацієнтів групи порівняння, але вона не була статистично вірогідною.

Таблиця 6.3.

Середня швидкість кровообігу (см/с) у дітей із симптоматичною епілепсією під впливом лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації ($M \pm m$)

Патерн транс-краніальної доплерографії	Група дітей					
	Порівняння (n=14)		Δ, %	Основна (n=15)		Δ, %
	до лікування	після лікування		до лікування	після лікування	
Високі швидкості кровообігу по:						
базиллярні й артерії	66,2±1,23	61,7±1,12	-6,8	67,2±1,05	53,4±0,68*	-20,5
середній мозковій артерії	98,4±1,02	91,5±1,21	-7,0	99,1±0,7	82,1±1,04*	-17,2
передній мозковій артерії	65,1±0,79	63,9±1,07	-1,8	64,9±1,2	59,8±1,19*	-7,9
Низькі швидкості кровообігу по:						
базиллярні й артерії	40,1±1,12	43,1±1,19	+6,9	39,1±0,23	52,2±1,07*	+25,1
середній мозковій артерії	54,2±1,11	62,1±1,24*	+12,7	54,7±1,03	69,2±1,14*	+20,9
передній мозковій	51,4±0,65	52,8±0,65	+2,7	51,9±0,37	57,8±1,12*	+10,2

артерії						
---------	--	--	--	--	--	--

*Примітка: * $P < 0,05$.*

Після проведення курсу комплексного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації спостерігали статистично вірогідне зростання низьких швидкостей кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (25,1, 20,9, 10,2 % відповідно).

У дітей з симптоматичною епілепсією групи порівняння також була позитивна динаміка цих патернів транскраніальної доплерографії, але статистично вірогідно зросла швидкість кровообігу лише по середній мозковій артерії (12,7 %).

Отже, результати транскраніальної доплерографії судин голови дітей, хворих на симптоматичну епілепсію, яким проводили комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації, показали, що позитивна динаміка патернів, які характеризують середню швидкість кровообігу, була вірогідно вищою, ніж у групі порівняння.

Результати проведеного транскраніального доплерографічного обстеження свідчать про більшу терапевтичну ефективність комплексного методу з використанням транскраніальної мікрополяризації в лікуванні дітей із симптоматичною епілепсією порівняно з традиційними лікувально-реабілітаційними заходами.

Включення транскраніальної мікрополяризації до лікувально-реабілітаційного комплексу хворих на симптоматичну епілепсію забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови у 84 % пацієнтів основної групи на відміну від 58 % у групі порівняння.

Транскраніальне доплерографічне обстеження продемонструвало, що транскраніальна мікрополяризація вірогідно зменшувала високі середні швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (на 20,5, 17,2 та 7,9 % відповідно); у групі порівняння вірогідної динаміки не було відзначено.

Транскраніальна мікрополяризація також вірогідно збільшувала низькі значення середніх швидкостей кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (на 25,1, 20,9, 10,2 % відповідно); статистично вірогідне зростання середніх швидкостей кровообігу на 12,7 % було лише по середній мозковій артерії у пацієнтів групи порівняння.

Основні результати **розділу 6** опубліковані в таких статтях:

1. Яценко КВ. Вплив комплексної терапії з використанням мікрополяризації на електроенцефалографічні показники у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію. Укр неврол журн. 2017;44(3):21–5.
2. Яценко КВ. Мозкова гемодинаміка та електроенцефалограма у хворих на симптоматичну епілепсію при комплексному лікуванні з використанням транскраніальної мікрополяризації. Фізіол журн. 2018;64(1):52–58.
3. Яценко КВ. Симптоматична епілепсія: причини виникнення та перспективні методи лікування. Здоб клін експер мед. 2019;1:7–13.

4. Яценко ЕВ. Микрополяризация - эффективный неинвазивный метод нейростимуляции при органических поражениях головного мозга у детей. *Art of medicine*. 2019;2(10):123–127.

РОЗДІЛ 7. ВИКОРИСТАННЯ МІКРОПОЛЯРИЗАЦІЇ В ПАЦІЄНТІВ З ПЕРИНАТАЛЬНОЮ ГІПОКСИЧНО-ІШЕМІЧНОЮ ЕНЦЕФАЛОПАТІЄЮ (ПГІЕ)

Досі недостатньо досліджені шляхи запобігання або зменшення пошкоджень при перинатальній гіпоксично-ішемічній енцефалопатії (ПГІЕ) і тривають пошуки ефективних терапевтичних засобів лікування важких наслідків гіпоксично-ішемічних уражень центральної нервової системи новонародженого.

Перспективним та ефективним методом покращення функціональних показників роботи мозку хворих з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією може бути така терапевтична неінвазивна технологія, як транскраніальна мікрополяризація з використанням постійного струму малої сили.

Тому метою наших подальших досліджень було вивчення ефективності застосування транскраніальної мікрополяризації у комплексному лікуванні пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією.

7.1. Вплив транскраніальної мікрополяризації на електроенцефалографічні показники пацієнтів з ПГІЕ

Аналіз електроенцефалограм дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією до лікування свідчив про порушення біоелектричної активності мозку різного ступеня вираженості. Центральний ритм був слабо виражений або непостійним.

У пацієнтів із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією також спостерігалася затримка формування коркової ритмічної активності (відсутність або недостатня вираженість альфа-ритму, його нерегулярність і т.п.).

Після закінчення курсу транскраніальної мікрополяризації у всіх дітей відзначалося виражене покращення електроенцефалографічної картини.

На електроенцефалограмі реєструвалося збільшення частоти і амплітуди альфа- і бета-ритмів, а також зменшення амплітуди і частоти дельта- і тета-ритмів (Рис. 7.1, Б).

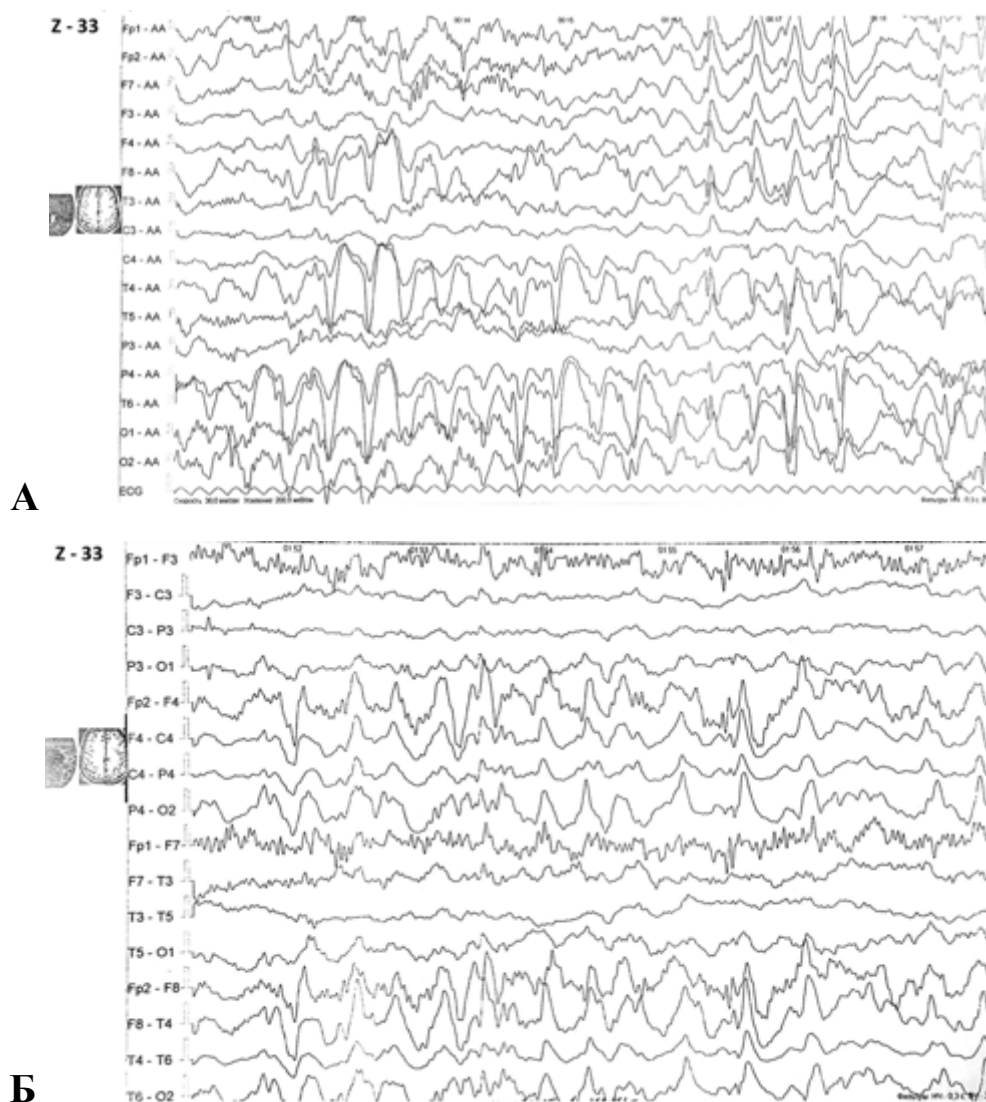


Рис. 7.1. Електроенцефалограма хворого з перинатальною

гіпоксично-ішемічною енцефалопатією до (А) та після (Б) лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації. Швидкість: 30,0 мм / с, посилення: 100,0 мкВ / см.

У результаті проведеного електроенцефалографічного дослідження були отримані дані, що представлені в **Табл. 7.1.**

Таблиця 7.1.

Динаміка розподілу патернів електроенцефалограми у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Патерни електро-енцефалограми	Група порівняння (n=15), відсоток дітей з позитивною динамікою після лікування	Основна група (n=30), відсоток дітей з позитивною динамікою після лікування
Дезорганізований з альфа-ритмом	42,8%	64,3%
Дезорганізований без альфа-ритму	-	60,0%
Десинхронний	-	16,6%
Гіперсинхронний	40,0%	100%
Міжпівкульна асиметрія	-	27,0%
Всього пацієнтів з позитивною	25,0%	77,0%

динамікою		
-----------	--	--

Примітка: n - кількість досліджених дітей у групі.

У межах загальної картини формування вікових патернів електроенцефалограми спостерігалася спрямована позитивна динаміка фонові біоелектричної активності мозку в 77% пацієнтів основної групи, в порівнянні з 25,0% дітей у групі порівняння.

Загальні зміни стосувалися стабілізації вікових прекурсорів центрального і альфа-ритмів і мали тенденції до зменшення структурної дезорганізації і дифузного уповільнення електроенцефалограми при відсутності збільшення пароксизмальної активності та міжпівкульна асиметрії.

Найбільша динаміка спостерігалася в групі дітей з дезорганізацією електроенцефалограми і збереженому альфа-ритмі (у 64,3% пацієнтів основної групи, у 48,2% дітей у групі порівняння): основним критерієм було посилення амплітуди і спектральної потужності альфа-ритму і реактивності під час розплющення очей, реакції засвоєння фотостимуляції, посилення зональної предомінантності та модуляторні альфа-ритму.

Позитивна динаміка також спостерігалася в дітей з дезорганізацією електроенцефалограми без альфа-ритму після проведеного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації (у 60,0% пацієнтів основної групи).

Десинхронний варіант електроенцефалограми із дифузним уповільненням переважно низькоамплітудної активності був мало змінний (16,6% у дітей основної групи), спостерігалися тенденції до посилення тета-діапазону в центральних зонах, фрагментарне посилення альфа-активності в центральних і потиличних зонах

пацієнта.

У пацієнтів групи порівняння не спостерігалось позитивних змін біоелектричної активності головного мозку з десинхронним варіантом електроенцефалограми.

Також виражена позитивна динаміка спостерігалася після проведеного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації у дітей з гіперсинхронним патерном електроенцефалограми (100% у порівнянні з 40,0% дітей у групі порівняння) (Табл. 7.1).

Динаміка стабілізації альфа-ритму пов'язана з формуванням центрального ритму, зменшенням потужності дифузійної синхронізації і повільної активності в лобно-скроневиx зонах.

Результати спектрально-амплітудного математичного перетворення аналогової електроенцефалограми основної групи і групи порівняння (результати Фур'є-аналізу вихідних даних ЕЕГ), призначених для динамічного спостереження за спектральними потужностями визначених частотних діапазонів (ритмічні складові електроенцефалограми), представлені в Табл. 7.2.

Таблиця 7.2.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограм пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Група порівняння, n=15	Діапазон, мкВ ² , (M±m)			
	альфа	бета	дельта	тета

до лікування	44,1±2,3	16,1±0,9	200,3±11,4	185,4±9,7
після лікування	50,1±2,1*	18,8±1,7*	182,2±10,2	163,7±10,7
Δ%	+11,9	+14,4	-9,0	-11,7
Основна група, n=30	альфа	бета	дельта	тета
до лікування	55,4±2,3	16,7±0,8	197,8±8,1	188,4±9,7
після лікування	72,1±3,2*	23,1±1,1*	130,1±8,8*	117,2±8,3*
Δ%	+23,2	+27,7	-34,2	-37,8

*Примітки: * - статистично достовірна різниця ($P < 0,05$), n - кількість осіб в групі.*

У дітей основної групи спектральна щільність потужності (СЩП) альфа-ритму статистично достовірно збільшилася на 23,2%, тоді як у групі порівняння наростання спектральної щільності потужності альфа-ритму було тільки 11,9%.

У пацієнтів обох груп спостереження спостерігалось статистично достовірне збільшення спектральної щільності потужності бета-діапазону: в основній групі цей показник становив 27,7%, у групі порівняння - 14,4%.

Повільнохвильова частина спектру електроенцефалограми під впливом проведеного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації також мала позитивну динаміку у вигляді зменшення потужності.

Після комплексного лікування з використанням мікрополяризації у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією спектральна щільність потужності дельта-ритму на електроенцефалограмі статистично достовірно знизилася на 34,2%, а спектральна щільність потужності тета-хвиль - на 37,8%.

Проведене енцефалографічне дослідження в пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією групи порівняння не спостерігалася статистично достовірна динаміка зменшення спектральної щільності потужності цих діапазонів повільнохвильової частини спектра.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограми в пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією підтверджують значну терапевтичну ефективність комплексного методу лікування з використанням мікрополяризації у порівнянні з традиційними лікувально-реабілітаційними заходами.

Отже, аналіз даних електроенцефалографічного дослідження в пацієнтів обох груп з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією свідчить про те, що у хворих основної групи після комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації, спостерігалася більш виражена позитивна динаміка параметрів електроенцефалограми відносно пацієнтів групи порівняння.

Такі зміни в дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією після комплексного лікування з додаванням транскраніальної мікрополяризації свідчать про позитивний розвиток функціональної організації головного мозку, що створює більш сприятливі умови для реалізації психофізіологічних функцій у цій групі пацієнтів.

Отримані дані дають підстави стверджувати, що включення в комплексне лікування дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією методу транскраніальної мікрополяризації збільшує ефективність лікування і позитивно впливає на клінічний перебіг захворювання.

7.2. Дія транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку пацієнтів з ПГІЕ

Для оцінки терапевтичної ефективності транскраніальної мікрополяризації аналізували клінічні дані, отримані до та після завершення проведення терапії.

Згідно з даними первинного комплексного клініко-нейрофізіологічного обстеження, в обох групах дітей із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією було виявлено функціональні та органічні розлади стану ЦНС.

Результати транскраніальної доплерографії судин голови дітей із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп спостереження свідчили про ті або інші порушення мозкового кровообігу в магістральних артеріях голови: гемодинамічно значима (більше 15%) асиметрія кровообігу по середній (СМА) і передній мозковим артеріям (ПМА); високі швидкості кровообігу по базилярній артерії (БА), СМА і ПМА; низькі швидкості кровообігу по БА, СМА і ПМА та інші.

Дані проведеного транскраніального доплерографічного обстеження показали, що діти з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп під впливом проведеної терапії у більшості випадків мали сприятливі зміни мозкової гемодинаміки.

Позитивні зміни мозкового кровообігу спостерігали у 82% пацієнтів основної групи і у 56% осіб групи порівняння.

Для об'єктивної оцінки рівня порушень мозкової гемодинаміки в магістральних артеріях голови до і після комплексного лікування дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією застосовували коефіцієнт асиметрії (КА) кровообігу по середній і передній мозковим артеріям.

Результати аналізу цих показників транскраніальної доплерографії дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп, представлені в **Табл. 7.3**.

Таблиця 7.3.

Результати аналізу даних транскраніальної доплерографії (коефіцієнт асиметрії кровообігу по середній і передній мозковим артеріям) обох груп спостереження до і після лікування

Група	КА кровообігу по СМА, %		КА кровообігу по ПМА, %	
	до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Порівняльна, n=15	15,8	11,4	12,3	11,2
Δ , %	4,4		1,1	
Основна, n=30	17,9	5,2	16,2	6,7
Δ , %	12,7		9,5	

Примітки: КА - коефіцієнт асиметрії, СМА - середня мозкова артерія, ПМА - передня мозкова артерія.

У дітей основної групи після лікування із використанням транскраніальної мікрополяризації відзначали зменшення коефіцієнта асиметрії кровообігу по середній мозковій артерії до 5,2 % (до лікування цей показник становив 17,9 %).

Позитивна динаміка також спостерігалася і в пацієнтів групи порівняння, але коефіцієнт асиметрії кровообігу по середній мозковій артерії зменшився недостовірно - тільки до 11,4 % (початкове значення - 15,8 %) (**Табл. 7.3**).

Така ж позитивна динаміка щодо коефіцієнту асиметрії кровообігу по передній мозковій артерії була зафіксована в дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією, яким проводили транскраніальну мікрополяризацію.

У них спостерігали зменшення коефіцієнта асиметрії кровообігу по передній мозковій артерії на 9,5 %, тоді як у групі порівняння цей показник становив лише 1,1 % (**Табл. 7.3**).

Оскільки стан мозкової гемодинаміки залежить від віку дитини, то для оцінки змін показника середньої швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях враховували нормативні дані для різних вікових груп.

Показники середньої швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях, залежно від патерну транскраніальної доплерографії, представлені в **Табл. 7.4**.

Таблиця 7.4.

Середня швидкість кровообігу в дітей із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп спостереження під впливом лікування

Патерн доплерографії, M ± m, см/с	Група порівняння, n=15		Основна група, n=30	
	До лікування	Після лікування	До лікування	Після лікування
Високі швидкості кровообігу: - по БА	66,1±1,14	63,0±1,23	66,7±1,02	52,0±0,87*
Δ, %	-4,7		-22,0	
- по СМА	96,8±1,02	91,7±1,27	97,4±1,01	80,2±1,31*
Δ, %	-5,3		-17,7	
- по ПМА	64,7±1,06	63,4±0,81	65,6±1,08	60,7±1,12*
Δ, %	-2,0		-7,5	
Низькі швидкості кровообігу: - по БА	40,7±1,24	43,2±1,08	39,4±0,65	55,0±1,24*
Δ, %	+5,8		+28,4	
- по СМА	55,4±1,34	61,6±1,07*	56,3±1,06	72,1±0,75*
Δ, %	+10,1		+21,9	

- по ПМА	51,7±1,24	54,6±0,82	52,7±0,75	58,8±1,04*
Δ, %	+5,3		+10,4	

Примітка. * - статистично вірогідні відмінності ($P < 0,05$), n - кількість досліджених осіб у групі. БА - базилярна артерія, СМА - середня мозкова артерія, ПМА - передня мозкова артерія.

Висока швидкість кровообігу по базилярній артерії в дітей основної групи, які проходили комплексне лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації, статистично достовірно зменшилася на 22,0 %.

У цій групі дітей також відзначено статистично достовірне зменшення високих швидкостей кровообігу по середній і передній мозкових артеріях (на 17,7 % і 7,5 % відповідно).

Позитивну динаміку цього параметра спостерігали і в пацієнтів із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією групи порівняння, але вона не була статистично достовірною.

Після проведення курсу транскраніальної мікрополяризації відзначали статистично достовірне зростання низьких швидкостей кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях (28,4 %, 21,9 %, 10,4 % відповідно) у пацієнтів із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією основної групи.

Також відзначали позитивну динаміку цих патернів транскраніальної мікрополяризації і в дітей групи порівняння, але статистично достовірно зросла швидкість кровообігу тільки по середній мозковій артерії (10,1 %).

Позитивна динаміка патернів транскраніальної доплерографії у дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною

енцефалопатією під впливом лікування відобразалася в компенсації мозкового кровообігу, зникненні вазоспазмів різного ступеня, нормалізації тонузу магістральних судин голови, зменшенні коефіцієнту асиметрії кровообігу по середнім та переднім мозковим артеріям.

Після проведення комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації відзначено статистично достовірне зменшення середніх високих і збільшення середніх низьких лінійних швидкостей кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях.

Зміни показників транскраніальної доплерографії на тлі лікування можуть бути наслідком нормалізації мозкового кровообігу, збільшенням капіляризації, активацією обох відділів вегетативної нервової системи (з переважанням впливу на симпатичний відділ) [15, 16].

Отже, застосування транскраніальної мікрополяризації в комплексному лікуванні пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови у 82 % пацієнтів основної групи на відміну від 56 % у групі порівняння.

Дані проведеного транскраніального доплерографічного обстеження свідчать про більшу терапевтичну ефективність комплексного методу з використанням транскраніальної мікрополяризації в лікуванні дітей з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією в порівнянні з традиційними лікувально-реабілітаційними заходами.

Основні результати **розділу 7** опубліковані в таких статтях:

1. Яценко КВ. Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія та експериментальні підходи до її корекції. Укр неврол жур. 2016;38(1):7–11.
2. Яценко ЕВ. Динамика электроэнцефалографических показателей у пациентов с перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатией под влиянием комплексного лечения с использованием метода транскраниальной микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2018;8(2):178–85.
3. Яценко КВ. Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. Здоб клін експер мед. 2018;3:151-6.

РОЗДІЛ 8. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Органічні ураження головного мозку новонароджених - це група розладів неврологічного характеру, які проявляються дистрофічними змінами нервової тканини і порушенням роботи нейронів у результаті загибелі нервових клітин.

Головний мозок при перинатальних ураженнях може пошкоджуватися на різних етапах формування.

Однією з важливих ланок патогенезу органічних уражень головного мозку новонароджених є перивентрикулярна лейкомаляція.

Гіпоксичні та ішемічні зміни в перивентрикулярній зоні призводять до деструкції нервової тканини і лейкомаляції з незворотними наслідками, які можуть переростати в більш важку патологію - дитячий церебральний параліч, гіпоксично-ішемічну енцефалопатію, епілепсію та інші [84, 269].

Основними патогенетичними факторами перивентрикулярної лейкомаляції вважають гіпоксично-ішемічне ушкодження та внутрішньоутробні інфекції матері і системне запалення плода (або новонародженого).

Ці фактори активізують критичні механізми:

- 1) *глутаматну ексайтотоксичність*,
- 2) *вивільнення цитокінів*,
- 3) *атаку вільних радикалів активними формами кисню та азоту*, які призводить до загибелі чутливих незрілих олігодендроцитів (**Рис. 8.1**) [148].

Основними джерелами підвищеного позаклітинного глутамату в білій речовині під час гіпоксично-ішемічного ушкодження є транспортери глутамату, які є високоафінними натрій-залежними системами.

Порушення у захопленні глутамату та фактично зворотний транспорт відбувається через збій у роботі іонного натрій-калієвого насоса [179].

Про те, що таке порушення транспорту глутамату може виникнути у немовля, свідчить відкриття залежної від дозрівання надекспресії транспортера глутамату в білій речовині головного мозку в піковий період перивентрикулярної лейкомаляції [72].

Основним місцем цього транспортера є незрілі олігодендроцити [72].

Аксони можуть бути іншим джерелом глутамату в умовах гіпоксично-ішемічного ушкодження [26, 27].

Крім того, під час активації запалення мікрогліальні клітини також вивільняють глутамат за допомогою зворотного транспорту через Na^+ -залежний транспортер, функціонування цистин-глутаматного антигену та вивільнення везикул [179].

Порушення гомеостазу глутамату під час запалення також відбувається шляхом потужного інгібування транспорту глутамату в кількох типах клітин через $\text{TNF-}\alpha$ та $\text{IL1}\beta$ [242, 288].

Другим патогенетичним фактором перивентрикулярної лейкомаляції є внутрішньоутробні інфекції та запалення, які активізують імунну систему плода (**Рис. 8.1**).

Відбувається активація мікрогліальних клітин та вивільнення цитокінів, (наприклад, інтерферон γ і $\text{TNF-}\alpha$), токсичних

для незрілих олігодендроцитів, принаймні частково через активні форми кисню [138].

TNF- α має токсичну дію на незрілі олігодендроцити, зокрема посилюючи токсичність інтерферону γ , а токсична дія обох цих цитокінів залежить від дозрівання олігодендроцитів, тобто більш токсичним є вплив на незрілі клітини, ніж на зрілі [43].

Таке посилене продукування TNF- α може пошкодити головний мозок плода шляхом:

- гіпотонії, яка може призвести до ішемії та перивентрикулярної лейкомаляції,
- дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції, яка викликає непрохідність судин та ішемію і перивентрикулярну лейкомаляцію,
- продукування фактору активації тромбоцитів, який має цитотоксичну дію та спричиняє звуженню судин, збільшує проникність гематоенцефалічного бар'єру та посилює медіатори, що беруть участь у вторинному ураженні мозку,
- загибелі олігодендроцитів та проліферації астроцитів [159].

Основним джерелом інтерферону γ можуть бути астроцити, які містять цей цитокін у великій кількості при дифузній формі перивентрикулярної лейкомаляції, а головною його мішенню можуть бути попередники олігодендроцитів, які експресують рецептор інтерферону γ [93].

Індукція iNOS і, таким чином, активованих форм кисню є головними чинниками, які призводять до загибелі клітин, індукованої інтерфероном γ [99].

Особлива участь мікроглії в патогенезі пошкодження білої речовини головного мозку недоношеної дитини може бути пов'язана також із виявленою особливістю дозрівання цих клітин.

Цікаво відзначити, що мікрогліальні клітини можуть бути виявлені в нормальному людському мозку дуже рано - вони розвиваються в передньому мозку з 16 по 22 тиждень гестації і, зокрема, зосереджені в білій речовині головного мозку зі значним градієнтом до поверхневих шарів мозку [194, 252].

У цей період розвитку в корі головного мозку виявляється порівняно небагато мікроглії.

Дослідження мозку людини *post-mortem* показало, що щільність мікроглії у білій речовині сягала свого піку в період найбільшої вразливості до перивентрикулярної лейкомаляції (третій триместр вагітності) і помітно знижувалась після 37 тижнів вагітності [37].

Це спостереження дозволяє припустити, що хвиля мікроглії, яка мігрує, присутня в білій речовині головного мозку в оптимальний час для її активації гіпоксично-ішемічним ушкодженням або інфекцією (або обома цими факторами), які призводять до пошкодження білої речовини.

Третім патогенетичним механізмом розвитку пошкодження білої речовини при перивентрикулярної лейкомаляції вважають атаку вільних радикалів *активними формами кисню та азоту* (Рис. 8.1).

Механізми, що лежать в основі чутливості незрілих олігодендроцитів до активних форм кисню та азоту, досліджували як на мозку людини, так і в експериментальних моделях.

Дані, отримані на мозку людини, вказують на затримку в розвитку антиоксидантних ферментів - різних форм

супероксиддисмутази (СОД), таких як Mn-СОД, Cu/ZnСОД, а також каталази [92].

Крім того, можливе накопичення перекису водню, який в присутності заліза перетворюється на гідроксильний радикал.

Про це свідчать спостереження щодо ранньої появи заліза в білій речовині головного мозку людини [221] та поглинання заліза для диференціювання незрілими олігодендроцитами [57].

Існування зв'язку між залізом та перивентрикулярною лейкомаляцією було продемонстровано на недоношених дітях, в яких протягом багатьох тижнів після внутрішньоплункового крововиливу помітно підвищувався рівень не зв'язаного з білком заліза у спинномозковій рідині [264].

У сукупності отримані результати досліджень свідчать про існування певного періоду в розвитку олігодендроцитів, в якому ці клітини надчутливі до оксидативного стресу.

Така чутливість незрілих олігодендроцитів головним чином пов'язана із затримкою у продукуванні антиоксидантних ферментів і поглинанні заліза для їх диференціювання.

Механізми, що лежать в основі чутливості незрілих олігодендроцитів до активних форм азоту, здебільшого досліджені на культивованих клітинах [160].

Відповідність цих механізмів процесам, які відбуваються під час перивентрикулярної лейкомаляції у людини, була підтверджена даними, які свідчать про значне збільшення кількості іNOS-позитивної глії в дифузному компоненті перивентрикулярної лейкомаляції, особливо в реактивних астроцитах при дифузному ураженні [112].

Дані свідчать про те, що ключовим джерелом оксиду азоту, який призводить до азотного стресу при дифузній формі перивентрикулярної лейкомаляції у людини, є реактивні астроцити [113].

Однак, ймовірно, що аніон супероксиду, необхідний для комбінації з оксидом азоту, щоб утворити пошкоджуючу активну форму азоту, пероксинітрит, походить як з активованої мікроглії при дифузній формі перивентрикулярної лейкомаляції, так і з самих незрілих олігодендроцитів [148].

Як зазначалося раніше, спостерігається відносний дефіцит обох форм супероксиддисмутази в незрілих олігодендроцитах у білій речовині головного мозку недоношеної дитини.

Отже, вірогідно що, множинні характеристики, залежні від дозрівання незрілих олігодендроцитів, взаємодіють ампліфікуючим способом з патогенетичними механізмами перивентрикулярної лейкомаляції - глутаматною ексайтотоксичністю, вивільненням цитокінів та атакою вільних радикалів активними формами кисню та азоту (**Рис. 8.1**).

Переривання розвитку цих патогенетичних механізмів може сприяти запобіганню або зменшенню пошкодження білої речовини головного мозку.

Дослідження на експериментальних моделях відіграють ключову роль у з'ясуванні механізмів, що беруть участь в пошкодженні мозку плода та новонародженого, і пошуку нових методів лікування перинатальної патології центральної нервової системи.

З кінця 1950-х до 1970-х років Ренк, Уіндл і Майерс розробили моделі перинатального пошкодження головного мозку на мавпах.

Майерс комбінував перетискання пуповини з обструкцією дихальних шляхів щоб викликати "загальну гостру асфіксію", яка призводила до пошкодження в таламусі і стовбурі мозку [200, 248].

У більш пізніх роботах з вивчення перинатальної асфіксії, поросята і ягнята в значній мірі замінили приматів, проте одним з недоліків цих моделей була їхня вартість та етичні проблеми.

Також використовуються *in vitro* моделі для вивчення механізмів розвитку перинатального ушкодження центральної нервової системи.

У нашій роботі ми досліджували клітинні механізми розвитку органічного ураження головного мозку як на *in vivo*, так і на створеній нами *in vitro* моделі.

Ми продемонстрували, що моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і, відповідно, олігодендроцитів, а також до реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.

Активація гліальних клітин призводить до патологічного процесу, який характеризується нейрозапаленням та дисфункцією гліальних клітин.

Нейрозапалення в центральній нервовій системі відрізняється від запалення в периферичних тканинах. Ця невідповідність значною мірою пояснюється гліальними клітинами, які задіяні у цьому процесі, та способом, у який вони комунікують між собою [250].

Клітинні та молекулярні механізми роботи гліальних клітин при нейрозапаленні досі залишаються недостатньо зрозумілими з кількох причин.

По-перше, нейрозапалення - це не проста реакція; вона дуже відрізняється залежно від різних факторів, які спричиняють запалення, як от інфекція, механічні пошкодження, токсичні метаболіти та аутоімунні реакції.

Відомо, що гліальні клітини відіграють різну роль при різних сценаріях нейрозапалення [317].

По-друге, подібно до імунних клітин, гліальні клітини грають “дволикі” ролі в процесах нейрозапалення, залежно від перебігу захворювання та характеру запалення.

По-третє, наслідками нейрозапалення є результат спільних дій різних типів гліальних клітин та периферичних імунних клітин [317].

Різні гліальні клітини діють узгоджено і взаємодіють між собою. Ці клітини добре організовані для підтримки гомеостазу та формування відмінних імунних реакцій центральної нервової системи.

Традиційно до гліальних клітин належать астроцити, мікроглія та олігодендроцити.

До четвертого типу гліальних клітин ЦНС відносять NG2 (glia antigen-2) гліальні клітини, які також називають клітинами-попередниками олігодендроцитів [236].

Було показано, що NG2-позитивні гліальні клітини є імуносупресивними щодо імунних подразників, демонструючи таким чином, що ці клітини є новою складовою гліальних клітин в

центральної нервовій системі, яка контролює нейроімунологічні функції [202].

Взаємодія між різними групами гліальних клітин при нейрозапаленні є надзвичайно складним і динамічним процесом.

Тому недостатньо розглядати роль лише конкретної групи гліальних клітин щодо нейрозапалення, а необхідно досліджувати клітинні механізми розвитку нейрозапалення лише в комплексі, з урахуванням реакції усіх типів гліальних клітин.

Узгоджену дію гліальних клітин при ініціації та поширенні нейрозапалення можна описати таким чином.

Дефіцит кисню і енергозабезпечення метаболізму клітин та підвищена екситотоксичність глутамату за таких обставин, як механічні травми, локальна ішемія або епілепсія, викликають підвищений $[K^+]_o$ та $[Ca^{2+}]_i$ одночасно із надактивацією NMDA-рецепторів та відкриттям напівканалів паннексину-1, що призводить до вивільнення АТФ/глутамату (**Рис. 8.2**).

Вмираючі нейрони або олігодендроцити та астроцити вивільняють високі концентрації АТФ (який потім швидко гідролізується до АДФ), глутамату та NO, утворюючи хімічний градієнт (**Рис. 8.2**).

Сигнали АТФ і глутамату можуть посилюватися за допомогою аутокринної/паракринної сигналізації як нейронами, так і гліальними клітинами.

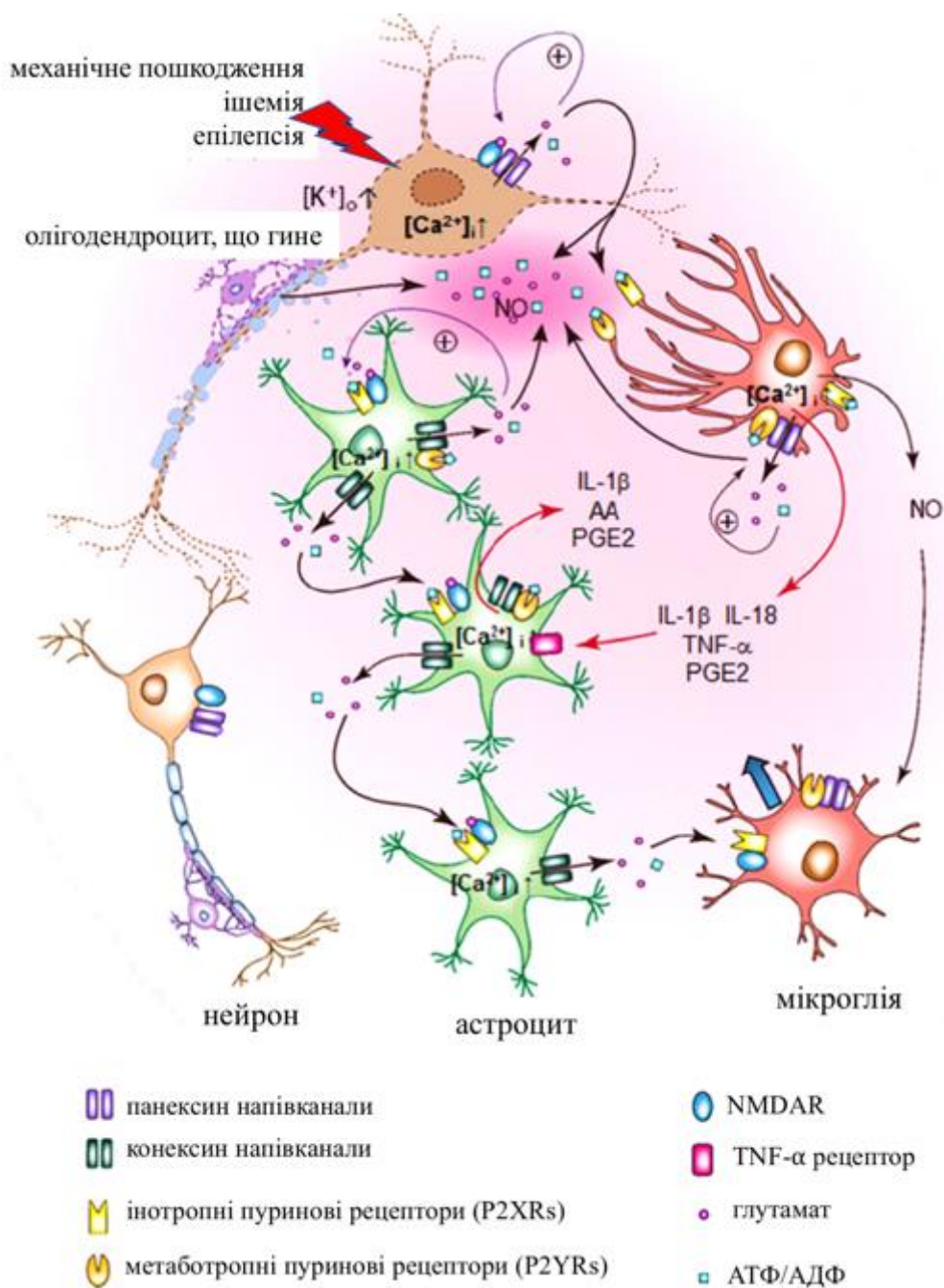


Рис. 8.2. Узгоджена дія гліальних клітин при ініціації та поширенні нейрозапалення через гліотрансмітери та кальцієву сигналізацію. Модифіковано з [317].

Було показано, що позаклітинна АТФ служить сигнальною молекулою для мікроглії, яка швидко мігрує у місце запалення за

допомогою активації метаботропного пуринового рецептора (P2Y₁₂R) та іонотропного пуринового рецептора (P2X₄R) [217]. Навпівканали панексин-1 і P2XR, що експресуються на нейронах, астроцитах і мікроглії, пов'язані з компонентами інфламасоми (**Рис. 8.2**).

Активація рецепторів P2X та відкриття напівканалів паннексину-1 можуть викликати утворення NLRP1/NLRP2 інфламасом у нейронах/астроцитах та NLRP1/NLRP3 інфламасом у мікроглії, що призводить до продукування прозапальних цитокінів (IL-1 β та IL-18) [94, 103].

Активація P2Y₁R на астроцитах може викликати продукування арахідонової кислоти (AA) та простагландину E₂ (PGE₂).

Аналогічно, активація P2Y₆R на мікрогліальних клітинах опосередковує вивільнення NO (**Рис. 8.2**) [246, 312].

Позаклітинна АТФ і прозапальні фактори (IL-1 β , TNF- α і PGE₂), що виділяються активованою мікроглією, можуть ініціювати хвилі Ca²⁺ в астроцитах.

Астроцити експресують дуже високий вміст конексинів, які утворюють напівканали, проникні для АТФ та глутамату [139].

Поширення хвиль Ca²⁺ серед астроцитів відбувається головним чином завдяки активації P2YRs та NMDAR, які опосередковують міжклітинний транз'єнт Ca²⁺ [97, 152].

Збільшення [Ca²⁺]_i в астроцитах викликає вивільнення АТФ та глутамату, який згодом запускає Ca²⁺ транз'єнт у сусідніх клітинах шляхом активації P2YRs та NMDAR.

Гліотрансмітери (АТФ, глутамат і NO) спільно опосередковують швидкий хемотаксис і активацію мікроглії. Хвилі

Ca^{2+} спрямовують віддалені активовані мікрогліальні клітини мігрувати до місця запалення (**Рис. 8.2**) [81, 169].

У нашій роботі ми також продемонстрували збільшення кількості активованих мікрогліальних клітин у зоні пошкодження мозолистого тіла, спричиненого моделюванням перивентрикулярної лейкомаляції і нейрозапалення.

Можливо таке збільшення кількості мікрогліальних клітин відбулося зокрема і завдяки міграції мікроглії в зону пошкодження, спричиненої гліотрансмітерами, які викликали хемотаксис мікроглії.

У наших дослідженнях ми також спостерігали трансформацію морфології гліальних клітин під час моделювання перивентрикулярної лейкомаляції з розгалуженої форми в активований фенотип (**Рис. 3.4, 3.5**).

Активовані мікрогліальні клітини трансформувалися з розгалуженої форми, яку мали клітини контрольних тварин, у стан із яскраво вираженою гіпертрофією, коли діаметр соми і товщина відростків істотно збільшувалися (**Рис. 3.5**).

Відомо, що морфологія мікроглії є однією з її динамічних характеристик. І хоча мікрогліальні клітини вочевидь рівномірно розподілені в паренхімі нервової тканини, більш детальні спостереження показали, що ані морфологія, ані розподіл цих клітин не є рівномірним у різних ділянках головного мозку, що свідчить про те, що мікрогліальні клітини чутливі до навколишнього мікрооточення [88].

За своєю формою мікрогліальні клітини поділяються на три основні морфологічні підтипи: компактні, поздовжньо розгалужені та радіально розгалужені [156].

Ці морфологічні підтипи тісно пов'язані з функціональним станом мікрогліальних клітин [65].

У нормальних умовах переважає фенотип "відпочиваючої" мікроглії ("resting microglia"), який характеризується розгалуженою морфологією.

Однак така мікроглія насправді не відпочиває, а постійно сканує своє навколишнє мікрооточення [218], регулюючи активність нейронів, забезпечуючи «тонке налаштування» нейронних мереж [192, 265] та нейротрансмітерної сигналізації/синаптичної передачі [33, 75].

У процесі нейрозапалення розгалужена мікроглія може переходити в активований стан, який характеризується набряклими розгалуженими клітинами з більшою сомою і більш короткими і товстими відростками (**Рис. 8.3**), або мікроглія може набувати реактивного стану, в якому клітини, як правило, мають невеличку сферичну форму, але можуть також мати паличкоподібну або амебоїдну морфологію [65].

Наступний стан активованої мікроглії може бути фагоцитарним, представляючи «реактивний фенотип» з відростками, що містять пікнотичні фрагменти.

Цей стан спостерігається в патологічних ситуаціях [282], а також у фізіологічних станах під час розвитку мозку або в нейрогенних нішах [274].

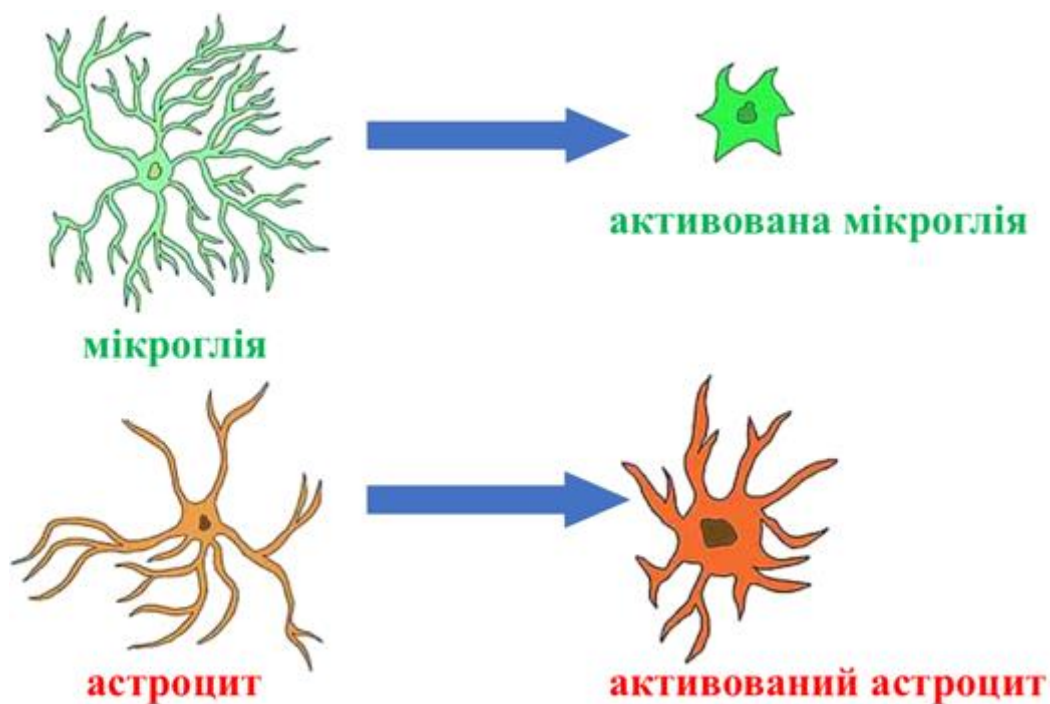


Рис. 8.3. Схематичне зображення зміни морфології гліальних клітин за активованим фенотипом. Модифіковано з [225].

Деякі типи мікрогліальної морфології пов'язані зі стадією її рухливості, коли клітини мають динамічні відростки, які демонструють цикли розгинання та втягування.

Або, навіть, мікроглія може мати локомоторну стадію, коли вона фактично переміщується з одного місця до іншого всередині тканини [238].

У нашому дослідженні під час моделювання перивентрикулярної лейкомаляції ми також спостерігали трансформацію морфології астрогліальних клітин із розгалуженої форми в активований фенотип (**Рис. 3.4**).

Було показано, що астроцити реагують на пошкодження гіпертрофією відростків і соми, посиленням проліферації та

підвищенням рівня експресії проміжних філаментів, таких як GFAP, віментин та нестін.

Ці зміни є важливими маркерами явища, відомого як реактивний астрогліоз [34].

Збільшення експресії GFAP, основного компонента проміжних філаментів астроцитів, розглядається як маркер реактивних астроцитів у приматів та гризунів [45].

Збільшення кількості та довжини GFAP-позитивних відростків, виявлених імунофарбуванням на GFAP, продемонстровано при різних патологічних станах і часто використовується для визначення астроцитарних морфологічних змін, таких як клітинна гіпертрофія [231].

У нашому дослідженні імуногістохімічне фарбування фронтальних зрізів головного мозку миші також показало, що після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції спостерігалось збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних реактивних астроцитів у порівнянні із контрольною групою тварин.

Liddelov та ін. виокремили два підтипи реактивних астроцитів - "A1" та "A2" [164]. Вони виявили, що реактивні астроцити A1 індуються факторами IL-1 α , TNF α і C1q, які секретуються активованою мікроглією.

Ці астроцити мають мало фізіологічних функцій, але сприяють загибелі нейронів та олігодендроцитів.

Реактивні астроцити A2, навпаки, належать до нейропротекторного підтипу.

Rakers та ін. нещодавно дослідили зміни транскриптомів після експериментальної фокальної ішемії [274].

Маркери реактивних астроцитів *Lcn2*, *Gfap*, *Vimentin*, *Timp1*, були сильно експресовані, як і очікувалося.

Також спостерігалось посилення експресії генів, що сприяють запаленню (наприклад, *Spp1*, *Cd52*, *Lcn2* та *Ifi202b*), поділу клітин та міграції (наприклад, *Cdk1*, *Myo1f* та *Anxa3*), а А2-специфічні транскриптоми переважали через 72 год після експериментальної фокальної ішемії [274].

Дослідження *in vitro* показало, що ІЛ-1 β може індукувати реактивний астрогліоз, посилення секреції медіаторів запалення, таких як ІЛ-6 та CXCL5, та підвищення рівня нейротрофних факторів, таких як нейротрофічний фактор мозку та фактор росту нервів [292].

Ці транскриптомні аналізи виявили, що реактивні астроцити можуть виконувати як прозапальну, так і нейропротекторну функції.

Крім того, цитокіни, що продукуються мікроглією, мають вирішальне значення для визначення фенотипу астроцитів.

Отже, зміна морфології гліальних клітин, а також посилення проліферації та підвищення рівня експресії проміжних філаментів під час моделювання перивентрикулярної лейкомаляції може свідчити про активацію астроцитів і мікрогліальних клітин - реактивний гліоз.

Під час прогресування нейрозапалення реактивні гліальні клітини виділяють значну кількість прозапальних медіаторів, які сприяють підвищенню проникності гематоенцефалічного бар'єра та залучають імунні клітини периферичної крові для проникнення в паренхіму центральної нервової системи для знищення патогенів або уламків ушкодженої тканини [317].

У той же час реакції гліальних та імунних клітин координуються для захисту тканини від вторинного ураження, спричиненого активацією запалення.

Тому одночасно з прозапальною реакцією активується і протизапальна [317].

У цьому процесі клітини глії можуть проявляти різні функції, які можуть або погіршити, або покращити стан пошкодженої нейрозапаленням тканини.

Двосторонній характер нейрозапалення визначається різноманітними фенотипами клітин глії та їх взаємодією між собою (Рис. 8.4).

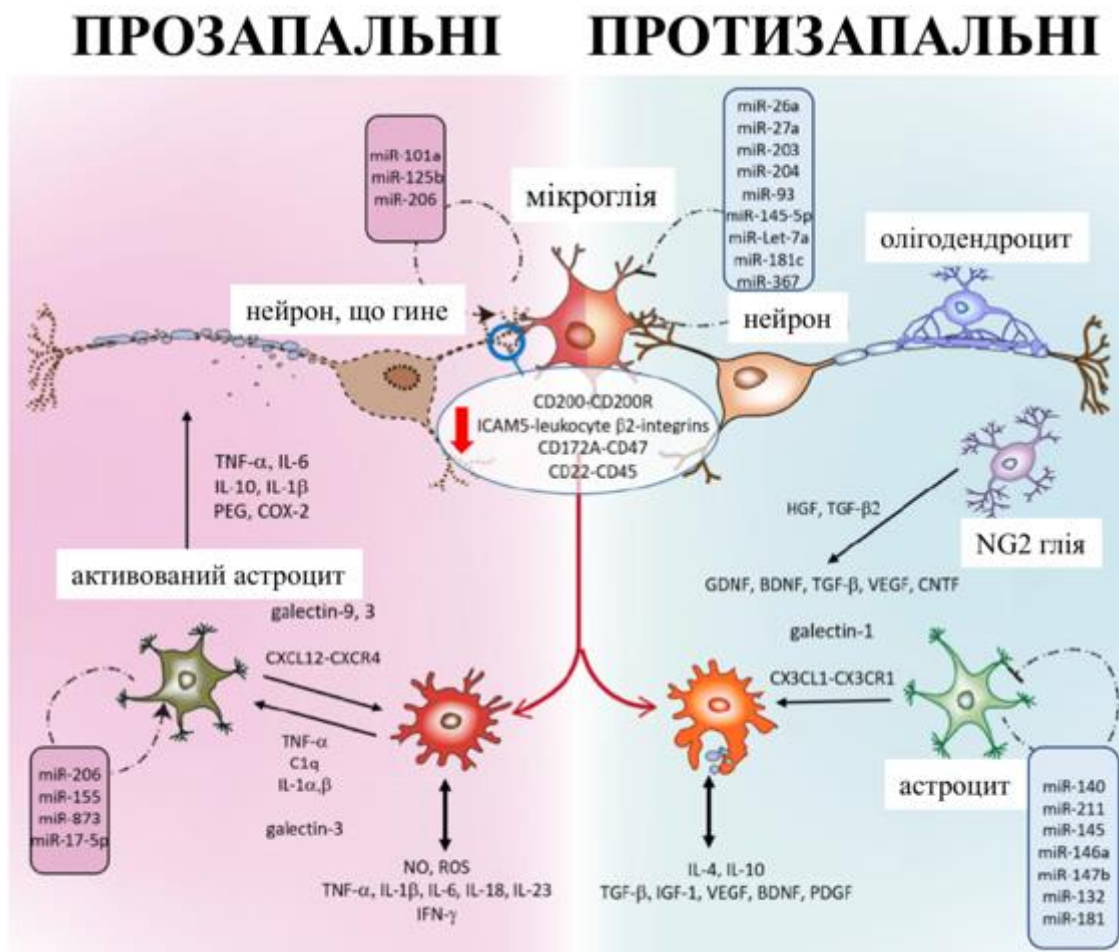


Рис. 8.4. Двосторонній характер процесів активації гліальних клітин та баланс про-/протизапальних факторів під час прогресування нейрозапалення. Модифіковано з [317].

Активовані гліальні клітини можна поділити на два протидіючі класи під час прогресування нейрозапалення:

1) прозапальна мікроглія, що секретує прозапальні медіатори (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-23, IFN- γ , NO та ROS) і ці прозапальні медіатори сприяють диференціації токсичної мікроглії. Цитокіни (IL-1 α / β , TNF- α та C1q), що секретуються активованою мікроглією, активують токсичні астроцити, які сприяють загибелі нейронів та олігодендроцитів [228, 261].

2) протективна мікроглія, що секретує протизапальні медіатори (IL-4, IL-10, TGF- β , IGF-1, VEGF, BDNF та PDGF) та бере участь в очищенні клітинного дебрису та відновленні тканин [52, 313].

Регулювання балансу про-/протизапального процесів між нейронами та гліальними клітинами відбувається таким чином:

(1) про- та протизапальні медіатори впливають на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи нейрозапалення та формують позитивні/негативні зворотні зв'язки в мікроглії та астроцитах для активації/супресії продукування прозапальних факторів [317];

(2) контакт-залежна взаємодія сигнальних шляхів між нейронами та мікроглією (CD200-CD200R, CD22-CD45, CD172A-CD47, ICAM5-лейкоцит та β 2-інтегрини) зменшує процес запалення [70, 96].

(3) паракринна/аутокринна сигналізація розчинних факторів: хемокіни (CXCL12 – CXCR4, CX3CL1 – CX3CR1), нейротрофні фактори (GDNF, BDNF, TGF- β , VEGF, CNTF та HGF) та інші білки, що секретуються (галектин-1,3,9) [22, 171, 216].

Отже, можна дійти до висновку, що прогресування нейрозапалення є балансуєчим процесом двох протидіючих сил (проти та протизапальної).

Неоднорідність клітин глії та різноманітні механізми міжклітинної регуляції формують двосторонній характер нейрозапалення.

Результат нейрозапалення буде залежити від того, яка сторона виграє в цій боротьбі.

На моделі перивентрикулярної лейкомаляції *in vivo* ми також продемонстрували, що найбільш чутливими клітинами, які пошкоджуються при перивентрикулярній лейкомаляції, були олігодендроцити.

Відомо, що олігодендроцити вразливі до різних пошкоджуючих чинників через їх високі метаболічні потреби [143].

Зокрема було продемонстровано, що олігодендроцити дуже вразливі до ішемії і після інсульту зазвичай спостерігається пошкодження мієлінової оболонки [28, 174].

Таке пошкодження мієлінової оболонки тісно пов'язане з функціональним порушенням роботи центральної нервової системи.

Нездатність проліферуючих клітин-попередників олігодендроцитів дозрівати в зрілі олігодендроцити призводить до збою ремієлінізації, що перешкоджає неврологічному одужанню після інсульту [174].

Було показано, що вплив мікроглії на олігодендроцити має велике значення в ремієлінізації. Прозапальні фактори, які продукуються активованою мікроглією, ушкоджують олігодендроцити та попередники олігодендроцитів [69].

Продемонстровано, що нейрозапалення, опосередковане TNF, MMP3 та MMP9, є важливим фактором пошкодження білої речовини та апоптозу олігодендроцитів [318].

Однак васкулярний ендотеліальний фактор росту C (VEGF-C), що продукується мікроглією, стимулює проліферацію попередників олігодендроцитів через рецептор VEGFR-3 [29].

Це може означати, що мікроглія може відігравати подвійну роль у функціонуванні олігодендроцитів.

Як для реактивних астроцитів виділяють 2 підтипи - A1 і A2, так і для мікроглії - M1 і M2.

Відомо, що мікроглія типу M1 продукує прозапальні цитокіни та нейротоксини, які призводить до подальшого пошкодження тканини. А мікроглія фенотипу M2, навпаки, має нейропротекторну дію і продукує IL-10, трансформуючий фактор росту- β та інші імуномодулюючі фактори [62].

Дослідження показали, що перетворення мікроглії фенотипу M1 у M2 пов'язане саме із ремієлінізацією [190].

Тому мікроглія M2, яка виконує функції протекторних клітин, може сприяти відновленню ушкоджених олігодендроцитів.

У нашій роботі, ми також продемонстрували, що одним з клітинних механізмів, відповідальних за нейропластичність нервової тканини у відповідь на органічні ураження головного мозку, зокрема ішемічне ушкодження, може бути активація ендогенного нейрогенезу, якій проявляється в збільшенні кількості нейронів, структурній перебудові нейронних мереж та утворенні нових синапсів.

У дорослому організмі нейрогенез відбувається, головним чином, у двох ділянках головного мозку: субвентрикулярній зоні та субгранулярній зоні зубчастої звивини [260].

На нейрогенез можуть впливати різні фізичні, фармакологічні та патологічні стани, зокрема, ішемічний інсульт [54].

Було показано, що ішемічне ушкодження мозку посилює нейрогенез і це може сприяти відновленню втрачених функцій шляхом утворення нових нейронів, які здатні замінити пошкоджені або загині нейрони [176].

Незважаючи на такий нейрогенез, спричинений гіпоксією/ішемією, пошкоджений мозок ссавців всеодно має низьку здатність до регенерації.

Однією із причин такого низького регенеративного потенціалу дорослого мозку є зменшення кількості нейральних стовбурових клітин у зонах нейрогенезу в процесі старіння організму [154].

Тому, зараз активно досліджується можливість застосування трансплантації стовбурових клітин різного генезу для лікування ішемічних і дегенеративних захворювань нервової системи [223].

Позитивний ефект такої трансплантації може полягати в заміні популяції пошкоджених або загиніх клітин новими, підтримці процесів відновлення нейронів реципієнта, поповненні запасів біологічно активних речовин та стимуляції ендogenous нейрогенезу [55].

Отже, отримані нами дані продемонстрували, що трансплантація нейральних прогеніторних клітин після ішемічного ушкодження мозку в мишей достовірно збільшувала кількість BrdU-імунопозитивних проліферуючих клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини, а також сприяла диференціації ендогенних нейральних прогеніторів у нейрогенному напрямку (Рис. 3.1, 3.2).

Іншим перспективним клітинним агентом у регенеративній медицині можуть бути мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини, які мають тропність до зони пошкодження, можуть пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати гомеостаз імунної системи завдяки фізичній та/або хімічній взаємодії з клітинами імунної системи [20].

Використання аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин дозволило б вирішити питання імунологічної сумісності трансплантованого матеріалу і тестування його на інфекції, а також уникнути етичних та юридичних проблем з приводу фетального донорського матеріалу [53].

У нашому дослідженні ми продемонстрували, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в умовах їх безконтактного спілкування зі зрізами головного мозку мали нейропротекторний вплив на нервову тканину, зменшуючи реактивний астро- та мікрогліоз та збільшуючи кількість Rip-1-імунопозитивних олігодендроцитів.

Це може свідчити про те, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини здатні реалізувати свої нейропротекторні властивості паракринно завдяки секреції різноманітних факторів.

З'ясувавши патогенетичні механізми розвитку перивентрикулярної лейкомаляції на *in vivo* моделі, ми вирішили

створити *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші для виявлення клітинних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та дослідження механізмів нейропротекторної дії неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції.

Органотипова культура зрізів головного мозку дає можливість досліджувати морфо-функціональні зміни на клітинному рівні при моделюванні патологічних станів та виявляти ефекти нейропротекторних факторів, зокрема мікрополяризації.

Умови культивування також дозволяють використовувати електродну техніку для підведення постійного електричного струму до шару нервових клітин, подібно терапії з використанням мікрополяризації.

Для моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* використовували органотипову культуру зрізів головного мозку, яку отримували з мишей 7-денного віку. Перивентрикулярну лейкомаляцію моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду.

Додавання у культуральне середовище бактеріального ендотоксину ліпополісахариду, дозволяє змоделювати умови подібні тим, що виникають при нейрозапальних процесах, які лежать в основі патогенезу багатьох захворювань центральної нервової системи.

У своїх дослідженнях ми продемонстрували, що саме спільна дія гіпоксично-ішемічного ушкодження та запалення (ліпополісахариди) має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо.

На створеній нами *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції ми показали, що така спільна дія гіпоксично-ішемічного ушкодження та запалення призводила до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдагідрогепази у культуральне середовище, деградації основного білка мієліну, що свідчить про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняла виражений реактивний астро- та мікрогліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

Механізми такої сенсипілізації головного мозку до гіпоксично-ішемічного ушкодження на тлі введення ліпополісахаридів ще не до кінця відомі.

Але однією з причин такої сенсипілізації може бути активація циклооксигенази-2 (COX-2) та збільшення утворення простагландинів E2, у результаті чого підвищується активність метаботропних глутаматних рецепторів через зменшення експресії GRK2 (G-protein-coupled receptor kinase 2).

Крім того відбувається активація Toll-подібних рецепторів за допомогою MyD88, що спричиняє секрецію цитокінів [189, 315].

Такі ж результати були отримані нами і на *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції.

Тому ми вважаємо, що створену нами *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної, а також шляхів нейропротекції головного мозку при цій патології, зокрема перспективних нейропротекторних факторів, зокрема мікрополяризації.

На короткостроковій культурі дисоційованих клітин гіпокампа ми показали, що мікрополяризація підвищувала метаболічну активність нервових клітин у нормі та запобігала їх ушкодженню при моделюванні процесу нейрозапалення.

У початковий період культивування, мікрополяризація значно підвищувала ефективність формування нервових відростків, у тому числі в присутності фактору запалення – ліпополісахаридів.

В умовах довгострокової культури, коли нейромережі добре розвинені, ми показали, що вплив мікрополяризації на нейритогенез був менш виражений, але стабілізуючий ефект мікрополяризації, також проявлявся в присутності ліпополісахаридів.

Ми спостерігали цікаві особливості архітектури нейромереж у довготривалій культурі клітин гіпокампа під час впливу ліпополісахаридів та мікрополяризації.

Візуалізація просторового розподілу нейритів в умовах мікрополяризації виявила ділянки односпрямованого розташування нейрональних відростків, яке було, вочевидь, не випадковим.

Схожі результати були отримані в роботі Pan та Borgens [226]. Вони продемонстрували, що під час безпосереднього впливу електричної стимуляції на нейрони *in vitro* спостерігалось збільшення нейритів, перпендикулярних до електричного поля, посилення росту та міграції [226].

Також на зрізах мозку миші була продемонстрована роль синаптичної пластичності, спричиненої електричною стимуляцією, яка може лежати в основі впливу мікрополяризації на рухове навчання [95].

Результати, отримані на зрізах мозку щурів, свідчать про те, що електрична стимуляція модулює довготривалу потенціалізацію

залежно від полярності, підтверджуючи таким чином регуляторну роль мікрополяризації щодо синаптичної пластичності [249].

Описано також ефекти електростимуляції на астроцити *in vitro*, які полягали у зміні метаболізму залежно від поляризації поля та прикладеної напруги [116], а також міграції та перпендикулярному до напрямку електричного поля розташуванні [232].

Можна зробити висновок, що мікрополяризація має потенціал безпосередньо стимулювати не лише нейрони, а й гліальні клітини, оскільки індуковані мікрополяризацією зміни мембранного потенціалу аналогічні змінам, індукованим в астроцитах під час активації нейронів [259].

Також на моделях *in vitro* був продемонстрований безпосередній вплив електричної стимуляції на ендотеліальні клітини.

Такий ефект полягав у перпендикулярному до напрямку електричного поля розташуванні, міграції та подовженні клітин [324].

Ці ефекти можуть бути пов'язані зі збільшенням секреції VEGF, що дозволяє припустити, що електрична стимуляція може також модулювати й ангиогенез [324].

Дослідження на культурі ендотеліальних клітин, на яку впливали фізіологічним електричним полем (3,3 мВ/мм), показали підвищення продукції NO, що дозволяє припустити, що електрична стимуляція може збільшити перфузію головного мозку [298].

Вважається, що перицити відіграють роль передавачів сигналів від нейронів до ендотеліальних клітин [105].

Під час активації нейрона відбувається вивільнення глутамату, який спричиняє продукування простагландину E₂, який, в

свою чергу, індукує розширення капілярів шляхом активації K^+ струмів у перицитах.

Електрофізіологічні та фармакологічні дослідження показали, що перицити головного мозку є електрично збудливими клітинами [46].

Тому прямий вплив мікрополяризації на мембранний потенціал перициту може гіперполяризувати його та викликати судинорозширювальні сигнали.

Отже, потрібні додаткові дослідження для більш глибокого розуміння впливу транскраніальної мікрополяризації на ненеуронні складові нейроваскулярної одиниці.

Отримавши результати експериментального дослідження дії мікрополяризації на нервову тканину при моделюванні нейрозапалення *in vitro*, ми вирішили дослідити вплив транскраніальної мікрополяризації у комплексному лікуванні пацієнтів із органічними ураженнями ЦНС.

Незважаючи на те, що дані, отримані в дослідженнях на тваринах можна екстраполювати на людей [35], необхідно відзначити, що стимулюючі параметри, які використовуються у тварин у *in vivo* та *in vitro* протоколах, вищі, ніж у людей, в яких максимальна щільність струму, що використовується, дорівнює $\sim 0,28 \text{ A/m}^2$ [120].

На відміну від людей, максимально безпечна стимуляція, яка використовується у щурів, дорівнює $142,9 \text{ A/m}^2$ [165].

Ефекти транскраніальної мікрополяризації залежать від розміру, полярності і положення електродів, сили струму, тривалості стимуляції, а також властивостей тканини.

Спрямованість впливу постійного струму під час процедури транскраніальної мікрополяризації досягається завдяки використанню електродів малої площини (100-600 мм²), які розташовуються на відповідних коркових (фронтальна, моторна та ін. ділянки) проекціях головного мозку.

У нашій роботі ми показали, що використання методу транскраніальної мікрополяризації в комплексному лікуванні пацієнтів із органічними ураженнями центральної нервової системи покращувало показники мозкової гемодинаміки.

Ми продемонстрували, що транскраніальна мікрополяризація зменшувала коефіцієнт асиметрії кровообігу по середніх та передніх мозкових артеріях, а також зменшувала високі і збільшувала низькі середні швидкості кровообігу за цикл по базилярній артерії, середніх та передніх мозкових артеріях у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку.

Транскраніальна мікрополяризація дозволяє спрямовано впливати не лише на коркові структури, які розташовані в піделектродному просторі, а й через систему кортикофугальних і транссинаптичних зв'язків впливати на стан структур мозку, які розташовані нижче, зокрема гіпоталамус [290].

Збудження гіпоталамуса супроводжується виділенням вазопресину в гіпофізі і адреналіну в наднирниках з їх подальшою дією на серце і судини, а також виділенням реніну нирками в результаті прямих нейрогенних впливів на їх юктагломерулярний апарат.

Кінцевим результатом цього процесу є підвищення артеріального тиску завдяки посиленому утворенню і наростанню в крові ангіотензину II.

Таким чином реалізується гіпоталамічний вплив на кровоносну систему гуморальним шляхом (центральний механізм впливу транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг).

Однією з унікальних особливостей мозкового кровообігу є тісний структурний і функціональний контакт між кровоносними судинами, нейронами та гліальними клітинами.

Hawkins і Davis запропонували концепцію нейроваскулярної одиниці, яка складається з ендотеліальних клітин, клітин мозку і позаклітинного матриксу та функціонує як єдине ціле за допомогою біохімічного сигналіngu (Рис. 8.5) [110].

Структурними компонентами нейроваскулярної одиниці є (Рис. 8.5):

1) Спеціалізовані клітини ендотелію, що вистеляють мозкові судини.

2) Щільні контакти між ендотеліальними клітинами, що обмежують диффузію між клітинами і ефективно «ущільнюють» судини.

3) Суцільна базальна мембрана, що охоплює клітини ендотелію. Перицити вбудовані в цю мембрану, розташовану між ендотеліальними клітинами та астроцитними ніжками.

4) Астроцити, що розташовані в паренхімі мозку. Ці клітини розповсюджують свої відростки, які контактують з нейронами та синапсами, а також охоплюють своїми астроцитними ніжками мозкові судини. Тому така локалізація астроцитів ідеально підходить для сприйняття і реагування як на нервові, так і на судинні сигнали.

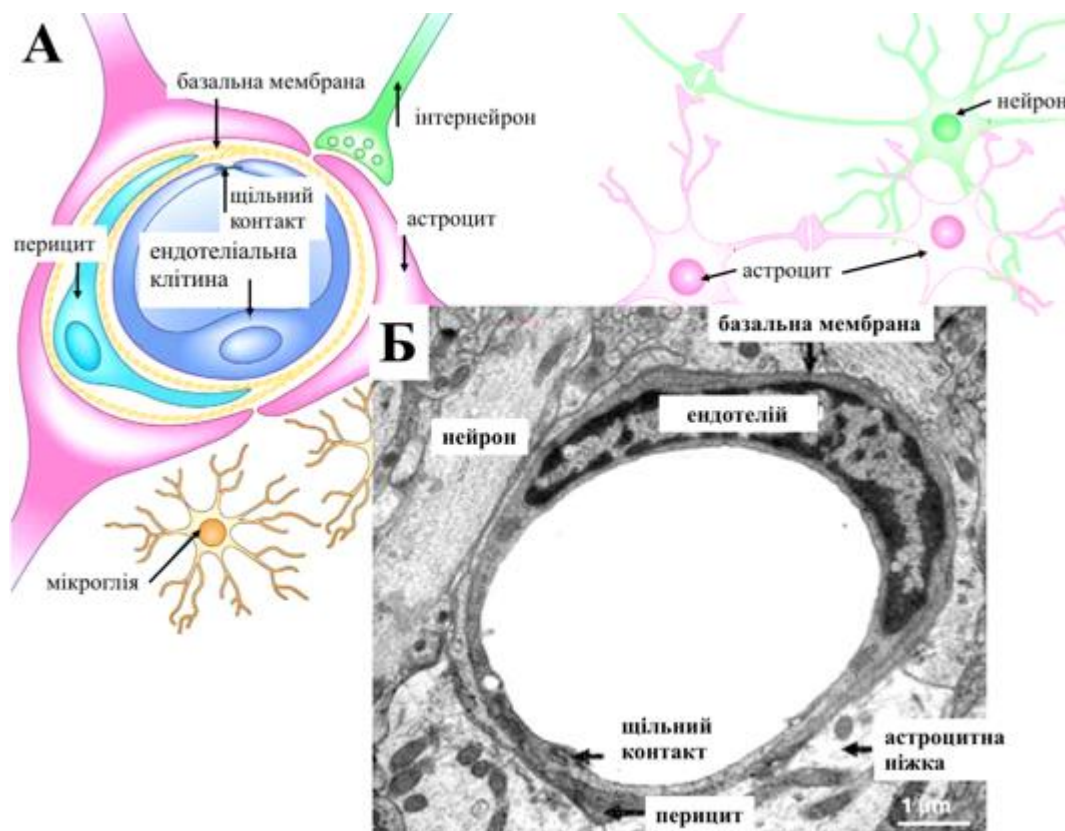


Рис. 8.5. Анатомічна будова нейроваскулярної одиниці. А - схематичне зображення. Б - електронна мікрофотографія мозкового капіляра щура. Модифіковано з [180].

5) Резидентні мікрогліальні клітини, які використовують свої довгі відростки для аналізу навколишнього мікросередовища і швидкого реагування на його зміни.

б) Локальні інтернейрони, що іннервують мозкові судини і можуть спонукати судини змінювати свій тонус, залежно від вхідних нейронних аферентних сигналів.

Відомо, що важливу роль у регулюванні мозкового кровообігу відіграють астроцити [191].

Нейромедіатори, що вивільняються з активних нейронів викликають збільшення Ca^{2+} в астроцитах, що спричиняє

вивільнення вазоактивних метаболітів арахідонової кислоти з астроцитарних ніжок, які містяться на кровоносних судинах [110, 191].

Були описані вазоконстрикторні та вазодилаторні властивості гліальних клітин [185], надаючи важливу роль гліальній eNOS у вазодилатації [281].

Нові дані свідчать про те, що астроцити також є компонентами нещодавно описаної «глімфатичної системи» - важливого механізму виведення розчинених речовин з мозку [119].

Глімфатична система складається з спрямованого потоку рідини вздовж аблумінальної поверхні ендотелію мозку під астроцитними ніжками, які експресують високий рівень AQP-4 (Рис. 8.6) [203].

Конвективний рух позаклітинних рідин і розчинних речовин сприяє кліренсу паренхіми мозку з дренажем (принаймні частковим) у периваскулярний простір.

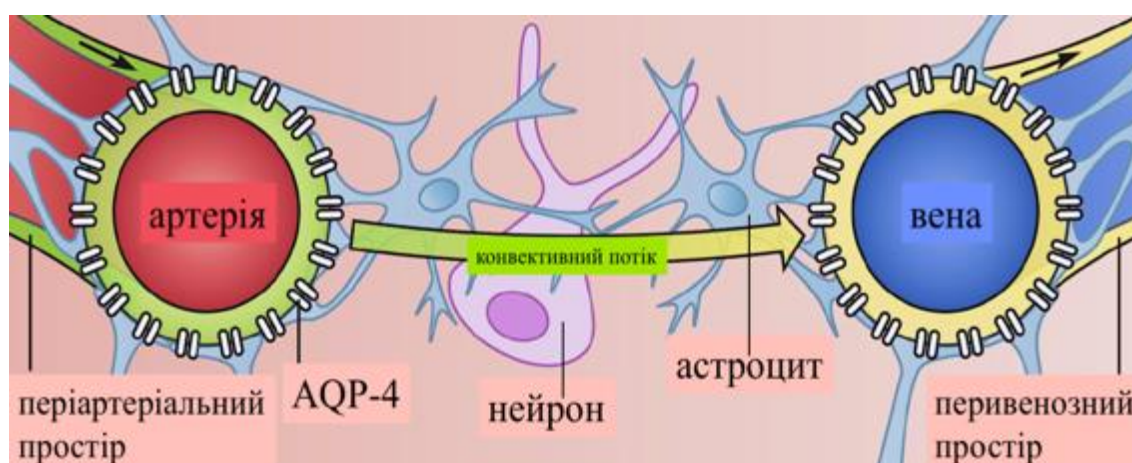


Рис. 8.6. Схематичне зображення периваскулярного кліренсу в мозку: глімфатична система. Модифіковано з [180].

Також важливими компонентами нейроваскулярної одиниці є перицити, які виконують функцію регуляторів гематоенцефалічного бар'єру, а також є потенційними медіаторами судинної дисфункції мозку [107].

До вже визначених функцій перицитів належать вазоконстрикція, гемостаз та ангиогенез.

Зважаючи на їх скорочувальні властивості, перицити можуть виступати в ролі гладком'язових клітин у мікросудинах мозку.

Оскільки існує тісний взаємозв'язок між активністю нейронів і мозковим кровообігом, то було показано, що транскраніальна мікрополяризація впливає на гемодинаміку, збільшуючи перфузію мозку, як показано в дослідженнях на тваринах [109] і людях [325].

Було продемонстровано, що стимуляція нейронів мозочка спричиняє збільшення діаметра як сусідніх артеріол, так і висхідних судин [118].

На моделі ішемічного ушкодження мозку в щурів було показано, що мозочкова стимуляція у фастигiальному ядрі зменшувала наслідки ішемії через NO-опосередковані гемодинамічні механізми [323].

Транскраніальна мікрополяризація, завдяки прямому впливу на нейрони, які розташовані в піделектродному просторі, може моделювати синаптичну передачу шляхом регулювання нейромедіаторів, таких як ГАМК, глутамат, серотонін, дофамін та інших [208].

Синтез простагландину E2 і епоксіейкозатрієнової кислоти розширює кровоносні судини, в той час як 20-гідроксіейкозатетраєнова кислота звужує судини (Рис. 8.7).

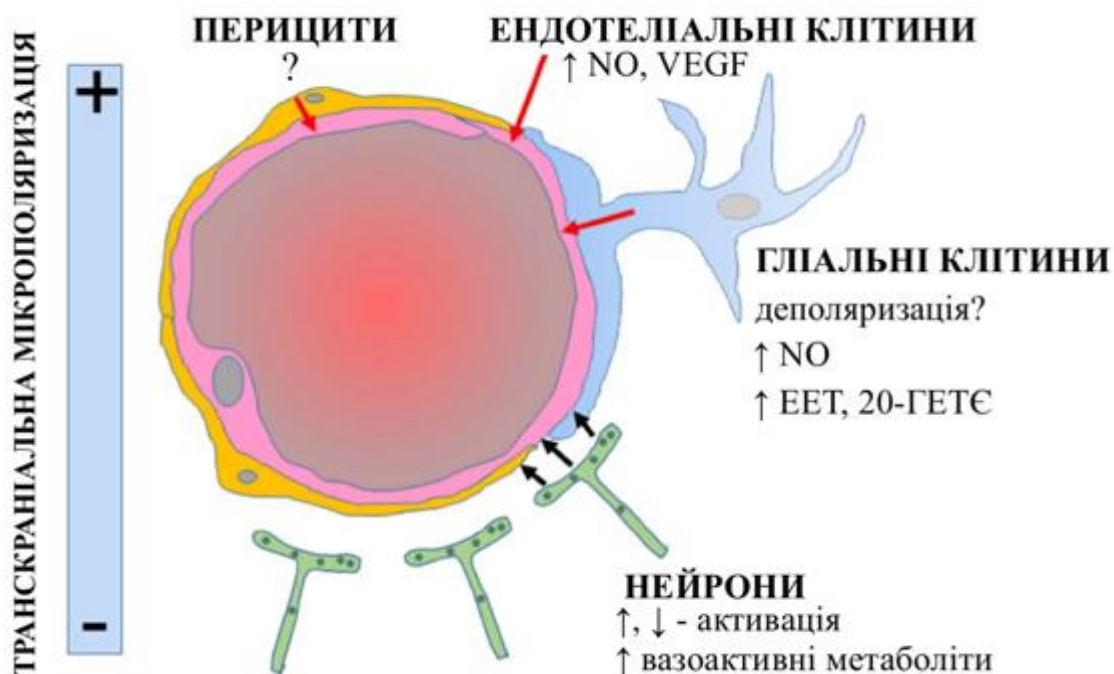


Рис. 8.7. Функціональні взаємодії у нейроваскулярній одиниці та можливі впливи транскраніальної мікрополяризації на різні типи клітин. Електричні поля, спричинені транскраніальною мікрополяризацією, можуть збільшувати, зменшувати або не впливати на частоту спайкових розрядів нейронів. Нейронні метаболіти прямо або опосередковано активують ендотеліальні клітини (чорні стрілки), індуюючи вазодилатацію. Можливий прямий вплив транскраніальної мікрополяризації на гліальні, ендотеліальні клітини та перицити зображено червоними стрілками. NO – оксид азоту, VEGF - васкулярний ендотеліальний фактор росту, EET - епоксіейкозатрієнові кислоти, 20-ГЕТЄ - 20-гідроксіейкозатетраєнові кислоти. Модифіковано з [245].

Вивільнення K^+ з астроцитних ніжок також може сприяти вазодилатації [25] (локальний механізм впливу транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг).

Взаємозв'язки між нейронними та судинними ефектами складні, і важко розмежовувати ефекти електричної стимуляції на ці дві тканини.

Однак очевидно, що крім прямих судинних ефектів від метаболітів, що продукуються нейронами, також має місце й безпосередній вплив транскраніальної мікрополяризації, яка модулює мозковий кровотік, на ненеуронні клітини, особливо гліальні та ендотеліальні.

Транскраніальна мікрополяризація може бути використана як окремий терапевтичний метод, так і в поєднанні зі стандартною терапією для корегування збудливості кори головного мозку у пацієнтів із різними неврологічними розладами [101].

Було показано, що транскраніальна мікрополяризація не спричиняє патологічних реакцій у дітей і тому може бути застосована як метод лікування в дитячій неврології [193].

В останні десятиліття спостерігаються значні досягнення в дослідженні нейропластичності головного мозку і важливим завданням є втілення цих результатів у клінічну практику.

В основі пластичності головного мозку лежить здатність нервової системи реагувати на фізіологічні й патологічні зміни зовнішнього або/і внутрішнього середовища шляхом активації нейрогенезу, синаптогенезу, зміни нейрональних зв'язків та гліальних елементів [132].

Усе більшої популярності набувають підходи в лікуванні органічних уражень головного мозку, які спрямовані на максимально можливе відновлення порушених функцій завдяки використанню потенціалу нейропластичності мозку [106, 284].

Незважаючи на значні успіхи в дослідженнях щодо створення нових засобів у лікуванні симптоматичної епілепсії, досі існують прогалини у знаннях щодо патофізіології епілепсії, а також нейрогенеративних механізмів і ендогенних нейропротекторів.

Існує також потреба в дослідженні біомаркерів при епілепсії, які можуть бути використані на рівні з методами нейровізуалізації головного мозку [283].

Основну роль в епілептогенезі відводять структурно-функціональним порушенням у нейронах та гліальних клітинах, а також формуванню стійких патологічних міжнейронних зв'язків [18, 304, 305].

Було показано, що для нейронів осередку судомної готовності найбільш характерне надмірне збудження, яке проявляється в пароксизмальних деполяризаційних зсувах мембранного потенціалу, що призводять до високочастотного розряду нейронів [131].

В епілептогенезі значне місце також посідає порушення контролю за синтезом цАМФ, обміном і транспортом катехоламінів, пептидів, та ін. [301].

Також важливу роль у патогенезі епілепсії відіграють гліальні клітини.

Показано, що пошкодження гліальних клітин призводить до гіперфункції глутамінергічних та гіпофункції ГАМК-ергічних

нейронів, порушення клітинного йонного балансу та в результаті до формування епілептичного осередку [304, 305].

Після кожного епілептичного нападу збільшується кількість епілептичних нейронів, що обумовлює формування патологічних внутрішньоцентральних і міжцентральних зв'язків.

Утворення таких зв'язків спричинено порушенням функціонування антиепілептичної системи [142].

Тому сучасні методи лікування епілепсії спрямовані на усунення перерахованих вище причин, які зумовлюють виникнення судомних проявів: на блокування надходження йонів кальцію в нейрони, усунення нейромедіаторного дисбалансу, нормалізацію метаболічних процесів, активацію антиепілептичної системи тощо [131].

Транскраніальна мікрополяризація може стати ефективним терапевтичним методом для покращення електроенцефалографічних показників у дітей хворих на епілепсію.

Було показано, що під час процедури транскраніальної мікрополяризації підвищується нейронна активність як у зонах дії постійного струму, так і в ділянках, які безпосередньо не піддавалися впливу струму [106].

Однак вираженість функціональних змін у віддалених структурах неоднакова і залежить перш за все від зони кори головного мозку, на яку спрямований вплив, її вихідного і зміненого в ході мікрополяризації функціонального стану і від сили струму.

Підвищення нейронної активності супроводжується збільшенням збудливості в цих ділянках мозку і відповідними змінами їх метаболічної активності.

Показано, що дія мікрополяризації спричиняє позитивні ультраструктурні зміни як самих нейронів, так і синаптичного апарату та гліальних клітин [18].

Відзначено також прискорення процесів регенерації та відновлення нейронної архітектури [85, 106].

Було також показано, що мікрополяризація здатна суттєво впливати на обмін йонів кальцію, а також генерацію і акумуляцію цАМФ, які, як зазначалося вище, відіграють важливу роль в епілептогенезі [122, 195].

Отже, застосування транскраніальної мікрополяризації скроневої і тім'яної зон кори великих півкуль у дітей з симптоматичною епілепсією сприяє зниженню судомних проявів.

Такий ефект обумовлений як нейрофізіологічними механізмами дії постійного струму на нервову тканину, так і можливістю спрямованої зміни структурно-функціонального стану низки підкіркових структур, відповідальних за формування і блокування епілептиформної активності.

Підбиваючи підсумки нашої роботи ми можемо запропонувати кілька механізмів дії мікрополяризації на морфо-функціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку (**Рис. 8.8**):

- зменшення реактивного гліозу;
- підвищення нейритогенезу та щільності синаптоподібних структур;
- покращення мозкової гемодинаміки;
- поліпшення функціонального стану нейром'язового апарату;
- покращення функціонального стану головного мозку.



Рис. 8.8. Механізми дії мікрополяризації на процеси регенерації нервової тканини при органічних ураженнях головного мозку дитини.

Отже, транскраніальна мікрополяризація може стати перспективним методом у лікуванні дітей з органічними ураженнями головного мозку.

Для цього необхідна його подальша розробка з більш глибоким вивченням механізмів впливу постійного струму малої інтенсивності на нервову тканину, пошуком нових, більш ефективних схем транскраніальних мікрополяризаційних впливів, а також їх поєднання з іншими наявними методами.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено детальний аналіз клітинних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції та досліджено вплив комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації на морфо-функціональний стан центральної нервової системи дитини при органічних ураженнях головного мозку. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено такі висновки:

1. На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції показано, що перивентрикулярна лейкомаляція призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) і, відповідно, олігодендроцитів та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.
2. Ішемія-реперфузія головного мозку мишей активує ендогенний нейрогенез у субгранулярній зоні зубчастої звивини і спричиняє збільшення кількості BrdU-позитивних ядер у 1,5 рази порівняно із контрольними тваринами, а трансплантація нейральних прогеніторних клітин у гіпокамп після ішемії-реперфузії збільшує кількість BrdU-позитивних ядер удвічі порівняно із ішемізованими тваринами.
3. На створеній нами *in vitro* моделі перивентрикулярної лейкомаляції показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпополісахаридів має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників

окремо. В органотиповій культурі зрізів головного мозку спільна дія киснево-глюкозної депривації та ліпополісахаридів призводить до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдагідрогенази у культуральне середовище, деградації основного білка мієліну, що відповідає пошкодженню білої речовини головного мозку, та спричиняє виражений реактивний астро- та мікрогліоз.

4. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* реалізують свої нейропротекторні властивості паракринно, зменшуючи реактивний астрогліоз (в 1,7 разів) і мікрогліоз (в 1,6 разів) та збільшуючи кількість Rip-1-імунопозитивних олігодендроцитів удвічі порівняно із групою перивентрикулярної лейкомаляції.
5. Мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та запобігає їх ушкодженню при моделюванні процесу нейрозапалення в короткостроковій культурі дисоційованих клітин гіпокампа. У початковий період культивування, мікрополяризація значно підвищує ефективність формування нервових відростків, зокрема в присутності фактору запалення – ліпополісахаридів. В умовах довгострокової культури вплив мікрополяризації на нейритогенез менш виражений, але стабілізуючий ефект мікрополяризації, також проявляється в присутності ліпополісахаридів.

6. Транскраніальна мікрополяризація зменшує коефіцієнт асиметрії кровообігу по середніх та передніх мозкових артеріях у пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку. Транскраніальна мікрополяризація вірогідно також зменшує високі середні швидкості кровообігу за цикл по базилярній артерії, середніх та передніх мозкових артеріях. Транскраніальна мікрополяризація вірогідно збільшує низькі середні швидкості кровообігу за цикл по базилярній артерії, середніх та передніх мозкових артеріях.

7. Застосування транскраніальної мікрополяризації у пацієнтів із дитячим церебральним паралічем найбільш позитивний ефект мало в дітей зі спастичними формами. Результати електронейрографічного аналізу параметрів Н-рефлексу показали достовірне зниження співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ з $87,72 \pm 6,22 \%$ до $19,84 \pm 2,34 \%$, що вказує на зниження раніше патологічно підвищеної рефлексорної збудливості мотонейронів.

8. Аналіз даних електроенцефалографічного дослідження пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку показав, що після закінчення курсу транскраніальної мікрополяризації у дітей відзначалося виражене покращення електроенцефалографічної картини: відзначалося зменшення вираженості епілептиформних змін, реєструвалося збільшення частоти та амплітуди альфа- та бета-ритмів, а також зменшення амплітуди і частоти дельта- і тета-ритмів. Спостерігалися тенденції до зменшення структурної дезорганізації і дифузного сповільнення електроенцефалограми

при відсутності збільшення пароксизмальної активності та міжпівкульової асиметрії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Жирмунская ЕА, Лосев ВС. Система описания и классификация энцефалограмм человека. М.: Наука; 1994.
2. Зенков ЛР. Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии). Т.: Издательство ТРТУ; 1996.
3. Зенков ЛР, Ронин МА. Функциональная диагностика нервных болезней. (Руководство для врачей). М.: Медицина; 1982.
4. Команцев ВН, Заболотных ВА. Методические основы клинической электронейромиографии. СПб.: Лань; 2001.
5. Кравчук ВС, Мартинюк ВЮ, Зінченко СМ. Допплеренцефалографія у дітей. Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. К.: Інтермед; 2005.
6. Малкова И. Органические поражения мозга у детей. *Psihologie*. 2009;1:55–68.
7. Михайленко ВЕ. Клинико-нейрофизиологическое обоснование применения физических факторов в реабилитации детей с ДЦП: автореф. дис. на присвоение науч. степени канд. мед. наук: спец. 14.03.04 «Патологическая физиология». Ялта; 2005.
8. Надоненко ОМ, Мартинюк ВЮ, Зінченко СМ. Электроэнцефалографічні характеристики у дітей від народження до 3-х років в стані сну і неспання. Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. К.: Інтермед; 2005.
9. Новинская НЛ, Горбачевская ЕВ. Сопоставление клинических, энцефалографических показателей у детей с различными видами интеллектуальной недостаточности. *Неврол психиатр*. 1980;7:17–23.

- 10.Панасюк ЛЮ, Мартинюк ВЮ, Зінченко СМ. Основи медико-соціальної реабілітації дітей з органічним ураженням нервової системи. К.: Інтермед; 2005.
- 11.Росин ЮА. Допплерографія судин головного мозку у дітей. СПб мед изд-во; 2004.
- 12.Семенова КА. Методические рекомендации по применению рабочей классификации детского церебрального паралича. М.; 1973.
- 13.Статистичний бюлетень: заклади охорони здоров'я та захворюваність населення України 2017 році. Держкомстат України. К.;2018.
- 14.Сычѳва МА, Сергеева ИГ, Тулупов АА. Органические поражения головного мозга: учеб.пособие. Н.: РИЦ НГУ; 2015.
- 15.Фарбер ДА, Вильдавский ВЮ. Гетерогенность и возрастная динамика α -ритма электроэнцефалограммы. Физ чел. 1996; 5:52–5.
- 16.Шейнкман ОГ. Особенности функционального состояния мозга недоношенных детей грудного и раннего возраста с перинатальной энцефалопатией и детским церебральным параличом. Ж неврол психиатр им СС Корсакова. 2003;6:37–42.
- 17.Шелякин АМ, Пономаренко ГН. Микрополяризация мозга. Теоретические и практические аспекты. СПб.: ИИЦ “Балтика”; 2006.
- 18.Abdullahi AT, Adamu LH. Neuronal network models of epileptogenesis. Neurosciences (Riyadh). 2017; 22 (2):85–93.
- 19.Abraham S, Shaju M. Innovations in epilepsy management - an

- overview. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(4):564–76.
20. Ahn SY, Chang YS, Park WS. Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage. *Korean J Pediatr.* 2014;57(6):251–6.
21. Alexopoulos AV. Pharmacoresistant epilepsy: Definition and explanation. *Epileptology.* 2013;1(1):38–42.
22. Ali I, Chugh D, Ekdahl CT. Role of fractalkine-CX3CR1 in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiol Dis.* 2015;74:194–203.
23. Allen KA, Brandon DH. Hypoxic ischemic encephalopathy: Pathophysiology and experimental treatments. *Newborn Infant Nurs Rev.* 2011;11:125–33.
24. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awany M, El-Gohary T, et al. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: A randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* 2015;35:186–91.
25. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468:232–43.
26. Back SA, Craig AS, Kayton R, Luo NL, Meshul CK, Allcock N, Fern R. Hypoxia-ischemia preferentially triggers glutamate depletion from oligodendroglia and axons in perinatal cerebral white matter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:334–47.
27. Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: a primary cerebral dysmaturation disorder? *Ann Neurol.* 2014;75:469–86.
28. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017;134:331–49.
29. Bain JM, Moore L, Ren Z, Simonishvili S, Levison SW. Vascular endothelial growth factors A and C are induced in the SVZ

- following neonatal hypoxia/ischemia and exert different effects on neonatal glial progenitors. *Transl Stroke Res.* 2013; 4:158–70.
30. Bax MC, Flodmark O, Tydeman C. Definition and classification of cerebral palsy. From syndrome toward disease. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 2007;109:39-41.
31. Bax MCO. Terminology and classification of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1964;6:295–307.
32. Beattie C, Gormley M, Wervey R, Wendorf H. An electromyographic protocol that distinguishes spasticity from dystonia. *J Pediatr Rehabil Med.* 2016;9(2):125–32.
33. Béchade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A. Microglial control of neuronal activity. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:32.
34. Beckerman SR, Jimenez JE, Shi Y, Al-Ali H, Bixby JL, Lemmon VP. Phenotypic assays to identify agents that induce reactive gliosis: A counter-screen to prioritize compounds for preclinical animal studies. *Assay and Drug Development Technologies.* 2015;13(7):377–88.
35. Bennabi D, Pedron S, Haffen E, Monnin J, Peterschmitt Y, Van Waes V. Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models. *Front Syst Neurosci.* 2014;8:159.
36. Berg, AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: entering 21st century. *Epilepsia.* 2011;52 (6):1058–62.
37. Billiards SS, Haynes RL, Folkerth RD, Trachtenberg FL, Liu LG, Volpe JJ, Kinney HC. Development of microglia in the cerebral white matter of the human fetus and infant. *J Comp Neurol.* 2006;497:199–208.
38. Blumetti FC, Wu JCN, Barzi F, Axt MW, Waugh MC, Selber P.

- Orthopaedic surgery in dystonic cerebral palsy. *J Pediatr Orthop* 2019;39:209–16.
39. Bonellie SR, Currie D, Chalmers J. Comparison of risk factors for cerebral palsy in twins and singletons. *Dev Med Neurol*. 2005;47:587–91.
40. Borg E. Perinatal asphyxia, hypoxia, ischemia and hearing loss. An overview. *Scand Audiol*. 1997;26(2):77–91.
41. Bovid KM, Patel DR. Orthopaedic considerations. In: Rubin IL, Merrick J, Greydanus DE, et al. editors. *Healthcare for people with intellectual and developmental disabilities across the lifespan*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
42. Brown GG, Jacobus J, McKenna B. Structural imaging for addiction medicine: From neurostructure to neuroplasticity. *Prog Brain Res*. 2016;224:105–27.
43. Buntinx M, Moreels M, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, Steels P, et al. Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res*. 2004;76:834–45.
44. Buonocore G, Groenendaal F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2007;12:287–95.
45. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229–48.
46. Burdyga T, Borysova L. Calcium signalling in pericytes. *J Vasc Res*. 2014;51:190–9.
47. Campos G, Fortuna A, Falcão A, Alves G. *In vitro* and *in vivo* experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Res*. 2018;146:63–86.

48. Carvalho I, Pinto SM, Chagas DDV, Praxedes Dos Santos JL, de Sousa Oliveira T, Batista LA. Robotic gait training for individuals with cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 2017;98:2332–44.
49. Chabot S, Williams G, Yong VW. Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of vla-4 and inhibition by interferonbeta-1b. *J Clin Investig*. 1997;100:604–12.
50. Chang WP, Lu HC, Shyu BC. Treatment with direct-current stimulation against cingulate seizure-like activity induced by 4-aminopyridine and bicuculline in an in vitro mouse model. *Exp Neurol*. 2015;265:180–92.
51. Chen W, Ma Q, Suzuki H, Hartman R, Tang J, Zhang JH. Osteopontin reduced hypoxia-ischemia neonatal brain injury by suppression of apoptosis in a rat pup model. *Stroke*. 2011;42:764–9.
52. Chen SH, Oyarzabal EA, Sung YF, Chu CH, Wang Q, Chen SL, et al. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. *Glia*. 2015;63(1):118–31.
53. Chernykh ER, Kafanova MY, Shevela EY, Sirota SI, Adonina EI, Sakhno LV, et al. Clinical experience with autologous M2 macrophages in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplant*. 2014; 23 Suppl 1:S97–104.
54. Choi JH, Yoo KY, Lee CH, Park JH, Yan BC, Kwon SH, et al. Comparison of neurogenesis in the dentate gyrus between the adult and aged gerbil following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 2012;37(4):802–10.
55. Choi J, Hwang I, Yoo D, Lee K, Park J, Jung H, et al. Glucose metabolism and neurogenesis in the gerbil hippocampus after

- transient forebrain ischemia. *Neural Reg Res.* 2016;11(8):1254–9.
56. Clark SM, Ghulmiyyah LM, Hankins GDV. Antenatal Antecedents and the Impact of Obstetric Care in the Etiology of Cerebral Palsy. *Clin Obstet Gynecol.* 2008;51(4):775–86.
57. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia.* 1996;17:83–93.
58. Costeff H. Estimated frequency of genetic and nongenetic causes of congenital idiopathic cerebral palsy in west Sweden. *Ann Hum Genet.* 2004;68(5):515–20.
59. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr.* 2014;164:973–9.
60. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005;21(1):1-14.
61. Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW, Haslam RR, Australasian Collaborative Trial of Magnesium Sulphate (ACTOMg SO₄) Collaborative Group. Effect of magnesium sulfate given for neuroprotection before preterm birth. *JAMA.* 2003;290:2669–76.
62. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Dev Neurosci.* 2011;33(3-4):199–209.
63. Dammann O, Leviton A. Role of the fetus in perinatal infection and neonatal brain damage. *Curr Opin Pediatr.* 2000;12:99–104.
64. Das SP, Ganesh GS. Evidence-based approach to physical therapy in cerebral palsy. *Indian J Orthop* 2019;53:20–34.
65. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull.* 1994;34:73–8.

66. Deangelis T. Going to bat for science. *Monitor on Psychology*. 2007;38(7):1–10.
67. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*. 1988; 115(1):61–9.
68. Deng W, Pleasure J, Pleasure D. Progress in periventricular leukomalacia. *Arch Neurol*. 2008;65(10):1291–5.
69. Deng Y, Lu J, Sivakumar V, Ling EA, Kaur C. Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. *Brain Pathol*. 2008;18:387–400.
70. Dentesano G, Serratosa J, Tusell JM, Ramon P, Valente T, Saura J, et al. CD200R1 and CD200 expression are regulated by PPAR-gamma in activated glial cells. *Glia*. 2014;62(6):982–98.
71. Desch LW. The spectrum of assistive and augmentative technology for individuals with developmental disabilities. In: Accardo PJ, editor. *Capute and Accardo's neurodevelopmental disabilities in infancy and childhood*. 3rd ed. Baltimore: Paul H. Brookes, 2008:691–720.
72. DeSilva TM, Kinney HC, Borenstein NS, Trachtenberg FL, Irwin N, Volpe JJ, et al. The glutamate transporter EAAT2 is transiently expressed in developing human cerebral white matter. *J Comp Neurol*. 2007;501:879–90.
73. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):22368–401.

74. Dod KJ, Imms C, Taylor NF. *Physiotherapy and occupational therapy for people with cerebral palsy*. London: Mac Keith Press, 2010:273–281.
75. Domercq M, Vázquez-Villoldo N, Matute C. Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:49.
76. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–17.
77. Dong J, Liu B, Song L, Lu L, Xu H, Gu Y. Neural stem cells in the ischemic and injured brain: endogenous and transplanted. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(4):623–9.
78. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Front Neurol*. 2012;3:144.
79. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: A review for the clinician. *JAMA Pediatr*. 2015;169: 397–403.
80. Doycheva D, Shih G, Chen H, Applegate R, Zhang JH, Tang J. Granulocyte-colony stimulating factor in combination with stem cell factor confers greater neuroprotection after hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rats than a solitary treatment. *Transl Stroke Res*. 2013;4:171–8.
81. Duan Y, Sahley CL, Muller KJ. ATP and NO dually control migration of microglia to nerve lesions. *Dev Neurol*. 2009;69(1):60–72.
82. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006;367(9516):1087–100.

83. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266–77.
84. Ekici B, Aydın N, Aydın K, Çalışkan M, Eraslan E, Özmen M. Epilepsy in children with periventricular leukomalacia. 2013;115(10):2046–8.
85. Erskine L, Stewart R, McCaio CD. Electric field-directed growth and branching of cultured frog nerves: effects of aminoglycosides and polycations. *J Neurobiol*. 1995;26(4):523–36.
86. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986:48.
87. Fathali N, Khatibi NH, Ostrowski RP, Zhang JH. The evolving landscape of neuroinflammation after neonatal hypoxia-ischemia. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;111:93–100.
88. Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD. Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:235.
89. Ferreira LB, Eloy K, Pestana A, Lyra J, Moura M, Prazeres H, et al. Osteopontin expression is correlated with differentiation and good prognosis in medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(4):551–61.
90. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
91. Fisher RS, Boas WV, Blume WT, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definition proposed by the

- International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4): 470–2.
92. Folkerth RD, Haynes RL, Borenstein NS, Belliveau RA, Trachtenberg F, Rosenberg PA, et al. Developmental lag in superoxide dismutases relative to other antioxidant enzymes in premyelinated human telencephalic white matter. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:990–9.
93. Folkerth RD, Keefe RJ, Haynes RL, Trachtenberg FL, Volpe JJ, Kinney HC. Interferon-gamma expression in periventricular leukomalacia in the human brain. *Brain Pathol*. 2004;14:265–74.
94. Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, Falzoni S, Sanz JM, Sarti AC, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J*. 2015;29(6):2450–61.
95. Fritsch B, Reis J, Martinowich K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*. 2010;66:198–204.
96. Gahmberg CG, Tian L, Ning L, Nyman-Huttunen H. ICAM-5 - a novel two-faceted adhesion molecule in the mammalian brain. *Immunol Letters*. 2008;117(2):131–5.
97. Gallagher CJ, Salter MW. Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci*. 2003;23(17):6728–39.
98. Gamdzyk M, Makarewicz D, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. Hypobaric hypoxia postconditioning reduces brain damage and improves antioxidative defense in the model of birth asphyxia in 7-day-old rats. *Neurochem Res*. 2014;39(1):68–75.
99. Gendron F-P, Chalimoniuk M, Strosznajder J, Shen S, González

- FA, Weisman GA, et al. P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN γ -induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *J Neurochem.* 2003;87:344–52.
100. Germain AM, Blackmore AM, Gibson N, Newell B, Williams SA. Effects of adaptive bungee trampolining for children with cerebral palsy: a single-subject study. *Pediatr Phys Ther.* 2019;31:165–74.
101. Gillick B, Menk J, Mueller B, Meekins G, Krach LE, Feyma T, Rudser K. Synergistic effect of combined transcranial direct current stimulation/constraint-induced movement therapy in children and young adults with hemiparesis: study protocol. *BMC Pediatrics.* 2015;15:178–87.
102. Gonzales-Portillo GS, Reyes S, Aguirre D, Pabon MM, Borlongan CV. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurol.* 2014;5:147.
103. Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, Felten P, Losciuto S, Heurtaux T, et al. NLRP3 Inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130624.
104. Hagberg B, Hagberg G, Beckung E, Uvebrant P. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden. VIII. Prevalence and origin in the birth year period 1991-94. *Acta Paediatr.* 2001;90:271–277.
105. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland, BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014;508:55–60.
106. Hameed MQ, Dhamne SC, Gersner R, Kaye HL, Oberman LM, Pascual-Leone A, et al. Transcranial magnetic and direct current stimulation in children. *Curr Neurol Neurosci Rep.*

- 2017;17(2):11–26.
107. Hamilton NB, Attwell D, Hall CN. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*. 2010;2:5.
 108. Hamrick SEG, Miller SP, Leonard C, Glidden DV, Goldstein R, Ramaswamy V, et al. Trends in severe brain injury and neurodevelopmental outcome in premature newborn infants: the role of cystic periventricular leukomalacia. *J Pediatr*. 2004;145:593–9.
 109. Han CH, Song H, Kang YG, Kim BM, Im CH. Hemodynamic responses in rat brain during transcranial direct current stimulation: a functional near-infrared spectroscopy study. *Biomedical Optics Express*. 2014;13:1812–21.
 110. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173–85.
 111. Hayati F, Ghamsari SM, Dehghan MM, Oryan A. Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study. *J Dermatolog Treat*. 2018;9(6):593–9.
 112. Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol*. 2005;15:225–33.
 113. Haynes RL, Folkerth RD, Keefe R, Sung L, Swzeda LI, Rosenberg PA, et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes is accompanied by microglial activation in periventricular leukomalacia in the human premature infant. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:441–50.
 114. Himmelmann K. Children and youth with complex cerebral

- palsy: care and management. Edited by Gladder LJ, Stevenson RD. London: Mac Keith Press; 2019.
115. Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T. MEK-ERK signaling is involved in interferon- γ -induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20095–106.
 116. Huang R, Peng L, Hertz L. Effects of a low-voltage static electric field on energy metabolism in astrocytes. *Bioelectromagnetics*. 1997;18:77–80.
 117. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: a review. *Neuroscience*. 2015;305:86–98.
 118. Iadecola C, Yang G, Ebner T, Chen G. Local and propagated vascular responses evoked by focal synaptic activity in cerebellar cortex. *Neurophysiol*. 1997;78:651–9.
 119. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4:147ra111.
 120. Im CH, Park JH, Shim M, Chang WH, Kim YH. Evaluation of local electric fields generated by transcranial direct current stimulation with an extracephalic reference electrode based on realistic 3D body modeling. *Phys Med Biol*. 2012;57:2137.
 121. Inder TE, Warfield SK, Wang H, Hüppi PS, Volpe JJ. Abnormal cerebral structure is present at term in premature infants. *Pediatrics*. 2005; 115(2):286–94.
 122. Islam N, Aftabuddin M, Moriwaki A, Hattori Y, Hori Y. Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain. *Brain Res*. 1995;684(2):206–8.
 123. Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen AS, Kavanaugh B, Coulter

- DA, et al. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2002;81(2):390-402.
124. Jacobsson B, Hagberg G, Hagberg B, Ladfors L, Niklasson A, Hagberg H. Cerebral palsy in preterm infants: a population-based case-control study of antenatal and intrapartal risk factors. *Acta Paediatr.* 2002;91:946–51.
125. Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best Practice Res.* 2004;18:425–36.
126. Jamali AR, Amini M. The effects of constraint-induced movement therapy on functions of cerebral palsy children. *Iran J Child Neurol* 2018;12:16–27.
127. Jeffery DT, Norton JA, Roy FD, Gorassini MA. Effects of transcranial direct current stimulation on the excitability of the leg motor cortex. *Exp Brain Res.* 2007;182(2):281–7.
128. Jellema RK, Ophelders DR, Zwanenburg A, Nikiforou M, Delhaas T, Andriessen P, et al. Multipotent adult progenitor cells for hypoxic-ischemic injury in the preterm brain. *J Neuroinflammation.* 2015;12(1):241.
129. Jenny B., Kanemitsu M, Tsupikov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et. al. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. *Stem Cells.* 2009;27(6):1309–17.
130. Jin K, Mao X, Xie L, Greenberg RB, Peng B, Moore A, et. al. Delayed transplantation of human neural precursor cells improves outcome from focal cerebral ischemia in aged rats. *Aging Cell.* 2010;9(6):1076–83.

131. Jiruska P, Alvarado-Rojas C, Schevon CA, Staba R, Stacey W, Wendling F, Avoli M. Update on the mechanisms and roles of high-frequency oscillations in seizures and epileptic disorders. *Epilepsia*. 2017;58(8):1330–1339.
132. Johansson BB. Brain plasticity in health and disease. *Keio J Med*. 2004;53(4):231–46.
133. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol*. 2011;10:372–82.
134. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 2001;49:735–41.
135. Jones HR, Bolton CF, Harper CM. Pediatric clinical electromyography. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1996.
136. Judith K, Grether J, Nelson KB, Walsh E, Willoughby R. Intrauterine exposure to infection and risk of cerebral palsy in very preterm infants. *Redline Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157(1):26–32.
137. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol*. 2014;41:119–31.
138. Kadhim HJ, Tabarki B, Verellen G, Prez CD, Rona AM, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 2001;56:1278–84.
139. Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, et al. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J Neurosci*. 2008;28(18):4702–11.
140. Kanner AM, Ashman E, Gloss D, Harden C, Bourgeois B, Bautista JF, et al. Practice guideline update summary: Efficacy and

- tolerability of the new antiepileptic drugs I: Treatment of new-onset epilepsy: Report of the American Epilepsy Society and the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Epilepsy Curr.* 2018;18(4):260–8.
141. Karadağ-Saygı E, Giray E. The clinical aspects and effectiveness of suit therapies for cerebral palsy: a systematic review. *Turk J Phys Med Rehabil.* 2019;65:93–110.
142. Karpova MN, Karganov MYu, Klishina NYu, Khlebnikova NN, Kryzhanovskii GN. Contribution of protein synthesis to mechanisms of antiepileptic system activity in kindling. *Bull Exp Biol Med.* 2002;133(6):544–7.
143. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes, M, Brugger B, Mildner A, Werner, HB, et al. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nature Genetics.* 2007;39(8):969–76.
144. Kaya Kara O, Livanelioglu A, Yardımcı BN, Soylu AR. The effects of functional progressive strength and power training in children with unilateral cerebral palsy. *Pediatr Phys Ther* 2019;31:286–95.
145. Kekic M, Boysen E, Campbell IC, Schmidt U. A systematic review of the clinical efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in psychiatric disorders. *J Psych Res.* 2016;74:70–86.
146. Kent A, Lomas F, Hurrion E, Dahlstrom JE. Antenatal steroids may reduce adverse neurological outcome following chorioamnionitis: neurodevelopmental outcome and chorioamnionitis in premature infants. *J Paediatr Child Health.*

- 2005;41:186–190.
147. Keough JM, Badawi N. The origins of cerebral palsy. *Curr Opin Neurol.* 2006;19:129–34.
148. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(2):F153–61.
149. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011;209(2):139–51.
150. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat.* 2015; 227(6):746–56.
151. Koepp M. Neuroimaging: how far could it take us? Go for zero. *International Epilepsy Summit, Abstracts.* Madrid. 2012;19.
152. Koizumi S. Synchronization of Ca^{2+} oscillations: Involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J.* 2010;277(2):286–92.
153. Krägeloh-Mann I, Cans C. Cerebral palsy update. *Brain Dev.* 2009;31(7):537–44.
154. Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Sasaki T, Niikura K, Narita M, et al. Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. *Synapse.* 2010;64(8):611–6.
155. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.* 2011:609813.
156. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neurosci.* 1990;39:151–70.

157. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, et al. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*. 2002;22(7):2478–86.
158. Leppanen RE. Monitoring spinal nerve function with H-reflexes. *J Clin Neurophysiol*. 2012;29(2):126–39.
159. Leviton A. Preterm birth and cerebral palsy: is tumor necrosis factor the missing link? *Dev Med Child Neurol*. 1993;35:1101–6.
160. Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9936–41.
161. Li J, O W, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*. 2013;14(12):24438–75.
162. Li LX, Zhang MM, Zhang Y, He J. Acupuncture for cerebral palsy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neural Regen Res* 2018;13:1107–17.
163. Liao Y, Cotten M, Tan S, Kurtzberg J, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:890–900.
164. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017;541:481–7.
165. Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol*. 2009;120:1161–7.
166. Little Club. Memorandum on terminology and classification

- of 'cerebral palsy'. (Mac Keith R, et al., editors). *Cereb Palsy Bull.* 1959;1: 27–35.
167. Liu A, Bryant A, Jefferson A, Friedman D, Minhas P, Barnard S, et al. Exploring the efficacy of a 5-day course of transcranial direct current stimulation (TDCS) on depression and memory function in patients with well-controlled temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behavior.* 2016;55:11–20.
168. Liu C, Chen S, Kamme F, Hu BR. Ischemic preconditioning prevents protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2005;134:69–80.
169. Liu GJ, Nagarajah R, Banati RB, Bennett MR. Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *Europ J Neurosci.* 2009;29(6):1108–18.
170. Lorek A, Take Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: Continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1994;36:699–706.
171. Luo X, Tai WL, Sun L, Pan Z, Xia Z, Chung SK, et al. Crosstalk between astrocytic CXCL12 and microglial CXCR4 contributes to the development of neuropathic pain. *Molecular Pain.* 2016;12:174480691663638.
172. Maier CM, Yu F, Nishi T, Lathrop SJ, Chan PH. Interferon-beta fails to protect in a model of transient focal stroke. *Stroke.* 2006;37:1116–9.
173. Mall V. Treadmill therapy in cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2019;23:543.
174. MarinMA, Carmichael ST. Mechanisms of demyelination

- and remyelination in the young and aged brain following white matter stroke. *Neurobiol Dis.* 2019;126:5–12.
175. Marlier Q, D'aes T, Verteneuil S, Vandebosch R, Malgrange B. Core cell cycle machinery is crucially involved in both life and death of post-mitotic neurons. *Cell Mol Life Sci.* 2020;10.1007/s00018-020-03548-1.
176. Marlier Q, Verteneuil S, Vandebosch R, Malgrange B. Mechanisms and functional significance of stroke-induced neurogenesis. *Front Neurosci.* 2015;9:458.
177. Martín-Valero R, Vega-Ballón J, Perez-Cabezas V. Benefits of hippotherapy in children with cerebral palsy: a narrative review. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018;22:1150–60.
178. Martinez-Biarge M, Groenendaal F, Kersbergen KJ, Benders MJNL, Foti F, Cowan FM, et al. MRI based preterm white matter injury classification: the importance of sequential imaging in determining severity of injury. *PLoS ONE.* 2016;11:e0156245.
179. Matute C, Domercq M, Sanchez-Gomez MV. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia.* 2006;53:212–24.
180. McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. The translational significance of the neurovascular unit. *J Biol Chem.* 2017;292(3):762–70.
181. McIntyre S, Morgan C, Walker K, Novak I. Cerebral palsy - don't delay. *Dev Disabil Res Rev.* 2011;17(2):114–29.
182. McQuillen PS, Sheldon RA, Shatz CJ, Ferreiro DM. Selective vulnerability of subplate neurons after early neonatal hypoxia-ischemia. *J Neurosci.* 2003;23(8):3308–15.
183. Mélanie Morin-Brureau M, De Bock F, Lerner-Natoli M.

- Organotypic brain slices: a model to study the neurovascular unit microenvironment in epilepsies. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10:11.
184. Merchant NM, Azzopardi DV, Hawwa AF, McElnay JC, Middleton B, Arendt J, et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76:725–33.
185. Metea MR, Newman EA. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci*. 2006;26:2862–70.
186. Meyn DFJr, Ness J, Ambalavanan N, Carlo WA. Prophylactic phenobarbital and whole-body cooling for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*. 2010;157: 334–6.
187. Michael-Asalu A, Taylor G, Campbell H, Lelea L-L, Kirby RS. Cerebral palsy: diagnosis, epidemiology, genetics, and clinical update. *Adv Pediatr*. 2019;66:189–208.
188. Miller JW, Henry JC. Solving the dilemma of EEG misinterpretation. *Neurology*. 2013;80(1):13–14.
189. Miriam Font-Nieves, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Pérdomo A, Márquez-Kisinousky L, et al. Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem*. 2012; 287(9): 6454–68.
190. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2013;16(9):1211–8.
191. Mishra AJ. Binaural blood flow control by astrocytes: listening to synapses and the vasculature. *J Physiol*. 2017;595(6):1885–902.

192. Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:70.
193. Moliadze V, Andreas S, Lyzhko E, Schmanke T, Gurashvili T, Freitag CM, et al. Ten minutes of 1 mA transcranial direct current stimulation was well tolerated by children and adolescents: Self-reports and resting state EEG analysis. *Brain Res Bull.* 2015;119(Pt A):25–33.
194. Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *J Comp Neurol.* 2006;499:565–82.
195. Moriwaki A, Hattori Y, Hayashi Y, Lu YF, Islam N, Hori Y. Repeated application of anodal direct current produces regional dominance in histamine-elicited cyclic AMP accumulation in rabbit cerebral cortex. *Acta Med Okayama.* 1994;48 (6):323–6.
196. Morris C. Definition and classification of cerebral palsy: a historical perspective. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 2007;109:3–7.
197. Morris DM, Crago JE, DeLuca SC, Pidikiti RD, Taub E. Constraint-induced movement therapy for motor recovery after stroke. *NeuroRehab.* 1997;9(1):29–43.
198. Morris DM, Taub E, Mark VW. Constraint-induced movement therapy: characterizing the intervention protocol. *Eura Medicophys.* 2006; 42(3):257–68.
199. Mutch LW, Alberman E, Hagberg B, Kodama K, Velickovic MV. Cerebral palsy epidemiology: where are we now and where are we going? *Dev Med Child Neurol.* 1992;34:547–55.
200. Myers RE. Two patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(2):246–

- 76.
201. Myrhaug HT, Odgaard-Jensen J, Jahnsen R. The longterm effects of conductive education courses in young children with cerebral palsy: a randomized controlled trial. *Dev Neurorehabil.* 2019;22:111–9.
202. Nakano M, Tamura Y, Yamato M, Kume S, Eguchi A, Takata K, et al. NG2 glial cells regulate neuroimmunological responses to maintain neuronal function and survival. *Sci Reports.* 2017;7:42041.
203. Nedergaard M. Garbage truck of the brain. *Science.* 2013;340:1529–30.
204. Nelson KB, Grether JK. Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics.* 1995;95:263–9.
205. Nelson Textbook of Pediatrics, 18th edition by Kliegman RM, Behrman RE, Hal BJ. Philadelphia: W.B. Saunders Company;2007.
206. Ni X, Yang ZJ, Carter EL, Martin LJ, Koehler RC. Striatal neuroprotection from neonatal hypoxia-ischemia in piglets by antioxidant treatment with euk-134 or edaravone. *Dev Neurosci.* 2011;33:299–311.
207. NICE Guideline CG 137. The Epilepsies: diagnosis and management. 2012:99.
208. Nitsche MA, Cohen, LG, Wassermann EM, Priori A, Lang, N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul.* 2008;1:206–23.
209. Noor JI, Ikeda T, Mishima K, Aoo N, Ohta S, Egashira N, et al. Short-term administration of a new free radical scavenger,

- edaravone, is more effective than its long-term administration for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stroke*. 2005;36:2468–74.
210. Noor JI, Ueda Y, Ikeda T, Ikenoue T. Edaravone inhibits lipid peroxidation in neonatal hypoxic-ischemic rats: An *in vivo* microdialysis study. *Neurosci Lett*. 2007;414:5–9.
211. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 2011;69:743–58.
212. Novak I, McIntyre S, Morgan C, Campbell L, Dark L, Morton N, et al. A systematic review of interventions for children with cerebral palsy: state of the evidence. *Dev Med Child Neurol*. 2013;55:885–910.
213. Novak I, Morgan C, Adde L, Blackman J, Boyd RN, Brunstrom-Hernandez J, et al. Early, accurate diagnosis and early intervention in cerebral palsy: advances in diagnosis and treatment. *JAMA Pediatr* 2017;171:897–907.
214. Novak I, Walker K, Hunt RW, Wallace EM, Fahey M, Badawi N. Concise review: stem cell interventions for people with cerebral palsy: systematic review with meta-analysis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:1014–25.
215. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: A key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:373–90.
216. O'Sullivan SA, Gasparini F, Mir AK, Dev KK. Fractalkine shedding is mediated by p38 and the ADAM10 protease under proinflammatory conditions in human astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):189.
217. Ohsawa K, Kohsaka S. Dynamic motility of microglia:

- Purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia*. 2011;59(12):1793–9.
218. Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HWGM. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011;10:108–18.
219. Olbrich S, Dinteren RV, Arns M. Personalized medicine: review and perspectives of promising baseline EEG biomarkers in major depressive disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology*. 2016;72(3-4):229–40.
220. Oskoui M, Shevell MI, Swaiman KF. Cerebral palsy. In: Swaiman KF, Ashwal S, Ferriero DM, et al. editors. *Pediatric neurology: principles and practice*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier;2017.
221. Ozawa H, Nishida A, Mito T, Takashima S. Development of ferritin-positive cells in cerebrum of human brain. *Pediatr Neurol*. 1994;10:44–8.
222. Ozturk A, Demirci F, Yavuz T, Yildiz S, Değirmenci Y, Döşoğlu M, et al. Antenatal and delivery risk factors and prevalence of cerebral palsy in Duzce (Turkey). *Brain Dev*. 2007;29:39–42.
223. Palma-Tortosa S, Tornero D, Grønning Hansen M, Monni E, Hajy M, Kartsivadze S, et al. Activity in grafted human iPS cell-derived cortical neurons integrated in stroke-injured rat brain regulates motor behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(16):9094–100.
224. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA. The hoffmann reflex: methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *J Athl Train*. 2004;39(3):268–77.

225. Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. The role of microglia and astrocytes in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:258.
226. Pan L, Borgens RB. Strict perpendicular orientation of neural crest-derived neurons in vitro is dependent on an extracellular gradient of voltage. *J Neurosci Res.* 2012;90:1335–46.
227. Panteliadis C, Panteliadis P, Vassilyadi F. Hallmarks in the history of cerebral palsy: from antiquity to mid-20th century. *Brain Dev.* 2013;35(4): 285–92.
228. Parisi C, Napoli G, Amadio S, Spalloni A, Apolloni S, Longone P, et al. MicroRNA-125b regulates microglia activation and motor neuron death in ALS. *Cell Death Differ.* 2016;23(3):531–41.
229. Parkin BL, Bhandari M, Glen JC, Walsh V. The physiological effects of transcranial electrical stimulation do not apply to parameters commonly used in studies of cognitive neuromodulation. *Neuropsychologia.* 2018;pii: S0028-3932(18)30123-4.
230. Pascual JM, Koenigsberger MR. Cerebral palsy: prenatal risk factors. *Rev Neurol.* 2003;37(3):275–80.
231. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1077–98.
232. Pelletier SJ, Lagacé M, St-Amour I, Arsenault D, Cisbani G, Chabrat A, et al. The morphological and molecular changes of brain cells exposed to direct current electric field stimulation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;18(5):pyu090.
233. Perucca E. Optimizing antiepileptic drug treatment in tumoral epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54 (suppl. 9):97–104.

234. Perucca E, Covanis A, Dua T. Commentary: Epilepsy is a global problem. *Epilepsia*. 2014;55(9):1326–8.
235. Perucca P, Gilliam FG. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Lancet Neurol*. 2012;11(9):792–802.
236. Peters A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J Neurocytol*. 2004;33(3):345–57.
237. Petersen MC, Palmer FB. Advances in prevention and treatment of cerebral palsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2001;7:30–7.
238. Petersen MA, Dailey ME. Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia*. 2004;46:195–206.
239. Petterson B, Nelson KB, Watson L, Stanley F. Twins, triplets, and cerebral palsy in births in Western Australia in the 1980s. *BMJ*. 1993;307:1239–43.
240. Pfuerscheller G. Rhythmic EEG activities and cortical functioning. Amsterdam: Elsevier / North-Holland Biomedical Press; 1980.
241. Pidlock FS. Neurosonographic features of pre-ventricular echodensities associated with cerebral palsy in preterm infants. *J Peds*. 1990;116(3):417.
242. Pitt D, Nagelmeier IE, Wilson HC, Raine CS. Glutamate uptake by oligodendrocytes. Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology*. 2003;61:1113–20.
243. Pivneva TA, OM Tsupykov M, Pilipenko N. Structural modifications of astrocytes in the hippocampus after experimental cerebral ischemia in gerbils. 2005;37(5/6):410–5.
244. Powell ES, Carrico C, Raithatha R, Salyers E, Ward A,

- Sawaki L. Transvertebral direct current stimulation paired with locomotor training in chronic spinal cord injury: A case study. *NeuroRehabilitation*. 2016;38:27–35.
245. Pulgar VM. Direct electric stimulation to increase cerebrovascular function. *Front Syst Neurosci*. 2015;9:54.
246. Quintas C, Pinho D, Pereira C, Saraiva L, Goncalves J, Queiroz G. Microglia P2Y(6) receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *J Neuroinflammation*. 2014;11:141.
247. Rakers C, Schleif M, Blank N, Matuskova H, Ulas T, Handler K, et al. Stroke target identification guided by astrocyte transcriptome analysis. *Glia*. 2019;67:619–33.
248. Ranck JB Jr, Windle WF. Brain damage in the monkey, macaca mulatta, by asphyxia neonatorum. *Exp Neurol*. 1959;1(2):130–54.
249. Ranieri F, Podda MV, Riccardi E, Frisullo G, Dileone M, Profice P, et al. Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. *J Neurophysiol*. 2012;107:1868–80.
250. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1164–71.
251. Reid LB, Boyd RN, Cunnington R, Rose SE. Interpreting intervention induced neuroplasticity with fMRI: the case for multimodal imaging strategies. *Neural Plast*. 2016;2016:2643491.
252. Rezaie P, Dean A, Male D, Ulfing N. Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester. *Cerebral Cortex*. 2005;15:938–49.
253. Rezaie P, Dean A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing

- nervous system. *Neuropathology*. 2002;22(3):106–32.
254. Ribiani E, Rosati A, Romanelli M, Cruciani L, Incalza F, Di Renzo GC. Perinatal infections and cerebral palsy. *Minerva Ginecol*. 2007;59:151–7.
255. Rivera-Urbina GN, Nitsche MA, Vicario CM, Molero-Chamizo A. Applications of transcranial direct current stimulation in children and pediatrics. *Rev Neurosci*. 2017;28(2):173–84.
256. Rosenbaum PL, Palisano RJ, Bartlett DJ, Galuppi BE, Russell DJ. Development of the Gross Motor Function Classification System for cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2008;50:249–53.
257. Rosenbaum PL, Walter SD, Hanna SE, Palisano RJ, Russell DJ, Raina P, et al. Prognosis for gross motor function in cerebral palsy: creation of motor development curves. *JAMA*. 2002;288(11):1357–63.
258. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstei, M, Bax M, Damiano D, et al. A report: The definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 2007;49(s109):8–14.
259. Ruohonen J, Karhu J. tDCS possibly stimulates glial cells. *Clin Neurophysiol*. 2012;123:2006–9.
260. Rusznak Z, Henskens W, Schofield E, Kim WS, Fu Y. Adult neurogenesis and gliogenesis: possible mechanisms for neurorestoration. *Exp Neurol*. 2016;25(3):103–12.
261. Saika R, Sakuma H, Noto D, Yamaguchi S, Yamamura T, Miyake S. MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):109.
262. Salazar AP, Pagnussat AS, Pereira GA, Scopel G, Lukrafka

- JL. Neuromuscular electrical stimulation to improve gross motor function in children with cerebral palsy: a metaanalysis. *Braz J Phys Ther.* 2019;23:378–86.
263. Sánchez-Kuhn A, Pérez-Fernández C, Cánovas R, Flores P, Sánchez-Santed F. Transcranial direct current stimulation as a motor neurorehabilitation tool: an empirical review. *Biomed Eng Online.* 2017;16:76.
264. Savman K, Nilsson UA, Blennow M, Kjellmer I, Whitelaw A. Non-protein-bound iron is elevated in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthemorrhagic ventricular dilation. *Pediatr Res.* 2001;49:208–12.
265. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012;74:691–705.
266. Schira J, Gasis M, Estrada V, Hendricks M, Schmitz C, Trapp T, et al. Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. *Brain.* 2012;135:431–46.
267. Seibenhener ML, Wooten MW. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice. *J Vis Exp.* 2012;65:3634.
268. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev.* 2004;80:125–41.
269. Shang Q, Ma CY, Lv N, Lv ZL, Yan YB, Wu ZR, et al. Clinical study of cerebral palsy in 408 children with periventricular leukomalacia. *Exp Ther Med.* 2015;9(4):1336–44.
270. Shea KL, Palanisamy A. What can you do to protect the

- newborn brain? *Curr Opin Anaesthesiol.* 2015;28:261–6.
271. Shen Y, Plane M, Deng W. Mouse models of periventricular leukomalacia. *J Vis Exp.* 2010;39:e1951.
272. Shetty J. Neonatal seizures in hypoxic-ischaemic encephalopathy-risks and benefits of anticonvulsant therapy. *Dev Med Child Neurol.* 2015;57:40–3.
273. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia.* 2011; 52(6):1052–7.
274. Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:6.
275. Sinha S, Pramod MN, Dilipkumar S, Satishchandra P. Idiopathic generalized epilepsy: Phenotypic and electroencephalographic observations in a large cohort from South India. *Ann Indian Acad Neurol.* 2013;16(2): 163-8.
276. Skibo GG, Lushnikova IV, Voronin KY, Dmitrieva O, Novikova T, Klementiev B, et al. A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Neurosci.* 2005;22(7):1589–96.
277. Skidmore MD. Increased risk of cerebral palsy among very low birthweight infants with chronic lung disease. *Dev Med Child Neurol.* 1990;32:325.
278. Stafstrom CE. The pathophysiology of epileptic seizures: a primer for pediatricians. *Pediatr Rev.* 1998;19(10):342–51.
279. Stagg CJ, Antal A, Nitsche MA. Physiology of transcranial direct current stimulation. *J ECT.* 2018;34:144–52.
280. Stanley F, Blair E, Alberman E. Cerebral palsies: epidemiology and causal pathways. London:MacKeith Press; 2000.

281. Stobart JLL, Lu L, Anderson HDI, Mori H, Anderson CM. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:3149–54.
282. Streit W, Walter S, Pennell N. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*. 1999;57:563–81.
283. Sueri C, Gasparini S, Balestrini S, Labate A, Gambardella A, Russo E, et al. Diagnostic biomarkers of epilepsy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(6):440–50.
284. Sumner MG, Hwang PA. Neuroplasticity, epilepsy and neuroplasticity as a potential treatment for some forms of epilepsy. *Clin Neurophysiol*. 2013;124(6):e3.
285. Sun J, Allison J, McLaughlin C, Sledge L, Waters-Pick B, Wease S, et al. Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: A pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion*. 2010;50:1980–7.
286. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). *Dev Med Child Neurol*. 2000;42(12):816–24.
287. Syczewska M, Świącicka A. Are electromyographic patterns during gait related to abnormality level of the gait in patients with spastic cerebral palsy? *Acta Bioeng Biomech*. 2016;18(3):91–6.
288. Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1 β promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol*. 2003;53:588–95.
289. Takahashi R, Yamada M, Takahashi T, Ito T, Nakae S, Kobayashi Y, et al. Risk factors for cerebral palsy in preterm

- infants. *Early Hum Dev.* 2005;81:545–53.
290. Takai H, Tsubaki A, Sugawara K, Miyaguchi S, Oyanagi K, Matsumoto T, et al. Effect of transcranial direct current stimulation over the primary motor cortex on cerebral blood flow: a time course study using near-infrared spectroscopy. *Adv Exp Med Biol.* 2016;876:335–41.
291. Taub E, Uswatte G, Mark VW. The functional significance of cortical reorganization and the parallel development of CI therapy. *Front Hum Neurosci.* 2014;8:396.
292. Teh DBL, Prasad A, Jiang W, Ariffin MZ, Khanna S, Belorkar A, et al. Transcriptome analysis reveals neuroprotective aspects of human reactive astrocytes induced by interleukin 1beta. *Sci Rep.* 2017;7:13988.
293. Tekin F, Kavlak E, Cavlak U, Altug F. Effectiveness of neurodevelopmental treatment (Bobath concept) on postural control and balance in cerebral palsied children. *J Back Musculoskelet Rehabil* 2018;31:397–403.
294. Teo JD, Morris MJ, Jones NM. Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 2015;77(6);757–64.
295. Thais Agut, Alarcon A, Cabañas F, Bartocci M, Martinez-Biarge M, Horsch S, et al. Preterm white matter injury: ultrasound diagnosis and classification. *Pediatr Res.* 2020;87(Suppl 1):37–49.
296. The epilepsies: The diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care. *Pharmacological update of clinical guideline 20.* 2012:21–8.
297. Tornero D, Tsupykov O, Granmo M, Rodriguez C,

- Gronning-Hansen M, Thelin J, et al. Synaptic inputs from stroke-injured brain to grafted human stem cell-derived neurons activated by sensory stimuli. *Brain*. 2017;140(3):692–706.
298. Trivedi DP, Hallock KJ, Bergethon PR. Electric fields caused by blood flow modulate vascular endothelial electrophysiology and nitric oxide production. *Bioelectromagnetics*. 2013;34:22–30.
299. van Velthoven CT, Heijnen CJ, van Bel F, Kavelaars A. Osteopontin enhances endogenous repair after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*. 2011;42:2294–301.
300. Vasudevan C, Levene M. Epidemiology and aetiology of neonatal seizures. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2013;18:185–91.
301. Vázquez-López A, Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G. Role of cAMP-dependent protein kinase on acute picrotoxin-induced seizures. *Neurochem Res*. 2005;30(5):613–8.
302. Velde A, Morgan C, Novak I, Tantsis E, Badawi N. Early diagnosis and classification of cerebral palsy: an historical perspective and barriers to an early diagnosis. *J Clin Med*. 2019;8(10):1599.
303. Veldhuis WB, Floris S, van der Meide PH, Vos IMP, de Vries HE, Dijkstra CD, et al. Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1060–9.
304. Vezzani A, Lang B, Aronica E. Immunity and inflammation in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;6(2):a022699.
305. Vezzani A, Pascente R, Ravizza T. Biomarkers of epileptogenesis: the focus on glia and cognitive dysfunctions. *Neurochem Res*. 2017;42(7):2089–98.
306. Wang W, Wang A, Yu L, Han X, Jiang G, Weng C, et al.

- Constraint-induced movement therapy promotes brain functional reorganization in stroke patients with hemiplegia. *Neural Regen Res.* 2012;7(32):2548–53.
307. WHO-UNICEF Meeting on promoting early childhood development. Colombo, Sri Lanka, July 2009. Geneva:WHO; 2009.
308. Williams TJ, Cervenka MC. The role for ketogenic diets in epilepsy and status epilepticus in adults. *Clin Neurophysiol Pract.* 2017;2:154–60.
309. Wolf P. History of epilepsy: nosological concepts and classification. *Epileptic Disord.* 2014;16(3):261–9.
310. Woodward LJ, Howard K, Inder TE. Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. *N Engl J Med.* 2006;355:685–94.
311. Wu YW, Colford JM. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: a metaanalysis. *JAMA.* 2000;284:1417–24.
312. Xia M, Zhu Y. Signaling pathways of ATP-induced PGE2 release in spinal cord astrocytes are EGFR transactivation-dependent. *Glia.* 2011;59(4):664–74.
313. Xu Z, Han K, Chen J, Wang C, Dong Y, Yu M, et al. Vascular endothelial growth factor is neuroprotective against ischemic brain injury by inhibiting scavenger receptor a expression on microglia. *J Neurochem.* 2017;142(5):700–9.
314. Yamaguchi T, Fujiwara T, Tsai YA, Tang SC, Kawakami M, Mizuno K, et al. The effects of anodal transcranial direct current stimulation and patterned electrical stimulation on spinal inhibitory interneurons and motor function in patients with spinal cord injury. *Exp Brain Res.* 2016;234:1469–78.
315. Yan Zhang, Igwe OJ. Lipopolysaccharide (LPS)-mediated

- priming of Toll-like receptor 4 enhances oxidant-induced prostaglandin E2 biosynthesis in primary murine macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2018;54:226–37.
316. Yang J, Wu EX. Detection of cortical gray matter lesion in the late phase of mild hypoxic-ischemic injury by manganese enhanced MRI. *Neuroimage.* 2008;39(2):669–79.
317. Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia.* 2019;67(6):1017–35.
318. Yang Y, Jalal FY, Thompson JF, Walker EJ, Candelario-Jalil E, Li L, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mediates the death of immature oligodendrocytes via TNF- α /TACE in focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation.* 2011;8:108.
319. Yatsenko KV, Berezovskii VA, Deyeva JV. Effects of intermittent normobaric hypoxia on the state of the CNS and brain circulation in patients with child cerebral palsy. *Fiziol Zh.* 2012;58(3):77–84.
320. YoonBH, Romero R, Park JS, Kim CJ, Kim SH, Choi JH, et al. Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:675–81.
321. Yu L, Fan SJ, Liu L, Xiao M, Lin X-J, Liu Y, et al. Effect of ischemic postconditioning on cerebral edema and the AQP4 expression following hypoxic-eschemic brain damage in neonatal rats. *World J Pediatr.* 2015;11(2):165–70.
322. Zalewska T, Jaworska J, Ziemka-Nalecz M. Current and experimental pharmacological approaches in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr Pharm Des.* 2015;21:1433–9.

323. Zhang F, Iadecola C. Fastigial stimulation increases ischemic blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:1013–9.
324. Zhao Z, Qin L, Reid B, Pu J, Hara T, Zhao M. Directing migration of endothelial progenitor cells with applied DC electric fields. *Stem Cell Res.* 2012;8(1):38–48.
325. Zheng X, Alsop DC, Schlaug G. Effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on human regional cerebral blood flow. *Neuroimage.* 2011;58:26–33.

Додаток 1

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ****Основні наукові результати дисертації:**

1. Tsurykov OM, Kyryk VM, Ustymenko AM, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Effect of transplantation of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells on the nervous tissue and behavioral responses in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Cell Organ Transplant*. 2015;3(1):68–73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
2. Яценко КВ. Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія та експериментальні підходи до її корекції. *Укр неврол журн*. 2016;38(1):7–11. *(Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо ППЕ, оформлення статті).*
3. Tsurykov OM, Lushnikova IV, Nikandrova YA, Yatsenko KV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Butenko GM, Skibo GG. A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell Organ Transplant*. 2016;4(2):188–193. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
4. Tsurykov O, Ustymenko A, Kyryk V, Smozhanik E, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microsc Res Tech*. 2016;79(6):557–64. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

5. Яценко КВ, Тараненко ТВ, Юрченко ФВ, Скибо ГГ. Вплив комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг у пацієнтів, які хворі на дитячий церебральний параліч. Запорозж мед жур. 2017;19(1):81–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
6. Яценко КВ, Надоненко ОМ. Динаміка електроенцефалографічних показників у пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, під впливом комплексного лікування з використанням методу. Здоб клін експер мед. 2017;2:101-7. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
7. Tsurykov OM, Lushnikova IV, Ustymenko AM, Kyryk VM, Nikandrova YA, Patseva MA, Yatsenko KV, Butenko GM, Skibo GG. Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model in vitro. Cell Organ Transplant. 2017;5(1):28–32. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).*
8. Цупиков О, Кирик В, Яценко К, Бутенко Г, Скибо Г. Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. ScienceRise. Medical Science. 2017;14(6):32–6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*

9. Яценко ЕВ, Криворучко ВС. Анализ электронейромиографических показателей у пациентов с ДЦП после комплексного лечения с использованием микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2017;7(3):464–9. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, оформлення статті).*
10. Tsurykov O, Lushnikova I, Ustyomenko A, Kyryk V, Nikandrova Y, Patseva M, Yatsenko K, Butenko G, Skibo G. The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an in vitro model of periventricular leukomalacia. Фізіол журн. 2017;63(5):3–12. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).*
11. Яценко КВ. Вплив комплексної терапії з використанням мікрополяризації на електроенцефалографічні показники у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію. Укр неврол журн. 2017;44(3):21–5. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
12. Яценко ЕВ. Динамика электроэнцефалографических показателей у пациентов с перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатией под влиянием комплексного лечения с использованием метода транскраниальной микрополяризации. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2018;8(2):178–85. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

13. Яценко ЕВ. Эффективность использования метода СИ-терапии у постинсультных пациентов с двигательными нарушениями в паретичной верхней конечности. Неврол Нейрохирург Вост Европа. 2018;8(3):392–8. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
14. Яценко КВ. Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. Здоб клін експер мед. 2018;3:151-6. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
15. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Дослідження впливу мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*. Укр неврол жур. 2018;47(2):69–73. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
16. Яценко КВ. Мозкова гемодинаміка та електроенцефалограма у хворих на симптоматичну епілепсію при комплексному лікуванні з використанням транскраніальної мікрополяризації. Фізіол журн. 2018;64(1):52–58. *(Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
17. Курук VM, Kuchuk OV, Mamchur AA, Ustymenko AM, Lutsenko TM, Tsuykov OM, Yatsenko KV, Skibo GG, Bilko DI, Bilko NM. 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. Cell Organ

- Transplant. 2018;6(2):195–201. *(Особисто дисертантом проведени статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
18. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Ефекти слабого постійного електричного струму на нейритогенез у модельних експериментах *in vitro*. Фізіол журн. 2019;65(4):41–49. *(Особисто дисертантом проведени статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*
19. Яценко КВ. Симптоматична епілепсія: причини виникнення та перспективні методи лікування. Здоб клін експер мед. 2019;1:7–13. *(Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо симптоматичної епілепсії, оформлення статті).*
20. Яценко ЕВ. Микрополяризация - эффективный неинвазивный метод нейростимуляции при органических поражениях головного мозга у детей. Art of medicine. 2019;2(10):123–127. *(Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо мікрополяризації при органічних ураженнях мозку, оформлення статті).*
21. Yatsenko K, Lushnikova L, Ustymenko A, Patseva M, Govbakh I, Kyryk V, Tsupykov O. Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. J Pers Med. 2020;10(2):66. *(Особисто дисертантом проведени експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).*

22. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ, Цупиков ОМ. Патент України на корисну модель №142371 А61N 1/18. "Система для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури *in vitro*" № u 2020 0159; Заяв. 05.03.2020; Опубл. 25.05.2020 – Бюл. № 12. (*Особистий внесок: проведення досліджень, обробка отриманих результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку*)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Цупиков ОМ, Кирик ВМ, Мамчур АА, Устименко АМ, Яценко КВ, Бутенко ГМ, Скибо ГГ. Трансплантація мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС. Збірник тез наук практ конф з міжнар участю «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє», Київ. 2014:37. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
2. Яценко КВ. Дитяча нейрореабілітація при органічних ураженнях мозку. Збірник тез міжнар наук практ конф «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичного виховання та валеології - 2018», Одеса. 2018:167-168. *Публікація тез, усна доповідь.*
3. Яценко КВ. Ефективний метод відновлення рухових функцій паретичної верхньої кінцівки у постінсультних пацієнтів. Матеріали IV національного конгресу "Інсульт та судинно-мозкові захворювання-2018", Київ. 2018:94. *Публікація тез, усна доповідь.*

4. Яценко КВ. Використання транскраніальної мікрополяризації у нейрореабілітації пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч. Матеріали IV всеукраїнського з'їзду «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичної та реабілітаційної медицини - 2019», Дніпро. 2019:217. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*
5. Яценко КВ, Лушнікова ІВ, Скибо ГГ. Вплив мікрополяризації на нейрони гіпокампа під час моделювання запального процесу *in vitro*. Збірник тез 20-го з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка, Київ. Фізіол жур. 2019;65(3):56. *Публікація тез.*
6. Яценко КВ. Оцінка функціонального стану ЦНС пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, після комплексного лікування з використанням мікрополяризації. Збірник тез 20-го з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка, Київ. Фізіол жур. 2019;65(3):56-57. *Публікація тез.*
7. Yatsenko K. Clinical application of transcranial direct current stimulation for neurorehabilitation of patients with cerebral palsy. Збірник тез конгресу RehabWeek 2019, Торонто. 2019:INRS87. *Публікація тез.*
8. Яценко КВ. Використання мікрополяризації у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. Матеріали конференції Школа клінічних нейронаук

"Карпатські читання", Ужгород. 2019:30. *Публікація тез, участь у постерній сесії.*

9. Yatsenko K, Tsurykov O, Skibo G. The protective effects of multipotent mesenchymal stromal cells in *in vivo* and *in vitro* models of neuroinflammation. Abstracts of I International Scientific and Practical Conference "EURASIAN SCIENTIFIC CONGRESS", Барселона. 2020:93-95. *Публікація тез.*
10. Yatsenko K. Effect of transcranial direct current stimulation on cerebral blood flow in patients with cerebral palsy. 34th European Neurology Congress, Цюрих, 2020: *Публікація тез, онлайн доповідь.*