

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

ЯЦЕНКО КАТЕРИНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК 616.831:615.841

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий консультант: член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор
Скибо Галина Григорівна
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу цитології

Офіційні опоненти: Член-кореспондент НАН України, академік НАМН України, доктор медичних наук, професор
Резніков Олександр Григорович
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України»,
завідувач відділу ендокринології репродукції і адаптації

Член-кореспондент НАМН України,
доктор медичних наук, професор
Чайковський Юрій Богданович
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця,
завідувач кафедри гістології та ембріології

доктор біологічних наук, професор,
Борисова Тетяна Олександрівна
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу нейрохімії

Захист відбудеться ____ листопада 2020 року о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті Інституту <http://biph.kiev.ua/>

Автореферат розіслано « ____ » жовтня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Любанова О. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Сычѐва и др, 2015, Eкісі et al., 2013).

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 із клітинами-мішенями і формування функціональних систем (Сессареллі et al., 2020).

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 (Khawaja et al., 2008).

Останнім часом також вивчається стан імунної системи, нейробіохімічні 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, ІЛ-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 (Kadhim et al., 2001).

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 перспективних методів корекції функціонального стану ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку може бути комплексна терапія з використанням неінвазивних методів нейростимуляції головного мозку.

Мікрополяризація – це неінвазивний електротерапевтичний метод стимуляції головного мозку, який успішно застосовується при лікуванні різних неврологічних захворювань (Stagg et al., 2018). Стимуляція структур ЦНС слабким постійним електричним струмом (до 1 мА) використовується як допоміжний метод для підвищення ефективності когнітивних функцій, зокрема пам'яті, та при таких патологіях як інсульт, хвороба Альцгеймера, нейрозапалення та ін. (Liu et al., 2016). 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 (Stagg et al., 2018).

Незважаючи на широке використання в 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 (Miraucourt et al., 2020).

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 органічним ураженнями ЦНС.

7. З'ясувати вплив неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції на динаміку електронейроміографічних 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 ураженнями 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, електро-енцефалографія, 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 uszkodження, може бути активація ендогенного нейрогенезу в субгранулярній зоні зубчастої звивини.

На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) показано, що ПВЛ призводить до uszkodження 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 ПВЛ показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації (КГД) та ліпополісахаридів (ЛПС) має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. Спільна дія КГД та ЛПС призводить до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдегідрогенази 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.

Уперше на короткостроковій культурі дисоційованих гіпокампальних клітин показано, що мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та запобігає їх uszkodженню 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 гіпокампальних клітин 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 одержаних результатів. 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 уражень головного мозку дитини, 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 на корисну модель №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 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 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 сторінки, із них основного тексту – 265 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 48 рисунками і 25 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних має два підрозділи, в яких наведено сучасні уявлення щодо органічних уражень головного мозку дитини та методів корекції функціонального стану ЦНС при цій патології. Аналіз літературних даних свідчить про те, що перспективним напрямком корекції морфо-функціонального стану ЦНС дитини при різних органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку, зокрема мікрополяризації. 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. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаного у дисертаційній роботі.

Матеріали і методи дослідження

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, 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, що підтверджено протоколом 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; 4-місячних самок та плодів 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.

У роботі були використані *модель глобальної короткотривалої ішемії головного мозку*, а також *in vivo* та *in vitro* моделі *перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ)*. Глобальну ішемію головного мозку моделювали на 3-4-місячних самцях мишей лінії FVB перетисканням (оклюзія) обох загальних сонних артерій протягом 20 хв з подальшим зняттям затискачів і відновленням кровопостачання (реперфузія). Моделювання ПВЛ *in vivo* здійснювалося шляхом одnobічної коагуляції загальної сонної артерії на мишах лінії FVB шостої доби після народження (P6). 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). Нами була створена *in vitro* модель ПВЛ з використанням органотипової культури зрізів головного мозку 7-денних мишей лінії FVB. Зрізи культивували на пористих напівпроникних нітроцелюлозних мембранах (Millicell-CM, Millipore, MA), розміщених у CO₂-інкубаторі на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5% CO₂) та рідкого середовища у 6-лункових планшетах при 35 °C. ПВЛ моделювали шляхом киснево-глюкозної депривації (КГД) зрізів головного мозку з подальшим додаванням у культуральне середовище ендотоксину ліпополісахариду (ЛПС) для імітації процесу запалення. КГД створювалась у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 % азоту (N₂) і 5 % CO₂, а рідке середовище – PBS, 12,5 ммоль Нерес з додаванням сахарози (15 ммоль D-сахарози) замість глюкози. Тривалість КГД становила 30 хвилин, після чого зрізи двічі відмивалися і поверталися до нормальних умов культивування (нормоксична реоксигенація протягом 24 та 48 годин). Після КГД у культуральне середовище додавали 100 нг/мл ЛПС (L4130, Sigma-Aldrich, США).

Культуру мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) отримували з жирової клітковини GFP-позитивних мишей. Клітинні суспензії культивувалися у повному середовищі DMEM-LG в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C. Пасажування проводили при досягненні 80 % конфлюентності моношару. Для трансплантації використовували клітини 2-3 пасажів. Фенотипічні характеристики культивованих ММСК визначали методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл проти поверхневих антигенів CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117.

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 в стерильних умовах. Очищену фракцію нейральних прогеніторних клітин (НПК) отримували центрифугуванням суспензії клітин у градієнті щільності (22 % розчині Percoll). НПК культивували в середовищі Neurobasal (Invitrogen) в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі 37 °C.

Дисоційовану культуру нейронів гіпокампа отримували з новонароджених щурів. Тканину гіпокампа подрібнювали, трипсинізували, ресуспендували пастерівською піпеткою та відокремлювали від поруйнованих клітин за допомогою центрифугування у розчині Кребса з 20 ммоль Нерес та 0,3 % 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 змінювали на другий день інкубації та далі двічі на тиждень.

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 пристрій** для вивчення впливу мікрополяризації на клітинні культури (**Рис. 1А**), використовуючи сертифікований пристрій «Реамед-Полярис» для генерації слабого постійного струму.

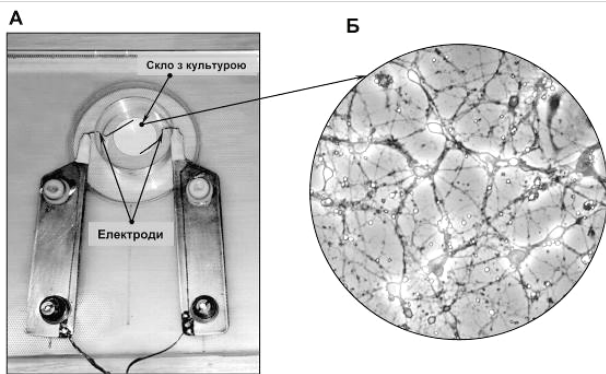


Рис. 1. Фото пристрою для проведення мікрополяризації культивованих гіпокампальних клітин (А) та фазово-контрастне зображення культур (збільшення $\times 200$) (Б).

Електроди занурювали в культуральне середовище з протилежних сторін скла, де були розташовані культивовані гіпокампальні клітини. 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 ЛПС (10 мкг/мл).

Зміни відносної кількості цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) у культуральному середовищі визначали колориметричним методом за допомогою тест-набору G1780 (“Promega”, USA). 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 у дублях та визначали середнє значень для кожної лунки. Зміни відносної кількості ЛДГ у культуральному середовищі виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину, нормалізованим до площі тканини у відповідній лунці.

Для проведення **MTS/формазанового тесту** культури клітин відмивали фізіологічним фосфатно-сольовим розчином (HBSS, Sigma), інкубували з MTS-реактивом (140 мкл/700 мкл) 60 хв. при 37 °С та спектрофотометрично визначали оптичну густину розчину при довжині хвилі 450 нм

(спектрофотометр uniSREC 2, LLG, Німеччина). Кількість формазаанового продукту прямо пропорційна кількості активних клітин. Результати виражали в умовних одиницях, що відповідали одиницям оптичної щільності розчину.

Трансплантація стовбурових клітин. GFP-позитивні ММСК (5×10^5 клітин у 2 мкл середовища) трансплантували семиденним (P7) тваринам з моделлю ПВЛ стереотаксично монолатерально в праву півкулю головного мозку через 24 години після ПВЛ. Тваринам контрольної групи вводили лише середовище культивування ММСК у відповідному об'ємі. Суспензію GFP-позитивних НПК ($2-2,5 \times 10^5$ клітин у 2 мкл середовища Neurobasal) стереотаксично трансплантували в гіпокамп експериментальних тварин через 24 години після ішемії/реперфузії. Контрольним тваринам робили ін'єкцію 2 мкл середовища культивування Neurobasal у такі ж координати.

Ін'єкція BrdU. Для виявлення клітин, що проліферують, тваринам перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили 5-бромдезоксиуридин (BrdU) – синтетичний нуклеозид, здатний замінювати тимідин у процесі реплікації ДНК, вбудовуючись в нову ДНК. Ін'єкції BrdU (50 мг/кг) робили внутрішньоочеревинно протягом 2 діб перед забором матеріалу двічі на день.

Перед забором матеріалу для **імуногістохімічного аналізу зрізів головного мозку** 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. Використовували такі первинні антитіла: anti-BrdU (1:100), anti-DCX (1:100), anti-GFAP (1:1500), anti-GFP (1:5000), anti-Iba-1 (1:750), anti-MBP (1:200), anti-NeuN (1:500), anti-Rip (1:1000). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa Fluor 488, 555, 568, 594 та 647 (1:1000, Molecular Probes Inc., США). Пофарбовані зрізи покривали середовищем Immu-MOUNT (Thermo Scientific, США) та досліджували за допомогою конфокального скануючого мікроскопа FV1000-VX61WI (Olympus, Японія).

Для **електронно-мікроскопічного аналізу культури ММСК** клітини фіксували за допомогою 4 % розчину формальдегіду і 2,5 % розчину глутаральдегіду (Sigma-Aldrich, США). Після фіксації клітини зневоднювали у висхідних концентраціях етанолу, а потім переносили в епоксидну смолу Epon. 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-CX (JEOL, Японія) при 80 кВ.

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 за загальноприйнятими методиками. Для встановлення діагнозу ДЦП використовували клінічну класифікацію ДЦП, яка запропонована К. О. Семеновою (Семенова КА, 1973). Діагноз епілепсія встановлювали за клінічними проявами судомних нападів і за результатами електроенцефалографічного дослідження. Усі пацієнти, які були залучені у дослідження, дали згоду на обробку персональних даних.

За допомогою **електроенцефалографії (ЕЕГ)** оцінювали біоелектричну активність головного мозку в динаміці двічі – до початку лікування та безпосередньо після закінчення терапевтичного курсу. Реєстрацію ЕЕГ здійснювали на енцефалографі ДХ-500 (DX-systems, Україна, м. Харків) за стандартною методикою запису біоелектричних потенціалів головного мозку з проведенням функціональних проб. Розміщення електродів здійснювали за Міжнародною системою 10-20 при скальповій референції в проміжку Fz-Cz. Аналіз електроенцефалографії здійснювався за допомогою системи картування Brain Atlas (Biologic Inc.). Катамнестичне спостереження після проведеної терапії було від 1 до 2 років.

Електронеуроміографічне (ЕНМГ) обстеження дітей проводилося на комп'ютеризованому електронеуроміографі М-TEST до лікування і після комплексної терапії з використанням транскраніальної мікрополяризації. Під час виконання стимуляційної електронеуроміографії 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.

Транскраніальну доплерографію судин голови (ТДГ) 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). Аналізували максимальну систолічну швидкість кровообігу, кінцеву діастолічну швидкість, середню швидкість кровообігу за цикл (СШК) та коефіцієнт асиметрії (КА).

Методи лікування. Обстежені діти з органічними ураженнями головного мозку були розподілені на дві групи, рандомізовані за віком та статтю (Табл. 1).

Таблиця 1.

Розподіл пацієнтів за групами

Діагноз	Дитячий церебральний параліч		Симптоматична епілепсія		Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія	
	порівняльна	основна	порівняльна	основна	порівняльна	основна
Кількість	42	51	14	15	15	30
Усього	167					

Пацієнти порівняльної групи (71 дітина) отримували базисний лікувально-реабілітаційний комплекс. Діти основної групи (96 пацієнтів), поряд із базисною терапією, додатково проходили курс транскраніальної мікрополяризації (Табл. 1).

Базисна терапія містила традиційний комплекс лікувально-реабілітаційних заходів, які комбінувались між собою залежно від індивідуальних потреб пацієнта: кінезіотейпування; біомеханічна стимуляція 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.

Таблиця 2.

Розподіл пацієнтів основної та порівняльної груп за віком і статтю

Група	Стать	До 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

Транскраніальна мікрополяризація у дітей основної групи виконувалася за допомогою сертифікованого апарату для мікрополяризації «Реамед-Полярис». Електроди розташовували на шкірі голови згідно з розробленими індивідуальними схемами лікування. Курс лікування становив 10 щоденних 40-хвилинних сеансів.

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 у експериментах з трансплантацією фетальної нервової тканини перевіряли з використанням тесту Шапіро-Вілка. Значення наведені у вигляді середнє \pm стандартне відхилення. Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення клітинних механізмів органічного ураження головного мозку на *in vivo* та *in vitro* моделях. Ми досліджували клітинні механізми розвитку гіпоксично-ішемічного ураження ЦНС на *in vivo* та *in vitro* моделях ураження білої речовини головного мозку – перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ).

Відомо, що ішемія-реперфузія головного мозку активує ендogenousний нейрогенез у зубчастій звивині гіпокампа і це може сприяти відновленню втрачених функцій (Choi J.H. et al, 2012). Незважаючи на такий ішемія-індукований нейрогенез, пошкоджений мозок ссавців має низьку здатність до регенерації. Тому зараз активно досліджується можливість застосування трансплантації стовбурових клітин різного генезу для лікування ішемічних і дегенеративних захворювань нервової системи (Tornero D. et al, 2017).

Для виявлення проліферуючих клітин тваринам з усіх експериментальних груп перед забором матеріалу для морфологічних досліджень вводили BrdU. Імуногістохімічний аналіз зрізів головного мозку показав, що у тварин контрольної групи кількість BrdU-мічених клітин на зріз становила $24,33 \pm 2,06$. 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). Трансплантація НПК у гіпокамп ішемізованих тварин збільшувала на 14-у добу кількість BrdU-позитивних клітин у зубчастій звивині вдвічі порівняно із ішемізованою групою тварин і становила $76,4 \pm 3,33$ ($P < 0,001$).

Отже, одним з клітинних механізмів, відповідальних за нейропластичність нервової тканини у відповідь на органічні ураження головного мозку, зокрема ішемічне ушкодження, може бути активація ендogenousного нейрогенезу. Трансплантація НПК після ішемічного ушкодження мозку в мишей достовірно збільшувала кількість BrdU-імунопозитивних проліферуючих клітин у субгранулярній зоні зубчастої звивини.

Для вивчення клітинних механізмів гіпоксично-ішемічного ушкодження головного мозку також використовували *in vivo* модель ПВЛ. Основною ознакою ПВЛ є пошкодження білої речовини головного мозку біля бокових шлуночків. Тому ми вирішили дослідити стан олігодендроцитів та мієліну. У контрольних тварин кожен олігодендроцит формував один сегмент мієліну для кількох сусідніх аксонів, загортаючи приблизно 1 мкм мієлінової оболонки навколо кожного аксона (Рис. 2А).

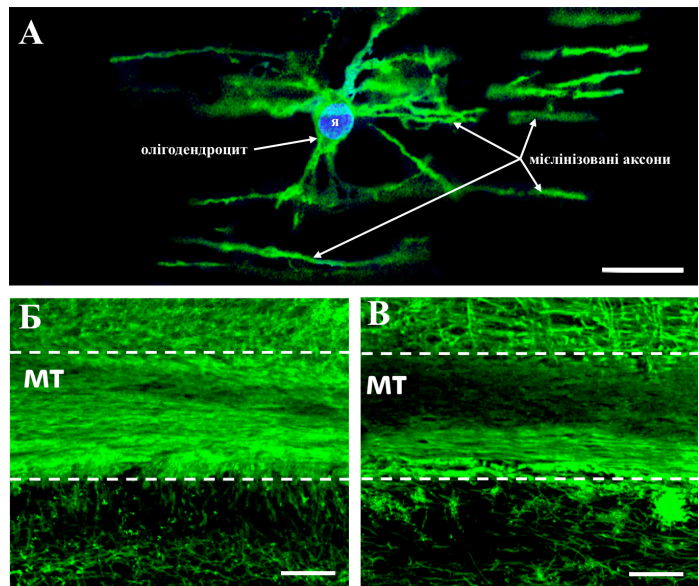


Рис. 2. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер олігодендроцитів Rip (А) та основний білок мієліну МВР (Б, В). А, Б - контрольна тварина, В - тварина з перивентрикулярною лейкомаляцією. Штрихова лінія - межі мозолистого тіла (mt). я - ядро олігодендроцита, пофарбоване DAPI. Шкала: А = 20 мкм, Б, В = 50 мкм.

Для оцінки ступеня ушкодження, спричиненого ПВЛ, ми використовували імуногістохімічне фарбування зрізів головного мозку на основний білок мієліну (МВР), який утворюється олігодендроцитами.

Імуногістохімічне фарбування зрізів оцінювали за 5-ти бальною шкалою: "0" – інтенсивне зафарбовування зрізів, "5" – відсутність імунофарбування. У контрольних тварин мозолисте тіло інтенсивно зафарбовувалося антитілами проти МВР і за шкалою оцінки відповідало "0" (Рис. 2Б). ПВЛ призводила до зменшення інтенсивності імунофарбування на МВР, що свідчило про пошкодження олігодендроцитів, і відповідало за шкалою оцінки пошкодження від "3" до "4" (Рис. 2В).

Імуногістохімічне дослідження фронтальних зрізів головного мозку миші показало, що після моделювання ПВЛ спостерігалось збільшення інтенсивності забарвлення GFAP-позитивних астроцитів та зміна їх морфології у мозолистому тілі (Рис. 3Б) в порівнянні з контрольною групою (Рис. 3А).

Також після моделювання ПВЛ спостерігалось збільшення інтенсивності забарвлення Іва-1-позитивних мікрогліальних клітин (Рис. 4Б) у порівнянні із контрольною групою (Рис. 4А) та зміна їх морфології з розгалуженого фенотипу (Рис. 4А) в активований фенотип (Рис. 4Б).

Отже, моделювання ПВЛ *in vivo* призводить до деградації МВР і, відповідно, олігодендроцитів та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин.

Метою наших подальших досліджень була розробка *in vitro* моделі ПВЛ на органотиповій культурі зрізів головного мозку миші. Під час моделювання ПВЛ *in vitro* ми, крім киснево-глюкозної депривації (КГД), також додавали ендотоксин ліпополісахарид (ЛПС) для створення умов, що імітують нейрозапалення.

Спектрофотометричний аналіз показав, що після спільної дії КГД і ЛПС пошкоджуючий вплив на органотипові зрізи суттєво більший, ніж при їх окремому використанні. Ефекти були виражені через 24 години і посилювалися через 48 годин (Табл. 3).

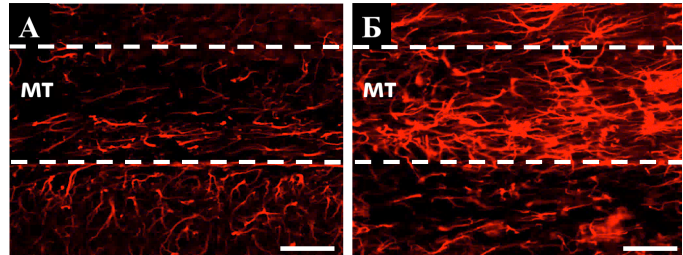


Рис. 3. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер астроцитів - GFAP. А - контрольна тварина, Б - тварина з ПВЛ. Штриховою лінією показано межі мозолистого тіла (mt). Шкала = 50 мкм.

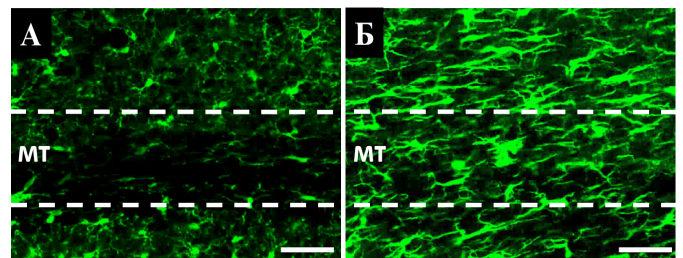


Рис. 4. Конфокальні мікрофотографії фронтальних зрізів головного мозку миші, пофарбованих на маркер астроцитів - GFAP. А - контрольна тварина, Б - тварина з ПВЛ. Штриховою лінією показано межі мозолистого тіла (mt). Шкала = 50 мкм.

Таблиця 3.

Відносна кількість лактатдегідрогенази в культуральному середовищі через 24 та 48 годин після КГД, додавання ЛПС або спільної дії КГД і ЛПС

	Лактатдегідрогеназа, у.о.	
	24 години	48 годин
Контроль	0,430 ± 0,04	0,510 ± 0,08
ЛПС	0,760 ± 0,05*	1,050 ± 0,14*
КГД	0,929 ± 0,03*	1,253 ± 0,20*
КГД + ЛПС	1,299 ± 0,07*	2,164 ± 0,49*

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

Також було продемонстровано, що спільна дія КГД та ЛПС призводила до значного зменшення Rip-імунореактивності, що свідчило про пошкодження білої речовини головного мозку, та спричиняла виражений реактивний астроцитарний мікрогліоз в органотиповій культурі зрізів головного мозку.

Отже, у цій серії експериментів було розроблено *in vitro* модель перивентрикулярної лейкомаляції, яку можна використовувати під час дослідження патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції, а також шляхів нейропротекції головного мозку, зокрема фармакологічних агентів та трансплантації стовбурових клітин.

Перспективним клітинним агентом для нейропротекції є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які можуть пригнічувати надмірні запальні процеси та підтримувати клітинний гомеостаз.

Існує гіпотеза, що нейропротекторні властивості мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин можуть реалізуватися паракринно завдяки різноманітним факторам, які вони секретують.

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

Було показано, що мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини в умовах їх безконтактного співкультивування зі зрізами головного мозку після моделювання перивентрикулярної лейкомаляції *in vitro* зменшували реактивний астрогліоз (в 1,7 разів, **Рис. 5**) і мікрогліоз (в 1,6 разів, **Рис. 6**) та збільшували кількість Rip-1-імунопозитивних олігодендроцитів удвічі порівняно із групою ПВЛ (**Рис. 7**).

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

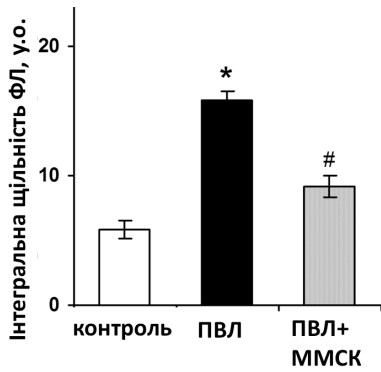


Рис. 5. Гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) GFAP+ астроцитів; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$).

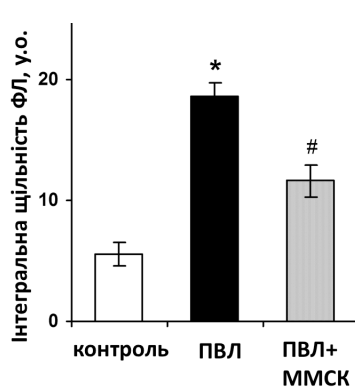


Рис. 6. Гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) Iba-1+ мікрогліальних клітин; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$).

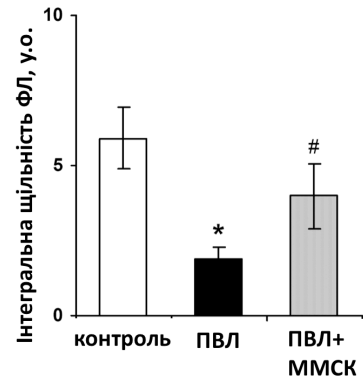


Рис. 7. Гістограма інтегральної щільності флуоресценції (у.о.) Rip-1+ олігодендроцитів; * – статистично достовірна відмінність порівняно з контролем ($P < 0,05$), # – статистично достовірна відмінність порівняно з ПВЛ ($P < 0,05$).

Дослідження механізмів нейропротекторної дії мікрополяризації на *in vitro* моделі органічного ураження головного мозку. Перспективним напрямком корекції функціонального стану ЦНС при органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивних інструментальних методів нейростимуляції головного мозку, зокрема мікрополяризації - стимуляції слабким (до 1mA) постійним струмом.

Тому, проаналізувавши клітинні механізми розвитку органічного ураження головного мозку, ми вирішили у нашій подальшій роботі дослідити дію мікрополяризації на нервові клітини в дисоційованій культурі гіпокампа.

Перевагами цього підходу 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.

Ми моделювали нейрозапальний процес, використовуючи ліпополісахарид, який додавали у культуральне середовище у трьох концентраціях (0.1, 1, 10 мкг/мл), для виявлення оптимальної дози-ефекту.

За даними ЛДГ-тесту, який виявляє ступінь життєздатності культивованих клітин, показано, що всі використані концентрації ліпополісахариду мали односпрямований дозозалежний негативний вплив на культивовані клітини.

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. 8).

Для дослідження впливу мікрополяризації на клітинні культури, нами був розроблений спеціальний пристрій (Рис. 1).

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. 8), але у присутності ЛПС, спостерігалось достовірне зменшення кількості ЛДГ в культуральному середовищі в середньому на 31 % відносно ЛПС, що вказує на нейропротекторний ефект мікрополяризації.

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. 9).

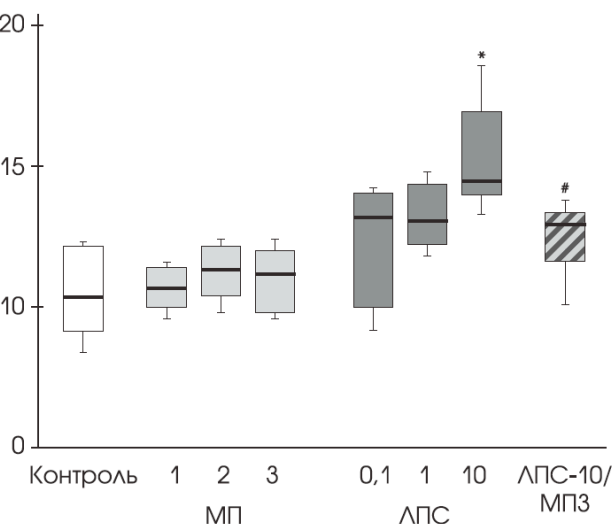
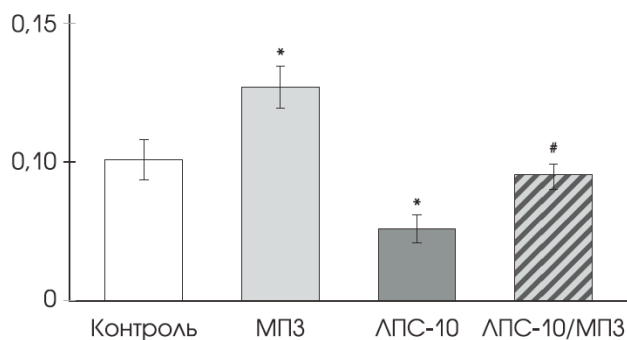


Рис. 8. Відносна кількість ЛДГ у культуральному середовищі клітинних культур гіпокампа через 24 год після проведення мікрополяризації у 3-х варіантах режимів (МП1, МП2, МП3), додавання ліпополісахаридів (ЛПС) у 3-х варіантах концентрацій та спільної дії ЛПС-10 та мікрополяризації в режимі МП3. Статистично достовірні відмінності: * – порівняно з контролем, # - порівняно з ЛПС-10 ($P < 0,05$).

Рис. 9. Результати аналізу мітохондріальної активності у культивованих клітинах гіпокампа при дії мікрополяризації у режимі МП3, 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 ($P < 0,05$).

Отже, використана експериментальна модель імітує події, які відбуваються в умовах запалення нервової тканини. ЛПС у концентрації 10 мкг/мл призводить до пошкодження культивованих клітин гіпокампа, а

мікрополяризація підвищує метаболічну активність нервових клітин у нормі та, у певній мірі, запобігає їх ушкодженню під час моделюванні процесу нейрозапалення.

У подальших експериментах 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 ЛПС. Показано, що у ранні терміни культивування дисоційованих клітин гіпокампа (2-5 доба), коли починається формування новоутворених нейритів, мікрополяризація суттєво підвищувала ефективність цього процесу (**Рис. 10**).

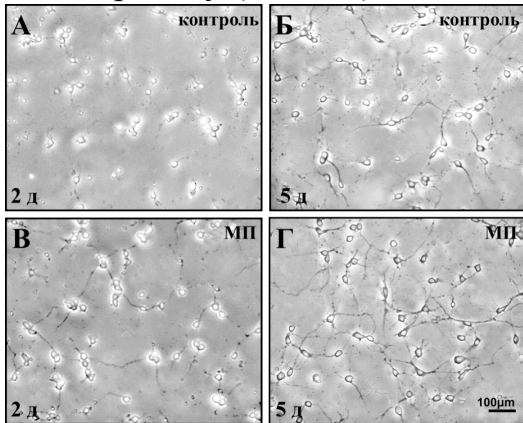


Рис. 10. Морфологічний аналіз ефективності формування нейритів у короткостроковій культурі дисоційованих клітинах гіпокампа. Ілюстрація змін нейритогенезу в період 2 (А) і 5 (Б) доби за нормальних умов та 2 (В) і 5(Г) доби після дії мікрополяризації (МП). Шкала = 100 мкм.

На **Рис. 11** представлені результати кількісної оцінки динаміки нейритогенезу у короткостроковій культурі клітин гіпокампа за нормальних умов та при дії мікрополяризації та ЛПС окремо і спільно.

Виявлено, що присутність ЛПС у культуральному середовищі суттєво уповільнює нейритогенез, тоді як мікрополяризація прискорює утворення відростків за нормальних умов і на фоні ЛПС.

Аналогічні дослідження були проведені на довгостроковій (10-12 добовій) культурі клітин гіпокампа, в якій відростки були добре розвинені та мали виражені контури (**Рис. 12**).

Сони нейронів та їх нейритні мережі були об'ємними, добре заломлювали світло і візуалізувалися як яскраво-виражені об'єкти (**Рис. 12А**, 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. 12А**, біла стрілка). Прижиттєві спостереження і подальший морфометричний аналіз показав, що на 12 добу культури виявляють ознаки стабільності та стійкості (**Рис. 13Б**).

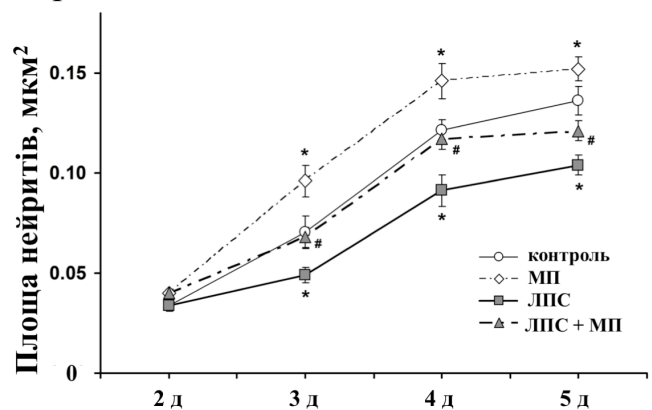


Рис. 11. Графічне зображення динаміки нейритогенезу при дії мікрополяризації (МП) і ліпополісахаридів (ЛПС) окремо та спільно (ЛПС+МП). Статистично значима різниця: * – щодо контролю, # – щодо ЛПС; n=40 для кожної з 4-х груп культур; P < 0,05.

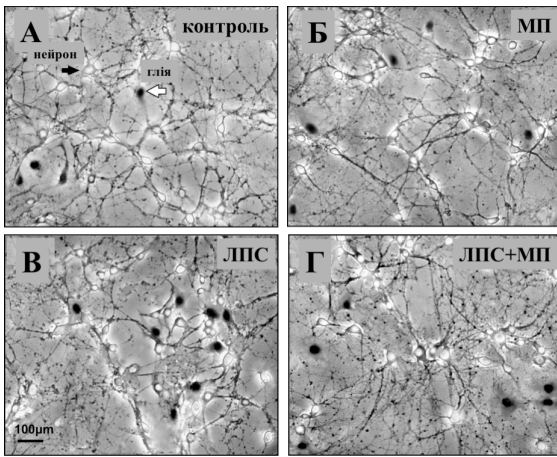


Рис. 12. Морфологічний аналіз стану нейритів та гліальних клітин у довгостроковій культурі. Ілюстрація змін нейритогенезу на 12 добу культивування за нормальних умов (А) та при дії мікрополяризації (МП) (Б) і ліпополісахаридів (ЛПС) (В) окремо і спільно з МП (Г). На фото (А) відмічено сому нейрону (1 – чорна стрілка) та гліальної клітини (2 – біла стрілка). Шкала = 100 мкм.

У довгостроковій культурі не було виявлено суттєвих змін нейритогенезу при дії мікрополяризації. ЛПС у певній мірі знижував вираженість нейритів, призводив до виникнення нерівномірності у розташуванні відростків та виникненню незаповнених відростками місць (Рис. 12В).

Мікрополяризація проявляла певні тенденції до стабілізації стану нейритів у присутності ЛПС (Рис. 12Г, 13А).

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 ЛПС викликає активацію цих клітин, що проявлялося у певному збільшенні їх кількості (Рис. 13Б).

Мікрополяризація у нормі не впливала на цей показник, але при дії ЛПС у деякій мірі відбувалася стабілізація стану глії.

Відомо, що при тривалому культивуванні нейрити відновлюються і формують нові синаптичні контакти.

З використанням двофотонної мікроскопії у попередніх дослідженнях були оцінені особливості морфо-функціональних змін синапсів в аналогічних до наших умовах культивування (Skibo GG, et al., 2005).

У нашій роботі, використання фазово-контрастного мікроскопа при збільшенні $\times 200$ уможливило, оцінку синаптоподібних структур, які візуалізувалися як чітко виражені темні точки на фоні виражених нейритів (Рис. 14).

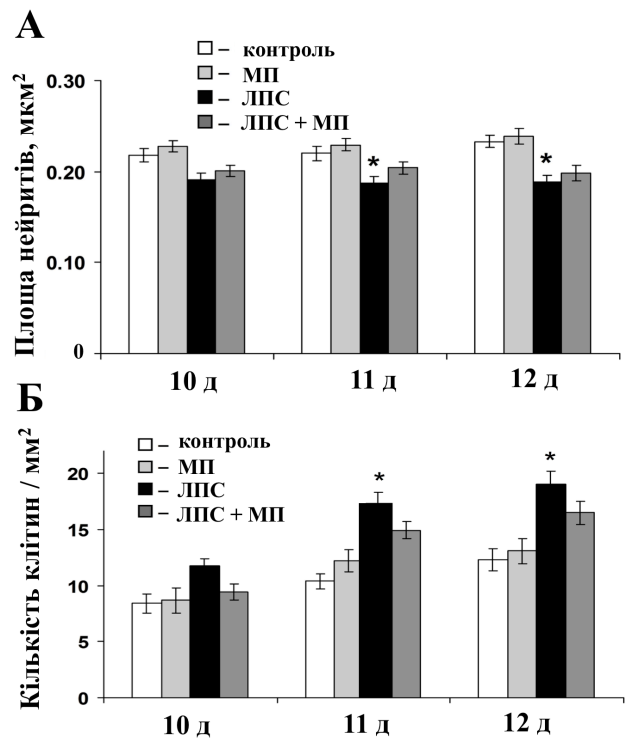


Рис. 13. (А) Гістограма змін площі нейритів. (Б) Гістограма змін кількості гліальних клітин. Статистично значуща різниця: * – щодо контролю, # – щодо дії ліпополісахаридів (ЛПС); $n=40$ для кожної з 4-х груп культур; $P < 0,05$.

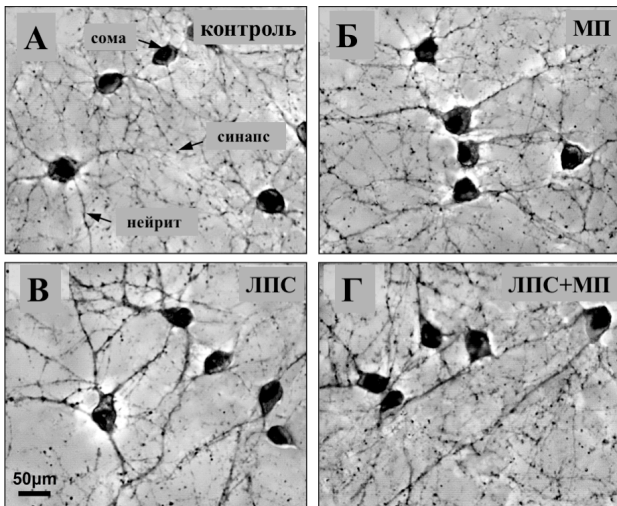


Рис. 14. Морфологічний аналіз синаптоподібних структур у довгостроковій (12 діб) культурі дисоційованих клітин гіпокампа. Ілюстрація вираженості синапсів за нормальних умов (А) та при дії мікрополяризації (Б) і ліпополісахаридів (ЛПС) (В) окремо і спільно (Г). На фото А відмічено сому нейрону, нейрит та синаптоподібну структуру. Шкала = 50 мкм.

Виявлено, що дія ЛПС зменшувала щільність як нейритів, так і синапсів (Рис. 15). Мікрополяризація у значній мірі сприяла стабілізації їх стану. Щільність синаптоподібних структур була 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. Активація 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.

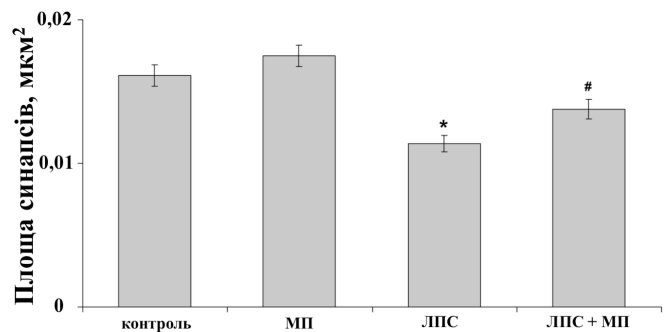


Рис. 15. Гістограма змін площі синапсів. МП - мікрополяризація, ЛПС - ліпополісахариди, ЛПС+МП - спільна дія ліпополісахаридів та мікрополяризації. Статистично значуща різниця: * – щодо контролю, # – щодо дії ліпополісахаридів (ЛПС); $n=50$ для кожної з 4-х груп культур; $P < 0,05$.

Використання мікрополяризації у пацієнтів, які хворі на дитячий церебральний параліч (ДЦП). 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 уражень 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.

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 ДЦП.

ЕЕГ-аналіз дітей із ДЦП до лікування свідчив про порушення біоелектричної активності мозку різного ступеня виразності (Табл. 4).

Таблиця 4

Динаміка розподілу патернів електроенцефалограми (ЕЕГ) у пацієнтів із 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 ЕЕГ спостерігалась спрямована позитивна динаміка фоновіої біоелектричної активності мозку у 76,2 % пацієнтів основної групи, порівняно із 25,0 % дітей у

групі порівняння (**Табл. 4**). Загальні зміни стосувались стабілізації вікових прекурсорів центрального і альфа-ритмів і мали тенденції до зменшення структурної дезорганізації і дифузного сповільнення ЕЕГ при відсутності збільшення пароксизмальної активності та міжпівкульової асиметрії.

Найбільш значима динаміка спостерігалась у групі дітей з дезорганізацією ЕЕГ 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 предомінантності і модуляторності альфа-ритму (**Табл. 4**).

Позитивна динаміка спостерігалась у дітей з дезорганізацією ЕЕГ без альфа-ритму після проведеного лікування із застосуванням транскраніальної мікрополяризації (у 60,0% пацієнтів основної групи).

Зміни патерну вираженої дезорганізації ЕЕГ з редукцією альфа і центрального ритмів мали тенденції зменшення потужності повільноспадових і потиличних і скроневих ділянок, підсилення синхронізації і потужності тета-діапазону в центрально-тім'яно-потилічній ділянці. Мало місце зменшення загостреної дизритмії в лобно-центральных і скроневих відділах.

Десинхронний варіант ЕЕГ 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. 4**).

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 ЕЕГ (100%, порівняно із 33,3% дітей у групі порівняння) (**Табл. 4**).

Динаміка стабілізації альфа-ритму пов'язана з формуванням центрального ритму, зменшенням потужності дифузної синхронізації і повільної активності в лобно-скроневих відділах.

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.

Результати Фур'є-аналізу вихідних даних ЕЕГ основної групи та групи порівняння представлені в **Табл. 5**.

Таблиця 5.

Результати Фур'є-аналізу даних електроенцефалограм пацієнтів із ДЦП обох груп спостереження під впливом проведеного лікування

Група порівняння, n=12	Діапазон, мкВ ² , (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	Діапазон, мкВ ² , (M±m)			
	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 СЩП бета-діапазону: в основній групі цей показник становив 26,9%, у групи порівняння - 17,3%.

Повільнохвильова частина спектра ЕЕГ під впливом проведеного лікування також мала позитивну динаміку у вигляді зменшення потужності. Після комплексного лікування із використанням мікрополяризації у пацієнтів з ДЦП СЩП дельта-ритму на ЕЕГ статистично вірогідно знизилась на 34,4%, а СЩП тета-хвиль – на 35,4%.

У пацієнтів групи порівняння не спостерігалась статистично вірогідна динаміка зменшення СЩП цих діапазонів повільнохвильової частини спектра.

Отже, аналіз даних ЕЕГ дослідження у пацієнтів з ДЦП групи порівняння та основної до і після лікування свідчить про те, що у хворих основної групи, в комплексне лікування яких додавалася транскраніальна мікрополяризація, спостерігалась більш виражена позитивна динаміка параметрів ЕЕГ. Такі зміни у дітей з ДЦП після комплексного лікування із додаванням методу ТМП свідчать про позитивний розвиток функціональної організації головного мозку, що створює більш сприятливі умови для реалізації психофізіологічних функцій у даній групі пацієнтів.

Для оцінки стану нервово-м'язового апарату в дітей із органічними ураженнями головного мозку, зокрема при ДЦП, широко використовується метод електронейроміографії. 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 (Leppanen R.E., 2012)

Проведене електронейроміографічне дослідження пацієнтів зі спастичною і гіперкінетичною формами ДЦП до і після комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації виявило зміни електронейроміографічних

показників (Табл. 6).

Таблиця 6.

Динаміка електронейроміографічних показників у дітей з ДЦП 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*

Результати аналізу параметрів Н-рефлексу показали достовірне зниження співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ у пацієнтів зі спастичними формами ДЦП після комплексного лікування з застосуванням мікрополяризації, що вказує на зниження раніше патологічно підвищеної рефлекторної збудливості мотонейронів.

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 гіпертону м'язів, найімовірніше, обумовлено поліпшенням впливу на спинальний рівень з боку супраспинальних систем, відповідальних за руховий контроль.

У дітей з гіперкінетичними формами ДЦП спостерігалось знижене в порівнянні з нормативними даними співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ відповідей литкового м'яза. Комплексне лікування із застосуванням мікрополяризації достовірно підвищувало показник $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ (Табл. 6).

Комплексне лікування з використанням методу мікрополяризації також показало достовірне поліпшення показників F-хвилі у пацієнтів як із спастичними формами ДЦП, так і гіперкінетичними (Табл. 6).

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 (Jeffery D.T. et al., 2007). 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 тону, що створює умови для поліпшення функціонування нейром'язового апарату (Jeffery D.T. et al., 2007).

Використання мікрополяризації у пацієнтів, які хворі на симптоматичну епілепсію. Було показано, що застосування ТМП значно зменшувало спонтанні та епілептичні збуджувальні постсинаптичні струми на бікуліновій *in vitro* моделі у мишей (Chang W.P. et al., 2015). Тому ми досліджували можливість застосування методу ТМП для покращення EEG показників у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію.

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. 16А). Центральний ритм був слабо виражений або непостійним. Рівень пароксизмальної активності EEG у таких дітей був високим. Після закінчення курсу ТМП у всіх дітей відзначалося виражене покращення EEG картини. Відзначалося зменшення вираженості епілептиформних змін, що проявлялося в зниженні генералізованої пароксизмальної активності, а також кількості та амплітуди одиночних спайків і епілептичних комплексів. На EEG реєструвалося збільшення частоти та амплітуди альфа- та бета-ритмів, а також зменшення амплітуди і частоти дельта- і тета-ритмів (Рис. 16Б).

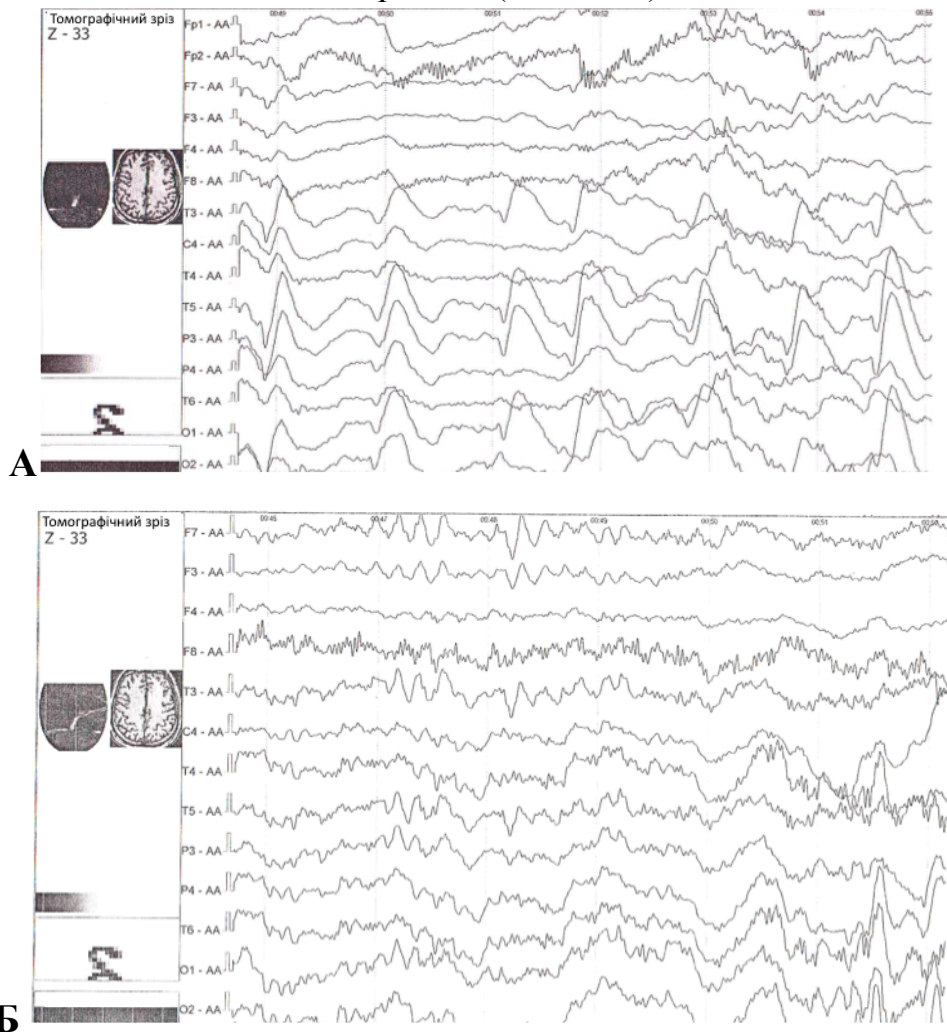


Рис. 16. Електроенцефалограма хворого з симптоматичною епілепсією до (А) та після (Б) лікування із використанням мікрополяризації. Швидкість: 30,0 мм/с, підсилення: 100,0 мкВ/см.

У дітей основної групи спектральна щільність потужності (СЩП) альфа-ритму статистично вірогідно збільшилася на 46,3% після комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації. Позитивну динаміку цього діапазону відзначали і у пацієнтів групи порівняння. На відміну від основної групи статистично вірогідне наростання СЩП альфа-ритму на повторних ЕЕГ групи порівняння становило лише 16,9%. Відзначено статистично вірогідне збільшення СЩП бета-діапазону у пацієнтів обох груп спостереження: в основній групі цей показник становив 25,6%, тоді як у пацієнтів групи порівняння - лише 13,9%. Мала місце позитивна динаміка у вигляді зменшення потужності повільнохвильової частини спектру. СЩП дельта-ритму на ЕЕГ дітей після проведення курсу мікрополяризації статистично вірогідно знизилась на 33,4%. Показник СЩП тета-хвиль на повторних ЕЕГ цієї групи спостереження також статистично вірогідно зменшився на 32,5%.

У пацієнтів групи порівняння не було виявлено статистично вірогідної динаміки зменшення СЩП даних діапазонів повільнохвильової частини спектру.

Слід зазначити, що динаміка характеристик ЕЕГ-картини відрізнялась у хворих основної та порівняльної груп. Співставлення результатів, отриманих при проведенні ЕЕГ-дослідження пацієнтів обох груп спостереження виявило, що у дітей, яким проводили транскраніальну мікрополяризацію, позитивна динаміка спектральних складових ЕЕГ була вірогідно вищою. Вище означені результати Фур'є-аналізу даних ЕЕГ є підтвердженням більшої терапевтичної ефективності комплексного методу лікування симптоматичної епілепсії з використанням мікрополяризації (основна група) у порівнянні із традиційними лікувально-реабілітаційними заходами (група порівняння).

Отже, застосування ТМП у дітей з симптоматичною епілепсією сприяє покращенню ЕЕГ картини. ТМП може стати перспективним методом у комплексному лікуванні хворих із симптоматичною епілепсією.

Використання мікрополяризації у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією (ПГІЕ). Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія (ПГІЕ) – це поширена патологія нервової системи як серед доношених, так і серед недоношених новонароджених. Ефективним методом покращення функціональних показників роботи мозку хворих з ПГІЕ може бути ТМП. Тому метою наших подальших досліджень було вивчення ефективності застосування ТМП у комплексному лікуванні пацієнтів з ПГІЕ.

Згідно з даними первинного комплексного клініко-нейрофізіологічного обстеження, в обох групах дітей (основна і порівняльна) із ПГІЕ було виявлено функціональні та органічні розлади стану ЦНС.

Результати транскраніальної доплерографії (ТДГ) судин голови дітей із ПГІЕ 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 ТДГ 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**.

Таблиця 7.

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**). 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**).

Показники середньої швидкості кровообігу по базилярній артерії, середній і передній мозкових артеріях, залежно від патерну транскраніальної доплерографії, представлені в **Табл. 8**.

Таблиця 8.

Середня швидкість кровообігу в дітей із перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією обох груп спостереження під впливом лікування

Патерн доплерографії, М ± 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 осіб у групі. БА - базиллярна артерія, СМА - середня мозкова артерія, ПМА - передня мозкова артерія.

Висока швидкість кровообігу по БА в дітей основної групи, які проходили комплексне лікування із застосуванням ТМП, статистично достовірно зменшилася на 22,0 %. У цій групі дітей також відзначено статистично достовірне зменшення високих швидкостей кровообігу по СМА і ПМА (на 17,7 % і 7,5 % відповідно). Позитивну динаміку цього параметра спостерігали і в пацієнтів групи порівняння, але вона не була статистично достовірною. Після проведення курсу ТМП відзначали статистично достовірне зростання низьких швидкостей кровообігу по БА, СМА і ПМА (28,4 %, 21,9 %, 10,4 % відповідно) у пацієнтів основної групи. Також відзначали позитивну динаміку цих патернів ТДГ і в дітей групи порівняння, але статистично достовірно зросла швидкість кровообігу тільки по середній мозковій артерії (10,1 %). Позитивна динаміка патернів ТДГ у дітей з ПГІЕ під впливом лікування відображалася в компенсації мозкового кровообігу, зникненні вазоспазмів різного ступеня, нормалізації тону магістральних судин голови, зменшенні КА кровообігу по СМА і ПМА. Після ТМП відзначено статистично достовірне зменшення середніх високих і збільшення середніх низьких лінійних швидкостей кровообігу по БА, СМА і ПМА. Зміни показників ТДГ на тлі лікування можуть бути наслідком нормалізації мозкового кровообігу, збільшенням капіляризації, активацією обох відділів вегетативної нервової системи (з переважанням впливу на симпатичний відділ).

Отже, застосування ТМП в комплексному лікуванні пацієнтів з ПГІЕ забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії

судин голови у 82 % пацієнтів основної групи на відміну від 56 % у групі порівняння. Дані проведеного ТДГ обстеження свідчать про більшу терапевтичну ефективність комплексного методу з використанням ТМП в лікуванні дітей з ПГЕ в порівнянні з традиційними лікувально-реабілітаційними заходами.

Підбиваючи підсумки нашої роботи можна відзначити, що однією з важливих ланок патогенезу органічних уражень головного мозку новонароджених є ПВЛ. На *in vivo* та *in vitro* моделях ПВЛ ми дослідили клітинні механізми розвитку ПВЛ і показали, що ця патологія призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну), утворення олігодендроцитів, та реактивного гліозу – активації астроцитів і мікрогліальних клітин. Гіпоксичні та ішемічні зміни в перивентрикулярній зоні призводять до деструкції нервової тканини і лейкомаляції з незворотними наслідками, які можуть перерости в більш важку патологію - ДЦП, гіпоксично-ішемічну енцефалопатію, епілепсію та ін.

Перспективним напрямком корекції функціонального стану ЦНС при органічних ураженнях головного мозку може бути застосування комплексної терапії з використанням неінвазивного методу нейростимуляції головного мозку - мікрополяризації.

Спираючись на результати проведеного дослідження, ми можемо запропонувати кілька механізмів дії мікрополяризації на морфо-функціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку, які представлені на **Рис. 17**:

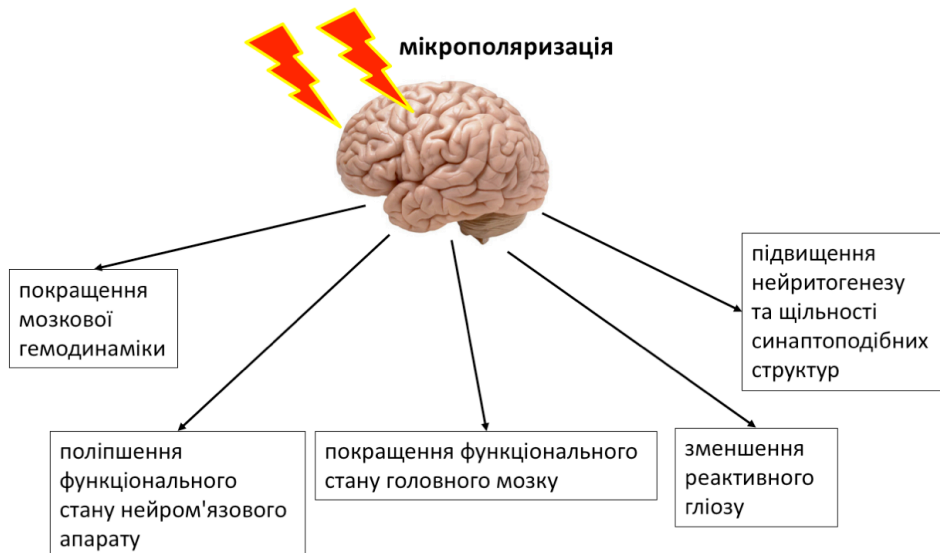


Рис. 17. Механізми дії мікрополяризації на процеси регенерації нервової тканини при органічних ураженнях головного мозку дитини.

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 ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено такі висновки:

1. На *in vivo* моделі перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) показано, що ПВЛ призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну), утворення 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 ПВЛ показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації (КГД) та ліпополісахаридів (ЛПС) має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. В органотиповій культурі зрізів головного мозку спільна дія КГД та ЛПС призводить до значного вивільнення цитозольного ферменту лактатдагідрогенази в культуральне середовище, degradaції 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 ПВЛ *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 ПВЛ.

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 базиллярній артерії, середніх та передніх мозкових артеріях. Транскраніальна мікрополяризація вірогідно збільшує низькі середні швидкості кровообігу за цикл по базиллярній артерії, середніх та передніх мозкових артеріях.

7. Застосування транскраніальної мікрополяризації у дітей із ДЦП найбільш позитивний ефект мало у пацієнтів зі спастичними формами. Результати електронейроміографічного аналізу параметрів Н-рефлексу показали достовірне зниження співвідношення $H_{\text{макс}}/M_{\text{макс}}$ з $87,72 \pm 6,22 \%$ до $19,84 \pm 2,34 \%$ у пацієнтів зі спастичними формами ДЦП, що вказує на зниження раніше патологічно підвищеної рефлекторної збудливості мотонейронів.

8. Аналіз даних ЕЕГ 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 ЕЕГ при відсутності збільшення пароксизмальної активності та міжпівкульової асиметрії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

СТАТТІ:

1. Tsupukov O.M., Kyryk V.M., Ustyomenko A.M., Yatsenko K.V., Butenko G.M., & Skibo G.G. (2015). 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 and Organ Transplantology*, 3(1), 68–73. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).
2. Яценко К.В. (2016). Перинатальна гіпоксично-ішемічна енцефалопатія та експериментальні підходи до її корекції. *Український неврологічний журнал*, 38(1), 7–11. (Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо ПГІЕ, оформлення статті).
3. Tsupukov O.M., Lushnikova I.V., Nikandrova Y.A., Yatsenko K.V., Ustyomenko A.M., Kyryk V.M., Butenko G.M., & Skibo G.G. (2016). A novel model of periventricular leukomalacia on mouse organotypic brain slice culture. *Cell and Organ Transplantology*, 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. (2016). Ultrastructural study of mouse adipose-derived stromal cells induced towards osteogenic direction. *Microscopy Research and Technique*, 79(6), 557–564. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
5. Яценко К.В., Тараненко Т.В., Юрченко Ф.В., & Скибо Г.Г. (2017). Вплив комплексного лікування з використанням транскраніальної мікрополяризації на мозковий кровообіг у пацієнтів, які хворі на дитячий церебральний параліч. *Запорозький медичний журнал*, 19(1), 81–85. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження,

статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

6. Яценко К.В., & Надоненко О.М. (2017). Динаміка електроенцефалографічних показників у пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, під впливом комплексного лікування з використанням методу. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, 2, 101-7. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
7. Tsurykov O.M., Lushnikova I.V., Ustymenko A.M., Kyryk V.M., Nikandrova Y.A., Patseva M.A., Yatsenko K.V. Butenko GM, & Skibo GG. (2017). Protective effects of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells of mice on periventricular leukomalacia model *in vitro*. *Cell and Organ Transplantation*, 5(1), 28–32. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів).
8. Цупиков О., Кирик В., Яценко К., Бутенко Г., & Скибо Г. (2017). Вплив трансплантованих нейральних прогеніторів на проліферацію клітин гіпокампа після ішемічного ушкодження мозку. *ScienceRise. Medical Science*. 14(6), 32–36. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).
9. Яценко Е.В., & Криворучко В.С. (2017). Анализ электроэнцефалографических показателей у пациентов с ДЦП после комплексного лечения с использованием микрополяризации. *Неврология и нейрохирургия Восточная Европа*, 7(3), 464–469. (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. (2017). The effects of multipotent mesenchymal stromal cells on mouse brain slices at their co-culture in an *in vitro* model of periventricular leukomalacia. *Фізіологічний журнал*, 63(5), 3–12. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, оформлення статті).
11. Яценко К.В. (2017). Вплив комплексної терапії з використанням мікрополяризації на електроенцефалографічні показники у дітей, хворих на симптоматичну епілепсію. *Український неврологічний журнал*, 44(3), 21–25. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація результатів, оформлення статті).
12. Яценко Е.В. (2018). Динамика электроэнцефалографических показателей у пациентов с перинатальной гипоксически-ишемической энцефалопатией под влиянием комплексного лечения с использованием метода транскраниальной микрополяризации. *Неврология и нейрохирургия Восточная Европа*, 8(2), 178–185. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

13. Яценко Е.В. (2018). Эффективность использования метода СИ-терапии у постинсультных пациентов с двигательными нарушениями в паретичной верхней конечности. *Неврология и нейрохирургия Восточная Европа*, 8(3), 392–398. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
14. Яценко К.В. (2018). Вплив транскраніальної мікрополяризації на мозкову гемодинаміку у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, 3, 151–156. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, статистичний аналіз, інтерпретація результатів, оформлення статті).
15. Яценко К.В., Лушнікова І.В., & Скибо Г.Г. (2018). Дослідження впливу мікрополяризації на нервові клітини при моделюванні запального процесу *in vitro*. *Український неврологічний журнал*, 47(2), 69–73. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
16. Яценко К.В. (2018). Мозкова гемодинаміка та електроенцефалограма у хворих на симптоматичну епілепсію при комплексному лікуванні з використанням транскраніальної мікрополяризації. *Фізіологічний журнал*, 64(1), 52–58. (Особисто дисертантом проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
17. Kyryk V.M., Kuchuk O.V., Mamchur A.A., Ustymenko A.M., Lutsenko T.M., Tsupykov O.M., Yatsenko K.V., Skibo G.G., Bilko D.I., & Bilko N.M. (2018). 3D culture of murine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in hydrogel based on carbomer 974P. *Cell and Organ Transplantology*, 6(2), 195–201. (Особисто дисертантом проведені статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
18. Яценко К.В., Лушнікова І.В., & Скибо Г.Г. (2019). Ефекти слабого постійного електричного струму на нейритогенез у модельних експериментах *in vitro*. *Фізіологічний журнал*, 65(4), 41–49. (Особисто дисертантом проведені статистичний аналіз даних, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).
19. Яценко К.В. (2019). Симптоматична епілепсія: причини виникнення та перспективні методи лікування. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, 1, 7–13. (Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо симптоматичної епілепсії, оформлення статті).
20. Яценко Е.В. (2019). Микрополяризация - эффективный неинвазивный метод нейростимуляции при органических поражениях головного мозга у детей. *Art of medicine*. 2(10), 123–127. (Особисто дисертантом проведений аналіз літератури щодо мікрополяризації при органічних ураженнях мозку).
21. Yatsenko K., Lushnikova L., Ustymenko A., Patseva M., Govbakh I., Kyryk V., & Tsupykov O. (2020). Adipose-derived stem cells reduce lipopolysaccharide-induced myelin degradation and neuroinflammatory responses of glial cells in mice. *Journal of Personalized Medicine*, 10(2), E66. (Особисто дисертантом

проведені експериментальні дослідження, інтерпретація отриманих результатів, оформлення статті).

22. Яценко К.В., Лушнікова І.В., Скибо Г.Г., & Цупиков О.М. (2020). 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 результатів та їх аналіз, підготовка до друку).

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ:

1. Цупиков О.М., Кирик В.М., Мамчур А.А., Устименко А.М., Яценко К.В., Бутенко Г.М., Скибо Г.Г. Трансплантація ММСК жирової клітковини при перинатальній патології ЦНС // Конференція «Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє», 7 листопада 2014, Київ (Україна).
2. Яценко К.В. Дитяча нейрореабілітація при органічних ураженнях мозку // Конференція «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичного виховання та валеології-2018», 4-5 жовтня 2018, Одеса (Україна).
3. Яценко К.В. Ефективний метод відновлення рухових функцій паретичної верхньої кінцівки у постінсультних пацієнтів // IV національний конгрес "Інсульт та судинно-мозкові захворювання", 1-3.11.2018, Київ (Україна).
4. Яценко К.В. Використання транскраніальної мікрополяризації у нейрореабілітації пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч // IV з'їзд «Сучасні досягнення спортивної медицини, фізичної реабілітації, фізичної та реабілітаційної медицини», 11-13.04.2019, Дніпро (Україна).
5. Яценко К.В., Лушнікова І.В., Скибо Г.Г. Вплив мікрополяризації на нейрони гіпокампа під час моделювання запального процесу *in vitro* // XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, 27-30 травня 2019, Київ (Україна).
6. Яценко К.В. Оцінка функціонального стану ЦНС пацієнтів, хворих на дитячий церебральний параліч, після комплексного лікування з використанням мікрополяризації // XX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, 27-30 травня 2019, Київ (Україна).
7. Yatsenko K. Clinical application of transcranial direct current stimulation for neurorehabilitation of patients with cerebral palsy // RehabWeek-2019, June 24-28, 2019, Toronto (Canada).
8. Яценко К.В. Використання мікрополяризації у пацієнтів з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією // Школа клінічних нейронаук "Карпатські читання", 13-15 червня 2019, Ужгород (Україна).
9. Yatsenko K., Tsuykov O., Skibo G. The protective effects of multipotent mesenchymal stromal cells in *in vivo* and *in vitro* models of neuroinflammation // EURASIAN SCIENTIFIC CONGRESS, January 27-28, 2020, Barcelona (Spain).
10. Yatsenko K. Effect of transcranial direct current stimulation on cerebral blood flow in patients with cerebral palsy // 34th European Neurology Congress, June 24-25, 2020, Zurich (Switzerland).

АНОТАЦІЯ

Яценко К. В. Механізми органічного ураження головного мозку і методи їх корекції. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.14 – патологічна фізіологія – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

У дисертаційній роботі представлений детальний аналіз патогенетичних механізмів розвитку перивентрикулярної лейкомаляції (ПВЛ) та досліджений вплив комплексного лікування з застосуванням транскраніальної мікрополяризації на морфо-функціональний стан ЦНС дитини при органічних ураженнях головного мозку. На *in vivo* моделі ПВЛ показано, що ПВЛ призводить до ушкодження мієлінової оболонки нервових волокон (деградації основного білка мієліну) та реактивного гліозу. Уперше на створеній *in vitro* моделі ПВЛ показано, що спільна дія киснево-глюкозної депривації (КГД) та ліпополісахаридів (ЛПС) має найбільш пошкоджуючий вплив на нервову тканину порівняно з кожним із цих чинників окремо. 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, а також впливає безпосередньо на нейритогенез. Аналіз ЕЕГ даних пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку, в комплексне лікування яких додавалася транскраніальна мікрополяризація, продемонстрував більш виражену позитивну динаміку параметрів ЕЕГ. Показано, що позитивна динаміка електронейроміографічних показників після курсу мікрополяризації свідчить про поліпшення функціонального стану нейром'язового апарату. Продемонстровано, що мікрополяризація в пацієнтів з органічними ураженнями головного мозку забезпечує позитивну динаміку показників транскраніальної доплерографії судин голови. Одержані результати дають підстави стверджувати про доцільність використання транскраніальної мікрополяризації у комплексній реабілітації дітей з органічними ураженнями головного мозку.

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

АННОТАЦИЯ

Яценко Е. В. Механизмы органического поражения головного мозга и методы их коррекции. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

В диссертационной работе представлен подробный анализ патогенетических механизмов развития перивентрикулярной лейкомаляции и

исследовано влияние комплексного лечения с применением транскраниальной микрополяризации на морфо-функциональное состояние ЦНС ребенка при органических поражениях головного мозга. На *in vivo* модели перивентрикулярной лейкомаляции (ПВЛ) показано, что ПВЛ приводит к повреждению миелиновой оболочки нервных волокон (деградации основного белка миелина) и, соответственно, олигодендроцитов и реактивного глиозом - активации астроцитов и микроглиальных клеток. Впервые на созданной *in vitro* модели ПВЛ показано, что совместное действие кислород-глюкозной депривации (КГД) и липополисахаридов (ЛПС) имеет наиболее повреждающее влияние на нервную ткань по сравнению с каждым из этих факторов в отдельности. Совместное действие КГД и ЛПС приводит к значительному высвобождению лактатдегидрогеназы в культуральную среду, деградации основного белка миелина и вызывает выраженный реактивный астро- и микроглиоз в органотипических культуре срезов головного мозга. Впервые на краткосрочной культуре диссоциированных клеток гиппокампа показано, что микрополяризация повышает метаболическую активность нервных клеток в норме и предотвращает их повреждение при моделировании процесса нейровоспаления, а также воздействует непосредственно на нейритогенез и стабилизирует состояние нервных клеток. Анализ данных ЭЭГ исследования у пациентов с органическими поражениями головного мозга группы сравнения и основной до и после лечения показал, что у больных основной группы, в комплексное лечение которых входила транскраниальная микрополяризация, наблюдалась более выраженная положительная динамика параметров ЭЭГ. Показано, что положительная динамика электронейромиографических показателей после курса микрополяризации свидетельствует об улучшении функционального состояния нейромышечной аппарата, которое происходит благодаря оптимизации воздействий на него надсегментарных структур моторного анализатора. Продемонстрировано, что включение транскраниальной микрополяризации в лечебно-реабилитационного комплекса пациентов с органическими поражениями головного мозга обеспечивает положительную динамику показателей транскраниальной доплерографии сосудов головы.

Результаты исследования прежде всего имеют фундаментальное значение, поскольку заметно расширяют существующие представления о клеточных механизмах развития ПВЛ, которая является одной из причин прогрессирующего роста частоты органических поражений головного мозга, к последствиям которых относятся ДЦП, симптоматическая эпилепсия и перинатальная гипоксически-ишемическая энцефалопатия. Полученные результаты дают основания утверждать о целесообразности использования транскраниальной микрополяризации в комплексной реабилитации детей с органическими поражениями головного мозга.

Ключевые слова: органические поражения ЦНС, перивентрикулярная лейкомаляция, ишемия, нейровоспаление, транскраниальная микрополяризация.

SUMMARY

Yatsenko K.V. Mechanisms of organic brain damages and methods to correct them. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of medical sciences, 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 morphological and functional state of the child's CNS in organic brain damages. On *in vivo* model of PVL 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. 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. For the first time, in short-term culture of dissociated hippocampal cells, direct current stimulation has been shown to increase normal metabolic activity of neural cells and prevent their damage in modeling the neuroinflammation, as well as directly affect neuritogenesis and stabilize the state of neural cells. Analysis of EEG data from patients with organic brain damages showed that tDCS 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. It is demonstrated that tDCS in patients with organic brain damages provides a positive dynamics of transcranial Doppler of the brain blood vessels. 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

Перелік основних умовних позначень та скорочень

БА – базилярна артерія
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
СЦП – спектральна щільність потужності
ТДГ – транскраніальна доплерографія
ТМП – транскраніальна мікрополяризація
ФБ – фосфатний буфер
BrdU – 5-бромдезоксіуридин
DCX – doublecortin
GFP – green fluorescent protein
MTS – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-
2H-tetrazolium
PBS – phosphate-buffered saline