

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Яременко Лілія Михайлівна

УДК: 616.831.1:616.831-005.4:57.084:[616.017.1:57.04]

**ЗМІНИ У КОРИ ПІВКУЛЬ ВЕЛИКОГО МОЗКУ
ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ІШЕМІЇ ТА ІМУНОКОРЕКЦІЇ
(ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.03.09 – гістологія, цитологія, ембріологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця, МОЗ України.

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор **Грабовий Олександр Миколайович**, професор кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України, доктор медичних наук, професор **Скибо Галина Григорівна**, завідувач відділу цитології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця;

доктор медичних наук, професор **Герашенко Сергій Борисович**, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології ДВНЗ «Івано-Франківський Національний медичний університет»;

доктор медичних наук, доцент **Шепітько Костянтин Володимирович**, завідувач кафедри медицини катастроф та військової медицини ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія».

Захист відбудеться « ____ » _____ 20 __ року о ____ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.003.06 в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця (03057, Київ-57, проспект Перемоги, 34, морфологічний корпус, кімната 17).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (03057, Київ, вул. Зоологічна, 1).

Автореферат розісланий « ____ » _____ 20 __ р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.003.06,
к.мед.н., доцент

М. А. Безштанько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цереброваскулярна патологія, а особливо гострі порушення мозкового кровопостачання, є однією із складних проблем медицини, що обумовлена їх суттєвою питомою вагою в структурі захворюваності та смертності населення, високими показниками втрат працездатності та первинної інвалідності. За даними ВООЗ, у світі нараховується більше 17 млн хворих, які перенесли інсульт. За прогнозами експертів кількість інсультів буде зростати, це пов'язане зі збільшенням факторів ризику [Зозуля А.І. та ін., 2014; Мищенко Т.С., Дмитриєва Е.В., 2018; Mozaffarian D et al., 2015]. В Україні щорічно близько 100 тисяч людей хворіють на мозковий інсульт. В 2016 р. захворюваність на 100 тисяч населення склала 278,6 випадків [Мищенко Т.С., 2017].

Пошкодження головного мозку в результаті ішемії тої чи іншої форми та ступеня завжди супроводжується вторинними або віддаленими структурними, функціональними та молекулярними змінами, які тривають від місяців до декількох років [Суслина З. А., 2008; Скибо Г.Г. и др., 2016].

Переважає більшість досліджень судинних уражень головного мозку присвячена дослідженню деструктивно-дегенеративних змін (інфарктів) і, перш за все, зони пенумбри. Це зумовлено можливістю максимально попередити розповсюдження некротичних змін у мозку та мінімізації їхнього об'єму [Зозуля А.І. та ін., 2014; Скибо Г.Г., 2016; Lipton P., 1999]. Разом з тим зміни у мозку не вичерпуються тільки змінами в осередках інфарктів та зоні пенумбри, а мають більш широке розповсюдження [Суслина З.А., 2008; Lee V.W., et al. 2012; Seeloga S. et al., 2017; Ruihua Yin et al., 2017]. Поширеність деменції у пацієнтів через 3 місяці, які перенесли інсульт у дев'ять разів вище, ніж у контрольній групі і в 4-12 разів вище – через 4 роки після лакунарного інфаркту головного мозку. Багато з цих деменцій прогресивно розвиваються і пошкодження головного мозку вважається безпосередньою причиною зниження когнітивних функцій тільки в половині цих випадків [Wen Yi et al., 2004]. Депресія та втрата пам'яті є основними ускладненнями після інсульту [Langhorne P. et al., 2000], і зараз приблизно 33 мільйони людей живуть з інвалідністю, викликаною інфарктом головного мозку [Corbyn Z., 2014]. Отже, визначення тонких проявів дегенеративних процесів у головному мозку при відсутності або/та за межами осередків інфарктів є актуальною медичною і соціальною проблемою.

Ішемічні пошкодження мозку стають причиною суттєвих порушень імунного статусу організму [Лисяний Н.И., 1999; Гусев Е.И., Скворцова В.И., 2001; Chamorro A. et al., 2012; Jia J., Cheng J., 2017], природа та конкретні прояви яких до сьогоднішнього дня залишаються багато в чому нез'ясованими. З цих позицій привертає до себе увагу синтетичне похідне тимопоетину - імунофан (*аргініл-альфа-аспартил-лізил-валіл-тирозил-аргінін*), який проявляє імунорегулюючі та детоксикаційні властивості, блокує вільнорадикальні процеси перекисного окислення [Караулов А.В., 2000; Лебедев В. В., Новиков С.А., 2006]. Крім імунологічних ефектів, важливими якостями імунофану є його здатність підвищувати антиоксидантний захист організму шляхом стимуляції синтезу церулоплазміну і лактоферину та активності каталази. Імунофан нормалізує

перекисне окислення ліпідів, пригнічує розпад фосфоліпідів у мембрані клітин та утворення арахідонової кислоти, що супроводжується зниженням продукції медіаторів запалення [Хаитов Р.М, Пинегин Б.В., 2003, 2009].

Слід зазначити, що впровадження в гістологію молекулярних методів, а саме імуногістохімії відкрило нові можливості поглибленої оцінки як фізіологічних, так і патологічних процесів [Сухорукова Е.Г. та ін., 2010; Dabbs, D. J., 2018]. Стосовно, центральної нервової системи, то це дає змогу оцінити за експресією тих чи інших маркерів стан її тканинних елементів, що не можуть бути визначені загальними та спеціальними нейрогістологічними методами, дозволяє провести найбільш точну верифікацію клітинних елементів.

МЕТА РОБОТИ – визначити закономірності змін у сенсомоторній корі за умов моделювання транзиторної ішемічної атаки та імунокорекції за експресією імуногістохімічних маркерів, що відображають стан нейронів та нейроглії.

ЗАВДАННЯ РОБОТИ

1. Встановити характер та динаміку змін експресії ІГХ маркерів, що відображають функціональний стан нейронів (*Syn, VEGF*) сенсомоторної кори півкуль великого мозку після моделювання транзиторної ішемічної атаки.
2. Встановити характер та динаміку змін експресії імуногістохімічних маркерів, що відображають стан цитоскелету нейронів (*NFP, Act, β -tub, tau-p*) сенсомоторної кори півкуль великого мозку після моделювання транзиторної ішемічної атаки.
3. Встановити характер та динаміку змін експресії імуногістохімічних маркерів, що відображають стан гліальних елементів (*S100, GFAP, Iba-1*) сенсомоторної кори півкуль великого мозку після моделювання транзиторної ішемічної атаки.
4. Визначити зміни експресії імуногістохімічних маркерів, що відображають функціональний стан нейронів, їх цитоскелет та стан гліальних елементів кори півкуль великого мозку після сенсibiliзації мозковими антигенами.
5. Визначити характер та динаміку змін експресії імуногістохімічних маркерів у сенсомоторній корі півкуль великого мозку після моделювання транзиторної ішемічної атаки за умов імунокорекції.
6. Визначити особливості змін експресії імуногістохімічних маркерів, що відображають функціональний стан нейронів, їх цитоскелет та стан гліальних елементів кори півкуль великого мозку при поєднанні імунного та ішемічного ураження мозку.
7. Визначити характер та динаміку змін експресії імуногістохімічних маркерів у сенсомоторній корі півкуль великого мозку при поєднанні імунного та ішемічного ураження мозку за умов імунокорекції.
8. Дати узагальнену характеристику змін сенсомоторної кори головного мозку при ішемічному та імунно-ішемічному ураженні, а також при їх корекції шляхом імуномодуляції за даними імуногістохімічного дослідження.

Об'єктом дослідження є ішемічні ураження головного мозку.

Предметом дослідження є зміни експресії імуногістохімічних маркерів у сенсомоторній корі півкуль великого мозку після моделювання ішемічного та

імунно-ішемічного ураження, а також при їх корекції шляхом імунотерапії.

Методи дослідження – загальногістологічні, імуногістохімічні, морфометричні, денсіометричні методи та статистичний аналіз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця “Зміни внутрішніх органів та регуляторних систем за умов експериментального пошкодження та історичні аспекти розвитку гістології, цитології та ембріології в Україні”, № держреєстрації 0116U000121.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано за умов порушення кровопостачання головного мозку, в сенсомоторній корі, комплекс змін експресії імуногістохімічних маркерів які відображають функціональний стан нейронів та стан їх цитоскелету, а також маркерів, що характеризують стан нейроглії. Вперше проведено кількісну оцінку змін експресії зазначених маркерів, оцінена їх динаміка після транзиторної ішемічної атаки, у тому числі у віддалені строки після порушення кровопостачання головного мозку. Показано, що дифузні зміни викликані ішемічним ушкодженням в сенсомоторній корі трансформуються у повільно прогресуючий нейродегенеративний процес з ознаками нейрозапалення та розвитком астроцитозу. Показано, що одностороннє ішемічне ураження лівої півкулі супроводжується системними реакціями нейроглії, які розповсюджуються і на контрлатеральну півкулю. Показано, що попередня сенсibiliзація мозковим антигеном потенціює зміни експресії імуногістохімічних маркерів, що викликає ішемію, а також модифікує їх динаміку. Імунокорекція змін в сенсомоторній корі за умов ішемії та за умов комплексного імунно-судинного ураження в експерименті за оцінкою експресії імуногістохімічних маркерів призводить до зменшення як виразності альтеративних явищ, так і до відносної активізації компенсаторно-відновлювальних процесів у сенсомоторній корі.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані в роботі данні щодо змін експресії імуногістохімічних маркерів які відображають функціональний стан нейронів та стан їх цитоскелету, а також маркерів, що характеризують стан нейроглії розширюють наші уявлення про ішемічне ураження мозку, а також про роль імунних порушень в його перебігу.

Отримані данні є підґрунтям для розробки способів лікування ішемічних уражень мозку в людини, в тому числі зі застосуванням імунотерапії.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем за консультацією О.М. Грабового визначені актуальність дослідження, визначені мета та завдання дослідження. Здобувачем особисто виконаний літературний пошук за темою роботи. Здобувачем разом з О.М. Грабовим проведено відтворення експериментальних моделей судинного та комплексного імунно-судинного ураження головного мозку в щурів. Здобувачем особисто виконані: всі процедури гістологічної обробки отриманого матеріалу, виготовлені гістологічні препарати; проведені імуногістохімічні реакції; проведено денсіометричну оцінку експресії імуногістохімічних маркерів та морфометричну оцінку кількості гліальних елементів в сенсомоторній корі. Здобувачем особисто виконано статистичний

аналіз отриманих кількісних даних. Здобувачем за консультацією О.М. Грабового проведено аналіз отриманих результатів, написані статті та тези за матеріалами роботи. Здобувачем особисто написаний текст дисертації та автореферату.

Матеріали даної праці не були використані в інших дисертаціях.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на: Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інтернаціоналізація вищої медичної освіти: науково-методичні засади освіти іноземних громадян у вищих медичних навчальних закладах» та «Жутаєвські читання» (14-15 березня 2013 року, Полтава, Україна); Научно-практической конференции неврологов. XIX Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз». II Симпозиуме «Современные возможности нейровизуализации» 23-26 мая 2013 года в Санкт-Петербурге; V (67) Міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (23-25 жовтня 2013 року м.Київ); Всероссийской научно-практической конференции «Дегенеративные и сосудистые заболевания нервной системы» посвященная 90-летию члена-корреспондента АМН СССР профессора Г.А. Акимова (21-22 ноября 2013 года Санкт-Петербург); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Морфологічні аспекти ангиології» (24-25 жовтня 2013 р.). Тернопіль; Науково-практической конференции посвященной 110-летию со дня рождения Н.И. Зазыбина «Морфологические основы научных исследований в медицине» Киев, 2013; Межрегиональной конференции «Цереброваскулярные заболевания: профилактика и реабилитация». Саратов, 13–14 марта 2014 года; VI (68) міжнародному науково-практичному конгресі студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» 15-17 жовтня 2014 р. м. Київ; Науково-практичній конференції «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» (Суми, 23–24 квітня 2015 року); VI конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України. «Актуальні питання анатомії, гістології, ембріології та топографічної анатомії» 16-18 вересня 2015 Запоріжжя; Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів» присвяченій 75-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В. 30 вересня-1 жовтня 2015 р. м. Івано-Франківськ; International symposium. “Peripheral nerve reconstruction after severe injuries. Neurology and rehabilitation.”19-21 May 2016. Kyiv, Ukraine; Науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології» 20 – 21 жовтня 2016 року. Тернопіль; Міжнародній Науково-практичній конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» М. Харків. 25 листопада 2016; VII Конгресі Українського Товариства нейронаук. – Київ, 7-11 червня 2017 року; Науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини та фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)» 18-25 квітня 2018р, 30 травня 2018р м. Запоріжжя; 2nd Neurology and Rehabilitation International Symposium: “Neuroregeneration” October 5, 2018, Kyiv, Ukraine.

Матеріали дисертації були представлені на засіданні апробаційної ради «Морфологія» при Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця 1 березня 2019 р., протокол № 8.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 23 статті (4 статті у міжнародному журналі видавництва Springer (New-York), що входить у базу цитувань Scopus, 4 статті, що входять у базу цитувань Web of Science, 1 стаття у закордонних журналах, 14 статей у фахових журналах України). Отримано патент на корисну модель. Опубліковано 17 тез доповідей. Видано 1 інформаційний лист, 1 галузеве нововведення.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація написана українською мовою і має титульний аркуш, анотацію, зміст, перелік умовних позначень, основну частину та список використаних джерел. Основна частина дисертації (складається з вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, двох розділів з викладенням результатів роботи, розділу аналізу та узагальнення отриманих даних, висновків. Дисертація викладена на 342 сторінках машинопису містить 114 рисунки та 21 таблицю. Список використаних джерел містить 468 робіт (91 кирилицею та 377 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведені на 325 самцях білих статевозрілих щурів лінії Вістар вагою 260-290 г., що утримувалися у віварії згідно «Принципам ухода за лабораторними животними» [Западнюк І.П. и др., 1983]. Всі досліди з використанням тварин проводились відповідно положень Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 2006 року, Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986 року, Директиви ЄС №2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою від 22.09.2010 року, та положенням міжнародних принципів гуманного поводження з тваринами викладених в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» [Albus U., 2010]. У досліджах використовували самців щурів, оскільки рівень естрогенів здійснює вплив на протікання ішемічного ушкодження головного мозку [Hurn, P. D., Macrae I. M., 2000].

У першій частині досліджень було використано 150 щурів. Тварини за випадковим принципом були поділені на 5 груп: 1 група – контроль (**К**), тварини (умовно інтактні), які не зазнавали ніяких дій (n=10); 2 група (**ПО**) – псевдооперовані, щурам виконувався доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізація, після чого рана зашивалася (n=35); 3 група (**ПСА**) – перев'язування лівої загальної сонної артерії (n=35), щурам здійснювали аналогічний до ПО доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, після чого в зазначену артерію вводили 0,2 мл фізіологічного розчину та накладали лігатуру, а потім рана зашивалася; 4 група (**МЕА**) – після виконання доступу до лівої загальної сонної артерії та її мобілізації щури були піддані мікроемболізації кровоносних судин лівої півкулі головного мозку, після чого на артерію накладали лігатуру та

рана зашивалася (n=35); 5 група (МЕА+і) – тварини з МЕА, які отримували імунофан за схемою (n=35) [Грабовий О.М. и др., 2008].

У другій частині досліджень було використано 175 щурів. За випадковим принципом тварин було поділено на 5 груп. Тварини всіх груп за 12 діб до відтворення моделі ішемії були сенсibilізовані 20% водно-сольовим екстрактом (антигеном) гомологічної тканини мозку (вміст білку 0,33 – 0,5 мг/мл за Лоурі), який був отриманий за загальноприйнятою методикою [Вязов О.Е., Ходжаев Ш.Х., 1973]. Щурам підшкірно вводили: у 1-й день – 0,5 мл; 2-й день – 1 мл; 3-й день – 1,5 мл екстракту [Ганнушкина И.В., 1974]. При цьому тварини групи **Кс** (контроль, сенсibilізовані; n=35) не зазнавали жодних інших втручань. Тваринам групи **ПОс** (псевдооперовані, сенсibilізовані; n=35) здійснювали оперативний доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, після чого рану зашивали. Щурам групи **ПСАс** (перев'язка сонної артерії, сенсibilізовані; n=35) здійснювали аналогічний доступ до лівої загальної сонної артерії та її мобілізацію, після чого в зазначену артерію вводили 0,2 мл фізіологічного розчину та накладали лігатуру. Тваринам груп **МЕАс** (з мікроемболізацією басейну сонної артерії, сенсibilізовані; n=35) та **МЕАс+і** (**МЕАс**+імунофан; n=35) моделювали гостре порушення мозкового кровообігу шляхом мікроемболії кровоносних судин суспензією адипоцитів [Грабовий О.М., Яременко Л.М., 2008], після чого на артерію накладали лігатуру. Щури групи **МЕАс+і** отримували підшкірно імунофан за схемою.

Всі оперативні втручання виконували під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). Евтаназію тварин здійснювали за допомогою тіопенталу в овердозі (200 мг/кг) [Западнюк И.П. и др., 1983].

Для мікроемболізації кровоносних судин лівої півкулі головного мозку [Грабовий О.М., Яременко Л.М., 2008] використовували введення в ліву загальну сонну артерію 0,2 мл суспензії ізольованих адипоцитів. Така суспензія готувалася за допомогою додавання 20 мл суспензії відмитих ізольованих адипоцитів до розчину, який включав у себе 2,8 мл 10%-вого розчину CaCl_2 , 10 г Twin'у з послідовним доведенням до об'єму 80 мл ізотонічним (0,9%) розчином NaCl .

Тваринам відповідних груп першої та другої частини досліджень вводили підшкірно по 0,5 мкг імунофану (НВП «Біонокс», РФ) протягом 1–10-го, 21–23-го, 30–32-го та 50–51-го днів після процедури мікроемболізації. Щурам інших групи вводили фізіологічний розчин за аналогічною схемою.

У тварин першої частини досліджень головний мозок для вивчення вилучали через 1, 3, 10, 30 або 90 діб після початку досліду. У другій частині досліджень також мозок забирали через 1, 3, 10, 30 та 90 діб після оперативного втручання, тобто, відповідно, через 12, 15, 22, 42 та 102 доби після сенсibilізації мозковим антигеном. Після евтаназії череп щура швидко розтинали, ізолювали мозок, який розділяли на три частини фронтальними перерізами. Середня частина занурювалась у 10%-вий забуферений холодний формалін (рН 7.4, 4°C) на 24 години. Зразки ущільнювали за стандартною методикою, заливали в парафін, і виготовляли фронтальні зрізи 4 мкм завтовшки, частину яких забарвлювали азур II-еозином для оцінки загального стану кори півкуль мозку.

Імуногістохімічні реакції проводили відповідно до протоколу виробника. У роботі були використані первинні антитіла:

- мишине моноклональне до синаптофізину (Synaptophysin Ab-2, Clone SYP02; Thermo Fisher Scientific, США) у розведенні 1:50;
- кроляче поліклональне до судинного ендотеліального ростового фактору (VEGF) (Vascular Endothelial Growth Factor Ab-1 (RB-222), імуноген VEGF₁₆₅; Thermo Fisher Scientific, USA) у розведенні 1:200;
- мишине моноклональне до протеїну нейрофіламентів (NFP, Clone 2F11, Dako, Данія), готове до використання;
- мишине моноклональне до актину гладких м'язів (Clone 1A4, Dako, Denmark), готове до використання;
- кроляче поліклональне до β -тубуліну (Thermo Fisher Scientific, USA) у розведенні 1:100;
- кроляче поліклональне до *tau*-білку (Thermo Fisher Scientific, USA) у розведенні 1:200
- кроляче поліклональне до білку *S100* (Dako, Данія), готове до використання;
- кроляче поліклональне до гліального фібрилярного кислого протеїну (*GFAP*) (Dako, Данія) готове до використання;
- кроляче поліклональне до *Iba-1* (Molecular Probes, США), у розведенні 1:750.

Продукти ІГХ-реакції візуалізували за допомогою системи детекції EnVision FLEX (Dako, Данія) зі застосуванням у якості хромогену діамінобензидин (DAB). Зрізи мозку товщиною 4 мкм монтовані на предметному склі SuperFrost+, депарафінували ксилолом та регідратували в спиртах спадаючої концентрації. Демаскування антигенів здійснювали в цитратному буфері (pH 6,0, EnVision FLEX) при 98°C протягом 20 хв. Після охолодження ємкостей з зануреними у буфер скельцями зі зрізами, останні промивали фосфатним буфером (EnVision FLEX). Далі на них наносили 3%-вий розчин пероксиду водню на 5 хв для блокування активності ендогенної пероксидази. Після триразового промивання у фосфатному буфері протягом 5 хв зрізи інкубували з первинними антитілами у вологих камерах 30 хв у термостаті при 22°C. Зрізи промивалися у двох порціях фосфатного буферу. На зрізи наносили вторинні антитіла (HRP, EnVision FLEX) і планшет розміщували у термостаті 22°C на 10 хв. Промивали зрізи у двох порціях по 2 хв. фосфатного буферу. На зрізи наносився розчин діамінобензидину на субстратному буфері (EnVision FLEX) і планшет розміщували у термостаті при 22°C на 5 хвилин. Потім зразки переносилися у дистильовану воду на 2 хвилини. Як позитивний контроль використовували зрізи мозку щурів із гарантовано визначеною позитивною реактивністю, щодо антитіл, які були використані у роботі. Для негативного контролю проводили згадані вище процедури без первинних антитіл. Зрізи призначені для кількісного аналізу заключали у водорозчинне середовище Dako Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako, Данія) під покривне скло. Частину зрізів додатково забарвлювали гематоксиліном Gill або азур II-еозином [Грабовий О.М. та ін., 2013] і після просвітлення ксилолом заключали у гістологічний бальзам Histofluid (Marienfeld, Німетчина).

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus BX51, цифрової камери Olympus C3040ZOOM, з програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. за суворо стандартизованих умов.

Для проведення денсіометричних вимірів (*S100*, *NF*, *Syn*, *VEGF*, *tau*, *β -tub*) копію цифрового зображення з робочого вікна Olympus DP-Soft 3.2 (x200, x400 (для *SMA* – x900), 1280x960 пікселів RGB (режим освітлення – фото, стандартній експозиції) вставляли у робоче вікно системи аналізу зображення ImageJ 1.46: (Wayne Rasband (NIH), USA). Їх трансформували у 8-бітні та вимірювали оптичну щільність у п'яти тест-полях 5-го шару симетричних ділянок кори лівої та правої півкуль сенсомоторної кори. Підрахунок кількості мічених клітин *GFAP* та *Iba-1* проводили у п'яти тест-полях 5-го шару кори лівої та правої півкуль (площа 430×320 мкм). Отримані цифрові дані експортували в MS Excel.

Отримані цифрові дані обробляли стандартними статистичними методами з розрахунком середнього арифметичного, стандартного відхилення, помилки середнього, достовірності середнього. Для оцінки вірогідності відмінностей середніх значень показників між групами, а також між ураженою та контралатеральною півкулями мозку використовували t-критерій Стьюдента. Статистично значимими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Для порівняння змін, які виявлялися в сенсомоторній корі великого мозку при модулюванні одnobічного ішемічного ураження головного мозку та їх імунокорекції розраховували: максимальну зміну показника (МЕА Δ max%), визначили строк спостережень, на якому він відмічений (МЕА max/доба), визначали наявність або відсутність відновлення показника на кінець спостережень (МЕА віднов.), наявність або відсутність достовірних змін показника у контралатеральній півкулі (МЕАс контрлат), відносну максимальну реакцію на дію імунофану ($i\Delta$ max/МЕА%), та залишкову зміну показника наприкінці експерименту за умов дії імунофану (i МЕА/К%).

Для порівняння змін, що виявлялися в сенсомоторній корі при сенсibiliзації мозковим антигеном та одnobічного ішемічного ураження головного мозку на фоні попередньої сенсibiliзації мозковим антигеном та їх імунокорекції розраховували: для Кс – максимальна зміна показника по відношенню до К (Кс Δ max%), строк спостережень, на якому він визначений (Кс max/доба), визначили наявність або відсутність відновлення показника на кінець спостережень (Кс віднов.). Для МЕАс розраховували максимальну зміну показника по відношенню до К (МЕАс Δ max%), визначали наявність/відсутність відновлення значень показника до контролю, наявність/відсутність достовірних змін показника у контралатеральній півкулі. За умов дії імунофану визначали відносну максимальну зміну показника при МЕАс у лівій півкулі, що зазнала комбінованого імуно-ішемічного ураження ($i\Delta$ max/МЕАс^{лв0}%), та правої півкулі, де домінувало ішемічне ураження ($i\Delta$ max/МЕАс^{лв0}%), відносне значення залишкових змін показника на кінець експерименту при МЕАс+і для лівої (i МЕАс^{лв102}/К%) та правої (i МЕАс^{пр102}/К%) півкуль.

Результати дослідження та їх обговорення. Експресія *Syn* та *VEGF* в нейронах кори головного мозку певною мірою можна розглядати як маркери, що

відображають їх функціональний стан. При цьому експресія *Syn* безпосередньо пов'язується з синаптичною функцією та здатністю до акумуляції медіаторів, а також, з тим порогом, який може забезпечити максимально високу трансинаптичну передачу сигналу [Bai X., Strong R., 2014]. *VEGF* це сигнальний білок, що є не тільки фактором підтримки адекватної перфузії мозкової тканини [Licht T., Ke Shet E., 2013], але й фактором забезпечення загальної життєздатності нейронів [Magnoni S. et al., 2011]. Останнє обумовлено наявністю рецепторів на цих клітинах, а його ефекти пов'язані з посиленням анаболічних процесів та підвищенням стійкості до негативних факторів [Ma Y. et al., 2017].

Проведені спостереження показали, що разом з дегенеративними та деструктивними змінами у мозку при порушенні його кровопостачання та ішемії відбувається зниження експресії *Syn*, яке є залежним від ступеня ішемічного ушкодження мозку (Рис.1), що збігається з даними інших авторів [Harms H. et al., 2008]. Характер змін експресії *Syn* можна розділити на 3 форми: 1-а – загальне (фонове) зниження, що має широке розповсюдження і проявляється незначно або помірно; 2-а – різке зниження у осередках інфарктів; 3-а – виразне фокальне зниження за межами інфарктів (у невеликих осередках діаметром до 100 мкм).

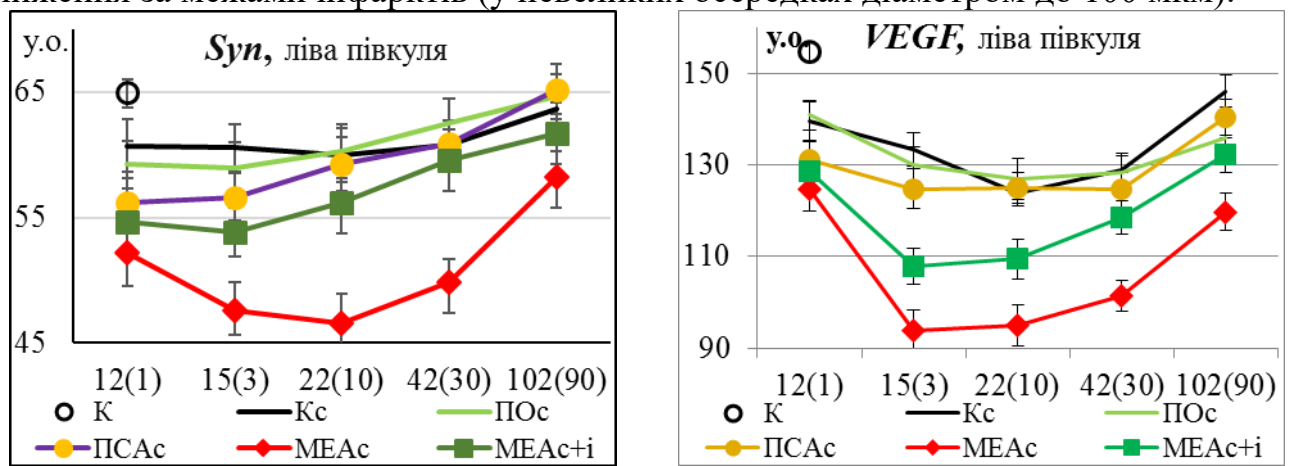


Рис. 1 – Експресія *Syn* та *VEGF* в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні порушень кровообігу в лівій півкулі мозку та імунореакції виниклих змін (у.о.). 1-90 доба від початку досліджу.

Незважаючи на реалізацію компенсаторних та відновлювальних процесів, що відмічалися у нашому експерименті з 10 доби після відтворення ішемії, в ураженій півкулі спостерігалось зниження рівня експресії *Syn*, що зберігався і у віддалені (1 - 3 місяці) строки після порушення кровопостачання. Альтеративні зміни, обумовлені гострою ішемічною атакою, що трансформувалися у повільно прогресуючий нейродегенеративний процес з кількісними змінами клітинного складу кори великих півкуль, характеризувалися збідненням нейронами та збільшенням питомої кількості гліоцитів, знаходить своє відображення й у загальному зменшенні вмісту *Syn*. Разом з цим, показниками активних відновлювальних процесів, що відбуваються після ішемічного ураження [Коржевский Д.Э. и др., 2010; Harms H. et al., 2008], є виявлені осередки гіперекспресії *Syn* поряд з гліальними рубцями та псевдокістами, а також поява новоутворених мічених аксонів у гліальних рубцях. Зниження експресії *Syn* в

ділянках мозку поза межами ділянок з виразними дегенеративно-деструктивними змінами, при дисциркуляторних порушеннях у наслідок псевдооперації або перев'язування сонної артерії, а також у контрлатеральній півкулі в гострий період після ішемічної атаки, вказує на системні порушення синаптичної функції в мозку, що співпадає з даними фізіологічних досліджень [Harms H. et al., 2008]. В значній мірі зниження, а потім поступове відновлення експресії *Syn* в ураженій півкулі співпадає з наявністю, а потім і зі зворотним розвитком ознак неврологічного дефіциту [Сергеев А. В. и др., 2015].

Певна травматизація сонної артерії при псевдооперації, яка неминує супроводжує останню, очевидно викликає деякі розлади кровообігу в басейні судин лівої півкулі, але ці ефекти мінімальні. Вони не призводять до змін у будові кори великих півкуль та в експресії *VEGF*. Перев'язка ж сонної артерії теж не спричиняє фатальних змін у кровопостачанні кори дослідженої півкулі, але все ж таки зумовлює певну недостатність такого кровопостачання. Це призводить спочатку до помірного зменшення експресії *VEGF*, проте з наступним (на 30-ту добу) її тимчасовим зростанням порівняно з контролем (див. Рис. 1). Останній феномен у динаміці експресії *VEGF*, вірогідно, можна розглядати як прояв компенсаторно-приспосувальної реакції тканин кори на деяке тимчасове зменшення забезпечення киснем та поживними речовинами.

В умовах МЕА пригнічення експресії *VEGF* в ураженій півкулі не тільки в гострий, але й у віддалений період свідчить про істотні порушення компенсаторно-відновлювальних процесів після ішемізації кори (див. Рис. 1). Подібні розлади можуть виступати як один із істотних факторів прогресування дегенеративних змін у корі мозку, ініційованих транзиторною ішемією.

Як вже зазначалося, цитоскелет нейрона є динамічною і регульованою системою, яка формує морфологію клітин та забезпечує виконання цілої низки специфічних функцій. До його складу входять три класи структурних елементів: мікротрубочки, нейрофіламенти і актинові філаменти (часто званих F-актином для ниткоподібного актину) [Kim J. Y. et al., 2014; Parada E. et al., 2013]. Дезорганізація цитоскелету нейронів веде до суттєвого розладу його функцій та пластичності [Fan Y. et al., 2011].

У корі великих півкуль мозку контрольних щурів гістохімічно виявлена експресія *NFP* (clone 2F11) була досить інтенсивно вираженою. Проте вона спостерігалася переважно в тонких терміналях, іноді в межах магістральних відростків кортикальних нейронів. У той же час наявність *NFP*⁺-елементів у перикаріонах таких нейронів була відсутньою або мінімально вираженою.

При розгляді результатів нашої роботи виникає логічне питання, наскільки розподіл *NFP*⁺-елементів, виявлених за допомогою використаної ІГХ-методики, відповідає реальному розподілу структурних елементів, котрі складаються з даного білка. Не виключено, що концентрація *NFP*⁺-структур у межах тіл, дендритів та крупних аксонів кортикальних нейронів дійсно значно нижча, ніж у дрібних термінальних розгалуженнях кортикальних волокон. Тому ці елементи в таких волокнах зв'язуються з використаними антитілами значно інтенсивніше, а кількість *NFP* у соматичних та аксонних структурах може в багатьох випадках

виявитися нижчою щодо чутливості застосованої методики. Не можна також виключити ймовірності наступної ситуації: використаний клон антитіл до *NFP* інтенсивніше зв'язується з легкими субодиницями даного протеїну (*NF-L*), що дозволяє думати про відносне збагачення саме тонких термінальних розгалужень кортикальних нервових волокон даним білком.

Транзиторна емболізація дрібних судин кори великого мозку призводила, в межах початкового періоду після ішемічної атаки, до певного зниження інтенсивності експресії *NFP* (Рис. 2). У той же час спостерігався такий феномен, як мозаїчний розподіл зон із дещо посиленою і практично пригніченою експресією цього протеїну. Виявлення глибоких структур та варикозів по ходу нервових волокон при ІГХ-реакції на *NF-L*, у гострий період після ішемічної атаки, певною мірою дозволяє оцінювати явища аутонейротомії. Відновлювальний період після порушення мозкового кровопостачання характеризувався появою округлих тілець із високою експресією *NF-L*; подібні структури, ймовірно, можуть бути кваліфіковані як колби (конуси) росту нервових волокон. Це дозволяє говорити про те, що ішемія кори великого мозку, в результаті емболізації дрібних судин, супроводжується масованим ушкодженням термінальних ділянок нервових волокон, які у подальшому починають регенерувати. Отже, подібна картина може розглядатись як морфологічний прояв компенсаторної реакції [Schwarz Q. et al., 2004].

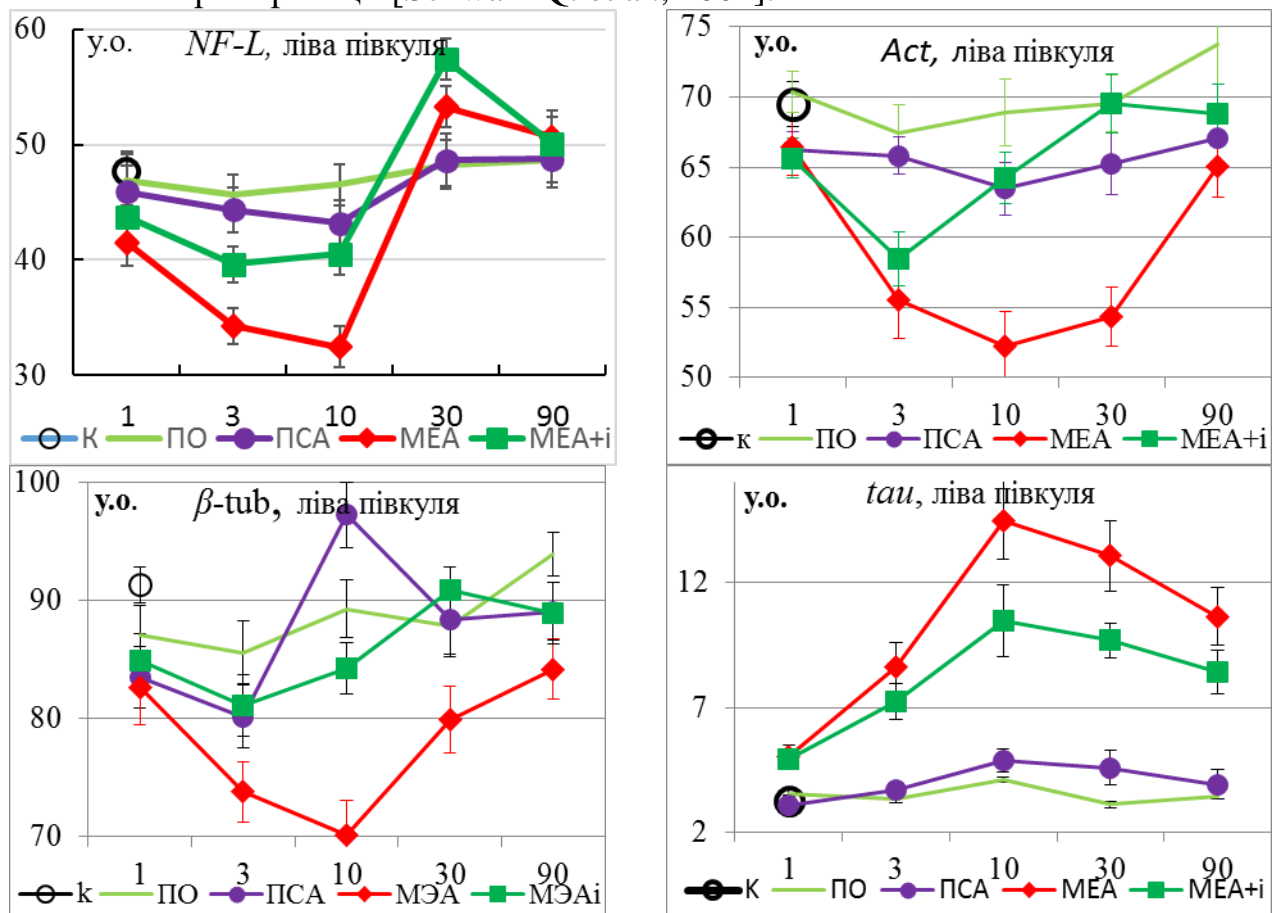


Рис. 2 – Експресія *NF-L*, *Act*, β -*tub* та *tau* в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні порушень кровообігу в лівій півкулі мозку та імуноткорекції виниклих змін (у.о.). 1-90 доба від початку досліджу.

Проведені нами спостереження показали, що моноклональне мишаче антитіло проти актину гладких м'язів (clone 1A4, Dako, Denmark) може бути використане для виявлення актину в головному мозку щурів. Враховуючи те, що при використанні зазначеного антитіла продукти імуногістохімічної реакції не виявляли в нейронах волокнисті структури, не візуалізували відростки нейронів, можна припустити, що таке виявлення актину в складі їх цитоскелету відбувалося при зв'язуванні розчинного актину. Його наявність у перикаріоні, співпадає у значній мірі з локалізацією тут гранулярної ендоплазматичної сітки, що можна розцінювати як результат його синтезу, а кількість гранул як інтенсивність цього процесу. Виявлення експресії *Act* в нейропілі у вигляді дрібних гранул, можна розцінювати як синапси, де *Act* знаходиться у динамічній рівновазі між розчинною формою та зв'язаним у складі мікрофіламентів, що пов'язують з модуляцією синапатичної передачі [Fan Y. et al., 2011; Steiner J. et al., 2007].

Дисциркуляторні зміни, що супроводжували ПО і ПСА, не призводили до суттєвих змін експресії *Act* у сенсомоторній корі великого мозку. Виразні ж дифузні дегенеративні і, зрідка, осередкові деструктивні зміни при емболії мікросудин приводили до різкого зниження експресії *Act* в цитоплазмі нейронів та нейропілі (див. Рис. 2), що, відповідно, може бути пов'язане зі зниженням інтенсивності його синтезу та/або протеолізом [Griva M. et al., 2017]. Враховуючи локалізацію виявленого *Act*, можна припустити, що зменшення його експресії у нервових терміналях (синапсах) може відображати порушення їх функцій та пластичності [Guo H. et al., 2016]. Відновлення рівня експресії *Act* відбувалося повільно лише наприкінці 3-го місяця після моделювання порушення кровообігу.

Порушення кровообігу у корі мозку призводить до зменшення експресії β -тубуліну в гострий період після ішемії-реперфузії, з послідуєчим відновленням (див. Рис. 2). Це було очікувано, оскільки за інших умов було показано зниження експресії тубуліну та зменшення кількості кодуєчої його мРНК [Shichita T, et al., 2012].

Особливу увагу звернув на себе характер виявлення експресії даного маркера при застосуванні поліклонального кролячого антитіла проти β -*tub*. Саме це стосується того, що β -*tub* виявлявся у перикаріонах, лише зрідка у дендритах, у неропілі, але при цьому рідко маркувалися волокна протягом, практично не візуалізувалися аксони пірамідних клітин. При застосуванні ж інших антитіл може спостерігатися інша локалізація продуктів реакції [Chetta J. et al., 2015; Zhang Y. et al., 2017]. Відповідно, наявність мікротрубочок і тубуліну в аксонах не підлягає сумніву [Kapitein L. C. et al., 2010], але у наших дослідженнях використаним антитілом вони не були виявлені. Це, на нашу думку, може бути пов'язано з різним станом β -*tub*. У нейронах, і насамперед у нервових провідниках, мікротрубочки характеризуються високою стійкістю, на відміну від інших клітин, що пов'язується з певною модифікацією тубілінів та їх зв'язування з іншими речовинами при їх формуванні [Kapitein L. C., Hoogenraad C. C., 2015]. У терміналях нервових волокон, синапсах мікротрубочки виступають як динамічні структури, що збираються та розбираються у залежності від функціонального стану [Akhmanova A., Hoogenraad C.C., 2015; Kapitein L. C. et al.,

2010]. Отже, можна припустити, що у перікаріоні нейрокитів виявлявся нещодавно синтезований β -*tub* або вивільнений при деполімеризації мікротрубочок, а в нейропілі цей білок вступає у реакцію з антитілом у деполімеризованому стані, коли він не зв'язаний з іншими речовинами.

Певною мірою вищезазначене припущення підтверджувалося виявленням β -*tub* у відновлювальний період після ішемічної атаки в аксонах нейронів сенсомоторної кори, а також вертикально розташованих нервових волокнах, частина яких може належати до аферентних. Це може бути пов'язано з посиленням синтезу та транспорту білків нервовими відростками.

Порушення кровообігу в корі мозку призводило до різкого зростання експресії *tau*-білку в сенсомоторній корі (див. Рис. 2). Виразність цих змін залежала від ступеню порушення кровообігу, що підтверджувалося наявністю змін експресії *tau* при ПО, ПСА, а також у контрлатеральній півкулі.

Стрімке наростання експресії *tau* в гостру фазу після ішемічної атаки (див. Рис. 2) свідчило про дезорганізацію цитоскелету нервових волокон [Bielewicz J. et al., 2011; Kaerst L. et al., 2013] та певною мірою відображало явища аутонейротомії [Härtig W. et al., 2016]. Поява *tau* в перікаріонах нейрокитів може бути показником тяжкості дегенеративних процесів. Виявлення нами цього білку в тілах гліокитів може бути розцінене як явища фагоцитозу продуктів розпаду нервових волокон та нейронів.

Зміни експресії білку *S100* у мозку за умов порушення кровообігу безпосередньо залежать від ступеня ураження (Рис. 3). В осередках некрозів і вогнищах виразних дегенеративних змін очікувано спостерігалось зменшення експресії *S100* у гостру фазу ішемічного ушкодження. У ділянках, які не зазнали критичних ушкоджень, навпаки відбувалося, вже за 1 добу дослідження, збільшення експресії *S100*, яка поступово зростала і на 30 і 90 доби на 25-30% перевищувала такі показники у контролі. Ішемія призводила до гіпертрофії *S100*⁺-гліокитів у корі мозку. Причому ці явища, певною мірою, можна розглядати як системні, оскільки збільшення виявлення *S100* спостерігалось як з боку ураження, так і з контрлатерального боку, хоч і менш виразно. У цілому це можна розглядати як показник активації нейроглії, що індукована ішемією мозку [Tu W. et al., 2010].

При транзиторній ішемії мозку в осередках деструктивних змін у корі в гострий період відбувалося зменшення експресії *GFAP* (Рис. 3). Разом з тим, у ділянках сенсомоторної кори, що не зазнали критичних пошкоджень, спостерігалось зростання його експресії вже через 3 доби дослідження. Це проявлялось збільшенням питомої кількості *GFAP*⁺-астроцитів, збільшенням розмірів їхніх тіл, товщини та кількості їх відростків, що виявлялися. Враховуючи, що подібні зміни спостерігалися і в контрлатеральній півкулі, хоча і в значно меншому ступені, вони можуть бути розцінені як реактивне системне підвищення активності астроцитів. Від зворотного, можна припускати, що не всі клітини астроцитарного ряду кори великих півкуль головного мозку за звичайних умов є *GFAP*-позитивними.

Перехід до відновлювально-компенсаторних процесів після ішемічного ушкодження (10 доба дослідження) супроводжувався зниженням експресії *GFAP* та

кількості астроцитів, що візуалізувалися з його допомогою до показників менших, ніж у контролі (Рис. 3). У подальшому відбувалося поступове наростання кількості $GFAP^+$ -клітин у сенсомоторній корі, кількість яких через 90 діб після моделювання транзиторної ішемії ставала майже вдвічі більшим, ніж у контролі. Останнє може бути тим фактором, який суттєво вплине на функцію уражених регіонів мозку [Скибо Г.Г. и др. 2016; Lladó J. et al., 2013; Yuan A. et al., 2017]. Що стосувалося осередків інфарктів, то у складі гліальних рубців та у стінках псевдокіст, які утворилися на їх місці, очікувано виявлялася велика кількість $GFAP^+$ гіпертрофованих астроцитів.

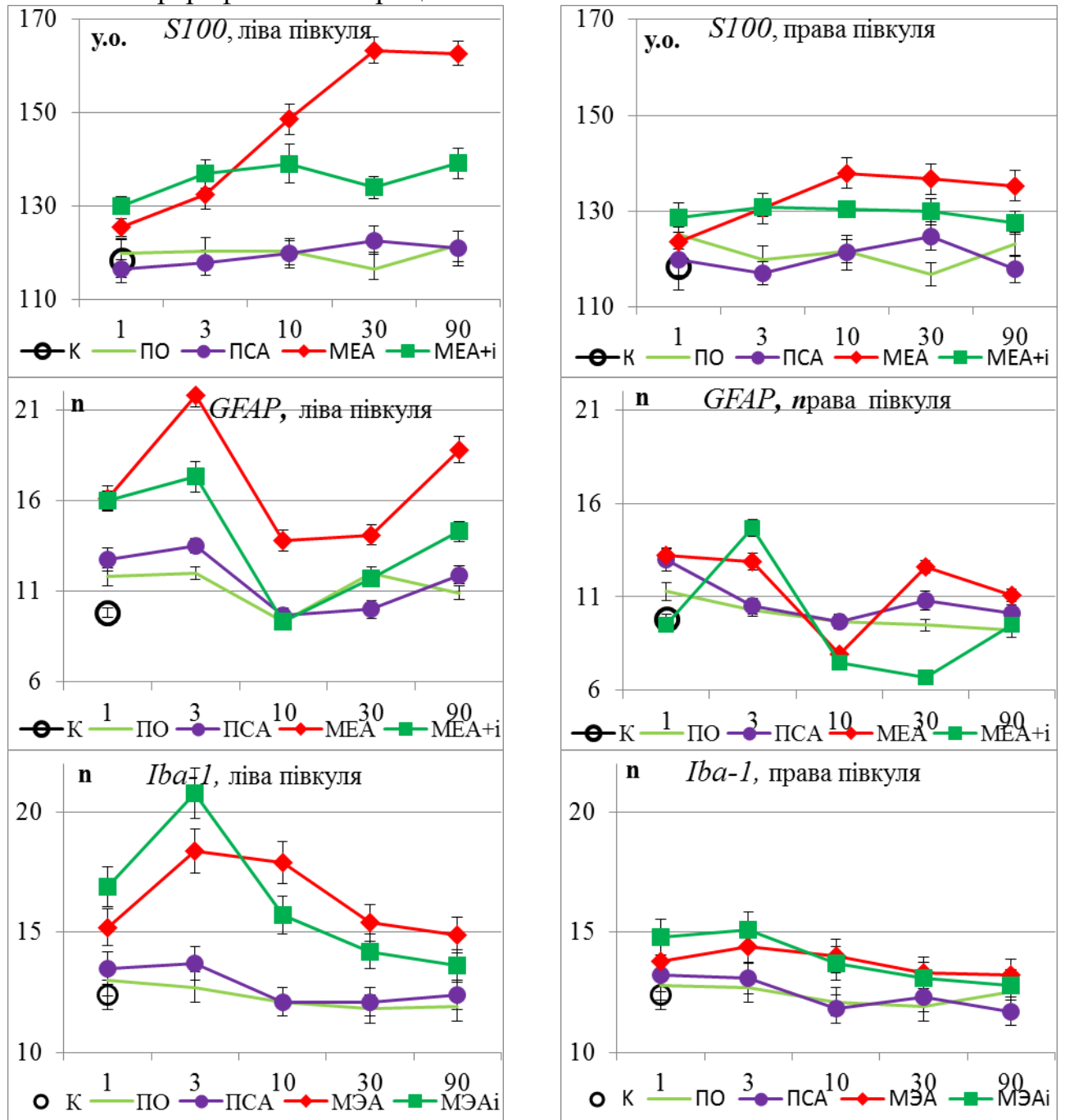


Рис. 3 – Експресія $S100$, кількість $GFAP^+$ та $Iba-1^+$ клітин в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні порушень кровообігу в лівій півкулі мозку та імунокорекції виниклих змін (у.о.). 1-90 доба від початку досліджу.

Активация мікроглії, скоріше за все, виконує подвійну роль після ішемічного ушкодження головного мозку [Kevenaar J. T., Hoogenraad C. S., 2015]. Мікроглія в один і той же час може продукувати нейропротекторні фактори, які слугують захистом для нейронів [Keep R. F. et al., 2012; Stefen H. et al., 2016], а також продукувати прозапальні цитокіни [Lai T. W. et al., 2014; Ren M. et al., 2012], що стимулюють нейрозапалення, яке може призвести до вторинного ушкодження головного мозку [Wang E. et al., 2017]. У ділянках кори, що не зазнали деструктивних змін при транзиторній ішемії, питома щільність мікроглії в гострий період також різко зростала (Рис. 3). Потім цей показник знижувався, хоча навіть через 90 діб він залишався більшим, ніж у контролі. Беручи до уваги в цілому негативний вплив нейрозапалення на відновлювально-компенсаторні процеси, його можна розглядати як несприятливий феномен [Gresle M. M. et al., 2011; Shichita T. et al., 2009]. Останнє твердження не є однозначним. Є дані, що мікроглія, продукуючи протизапальні цитокіни, здатна пригнічувати запалення [Pargura V. et al., 2011; Shichita T. et al., 2009], попереджати апоптоз нейронів, а тому функціонування мікроглії необхідне для процесів відновлення [Lam V. et al., 2013]. Баланс згаданих явищ може залежати від ступеня ішемічного ушкодження та загальної спрямованості компенсаторно-відновлювальних процесів.

Звертає на себе увагу зростання кількості клітин *Iba-1+*-мікроглії в контралатеральній півкулі (Рис. 3), що не можна пояснити виключно дисциркуляторними змінами внаслідок перев'язування лівої сонної артерії. Тут ми, вірогідно, стикаємось із системними змінами, які можуть реалізовуватися за рахунок імунних регуляторних впливів на ці клітини [Liesz A. et al., 2011; Wang C.X. et al., 2001].

Отже, проведені спостереження показали, що зміни досліджених маркерів у сенсомоторній корі при моделюванні порушень її кровопостачання не є однозначними. Ішемічна атака, яка не є фатальною і не приводить до інфаркту тканини мозку, веде до дегенеративних змін нейроцитів і загибелі їх частини та активації клітин глії.

Так, зміни маркерів, пов'язаних з функцією/життєзабезпеченням нейроцитів, сягають мінімальних значень на третю добу після ішемії, після чого повільно відновлюються, але навіть через 3 місяці спостережень залишаються меншими за контрольні значення (Табл. 1).

Зміни маркерів ряду складових цитоскелету нейронів за спрямованістю у цілому співпадають зі змінами у нейронах маркерів, що пов'язуються з їх функцією. Значною мірою зменшення експресії *NF-L*, *Act* та *b-tub* у початковий період після ішемії (Табл. 1) може бути пов'язаним з протеолізом [Aronowski J. et al., 1999] та подальшим зниженням інтенсивності їхнього синтезу, що відповідає зменшенню функціональних можливостей нейронів. З цієї групи маркерів випадає *tau*, зміни якого, по-перше, значно більші, а по-друге, мають протилежну спрямованість. Насамперед збільшення кількості *tau* можна пов'язати з утворенням його патологічних форм [Buée L. et al., 2000; Malarkey E.V., Pargura V., 2008], які накопичуються у нейронах і є складовою комплексу факторів, що затримують відновлювальні процеси або сприяють повільному подальшому

розвитку нейродегенеративних явищ [Wu X. L. et al., 2017; Yilmaz G. et al., 2006].

У відповідь на ішемію активується глія (Табл. 1), що супроводжується зростанням як кількості мічених клітин, так і рівня експресії в них маркерів. Причому ці зміни є достовірними не тільки з боку ураження, а й з контрлатеральної сторони. Це можна розцінювати як системну активацію цих клітин. Кількість *S100* зростає протягом місяця після ушкодження і до кінця 3 місяця практично зберігається на підвищеному рівні. При цьому, у гострий період відмічається більш значне її зростання у тілах клітин та початкових ділянках відростків, завдяки чому вони значно краще візуалізуються. Динаміка зростання експресії *GFAP* насамперед пов'язана зі зростанням кількості мічених клітин та вмісту в них цього білка, виявляється двофазною. По-перше, зростання *GFAP*+ клітин спостерігається протягом перших трьох діб після ішемії, потім зменшується і у подальшому зростає у інтервалі 1-3 місяця після ішемічної атаки. Це дозволяє припустити, що частина астроцитів за нормальних умов може не експресувати *GFAP*+. Ішемічна ж травма активує цей процес. Зростання ж кількості цих клітин на 2-3 місяці експерименту, можна вважати, відбувається за рахунок реального збільшення їх кількості (Табл. 1).

Таблиця 1 – порівняльна характеристика змін експресії ІГХ маркерів, що відображають функціональний стан нейронів, стан цитоскелету нейронів та стан гліальних елементів сенсомоторної кори після моделювання судинних уражень мозку та імунокорекції.

Маркер	<i>Syn</i>	<i>VEGF</i>	<i>NF-L</i>	<i>SMA</i>	<i>b-tub</i>	<i>tau-p</i>	<i>GFAP</i>	<i>S-100</i>	<i>Iba-1</i>
МЕА Δ max%	-25,8	-36,4	-31,8	-24,7	-35,9	+343,1	+40,8 +45,9	+38,1	+48,6
МЕА max/доба	3	3	10	10	10	10	10 90	30	3
МЕА віднов.	-	-	+	+	-	-	-	-	-
МЕА контрлат	-	-	-	-	-	+	+	+	+
$i\Delta$ max/МЕА%	+10,5	+28,5	+24,9	+22,9	+20,1	-27,6	-32,6 -23,9	-18,0	-13,0
i МЕА/К%	-3,0	-3,9	+5,25	-0,99	-2,6	+157,8	+45,9	+17,6	+9,8

Примітки: Δ max% - відсоток максимальної зміни показника; max/доба – строк спостережень, на якому він відмічений Δ max%; МЕА віднов. – наявність/відсутність відновлення показника на кінець спостережень; МЕА контрлат – наявність/відсутність статистично значимих змін показника у контрлатеральній півкулі; $i\Delta$ max/МЕА% – відносна максимальна реакція на дію імунофану; i МЕА/К% – залишкові зміни показника наприкінці експерименту за умов дії імунофану.

Зміни експресії *Iba-1* у цілому відповідають альтеративним явищам та найбільш виражені у гострий період після ішемії, що супроводжується найбільшим зростанням їх кількості *Iba-1*+клітин (див. Табл. 1).

При дії імунофану поряд зі зменшенням виразності загальних імунних змін [Яременко Л.М., та ін., 2009], у корі великих півкуль мозку при порушеннях

кровообігу, спостерігається певною мірою зменшення проявів альтеративних змін та співвідношення нероцитів/глія [Белозерцев Ю. А., Юнцев С. В., 2008].

Імунофан зменшує виразність змін усіх маркерів, які були викликані ішемічною атакою (Табл. 1). Виявлені ефекти на 1-3 доби після моделювання судинних уражень може бути пояснений його прямою дією на тканини мозку та пов'язаний з антиоксидантними і, відповідно, детоксикаційними властивостями, що реалізується шляхом стимуляції продукції церулоплазміну та активності каталази [Караулов А.В., 2000; Караулов А. В. и др., 2005; Лебедев В. В., Покровский В. И., 1999]. Прискорення відновлення експресії маркерів, що досліджувалися, у гангліонарному шарі кори великих півкуль можна пов'язувати як з певною нейропротекторною дією імунофану, так і зі зменшенням проявів імунних порушень (аутоагресії) [Яременко Л.М. та ін., 2009], що супроводжують судинні ураження мозку. Це можна розцінювати як те, що імунофан сприяє реалізації компенсаторних та відновлювальних процесів в ураженій півкулі та зменшує прояви трансформації альтеративних змін, обумовлених гострою ішемічною атакою, у повільно прогресуючий нейродегенеративний процес, який веде до кількісної зміни клітинного складу кори мозку (збідніння нейронами та збагачення гліоцитами). Останнє є морфологічним субстратом, що забезпечує зменшення ознак неврологічного дефіциту [Tateishi N. et al., 2002].

Імунофан призводив до відносно значного, у порівнянні з іншими маркерами, при МЕА зростання кількості *VEGF* у нейронах, що могло сприяти підвищенню стійкості нейронів до вторинних ушкоджуючих факторів (нейрозапалення) та їх виживаності після ішемічної атаки (Табл. 1). Серед компонентів цитоскелету найбільші зміни під впливом імунофану зазнавав *tau* (Табл. 1). Останнє може бути також тим фактором, що зменшує вторинні зміни у корі мозку після епізоду ішемії [Fujii H. et al., 2017].

Слід особливо відмітити за цих умов швидке відновлення експресії *Act* (Табл. 1) в нейропілі у вигляді дрібних гранул. Останнє може бути пов'язане як з відновленням функціонування синапсів [Fan Y. et al., 2011; Stefen H. et al., 2016], так і з формуванням колб росту, після термінальних аутонейротомій унаслідок ішемічного ушкодження [Fan Y. et al., 2011; Flynn K. C. et al., 2012].

Серед гліальних елементів мікроглія виявляла неоднозначну реакцію на дію імунофану, кількість якої ставала більшою у гострий період після епізоду ішемії, а у відновлювальний період лише незначно зменшувалася, що, на перший погляд, входило в деяке протиріччя з загальним позитивним впливом імунофану на зміни у корі мозку після ішемічної атаки. Даний феномен співпадає з відносно менш виразним зменшенням після ішемічного ураження мозку кількості Т-лімфоцитів, у тому числі й Т-хелперів. Активація Т-регуляторних клітин виступає як один з істотних нейропротекторних факторів, що запускаються після ішемії [De Bilbao, F. et al., 2009; Liesz A. et al., 2009]. Кількість таких клітин зростає під впливом імунофану [Белозерцев Ю.А., Юнцев С.В., 2008; Караулов А.В. и др., 2005; Лебедев В.В., Новиков С.А., 2006]. Разом з тим, імовірно, не можна виключити можливості безпосереднього впливу імунофану на мікроглію.

Враховуючи те, що мікроглія є основним імунокомпетентним клітинним елементом мозку [Скибо Г.Г. та ін., 2016; Kawakuchi J. et al., 2008], можна було сподіватися, що вона найбільш активно відреагує на імунофан. Але різких змін її кількості ми не спостерігали. У зв'язку з цим, можна припустити, що за цих умов змінювалася функція клітин у бік посилення їх нейропротекторних властивостей. Але це припущення потребує окремих спеціальних досліджень.

Зменшення рівня протимозкових аутоантитіл та ЦК [Яременко Л.М. та ін., 2009] під впливом імунофану при ішемічних ушкодженнях мозку практично не викликає сумнівів щодо позитивного впливу на перебіг процесів у мозку після його ішемічної атаки. Водночас ми не спостерігали значного проникнення лімфоцитів у тканини мозку навіть у ділянках некрозу, що могло суттєво вплинути на перебіг постішемічних реакцій. Отже, відповідний короткодистантний ефект, який би міг бути опосередкованим відносною активацією системи Т-регуляторних клітин імунофаном [Белозерцев Ю.А., Юнцев, С.В., 2008; Караулов А.В. и др., 2005; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999] за умов нашого експерименту, є малоімовірним. Вказані вище фактори, задіяні після ішемізації кори, свідчать про істотні нейропротекторні властивості імунофану [Liesz A. et al., 2009; Walsh J. T. et al., 2014]. Певною мірою можна пов'язати як з меншою виразністю альтеративних змін у гострому періоді ішемії мозку, так і зі зменшенням імунної відповіді на його ураження [Basigaluppi M., Hermann D.M., 2008; Chamorro Á. et al., 2012]. Відновлювальний ж період після ішемічної атаки характеризується швидшим розвитком відновлювально-компенсаторних реакцій та меншою виразністю вторинних нейродегенеративних змін.

Виходячи з отриманих даних, що імунотропний препарат імунофан зменшує виразність змін з боку імунної системи [Дарий В.И. и др., 2009] і виявляє нейропротекторні властивості при ішемії мозку, а також, що у значної кількості людей гострі судинні ураження мозку виникають на фоні сенсibiliзації до нервової тканини [Vogelgesang A, Dressel A., 2011], ми відтворили модель імунно-судинного ураження мозку. Для цього ми сенсibiliзували щурів мозковим антигеном і на цьому фоні відтворювали МЕА.

Проведені дослідження показали, що у сенсibiliзованих тварин розвивається аутоімунний енцефаліт [Ганнушкина И.В., 1974; Heppner F. L. et al., 2005; Holz K. et al., 2018], що супроводжується помірним неврологічним дефіцитом [Pender M. P., McCombe, 1995], змінами імунної системи [Hug A. et al., 2009; Rao P., Segal B.M., 2012], дегенеративними змінами нейронів та активацією клітин глії у корі головного мозку.

Сенсibiliзація призводила до зміни експресії усіх досліджених маркерів, які носили у цілому ту ж спрямованість, як і при. Виразність ж цих змін загалом була меншою та мала суттєві відмінності. Так *Syn* (Рис. 4) демонстрував зміни, що були понад чим у 3 рази меншими, ніж при МЕА, що може свідчити про незначне порушення синаптичної функції [Скибо Г. Г., 2010; Скибо Г.Г. и др., 2016]. На відміну від цього максимальне зменшення експресії *VEGF* було одним зі значимих серед усіх маркерів і на 45% меншим, ніж за МЕА (Рис. 4).

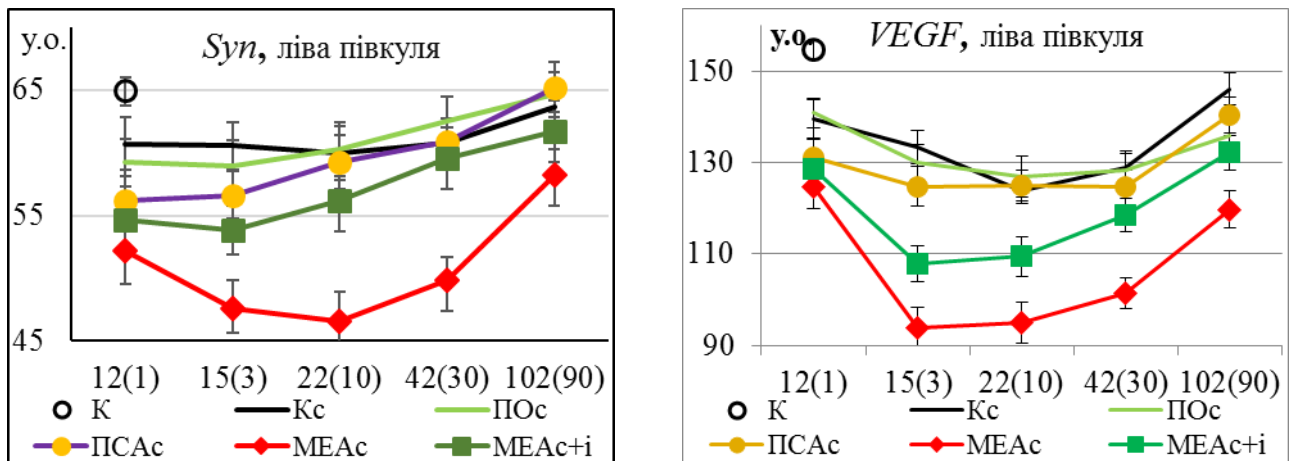
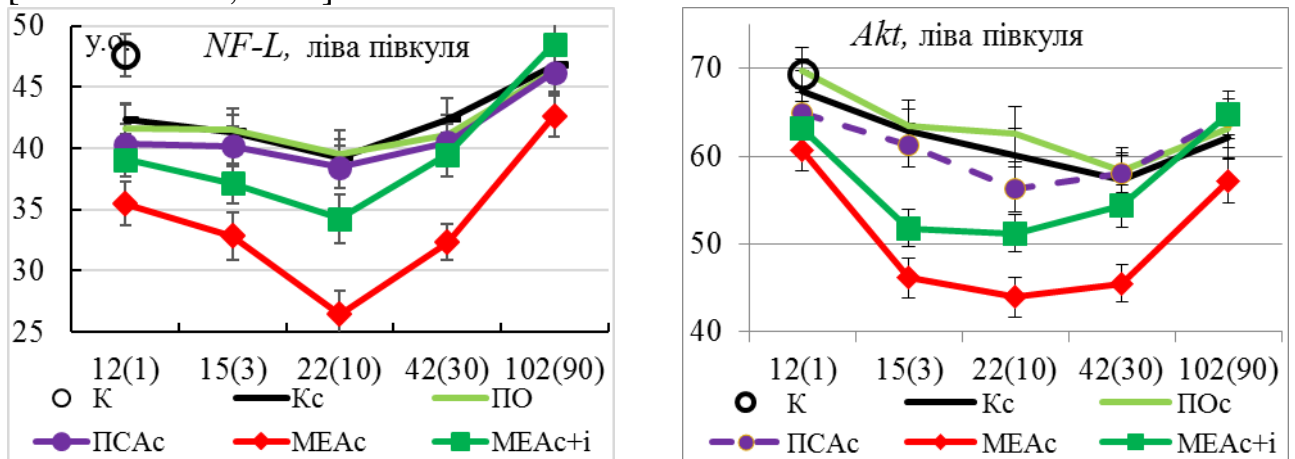


Рис. 4 – Експресія *Syn* та *VEGF* в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні імунно-судинного ураження мозку та імунокорекції виниклих змін (у.о.). 12(1)-102(90) доба від початку досліджу.

Серед маркерів, що відображували стан цитоскелету нейронів (Рис. 5), найменші відносні зміни, у порівнянні з МЕА, зазнавав *tau* (34,5%). Зміни експресії *NF-L* був майже вдвічі, а *b-tub* – втричі меншими, ніж при МЕА. Максимальне зменшення експресії *Act* було лише на 1/2 меншим, ніж те, що спостерігалось при МЕА. У відновлювальний період після ішемії у нейропілі виявлялося значно менше округлих тілець, у тому числі таких, що визначалися на кінцях нервових волокон та які були нами кваліфіковані як колби (конуси) росту [Lee M.K. et al., 1993]. Це дозволяє говорити про те, що сенсibilізація мозковим антигеном затримує регенерацію нервових волокон, яка є важливим компонентом компенсаторно-відновлювальних процесів в корі мозку після ішемічної атаки [Ueno Y. et al., 2012].



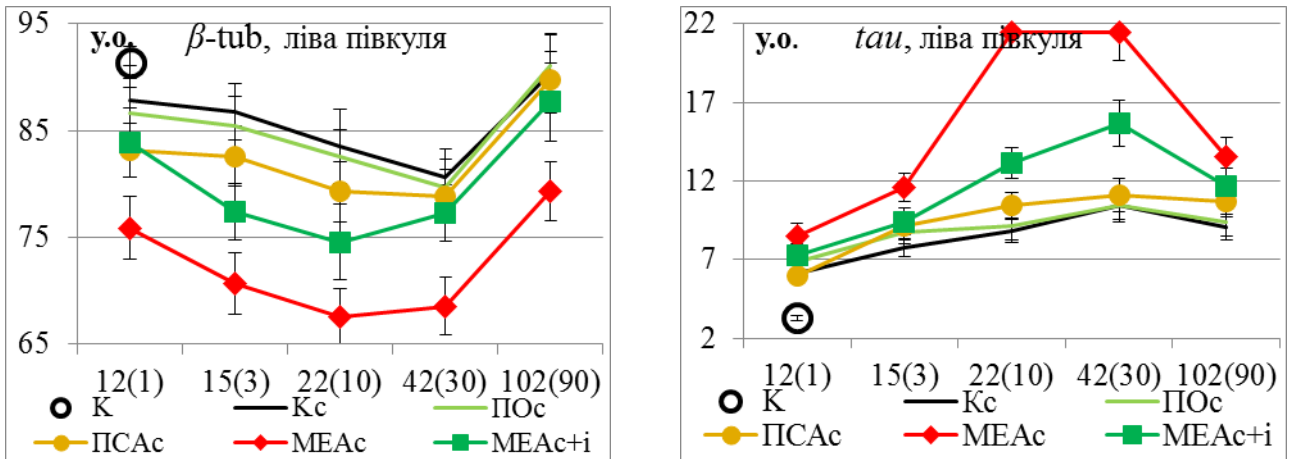
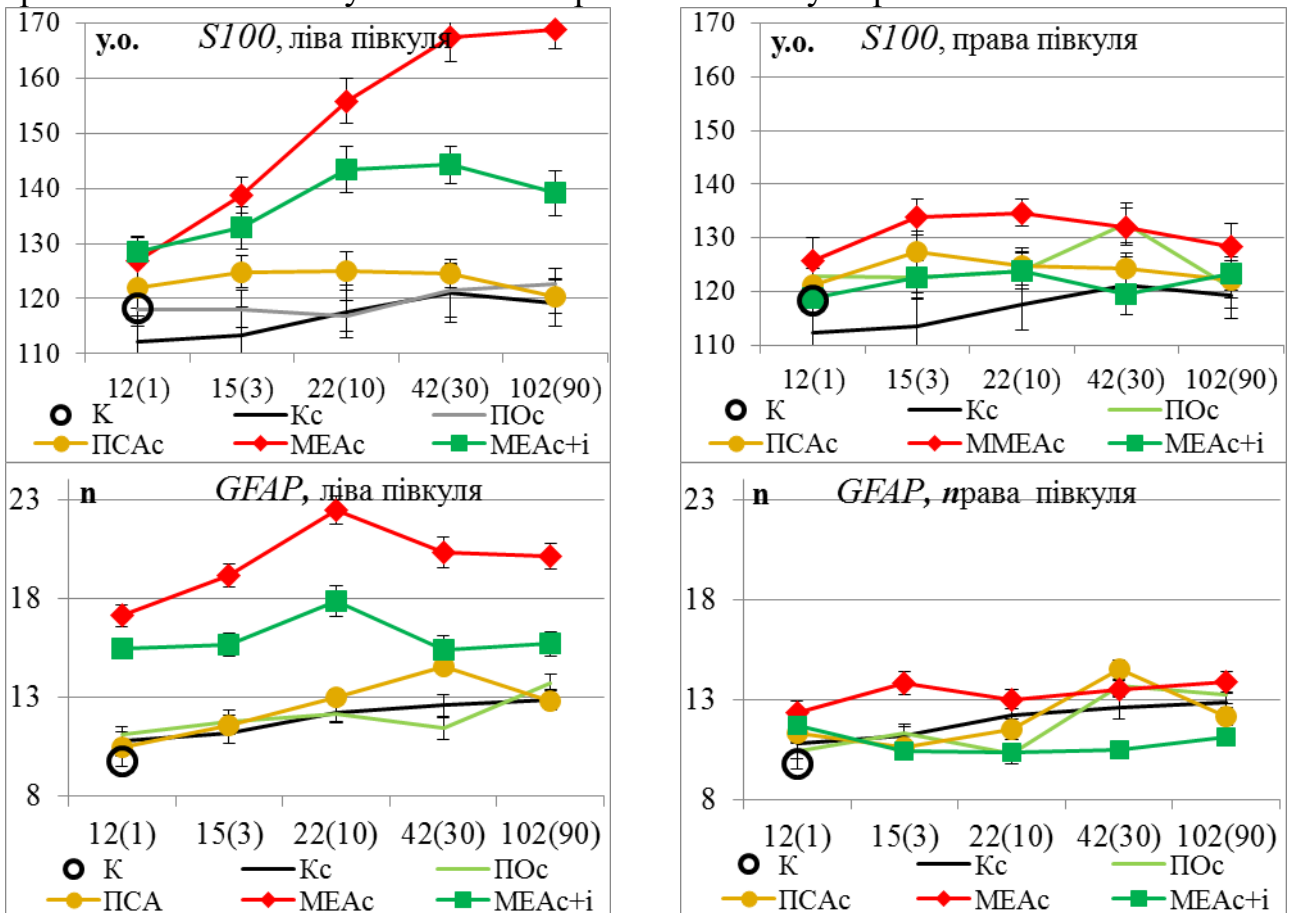


Рис. 5 – Експресія *NF-L*, *Act*, β -*tub* та *tau* в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні імунно-судинного ураження мозку та імюнокорекції виниклих змін (у.о.). 12(1)-102(90) доба від початку досліджу.

Що стосується клітин глії (Рис. 6), то їх активація у відповідь на сенсibiliзацію була також менш виразною, ніж при МЕА. При цьому найбільш виразними були зміни кількості *GFAP*⁺-клітин, і були лише на 1/4 меншими, ніж при МЕА. Найменшу реакцію виявляла експресія *S100*, яка лише на піці змін незначно перевищувала значення у інтактних тварин. Кількість *Iba-1*⁺-клітин зростала незначно і була майже в 5 разів меншою у порівнянні з МЕА.



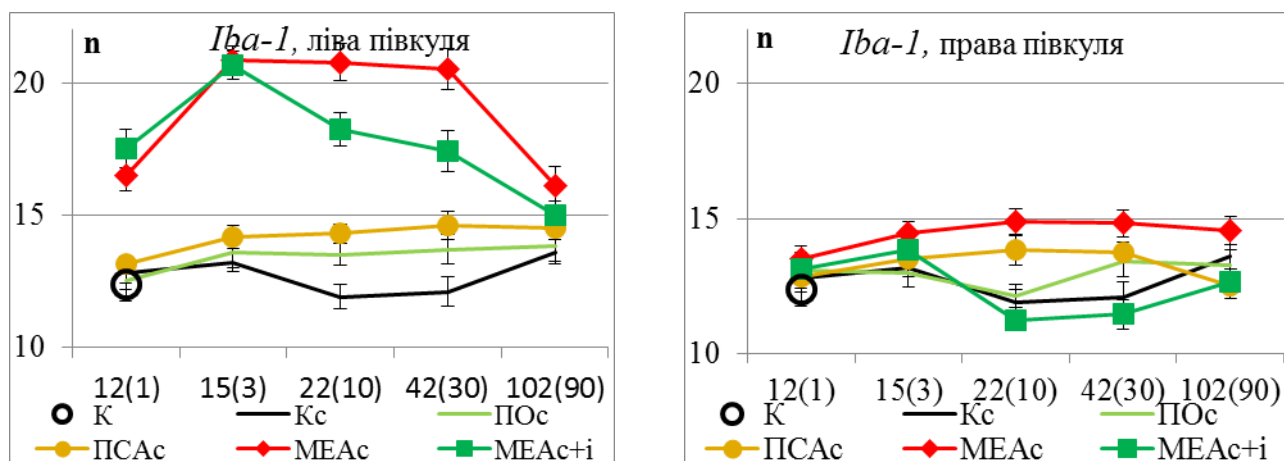


Рис. 3 – Експресія *S100*, кількість *GFAP*⁺ та *Iba-1*⁺ клітин в гангліонарному шарі сенсомоторної кори у щурів при моделюванні імунно-судинного ураження мозку та імунокорекції виниклих змін (у.о.). 12(1)-102(90) доба від початку досліду.

Наприкінці спостережень, через 102 доби після початку сенсibiliзації, до контрольних значень поверталися показники експресії *Syn*, *NF-L*, *b-tub* та *S100*. Експресія *VEGF*, *Act* та *tau* були достовірно нижчими, а кількість *GFAP*⁺ і *Iba-1*⁺ клітин більшими за контрольні значення.

Натомість, сенсibiliзації мозковими антигеном, яку певною мірою можна розглядати як аналог деяких патологічних станів [Diamond B. et al., 2013; Levin E.C. et al., 2010; Stolp H.B., Dziegielewska K.M., 2009], навіть у відсутності безпосереднього судинного ушкодження мозку викликає нейродегенеративні процеси та реакція з боку нейроглії [Ганнушкина И.В., 1974; Holz K. et al., 2018; Rao P., Segal B.M., 2012; Steinbach K., Merkler D., 2014]. Остання носить характер нейрозапалення зі збільшенням кількості та гіпертрофією *Iba-1*⁺-мікроглії. Разом з тим відбуваються гліоз з поступовим, зі стабільною динамікою, зростанням кількості астроцитів та їх гіперплазією, що виразно виявляється за експресією *GFAP*. Значною мірою це співпадає зі зростанням рівня протимозкових антитіл у крові дослідних щурів [Яременко Л.М. та ін., 2009]. Зменшення експресії *S100*, який дозволяє, певною мірою, оцінити ступінь диференціювання та функціональну активність гліальних елементів [Marenholz I. et al., 2004], і експресію *GFAP* у клітинах макроглії сенсомоторної кори на початкових етапах розвитку сенсibiliзації (у межах першого місяця), свідчать про зниження їх активності. Зростання ж кількості клітин мікроглії у відповідь на сенсibiliзацію мало нелінійний характер, і значною мірою співпадало з динамікою змін циркулюючих імунних комплексів у крові дослідних тварин [Яременко Л.М. та ін., 2009].

Попередня сенсibiliзація мозковим антигеном при відтворенні мікроемболії адипоцитами мікросудин лівої півкулі мозку у цілому потенціувала нейродегенеративні явища у сенсомоторній корі, затримувала віновлювально-компесаторні процеси.

Зменшення експресії *Syn* за цих умов у сенсомоторній корі була дещо більшою, але сягала мінімального значення тільки на 10 добу після МЕА (див. Рис. 4). Падіння вмісту *VEGF* (див. Рис. 4) в нейронах було на третину більшим,

але спостерігалось у ті ж строки (3 доба після відтворення ішемії), як і при МЕА.

Сенсibiliзація, що передувала ішемічній атаці, потенціувала падіння вмісту *NF-L* на третину, а *Act* в півтори рази у порівнянні з МЕА (див. Рис. 5). Крім того, відмінністю було прискорення зниження експресії *Act*, яка сягала мінімуму вже на 3(15) добу експерименту. На відміну від цього, при МЕАс несподівано спостерігалось менш значне, ніж при МЕА, зменшення кількості *b-tub*. Відносні зміни експресія *tau*, як і перших двох маркерів – показників стану цитоскелету нейронів, зростав більше, ніж на 1/3 у порівнянні з МЕА (див. Рис. 5).

Зміни експресії *tau* звертають на себе особливу увагу тим, що їх відносні прояви значно більші, ніж інших маркерів, що спостерігалось при усіх видах використаних нами уражень мозку. Накопичення *tau* в нейропілі та перикаріонах насамперед можна пов'язати з дестабілізацією мікротрубочок [Fujii H. et al., 2017], яке викликає імунне та/або ішемічне ураження. Але це явище не збігається зі зменшенням вмісту в цей час інших досліджених елементів цитоскелету – *NF-L*, актину та *b-tub*, які зазнають протеолізу [Aronowski J. et al., 1999]. Це дозволяє припустити, що *tau* не зазнає протеолізу, а трансформується у патологічні форми [Schlaepfer W. W., Zimmerman, U. J. P., 1985]. Появу ж експресії *tau* в цитоплазмі гліоцитів ми схильні розглядати як його фагоцитоз мікроглією. Відповідно, накопичення *tau* може виступати як вторинний фактор ушкодження мозку, та як патогенетичний чинник розвитку нейродегенеративних розладів у хворих з судинними ураженнями мозку [Yi Wen et al., 2004], у тому числі як один з принципово важливих чинників порушення синаптичних функцій [Bielewicz J. et al., 2011].

Кількість *GFAP*+клітин в ураженій сенсомоторній корі при МЕАс виявлялася втричі більшою на 22(10) добу досліду (див. Рис. 6), ніж у відповідний строк при МЕА. У подальшому спостерігалось тільки зменшення цього показника, а наприкінці експерименту він залишається більшим, ніж при МЕА.

Прирощення зміни експресії *S100* при комбінованому імунно-судинному ураженні (див. Рис. 6) виявляється незначно більшим у порівнянні з МЕА, але його максимум зміщується на кінець спостережень.

Зростання кількості *Iba-1*+клітин при МЕАс (див. Рис. 5) виявляється на 40% більшим, ніж при МЕА, а максимальне значення цього показника в обох дослідних групах виявлялося за 3 доби після відтворення емболії.

За умов поєднання імунного та судинного ураження мозку відновлення рівня експресії ні одного з досліджених маркерів на кінець досліду (90 доба після МЕА) не було відмічене. Зміни в контрлатеральній півкулі, що не зазнавала ішемічної атаки, стосувалися тих же маркерів, що й при МЕА, а саме *tau*, *GFAP*, *S-100* та *Iba-1*.

Отже, комбіноване імунно-ішемічне ураження мозку характеризувалося посиленням нейродегенеративних та затримкою компенсаторно-відновлювальних процесів у порівнянні з моделлю, що відтворювала тільки судинне ураження мозку в щурів. При цьому виразність змін досліджених маркерів мала свій специфічний спектр, відмінний від того, що спостерігається при гострій ішемії судинного походження. Відповідно, аутоімунна агресія може бути фактором, який

суттєво впливає на функцію регіонів мозку після перенесеної судинної катастрофи [Middeldorp J., Hol E.M., 2011]. Слід зазначити, що при імунно-ішемічному враженні мозку уповільнюються відновлювальні процеси. Це дає підстави вважати, що у їх гальмуванні принципову роль відіграють механізми імунної агресії.

За умов дії імунофану при МЕАс в ураженій півкулі спостерігалось відносно зменшення виразності зміни експресії *Syn*, ніж при МЕА. В той же час відносно покращення рівня *VEGF* сягало лише 41% (Таб. 2). Це можна трактувати як порівняно ефективний вплив на відновлення синаптичної функції [Bai X., Strong R., 2014], та слабкий, у порівнянні з МЕА, загального метаболічного потенціалу [Basigaluppi M., Hermann D.M., 2008] нейронів після ішемічної атаки.

Значно слабшою реакцією на імунофан за умов МЕАс, ніж при МЕА, в півкулі, що зазнала ішемічної атаки, було більш виразне відносно зростання експресії *NF-L*, але менше, ніж при МЕА зростання *Act* та, особливо, *b-tub*. Зменшення накопичення *tau*, навпаки було більшим (Таб. 2). Це може свідчити про різну чутливість до імунних пошкоджень цих молекулярних компонентів цитоскелету.

Відносні зміни експресії *S100* та кількості *Iba-1*+клітин з боку ураження були виражені практично на тому ж рівні, що й при МЕА. Відносно ж зменшення ж кількості *GFAP*+астроцитів за цих умов в цілому було менш виразним, ніж при МЕА (Таб. 2).

У контрлатеральній (правій) півкулі, що не зазнавала ішемічної атаки та в якій патологічні зміни були обумовлені переважно аутоімунною реакцією, спостерігалось, порівняно з лівою півкулею, майже вдвічі більш виразне відносно відновлення експресії *Syn*, та лише незначне – *VEGF* (Таб. 2).

Таблиця 2 – Порівняльна характеристика змін експресії імуногістохімічних маркерів, що відображують функціональний стан нейронів, стан цитоскелету нейронів та стан гліальних елементів сенсомоторної кори після моделюванні судинних уражень головного мозку на фоні попередньої сенсibiliзації мозковим антигеном та їх імунокорекція

Маркер	<i>Syn</i>	<i>VEGF</i>	<i>NF-L</i>	<i>Act</i>	<i>b-tub</i>	<i>tau-p</i>	<i>GFAP</i>	<i>S-100</i>	<i>Iba-1</i>
Кс Δmax%	-7,58	-20,03	-17,6	-17,48	-11,69	+119,6	+31,4	+3,0	+9,85
Кс max/доба	22(10)	22(10)	22(10)	42(30)	42(30)	42(30)	102(90)	42(30)	102(90)
Кс віднов.	+	-	+	-	+	-	-	+	-
МЕАс Δmax%	-28,24	-39,47	-44,48	-36,76	-22,03	+556,9	+129,3	+43,5	+68,26
МЕАс max/доба	22(10)	15(3)	22(10)	15(3)	22(10)	22(10)	22(10)	102(90)	15(3)
МЕАс віднов.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МЕАс контрлат	-	-	-	-	-	+	+	+	+
iΔmax/МЕАс ^{np} %	+20,6	+18,4	+13,4	+14,7	+7,54	-39,93	-22,62	-9,59	-24,7
iΔmax/МЕАс ^{nb} %	+11,6	+16,9	+29,6	+19,5	+12,69	-38,7	-24,1	-17,54	-15,02
iМЕАс ^{np102} /К%	-0,6	-2,9	+1,9	-6,8	-0,74	+130	+13,77	+4,88	+2,42
iМЕАс ^{nb102} /К%	-4,9	-14,7	+4,8	+0,67	-4,02	+257,8	+60,31	+18,3	+21,2

Примітки: Кс Δmax% – відсоток максимальної зміни показника від К; Кс max/доба – строк спостережень, на якому відмічений Δmax%; Кс віднов. –

наявність або відсутність відновлення показника на кінець спостережень (+/-); MEAc Δ max% – відносна максимальна зміна показника при по відношенню до K; MEAc контрлат – наявність або відсутність достовірних змін показника у контрлатеральній півкулі (+/-); $i\Delta$ max/MEAc% – відносна максимальна зміна показника за умов дії імунофану в правій (^{пр}) і лівій (^{лв}) півкулях; i MEAc¹⁰²/K% – відносне значення залишкових змін показника на кінець експерименту в правій (^{пр}) і лівій (^{лв}) півкулях.

Відносні реакції таких компонентів цитоскелету як *NF-L*, *SMA* та *b-tub* були менш виразними, ніж у лівій півкулі, а *tau* – практично на тому ж рівні. Останнє дає підстави припустити, що накопичення *tau* є у більш залежним від аутоімунних процесів, ніж від ішемічного ушкодження.

Доволі різноманітними при MEAc були реакції гліальних елементів у контрлатеральній півкулі від правої, що зазнала емболії мікросудин. Так, зміни відносної кількості *GFAP*+клітин лише незначно поступалися, зростання відносної експресії *S100* було майже удвічі меншим, а відносні зміни кількості *Iba-1*-позитивних клітин були майже на 40% меншими (див. Таб. 2).

Наприкінці експерименту (через 102(90) діб) при поєднанні імунного і ішемічного ураження під впливом імунофану поверталися до контрольних значень (достовірно не відрізнялися) маркери (див. Таб. 2), що відображали певні функціональні властивості нейронів (*Syn* та *VEGF*), досліджені компоненти цитоскелету нейронів, крім *tau* (збільшений на 257,8%). Що ж стосується маркерів, що пов'язані зі станом глії, то всі вони виявлялися більшими за контрольні значення на: кількість *GFAP*+клітин – 60,31%, експресія *S100* – 18,3%, кількість *Iba-1*+клітин – 21,2%. Водночас у контрлатеральній півкулі достовірно залишалися більшими за контрольні значення експресія *tau* (на 130%) і кількість *GFAP*+клітин (на 13,77%). Динаміка змін кількості гліальних клітин при MEAc+і дозволяє припускати, що провідним механізмом тут виступає модуляція стану імунної системи, а не антиоксидантні властивості імунофану.

Отже, застосування імунофану за умов моделювання імунного та комбінованого імуно-судинного ураження мозку виявило його протекторні властивості, що значною мірою можна пов'язати й зі зменшенням інтенсивності патогенетичних факторів імунної агресії [Bhattacharya P. et al., 2013].

Слід зазначити, що ці ефекти спостерігаються у корі мозку як з боку транзиторного порушення кровообігу, так і з контрлатерального боку, де переважним було імунне ураження. Останнє свідчить про модуляцію імунофаном імунної відповіді при ураженні головного мозку [Jia J., Cheng J., 2017].

Імунофан, імовірно, зменшує виразність нейродегенеративних змін та змін досліджених ІГХ-маркерів, викликаних як порушенням кровообігу в корі мозку, так і сенсibiliзацією. Це може бути пов'язано як з прямим впливом імунофану, обумовленим його антиоксидантними властивостями [Караулов А.В., 2000; Караулов А. В. и др., 2005], так і опосередковано, за рахунок відносної активації системи T-регуляторних клітини [Караулов А.В., 2000; Лебедев В. В., Новиков С.А., 2006]. Активація ж останніх виступає як один з істотних нейропротекторних

факторів, що запускаються після ішемії [Liesz A. et al., 2009; Walsh J. T. et al., 2014]. Кількість таких клітин у крові зростає під впливом імунофану. Разом з тим, імовірно, не можна виключити можливості безпосереднього впливу імунофану на мікроглію.

Виявлені ефекти імунофану при МЕАс співпадають з відносно меншою депресією пулу Т-лімфоцитів, у тому числі й Т-хелперів [Караулов А.В., 2000; Vogelgesang A. et al., 2008; Walsh J. T. et al., 2014]. а також, певною мірою, з реакцією мікроглії. Зростання кількості та модуляція ж імунофаном Т-регуляторних клітин [Белозерцев Ю.А., Юнцев С. В., 2008; Караулов А.В., 2000; Лебедев В.В., Новиков С.А., 2006] може виступати як нейропротекторний фактор [Yilmaz G. et al., 2006]. Можна припустити, що за цих умов можливе посилення продукції мікроглією протизапальних цитокінів, що пригнічує нейрозапалення [Adami C. et al., 2001; Chhor V. et al., 2013], а також попереджає апоптоз нейронів є необхідним для процесів відновлення [Bin Liu et al., 2015; ElAli A., 2016].

ВИСНОВКИ

Гострі порушення мозкового кровообігу такі як транзисторні ішемічні атаки, інсульти, в областях, що не зазнали деструкції, ведуть до розвитку нейродегенеративних змін. Певна роль у розвитку цих процесів належить дисфункції імунної системи та аутоімунним реакціям, що виникають. У дисертації представлено теоретичне узагальнення та вирішення наукової проблеми, що пов'язані з оцінкою експресії низки іммуногістохімічних маркерів у сенсомоторній корі головного мозку після гострого транзиторного ішемічного та комбінованого імуно-ішемічного ушкодженнях, які характеризуються дифузними нейродегенеративними змінами та обґрунтована ефективність їх корекції шляхом імуномодуляції.

1. Гостре транзиторне порушення кровообігу в корі великих півкуль мозку призводить до дифузних нейродегенеративних змін, які проявляються зниженням експресії *синаптофізину* (*Syn*) та *судинного ендотеліального ростового фактору* (*VEGF*). Зниження вмісту *Syn* можна розглядати як один з факторів порушення синаптичної функції, пов'язаної з депонуванням медіаторів. Зменшення експресії *VEGF* у перікаріонах є фактором, який свідчить про зниження їх загальної метаболічної активності та резистентності. Відновлення рівня експресії *Syn* та *VEGF* повністю не відбувається навіть через три місяці після ішемічної атаки, що можна розглядати як ознаки повільного прогресуючого дегенеративного процесу в корі півкуль великого мозку, ініційованого транзиторною ішемією.

2. Транзиторна ішемічна атака призводить до дезорганізації цитоскелету нейронів, що зберегли життєздатність. Це проявляється у гострому періоді після ішемічної атаки зменшенням експресії *нейрофіламентів з низькою молекулярною масою* (*NF-L*), *актину* (*Act*), *β-тубуліну* (*β-tub*), та зростанням – *таубілку* (*tau*). Причому поява в гострому періоді в нейропілі гранул та варикозів по ходу нервових волокон мічених *NF-L* свідчить про термінальну аутонейротомію і, відповідно, про деградацію міжнейронних зв'язків. Наявність *NF-L*⁺ округлих

тілець на кінцях нервових волокон у відновлювальний період після транзиторної ішемічної атаки відповідають конусам росту. Зменшення кількості *Act* та β -*tub* у перікаріонах після ішемічної атаки відображає зниження інтенсивності їх синтезу. Зниження експресії *Act* у гранулах на поверхні тіл нейронів та у нейропілі, скоріше пов'язаних з синапсами, відображає певною мірою порушення синаптичної пластичності. Значне накопичення *tau* в нейрочитах після транзиторної ішемії пов'язане насамперед з порушенням метаболізму нейронів та утворенням патологічних (фосфорильованих) форм цього білка. Зміни експресії *NF-L*, *Act*, β -*tub* після ішемічної атаки є тимчасовими і за 30-90 діб практично відновлюються до похідного рівня.

3. Транзиторна ішемія сенсомоторної кори у щурів активує нейроглию і проявляється зростанням експресії білку *S100*, збільшенням кількості та гіпертрофією клітин *GFAP*⁺-астроглії та *Iba-1*⁺-мікроглії. Причому підвищення експресії *S100* та кількості клітин *GFAP*⁺-астроглії є прогресуючим протягом 3 місяців після епізоду ішемії. Динаміка змін кількості *GFAP*⁺-клітин після ішемічної атаки має два піки за 3 і 90 діб, що дає підстави припустити, що у гострий період зростання кількості цих клітин, що виявилися міченням *GFAP*, зумовлено активацією клітин, які за нормальних умов його не експресували. Відповідно, зростання їх кількості у подальшому пов'язано з їх проліферацією, що веде до розвитку астроцитозу. Кількість *Iba-1*⁺-мікроглії, яка стрімко зростає після ішемічної травми, а потім поступово зменшується, але навіть за 3 місяці, залишається більшою, ніж у контролі, що свідчить про перехід гострого нейрозапалення в персистуюче. Реакція глії на одностороннє ішемічне ураження мозку виявляє певні ознаки системності та проявляється зростанням експресії *S100*, збільшенням кількості *GFAP*⁺- і *Iba-1*⁺-клітин у контрлатеральній півкулі, яка не зазнала прямого ішемічного ураження.

4. Дія імунофану при транзиторній ішемії мозку призводить до зменшення альтеративних змін та астрогліозу. Причому під впливом імунофану експресія *Syn* виявляється відносно збереженою, що свідчить про відносно невелике порушення синаптичної функції. Виразне зростання за цих умов кількості *VEGF* у нейронах є фактором, який сприяє підвищенню їхньої стійкості до вторинних пошкоджуючих факторів ішемії. Більш висока експресія *NF*, *Act* та β -*tub* при дії імунофану свідчить про більшу збереженість цитоскелету нейронів у гострий період після ішемічної атаки, а у подальшому про відносне посилення синтезу білків цитоскелету та активацію відновлення міжнейронних зв'язків після аутонейротомії. Суттєве зменшення накопичення *tau* після ішемічної атаки за умов дії імунофану з одного боку свідчить про менш значне порушення метаболічних процесів у нейронах, що ведуть до утворення патологічних форм цього білка, з іншої – про зменшення інтенсивності дії факторів, які сприяють млявоплинним нейродегенеративним процесам у віддалені терміни після ішемії. Зменшення експресії *S100* та менш значне зростання кількості *GFAP*⁺-астроцитів після ішемії під впливом імунофану є одним з найбільш ілюстративних показників зменшення віддалених змін клітинного складу сенсомоторної кори та можливість настання вторинних неврологічних дефектів. Імунофан модифікує

реакції *Iba-1*⁺-мікроглії, призводячи до більш значного зростання їх кількості у гострий період після ішемії, та зменшуючи їх кількість у відновлювальний період. Враховуючи загальне зменшення альтеративних проявів після ішемії під впливом імунофану, це дає певні підстави думати про активацію нейропротекторних властивостей цих клітин.

5. Сенсibiliзація мозковим антигеном призводить у щурів до розвитку аутоімунного енцефаліту та характеризується помірними змінами більшості досліджених маркерів, що відображають альтеративні явища, які мали таку ж спрямованість, як і при ішемічному ураженні. На цьому фоні у сенсомоторній корі відмічалось відносно виразне зменшення експресії *VEGF* та накопичення *tau*.

6. Попередня сенсibiliзація мозковим антигеном при відтворенні мікроемболії адипоцитами мікросудин лівої півкулі мозку, в цілому, потенціювала нейродегенеративні явища у сенсомоторній корі та затримувала віновлювально-компенсаторні процеси. У цілому, при імунно-ішемічному ураженні зменшення експресії маркерів, що відображають стан нейронів та їх цитосклету, було на 1/3 більшим, ніж при емболії мікросудин адипоцитами. Сенсibiliзація не тільки потенціювала реакцію глії на ішемію, а й змінювала її динаміку, насамперед зміни кількості *GFAP*⁺-клітин, яка сягала максимуму наприкінці гострого періоду після ішемічної атаки, і хоча у подальшому зменшувалася, навіть за 3 місяці спостережень виявлялася більшою, ніж при судинному враженні. Сенсibiliзація посилювала і прискорювала реакцію мікроглії на ішемічну атаку і фактично забезпечувала збереження такої високої кількості *Iba-1*⁺-клітини протягом місяця спостережень. Не один з досліджених імуногістохімічних маркерів при імунно-ішемічному ураженні мозку не повертався за 3 місяці спостережень до показників, притаманних контрольному рівню.

7. Імунофан при імунно-ішемічному ураженні мозку в цілому суттєво зменшував зміни експресії досліджених маркерів, наближаючи їх динаміку до тієї, що спостерігалася при імуннокорекції при ізольованій транзиторній ішемічній атаці. Наприкінці експерименту (за 102(90) діб) при поєднанні імунного і ішемічного ураження під впливом імунофану поверталися до контрольних значень (достовірно не відрізнялися) маркери, які відображали певні функціональні властивості нейронів (*Syn* та *VEGF*), досліджені компоненти цитосклету нейронів, крім *tau* (залишався збільшеним понад 2,5 рази). Маркери, які пов'язані зі станом глії, демонстрували розвиток астроцитозу (збільшення експресії *S100* та кількості *GFAP*⁺-клітин) і збереження помірних явищ нейрозапалення (збільшення кількості *Iba-1*⁺-клітин).

8. Зміни експресії досліджуваних імуногістохімічних маркерів при транзиторній ішемічній атаці й при відсутності осередків некрозу свідчать про виникнення значимих нейродегенеративних змін та реакції з боку глії, які трансформуються у тривалий повільно прогресуючий процес, що призводить до зменшення кількості нейронів та зниження їх функціональних потенцій, розвитку астроцитозу та тривале збереження ознак нейрозапалення. Реакції глії на травму, як при ішемічному, так і при імунно-ішемічному ураженні, носять певні ознаки

генералізації та спостерігаються у ділянках мозку, що безпосередньо не зазнали ішемії. Ішемічне ураження мозку супроводжується певними імунними змінами, корекція яких в експерименті призводить до зменшення в ньому альтеративних явищ і активізації компенсаторно-відновлювальних процесів.

СПИСОК ПРАЦЬ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Раскалей В.Б. & Запривода Л.П. (2013). Експресія синаптофізину в гангліонарному шарі сенсомоторної кори при моделюванні порушення церебрального кровообігу за умов імунокорекції у щурів. *Таврический медико-биологический вестник*. 16 (1, ч.1.(61), 261-264. **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
2. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Раскалей Д.В. & Запривода Л.П. (2013). Експресія синаптофізину в гангліонарному шарі сенсомоторної кори при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості у щурів. *Галицький лікарський вісник*. 20 (1), 102-104. **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
3. Яременко Л.М. (2014). Експресія GFAP в сенсомоторній корі головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії за умов імуномодуляції. *Укр. Морф. альманах*. 12 (4), 57-60. **Google Scholar**.
4. Яременко Л.М. (2014). Експресія GFAP в сенсомоторній корі головного мозку в щурів після ішемічного ушкодження. *Вісник Луганського нац. Універ. імені Тараса Шевченка*. 10 (293) Частина II, 48-56. **Google Scholar**.
5. Яременко Л.М. & Грабовий О.М. (2015). Експресія білку нейрофіламентів у сенсомоторній корі головного мозку в щурів після ішемічного ушкодження. *Вісник морфології*. 1 (21), 55-59. **Google Scholar** (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
6. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Запривода Л.П. & Козак Г.І. (2015). Вплив імуномодуляції на експресію білку S-100 у сенсомоторній корі щурів при моделюванні порушень церебрального кровообігу *Актуальні питання медичної науки та практики: Зб. наук. пр. ДЗ «ЗМАПО МОЗ України» Запоріжжя*. 82 (2, 2), 146-151 **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
7. Яременко Л.М. & Грабовий О.М. (2015). Експресія білку S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку у щурів при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості *Галицький лікарський вісник*. 22 (3 (частина 2), 118 – 120. **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача:

аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).

8. Yaremenko L.M. & Grabovoy A.N. (2016). Changes in the Expression of Neurofilament Protein in the Rat Sensorimotor Cortex Induced by Microembolization of Blood Vessels: Effect of Immunomodulation. *Neurophysiology*. 48, 111-116.. **Scopus**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
9. Yaremenko L.M. & Garboviy O.M. (2016). Influence of sensitization with brain antigen sensitization on the condition of cerebral cortex sensomotor neuroglial elements of their immunohistochemical detection. *Deutscher Wissenschaftsherold*. №2, 6-9. **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
10. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Слічна Г.М., Чухрай С.М. & Слічний І.В. (2016). Експресія актину в сенсомоторній корі великих півкуль головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії та імунокорекції. *Morphologia*. Дніпропетровськ. 10 (3), 349-353 **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).
11. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Слічна Г.М. & Слічний І.В. (2016). Експресія β -тубуліну в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії та імунокорекції. *Вісник української медичної стоматологічної академії. "Актуальні проблеми сучасної медицини"* Полтава. 16 (56 в. 4 ч. 2), 53 – 56. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
12. Yaremenko, L.M., Grabovyi O.O. & Grabovyi O.M. (2016). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Rat Cerebral Cortex after Blood Supply Disturbances and Immunocorrection of Their Consequences. *Neurophysiology*. 48, 354-359. **Scopus**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
13. Yaremenko L. M. & Grabovyi O. M. (2017). Reactions of Microglial Cells in the Sensorimotor Cortex of Rats after Transient Ischemia. *Neurophysiology*. 49 (2), 107–112. **Scopus**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
14. Yaremenko L. M., Grabovyi O.M. & Shepelev S.Ye. (2017) Effect of Sensitization by Cerebral Antigen on Expression of Synaptophysin in the Sensorimotor Cortex under Conditions of Ischemia and Immunocorrection of its Consequences. *Neurophysiology*. 49 (3), 237-239. **Scopus**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури,

- проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).*
15. Яременко Л.М., Шепелев С.Є. & Грабовий О.М. (2017). Експресія актину гладких міоцитів у сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії на фоні попередньої сенсибілізації мозковим антигеном та імунокорекції. *Вісник української медичної стоматологічної академії "Актуальні проблеми сучасної медицини" Полтава.* 17 (60, в. 4 ч. 2), 119-123. **Google Scholar.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).*
 16. Яременко Л. М., Грабовий О. М. & Шепелев С. Є. (2017). Експресія гліального фібрилярного кислого білка в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії на тлі попередньої сенсибілізації мозковим антигеном та імунокорекції. *Патологія.* 14 (3 (41)), 314-318. **Web of Science.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).*
 17. Яременко Л. М., Грабовий О. М. & Шепелев С. Є. (2017). Експресія β -тубуліну в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії на тлі попередньої сенсибілізації мозковим антигеном та імунокорекція виниклих змін. *Світ Медицини та Біології.* 4 (62), 173-178. **Web of Science.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).*
 18. Яременко Л. М. Грабовий О. М. & Шепелев С. Є. (2017). Експресія tau-білка в сенсомоторній корі при моделюванні транзиторної ішемії та імунокорекції. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини.* 4 (32), 109-114. **Google Scholar.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).*
 19. Яременко Л. М., Грабовий О. М. & Шепелев С. Є. (2017). Експресія S-100-білка у корі великих півкуль при моделюванні ішемії за умов сенсибілізації мозковим антигеном та імунокорекції. *Вісник наукових досліджень.* 4, 153-157. **Google Scholar.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).*
 20. Яременко Л. М., Шепелев С. Є., Бідна Л. П. & Грабовий О. М. (2018). Експресія tau-протеїну в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії на фоні попередньої сенсибілізації мозковим антигеном та імунокорекція виниклих змін. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень.* 6 (1), 31-37. **Google Scholar.** *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ІГХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення даних, підготовка публікації).*

21. Яременко Л. М. Л., Грабовий О. М., Бідна Л. П., Шепелев С. Є. & Груша М. М. (2018). Експресія білка NF-L в сенсомоторній корі при моделюванні транзиторної ішемії на тлі сенсibilізації мозковим антигеном та імунорекції змін, що виникли. *Патологія*. 15 (1(42)), 57–61. **Web of Science**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
22. Яременко Л. М., Грабовий О. М. & Шепелев С. Є. (2018). Експресія ендотеліального фактора росту судин у корі великого мозку при порушеннях кровообігу за умов попередньої сенсibilізації мозковим антигеном та імунорекції. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2 (34), 228-235. **Google Scholar**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
23. Яременко Л.М., Бідна Л.П., Шепелев С.Є. & Грабовий О.М. (2018). Реакції іbа-1-позитивних клітин мікроглії у сенсомоторній корі головного мозку щурів при індукції транзиторної ішемії. *Світ Медицини та Біології*. 3 (65), 205-210. **Web of Science**. (Особистий внесок здобувача: аналіз літератури, проведення експерименту, проведення ПХ реакцій, кількісна оцінка маркерів, статистичний аналіз, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовка публікації).
24. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Раскалей В.Б. & Запривода Л.П. (2013). *Експресія синаптофізину в гіпокампі після експериментального ішемічного ушкодження головного мозку*. Тези представлені в матеріалах Науково-практична конференція з міжнародною участю «Інтернаціоналізація вищої медичної освіти: науково-методичні засади освіти іноземних громадян у вищих медичних навчальних закладах» та «Жутаєвські читання» (14-15 березня 2013 року, Полтава, Україна). XI, (1–2), 148-149.
25. Яременко Л.М. & Грабовой А.Н. (2013). *Влияние иммунофана на экспрессию синаптофизина в ганглионарном слое сенсомоторной коры при моделировании нарушения мозгового кровообращения у крыс*. Материалы Научно-практической конференции неврологов. XIX Всероссийская конференция «Нейроиммунология. Рассеянный склероз». II Симпозиум «Современные возможности нейровизуализации» материалы. (Санкт-Петербург 23 – 26 мая 2013) *Нейроиммунология*. XI (1–2), 148-149.
26. Булава О.В. & Л.М. Яременко (2013). *Зміни астроцитарної глії при ішемічному ушкодженні головного мозку у щурів за експресією гліального фібрилярного кислого протеїну*. Тези представлені в матеріалах V (67) Міжнародного науково-практичного конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини». *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 4(74). (23-25 жовтня 2013 року м. Київ), 154-155.
27. Яременко Л.М. & Грабовой А.Н. (2013). *Влияние иммунофана на количество GFAP-иммунопозитивных астроцитов в сенсомоторной коре головного мозга крысы при моделировании нарушения мозгового кровообращения у крыс*. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Дегенеративные

- и сосудистые заболевания нервной системы» посвященная 90-летию члена-корреспондента АМН СССР профессора Г.А. Акимова (21-22 ноября 2013 года Санкт-Петербург). *Вестник российской военно-медицинской академии. Санкт-Петербург.* 44 (4), 108-109.
28. Яременко Л.М., Грабовий О.М. & Запривода Л.П. (2013). *Експресія GFAP у гліальних периваскулярних мембранах у кори великих півкуль мозку у щурів при транзиторній ішемії та впливі поліпептидного імуномодулятора.* Збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної конференції «Морфологічні аспекти ангіології» (24-25 жовтня 2013 р Тернопіль.). Укрмедкнига. 2013, 182-183.
29. Яременко Л.М. (2013). *Вплив сенсibiliзації мозковим антигеном на рівень експресії білку S-100 в корі великих півкуль головного мозку у щурів.* Науково-практическа конференція, посвяченна 110-летию со дня рoдження Н.И. Зазыбина «Морфологические основы научных исследований в медицине» Киев, 2013, 137-138.
30. Яременко Л.М., Грабовий О.М. & Запривода Л.П. (2014). *Експресія белков нейрофиламентов в сенсомоторной коре при моделировании транзиторного нарушения мозгового кровообращения у крыс.* Бюллетень медицинских Интернет-конференций (ISSN 2224-6150). 4 (2), 111. (Межрегиональная конференция «Цереброваскулярные заболевания: профилактика и реабилитация». Саратов, 13–14 марта 2014. (<http://medconfer.com/node/3815>; <http://medconfer.com/files/archive/2014-02/2014-02-23-A-3815.pdf>)
31. Пилипенко О.С., Яременко Л.М. & Запривода Л.П. (2014). *Експресія білку нейрофіламентів в корі головного мозку після експериментального ішемічного ушкодження у щурів.* Матеріали УІ (68) міжнародного науково-практичного конгресу студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» 15-17 жовтня 2014 р. м. Київ. *Український науково-медичний молодіжний журнал.* №4(83), 139.
32. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Грабовий О.О. & Козак Г.І. (2015). *Імуногістохімічне виявлення судинного епітеліального ростового фактору в корі великих півкуль головного мозку при порушеннях кровообігу.* Збірник тез доповідей «Морфологічні дослідження – виклики сучасності» Науково-практичної конференції (23–24 квітня 2015 року) Суми, 87 – 89.
33. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Запривода Л.П. & Козак Г.І. (2015). *Влияние иммуномодуляции на экспрессию белка S-100 в сенсомоторной коре крыс при моделировании нарушения церебрального кровообращения.* Актуальні питання анатомії, гістології, ембріології та топографічної анатомії (тези доповідей VI конгресу анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України. 16-18 вересня 2015). Запоріжжя., 107.
34. Яременко Л.М. & Грабовий О.М. (2015). *Експресія білку S-100 в гангліонарному шарі сенсомоторної кори головного мозку у щурів при моделюванні порушень церебрального кровообігу різного ступеня важкості.* Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження

- онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів» присвяченій 75-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В. (30 вересня-1 жовтня 2015), Івано-Франківськ, 74-75.
35. Yaremenko, L.M. & Grabovoy A.N. (2016). *Expression of tau-protein sensorimotor cortex in rats after ischemic attack. Neurology and rehabilitation. International symposium. "Peripheral nerve reconstruction after severe injuries"* (19-21 May 2016. Kyiv, Ukraine), 12-13.
 36. Яременко Л. М., Грабовий О. М., Слічна Г. М., Чухрай С. М. & Слічний І.В. (2016). *Експресія тау-протеїну в сенсомоторній корі великих півкуль головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії та за умов імунокорекції*. Збірник матеріалів Науково-практичної конференції «Прикладні аспекти морфології» (Тернопіль, 20 – 21 жовтня 2016 р.). 210-212..
 37. Яременко Л.М. & Грабовий О.М. (2016). *Експресія білку S-100 у сенсомоторній корі великих півкуль головного мозку при моделюванні транзиторної ішемії та за умов імунокорекції*. Збірник матеріалів Міжнародної Науково-практичної конференції. «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Харків, 25 листопада 2016.). 51-52..
 38. Яременко Л.М., Грабовий О.М. & Шепелєв С.Є. (2017). *Вплив сенсibiliзації мозковим антигеном на експресію синаптофізину в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні ішемії та імунокорекції*. Збірник матеріалів VII Конгресу Українського Товариства нейронаук. (Київ, 7-11 червня 2017 р.),-124.
 39. Яременко Л.М., Грабовий О.М., Запривода Л.П. & Грабовий О.О. (2018) *Порівняльна характеристика змін експресії імуногістохімічних маркерів при ішемії мозку*. Актуальні питання сучасної медицини та фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ) тези доповідей (Запоріжжя 18-25 квітня 2018р, 30 травня 2018р). 30.
 40. Яременко Л.М. & Запривода Л.П. (2018). *Експресія β -тубуліну в сенсомоторній корі великих півкуль при моделюванні транзиторної ішемії на фоні попередньої сенсibiliзації мозковим антигеном та імунокорекція виниклих змін*. Abstracts of 2nd Neurology and Rehabilitation International Symposium: "Neuroregeneration" October 5, 2018. – С. 24-25.
 41. Грабовий О.М., Яременко Л.М. & Іващенко Л.М. (2014 Випуск 38-39) *Методика забарвлення гістологічних зрізів азур II-еозином Реєстр галузевих нововведень*. Реєстр. № 170/38/13, м. Київ.
 42. Грабовий О.М., Яременко Л.М. & Іващенко Л. М. (2011). *Спосіб стандартизованого забарвлення гістологічних зрізів азур II-еозином Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я*. Укрмедпатентінформ, № 274 – 2011, м. Київ.
 43. Грабовий О.М., Яременко Л.М. & Іващенко Л. М. (2013). Патент 80457 Україна, МПК А61В 10/00. Спосіб забарвлення гістологічних препаратів/ заявник й патентовласник Національний інститут раку. – № u201214998; заявл. 27.12.12; опубл. 27.05.13, Бюл. №10.

АНОТАЦІЯ

Яременко Л. М. Зміни у корі півкуль великого мозку за умов моделювання ішемії та імунокорекції (імуногістохімічне дослідження). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.09 – «Гістологія, цитологія, ембріологія» (222 «Медицина»). – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця., Київ, 2019.

За умов порушення кровопостачання головного мозку, в сенсомоторній корі, показано комплекс змін експресії імуногістохімічних маркерів які відображають функціональний стан нейронів та стан їх цитоскелету, а також маркерів, що характеризують стан нейроглії. Вперше проведено кількісну оцінку змін експресії зазначених маркерів, оцінена їх динаміка після транзиторної ішемічної атаки, у тому числі у віддалені строки після порушення кровопостачання головного мозку. Показано, що дифузні зміни викликані ішемічним ушкодженням в сенсомоторній корі трансформуються у повільно прогресуючий нейродегенеративний процес з ознаками нейрозапалення та розвитком астроцитозу. Показано, що одностороннє ішемічне ураження лівої півкулі супроводжується системними реакціями нейроглії, які розповсюджуються і на контрлатеральну півкулю. Показано, що попередня сенсibiliзація мозковим антигеном потенціює зміни експресії імуногістохімічних маркерів, що викликає ішемія, а також модифікує їх динаміку. Імунокорекція змін в сенсомоторній корі за умов ішемії та за умов комплексного імунно-ішемічного ураження в експерименті за оцінкою експресії імуногістохімічних маркерів призводить до зменшення як виразності альтеративних явищ, так і до відносної активізації компенсаторно-відновлювальних процесів у сенсомоторній корі.

Ключові слова: сенсомоторна кора, ішемія, імуногістохімія, імунокорекція.

АННОТАЦИЯ

Яременко Л. М. Изменения в коре полушарий большого мозга в условиях моделирования ишемии и иммунокоррекции (иммуногистохимическое исследование). - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.09 - «Гистология, цитология, эмбриология» (222 «Медицина»). - Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца. Киев, 2019.

Транзиторная ишемическая атака (ТИА) в коре больших полушарий мозга ведет к диффузным нейродегенеративным изменениям, проявляющихся снижением экспрессии *синаптофизина (Syn)* и *сосудистого эндотелиального ростового фактора (VEGF)*. Снижение содержания *Syn* можно рассматривать как один из факторов нарушения синаптической функции, связанной с депонированием медиаторов. Падение экспрессии *VEGF* в нейронах является фактором, свидетельствующем о снижении их общей метаболической активности и резистентности. Восстановление экспрессии *Syn* и *VEGF* полностью не

происходит даже через 3 месяца после ишемической атаки.

ТИА приводит к дезорганизации цитоскелета нейронов, сохранивших жизнеспособность. Это проявляется в остром периоде после ишемической атаки уменьшением экспрессии *нейрофиламентов с низкой молекулярной массой (NF-L)*, *актина (Act)*, β -тубулина (β -*tub*), и ростом - *tau*-белка. Появление в остром периоде в нейропиле меченых *NF-L* гранул и варикозов по ходу нервных волокон свидетельствует о терминальной аутонейротомии и деградации межнейронных связей. *NF-L*⁺ округлые тельца на концах нервных волокон в восстановительный период после ТИА соответствуют конусам роста. Уменьшение количества *Act* и β -*tub* в перикарионах после ТИА отражает снижение интенсивности их синтеза. Падение экспрессии *Act* в гранулах на поверхности тел нейронов и в нейропиле отражает в определенной степени нарушения синаптической пластичности. Значительное накопление *tau* в нейронах после ТИА связано с нарушением метаболизма нейронов и образованием патологических (фосфорильованных) форм этого белка. Изменения экспрессии *NF-L*, *Act*, β -*tub* после ТИА временные и через 30-90 суток практически восстанавливаются до исходного уровня.

Ишемия сенсомоторной коры у крыс активизирует нейроглию и проявляется ростом экспрессии *S100*, увеличением количества и гипертрофией *GFAP*⁺- и *Iba-1*⁺-клеток. Рост экспрессии *S100* и количества клеток *GFAP*⁺-астроглии прогрессирует в течение 3 месяцев после эпизода ишемии. Динамика роста количества *GFAP*⁺-клеток после ТИА имеет два пика через 3 и 90 суток. Это дает основания предполагать, что рост их количества в острый период, обусловлен активацией клеток, которые при нормальных условиях его не экспрессировали. Количество *Iba-1*⁺-микроглии стремительно растет после ТИА, а затем уменьшается, но даже за 3 месяца, остаётся большим, чем в контроле. Реакция глии на одностороннее ишемическое поражение мозга имеет признаки системности и проявляется ростом экспрессии *S100*, увеличением количества *GFAP*⁺- и *Iba-1*⁺ клеток в контралатеральном полушарии.

Действие иммунофана при ТИА приводит к уменьшению альтеративных изменений и астроглиоза. Под его влиянием экспрессия *Syn* оказывается относительно сохраненной. Выразительный рост в этих условиях количества *VEGF* в нейронах является фактором, способствующим повышению их устойчивости к вторичным повреждающим факторам. Повышение экспрессии *NF*, *Act* и β -*tub* при воздействии иммунофана свидетельствует о большей сохранности цитоскелета нейронов в острый период после ТИА, а в дальнейшем - об относительном усилении синтеза этих белков и активации восстановления межнейронных связей. Уменьшение накопления *tau* после ишемической атаки в условиях действия иммунофана свидетельствует о менее значительном нарушении метаболических процессов в нейронах и об уменьшении интенсивности действия факторов, способствующих нейродегенеративному процессу в отдаленные сроки после ишемии. Уменьшение экспрессии *S100* и менее значительный рост количества *GFAP*⁺-астроцитов после ишемии под влиянием иммунофана является показателем уменьшения отдаленных изменений клеточного состава сенсомоторной коры. Иммунофан модифицируя реакции *Iba-1*⁺-микроглии,

приводит к более значительному росту их количества в острый период после ишемии, и уменьшает их количество в восстановительный.

Сенсибилизация мозговым антигеном (СМА) ведет у крыс к развитию аутоиммунного энцефалита и характеризуется умеренными изменениями большинства исследованных маркеров, отражающих альтеративные явления. На этом фоне в сенсомоторной коре отмечалось относительно отчетливое уменьшение экспрессии *VEGF* и накопления *tau*.

СМА предшествующая эмболии микрососудов левого полушария мозга потенцировала нейродегенеративные явления в сенсомоторной коре и задерживала восстановительно-компенсаторные процессы. В целом, при иммунно-ишемическом поражении уменьшение экспрессии маркеров, отражающих состояние нейронов и их цитоскелета, было на 1/3 больше, чем при одной ишемии. СМА меняла динамику реакции глии на ишемию. Росло количества *GFAP*⁺-клеток, достигавшее максимума в конце острого периода после ТИА, и хотя в дальнейшем уменьшалась, даже за 3 месяца наблюдений оказывалась больше, чем после микроэмболии. Сенсибилизация усиливала и ускоряла реакцию микроглии на ишемию и фактически обеспечивала сохранение такого высокого количества *Iba-1*⁺-клеток в течение месяца наблюдений. Не один из исследованных ИГХ маркеров при иммунно-ишемическом поражении мозга не возвращался за 3 месяца наблюдений к показателям, присущих контролю.

Иммунофан при иммунно-ишемическом поражении мозга существенно уменьшал изменения исследованных маркеров, приближая их динамику той, что наблюдалась при иммунокоррекции при ТИА. В конце эксперимента (по 102 (90) суток) при сочетании иммунного и ишемического поражения под влиянием иммунофана возвращались к контрольным значениям (достоверно не отличались) маркеры, которые отражали функциональные свойства нейронов (*Syn* и *VEGF*), исследованные компоненты цитоскелета нейронов, кроме *tau* (оставался увеличенным более 2,5 раза). Маркеры, связанные с состоянием глии, демонстрировали развитие астроцитоза (увеличение экспрессии *S100* и количества *GFAP*⁺-клеток) и сохранение умеренных явлений нейровоспаления (увеличение количества *Iba-1*⁺-клеток).

Изменения экспрессии исследуемых ИГХ маркеров при ТИА и при отсутствии очагов некроза свидетельствуют о возникновении значимых нейродегенеративных изменений и реакции со стороны глии, которые трансформируются в длительный медленно прогрессирующий процесс, приводящий к уменьшению количества нейронов и снижению их функциональных потенциалов, развитию астроцитоза и длительному сохранению признаков нейровоспаления. Реакции глии на травму, как при ишемическом, так и при иммунно-ишемическом повреждении, носят определенные признаки генерализации и наблюдаются в участках мозга, которые непосредственно не подверглись ишемии. Ишемическое поражение мозга сопровождается определенными иммунными изменениями, коррекция которых в эксперименте приводит к уменьшению в нем альтеративных явлений и активизации компенсаторно-восстановительных процессов.

Ключевые слова: сенсомоторная кора, ишемия, иммуногистохимия, иммунокоррекция.

SUMMARY

Yaremenko L.M. Changes in the cortex of the cerebral hemispheres under conditions of modeling of ischemia and immunocorrection (immunohistochemical study). - Manuscript.

Thesis for a doctor's degree by specialty 14.03.09 - "Histology, cytology, embryology" (222 "Medicine"). National O.Bogomolets Medical University. The defense of the dissertation will be held at the National O. Bogomolets Medical University, Kyiv, 2019.

In conditions of cerebrovascular damage, in the sensorimotor cortex, a complex changes in the immunohistochemical markers expression has been shown. It reflect the functional status of neurons or and the state of their cytoskeleton, and it her the state of neuroglia markers. For the first time a quantitative estimate of changes in the expression of these markers, their dynamics after transient ischemic attack, including in the long term after the violation of blood supply to the brain it has been estimated. It shown that diffuse changes caused by ischemic damage in sensorimotor cortex are transformed into slowly progressing neurodegenerative process with signs of neuroinflammation and development of astrocytosis. It shown that ischemic lesion of the left hemisphere is accompanied by systemic reactions of neuroglia, which extends to the contralateral hemisphere. It is has been shown that previous sensitization by brain antigen potentiates changes in the expression of immunohistochemical markers that causes ischemia, as well as modifies their dynamics. Immunocorrection of changes in the sensorimotor cortex under conditions of ischemia and in the context of a complex immune-vascular lesion in an experiment evaluated by the expression of immunohistochemical markers leads to a decrease in both the severity of the altered phenomena and the relative activation of the compensatory-recovery processes in the sensorimotor cortex.

Keywords: sensorimotor cortex, ischemia, immunohistochemistry, immunocorrection.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Act - актин

GFAP – гліальний фібрилярний кислий протеїн

Iba-1 - іонізований кальцій зв'язуючий адаптер молекули 1

NF – нейрофіламенти

NF-L – нейрофіламенти легкі

S100 – білок S100

Syn – синаптофізин

tau – тау-білок

VEGF– судинний ендотеліальний фактор росту

β -tub – β -тубулін

ІГХ – імуногістохімія (імуногістохімічний)

К – щури контрольної групи

Кс – щури контрольної групи сенсibilізовані мозковим антигеном

МЕА – мікроемболія адипоцитами

МЕАс – щури, яким виконана МЕА після попередньої сенсibilізації

МЕА+і – щури з МЕА, які отримували імунофан

МЕАс+і – щури з МЕАс, які отримували імунофан

ПО – щури, яким виконана псевдооперація

ПСА – щури, яким виконана перев'язування лівої загальної сонної артерії

СМА – середня мозкова артерія

ТІА – транзиторна ішемічна атака