

Міністерство охорони здоров'я України
Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Костенко Володимир Васильович

УДК 616.8-009.1-092-07

ДИСЕРТАЦІЯ

Особливості диференціальної діагностики, перебігу та визначення важливості немоторних симптомів при хворобі рухового нейрона

Спеціальність 222 — Медицина
(спеціалізація 14.01.15 — Нервові хвороби)

Галузь знань 22 — Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей та результатів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ В. В. Костенко

Науковий керівник: Головченко Юрій Іванович, доктор медичних наук,
професор, завідувач кафедри неврології № 1 Національний університет
охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Костенко В.В. «Особливості диференціальної діагностики, перебігу та визначення важливості немоторних симптомів при хворобі рухового нейрона.» — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 Охорона здоров'я за спеціальністю 222 Медицина (спеціалізація «Нервові хвороби» 14.01.15).- «Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика» Київ, 2021.

Дисертаційну роботу присвячено складним питанням диференціальної діагностики, систематизації та науковому опису немоторних симптомів, а також комплексної ролі клітин мікрооточення мотонейронів в перебігу хвороби рухового нейрона (ХРН).

Велике соціальне значення останніми роками набувають нейродегенеративні захворювання до яких зараховують і ХРН.

З огляду на той факт, що ХРН і інші нейродегенеративні захворювання частіше зустрічаються у людей середнього та похилого віку, а також беручи до уваги світову тенденцію до збільшення тривалості життя людини ця проблема стає вкрай актуальною для неврологів, лікарів суміжних спеціальностей, та звичайно для нашої системи охорони здоров'я в цілому.

Також, на жаль, в більшості випадків перші симптоми ХРН досить неспецифічні, тому часто лишаються поза увагою фахівців, наслідком чого є пізня діагностика цього фатального захворювання.

Хвороба рухового нейрона (бічній аміотрофічний склероз (БАС), хвороба Шарко, або хвороба Лу Геріга) — одне з найвідоміших дегенеративних захворювань мотонейронів. При цьому уражаються як верхні так і нижні мотонейрони з нерівномірним їх залученням до патологічного процесу. Дистрофічні зміни виявляються в α -мотонейронах передніх рогів

спинного мозку, волокнах пірамідного шляху, ядрах V, VII і X—XII черепно-мозкових нервів та в моторній корі. Цікавим видається той факт, що певні групи мотонейронів не піддаються нейродегенеративному процесу при БАС, до них можна зарахувати: ядра окорухового (III), блокового (IV) і відвідного (VI) черепно-мозкових нервів, що іннервують екстраокулярні м'язи, а також ядро Онуфа, розташоване в крижовому відділі (S2—S4) спинного мозку. Вони іннервують м'язи, що мають унікальний спектр важких ланцюгів міозину, включаючи ембріональні і неонатальні ізоформи, стійкі до дегенерації [1].

Прогресування нейродегенерації частини центральних і периферійних мотонейронів при ХРН призводить до появи кардинального симптомокомплексу хвороби: м'язової слабкості, яка наростає, розвитку асиметричних дистальних атрофії, фасцикуляцій в різних групах м'язів, іноді при локалізації первинного патологічного процесу в довгастому мозку спочатку розвиваються бульбарні і псевдобульбарні симптоми.

За оцінками дослідників, середня тривалість життя після встановлення діагнозу БАС коливається від 20 до 48 місяців. Бульбарний дебют та похилий вік є несприятливими прогностичними чинниками [2].

Хвороба мотонейронів в даний час є однією з найскладніших проблем в неврології.

Це фатальне захворювання призводить до того, що пацієнт поступово втрачає можливість пересуватися, спілкуватися, приймати їжу і врешті дихати.

Нерідко після встановлення діагнозу ХРН у пацієнтів можуть розвинутися генералізований тривожний розлад, тривожно-депресивний стан, загальна слабкість, вони також втрачають вагу [3].

Якщо протягом ХХ століття панувала теорія селективного ураження рухових нейронів при ХРН, то нині ця концепція значно розширилася. Сучасні дані свідчать про те, що патоморфологічні зміни при ХРН зачіпають

не тільки центральну нервову систему (ЦНС), а й деякі екстраневральні органи.

Новітні методики мікроскопії та нейровізуалізації дають змогу дослідникам отримати уявлення про природу захворювання на клітинному і субклітинному мікрорівнях. Було показано, що на МРТ (ЗТ) у пацієнтів з ХРН з різними дебютами виявляють атрофії не лише в ділянці первинної моторної кори, але в префронтальній корі, у лобній і скроневій, мозочку, а також у базальних гангліях [4].

Численні факти вказують на мультисистемний і полікаузативний характер даного захворювання. Наприклад, гістологічні зміни шкіри при ХРН виражаються в атрофії епідермісу, також характерним є потовщення стінок дрібних судин (незапальна васкулопатія) та зменшення діаметра колагенових пучків [5].

Нещодавно встановлено, що 75 % пацієнтів з ХРН мають жирову дистрофію печінки, за даними ультразвукового дослідження, що підкреслює полісистемний характер цього важкого захворювання [6].

Результати міжнародних досліджень свідчать про те, що немоторні симптоми досить часто зустрічаються у пацієнтів з ХРН, за різними джерелами від 5 до 80 % випадків. До них належать тривожно-депресивні розлади, психовегетативні розлади, шлунково-кишкові порушення, серцево-судинні захворювання, порушення сну [7].

Логічним поясненням цих численних симптомів може бути відносно нещодавно описана гіпотеза “поширення нейродегенеративних захворювань”, суть якої полягає в тому, що спочатку уражені нейрони можуть поширювати різні протеїнові агрегати уздовж аксонів на сусідні ділянки головного мозку, включаючи немоторні ділянки [8, 9].

Зарубіжні дослідження на тему немоторних симптомів при ХРН нечисленні, зазвичай з вибірками невеликого розміру. Необхідні подальші

зусилля вчених для вивчення механізмів розвитку, своєчасного виявлення та комплексного лікування немоторних симптомів. В Україні досліджень на цю тему не проводилося.

Мета дослідження — встановити структуру і вираженість немоторних симптомів на ранніх стадіях хвороби рухового нейрона у пацієнтів з урахуванням гендерних чинників; ідентифікувати та проаналізувати патологічні зміни компонентів нейроваскулярної одиниці в центральній нервовій системі у пацієнтів з хворобою рухового нейрона.

Завдання дослідження

1. Дослідити поширеність немоторних симптомів у пацієнтів з ХРН порівняно з контрольною групою осіб без нейродегенеративних захворювань.
2. Вивчити характер та структуру особливостей немоторних виявів при ХРН.
3. Проаналізувати особливості больового синдрому при ХРН та його кореляційний зв'язок з прогресуванням хвороби.
4. Дослідити порушення проникності гематоенцефалічного бар'єра, що можливо сприяє прискоренню дегенерації мотонейронів.
5. Уточнити гістологічний поліморфізм ХРН.

Для здійснення завдань дослідження виконано ретельне обстеження 52 хворих на ХРН (22 жінки та 30 чоловіків, вік у середньому становив $(56,7 \pm 11,3)$ року, які утворили основну групу. До контрольної групи залучено 44 особи (15 жінок і 29 чоловіків) без нейродегенеративних захворювань (вік у середньому — $(59,7 \pm 12,4)$ року. Групи були порівнянні за співвідношенням статей та віком.

Було застосовано неврологічне комплексне обстеження, формалізовані шкали: шкала немоторних симптомів (ШНС), візуально-аналогова шкала

(ВАШ), розширена шкала оцінки функціонування хворих на ХРН (ALSFRS-R) — для аналізу тяжкості моторних симптомів та моніторингу прогресування хвороби, діагностичні методи такі як електронейроміографія та магнітно-резонансна томографія спинного і головного мозку, які використовували у процесі диференціальної діагностики з іншими нервово м'язовими розладами. Метод фарбування вільно плаваючих зрізів — авідин-біотиновий комплекс (АБК, *англ.* ABC).

Наше анкетування за допомогою ШНС виявило, що серед немоторних симптомів ХРН переважають шлунково-кишкові розлади. Загалом в основній групі виявлено 30 немоторних симптомів. Загальний показник за ШНС був статистично значуще вищим при ХРН: 3—16 балів (у середньому — $(7,4 \pm 3,5)$ бала) в основній групі та 0—14 балів (у середньому — $(5,4 \pm 2,7)$ бала) – у контрольній. В основній групі трьома найпоширенішими симптомами були втрата маси тіла — 39 (75,0 %), біль — 32 (61,5 %), та пітливість — 29 (55,8 %), у контрольній відповідно порушення статевого потягу — 29 (65,9 %), біль і денна сонливість — 17 (38,6 %) та занепокоєння і безсоння — 16 (36,4 %). В процесі дослідження було показано, що пацієнти із ХРН статистично частіше, ніж особи з контрольної групи, мали такі симптоми: втрата маси тіла, пітливість, біль, падіння.

Під час порівняльного дослідження вікових особливостей виявлено що у пацієнтів контрольної групи, віком понад 60 років, удвічі рідше ніж у хворих, спостерігали випадки падіння ($p = 0,02$) та проблеми із сексуальним потягом ($p = 0,04$).

У пацієнтів з ХРН не виявлено статистично значущої різниці між чоловіками та жінками щодо вираженості немоторних симптомів.

На користь мультисистемного характеру ХРН свідчить наявність немоторних симптомів. Вже на доклінічній і досить ранніх стадіях хвороби пацієнти відзначали появу гіпергідрозу і втрату маси тіла.

Виявлені в нашій популяції ранні немоторні симптоми такі як втрата ваги, гіпергідроз падіння в цілому можуть служити вагомими додатковими діагностичними критеріями ХРН.

При аналізі показників болю за шкалою ВАШ у 69 % пацієнтів відзначалися різного ступеня інтенсивності больові відчуття. Наявність болю у пацієнтів не залежало від статі і становило у жінок 71 % (15/6) та у чоловіків 68 % (19/9) випадків. Середній вік пацієнтів із больовим синдромом був $(54,9 \pm 10,8)$ року, цей показник не відрізнявся від середнього віку пацієнтів, які не відчували болісних відчуттів ($(60,9 \pm 12,1)$ року). Середнє значення функціональної шкали оцінки прогресування захворювання (ALSFRS-R) у пацієнтів із больовим синдромом $(36,5 \pm 4,9)$ бала, без болю – $(40,4 \pm 4,4)$ бала, що різняться на статистично значущому рівні ($p = 0,01$). Пацієнти вказували на появу болю в поперековому відділі, тулубі, нижніх кінцівках, плечовому поясі, верхніх кінцівках, у шиї та голові.

Найбільш часто у пацієнтів із ХРН біль локалізувався в верхніх кінцівках $(38,0 \pm 16,3)$ %, нижніх кінцівках $(27,0 \pm 14,8)$ %, а також в поперековій ділянці $(15,0 \pm 11,9)$ %.

Пацієнти вказували на наявність ниючого болю (32 %), тягнучого болю (29 %), смикаючого (18 %), пекучого (12 %). Стискаючий, колючий, та пульсуючий характер болю відмічали поодинокі пацієнти (3 %).

Наявність больового відчуття та інтенсивність болю не були пов'язані з терміном захворювання, на відміну від оцінки функціонування за шкалою ALSFRS-R. Так у разі 1—2-річної тривалості ХРН оцінка за шкалою ALSFRS-R була статистично значущо вищою ($U = 169,5; p = 0,02$), ніж у разі тривалості хвороби 3—4 роки $(40,0 (34,8—43,0)$ та $37,0 (31,0—39,0)$ відповідно).

Тип дебюту ХРН статистично значущо корелював із наявністю больового синдрому ($\chi^2 = 17,5, v = 0,59, p = 0,001$). Найчастіше біль відчували пацієнти з шийним дебютом 20 з 49 $(41 \pm 13,8 \%)$, а при поперековому дебюті

біль виявлявся у 12 із 49 ($25 \pm 12,0$ %). Вкрай рідко больовий синдром був відзначений при бульбарному дебюті ХРН 2 з 49 ($4 \pm 5,5$ %), У пацієнтів з шийним дебютом ризик появи болю в 1,5 рази вище ($\chi^2 = 4,3$, $\phi = 0,3$, $p = 0,04$; $VR = 1,49$, 95 % ДІ 1,01 — 2,20).

Наші дані свідчать про високу частоту больового синдрому при ХРН, що узгоджується з даними інших дослідників. Частота цього симптому не залежить від статі та віку пацієнтів, проте його наявність корелює зі швидшим порівняно з хворими, які не відчують болю, прогресуванням характерних моторних симптомів хвороби.

В результаті проведеного дослідження встановлено значне порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру при ХРН, на що вказує дисфункція елементів нейроваскулярної одиниці, насамперед мікросудин, астроцитів та полідендроцитів, що може бути однією з важливих ланок патогенезу ХРН, яка призводить до дегенерації рухового нейрона. В автопсійному матеріалі первинної моторної кори (ПМК) осіб з ХРН середня щільність NuR-позитивних мотонейронів значно варіювала між різними пацієнтами та становила від 65 до 255 кл./мм², у середньому 173 кл./мм². Аналіз умісту NuR-позитивних нейронів засвідчив статистично значуще ($p < 0,05$) збільшення їхньої кількості у пацієнтів з мутаціями C9orf72/SOD1 порівняно з пацієнтами без мутацій (у середньому 225 та 155 кл./мм² відповідно. У різних пацієнтів виявлено значний гістологічний поліморфізм від легкого астрогліозу, виїнятково в білій речовині рухової кори до вираженого дифузного астрогліоза у сірій речовині ПМК.

ANNOTATION

Volodymyr Kostenko

**Motor neuron disease: the course of the disease,
features of differential diagnosis and determination
of the importance of non-motor symptoms**

Qualifying scientific work on the rights of manuscripts is for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge «Healthcare» in the specialty «Medicine» 222 (scientific specialty «Neurology» № 14.01.15) – «The Shupyk National Healthcare University of Ukraine» Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to complex issues of differential diagnosis, systematization, and scientific description of non — motor symptoms, as well as the complex role of cells of the microenvironment of motoneurons during ALS course.

Motor neuron disease (MND) or Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), or Lou Gehrig's disease is one of the most well-known neurodegenerative disease of motoneurons.

Disease affects both the upper and lower motor neurons with their uneven involvement of different parts of the body.

Dystrophic changes appear in α -motor neurons of the anterior horns of the spinal cord, fibers of the pyramidal tracts, nuclei of the V, VII, and X-XII cranial nerves and motor cortex. Some groups of motor neurons subtypes are resistant to degeneration in MND, for example: the nucleus of oculomotor nerve (III), trochlear nerve (IV), abducens nerve (VI) together they control oculomotor muscles (6 extraocular muscles, direction of the gaze and size of pupils) also the Onuf's nucleus, located in the sacral spinal cord (S2-S4 segments).

These motoneurons innervate muscles with special myosin heavy chains, including fetal and neonatal isoforms are resistant to degeneration. [1]

Progressive neurodegeneration of the central and peripheral motoneurons leads to cardinal symptoms of the disease: gradual muscle weakness, asymmetric distal atrophy, fasciculations in different muscle groups, sometimes difficulties chewing, poor articulation and swallowing. In some cases, patients experience uncontrollable crying or laughing (pseudobulbar affect).

According to researchers, the average life expectancy after the diagnosis of NMD ranges from 20 to 48 months. The onset of Bulbar symptoms and old age are unfavorable prognostic factors [2].

Motoneuron disease is currently one of the most difficult fields in Neurology. This frightening disease causes immobility, communication problems, difficulty in eating and breathing.

Often, ALS patients may develop generalized anxiety disorder, depression, general weakness, and weight loss [3].

During twentieth century, the theory of selective damage of motor neurons, was accepted, but now, this concept has been significantly enhanced. Current data indicates, that pathomorphological changes in ALS, affect not only the central nervous system, but also, some extraneural organs.

The latest microscopy and neuroimaging techniques, allow researchers to get an idea of the nature of the disease, at the cellular and microcellular, levels. MRI (3T) techniques have been shown that atrophy occurs, not only in the primary motor cortex, but also in the prefrontal cortex, frontal and temporal cortex, cerebellum, and basal ganglia in patients, with ALS with different clinical phenotypes [4].

Overwhelming evidence indicates, the multisystem and polycasative nature, of this fatal disease. For example, histological changes in the skin, characterized by the thickening of the walls, of small vessels (non-inflammatory vasculopathy), decrease in the diameter of collagen bundles, and epidermis atrophy [5].

More recently, it was found that in ultrasound scans, 75 % of patients with MND had fatty liver disease, which emphasizes the polysystemic nature, of this serious disease [6].

The results of international studies, indicate that non-motor related symptoms are quite common in patients with ALS, according to various sources from 5 to 80 % of cases. These include anxiety, depression, the symptoms of autonomic dysfunction, gastrointestinal disorders, cardiovascular disease, and sleep disorders [7].

The logical explanation for these numerous, varying symptoms were recently discovered as a hypothesis, “of the spread of neurodegenerative process,” the essence of which is that initially affected motor neurons can spread the disease, via various protein aggregates, along axons to neighboring areas of the brain, including non-motor areas [8-9].

Few studies on non-motor symptoms were available in ALS.

Further efforts of scientists are needed to study the mechanisms of development, timely detection, and comprehensive treatment of non-motor symptoms. No research on this topic has been conducted in Ukraine.

The aim of our study was to establish the presence and severity of non-motor symptoms in the early stages of motoneuron disease in patients, taking into consideration, the gender of the patient.

Study of neurovascular component parts, to identify possible adverse effects on motoneurons.

Motivation

A better understanding of glia, which are the supporting cells, surrounding the motoneurons, may lead to more effective therapies.

Objective

1. To investigate the prevalence of non-motor symptoms in patients with Motor neuron disease in comparison with the control group of persons without neurodegenerative disorders.
2. To study the nature and structure of features of nonmotor manifestations in Motor Neuron Disease.
3. To analyze the features of the pain syndrome in MND and the correlation of pain syndrome with disease progression.
4. Investigate the possible damage of the blood-brain barrier, which accelerates the degeneration of motoneurons.
5. Characterize the astrocytes, microglia, oligodendrocytes and NG2 cells in primary motor cortex, harvested from recently deceased MND patients.

Method

We examined 52 patients, 22 women and 30 men (mean age of 56.7 ± 11.3 years) with MND.

A comparable control group of 44 people (15 women and 29 men) mean age of 59.7 ± 12.4 was similarly interviewed.

12 MND patients consented to rapid autopsy program.

Workup: CBC, MRI spine and brain, EMG.

Physical examination for core symptoms of disease: the presence of muscles weakness, spasticity, fasciculations, muscles atrophy, hyperreflexia, pathological reflexes Hoffmann's, Babinski reflexes. Bulbar and Pseudobulbar symptoms (tongue atrophy, dysarthria, dysphonia, dysphagia, exaggerated gag reflex or the absence of gag reflex, uncontrollable outbursts of crying or laughing.

Non-motor symptoms scale (NMSS).

The visual analog scale (VAS) for pain measurement.

ALS- Rating Scale (ALSFRS-R) was used as a tool for evaluating disease progression and functional status of our patients.

The avidin-biotin complex (ABC) method for staining, to reveal free-floating brain and spinal cord sections.

Results

We found that gastrointestinal disorders are common among non-motor symptoms of ALS patients. A total of 30 non-motor symptoms were detected in the main group. The overall rate of NMSS was statistically higher in MND: 3 — 16 points (average — 7.4 ± 3.5 points) in the main group and 0 — 14 points (average — 5.4 ± 2.7) points) — in the control. In the main group, the three most common symptoms were weight loss — 39 (75.0 %), pain -32 (61.5 %), and sweating — 29 (55.8 %), in the control groups, respectively, sexual dysfunction — 29 (65, 9 %), pain and daytime sleepiness — 17 (38.6 %) and anxiety and insomnia — 16 (36.4 %).

The study showed that patients with motor neuron disease were statistically more likely to have the following symptoms: weight loss, sweating, pain, falls, than those in the control group.

During a comparative study of age, it was found that patients with ALS who were over 60 years of age, were twice as often to exhibit, cases of falls ($\chi^2 = 5.54$; $p = 0.02$) and problems with sexual desire ($\chi^2 = 4, 04$; $p = 0.04$), compared to the control group.

There were no statistically significant differences between men and women in the severity of non-motor symptoms in patients with MND.

The presence of non-motor symptoms testifies in favor of the multisystemic and heterogeneous nature of MND.

We found pain syndrome in 69 % of patients with MND, the intensity of the pain, varied extensively. The pain did not vary by gender. 71 % (15/6) women and 68 % (19/9) in men noted the pain syndrome. The mean age of patients with pain was 54.9 ± 10.8 , this data did not differ from the mean age of patients who did not experience pain (60.9 ± 12.1). The average (ALSFRS-R) score patients with pain was (36.5 ± 4.9) and patients without pain 40.4 ± 4.4 , was statistically significant ($p = 0.01$).

Most often in patients with MND the pain was localized in the upper extremities 38 ± 16.3 %, lower extremities 27 ± 14.8 %, as well as in the lumbar region 15 ± 11.9 %.

Debut of NMD phenotype was statistically correlated with the presence of pain ($\chi^2 = 17.5$, $v = 0.59$, $p = 0.001$). Most often, patients with cervical onset experienced pain, 20 out of 49 (41 ± 13.8 %), and in lumbar onset, the pain was detected in 12 of 49 (25 ± 12.0 %). It was extremely rare, that the pain syndrome was noted at the bulbar debut of MND, 2 out of 49 (4 ± 5.5 %). In patients with cervical onset, the risk of pain was 1.5 times higher ($\chi^2 = 4.3$, $\phi = 0.3$, $p = 0.04$; BP = 1.49, 95 % ДИ 1.01 — 2.20).

Six patients were diagnosed with sporadic MND after genetic testing and negative family history. MND-related mutations were detected in six patients. Expansion at the C9orf 72 locus was identified in 2 patients, and mutations in the SOD1 gene were detected in four.

Our studies show that MND at the clinical and histopathological levels is a heterogeneous disease. Damage to the “neurovascular unit” and could be one of the crucial factors, in the pathogenesis, which leads to degeneration of the motor neuron.

Astrocyte and vascular pathology are key factors, in the breakdown of the blood-brain barrier.

Conclusions

We hypothesize that

- Possible non-motor symptoms may contribute to the nature of this complex disease
- Damage to the neurovascular unit might be one of the primary events that leads to the motor neuron degeneration.
- Astrocyte and vascular pathology are key factors in Blood Brain Barrier impairment.

We have demonstrated

- Digestive disorders are dominant non-motor symptoms of ALS.
- Patients with motoneuron disease were statistically more likely to have symptoms such as pain, weight loss, sweating, falls, swallowing problems, than individuals without neurodegenerative diseases.
- Testing patients with Non- Motor Symptoms Questionnaire, will allow neurologists to detect non-motor disorders, in the early stages, of this difficult to diagnose and treat disease.
- During the analysis of age correlation, it was found that in patients of the control group, who were over 60 years of age, patients fell half as often, than in patients with ALS.
- The pain is most often localized in the upper and lower extremities, as well as in the lumbar region.
- We noted that in patients with bulbar onset, pain symptoms, were extremely rare.

We found in MND patients

Hypertrophic/reactive morphology of astrocyte (GFAP),

Blood brain barrier disruption

- Capillary leakage,
- Perivascular fibrin colocalizing with reactive astrocytes, but not with microglia
- Increased microvascular density in ALS IMC Gray Matter.
- Significant increase found in the number of NG2 cells in layer V as compared to layer 3 motor cortex

Clustering

- Two types of abnormal clustering patterns
- Clustering occurs in > 91 % patients
- Clustering astrocytes do not directly associate with neurons

Diffuse astrogliosis & degenerating astrocytes in subcortical white matter specific to mSOD1 and abnormal spheroid-shaped astrocytes in gray matter

The relationship between NG2 cells and astrocytes:

Both are reactive in the same tissue sections, but they are reactive in different cortical layers (V vs III) both are responding as an overall “glial reactivity” in ALS?

Future Goals

1. MRI analysis:co-localing posmortem MRI data with postmortem pathology
2. Quatitative analysis of astrocytes density, microglia density.

3. Correlation between astrogliosis, hypervascularity and clinical manifestations.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

1. Володимир Костенко, Юрій Головченко. Важливість немоторних симптомів у клінічній картині хвороби рухового нейрона. Український неврологічний журнал. 2020. № 3. С. 33.
2. Володимир Костенко. Характеристика больового синдрому при хворобі рухового нейрона. Міжнародний неврологічний журнал. Том 16, № 2, 28.02.2020 DOI: 10.22141/2224-0713.16.2.2020.200963
3. Jacqueline Chen, PhD, Volodymyr Kostenko, MD, Erik P. Pioro, MD, PhD, Bruce D. Trapp, PhD Magnetic Resonance Imaging-Based Estimation of Upper Motor Neuron Density in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis – a Feasibility Study. Radiology 2018 Jun;287(3):955-964.doi:10.1148/radiol.2018162967. Epub 2018 Jan 23
4. Jacqueline Chen, Volodymyr Kostenko, Erik Pioro, Bruce Trapp. Myelin density in the primary motor cortex is related to the density of associated lower motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Investigative Medicine Volume 66, Issue 4. P.865-866 5 April 2018 10.1136/jim-2018-000745.150
5. Cardona A., Pioro EP, Sasse M., Kostenko V., et al. “Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor.” NATURE NEUROSCIENCE volume 9 number 7 July doi:10.1038/nn1715

**Наукові роботи, що доповнюють
основну тему дисертації**

6. Ella G Frolova, Judith Drazba, Irene Krukovets, Volodymyr Kostenko et al. Control of organization and function of muscle and tendon by thrombospondin-4. *Matrix Biol.* 2014 Jul;37:35-48. doi: 10.1016/j.matbio.2014.02.003. Epub 2014 Mar 1
7. Volodymyr Kostenko, Jialin Zhang, E. P. Pioro. Slow Wallerian degeneration gene rescues the wobbler mouse ALS phenotype. *R-AMA Journal*, 2004 volume 1:20-21
8. Erik P. Pioro, Volodymyr Kostenko, Kepeng Che, and Supriya Mahajan. Vps54 Mutation in Wobbler Mouse Motor Neuron Disease Causes TDP-43 Mislocalization and Pathology. October 12, (2009). *Annals of Neurology*, 66(S1), doi:10.1002/ana.21857
9. Volodymyr Kostenko, J. Meinert, A. Rae-Grant, A. Viguera. Menopause knowledge among women with multiple sclerosis and major depression. The Cleveland Clinic Foundation's 30th Annual Research Day, Lerner Research Institute, October 12, 2010
10. Volodymyr Kostenko, E. P. Pioro, B.D. Trapp, J. Chen. Glial cell abnormalities in sporadic and familial ALS with SOD1 mutation. The Cleveland Clinic Foundation's Annual Research Day, Lerner Research Institute, Department of Neurosciences and Department of Neurology October 22, 2015
- J. Chen, V. Kostenko, E. P. Pioro, B.D. Trapp. The underlying pathology associated with abnormal brain magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. The Cleveland Clinic Foundation's Annual Research Day, Lerner Research Institute, Department of Neurosciences and Neuromuscular center October 25, 2016

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень

Вступ

Розділ 1. Сучасні погляди на етіологію, диференціальну діагностику, патогенез та перебіг хвороби рухового нейрона (огляд літератури)

Розділ 2. Методи і матеріали

2.1. Дизайн дослідження

2.2. Застосування імуногістохімічних методів

у диференціальній діагностиці хвороби рухового нейрона

2.2.1. Підготовка тканин головного та спинного мозку

2.2.2. Методика імуногістохімічного фарбування

вільно-плаваючих зрізів головного мозку за допомогою
авідин-біотинового комплексу

2.2.3. Стереологічний підрахунок мотонейронів

2.3. Методи статистичних досліджень

Розділ 3. Немоторні симптоми при хворобі рухового нейрона

3.1. Особливості виявів немоторних симптомів

в доменах ШНС

3.2. Вікові особливості немоторних симптомів

Розділ 4. Особливості больового синдрому при хворобі рухового нейрона

Розділ 5. Гістологічна картина патологічних змін компонентів
нейроваскулярної одиниці при хворобі рухового нейрона

- 5.1. Сучасні уявлення про нейроваскулярну одиницю
- 5.2. Дегенерація рухових нейронів спинного мозку
- 5.3. Білок Glut -1
- 5.4. Зміни мікросудинної мережі
- 5.5. Роль клітин мікрооточення мотонейронів
в перебігу хворобі рухового нейрона
 - 1. Дисфункція олігодендроцитів в моторній зоні
кори головного мозку
 - 2. Полідендроцити (NG2-клітини)
 - 3. Астроцити:
 - (А)-Класифікація астроцитів
 - (Б)-Кластери реактивних астроцитів
 - (В)-Астрогліоз у білій речовині
- 5.6. Екстравазація фібриногена
- 5.7. Мікроглія

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АБК	авідин-біотиновий комплекс
БАС	бічний аміотрофічний склероз
ВАШ	візуально аналогова шкала (<i>анг.</i> VAS)
ВР	відносний ризик
ГЕБ	гематоенцефалічний бар'єр
ЕНМГ	електронеуроміографія
ЖЄЛ	життєва ємність легенів
МРТ	магнітно-резонансна томографія
НВО	нейроваскулярна одиниця
НФ	нейрофіламенти
ПБП	прогресивний бульбарний параліч
ПБС	первинний бічний склероз
ПМА	прогресивна м'язова атрофія
ПМК	первинна моторна кора
СЗР	синдром звисаючої руки
ХРН	хвороба рухового нейрона
ЦНС	центральна нервова система
ALSFRS-R	розширена шкала оцінки функціонування хворих на ХРН (Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale)
IQR	міжквартильний інтервал
PLP	протеоліпідний білок (proteolipid protein)
p	рівень значущості

Особливості диференціальної діагностики, перебігу та визначення важливості немоторних симптомів при хворобі рухового нейрона

ВСТУП

Актуальність теми

Хвороба рухового нейрона належить до фатальних, дегенеративних захворювань ЦНС, що неухильно прогресує і характеризується специфічним змішаним ураженням периферійних і центральних рухових нейронів. Імуногістохімічні методи виявляють патологічні зміни мотонейронів, а також нейроглії в основному на рівні первинної моторної кори, мозкового стовбура, шийного і поперекового потовщень спинного мозку [1].

На початку ХХ століття відомий російський невропатолог М. І. Аствацатуров писав щодо бічного аміотрофічного склерозу (БАС) — «хвороба спричиняє досить тяжкі страждання, дуже рано призводить до повної інвалідності...». На жаль, з того часу мало що змінилося в прогнозах щодо тривалості життя та тяжкості перебігу хвороби. Хоча ХРН детально описано Жаном-Мартеном Шарко ще у 1869 р., а сучасна база знань значно розширилася, наука поки не має відповідей на багато питань щодо цієї хвороби. Зокрема, не встановлено точної етіології хвороби та досить мало відомо про ранні немоторні вияви. При цьому моторні симптоми властиві багатьом більш поширеним захворюванням, що ускладнює діагностику на ранніх стадіях хвороби.

Ці проблеми значною мірою обумовлені обмеженими знаннями у сфері клітинних механізмів розвитку патології мотонейронів і нейроглії у людини.

Моделі трансгенних тварин не дають нам достатнього уявлення про молекулярні несправності, як у самих мотонейронах, так і в допоміжних клітинах їхнього мікрооточення.

За даними Глобального дослідження тяжкості хвороб (Global Burden of Disease Study), у 2016 р. у світі загалом зареєстровано 330 918 хворих на ХРН, а 34 325 пацієнтів померли від хвороби рухового нейрона. Загальний світовий показник поширеності ХРН становить 4,5 на 100 000 населення. З 1990 до 2016 р. рівень смертності від ХРН зріс на 8,0 % у всьому світі. Дослідження зазначеного вище фонду засвідчили, що в Україні в 2016 р. поширеність хвороби мотонейрона склала 1287 випадків. Було виявлено також, що поширеність ХРН значно зростає після 50 років [10].

Протягом життя сумарний ризик виникнення хвороби мотонейрона у чоловіків (1:350) вище, ніж у жінок (1:400) [11]. Тривалість життя у пацієнтів з ХРН після встановлення діагнозу не перевищує 2-5 років. Найбільший шанс захворіти на ХРН мають особи після 60 років [12].

Відомо, що 50 % хворих помирають протягом 3 років після появи перших симптомів, приблизно 20 % живуть 5 років, біля 10 % — 10 років і більше. Лише 5 % людей проживають понад 20 років [13]. Хвороба неминуче погіршує якість життя, призводячи до тяжких станів.

Виділяють спорадичний та сімейний типи ХРН. Клінічна картина двох типів хвороби подібна, за винятком того, що за сімейного типу дебют захворювання відбувається у більш ранньому віці. Понад 90 % випадків припадає на спорадичний тип, решта — на сімейний. Після того як у 1993 р. відкрито перший ген супероксиддисмутази, пов'язаний з ХРН (*SOD1*), виявлено ще понад 50 генів, потенційно пов'язаних як зі спорадичними, так і сімейними формами хвороби [14].

Незважаючи на відносну рідкість ХРН, соціальна і наукова важливість цього проблемного захворювання вкрай висока. Неухильне прогресування

провідних симптомів, значне зниження якості життя, значний рівень інвалідизації, відсутність етіотропної терапії, всі ці чинники лягають важким тягарем на сім'ю, пацієнта і медичну систему країни в цілому.

Мета дослідження. Встановити структуру і вираженість немоторних симптомів на ранніх стадіях ХРН у пацієнтів в Україні з урахуванням гендерних чинників.

Ідентифікувати та проаналізувати патологічні зміни компонентів нейроваскулярної одиниці в ЦНС на автопсійному матеріалі пацієнтів з ХРН.

Завдання дослідження

1. Дослідити поширеність немоторних симптомів у пацієнтів з ХРН порівняно з контрольною групою осіб без нейродегенеративних захворювань.
2. Вивчити особливості та структуру немоторних виявів ХРН.
3. Проаналізувати особливості болювого синдрому при ХРН та його зв'язок із прогресуванням хвороби.
4. Дослідити можливе порушення проникності гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ), що сприяє прискоренню дегенерації мотонейронів.
5. Уточнити гістологічний поліморфізм ХРН.

Об'єкт дослідження: хвороба рухового нейрона згідно МКХ-10 (G12.2)

Предмет дослідження

Клінічні характеристики немоторних виявів на ранніх стадіях ХРН, морфологічні особливості сімейних та спорадичних форм ХРН.

Методи дослідження

1. З метою діагностики ХРН використовували сучасні методики електродіагностики (голчаста і стимуляційна ЕНМГ). Метод використовували для виявлення ознак ураження периферійного рухового нейрона та нейром'язового апарату в цілому, а також з метою диференціальної діагностики з іншими нервово-м'язовими захворюваннями

2. Для нейровізуалізації використовували МРТ головного та спинного мозку.

Збільшення інтенсивності сигналу (на T2-зважених зображеннях) кортикоспінальних трактів може слугувати ранньою ознакою ХРН, хоча й з досить обмеженою специфічністю (< 70 %). [15]

Також варто відзначити цікавий радіологічний феномен ХРН, відомий як “ознака моторної стрічки” (“анг. motor band sign”), який виявляється ділянкою гіпоінтенсивного сигналу в прецентральної звивині. Втім “ознака моторної стрічки” достатньо не специфічна особливість ХРН, яка зустрічається і при інших нейродегенеративних захворюваннях, наприклад при хворобі Альцгеймера [16, 17].

З огляду на ці чинники, ми використовували нейровізуалізацію переважно для захворювань з подібними симптомами.

3. Немоторні симптоми виявляли за допомогою шкали немоторних симптомів (ШНС).

4. Інтенсивність болю визначали за допомогою візуально-аналогової шкали (ВАШ).

5. Аналіз тяжкості моторних симптомів та моніторинг прогресування хвороби проводили з використанням розширеної шкали оцінки функціонування хворих на ХРН (ALSFRS-R).
6. Для посмертного патоморфологічного вивчення тканин використовували метод фарбування вільно плаваючих зрізів авідин-біотінового комплексу (АБК) з різними первинними антитілами: GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок — маркер астроцитів), Glut-1 (глюкозний транспортер типу 1 — маркер мікросудин), Iba1 (кальцій-зв'язувальний білок — селективний маркер мікроглії), NG2 (нейральний, гліальний антиген-2 — клітини-попередники олігодендроцитів, ідентифіковані шляхом застосування первинних моноклональних антитіл), SMI 32 (моноклональні антитіла до білка нефосфорильованого нейрофіламенту — маркер пірамідних мотонейронів).
7. Стандартний молекулярно-генетичний тест генів *SOD1* (Ca/Zn залежної супероксиддисмутази 1, СОД1) та *C9orf72* (експансованих гексануклеотидних повторів в 9-й хромосомі).

Наукова новизна дослідження

Уперше досліджено структуру, частоту, різноманітність та особливості немоторних виявів ХРН в українській популяції.

Також уперше в українській популяції пацієнтів з ХРН вивчено локалізацію, характер, частоту у чоловіків та жінок, інтенсивність больового синдрому. Проведено співставний аналіз больових відчуттів за різних дебютів ХРН.

Методику надшвидкого забору автопсійного матеріалу (6-7 годин після смерті пацієнта) було вперше застосовано під час дослідження тканин пацієнтів з ХРН.

В автопсійному матеріалі первинної моторної кори (ПМК) осіб з ХРН ми першими виявили велику кількість амебоїдних, добре помітних клітин-полідендроцитів (NG2) з потовщеними біля основи, та слабо розгалуженими відростками, згрупованими у реактивні кластери, що оточують нейрони як клітини-сателіти. Реактивні кластери NG2-клітин було виявлено як у пацієнтів з мутаціями *SOD1* та *C9orf72*, так і у пацієнтів з спорадичним ХРН.

Такі реактивні кластери переважно розташовувалися у шарі V моторної кори. Ми припускаємо, що ці характерні зміни NG2-клітин є однією з ланок патологічного процесу при ХРН, важливість якої ще належить з'ясувати.

Виявлені нами пошкодження гематоенцефалічного бар'єра ПМК різного ступеня інтенсивності у хворих ХРН, можуть свідчити про складні, різнохарактерні механізми розвитку захворювання залежно від дебюту хвороби та генетичної гетерогенності процесів у мотонейронах і гліальних клітинах-сателітах.

Дисфункція елементів нейроваскулярної одиниці, насамперед мікросудин, астроцитів та полідендроцитів, може бути одною з важливих ланок патогенезу ХРН, що призводить до дегенерації рухового нейрона.

Практичне значення одержаних результатів

1. З огляду на те, що у більшості наших пацієнтів з мутаціями генів *SOD1* та *C9orf72* не виявлено сімейної історії ХРН ми рекомендуємо у клінічній практиці при підозрі на ХРН проведення рутинного генетичного дослідження як мінімум двох найпоширеніших мутацій *SOD1* та *C9orf72*. У разі виявлення мутацій, ці дані можуть допомогти з диференціальної діагностикою, прогнозом, а також вибором лікувальної тактики.
2. Методика надшвидкого забору автопсійного матеріалу істотно поліпшила виявлення морфологічних особливостей зразків тканин

головного мозку, оскільки запобігає появі фіксаційних артефактів і істотно уповільнює автолізис.

3. Удосконалена методика імуногістохімічного фарбування вільно плаваючих зрізів головного мозку (АБК) дала змогу зберегти антигенні властивості деяких білків, які важко забарвлюються. Уможливила максимально знизити інтенсивність дифузного фонового фарбування тканини, а також дозволила візуалізувати полідендроцити в ПМК людини, які вкрай важко піддаються фарбуванню через наявність NG2-протеїнгліканів на поверхні клітин.
4. Результати проведеного комплексного, всебічного вивчення немоторних симптомів при ХРН дають можливість розширити наші уявлення про цю проблему в українській популяції пацієнтів з ХРН і виділити головні напрями подальших досліджень у сфері немоторних виявів цієї грізної недуги.
5. Обґрунтовано доцільність зарахування дослідження немоторних симптомів до переліку необхідних заходів діагностичного алгоритму ведення пацієнтів із ХРН.
6. Наші дані щодо високої частоти, характеру, локалізації, інтенсивності больового синдрому у хворих із ХРН прямо вказують на необхідність своєчасного виявлення та адекватного лікування з метою поліпшення якості життя пацієнтів.

Особистий внесок пошукача

Дана дисертація є завершеним та самостійним науковим проектом автора. Ідею, напрям та завдання роботи було запропоновано автором спільно із завідувачем кафедри неврології № 1 (НУОЗУ імені П. Л. Шупика),

науковим керівником, доктором медичних наук, професором Юрієм Івановичем Головченком.

Здобувач безпосередньо проаналізував сучасні наукові першоджерела за цією темою, а саме: щодо ролі різних клітин мікрооточення мотонейронів в патогенезі ХРН, диференціальної діагностики нейром'язових захворювань та різноманітності немоторних симптомів у пацієнтів з ХРН; згідно окресленим критеріям здійснив набір пацієнтів і групи контролю, зібрав детальний, зокрема сімейний, анамнез, провів розгорнуте неврологічне обстеження.

Зібрав і проаналізував лабораторні та інструментальні дані хворих із ХРН, що включають нейровізуалізацію і ЕНМГ. Автор самостійно проводив забір матеріалів, фіксацію зрізів головного і спинного мозку, виготовлення гістологічних препаратів, маркування спеціальними антитілами для вивчення і підрахунку мотонейронів і клітин нейроглії, виконав конфокальну лазерну мікроскопію і досліджував отримані дані.

Автор резюмував основні наукові дані дисертації та провів ряд заходів щодо впровадження результатів роботи в практичну площину неврологічної служби.

Апробація та впровадження результатів дисертаційної роботи

Теоретичні та практичні аспекти актуальної проблеми диференціальної діагностики і значення немоторних симптомів ХРН предметно вивчено автором, основоположні висновки обговорювалися на наукових форумах з міжнародною участю.

- «Неврологічні читання – пам'яті Д.І. Панченка» (01.03.2018)
- «Шляхи вирішення актуальних проблем у сучасній неврології» (14.12.2018)

- Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю «Разом задля покращення неврологічного та психічного здоров'я» (Запоріжжя, 03.05.2018): «Диференціальна діагностика та визначення важливості немоторних симптомів при БАС»
- Опубліковано тези в рамках науково-практичної конференції “Медицина 21 століття” (Харків, 2018): «Особливості діагностики та визначення важливості немоторних симптомів при БАС»
- Доповідь на тему «Сімейний БАС» на конференції Асоціації неврологів Києва (15.11.2018)
- Доповідь на тему «Сімейні форми бічного аміотрофічного склерозу» клінічні випадки. 3-я Міжнародна конференція «Advances in Neurology» (Київ, 11.04.2019)
- Доповідь на тему «Генетична діагностика у хворих на БАС -сучасний погляд на проблему» Міжнародна конференція «Генетична діагностика у клінічній практиці лікаря» (Медичний діагностичний інститут, MDI. Київ, 16.04.2019)
- Стендова доповіді в рамках науково-практичних конференцій «Young Science 2.0» «Хвороба рухового нейрона та больовий синдром» (Київ, 19.02.2020)
- Конференція молодих вчених «Young Science» тези: «Значення немоторних симптомів у пацієнтів із БАС» (Київ, 20.11.2020)
- Адаптовані протоколи, практичні результати, основні матеріали і шкали для виявлення немоторних симптомів у пацієнтів з БАС використовуються як у освітньому процесі викладачами і курсантами кафедри неврології № 1 НУОЗ України імені П.Л. Шупика, так і лікарями в неврологічному відділенні КНП БРР «Богуславської ЦРЛ»

Публікації

В рамках означеної вище теми дисертаційної роботи опубліковано 5 статей, одну з яких видано одноосібно.

Три статті надруковано в провідних зарубіжних медичних спеціалізованих та рецензованих журналах, зареєстрованих в основних наукометричних системах, проіндексованих в Scopus, Google Scholar, Web of Science. Коефіцієнт впливовості (impact-factor) яких був обчислений у 2019-2020 рр. становив відповідно 20.07, 8.57, 7.9. Одна з опублікованих статей цитована 6 різними джерелами на момент написання дисертації. Також дві статті вийшло у фахових науково-практичних журналах України, віднесених до категорії «Б».

Тези п'яти доповідей автора опубліковано в збірниках матеріалів наукових форумів, медичних міжнародних конференцій, інтернет-конференцій, обговорювались на багатьох лікарських семінарах.

Обсяг та структура дисертації

Дану наукову роботу викладено на 131 сторінках. Вона ділиться на такі розділи: анотація, вступ, перелік умовних позначень, розділ використаних у дисертації джерел (містить 152 посилань на першоджерела), розділ аналізу новітніх літературних даних на запропоновані проблеми, методи і матеріали, методи і матеріали, методи статистичних досліджень, 3 розділів результатів власних оригінальних медичних досліджень: немоторні симптоми при хворобі рухового нейрона, особливості больового синдрому при хворобі рухового нейрона, гістологічна картина патологічних змін компонентів нейроваскулярної одиниці, висновки, та рекомендації лікарям-практикам і дослідникам.

Робота містить 7 таблиць та 25 рисунків.

Література в анотації та вступі

1. Nijssen J., Comley L., Hedlund E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* (2017) 133:863–885
2. Adriano Chio A., Logroscino G., Hardiman O., et al. Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009 Oct-Dec; 10(5-6): 310–323.
3. Sandstedt P., Littorin S., Johansson S., Disability and Contextual Factors in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis — A Three-Year Observational Study. *J Neuromuscul Dis.* 2018; 5(4): 439–449
4. Foteini Christidi, Efstratios Karavasilis, Franz Riederer. Gray matter and white matter changes in non-demented amyotrophic lateral sclerosis patients with or without cognitive impairment: A combined voxel-based morphometry and tract-based spatial statistics whole-brain analysis. *Brain Imaging and Behavior* 2018 Apr;12(2):547-563.
5. Kolde, G., Bachus, R., & Ludolph, A. Skin involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*, 347(9010),1996. 1226–1227.
6. Hiroyuki Nodera, Naoko Takamatsu, Naoki Muguruma, Frequent hepatic steatosis in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for systemic involvement. *Neurology.* April 06, 2015; 84
7. Ton Fang, Felix Jozsa, Ammar Al-Chalabi. Nonmotor Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Int Rev Neurobiol.* 2017;134:1409-1441
8. Brundin, Patrik, Melki Ronald and Kopito Ron. “Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases.” *Nat. Rev.*(2010) *Mol. Cell Biol.* 11, 301–307.

9. Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J. B., Robinson, J. L., Irwin, D. J., Grossman, M., et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. 2013 *Ann. Neurol.* 74, 20–38.
10. Collaborators: Logroscino G., Piccininni M., Marin B., et al. Global, regional, and national burden of motor neuron diseases 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 *Lancet Neurol.* 2018 Dec;17(12):1083-1097
11. *Acquired Neuromuscular Disorders Pathogenesis, Diagnosis and Treatment.* Editors: Angelini, Corrado (Ed.) 2016.- P. 220
12. Mehta P., Wendy Kaye W., Raymond J., et al. Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis — United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018 Feb 23;67(7):216-218
13. Darrell Hulisz. Amyotrophic lateral sclerosis: disease state overview. *Am J Manag Care.* 2018 Aug;24(15 Suppl):S320-S326.
14. Kevin Boylan. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin.* 2015 Nov;33(4):807-30
15. Simon N.G., Turner M.R., S. Vucic, et al. “Quantifying disease progression in amyotrophic lateral sclerosis” *Ann Neurol*, 76 (5) (2014), pp. 643–657
16. Chakraborty S, Gupta A, T. Nguyen T, Bourque P. “The “motor band sign:” susceptibility-weighted imaging in amyotrophic lateral sclerosis” *Can J Neurol Sci*, 42 (2015), pp. 260-263
17. Ngai S, Tang Y, Stuckey L S “Hyperintensity of the precentral gyral subcortical white matter and hypointensity of the precentral gyrus on fluid-attenuated inversion recovery: variation with age and implications for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis” *Am J Neuroradiol*, 28 (2) 2007, pp. 250–254

РОЗДІЛ 1

Сучасні погляди на етіологію, диференціальну діагностику, патогенез та перебіг хвороби рухового нейрона (огляд літератури)

Достовірну причину спорадичних випадків ХРН все ще не знайдено, хоча горизонти наших уявлень про етіологію та патологію уразливості мотонейронів за останній час значно розширилися.

Механізми пошкодження мотонейронів складні і вимагають додаткових фундаментальних досліджень. Слід зазначити, що ланцюг послідовних і часто паралельних процесів внутрішньоклітинного ушкодження включає в себе: оксидантний стрес, вторинні мітохондріальні дисфункції, глутаматну ексайтотоксичність, патологічний апоптоз, дегенерацію білків цитоскелету та інші чинники.

Безумовно значущими чинниками ризику захворювання, підтвердженими численними авторами є: сімейний анамнез, чоловіча стать і вік пацієнтів [1].

Чинники навколишнього середовища

В даний час велика увага приділяється чинникам навколишнього середовища. Досить глибоко вивчений такий чинник як куріння. Метааналіз результатів доволі великої кількості досліджень виявив, що куріння імовірно збільшує ризик ХРН у жінок [2].

Дані про вплив важких металів, зокрема свинцю, на ризик виникнення симптомів ХРН суперечливі.

Досить давно відомо про токсичний вплив свинцю на альфамотонейрони. Тривалий контакт з цим металом може спричинити свинцеву рухову полінейропатію, яка клінічно виявляється дистальними асиметричними парезами розгиначів кисті або стопи, за відсутності або мінімальному залученні чутливої сфери. Така клінічна картина багато в чому нагадує ХРН [3]. Підвищений рівень свинцю, кадмію і цинку виявлено в крові пацієнтів з ХРН. Було зроблено висновок, що ці метали можуть бути етіологічними чинниками ХРН [4].

Метааналіз 9 різних досліджень вказує на те, що свинець, як виробничий забруднювач, є безпосереднім чинником ризику приблизно у 5 % спорадичних випадків ХРН [5].

Також кілька авторів відзначили, що парадоксальне зростання рівня свинцю в плазмі хворих на ХРН очевидно слугує захисним чинником, що подовжує тривалість життя пацієнтів. [6]

Класичною клінікою ХРН є прогресування слабкості дистальних м'язів кінцівок або м'язів, які іннервуються бульбарною групою черепних нервів, яке може бути першою клінічною ознакою хвороби. Унаслідок ураження рухових нейронів з'являються мимовільні фасцикуляції, м'язи стають слабкими, атрофуються, при цьому може підвищуватися їхній тонус. Також можуть з'являтися патологічні рефлекси, які свідчать про втрату кіркового гальмування. Спостерігається переважна атрофія групи м'язів тенара у хворих з шийним дебютом. Іноді хвороба починається бульбарним і псевдобульбарним синдромами. У цьому випадку можуть поєднуватися елементи спастичності та в'ялості: фібриляція м'язів язика, атрофія і слабкість жувальних і мимічних м'язів, дизартрія, назофонія, дисфагія, зниження кашльового і глоткового рефлексів, насильницький плач або сміх тощо.

Дослідницька група бічного аміотрофічного склерозу/хвороби мотонейрона Всесвітньої федерації неврології (The World Federation of Neurology Research Group ALS/MND) зарахувала БАС до групи хвороб рухових нейронів невизначеної етіології. На підставі нового бачення про природу цього захворювання Дослідницька група доповнила Ель-Ескоріальські критерії діагностики (1998), згідно з якими порушення функції тазових органів, окорухові порушення і порушення чутливості, не можуть служити перепорою для встановлення діагнозу «хвороба мотонейрона», якщо заперечено інші хвороби [7].

Нині, згідно з новими рекомендаціями, для встановлення діагнозу достовірний ХРН необхідно, щоб виконувався принаймні один з критеріїв:

- прогресування процесу залучення у патологічний процес нижніх і верхніх мотонейронів, виявлений неврологічний дефіцит як мінімум в одній кінцівці або частині тіла, що раніше відповідало переглянутими критеріям Ель-Ескоріаль, для так званого «можливого» БАС;

- патологія нижніх мотонейронів, виявлених під час неврологічного огляду в одній ділянці тіла і/або під час ЕНМГ у двох ділянках (на попереково-крижовому, грудному, бульбарному або шийному рівнях). Ознаками на електронейроміограмі є поненціали фасцикуляцій і потенціали фібриляцій та/або позитивні гострі хвилі.

Виділяють спорадичний та сімейний типи ХРН. Клінічна картина двох типів хвороби подібна, за винятком того, що за сімейного типу дебют захворювання відбувається у більш ранньому віці. Понад 90 % випадків припадає на спорадичний тип, решта — на сімейний. Після того як у 1993 р. відкрито перший ген супероксиддисмутази, пов'язаний з ХРН (*SOD1*), виявлено ще понад 46 генів, пов'язаних як зі спорадичними, так і сімейними формами ХРН [8].

Згідно з сучасними уявленнями, до клінічно ізольованих фенотипів ХРН належать:

1. Первинний бічний склероз.
2. Прогресивна м'язова атрофія.
3. Прогресивний бульбарний параліч.
4. Синдром звисаючої руки (Вюльпіана Барнхарда, синдром «чоловіка в діжці», брахіальна аміотрофічна диплегія).
5. Синдром звисаючої ноги.

За даними різних авторів від 4 до 5 % від усіх випадків ХРН становить **Первинний бічний склероз (ПБС)**, який починається з ізольованого залучення центрального мотонейрона. Клінічно цей вид захворювання виявляється прогресуванням м'язової слабкості, характеризується вираженою асиметричністю симптомів, а також спастичністю і парезами. Приблизно у 40 % пацієнтів з ПБС розвиваються чіткі елетроміографічні ознаки залучення периферійного мотонейрона [9]. Відмінна особливість ПБС — незначна втрата ваги пацієнтами, повільний плин і відсутність ознак дихальної недостатності [10].

Прогресивна м'язова атрофія (ПМА) може бути діагностована, якщо клініко-електроміографічні методи підтверджують ураження лише периферійного мотонейрона. ПМА становить від 2 до 11 % всіх випадків хвороби мотонейрона у дорослих, частіше хворіють чоловіки. Дебют ПМА припадає приблизно на 3 роки пізніше і прогресує повільніше, ніж класичний БАС [11]. У пацієнтів з ПМА спочатку спостерігають прогресування фокальної асиметричної м'язової слабкості дистальних відділів верхніх або нижніх кінцівок, яка поступово поширюється на сусідні м'язові групи. Згодом, протягом 5 років від початку захворювання, у 20-30 % хворих з'являються симптоми залучення центрального мотонейрона [12].

Прогресивний бульбарний параліч (ПБП) — нейродегенеративне захворювання, яке зараховують до одного з регіональних фенотипів ХРН, при якому спостерігають дисфункцію мотонейронів нижніх відділів стовбура мозку. Основними симптомами ПБП є дизартрія і дисфагія. Також при огляді можуть виявляти атрофію м'язів язика і фібрилярні посмикування. Зазвичай в перших 6 місяців після появи перших ознак ПБП, симптомів залучення мотонейронів шийного і поперекового потовщень не виявляють [13]. За даними літератури, в середньому через 12 місяців у переважної більшості пацієнтів (87 %) можна ідентифікувати нейрофізіологічні і клінічні симптоми класичного БАС з несприятливим прогнозом [14].

Синдром звисаючої руки (СЗР) — це симптомокомплекс, який включає такі клінічні параметри: частіше симетричну слабкість проксимальних відділів верхніх кінцівок, атрофію м'язів цих же відділів, зниження м'язової сили у відповідних відділах, відсутність порушень чутливості, фасцикуляції трапляються досить рідко (17 %). Зазвичай не відзначається залучення дихальної та бульбарної мускулатури, а також слабкості м'язів нижніх кінцівок протягом 12 місяців. За допомогою клінічних та інструментальних методів обстеження (МРТ головного та спинного мозку, ЕМГ) проводять диференціальну діагностику сирингомієлії, вертеброгенної ішемічної мієлопатії, пухлини спинного мозку, інфекційні полірадикулопатії і т. п. Електродіагностичні методи вказують на те, що вже в дебюті СЗР в більшості випадків (81 %) можна спостерігати залучення до патологічного процесу периферійного мотонейрона на рівні двох сегментів [15]. Демографічні дані різних джерел свідчать про те, що СЗР зустрічається досить рідко, приблизно в 5 % всіх випадків ХРН, і має досить сприятливий прогноз перебігу. Середня тривалість життя у хворих СЗР становить 61 місяць порівняно з 27 місяцями у хворих з бульбарним дебютом [16]. Згідно з новітніми рекомендаціями Всесвітньої федерації неврологів, якщо

зазначені вище клінічні та електрофізіологічні симптоми у хворих на СЗР поширюються на сусідній регіон, можна діагностувати вірогідний ХРН.

Практичне значення для лікарів неврологів має **Північноамериканська класифікація ХРН [17].**

1. Набута (спорадична) ХРН

- Класичний спінальний дебют
- Первинне ураження центрального мотонейрона
- Первинне ураження периферійного мотонейрона
- Бульбарний дебют
- Респіраторний дебют
- Синдром Міллса (геміплегічний варіант)
- Мономелічна форма ХРН
- Прогресивний бульбарний параліч
- Прогресивна м'язова атрофія
- Первинний бічний склероз
- Синдром звисаючої руки
- Західно-Тихоокеанська ХРН

2. Сімейна ХРН

Ювенільний вік початку:

- ХРН2: ген *ALSIN* (хр. 2q330) аутосомно- рецесивний тип
- ХРН4: ген *SETX* (сенатаксин; хр. 29q34), аутосомно- домінантний тип
- ХРН5: ген невідомий (хр. 15q15), аутосомно-рецесивний

Дорослий вік початку:

- ХРН1: сімейна форма з геном *SOD1* (хр. 121q22.1), міссенс мутація, виникає у дорослих, тип успадкування автосомнодомінантний та автосомнорецесивний (зустрічається рідко)
- ХРН3: ген невідомий (хр. 18q), аутосомно-домінантний
- ХРН7: ген невідомий (хр. 20p), аутосомно-домінантний
- ХРН8: ген *VAPB* (білок, асоційований з везикулами плазмалемми В; хр. 20q), аутосомно-домінантний.
- ХРН9: ген ангиогенин (хр. 14 q), аутосомно-домінантний
- ХРН11: ген *FIG4* (фактор-індукований ген 4, поліфосфоїнозитид фосфатаза; хр. 6 q), аутосомно-домінантний
- ХРН12: ген оптінеурин (хр. 10p15), аутосомно-домінантний
- ХРН13: ген атаксин 2 (проміжні повторні розширення СAG; хр. 12q24)
- ХРН 14: валозинумісний білок (хр. 9p13)
- ХРН 15: ген *UBQLN2* (Ubiquilin2; хр. X)
- ХРН 16: ген *SIGMAR1* (сигма не опіодний внутрішньоклітинний рецептор-1; хр9p13; міссенс мутація)
- ХРН 17: ген *CHMP2B* (заряджений мультивезикулярний білок; хр. 2q; міссенс мутація), автосомнодомінантний
- ХРН 18: ген *PFN1* (профілін 1; хр. 17p13)
- ХРН 19: ген ERBB4 (хр. 2q34)
- ХРН20: ген *HNRNP A1* (гетерогенні ядерні рибонуклеопротеїни А1; хр. 12q13)

Лобовоскронева деменція (ЛСД) асоційована з ХРН:

- ХРН6: ген *FUS/TLS* (хр. 16p), автосомнодомінантний, автосомнорецесивний (рідко).
- ХРН10: ген *TDP43* (хр. 1q), автосомнодомінантний
- ХРН — ЛСД: ген *C9orf72* (хр. 9p21), автосомнодомінантний (клінічно може проявлятися як ХРН або ЛСД)
- ЛСД з деякими симптомами ХРН: ген тау (хр.17), ген програнулін (хр. 17)

Також викликає практичний інтерес класифікація Г.Н Левицького та В.І. Скворцова [18].

Модифікована класифікація ХРН (2006)

- Сімейна та ендемічні форми
- Спорадична :
 - ХРН, що включає бульбарні порушення: респіраторний, дифузний, шийний, поперековий дебюти захворювання
 - Первинний бічний склероз
 - Прогресивний бульбарний параліч
 - Прогресивна м'язова атрофія

Ключовим інструментальним методом діагностики ХРН, а точніше діагностики залучення периферійного мотонейрона в патологічний процес є комплексна електродіагностика. Її метою є заперечення захворювань клінічно схожих з ХРН, а саме: спінальна аміотрофія, міозит з клітинними включеннями, міопатія, міастенія, інфекційні полірадикулопатії, моторні і

запальні полінейропатії та інші неврологічні захворювання з більш доброякісним перебігом і прогнозом. Критерієм ЕНМГ-діагностики ХРН є виявлення нейрональних змін в атрофованих м'язах, а саме: виявлення гострої денервації — позитивних гострих хвиль, потенціалів фібриляцій з амплітудою 50—150 мкВ. Дифузні потенціали фасцикуляцій роблять діагноз ХМН більш ймовірним. Присутність потенціалів рухової одиниці зі збільшеною кількістю фаз і тривалістю. З нормальним або близьким до норми проведенням збудження по чутливим волокнам [19].

Сучасні підходи до лікування ХРН зосереджені переважно на полегшенні симптомів для поліпшення якості життя хворих. База даних щодо ефективності симптоматичної терапії обмежена. Два препарати, рилутек та едаравон, які використовують в даний час для надання допомоги хворим, мають досить помірний вплив на якість та тривалість життя. Рилутек (рилузол), який є блокатором інактивованих Na^+ -каналів, зменшує ексайтотоксичне пошкодження мотонейронів шляхом пригнічення вивільнення глутамату, віддаляє термін необхідності проведення трахеотомії та штучної вентиляції легень, подовжуючи тривалість життя на 4 міс. Було також показано, що препарат здатний знизити рівень смертності за 12 місяців на 15 % [20].

Едаравон має потужну радикал-поглинальну здатність. Він зменшує ушкодження ГЕБ, нейтралізуючи гідроксильний і супероксидний радикали, та забезпечує нейропротекцію рухових нейронів, підвищуючи рівень простагліцину та знижуючи рівень 3-нітротирозину в спинномозковій рідині. Він ефективний і безпечний, особливо на початкових стадіях ХРН, у пацієнтів з нормальними показниками функції зовнішнього дихання [21]. Важливо відзначити, що при тривалому прийомі едаравону (до 48-го тижня) функціональне зниження клінічних показників було меншим у пацієнтів, які приймали едаравон порівняно з тими, що не приймали препарат [22].

В Україні «Ксаврон», що є генериком оригінального препарату едаравону застосовують з 2018 р.

Перспективним напрямом лікування ХРН є розроблення антитіл проти токсичних агрегатів TDP-43. Дослідниками було створено одноланцюгові антитіла (VH7Vk9) до РНК 1 (RRM1) TDP-43 у трансгенної миші з гострим нейрозапаленням, дані антитіла після введення зменшувалися рухові порушення, мікрогліоз та когнітивні відхилення.

Дане відкриття відкриває можливість цільового терапевтичного впливу на важливу ланку патологічного процесу ХРН [23].

Література в розділі 1

1. Caroline I., Roos PM, Piehl F, Kamel F, and Fang F. “Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis”. *Clin Epidemiol.* 2015; 7: 181–193
2. Alonso A, Logroscino G, Hernan MA. Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010; 81:1249–52.
3. Thomson RM, Parry GJ. Neuropathies associated with excessive exposure to lead. *Muscle Nerve.* 2006;33:732–741
4. Peters S., Broberg K., Gallo V., Levi M et al. Blood Metal Levels and Amyotrophic Lateral Sclerosis Risk: A Prospective Cohort. *Ann Neurol.* 2021 Jan;89(1):125-133
5. Wang M, James Gomes J., Neil R. et al. A Meta-Analysis of Observational Studies of the Association Between Chronic Occupational Exposure to Lead and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JOEM* Volume 56, Number 12, December 2014
6. Oskarsson B., Kevin Horton K., Mitsumoto H., Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin.* 2015 November; 33(4): 877–888
7. Ludolph A., Drory V., Hardiman O. et al. For the WFN research group on ALS-MND. A revision of the El Escorial criteria(2015). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 2015.
8. Ghasemi M., Brown R H. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2018 May; 8(5): a024125
9. D’amico E., Pasmantier M., Lee, YW. Clinical evolution of pure upper motor neuron disease-dysfunction (PUMND).2013 *Muscle Nerve* 47, 28–32

10. Bakulin S., Zakroyschikova V, Suponeva A. Amyotrophic lateral sclerosis: Clinical heterogeneity and approaches to classification. *Neuromuscular diseases*. Vol. 7. 11-19. 2017.
11. Liewluck, T., Saperstein, D. S. Progressive Muscular Atrophy. *Neurologic Clinics*, 33(4), 761–773.2015.
12. Kim WK, Liu X, Sandner J, et al. Study of 962 patients indicates progressive muscular atrophy is a form of ALS. *Neurology* 2009;73:1686–92.
13. Chio, A., Calvo, A., Moglia. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 82(7), 740–746.2011
14. Karam C., Scelsa S. N., MacGowan D. J. L. The clinical course of progressive bulbar palsy. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11(4), 364–368. 2010
15. Byung-Nam Yoon, Seong Hye Choi, Joung-Ho Rha. et al. Comparison between Flail Arm Syndrome and Upper Limb Onset Amyotrophic Lateral Sclerosis: Clinical Features and Electromyographic Findings. *Exp Neurobiol*. 2014 Sep; 23(3): 253–257
16. WijesekeraL., MathersS, Talman P. et al. Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009 Mar 24; 72(12): 1087–1094
17. Bradley's Neurology in Clinical Practice 7th Edition 2016 p.1504
18. Левицкий Г. Боковой амиотрофический склероз. *Практическая медицина*. Сс.105-107 2010
19. Carvalho M., Dengler R., Eisen A. Electro-diagnostic criteria for diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Neurophysiology* 119 (2008) 497–503

20. Traynor B, Alexander M. et al. An outcome study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis *Journal of Neurology* volume 250, 2003. pages473–479.
21. Safety and efficacy of edaravone in well-defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Writing Group; Edaravone (MCI-186) *Lancet Neurol.* 2017 Jul;16(7):505-512
22. Shefner J., Heiman-Patterson T., Pioro E. Long-term edaravone efficacy in amyotrophic lateral sclerosis: Post-hoc analyses of Study 19 (MCI186-19) *Volume61, Issue2.2020 muscle/nerve*
23. Pozzi S., Thammisetty S., Codron P. Virus-mediated delivery of antibody targeting TDP-43 protein mitigates associated neuropathology. *J Clin Invest.* 2019 Feb 25;129-4-1581-1595

РОЗДІЛ 2

Методи і матеріали

2.1. Дизайн дослідження

Дослідження виконано у 2017-2021 рр. на базі Комунального некомерційного підприємства “Київська міська клінічна лікарня № 9” лікарні – клінічній базі кафедри неврології № 1 Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика. Протягом усього дослідження враховували і застосовували етичні принципи Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (1964-2000 рр.) та “Конвенції Ради Європи щодо прав людини та біомедицини”.

Дослідження схвалила експертна комісія з питань етики Національного університету охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика. Від усіх учасників дослідження одержано інформовану згоду на участь.

Під нашим спостереженням перебувало 52 пацієнти з ХРН. Діагноз ХРН підтверджено клінічними та нейрофізіологічними методами, в суворій відповідності до критеріїв Авадзі (Awaji) розробленими для раннього, більш точного діагностування хвороби [1], та переглянутими Ель-Ескоріальськими критеріями [2].

Критерії залучення до дослідження

1. Хворі з ХРН, які постійно проживали в Україні.
2. Вік від 35 до 80 років.
3. Спорадичні та сімейні випадки.

4. Термін від появи перших симптомів — не більше 2 років.
5. Життєва ємність легенів (ЖЄЛ) — більше 60 % на момент тестування.
6. Інформована добровільна згода пацієнта.
7. Пацієнти без трахеостомії.
8. Пацієнти без гастростомії.

Критерії вилучення із дослідження

1. Вік менше 35 або більше 80 років.
2. ЖЄЛ менше 60 %.
3. Цукровий діабет 1 типу.
4. Серцево-судинна недостатність.
5. Печінковою недостатність.
6. Гіпотиреоз або гіпертиреоз.
7. Жінки в період вагітності.
8. Відсутність інформованої згоди.
9. Фронтально-темпоральна деменція.
10. Спінальна м'язова атрофія.

Проведено низку клініко-лабораторних досліджень, які включали в себе загальноклінічні методи, такі як: загальний аналіз сечі, загальний аналіз крові, визначення рівня глюкози крові, ЕКГ, пакет аналізів «Тиреоїдна панель» (Т3, Т4, ТТГ), консультації профільних фахівців — тепевта, оториноларинголога з метою диференціальної діагностики та виключення супутніх захворювань.

Враховавши дані літератури про підвищення активності креатинфосфокінази у 50 % пацієнтів з ХРН (за винятком пацієнтів з

бульбарним дебютом [3]), ми враховували її рівень для диференціальної діагностики ХРН щод метаболічної міопатії, мітохондріальної міопатії, ідіопатичної запальної міопатії, м'язової дистрофії [4, 5].

Договір про використання даних патогістологічних досліджень за номером № 4141773 в дисертаційній роботі між науково-дослідним інститутом Лернера і НУОЗ України імені П. Л. Шупика був підписаний і набув чинності до публікації матеріалів у наукових журналах. Хворі надали письмову інформовану згоду на трупне донорство головного і спинного мозку для наукових цілей, протокол дослідження був схвалений етичною наглядовою радою клініки.

Усім хворим провели клініко-неврологічне обстеження із застосуванням сучасних інструментальних діагностичних методів (ЕНМГ, магнітно-резонансна томографія спинного та головного мозку).

Обстежено 52 хворих на ХРН (22 жінки та 30 чоловіків, вік у середньому становив (57 ± 11) років), які утворили основну групу. До контрольної групи залучено 44 особи (15 жінок та 29 чоловіків) без нейродегенеративних захворювань (вік у середньому — (59 ± 12)). Групи були порівнянні за співвідношенням статей та віком.

Пацієнти обох груп заповнювали опитувальник — Шкала немоторних симптомів (Non-motor symptoms questionnaire, ШНС), який використовують для виявлення немоторних симптомів у пацієнтів із хворобою Паркінсона та ХРН [6-8]. Опитувальник містить 31 запитання, розділене на 6 розділів: шлунково-кишкові порушення, розлади сечовипускання, нейропсихічні порушення, розлади сну, сенсорні порушення, інші немоторні симптоми. Пацієнти самостійно оцінювали наявність симптому, відповідаючи на питання. Загальна кількість ствердних відповідей щодо наявності симптомів становила загальний бал за ШНС.

Для аналізу тяжкості моторних симптомів та моніторингу їхнього прогресування використовували розширену шкалу оцінки функціонування хворих на ХРН ALSFRS-R (Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale) [9].

Дана шкала виявляє наявність розладів артикуляції, ковтання, порушень самообслуговування і руховий дефіцит. До неї включено 12 питань, кожне з яких має 5 можливих варіантів відповідей. 4 є найбільшою кількістю балів, що означає відсутність порушень, а 0 балів максимально виражений дефіцит артикуляції, самообслуговування або рухової активності.

Шкала ALSFRS-R є клінічно важливим, не складним в застосуванні, чутливим інструментом для досліджень прогресування і прогнозування виживаності пацієнтів з ХРН, що неодноразово було підтверджено даними літератури [10].

Демографічні та клінічні характеристики обстежених осіб наведено у таблиці 2.1. В обох групах переважали чоловіки (57,7 та 65,9 % відповідно), що узгоджується з даними інших авторів щодо розподілу статей [11].

ТАБЛИЦЯ 2.1. Демографічні та клінічні характеристики

Показник	БАС	Контрольна група	Порівняння
Вік (Me (IQR)), роки	58 (51-66)	62 (51-70)	971,5; 0,20
Жінки	22 (43,2 %)	15 (34,1 %)	0,68; 0,41
ALS-FRS-R (Me (IQR)), бали	38,5 (33,0-41,75)		
Тип дебюту			
Бульбарний	11 (22,4 %)		
Шийний	24 (49,0 %)		
Поперековий	14 (28,6 %)		
Загальний бал ШНС (Me (IQR))	6,5 (4,0-9,75) 3-16	5 (4,0 -7,0) 0-14	794,5; 0,01

Для визначення інтенсивності болю використовували візуально-аналогову шкалу (ВАШ). Пацієнт оцінював больові відчуття на відрізьку, довжиною 10 см, що відповідало оцінці від 10 до 0, де 10 балів це найсильніший біль, якій хворий коли небудь відчував, а 0 — повна відсутність болю. Згідно з даними літератури, ВАШ дає змогу виконувати порівняльний аналіз больового синдрому у пацієнтів з різною патологією. Вона відрізняється простотою і зручністю у використанні. Шкала отримала широке визнання в клінічних дослідженнях. Оцінка болю за ВАШ є чутливим і надійним інструментом, особливо за гострого больового відчуття у пацієнтів, має високу чутливість до змін в рівні болю [12, 13]. Таку оцінку використовують як у загальній неврологічній практиці, так і в клінічних дослідженнях у пацієнтів з ХРН [14, 15].

При локальній больючості, скутості в суглобах і різних відділах хребта, проводили додаткове магнітно-резонансне томографічне дослідження.

2.2. Застосування імуногістохімічних методів у диференціальній діагностиці хвороби рухового нейрона

2.2.1. Підготовка тканин головного та спинного мозку

Ми використовували методику надшвидкого забору і обробки автопсійного матеріалу, розроблену для вивчення тканин хворих з розсіяним склерозом. Її унікальною особливістю є якісна, оперативна підготовка і виділення тканин головного і спинного мозку, що займає не більше шести-семи годин після смерті пацієнта. Така методика була вперше застосована при дослідженнях тканин пацієнтів з ХРН. Методика передбачає негайну фіксацію, із запобіганням механічних, термічних пошкоджень, а також висихання зразків, з перевіркою якості фіксатора.

Цей протокол істотно поліпшив виявлення морфологічних особливостей зразків тканин і запобігає появі фіксаційних артефактів [16].

ПМК в середньо-задньому сегменті прецентральної звивини правої півкулі було виділено і розділено на 5 рівних блоків товщиною приблизно 2 см (рисунок 2.1). Верхній, середній і нижній сегменти моторної кори фіксували свіжоприготованим розчином 4 % параформальдегіду протягом 2,5 доби. Два блоки були миттєво заморожені.

Вивчали медичну документацію, історії хвороби. Не використовували біологічний матеріал пацієнтів, які понад 3 доби перебували на штучній вентиляції легень або яким в реанімації понад 3 доби застосовували вазоактивні препарати. Також матеріал вилучали з аналізу у разі виявлення під час розтину мозкових крововиливів, інсультів, пухлин та інших макроскопічних патологічних змін.

ПМК у контрольних суб'єктів була виділена за аналогічним протоколом зі схваленням наглядової етичної ради інституту Лернера у осіб без клінічних, макроскопічних або мікроскопічних ознак неврологічного захворювання, у

яких було проведено повний діагностичний розтин за згодою найближчих родичів.

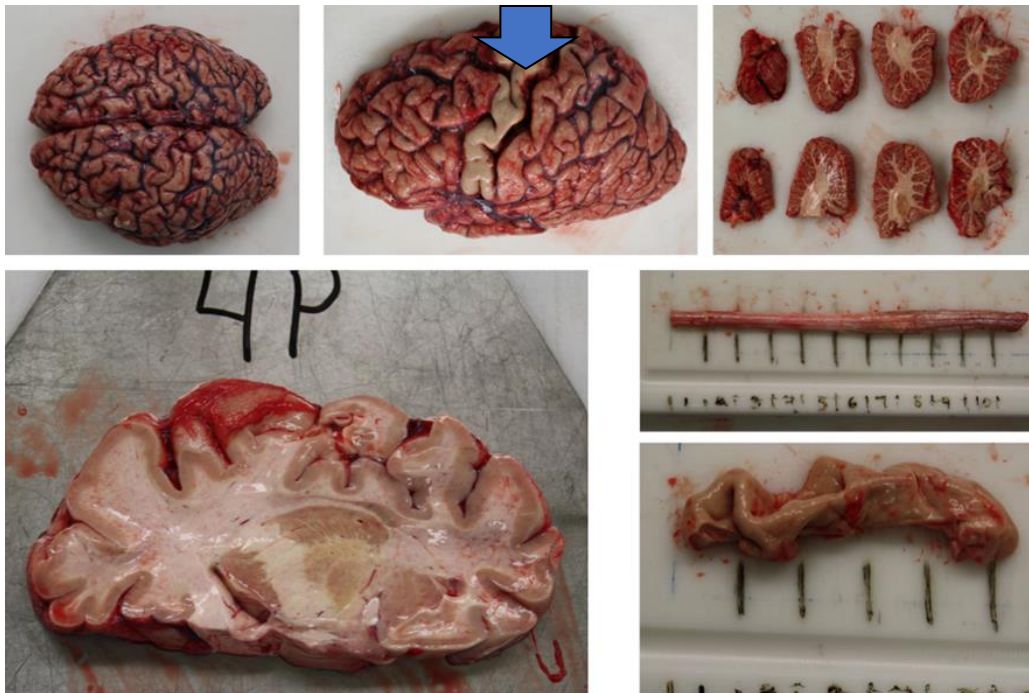


РИСУНОК 2.1. Зовнішній вигляд кори великих півкуль, спинного мозку і мозочка та локалізація первинної моторної кори

2.2.2. Методика іммуногістохімічного фарбування вільно-плаваючих зрізів головного мозку за допомогою авідин-біотинового комплексу

1. Послідовні 30 мкм зрізи після кріоконсервації промито не менше ніж 3 рази за 10 хв в натрій-фосфатному сольовому буфері.
2. Процедуру демаскування антигенів препарату виконано мікрохвильовим методом приблизно в 30 мл 10 М цитратного буфера (рН 6,0) протягом 1,5 хв до початку кипіння розчину зі зрізами.
3. Після цього зрізи перенесено в 6-ямковий планшет для клітин і промито протягом 5 хв 2 рази в 2 мл (кожна ямка) натрій-фосфатного буфера, що містить 0,3 % тритон X-100.

4. Для ослаблення активності ендогенних ферментів застосовували 3 % перекис водню і 0,3 % тритон X-100 протягом 30 хв.
5. Блокування зрізів проводили в 1 % розчині козячої сироватки (Vector, CA) протягом 1 год.
6. Наступним кроком була інкубація препаратів 6—7 днів в різних розведеннях первинних антитіл при 4 °С з додаванням 1 % блокуючого буфера на лінійному шейкері.
7. Далі зрізи препаратів відмивали в натрій-фосфатному буфері 2 рази по 5 хв.
8. Потім зразки поміщали у вторинні кон'юговані з біотином антитіла протягом 60 хв за температури 18-20 °С.
9. За 1 год до інкубації готували реагент авідин-біотинового комплексу (Vector Laboratories, Велика Британія) для повнішого зв'язування авідіна з біотином.
10. Далі препарати промивали у натрій-фосфатному буфері 2 рази по 5 хв.
11. Потім інкубували в розчині авідин-біотинового комплексу, і поміщали препарати на лінійний шейкер на 60 хв за температури 18-20 °С.
12. Далі препарати були аналогічним чином промиті 2 рази по 5 хв.
13. Для посилення сигналу додали профільтрований діамінобензидин (Sigma), що містить 30 % перексиду водню і інкубували протягом 2-5 хв за температури 18-20 °С, після отримання чіткого фарбування реакцію сповільнювали і зупиняли шляхом додавання дистильованої води.
14. Далі препарати були промиті натрій-фосфатному буфері 2 рази по 5 хв.
15. Монтували пофарбовані зрізи на предметні скельця (Thermo Scientific) за допомогою пензлика, запечатуючи під покрівне скло та використовуючи прозоре середовище Immu-Mount (Thermo Shandon Limited) для укладення мікропрепаратів. [16].

Для розпізнавання клітин мікрооточення мотонейронів використано наведені нижче первинні антитіла.

- Морфологію та розподіл астроцитів охарактеризовано за допомогою моноклональних антитіл до гліального фібрилярного кислого білка (GFAP; розведення 1 : 3000; DAKO).
 - Мікросудини ПМК візуалізовано з використанням первинних моноклональних антитіл Glut-1 (глюкозний транспортер тип 1; розведення 1 : 1000; Abcam)
 - Для детекції розподілу мікроглії використано моноклональні антитіла Iba1 (кальцій-зв'язувальний білок), який є селективним маркером мікроглії (розведення 1: 1000; Abcam).
 - Клітини-попередники олігодендроцитів або полідендроцити, ідентифіковані шляхом застосування первинних моноклональних антитіл NG2 (нейральний гліальний антиген-2).
 - SMI-32 — маркер мотонейронів (розведення 1:5000; Biolegend).
- Ми створили трансгенну модель миші з XPH- SOD1G93A/Cx3cr1+/+, SOD1G93A/Cx3cr1+/-, SOD1G93A/Cx3cr1-/- . Провели гістологічну оцінку кількості мотонейронів у передніх рогах трансгенних тварин. Підготовлені зрізи спинного мозку фарбували за модифікованим методом Нісля.

2.2.3. Стереологічний підрахунок мотонейронів

Зрізи товщиною 30 мкм отримано на санному мікротому Leica SM2010R (Leica Biosystems).

Для візуалізації і кількісної оцінки щільності мотонейронів проводили імуногістохімічне фарбування зрізів товщиною 30 мкм моторної кори тканин

мозку з використанням моноклональних антитіл HuR (співвідношення 1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology) [17].

Предметні скельця серійних імунофарбованих зрізів було оцифровано. Використовували нову систему сканування зрізів Zeiss Mirax SCAN (Німеччина) при 5- та 20-кратному збільшенні.

Кожну мікрофотографію спочатку візуалізували при 5-кратному збільшенні, щоб вибрати потрібні регіони (шари III і V ПМК). Аналізували в середньому 8 регіонів у кожного суб'єкта за допомогою автоматизованої системи ImageJ (1.47v, Java 1.6.0) з використанням алгоритму "Аналіз частинок", що розпізнає нейрони на підставі заданих розмірів і характерної форми.

Щільність мікросудин ПМК та полідендроцитів NG2⁺ розраховували аналогічним чином за допомогою автоматизованої системи ImageJ.

2.3. Методи статистичних досліджень

Порівняння показників загального бала ШНС, розділів ШНС і віку проводили з використанням непараметричного U-критерію Манна—Уїтні, оскільки значення в вибірках не були нормально розподілені. Для виявлення відмінностей за віком, статтю та розподілом відповідей «так» і «ні» в групах застосовували критерій χ^2 . Для визначення міри зв'язків використовували рангову кореляцію Спірмена. Дані опрацьовували із застосуванням спеціального програмного пакету IBM SPSS Statistics 26.0. Дані наведено у вигляді медіани (Me) та міжквартильного інтервалу (IQR). Дані вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Перевірка розподілу показників проводилася за допомогою критерію Колмогорова—Смирнова. Для опису нормально розподілених показників використовували середнє значення і середньоквадратичне відхилення ($M \pm SD$), при розподілі відмінному від гаусового — медіану і

міжквартильний інтервал. При описі частотних характеристик використовували частоту і 95 % довірчий інтервал ($P \pm 95 \% ДІ$). Для порівняння 2 груп застосовувався критерій Стюдента або Мана—Уїтні (U), кількох груп критерій Краскела—Уоліса (χ^2). Порівняння частот проводили за допомогою таблиць спряженості.

Також додатково використовувалося програмне забезпечення GraphPad Prism 8 for Windows (GraphPad Software, San Diego, США) та автоматизована система ImageJ (1.47v, Java 1.6.0).

Література в методах дослідження:

1. Costa J., Swash M., Carvalho M. Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol.* 2012 Nov;69(11):1410-6
2. Brooks BR., Miller RG., Swash M., Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* (2000) 1:293–9. doi:10.1080
3. Волошина Н, Егоркина О, Рязанцев В, Черненко М. Креатинкиназемия при боковом амиотрофическом склерозе.. *Український неврологічний журнал.*— 2014.— № 2.— С. 31—37.
4. Leverenz D., Zaha O., Crofford L., Chung C, M.D. Causes of Creatine Kinase Levels Greater Than 1,000 IU/L in Patients Referred to Rheumatology. *Clin Rheumatol.* 2016 Jun; 35(6): 1541–1547.
5. MOGHADAM-KIA S., CHESTER V. ODDIS, and AGGARWAL R, MD, MS, Approach to asymptomatic creatine kinase elevation. *Associate Cleve Clin J Med.* 2016 Jan; 83(1): 37–42.
7. Chaudhuri K R., Martinez Martin P., Schapira H. et al. «International multicenter pilot study of the first comprehensive self completed non-motor symptoms questionnaire for Parkinson’s disease- the NMSQuest study». *Mov Disord* (2006) 21:916–23
8. Chaudhuri K. R., Martinez-Martin Pablo. et al. «The metric properties of a novel non motor symptoms scale for Parkinson’s disease- results from an international study». *Mov Disord* (2007) 22:1901–11 DOI: 10.1002/mds.21596

9. Günthe Rene., Richter Nicole., Sauerbier Anna. et al. «Non Motor Symptoms in Patients Suffering from ALS» *Front. Neurol.*, Vol. 7 117. 25 Jul. 2016. DOI: 10.3389/fneur.2016.00117
10. Castrillo-Viguera C., Grasso D., Simpson E. et al. Clinical significance in the change of decline in ALSFRS-R Amyotrophic Lateral Sclerosis Volume 11, 2010 — Issue 1-2
11. Gordon P, Miller RG, Moore DH. ALSFRS-R.ALS and other motor neuron disorders 2004 5(Suppl 1), 90–93
12. McCombe P., Henderson R. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gen Med.* 2010 Dec;7(6):557-70 DOI: 10.1016/j.genm.2010.11.010
13. Younger Jared., McCue Rebecca., BA, and Mackey Sean. «Pain Outcomes- A Brief Review of Instruments and Techniques». *Curr. Pain Headache Rep.* 2009 Feb; 13(1): 39–43
14. Bijur P., Silver W., Gallagher EJ. «Reliability of the Visual Analog Scale (VAS) for Measurement of Acute Pain». *Academic Emergency Medicine* 2012.8(12):1153-7
15. Игуменцев А.В., Ханина Е.А., Шилова Н.Я. Ведение пациентов с болевым синдромом при остеохондрозе в амбулаторно-поликлинической практике. Прикладные информационные аспекты медицины. Том: 22 Номер: 1, 2019 С. 35-40
16. Gicalone AR., Heckman MG., Otto E., McVeigh KH. Shoulder Pain Among Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Series. *The American Journal of Occupational Therapy : Official Publication of the American Occupational Therapy Association*, 01 Sep 2019, 73(5)
17. Dutta R., Mahajan K., Nakamura K., Comprehensive Autopsy Program for Individuals with Multiple Sclerosis. *J Vis Exp.* 2019 Jul 19;(149)

18. Skliris AS., Papadaki O., Kafasla PL, Bauer J. «Neuroprotection requires the functions of the RNA-binding protein HuR». *Cell Death Differ.* 2015 Apr; 22(5): 703–718.

РОЗДІЛ 3

Немоторні симптоми при хворобі рухового нейрона

Лишаються відкритими питання щодо ранніх виявів, діагностики та патогенезу ХРН. Деяким нейродегенеративним хворобам, наприклад, хворобі Паркінсона, властиві ураження немоторних ділянок. Структури нюхової цибулини накопичують нейротоксичні агрегати білка α -синуклеїна на кілька років раніше, ніж клітини чорної речовини середнього мозку. Відомо також, що клінічне підтвердження зниження функції нюху може бути додатковою ознакою в диференціальній діагностиці хвороби. Гіпосмія у пацієнта слугує імовірним раннім маркером когнітивних розладів [8].

Для ХРН властиве аберантне накопичення білка TDP-43 в цитоплазмі рухових нейронів. Патологічний субстрат виявляють в ділянках, сусідніх та віддалених від первинної моторної кори (червоне ядро, ретикулярна формація стовбура, смугасте тіло, зацентральна звивина, нижні оливи) [7]. Імовірно, субклінічні симптоми також властиві цьому захворюванню.

Такі немоторні симптоми хвороби мотонейрона, як втрата маси тіла, ознаки депресії, порушення смаку, сну, вивчено недостатньо [10]. Щодо больового синдрому, то хворі на ХРН мають його досить часто (за винятком пацієнтів з бульбарним дебютом захворювання). При цьому виявлено зв'язок наявності болю зі швидшим прогресуванням хвороби [11].

Є дані про залучення до патологічного процесу шкірних покривів. В одному з досліджень під час біопсії шкіри засвідчено втрату внутрішньоепідермальних вегетативних волокон, втрату тілець Мейснера, зниження густини норадренергічних та холінергічних волокон, а також

зменшення діаметра судинного русла. Різниця була статистично значущою щодо здорових осіб ($p < 0,01$) [20]. Також є свідчення порушення функцій травного каналу, хоча пацієнти можуть на це і не скаржитися. Наприклад затримка спорожнення шлунка, яка може призвести до зменшення обсягу спожитої їжі [23]. Разом із дисфагією це може спричинити аліментарну недостатність. Велике значення також має контроль слиновиділення.

Мета роботи — вивчити структуру немоторних симптомів, характер, частоту та клінічне значення на ранніх стадіях бічного аміотрофічного склерозу, зв'язок вираженості немоторних виявів та статі.

За типом дебюту пацієнти основної групи розподілилися таким чином: поперековий — у 15 (28,8 %). шийний дебют — 25 (48,1 %), бульбарний — 12 (23,1 %), Показник за шкалою ALSFRS-R у середньому становив 38,5 бала (міжквартильний інтервал — 33,0—41,8 бала).

Загалом в основній групі виявлено 30 немоторних симптомів. Загальний показник за ШНС був статистично значуще вищим при ХРН: 3—16 балів (у середньому — $(7,4 \pm 3,5)$ бала) в основній групі та 0—14 балів (у середньому — $(5,4 \pm 2,7)$ бала) – у контрольній. В основній групі трьома найпоширенішими симптомами були втрата маси тіла — 39 (75,0 %), біль — 32 (61,5 %), пітливість — 29 (55,8 %), у контрольній відповідно порушення статевого потягу — 29 (65,9 %), біль і денна сонливість — 17 (38,6 %) та занепокоєння і безсоння — 16 (36,4 %).

3.1. Особливості виявів немоторних симптомів в доменах ШНС

При порівнянні різних груп пацієнтів статистично достовірну кореляцію виявлено в таких доменах: «інші порушення» (мається на увазі падіння та гіпергідроз; $p = 0,005$), «шлунково-кишкові порушення»

($p = 0,001$). В інших доменах не виявлено статистично значущої різниці ($p > 0,05$; таблиця 3.1).

ТАБЛИЦЯ 3.1. Порівняння на рівні доменів ШНС (Me (IQR))

Порушення	Основна група	Контрольна група	U	p
Сенсорні	1 (0-1)	1 (0-1)	994,0	0,22
Шлунково-кишкові*	2 (1-2)	0 (0-1)	408,0	0,001
Сечовипускання	0 (0-0)	0 (0-1)	995,0	0,14
Нейропсихічні	1 (0-2)	1 (0-2)	1118,5	0,84
Сну	1 (0-2)	1 (0-2)	1102,5	0,75
Інші*	2 (1-3)	1 (1-2)	781,5	0,005

* Статистично значуща різниця ($p < 0,05$) між основною та контрольною групою.

Між основною та контрольною групою виявлено статистично значущу різницю щодо таких немоторних симптомів: біль ($\chi^2 = 5,0$; $p = 0,03$; $\phi = 0,23$), втрата маси тіла ($\chi^2 = 41,87$; $p = 0,001$; $\phi = 0,66$), пітливість ($\chi^2 = 35,16$, $p = 0,001$; $\phi = 0,61$), падіння ($\chi^2 = 14,3$; $p = 0,001$; $\phi = 0,39$). Переважна кількість пацієнтів із ХРН відзначали гіпергідроз і втрату маси тіла до появи рухових порушень. Також не виявлено впливу статі на вираженість немоторних симптомів.

Ризик виникнення певних порушень у пацієнтів із ХРН збільшується більше ніж у 8 разів порівняно з особами без нейродегенеративних захворювань: втрата маси тіла (відносний ризик (ВР) 8,3; 95 % ДІ 3,2—21,3), ймовірність падінь (ВР 8,04, 95 % ДІ 2,0—32,6). Ризик виникнення болю зростає майже в 2,5 разу (ВР 1,6, 95 % ДІ 1,1—2,4; таблиця 3.2).

Між показниками загальної оцінки за шкалами ALSFRS-R та ШНС встановлено обернено пропорційний зв'язок ($\rho = -0,45$, $p = 0,001$).

ТАБЛИЦЯ 3.2. Частота основних немоторних порушень

Порушення	Основна група			Контрольна група			χ^2	p
	N	P, %	ДІ, %	N	P, %	ДІ, %		
Біль*	32	61,5	13,2	17	38,6	14,4	5,00	0,03
Ковтання*	31	59,6	13,3	3	6,8	7,4	29,0	0,001
Запор	18	34,6	12,9	11	25,0	12,8	1,18 8	0,2
Втрата ваги*	39	75,0	11,8	4	9,1	8,5	41,87	0,001
Проблеми з пам'яттю	10	19,2	10,7	14	31,8	13,8	2,01	0,16
Концентрація уваги	6	11,5	8,7	11	25,0	12,8	2,96	0,09
Апатія	11	21,2	11,1	4	9,1	8,5	2,63	0,10
Занепокоєння	28	53,8	13,5	16	36,4	14,2	2,93	0,09
Денна сонливість	20	39,2	13,2	17	38,6	14,4	0,003	0,95
Безсоння	19	36,5	13,1	16	36,4	14,2	0,0	0,99
Статевий потяг	25	48,1	13,6	29	65,9	14,0	3,08	0,08
Проблеми з сексом	15	28,8	12,3	6	13,6	10,1	3,23	0,07
Пітливість*	29	55,8	13,5	0	0,0	8,0	35,16	0,001
Запаморечення	6	11,5	8,7	10	22,7	12,4	2,15	0,14
Падіння*	19	36,5	13,1	2	4,5	6,2	14,3	0,001

* Статистично значуща різниця ($p < 0,05$) між основною та контрольною групою.

Забезпечення повноцінного харчування – проблема, яка є вкрай важливою, і, головне, яка має рішення при ХРН. Втрата маси тіла і дисфагія – чинники, що значною мірою впливають на якість життя пацієнтів із ХРН і на прогноз загалом. За даними літератури, моторний компонент дисфагії

превалює на пізніх стадіях захворювання, на ранніх — він має змішаний сенсомоторний характер [1, 13]. Тому спілкування з лікарем-дієтологом має обов'язково входити до консультативної підтримки хворих.

Гіпергідроз, виявлений на доклінічних та ранніх стадіях захворювання, може свідчити про підвищення активності симпатичної нервової системи [14].

3.2. Вікові особливості немоторних симптомів

Під час аналізу вікових особливостей виявлено що в пацієнтів контрольної групи, віком понад 60 років, удвічі рідше ніж у хворих, віком 60 років та менше, спостерігали випадки падіння ($\chi^2 = 5,54$; $p = 0,02$) і проблеми із сексуальним потягом ($\chi^2 = 4,04$; $p = 0,04$), тоді як у контрольній групі такої різниці за віком не було. Водночас у контрольній групі, на відміну від основної, у пацієнтів, віком понад 60 років проблеми з пам'яттю зустрічалися втричі частіше, ніж у осіб, віком 60 років та менше ($\chi^2 = 4,78$; $p = 0,03$) (таблиця 3.3).

ТАБЛИЦЯ 3.3 Немоторні симптоми і вік

Порушення	Вік	Хворі на БАС			Контрольна група		
		N	P, %	χ^2 ; p	N	P, %	χ^2 ; p
Проблеми з пам'яттю	≤ 60	5	16,7	0,30; 0,59	3	15,0	4,78; 0,03
	> 60	5	22,7		11	45,8	
Статевий потяг	≤ 60	18	60,0	4,04; 0,04	16	80,0	3,24; 0,07
	> 60	7	31,8		13	54,2	
Падіння	≤ 60	15	50,0	5,54; 0,02	1	5,0	0,02; 0,89
	> 60	4	18,2		1	4,2	

Одержані нами дані щодо підвищеного ризику падінь хворих на ХРН узгоджуються з даними інших авторів [2, 22]. Зважаючи на те, що падіння – одна з головних причин серйозних нефатальних травм, важливо вживати запобіжні заходи щодо падінь, зокрема під час амбулаторного прийому.

Висновки

Невід'ємною ознакою ХРН є немоторні симптоми.

1. Серед немоторних симптомів ХРН переважають порушення, пов'язані з травленням.

2. Пацієнти із ХРН статистично значуще частіше мали такі симптоми, як біль, втрата ваги, пітливість, падіння, ніж особи без нейродегенеративних захворювань.

3. У пацієнтів, віком понад 60 років, не виявлено статистично значущої різниці між чоловіками та жінками щодо вираженості немоторних симптомів.

4. Наявність немоторних симптомів свідчить на користь мультисистемного характеру ХРН. Вже на доклінічній і ранній стадіях хвороби пацієнти відзначають появу гіпергідрозу і втрату маси тіла.

5. Тестування пацієнтів за допомогою ШНС дасть змогу неврологам своєчасно виявляти немоторні порушення на ранніх стадіях цього складного для діагностики та терапії захворювання

Література в розділі 3

1. Fullard ME., Morley JF., Duda JE. Olfactory Dysfunction as an Early Biomarker in Parkinson's Disease. *Neurosci Bull.* 2017 Oct;33(5):515-525 DOI: 10.1007/s12264-017-0170-x
2. Cykowski MD, Powell SZ, Peterson LE et al. Clinical Significance of TDP-43 Neuropathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* Vol. 76, No. 5, May 2017, pp. 402–413 DOI: 10.1093/jnen/nlx025
3. Gunther R. et al: Non-Motor symptoms in patients suffering from Amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Neurology.* 2016 Jul.7(117). DOI: 10.3389/fneur.2016.00117
4. Kostenko V. Characteristics of pain syndrome in motor neuron disease. *International neurological journal* Vol. 16, № 2, 2020 DOI: 10.22141/2224-0713.16.2.2020.200963
5. Nolano M., Provitera V., Manganelli F. et al. Non-motor Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Insight From Nerve and Vessel Analysis in Skin Biopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 Feb;43(2):119-132 DOI: 10.1111/nan.12332
6. Toepfer M., Folwaczny C., Klauser A. et al. Gastrointestinal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and other motor neuron disorders.* 1999 1, 15–19 DOI: 10.1080/146608299300079484
7. McCombe P., Henderson R. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med.* 2010 Dec;7(6):557-70 DOI: 10.1016/j.genm.2010.11.010
8. Bergen G., Stevens M. R., Burns E. R. (2016). Falls and fall injuries among adults aged i 65 years, 2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(37), 993-998. DOI: 10.15585/mmwr.mm6537a2

9. Schell W. E., Mar V. S., Da Silvab C. P. Correlation of falls in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis with objective measures of balance, strength, and spasticity. *NeuroRehabilitation*. 2019; 44(1): 85–93. DOI: 10.3233/NRE-182531
10. Moglia C., Calvo A., Grassano M. et al. Early weight loss in amyotrophic lateral sclerosis: outcome relevance and clinical correlates in a population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2019 Jun;90(6):666-673.
11. Beck M., Giess R., Magnus T. et al. Progressive sudomotor dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jul;73(1):68-70 DOI: 10.1136/jnnp.73.1.68
12. Martíneza BH.R., Escamilla-Ocañasa C.E., Hernández-Torre M. Non-motor neurological symptoms in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurología (English Edition)* Vol. 33. Issue 7.p. 474-476 (Sep. 2018) DOI: 10.1016/j.nrl.2016.05.002

Наукові дані і резюме до розділу № 3 були опубліковані в статті:

В. Костенко, Ю. Головченко. Важливість немоторних симптомів у клінічній картині хвороби рухового нейрона. *Український неврологічний журнал*. 2020. № 3. С. 33.

РОЗДІЛ 4

Особливості больового синдрому при хворобі рухового нейрона

Біль — не тільки досить часта, але й суб'єктивно різноманітна за сприйняттям і описом неврологічними хворими скаргою. Він має важливе фізіологічне значення, його виникнення — серйозний знак загрози нормальній життєдіяльності організму. Біль носить не тільки фізіологічний, сигнальний характер, але залежно від тривалості та інтенсивності часто може бути патологічно поєднаним зі стражданням пацієнтів.

Детальний аналіз фонду глобального дослідження тяжкості хвороб (2016) показав, що больові синдроми (головний біль та біль у попереку) є основними причинами інвалідності населення в світовому масштабі [1]. За деяких неврологічних станів (наприклад дорсалгії, постгерпетичної невралгії) біль відіграє провідну роль у патогенезі і перебігу захворювання, за інших захворювань, таких як хвороба Паркінсона, Альцгеймера та ХРН, його роль менш вивчено.

Панівна протягом останніх десятиліть концепція, що при ХРН уражуються винятково рухові нейрони, береться під сумнів. Збільшується кількість даних щодо пошкодження чутливих нейронів на різних етапах патологічного процесу. Зокрема, гістологічні дослідження свідчать про можливість залучення у патоморфологічний процес у хворих із ХРН периферійних чутливих нервів, спінальних гангліїв і задніх канатиків спинного мозку [2]. Використання комбінації електрофізіологічних і нейрорадіологічних методів дослідження спинного мозку дало змогу виявити субклінічний сенсорний дефіцит приблизно у 85 % пацієнтів із ХРН [3].

Свідчення про залучення до патологічного процесу екстрамоторних систем привернули увагу клініцистів і дослідників до немоторних виявів хвороби.

У пацієнтів виявляють когнітивні порушення, загальну слабкість, втомлюваність, порушення сну, тривожність, депресію та біль різного характеру [4-7]. Захворювання традиційно вважали безболісним, тому виявленням й оцінкою больового синдрому нехтували як лікарі, так і самі пацієнти [8]. Хоча за даними різних авторів частота больового синдрому у хворих із ХРН варіює від 51 % до 85 % [9, 10]. Біль корелює з погіршенням якості життя пацієнтів та посиленням депресивних симптомів [11]. На пізніх стадіях хвороби біль може бути досить сильним, щоб вимагати посиленого вживання седативних та знеболюючих препаратів. Його локалізація залежить від типу або основного механізму (наприклад, хворобливі судоми, ноцицептивний біль або невропатичний біль). Для зняття болю запропоновано різні методи лікування, починаючи від нестероїдних протизапальних препаратів, препаратів від невропатичного болю, опіоїдів та каннабіноїдів, закінчуючи стратегіями фізичної терапії та профілактичними допоміжними пристроями. Причини болю та медикаментозна і не медикаментозна терапія вимагають додаткового дослідження. Оцінку больового синдрому слід проводити протягом усього перебігу хвороби, охоплюючи часові межі, досить довгі, щоб покрити характерні коливання болю.

Ми ставили за мету встановити вираженість больових відчуттів, особливості (залежної від дебюту) та локалізацію больового синдрому на ранніх стадіях ХРН в українській популяції пацієнтів.

До дослідження залучено 49 пацієнтів із хворобою рухового нейрона 28 (57,1 %) чоловіків і 21 (42,9 %) жінка, вік яких у середньому становив (57 ± 11)

років. ХРН діагностували і визначали як клінічно вірогідний, базуючись на переглянутих Ель-Ескоріальських клініко-діагностичних критеріях.

Критерії залучення

Клінічно та інструментально підтверджена ХРН. Вік пацієнта від 35 до 80 років. Спорадичні та сімейні випадки хвороби. Перших два роки від появи симптомів. ЖЄЛ більше 60 %. Пацієнти без трахеостомії та гастростомії. Усвідомлена інформована згода пацієнта.

Критерії вилучення

Не підтверджена клінічно та інструментально ХРН, згідно до вище перерахованих критеріїв. Вік менше 35 або більше 80 років. ЖЄЛ менше 60 %. Супутні хронічні захворювання, жінки в період вагітності, порушення когнітивних функцій, згідно до МКБ-10. Відсутність інформованої згоди.

Для визначення інтенсивності больового відчуття використовували візуально аналогову шкалу (ВАШ), за якою пацієнт оцінював біль. 0 балів відповідали відсутності болю, 10 балів – нестерпному, найсильнішому болю, який коли-небудь відчував хворий. Моніторинг прогресування захворювання здійснювали за розширеною переглянутою шкалою оцінки ХРН (ALSFRS-R) [16].

У разі локальної скутості в різних відділах хребта і суглобах додатково проводили магнітно-резонансне томографічне дослідження.

Дані обробляли із застосуванням пакета статистичних програм Statistics 6.1. Розподіл показників перевіряли за допомогою критерія Колмогорова — Смирнова. Нормально розподілені показники наведено у вигляді середнього значення та середньоквадратичного відхилення ($M \pm SD$), при розподілі відмінному від нормального — медіану і міжквартильний інтервал. Для виявлення різниці між двома групами застосовувався критерій

Стюдента або Мана — Уїтні (U), для порівняння кількох груп — критерій Краскела — Уоліса (χ^2). При порівнянні частот використовували таблиці спряженості.

Результати

У 34 (69,4 %) пацієнтів із ХРН відзначено больові відчуття різного ступеня інтенсивності. Частота виявлення була порівнюваною у чоловіків та жінок та становила відповідно 19 (67,9 %) та 15 (71,4 %). Вік пацієнтів із больовим синдромом не відрізнявся статистично значущо від віку пацієнтів без нього — у середньому ($54,9 \pm 10,8$) та ($60,9 \pm 12,1$) року відповідно. Водночас оцінка прогресування захворювання за функціональною шкалою ALSFRS-R статистично значущо відрізнялася у пацієнтів із больовим синдромом та без нього — $36,5 \pm 4,9$ та $40,4 \pm 4,4$ відповідно ($t = 2,67$, $p = 0,01$). Чим вище оцінка за даною шкалою тим, тим більше функцій (рухова активність і показники зовнішнього дихання) зберігається. Пацієнти зазначали появу болю в таких регіонах: тулуб, плечовий пояс, поперекова ділянка, нижні кінцівки, верхні кінцівки, шия, голова.

Найчастіше біль локалізувався в кінцівках. Хворі відзначали біль у верхніх кінцівках (плече, передпліччя, кисть) — $(38 \pm 16,3)$ %, нижніх кінцівках (стегно, гомілка, стопа) — $(27 \pm 14,8)$ %, а також в поперековій ділянці — $(15 \pm 11,9)$ % (рисунок 4.1).

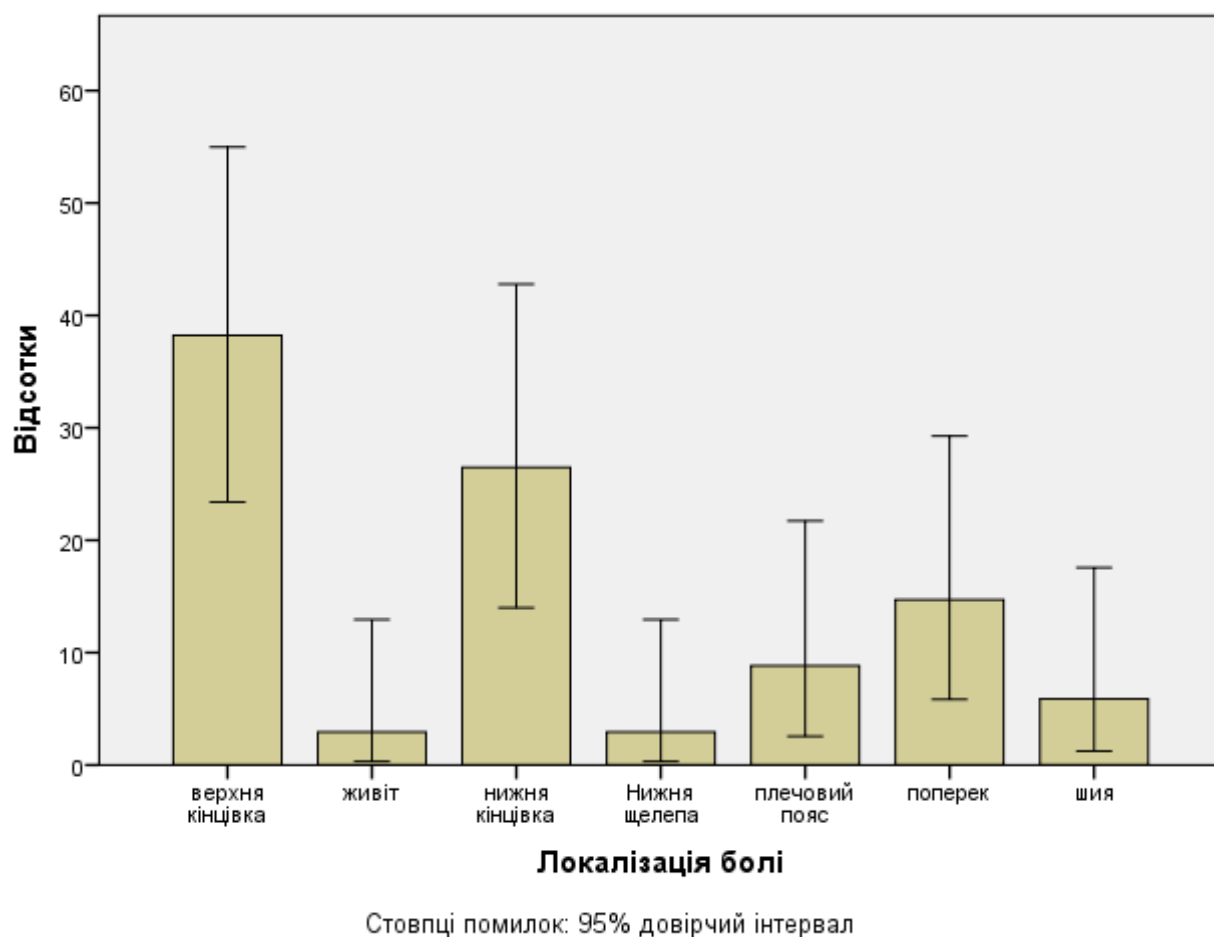


РИСУНОК 4.1. Частота різної локалізації болю у пацієнтів з бічним аміотрофічним склерозом

Пацієнти прямо вказували на наявність ниючого болю 11 (32 %) з 34, тягнучого болю 10 (29 %) з 34, смикаючого 6 (18 %) з 34, пекучого 4 (12 %) з 34. Стискаючий, колючий, та пульсуючий характер болю відмічали поодинокі пацієнти (таблиця 4.1).

ТАБЛИЦЯ 4.1. Різновиди болю у пацієнтів основної групи

Вид болю	Абс.	P, %	m, %	95 % ДІ, %
Колючий	1	2,9	10,2	10,2
Ниючий	11	32,4	8,0	15,7
Пекучий	4	11,8	5,5	10,8

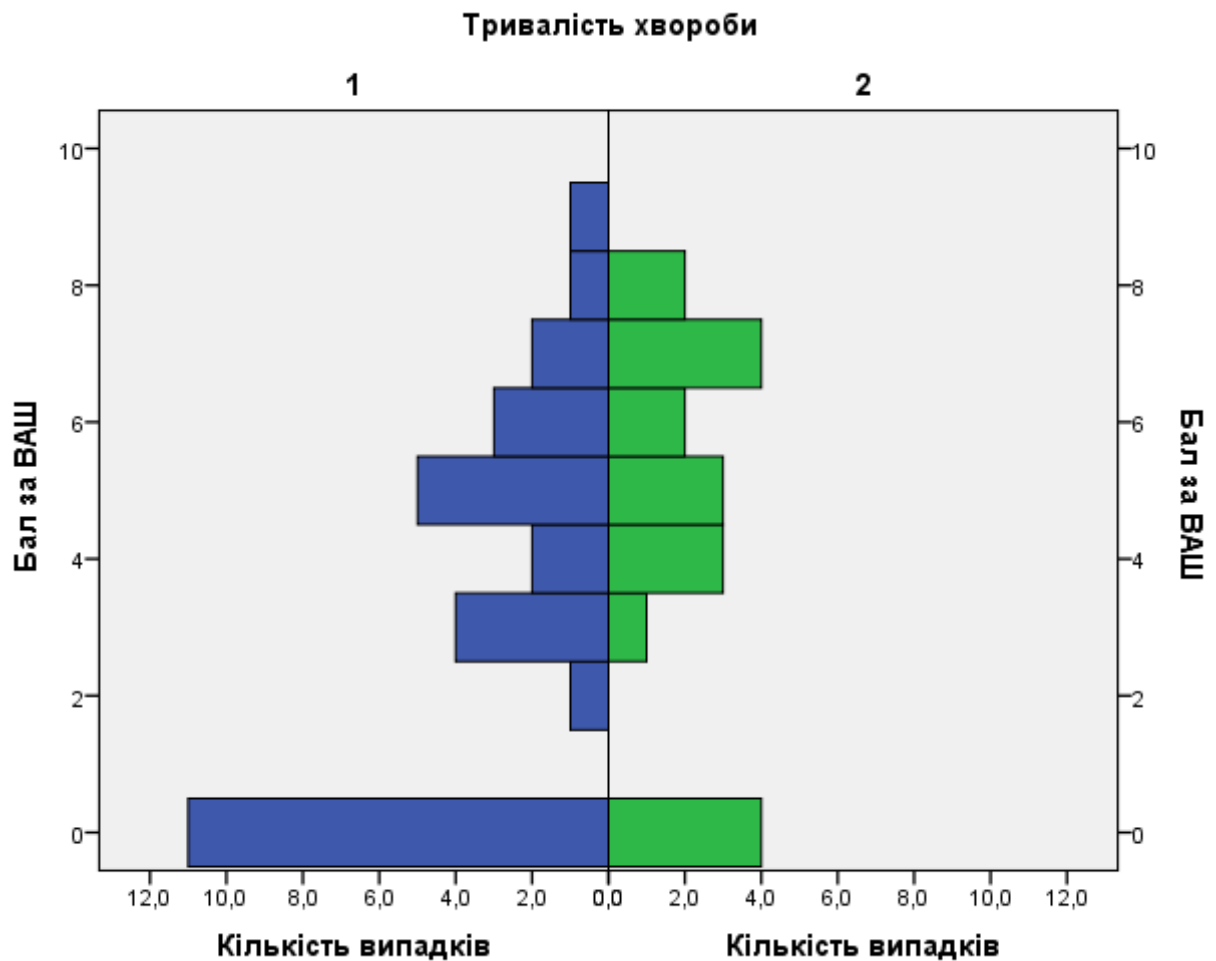
Пульсуючий	1	2,9	10,2	10,2
Стискаючий	1	2,9	10,2	10,2
Смикаючий	6	17,6	6,5	12,8
Тягнучий	10	29,4	7,8	15,3

У 19 (38,8 %) пацієнтів тривалість хвороби рухового нейрона становила понад два роки. Наявність больового відчуття та інтенсивність болю не були пов'язані з терміном захворювання (рисунок 4.2), на відміну від кількості балів за шкалою ALSFRS-R. Так у разі 1-2-річної тривалості ХРН оцінка за шкалою ALSFRS-R була статистично значущо вищою ($U = 169,5$; $p = 0,02$), ніж у разі тривалості хвороби 3-4 роки (Me 40,0; IQR 34,8 — 43,0 та Me 37,0; IQR 31,0 — 39,0 відповідно).

18,5 % пацієнтів відзначали нападopodobний характер больових відчуттів, виражений біль з'являвся раптово, тривав кілька хвилин і зникав, як правило це були непоодинокі випадки, частіше в нічний час.

Такі хворі відзначали, що подібні больові відчуття зазвичай посилюються зі збільшенням фізичної активності, емоційними переживаннями, новими фізичними вправами або пов'язані з тривалою нерухомістю.

Таким чином враховуючи гетерогенний характер болю у пацієнтів з ХРН, різну локалізацію і вираженість больових відчуттів потрібен індивідуальний підхід до фармакологічного та немедикаментозного лікування даної категорії хворих



*РИСУНОК 4.2. Оцінка болю за ВАШ залежно від тривалості ХРН:
1 — більше двох років; 2 — менше двох років*

Тип дебюту ХРН статистично значущо корелював із наявністю больового синдрому ($\chi^2 = 17,5$, $v = 0,59$, $p = 0,001$). Найчастіше біль відчували пацієнти з шийним дебютом 20 (41 %) з 49, а при поперековому дебюті біль виявлявся у 12 (25 %) із 49 (рисунок 4.3). Вкрай рідко больовий синдром був відзначений при бульбарному дебюті — 2 (4 %) з 49. У пацієнтів з шийним дебютом ризик появи болю в 1,5 рази вищий ($\chi^2 = 4,3$, $\phi = 0,3$, $p = 0,04$; $VR = 1,49$, 95 % ДІ 1,01 — 2,20).

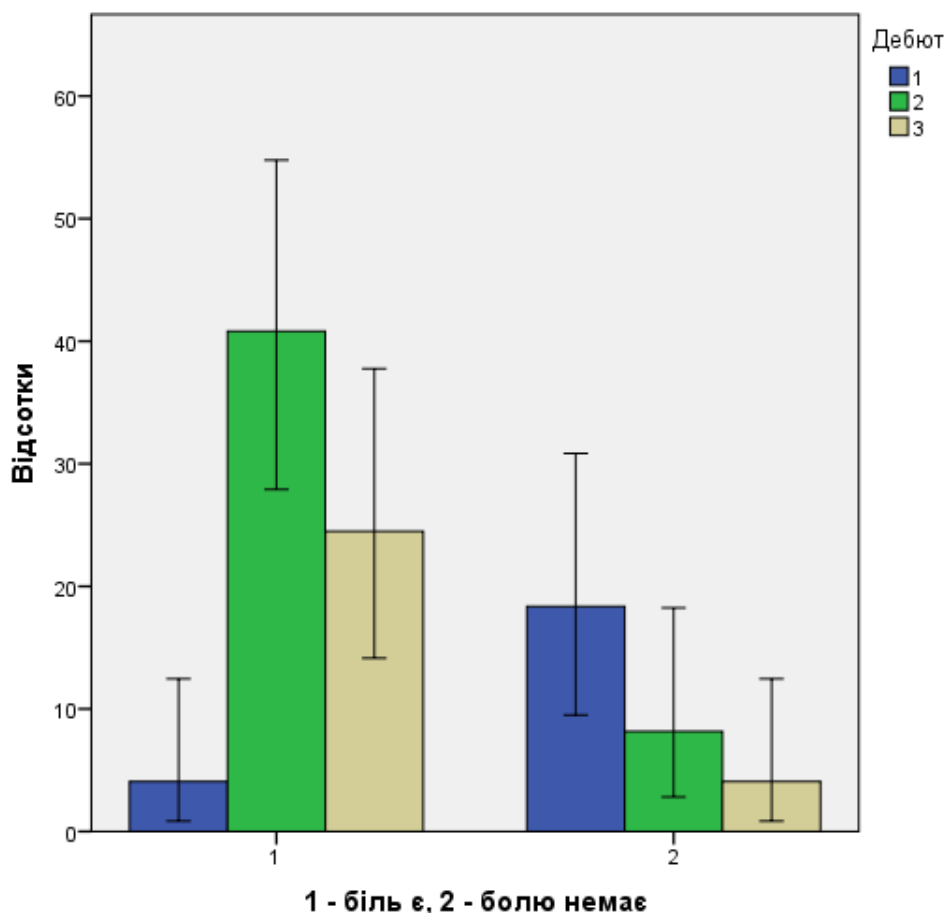


РИСУНОК 4.3. Біль при різних типах дебюту ХРН

1 — бульбарний дебют, 2 – шийний дебют, 3 – поперековий дебют.

Рівень болю за ВАШ та функціональний стан за шкалою ALSFRS-R не мали статистично значущої залежності від виду дебюту. Проте оцінка функціонального стану за відсутності больових виявів була статистично значущо нижчою ($U = 4,5$; $p = 0,02$), у разі шийного дебюту (Me 38,0; IQR 35,0—38,8) порівняно з бульбарним і поперековим дебютами (Me = 42,0; IQR 40,0—44,0). За даними літератури [16] розширена переглянута шкала оцінки ХРН (ALSFRS-R) має валідну структуру і внутрішню зваженість [12]. Тому ми використовували її для оцінки прогресування і прогнозу виживання при ХРН.

Оцінка больового синдрому за ВАШ у разі бульбарного дебюту становила ($3,5 \pm 0,7$) бала, для шийного — $5,5 \pm 1,6$, для поперекового — $5,4 \pm 2,1$.

Резюме до розділу 4

Наші дані свідчать про високу частоту больового синдрому при ХРН, що узгоджується з даними інших дослідників. Частота цього симптому не залежить від статі та віку пацієнтів, проте його наявність корелює зі швидшим порівняно з хворими, які не відчувають болю, прогресуванням характерних моторних симптомів хвороби.

Найхарактернішими для хворих із ХРН є больові відчуття у верхніх і нижніх кінцівках та у поперековій ділянці. Часто це тягнучий, ниючий, пекучий, смикаючий біль, в поодиноких випадках — стискаючий, колючий або пульсуючий. Також відзначено, що пацієнти з бульбарним дебютом хвороби практично не мали больового синдрому.

Встановлено, що наявність і інтенсивність больового відчуття не залежали від тривалості захворювання.

Необхідні подальші дослідження як клініцистів так і вчених для поглиблення знань щодо механізмів виникнення больового відчуття та його впливу на загальну якість життя пацієнтів із хворобою рухового нейрона. Для цієї категорії хворих потрібне розроблення спеціального стандартизованого опитувальника, який допоможе у виявленні больового синдрому, лікування якого є важливим напрямом паліативної допомоги при ХРН. Детальні уявлення про тонкі механізми больових відчуттів у даній категорії пацієнтів матимуть значення в клінічній практиці для оптимального вибору знеболюючих препаратів і, можливо, для стратегії профілактичного лікування.

Література у розділі 4

1. Vos T., Allen C., Arora M. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390: 1211-1259
2. Tao, Q.- Q., Wei, Q., Wu, Z.- Y. Sensory nerve disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Life Sciences*, (2018) 203, 242–245
3. Iglesias C., Sangari S., El Mendili M.M et al. Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 2015 Feb 24.5(2)
4. Chiò A., Moglia C., Canosa A. et al. A Cognitive impairment across ALS clinical stages in a population-based cohort. *Neurology*. 2019 Aug 13. Pii. 10.121
5. Lo Coco D., Fatigue LV. Sleep, and nocturnal complaints in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2012 May. 19(5)
6. Prado L., Bicalho I. C., Vidigal-Lopes M. et al. Depression and anxiety in a case series of amyotrophic lateral sclerosis: frequency and association with clinical features. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017 Jan-Mar, 15(1), 58–6
7. Akerblom Y., Jakobsson L. B., Zetterberg L. et al. «The multiple faces of pain in motor neuron disease: a qualitative study to inform pain assessment and pain management». *Disabil Rehabil*. 2019 Apr 24. 1-10
8. Handy C. R., Krudy C., Boulis N. Pain in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neglected Aspect of Disease. *Neurol Res Int*. 2011; May 3
9. Rivera I., Ajroud Driss S., Casey P. et al. «Prevalence and characteristics of pain in early and late stages of ALS». *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2013 Sep.14(5-6).369-72

10. Wallace VC., Ellis C.M., Burman R. et al. The evaluation of pain in amyotrophic lateral sclerosis: a case controlled observational study. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014 Dec. 15(7-8).520-7
11. Scott J., Huskisson E.C. Graphic representation of pain. *Pain* 1976. 2 (2).175–184
12. Castrillo-Viguera C., Grasso D., Simpson E. et al. Clinical significance in the change of decline in ALSFRS-R *Amyotrophic Lateral Sclerosis* Volume 11, 2010 — Issue 1-2

Наукові дані і резюме до розділу № 4 були опубліковані в статті:

Володимир Костенко. Характеристика больового синдрому при хворобі рухового нейрона. *Міжнародний неврологічний журнал.* Том 16, № 2, 28.02.2020 DOI: 10.22141/2224-0713.16.2.2020.200963

РОЗДІЛ 5

Гістологічна картина патологічних змін компонентів нейроваскулярної одиниці при хворобі рухового нейрона

5.1. Сучасні уявлення про нейроваскулярну одиницю

Нейроваскулярна одиниця (НВО) складається з елементів ГЕБ: астроцитів, клітин ендотелію, інтернейронів, нейронів, а також перицитів, гладеньких м'язових клітин судин і позаклітинного матриксу [1].

У сукупності ці складові нейросудинної одиниці створюють досить селективний фізичний і метаболічний бар'єри для певних молекул, патогенів і токсинів [2]. Якщо функція одного з елементів цього ланцюга порушується, то це може привести до нейродегенеративних процесів в ЦНС [3].

Важливим елементом ГЕБ є ендотелій судинного русла ЦНС. Ці клітини мають ряд унікальних відмінностей від судин інших органів і тканин: вони характеризуються сплющеною формою будови, вираженими замикаючими міжклітинними контактами, малою кількістю кавеол [4].

Ми послідовно вивчили більшість клітинних елементів НВО з метою виявити у пацієнтів з ХМР гістохімічні відхилення, що можливо впливають на патогенез та перебіг захворювання.

Було обстежено 12 пацієнтів з ХРН. Середній вік пацієнтів з аналізованої когорти становив 60 років (від 35 до 81 року). Тривалість захворювання — в середньому 3 роки (0,8—9,9 року).

У 6 хворих після генетичного тестування і вивчення сімейного анамнезу виставлено діагноз спорадичного БАС. У 6 пацієнтів виявлено мутації,

пов'язані з ХРН. Експансію в локусі *C9orf72* було ідентифіковано у 2 пацієнтів, у 4 — виявлено мутації в гені *SOD1* (СОД1 — Ca/Zn залежна супероксиддисмутаза 1).

У 4 пацієнтів перші симптоми захворювання спостерігали у верхніх кінцівках, ще в 4 — у нижніх, у 4 хворих спостерігали бульбарний дебют хвороби.

Усім пацієнтам після детального клінічного, генетичного і інструментального обстеження виставлено діагноз ХРН, відповідно до чітких Ель-Ескоріальських критеріїв, переглянутих у 1998 р. Пацієнти проходили лікування під наглядом досвідчених неврологів у центрі нервово-м'язових захворювань клініки Клівленда. Хворі надали письмову інформовану згоду на трупне донорство головного і спинного мозку для наукових цілей, протокол дослідження був схвалений етичною наглядовою радою клініки.

5.2. Дегенерація рухових нейронів спинного мозку

Патологічні зміни мотонейронів мають певні особливості: зменшується розмір клітини, часто змінюється щільність ядра [5], форма змінюється на веретеноподібну, дендрити і аксони дегенерують.

Спираючись на ці критерії, ми вивчали автопсійний матеріал пацієнтів з ХРН. Порівняння морфології α -мотонейронів шийного потовщення наведено на [рисунок 5.1](#).

На зрізі автопсійного контрольного препарату на рівні ІХ пластини переднього рогу візуалізуються інтенсивно рівномірно пофарбовані, типові мультиполярні альфа-мотонейрони (SMI-32⁺) великих розмірів з чітко окресленими дендритами і аксонами та розташованими по центру, слабо забарвленими ядрами (див. рисунок 5.1А). В препараті пацієнтів з ХРН є ознаки дегенеративного процесу в нейронах: полігональна форма SMI-32⁺-клітин трансформувалася в веретеноподібну, клітини зменшені в розмірах,

ядро забарвлене більш інтенсивно і розташоване ексцентрично, дендрити й аксони дистрофічні: спостерігається зменшення кількості, діаметра, вони мають звивистий характер. Також виявляється фрагментація дендритів (див. рисунок 5.1Б).

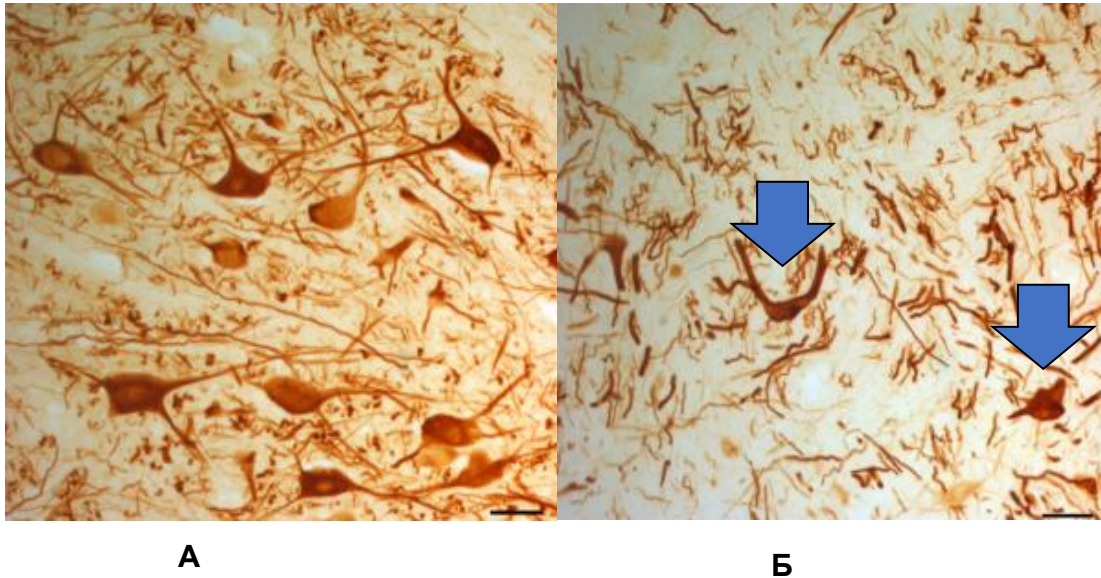


РИСУНОК 5.1. Передні роги спинного мозку, імуногістохімічне фарбування тканини 30 мкм зрізів антитілами SMI-32. А — контроль; Б — ХРН, виражені дегенеративні зміни альфа-мотонейронів передніх рогів на рівні С5—С7 шийного потовщення. Стрілки вказують на пошкоджені мотонейрони. Збільшення 40

Ми використовували первинні моноклональні антитіла SMI-32, які прикріплюються до нефосфорильованих епітопів середніх і важких форм субодиниць нейрофіламентів. Ці антитіла візуалізують шляхом імуногістохімічного фарбування сому альфа мотонейронів, великі аксонів і дендрити нейронів [6, 7].

Нейрофіламенти (НФ) — це ультратонкі волокна (діаметром приблизно 10 нм), зібрані в пучки, які знайшли в цитоплазмі нейронів. Вони є головними структурними одиницями цитоскелета мотонейронів, регулюють діаметр,

виглядають прямолінійно у аксонах. Порівняно рідко зустрічаються в дендритах та мають звивистий характер [8].

Нейрофіламенти залучені в процес внутрішньоклітинної передачі сигналів, закріплюють в певному положенні ядро і мітохондрії [9].

Було показано, що підвищений рівень важких форм нейрофіламентів, які виявляються в спинномозковій рідині найбільш специфічні для ХРН (специфічність — 88,2 %), вони можуть бути використані в найбільш складних випадках, для диференційної діагностики ХРН (чутливість — 90,7 %) [10].

Визначення рівня фосфорильованих нейрофіламентів в крові як біомаркера є новим та перспективним методом прогнозування перебігу хвороби, який може бути використаним під час клінічних випробувань різних препаратів у пацієнтів з ХРН [11].

Верхні або центральні мотонейрони розташовані в руховій корі головного мозку. Особливий інтерес представляють мотонейрони, розташовані в самому широкому, третьому, шарі малих і середніх пірамід, а також у шарі V великих пірамід, в яких при ХРН виявляють виражені нейродегенеративні процеси.

Дослідження показують, що нейрони рухової зони кори значно менше в розмірах при ХРН, ці зміни значною мірою стосуються клітин Беца [12].

При патогістологічному дослідженні ПМК і чутливої зони кори з'ясовано, що нейронів статистично значущо менше в руховій корі пацієнтів з ХРН, ніж у здорових [13].

NuR⁺-нейрони ПМК візуалізуються переважно у шарі II—V. ПМК найінтенсивніше імуногістохімічно зафарбована в середньому і глибокому шарах моторної кори. Ці ділянки відповідали широкому шару малих і середніх пірамід, а також шару V великих пірамід, відокремлених від глибше розташованої білої речовини ПМК.

На деяких ділянках у шарі V виражене нерівномірне розташування нейронів. Стрілки вказують (рисунок 5.2) на зони без великих пірамідних нейронів (клітини Беца).

Патологічні зміни в зазначеній ділянці, як і передбачалося, були виражені досить помітно.

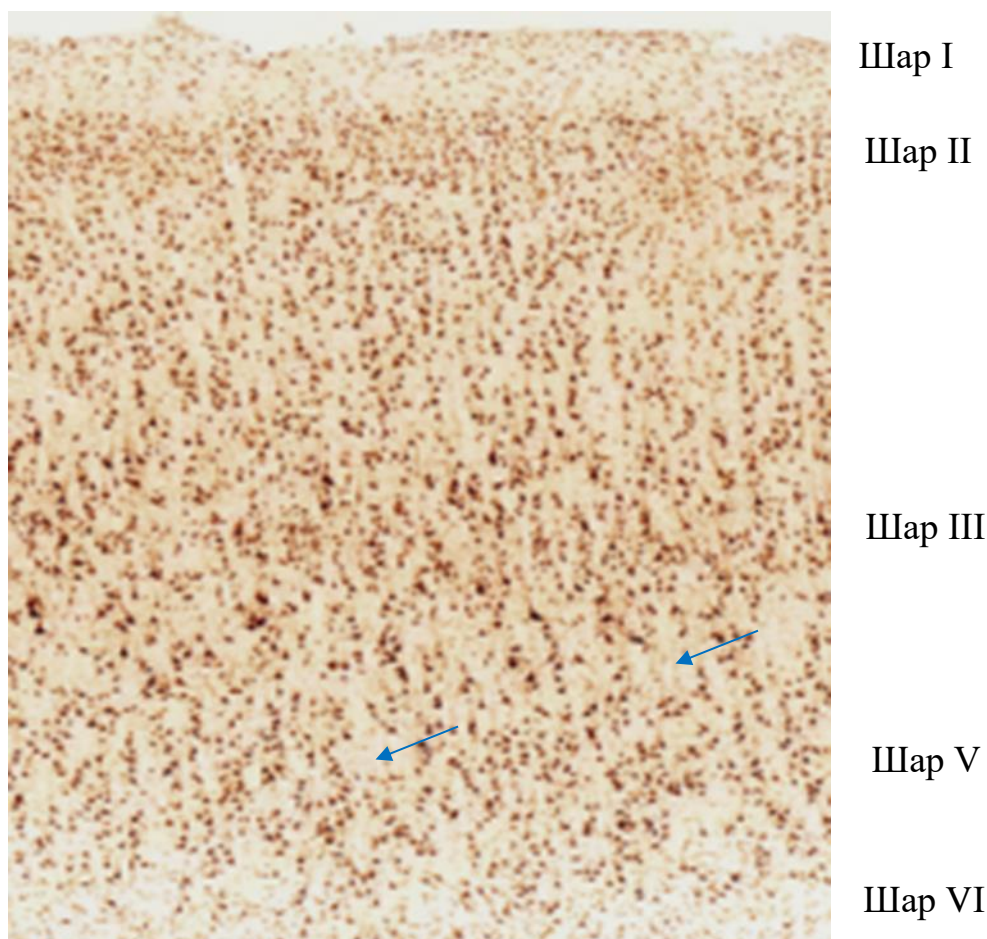


РИСУНОК 5.2. Імуногістохімічне фарбування зони первинної моторної кори (шари I—VI) первинними антитілами білка NuR. Збільшення 5

Клітини Беца і дрібніші нейрони контрольного препарату інтенсивно і однорідно забарвлені та рівномірно розподілені. Своєю чергою на зрізі препарату ХРН візуалізуються ділянки без нейронів (товста стрілка) і менш інтенсивно забарвлені NuR⁺- нейрони з ознаками дегенерації (тонка стрілка): Зменшення в розмірах, редукування кількості і арборизації дендритів. Також

на мікрофотографії помітні деякі мотонейрони шару V згруповані в кластери по 2—3 клітини, чого не спостерігається в контрольному препараті (рисунку 5.3).

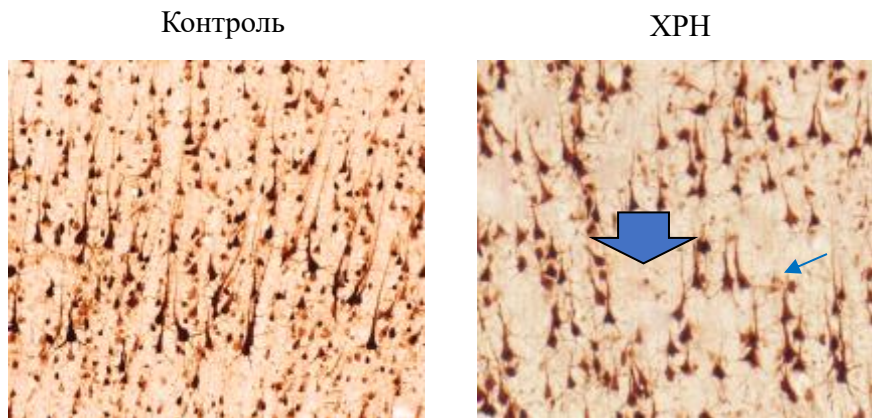


РИСУНОК 5.3. Імуногістохімічне фарбування 30 мкм зрізів зони первинної моторної кори (шар V) первинними антитілами білка NuR.

NuR⁺-нейрони демонструють різну морфологію. Збільшення 20

Результати докладного морфометричного дослідження кількості мотонейронів в первинній моторній корі наведено на рисунку 5.4.

Виявлено, що кількість NuR⁺-клітин, розмірами більше 60 мкм², в 30 мкм зрізах моторної кори у пацієнтів з ХРН статистично значуще менша, ніж у контролі ($p = 0,0468$), особливо в шарі V ($p = 0,0225$).

Значне зменшення кількості NuR⁺-нейронів у нижньому сегменті моторної кори виявлено у пацієнтів з ХРН порівняно з контролем ($p < 0,001$) як у шарі III, так і V ($p = 0,0218$ і $p < 0,001$ відповідно).

Не виявлено суттєвої різниці щодо кількості NuR-позитивних клітин у верхньому сегменті моторної кори або потиличної кори між контрольними пацієнтами та пацієнтами з ХРН.

Значне збільшення кількості NuR-позитивних нейронів у середньому сегменті моторної кори у хворих на ХРН порівняно з контролем ($p = 0,0012$), зокрема у шарі V ($p < 0,001$).

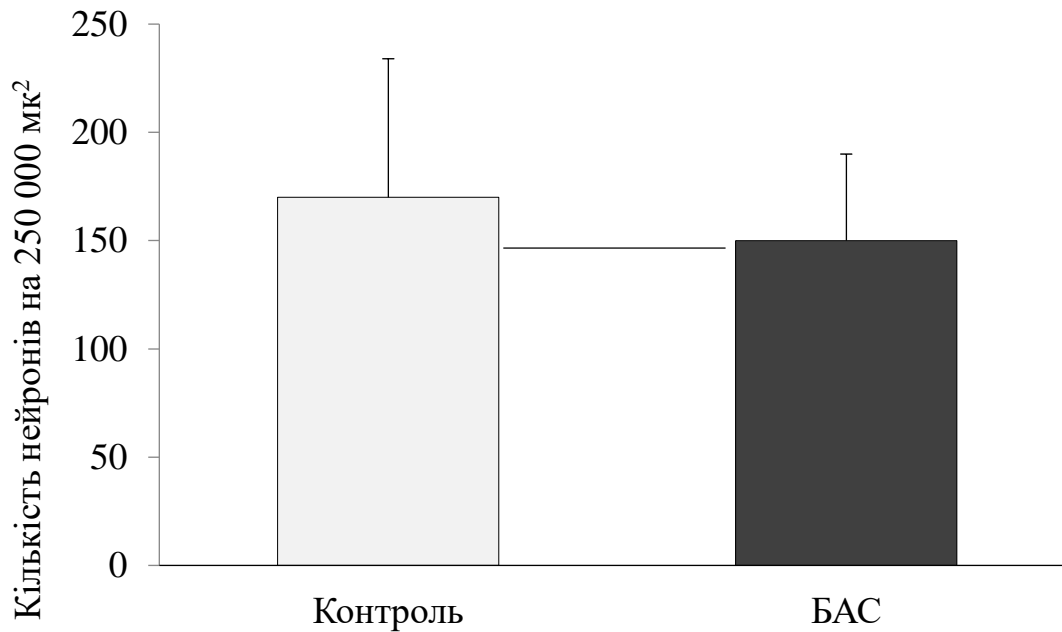
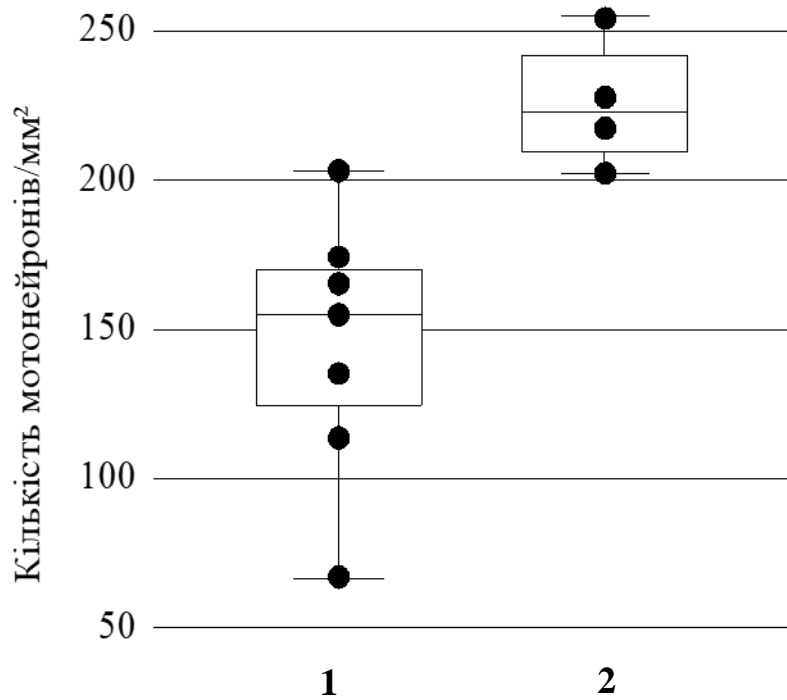


РИСУНОК 5.4. Кількість HuR-позитивних нейронів. Моторна кора. Шар V ($p = 0,0225$)

Аналіз щільності HuR-позитивних мотонейронів не виявив статистично значущої різниці між верхнім, середнім і нижнім сегментами моторної кори у окремих пацієнтів. Також не було різниці за цим показником між жінками та чоловіками, та між різними дебютами захворювання (бульбарний дебют порівняно з шийним порівняно з поперековим дебютом).

Середня щільність HuR-позитивних мотонейронів значно варіювала між різними пацієнтами та становила від 65 до 255 кл./мм², у середньому 173 кл./мм² (стандартне відхилення — кл./мм²).

Аналіз умісту HuR-позитивних нейронів засвідчив статистично значуще ($p < 0,05$) збільшення їхньої кількості у пацієнтів з мутаціями *C9orf72/SOD1* порівняно з пацієнтами без мутацій (у середньому 225 та 155 кл./мм² відповідно; рисунок 5.5).



*РИСУНОК 5.5. Щільність мотонейронів в моторній корі:
1 – пацієнти без мутацій, 2 – пацієнти з мутацією C9orf72/SOD1*

5.3. Білок Glut-1

Glut-1 (глюкозний транспортер-1) — білок, що є основним переносником глюкози через клітинні мембрани в тканини головного і спинного мозку, експресується в еритроцитах, кодується геном *SLC2A* розташованим на 1-й хромосомі [13, 14].

Glut-1 є одним з компонентів ГЕБ, він не експресується у нейронах [15]. Точніше Glut1 експресується в ендотелії, який вкриває мікросудинну мережу білої та сірої речовини головного та спинного мозку [16].

Присутність Glut1 на ендотелії мікросудин та закінченнях відростків астроцитів свідчить про велике значення цього переносника для переміщення глюкози через ГЕБ в астроцити [17].

Церебральна ішемія призводить до надмірної експресії білка Glut-1 в мікросудинах і паренхімі мозку і найімовірніше є адаптаційною реакцією на клітинний стрес [18].

5.4. Зміни мікросудинної мережі

На мікрофотографіях гістологічних зрізів ПМК видно вищу інтенсивність фарбування антитілами Glut-1 ендотелію мікросудин автопсійного матеріалу отриманого від пацієнтів з ХРН порівняно з контролем.

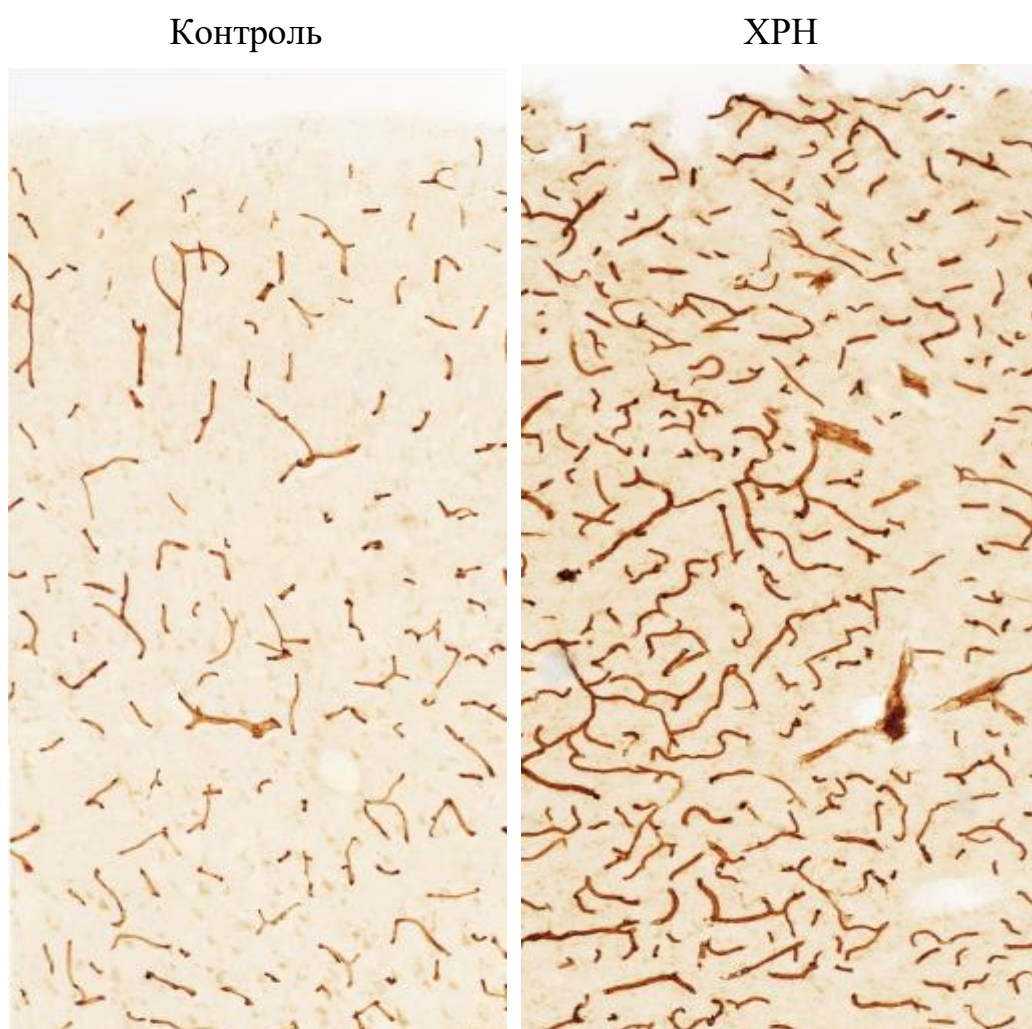


РИСУНОК 5.6. Імуногістохімічне фарбування зони первинної моторної кори (шар I—V) первинними антитілами білка Glut-1. Збільшення 5

Видимі зміни мікросудинної мережі у пацієнтів з ХРН:

- збільшення щільності мікросудин;
- розширення діаметру просвіту деяких судин;
- порушення геометрії судинного малюнка (збільшення вигинів і звивистості; рисунок 5.6).

Дистрофічні зміни видимі на гістологічних препаратах зони ПМК у пацієнтів з ХРН значною мірою стосуються внутрішнього шару судин, що особливо помітно по значному збільшенню діаметра просвіту та стоншення (стрілка) судинної стінки. Асиметричне потовщення деяких ділянок стінки судин. Стінка має дисморфічний вигляд. Подібні патогістологічні зміни в ПМК ми спостерігали у 8 з 11 пацієнтів з хворобою мотонейрона.

Своєю чергою в ендотеліальних клітинах контрольних препаратів (в судинах середнього розміру) видиме рівномірне фарбування судинної стінки, без розширення діаметру і без збільшення гіллястості судинної мережі (рисунок 5.7).

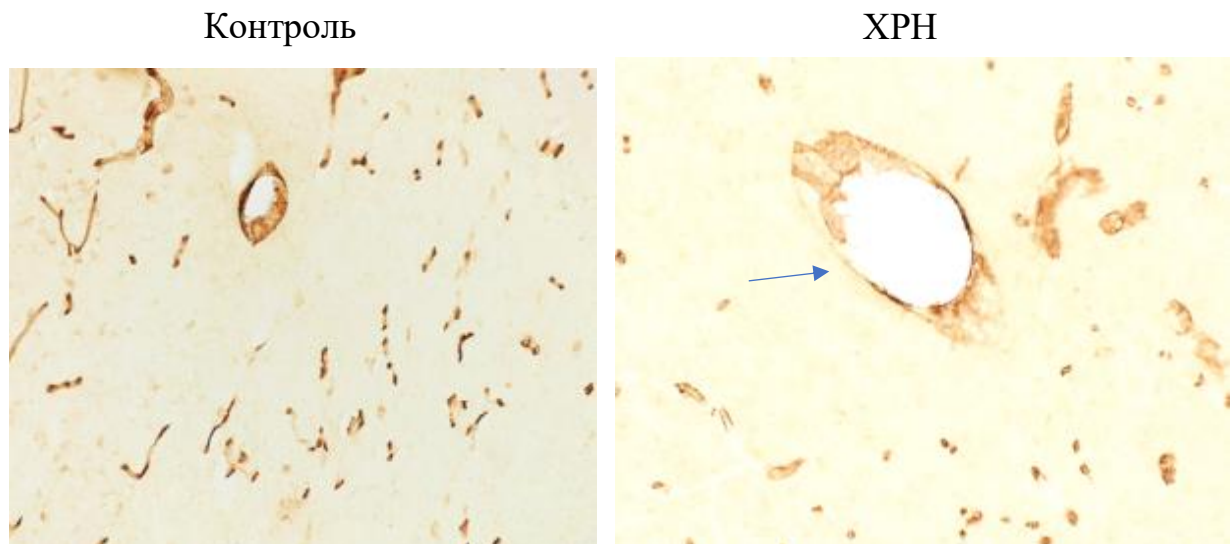


РИСУНОК 5.7. Імуногістохімічне фарбування зони первинної моторної кори (шар V) первинними антитілами білка Glut-1. Збільшення 20

Ми виявили статистично значуще ($p = 0,0020$) триразове збільшення щільності мікросудин (5,1 порівняно 15,8 %) у ПМК у пацієнтів з БАС порівняно з контрольною групою (рисунок 5.8).

Схожі гістопатологічні дані (збільшення щільності мікросудин у пацієнтів з хворобою мотонейрона, зокрема в сірій речовині поперекового відділу хребта) одержали й інші автори [19].

Збільшення щільності і деякі інші ознаки ангиогенезу спостерігають також і за деяких нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Альцгеймера, що може вказувати на зміну цілісності гематоенцефалічного бар'єра головного мозку [20].

Ці ушкодження мікросудинного бар'єра можуть демонструвати нейроваскулярні причини, що негативно впливають на патогенез БАС.

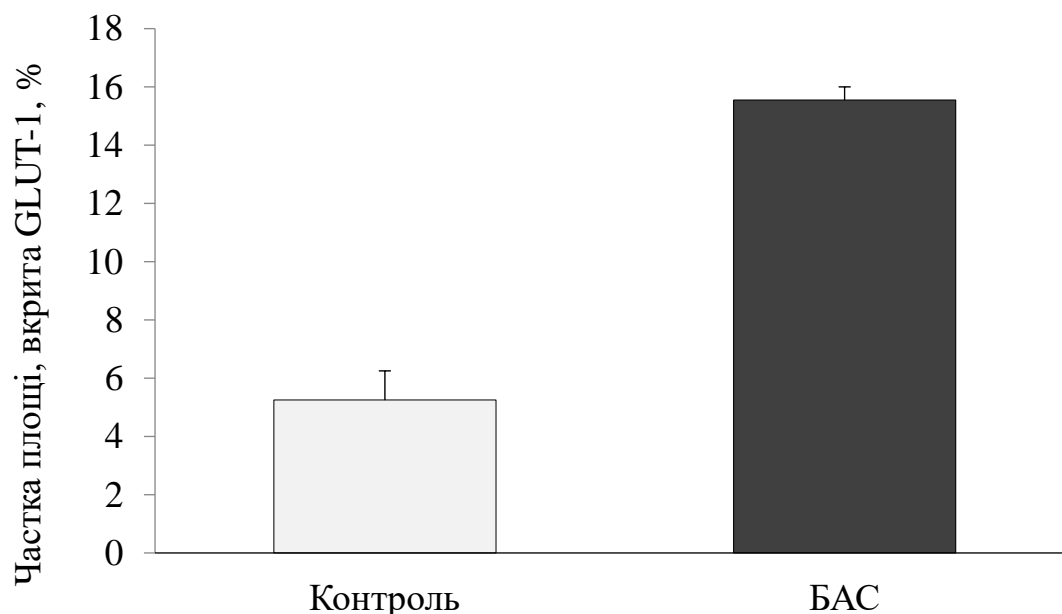


РИСУНОК 5.8. Щільність мікросудин первинної моторної кори

5.5. Роль клітин мікрооточення мотонейронів в перебігу хвороби рухового нейрона

Дисфункція олігодендроцитів в моторній зоні кори головного мозку

Наступним нашим завданням було визначення можливої первинної дисфункції олігодендроцитів в моторній зоні кори головного мозку у пацієнтів із ХРН.

На мишачій моделі ХРН з точковою мутацією *SOD1-G93A* було показано, що олігодендроцити залучені в патологічний процес на рівні спинного мозку (спостерігається зменшення кількості клітин, збільшується їх проліферація) [21].

PLP — це інтегральний білок, який є основним структурним компонентом мієліну і сприяє стабільності та компактності його структури, є маркером дисфункції олігодендроцитів [22].

Аналіз імуофарбування протеоліпідного білка у ПМК 11 пацієнтів з БАС і імуоблотинга для PLP не виявив осередків демієлінізації або значного зниження інтегральних білків мієліну, що свідчить про відсутність первинної дисфункції олігодендроцитів у зоні верхнього і середнього сегментів моторної кори у когорти пацієнтів з БАС (рисунок 5.9).

Проте виявлено, що нижні сегменти моторної кори мають статистично значуще нижчу ($p < 0,05$) порівняно з верхнім і середнім сегментами моторної кори щільність мієліну, яка визначається імуногістохімічним методом (на 4 % та 19 % відповідно).

При імуногістохімічному фарбуванні PLP у ПМК не виявлено демієлінізувальних уражень, які виявляють, наприклад, при розсіяному склерозі [23].

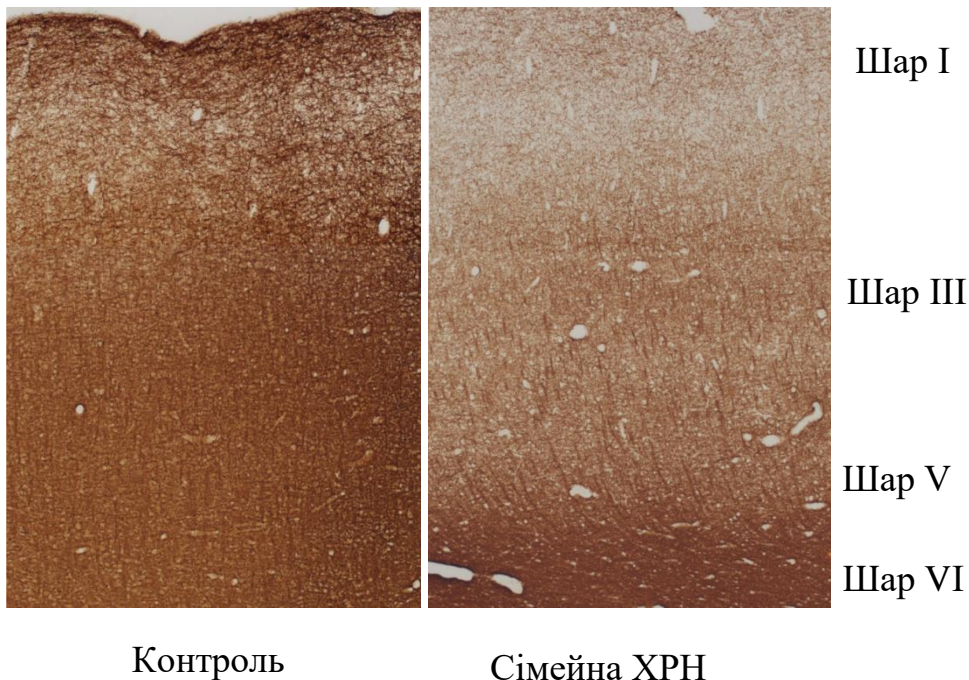


РИСУНОК 5.9. Імуногістохімічне фарбування тканин первинної моторної кори з використанням первинних антитіл протеолітного білка

Полідендроцити (NG2-клітини)

Варто звернути увагу на унікальні та маловивчені гліальні клітини-полідендроцити. Останніми роками вивченню NG2-клітин приділяють достатньо багато уваги.

NG2-клітини (нейронний/гліальний антиген 2), або полідендроцити, становлять собою особливу популяцію нейрогліальних клітин в головному і спинному мозку людини, які значно відрізняються від інших гліальних клітин: олігодендроцитів, астроцитів, мікроглій, а також нейронів.

У відповідь на різні чинники, що ушкоджують ЦНС, такі як вірусна інфекція, травма спинного мозку, ішемія та інші, полідендроцити активуються, піддаючися гіпертрофії, при цьому збільшується арборизація відростків та зростає кількість самих клітин в місці пошкодження тканини [24, 25].

Цікаво, що у трансгенних тварин при церебральній гіперперфузії фермент матрична металопротеїназа-9 (ММР-9), який продукують полідендроцити негативно впливає на ендотеліальні клітини судин, що призводить до дезінтеграції ГЕБ [26].

Численні наукові дані (фізіологічні та морфологічні) на тваринних моделях безпосередньо вказують на те, що NG2-клітини мають прямі синаптичні контакти з різними нейронами [27].

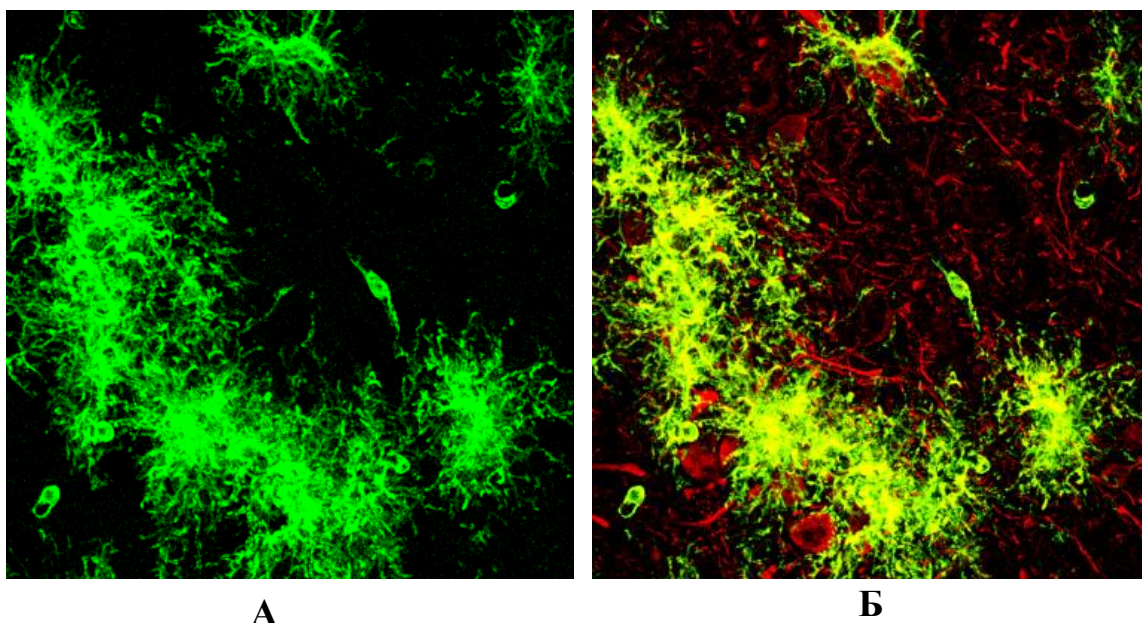


РИСУНОК 5.10. Конфокальна мікроскопія. Імуногістохімічне забарвлення первинними антитілами NG2-клітин (зелений) і нейроспецифічними первинними антитілами MAP2 (червоний). А - NG2-клітини; Б — накладення зображень (мотонейрони показано червоним). Збільшення 60

На рисунку 5.10 наведено приклад реактивних NG2-клітин, які мають велике тіло і багато товстих біля основи, не розгалужених відростків. Клітини згруповані в кластери, перебувають у тісному контакті з мотонейронами як клітини-сателіти. Найбільшу кількість таких реактивних полідендроцитів виявляли у глибоких відділах неокортексу ПМК (шари V—VI).

Загалом у когорті пацієнтів з ХРН щільність полідендроцитів NG2⁺ у різних сегментах моторної кори суттєво не різнилася та в зоні верхнього, середнього та нижнього сегмента у середньому становила 136, 128 та 133 NG2⁺/мм² відповідно (рисунок 5.11).

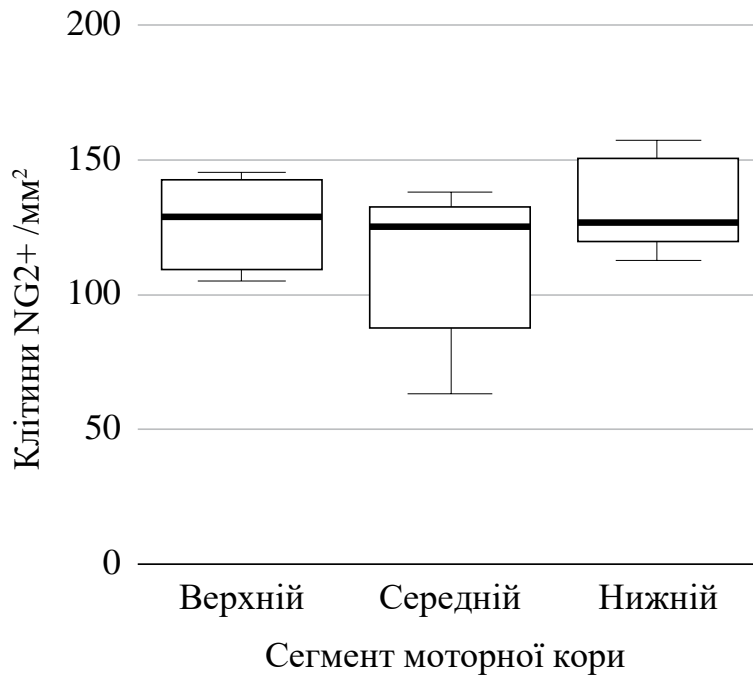


РИСУНОК 5.11. Щільність полідендроцитів NG2⁺ в різних сегментах моторної кори

Проте виявлено статистично значущу ($p = 0,02$) різницю щодо щільності нейрогліальних клітин у V та III шарі моторної кори (в середньому 137 та 116 NG2⁺/мм² відповідно; рисунок 5.12).

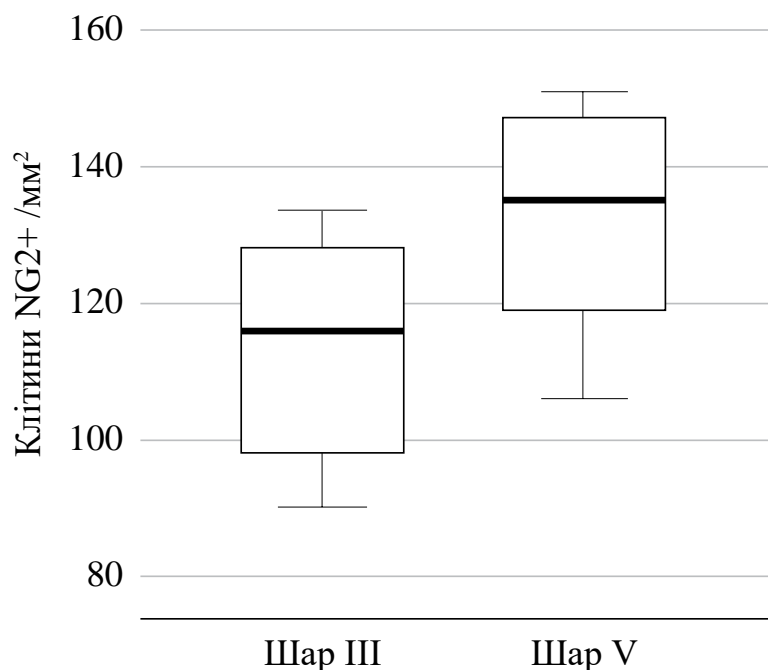


РИСУНОК 5.12. Щільність полідендроцитів NG2⁺ у V та III шарі моторної кори

Подібну картину гістопатологічного дослідження реактивних змін клітин NG2 в руховій корі на рівні клітин Беца отримали й інші автори [28] .

Ми першими продемонстрували велику кількість амебоїдних, добре помітних клітин-полідендроцитів (NG2) зі стовщеними біля основи, та слабо розгалуженими відростками, згрупованими у реактивні кластери, що оточують нейрони. Такі реактивні кластери розташовувалися переважно у V шарі моторної кори (див. рисунок 5.12). Ми припускаємо, що ці характерні зміни NG2 глії та її проліферація є однією з ланок патологічного процесу при ХРН, важливість якої ще належить з'ясувати.

Астроцити

Ще одним ключовим елементом нейроваскулярної одиниці є досить гетерогенна популяція клітин, а саме — астроцити.

Вони мають вкрай важливе значення для ЦНС: перш за все виконують трофічну функцію, а також вони формують та ремоделюють синаптичний апарат [29, 30], коригують рівні різних іонів і гомеостаз води, контролюють рівень нейротрансмітерів [31], формують ГЕБ і моделюють основні процеси, що перебігають у ньому. Астроцити також беруть участь в процесах нейроангіогенеза, секретуючи, наприклад, фактор росту ендотелію судин [32].

Підвищена проникність ГЕБ властива низці неврологічних захворювань, зокрема: епілептичні судоми, травми головного і спинного мозку, хвороба Паркінсона і ХРН [33].

Експеримент спільного культивування астроцитів пацієнтів, померлих від ХРН, і культури мотонейронів засвідчив нейротоксичність таких астроцитів, а їхня присутність призводить до загибелі мотонейронів [34].

У модельних трансгенних тварин реактивні астроцити стимулюють агрегацію білкових молекул за допомогою трансформівного фактора росту b1, який перериває нормальний процес автофагії [35].

Експерименти на моделях тварин засвідчили, що експресія патологічного білка TDP43 (характерного для ХРН) в астроцитах викликає загибель оточуючих нейронів, аксонів і прогресування атрофії відповідних м'язів [36].

Буферизація глутамату — важлива специфічна функція астроцитів. У збудливих синапсах нейтралізація надлишку глутамата потрібно для оптимальної синаптичної передачі імпульсу, а накопичення глутамату призводить до дефекта мотонейронів при ХРН [37].

Основною причиною його накопичення в позаклітинному просторі є істотне зниження білка переносника збуджуючих амінокислот (EAAT2). Такий механізм ексайтотоксичності описано як у моделей тварин з ХРН (СОД1-G93A) так і у пацієнтів [38].

Астроцити досить гетерогенна група гліальних клітин. Астроцити людини мають набагато більший діаметр та більшу кількість відростків порівняно з гризунами. Вони організовані в унікальні домени, що не перекриваються і включають як мікросудини, так і нейрони.

Згідно з даними літератури, людські астроцити поділяються на кілька підкласів, кожен з яких має свою спеціальну функцію.

(А)-Класифікація астроцитів людини

У шарі I кори головного мозку можна виявити **інтерламінарні астроцити** з довгими, звивистими відростками, які виконують роль сполучних компонентів різних шарів ПМК.

У шарі II—VI переважають **протоплазматичні клітини** астроглії, завданням яких вважається інформаційна інтеграція.

У шарі V та VI знаходяться поляризовані **уніполярні астроцити**, які найімовірніше виконують метаболічну функцію.

Фіброзні астроцити розташовуються ще нижче в білій речовині, їхньою особливістю множинні короткі, розгалужені відростки, їх основною функцією є метаболічна підтримка нейронів [39, 41].

Найновіші дані про роль астроцитів при нейродегенеративних процесах вказують на наявність у ЦНС двох типів реактивних астроцитів — A1 та A2. Астроцити типу A2 відіграють традиційну захисну роль, завдяки різним нейротрофічним факторам, що беруть участь зокрема в регенерації мозкової тканини.

Своєю чергою астроцити типу A1 під час нейрозапальних процесів під впливом активованої мікроглії та виділення TNF, C1q та інших факторів в цілому втрачають протекторний вплив на нейрони та олігодендроцити, що прискорює їхню загибель. Цей феномен було продемонстровано не лише на моделях тварин, але й на автопсійному матеріалі пацієнтів із хворобою Паркінсона, хворобою Альцгеймера та при ХРН [42].

Цікавим є той факт, що активована мікроглія сама по собі не здатна призвести до загибелі нейронів, а лише спільно з пулом A1-астроцитів, здатних виділяти зокрема нейротоксини та компоненти комплементу, які руйнівні діють на синапси [43].

Виходячи з перерахованих вище чинників детальне дослідження морфологічних особливостей астроцитів при патології мотонейронів є досить важливим питанням.

Нашим завданням було вивчити структурні особливості реактивних астроцитів та їхню локалізацію у ПМК контрольних тканин та автопсійного матеріалу пацієнтів із ХРН. Ми обрали найвідоміший метод маркування астроглії за допомогою фібрилярного гліального кислого білка GFAP.

Гліоспецифічний білок GFAP (50 кДа), який зараховують до 3-го класу філаментів, знаходиться у проміжних філаментах, він присутній як у зрілих клітинах, так і у астроглії, що диференціюється, а також в шваннівських клітинах.

Першорядною функцією проміжних філаментів є збереження цілісності цитоскелету астроцитів.

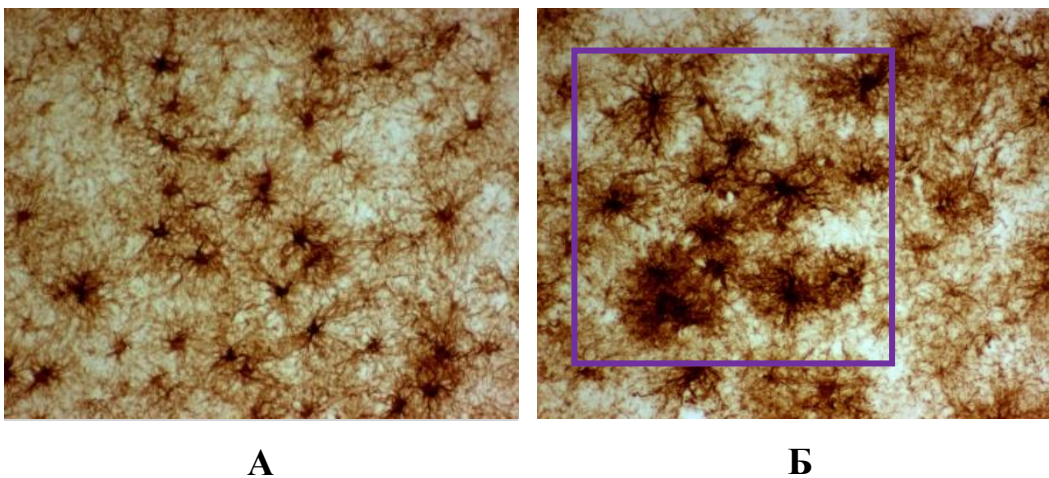
Використання антитіл до GFAP для імуногістохімічного фарбування астроцитів дало можливість описати нову, специфічну для неокортексу приматів форму астроглії, так звані трансламінальні астроцити з дуже довгими відростками, які проходять одразу через I—IV шари ПМК.

Посилення експресії GFAP виявляють за різних пошкоджень ЦНС: нейродегенеративних захворюваннях, зокрема при ХРН, хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона, а також епілепсії, черепно-мозковій травмі тощо. При цьому в тканинах мозку спостерігають реактивний астрогліоз, у вигляді розширених потовщених відростків, гіпертрофії і збільшення кількості астроцитів [44].

Аномальна кластеризація астроцитів (шари II–IV) спостерігали у 10 з 12 випадків, зразки мали від 3 до 48 аномальних кластерів/ділянок. Кожен складався з 2 до 19 активованих астроцитів.

У таких ділянках астроглія зазнає виражених морфологічних змін, гіпертрофію тіла клітини, скорочення та потовщення відростків з одночасним зниженням рівня їхньої арборизації.

Також чітко візуалізуються домени сусідніх астроцитів, що перекриваються (рисунок 5.13).



*РИСУНОК 5.13. Порушення морфології і розподілу астроцитів:
А — спорадична ХРН з вираженим дифузним астрогліозом у сірій речовині;
Б — спорадична ХРН з вираженим астрогліозом та реактивними
кластерами астроцитів у сірій речовині. Збільшення 20*

(Б)-Кластери реактивних астроцитів у ПМК

У пацієнтів із сімейний типом ХРН (*SOD1*) не спостерігали скупчення реактивних астроцитів у ПМК, що зазвичай спостерігалось при спорадичних випадках. При сімейній ХРН кластери астроцитів не оточували нейрони (рисунок 5.14). Ці свідчать про те, що скупчення астроцитів може бути вторинним процесом і безпосередньо не пошкоджувати моторні нейрони.

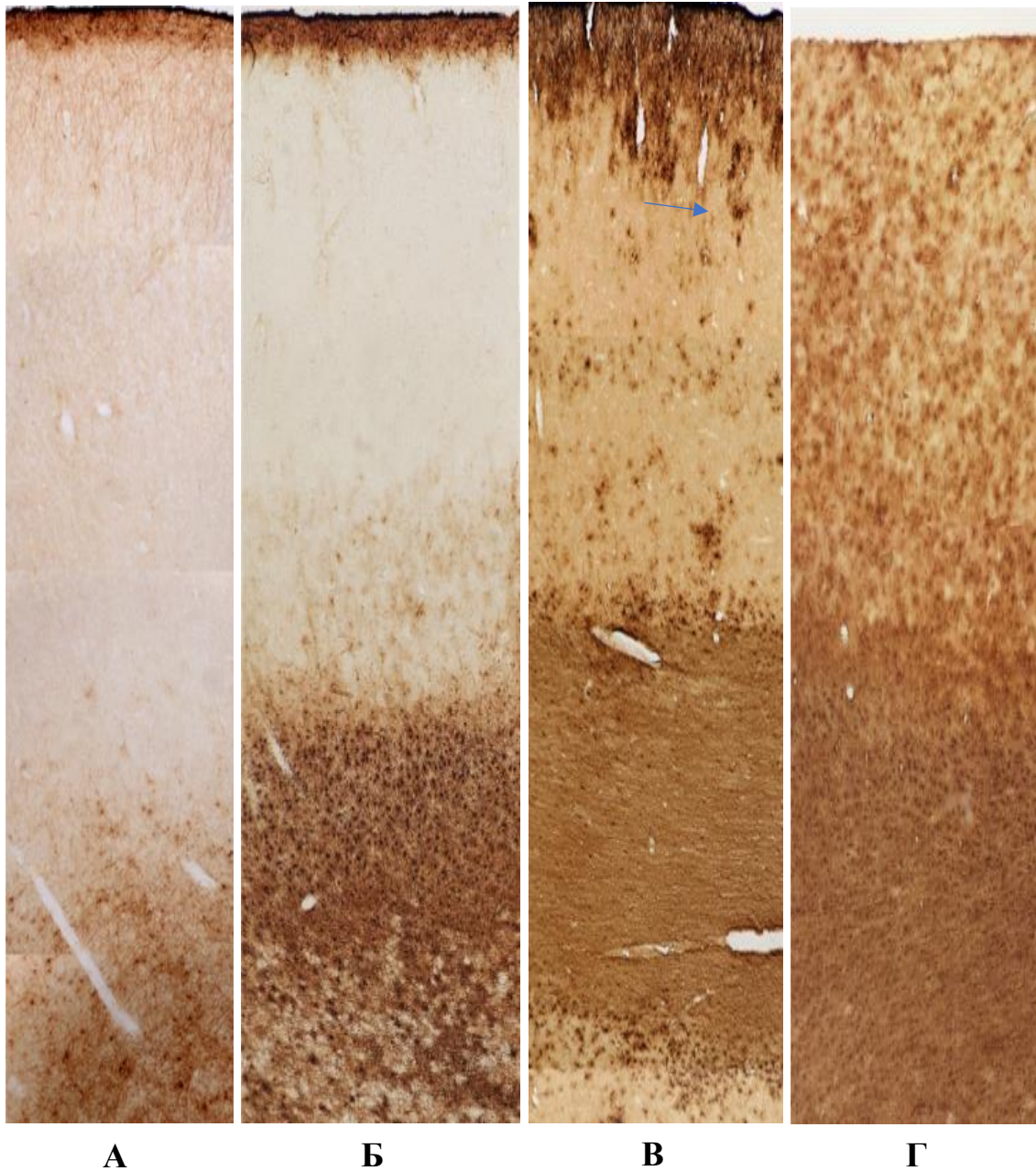


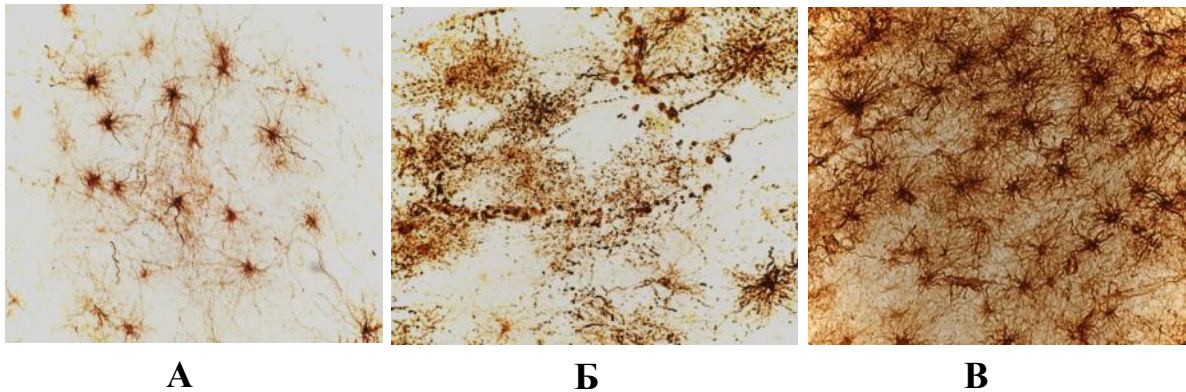
РИСУНОК 5.14. Реактивність астроцитів при ХРН. Імуногістохімічне фарбування зони первинної моторної кори (шар I—V) проводили первинними антитілами проти білка GFAP.

A — контроль; Б — сімейний тип ХРН (SOD1), легкий астрогліоз винятково в білій речовині рухової кори; В — спорадичний тип ХРН з помірним астрогліозом та реактивними кластерами астроцитів у сірій речовині (стрілка); Г — спорадична ХРН з вираженим дифузним астрогліозом у сірій і в білій речовині. Збільшення 5

(В)-Астрогліоз у білій речовині

Дослідження виявили в препаратах спинного мозку *SOD1*-трансгенних мишей не тільки астрогліоз, а й ознаки дегенерації астроглії у вигляді округлих GFAP-позитивних клітин [45].

У пацієнтів із сімейним типом ХРН (*SOD1*) у в білій речовині ПМК виявлено не тільки астрогліоз, але що цікавіше, незвичайну морфологію клітин глії, у вигляді астроцитарних бляшок з аномальними бісерними, сегментованими відростками, що може свідчити про ранні фокальні, дистрофічні зміни астроцитів у білій речовині (рисунок 5.15)



*РИСУНОК 5.15. Астрогліоз у білій речовині ПМК, імуногістохімічне фарбування 30 мкм зрізів білої речовини мозку антитілами GFAP: А — контрольна тканина; Б — мутації *SOD1*, гіпертрофічні та видовжені астроцити з аномальними бісерними, сегментованими відростками, фокальна дегенерація астроцитів у підкірковій білій речовині; В — спорадична форма ХРН, виражений астрогліоз фіброзних астроцитів. Збільшення 20*

5.6. Екстравазація фібриногена

Фібриноген - великий (340 кДа) білок плазми крові, синтез якого відбувається в печінці. Під час утворення тромбу за допомогою ферменту тромбіну він розщеплюється до фібрину, утворюючи білі нитки (так звані

фібрин-полімери). Фібриноген має ключове значення для гомеостазу, сприяє агрегації тромбоцитів. Він також відіграє вагомий роль в запальних реакціях, опосередковано взаємодіє з багатьма білками в кровоносному руслі та на поверхні різних клітин поза ним [46].

Важливість фібриногена не обмежується тромботворенням. Ця молекула має унікальну здатність проникати через ГЕБ при низці таких патологічних станів ЦНС як: ХРН, розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера, травматичне пошкодження головного і спинного мозку.

Під час нещодавніх досліджень тканин спинного мозку при ХРН виявлено досить великі білки плазми (фібрин, тромбін, IgG), а також пошкодження дрібних судин і зменшення кількості перицитів, що вказує на підвищену проникність ГЕБ [47].

Фібриноген, потрапляючи через пошкоджений ГЕБ в головний або спинний мозок викликає активацію клітин мікроглії, пригнічення активності NG2-глії (полідендроцитів), виражене пошкодження аксонів, реактивний клітинний астрогліоз. Прозапальна функція фібриногена реалізується через взаємодію з інтегринами (CD11b—CD18) мікроглії, що сприяє нейрозапальним змінам в паренхімі мозку.

При деяких неврологічних захворюваннях з підвищеною проникністю ГЕБ спостерігається виражене порушення очищення від фібрину за рахунок активації інгібітора активатора плазміногена 1 (РАІ1). Тривале відкладення фібрину в паренхімі ЦНС сприяє нейрозапальним процесам та нейродегенерації [48].

Ще одним підтвердженням даних постулатів є дослідження гістологічних матеріалів при розсіяному склерозі. Було показано, що фібрин локалізується навколо судин головного мозку разом з кластерами мікроглії, а також клітинами CD68 і клітинами МНСІІ недемієлінізованих ділянок. Своєю чергою фібрин рівномірно розташовується в демієлінізованих

вогнищах, він колокалізований з аксональними і астроцитарними відростками. Патологічні відкладення фібриногена знаходять у премоторній корі посмертних препаратів пацієнтів із розсіяним склерозом і це взаємопов'язано зі зменшенням щільності нейронів [49, 50].

Іншим прикладом патологічного впливу фібрину може слугувати локалізація його в ділянках разом з амілоїдними бляшками і дистрофічно зміненими дендритами нейронів в автопсійному матеріалі хворих з хворобою Альцгеймера [51].

Виходячи з перерахованого вище, фібриноген як один з важливих білків плазми, який виявляють у паренхімі ЦНС за різних патологічних станів, може слугувати гістологічним маркером дисфункції ГЕБ.

Ми провели гістологічний аналіз автопсійних тканин первинної моторної кори пацієнтів з ХРН. Виявлено характерні особливості екстравазації фібриногена за різних дебютів ХРН. Три випадки з поперековим/шийним дебютом та три випадки з бульбарним дебютом (рисунки 5.16).

При бульбарному початку захворювання спостерігали відкладення фібриногена (інтенсивне коричневе забарвлення), частіше навколо великих судин, у вигляді так званих периваскулярних «комірців», переважно у сірій речовині ПМК (рисунки 5.17). При поперековому/шийному дебюті відзначено дифузний розподіл фібриногена як в сірій, так і білій речовині ПМК, без утворення помітних периваскулярних «комірців». Це може свідчити про різний ступінь пошкодження ГЕБ за різних дебютів ХРН.

Подібна гістопатологічна картина властива і препаратам тканин, отриманим від хворих на розсіяний склероз.

Фібриноген здатний стимулювати активацію імунних реакцій, викликаючи локальні нейроінфламаторні процеси, які пошкоджують як

мієлінові оболонки, що покривають аксони, так і безпосередньо нейрони, внаслідок чого виникають нові вогнища демієлінізації [52].

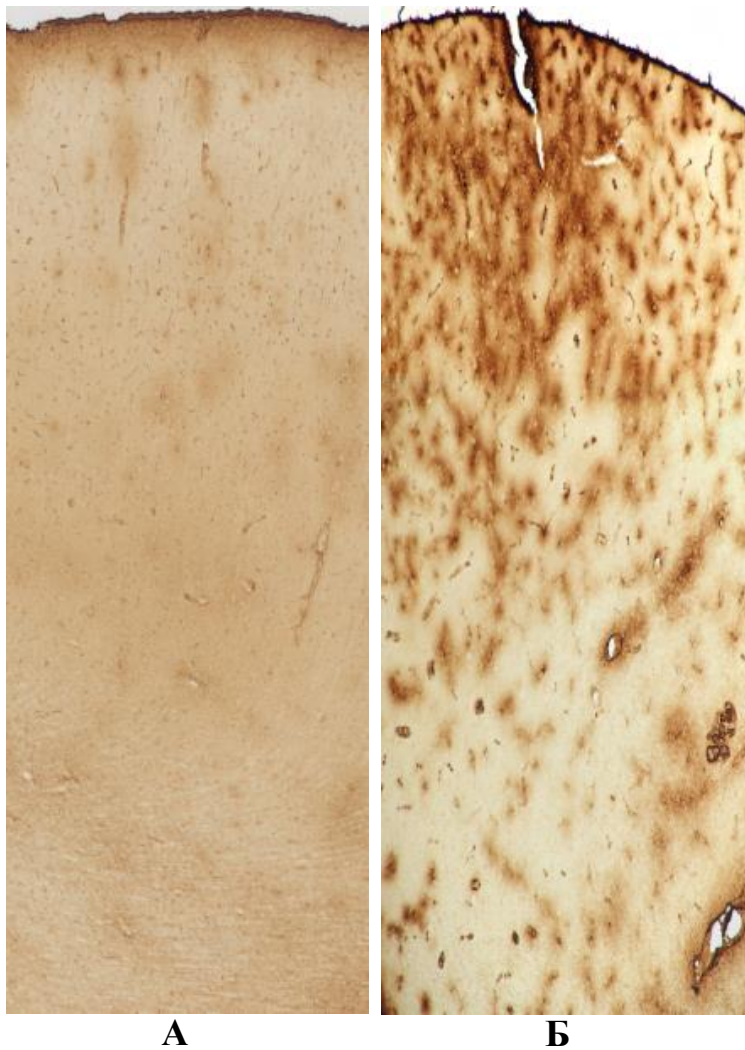
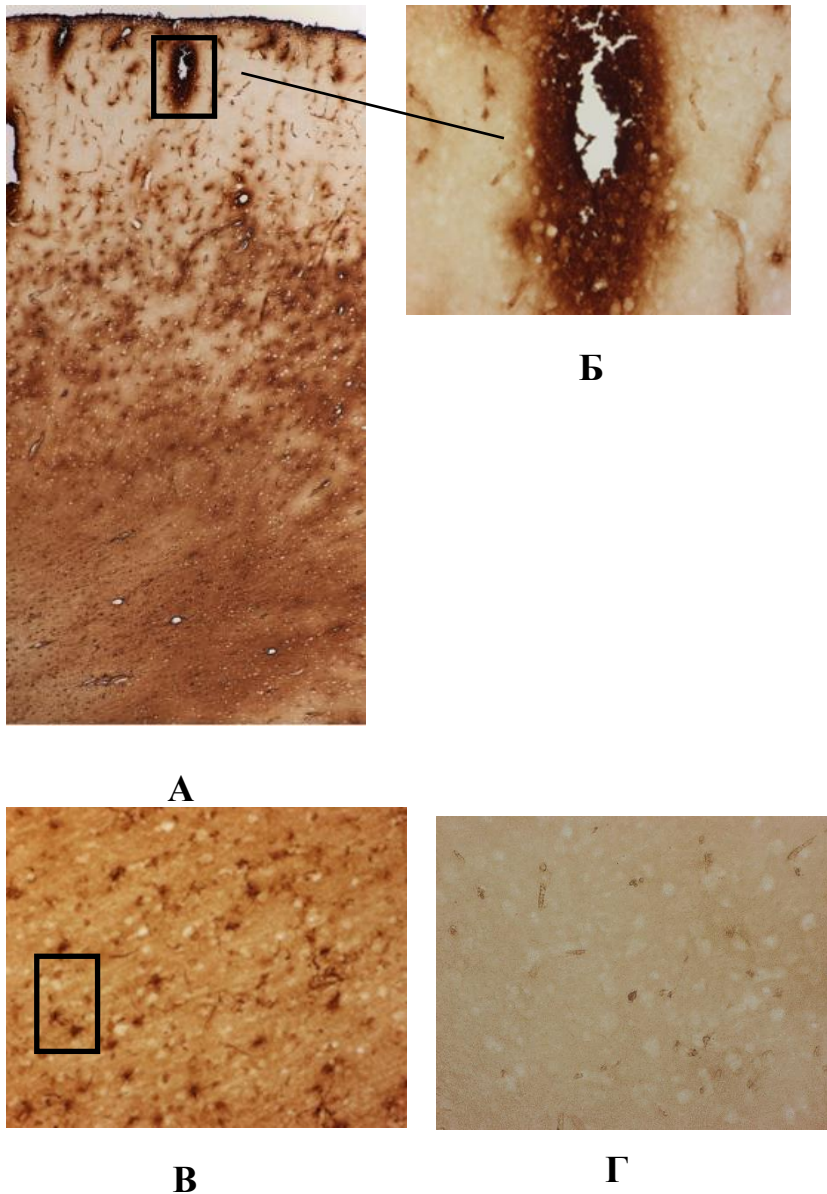


РИСУНОК 5.16. Імуногістохімічне фарбування тканин ПМК з використанням первинних поліклональних антитіл до фібриногена (1:5000; шар I—V): А - шийно-грудна форма ХРН; Б – бульбарна форма ХРН. Збільшення 5



*РИСУНОК 5.17. Імуногістохімічне фарбування тканин ПМК з використанням первинних поліклональних антитіл до фібриногена. Шари I—V + біла речовина:
 А - бульбарна форма ХРН. Збільшення 5;
 Б - периваскулярний «комірець» фібриногена. Збільшення 20;
 В - фібриноген в клітинах з астроцитарною морфологією (прямокутник). Збільшення 20;
 Г - контроль. Збільшення 20*

На відміну від наведеного вище прикладу з розсіяним склерозом, у препаратах ПМК пацієнтів з ХРН вогнищ демієлінізації виявлено не було.

Для шару III моторної кори виявлено обернено пропорційний зв'язок між кількістю нейронів та площею поверхні, вкритої фібриногеном (таблиця 5.1; рисунок 5.18). У V шарі моторної кори це сильний статистично значущий зв'язок ($r = -0,84$; $p = 0,018$). Якщо площа поверхні, вкритої фібриногеном, не перевищує 10 %, то щільність мотонейронів не перевищує 200 кл. на 250 000 мк^2 ($P_1 = 0,05$; $\varphi = -1$, $p = 0,014$) (таблиця 5.2; рисунок 5.19).

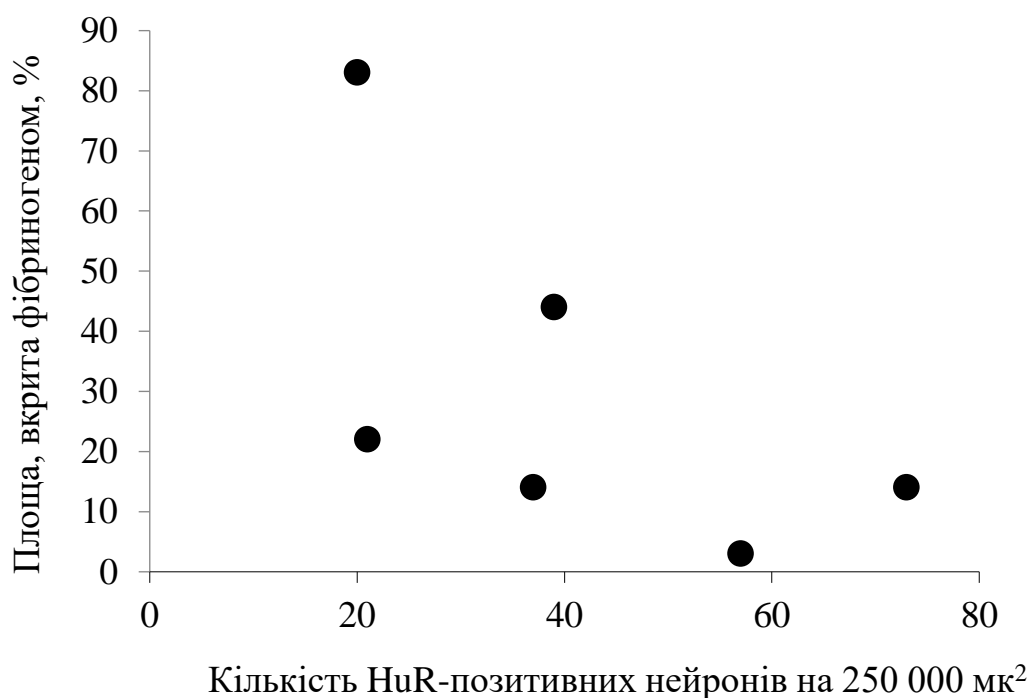


РИСУНОК 5.18. Зв'язок між кількістю HuR⁺-нейронів та площею поверхні, вкритою фібриногеном. Моторна кора. Шар III

ТАБЛИЦЯ. 5.1. Кількість HuR^+ -нейронів та площа поверхні, вкритої фібриногеном. Моторна кора. Шар III

Площа, вкрита фібриногеном, %	Кількість HuR^+ -клітин на 250 000 μm^2
83	20
22	21
44	39
14	37
3	57
14	73

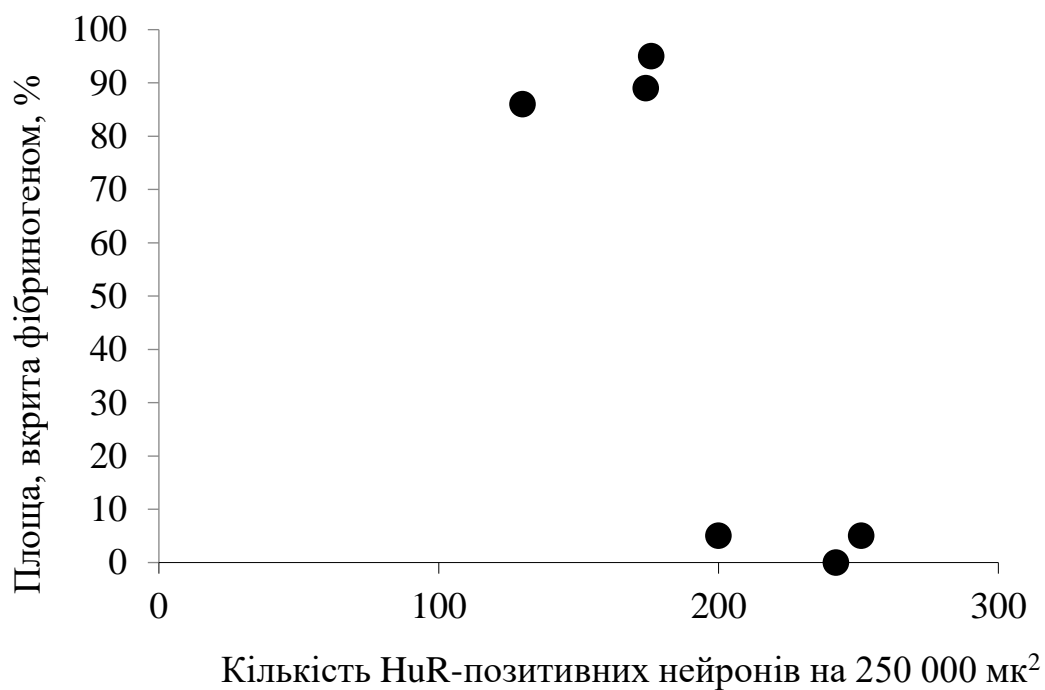


РИСУНОК 5.19. Зв'язок між кількістю HuR^+ -нейронів та площею поверхні, вкритою фібриногеном. Моторна кора. Шар V

Таблиця. 5.2 Кількість HuR^+ -нейронів та площа поверхні, вкритої фібриногеном. Моторна кора. Шар V

Кількість NuR ⁺ -клітин на 250 000 мкм ²	Площа, вкрита фібриногеном, %	Кількість NuR < 200 кл.	Площа < 10 %
130	86	+	–
174	89	+	–
176	95	+	–
200	5	–	+
242	0	–	+
251	5	–	+
r = -0,84; p = 0,018		P ₁ = 0,05; φ = -1, p = 0,014	

r — коефіцієнт кореляції Пірсона, *p* – рівень значущості; *P*₁ — односторонній точний критерій Фішера; *φ* – тетракоричний коефіцієнт кореляції.

Це спостереженням видається важливим, оскільки саме у кортикальному шарі V кори головного мозку виявляють значне зниження кількості клітин Беца, а також ГАМКергічних інтернейронів, що характерно для ХРН [53].

За нашими даними саме у цьому регіоні ПМК спостерігається значна екстравазація фібриногена, який імовірно опосередковано руйнівню діє на нейрони.

Вивчення автопсійного матеріалу від пацієнтів з ХРН має свої обмеження, одним з яких є неможливість вивчити хворобу на ранніх стадіях патологічного процесу. Проте така можливість є для трансгенних моделей мишей. Цікаві дані опубліковано групою дослідників (Davalos et al.), які вивчили вплив фібриногена *in vivo* за допомогою двофотонного лазера, використовуючи метод ін'єкції фібриногена безпосередньо в кору головного мозку миші та спостерігали реакцію мікроглії. Було помічено, що мікроглія активується протягом перших 30 хв, потовщенням тіла і відростків, а також з

утворенням запальних кластерів, в подальшому цей процес викликає осередки демієлінізації. Цікавим видається той факт, що інші білки плазми, введені аналогічним способом подібної реакції мікроглії не викликали [54].

Ще одним переконливим доказом негативної дії фібриногена є досліди з моделями тварин з мутантними перицитами. У них знаходять відкладення фібрину на ранніх стадіях розвитку, який на думку вчених викликає дегенерацію нейронів, незважаючи на те, що у цих мишей не знаходять вираженої нейрозапальної відповіді з боку центральної нервової системи на початкових стадіях захворювання [55].

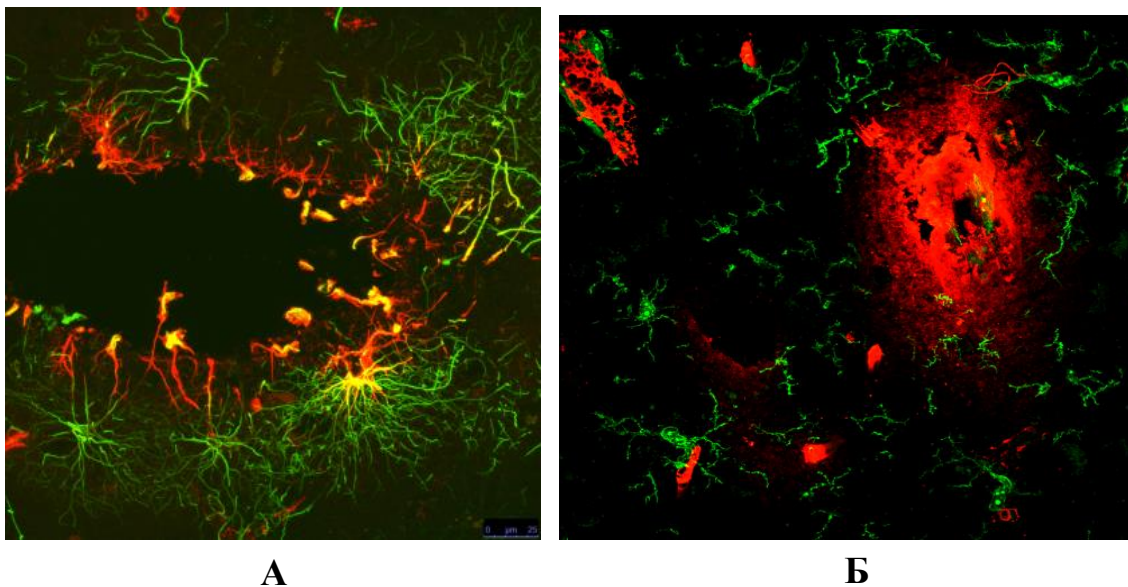


РИСУНОК 5.20. Конфокальна мікроскопія.

А — імуногістохімічне забарвлення первинними антитілами до фібрину (червоний) і первинними антитілами до мікроглії (Iba) (мікроглія — зелений). Накладення зображень (жовтий). Збільшення 60

Б - імуногістохімічне забарвлення первинними антитілами до фібриногена (червоний) і гліоспецифічними первинними антитілами (GFAP — зелений). Накладення зображень (жовтий). Збільшення 60x

Імуногістохімічне забарвлення фібриногена та астроглії показало, що відкладення периваскулярного фібриногена колокалізуються з реактивними

астроцитами в автопсійному матеріалі у ПМК пацієнтів з ХРН. Мікроглія, на відміну від астроцитів, не колокалізується з фібриногеном (рисунок 5.20).

Подібні патогістологічні зміни в ПМК ми спостерігали у 10 з 12 пацієнтів з ХРН.

Нові дані літературних джерел вказують на те, що фібриноген при ушкодженні ЦНС може активувати рецептори астроглії, що в свою чергу запускає механізми підвищеного утворення вільних радикалів (АФК), що ушкоджують нейрони [56].

Проблема проникнення паренхіму головного і спинного мозку фібриногена та інших великих молекул крові при різних патологічних станах активно вивчається. Таким чином, фібриноген і астроцити можуть бути перспективними цілями терапевтичного впливу, що вимагають подальшого вивчення.

5.7. Мікроглія при ХРН

Мікроглія є ключовим компонентом бар'єрної системи спинного і головного мозку людини. Вона виконує спеціалізовану функцію імунного захисту ЦНС. Клітини мікроглії беруть безпосередню участь у фагоцитарній активності, підтримці гомеостазу, здатні виділяти нейротрофічні фактори, регулювати утворення та видалення синапсів та інші важливі функції.

Активована мікроглія досить пластична, у людини можна спостерігати її різні морфологічні стани: паличкоподібну, амебоїдну, округлу форму, клітина може мати кілька ядер.

Клітини мікроглії, що перебувають у стані спокою, у людини без патології ЦНС мають невелике, частіше сферичне тіло з досить довгими і розгалуженими відростками, які можуть здійснювати поступальні рухи.

У разі пошкодження ЦНС мікрогія зі стану спокою переходить в активний, проліферує і навіть має здатність набувати властивостей травмівного агента.

Активована мікрогія досить пластична, у людини можна спостерігати її різну морфологічну форму: паличкоподібний, амебоїдний, округлий вигляд, клітина може мати кілька ядер [57, 58].

Багато дослідників спостерігали збільшення кількості та активацію мікроглії у трансгенних тварин з ХРН (*mSOD1*, *C9orf72*), одночасно ці клітини секретували активні форми кисню, прозапальні цитокіни, що негативно впливало на навколишні нейрони у культурі тканин [59].

Проте деякі дослідники автопсійного матеріалу хворих на ХРН стверджують, що проліферація та активація мікроглії виявляється лише за окремих клінічних фенотипів ХРН [60].

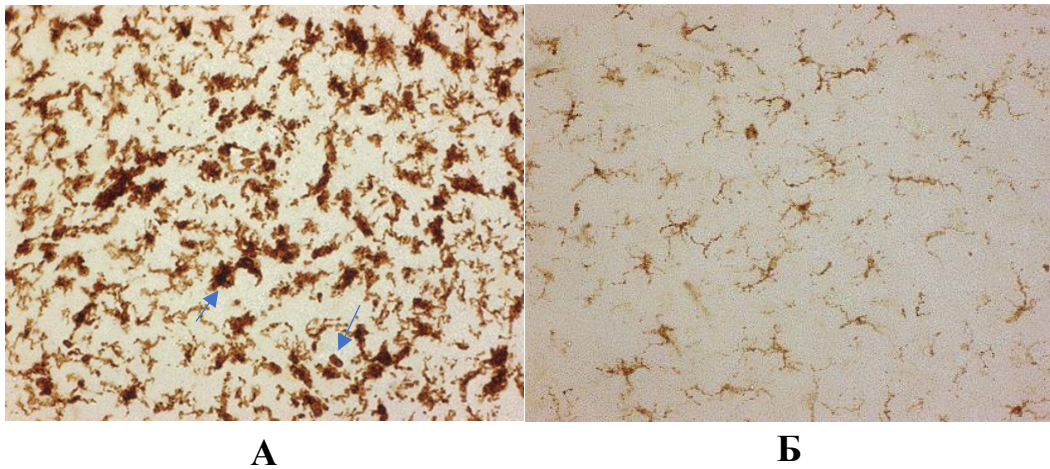


РИСУНОК 5.21. Мікрогліоз ПМК з використанням первинних моноклональних антитіл до Iba1 (1:1000; шар V). Збільшення 20. А – спорадична ХРН; Б - контроль

Також у автопсійному матеріалі пацієнтів ми виявили виражений мікрогліоз. У препаратах пацієнтів з ХРН, візуалізувалися овальні та амебоїдні клітини мікроглії з вираженим, інтенсивно забарвленим тілом,

укороченими та потовщеними відростками, або округлі повністю позбавлені відростків клітини (рисунок 5.21, стрілка).

Подібні ознаки мікрогліозу виявлено у 10 з 12 пацієнтів з ХРН. Вони виявлялися як у пацієнтів з виявленими генетичними мутаціями так без них, у хворих з різними клінічними фенотипами. Тканинні препарати контролю показали відсутність подібних ознак активації мікроглії, відмічалися рідкісні, слабо забарвлені клітини з тонкими і розгалуженими відростками і невеликим розміром тіла клітин, що характерно для неактивної мікроглії.

Таким чином, ми виявили нейрозапальні реакції з боку мікроглії при ХРН на термінальних стадіях патологічного процесу у пацієнтів з різними дебютами та тривалістю хвороби. При цьому ще раз зазначимо, що жоден з пацієнтів не перебував на штучній вентиляції легень, яка сама по собі може викликати подібні нейрозапальні процеси [61].

Одним із важливих механізмів патологічного впливу мікроглії на нейрони є сигнальна трансдукція фракталкіна (*CX3CL1*). Фракталкін належить до численної групи трансмембранних хемокінів, основною функцією яких є підтримка міграції лейкоцитів. Взаємодія фракталкіна (*CX3CL1*) з його рецептором (*CX3CR1*), який розташований винятково на мікроглії, відіграє ключову роль у різних нейродегенеративних захворюваннях. Наукові дані вказують на те, що значний рівень фракталкіна нейронів утримує клітини мікроглії у неактивному стані [62]. І навпаки, виділення моторними нейронами у позаклітинний простір мутантного білка СОД1 призводить до вираженої активізації мікроглії [63].

Ми вивчили вплив відсутності рецептора *CX3CR1* (*Cx3cr1*^{-/-}) на мотонейрони спинного мозку у трансгенної моделі миші (*SOD1-G93A*) хвороби рухового нейрона.

У трансгенних мишей як з наявністю з рецептора (Cх3cr1+/+, контрольна група) так і без нього (Cх3cr1-/-) у передніх рогах поперекового відділу спинного мозку виявлено значний мікрогліоз (39% порівняно з 46 %).

Паралельно спостерігали значне статистично значуще ($p = 0,03$) зменшення мотонейронів у передніх рогах трансгенних тварин без рецептора порівняно з контрольними тваринами (29 та 49 мотонейронів/мм² відповідно).

У тварин без рецептора CX3CR1 при оцінці м'язової сили починаючи з 15 тижня спостерігалось більш різке зниження сили захоплення як передніми так і задніми кінцівками, порівняно з контрольною групою ($p = 0,02$; $p = 0,01$), а також виражена втрата маси тіла ($p < 0,01$).

Ці дані досить переконливо демонструють, що відсутність фракталкін/CX3CR1-сигналіngu сприяє не тільки активації мікроглії, але і її нейротоксичності [64].

Фармакологічна дія з метою посилення фракталкін/CX3CR1-сигналінга потенційно може запобігти негативному впливу активованої мікроглії на мотонейрони.

Резюме до розділу 5

1. Наші дослідження продемонстрували, що ХРН на клінічному і патогістологічному рівні є гетерогенним захворюванням. Пошкодження нейроваскулярної одиниці може бути однією з основних ланок патогенезу, що призводить до дегенерації рухового нейрона.

2. Ми припускаємо, що патологія астроцитів та судин є одним з ключових чинників порушення цілісності ГЕБ, внаслідок якої підвищується токсичність мікросередовища нейронів, що своєю чергою прискорює їхню дегенерацію.

3. Посмертне патоморфологічне вивчення тканин моторної кори дало змогу встановити такі її властивості у пацієнтів з ХРН:

- Кількість NuR-позитивних нейронів, розмірами більше 60 мкм², статистично значуще знижена в усій моторній корі.
- Кількість NuR-позитивних нейронів у нижньому сегменті моторної кори у пацієнтів з ХРН значно менша, ніж в у пацієнтів без нейродегенеративних захворювань.
- Відсутність демієлінізуювальних уражень в первинній руховій корі (використано метод імуногістохімічного фарбування PLP).
- Астроцити мають гіпертрофічну та реактивну морфологію (як маркер використано GFAP).
- Пошкодження гематоенцефалічного бар'єра.
- Капілярний витік
- Периваскулярний фібрин колокалізується з реактивними астроцитами, але не з мікроглією.
- Підвищена мікросудинна щільність ХРН порівняно з пацієнтами без нейродегенеративних захворювань.

- Шар V первинної моторної кори містить значно більше клітин NG2, ніж шар III.
- Дифузний астрогліоз і фокальна дегенерація астроцитів у білій речовині ПМК, аномальні сфероїдоподібні астроцити у сірій речовині ПМК специфічні для мутації *SOD1*.
- Більшості випадків ХРН (як з виявленими генетичними мутаціями, так без них) властивий виражений мікрогліоз.
- Дисфункція елементів нейроваскулярної одиниці, насамперед мікросудин, астроцитів та полідендроцитів, може бути однією з важливих ланок патогенезу ХРН, яка призводить до дегенерації рухового нейрона.

Висновки

1. У дисертаційній роботі представлено теоретичне обґрунтування та наведено новий погляд на нагальну наукову проблему диференціальної діагностики та важливості немоторних симптомів при ХРН, сутність якого полягає в покращенні діагностики таких розладів на основі комплексного клінічного обстеження, результатів тестування за специфічними шкалами, нейрофізіологічного обстеження та застосування удосконаленої методики іммуногістохімічного фарбування зрізів тканини мозку.

2. У групі пацієнтів із ХРН виявлено 30 видів немоторних симптомів, при цьому загальний бал за шкалою ШНС був статистично значуще вищим (у середньому $7,4 \pm 3,5$) у пацієнтів з ХРН, порівняно з контрольною групою (у середньому $5,4 \pm 2,7$ бали). Результати дослідження показали, що у хворих із ХРН існує статистично значуща різниця в домінуванні таких немоторних симптомів як: втрата ваги ($p = 0,001$), пітливість ($p = 0,001$), біль ($p = 0,03$) та падіння ($p = 0,001$). Переважна кількість пацієнтів із ХРН відзначали гіпергідроз і втрату маси тіла до появи рухових порушень. Не було виявлено впливу статі на вираженість немоторних симптомів. Ризик виникнення певних порушень у пацієнтів із ХРН збільшується більше ніж у 8 разів порівняно з особами контрольної групи: втрата маси тіла та ймовірність падінь. Ризик виникнення болю зростає майже в 2,5 рази.

3. Наші дані свідчать про високу частоту больового синдрому при ХРН (у 69% пацієнтів). Частота цього симптому не залежить від статі та віку пацієнтів, проте його наявність корелює зі швидшим порівняно з хворими, які не

відчують біль, прогресуванням характерних моторних симптомів хвороби. Найхарактернішими для хворих із ХРН є больові відчуття у верхніх і нижніх кінцівках та у поперековій ділянці. Найчастіше хворі на ХРН відзначали тягнучий (29 %) та ниючий (32 %) біль. Також відзначено, що пацієнти з бульбарним дебютом хвороби практично не мали больового синдрому (4 %). У пацієнтів з шийним дебютом ризик появи болю в 1,5 рази вищий ($p = 0,04$).

4. В результаті проведеного дослідження встановлено значне порушення проникності гематоенцефалічного бар'єру при ХРН, на що вказує дисфункція елементів нейроваскулярної одиниці, насамперед мікросудин, астроцитів та полідендроцитів, що може бути однією з важливих ланок патогенезу ХРН, яка призводить до дегенерації рухового нейрона. За нашими даними у регіоні ПМК спостерігається значна екстравазація фібриногена, який імовірно опосередковано руйнівню діє на нейрони. Для шару V моторної кори виявлено статистично значущий обернено пропорційний зв'язок між кількістю нейронів та площею поверхні, вкритої фібриногеном ($p = 0,018$). Периваскулярний фібрин колокалізується з реактивними астроцитами, але не з мікроглією.

5. В автопсійному матеріалі первинної моторної кори (ПМК) осіб з ХРН середня щільність NuR-позитивних мотонейронів значно варіювала між різними пацієнтами та становила від 65 до 255 кл./мм², у середньому 173 кл./мм². Аналіз умісту NuR-позитивних нейронів засвідчив статистично значуще ($p < 0,05$) збільшення їхньої кількості у пацієнтів з мутаціями C9orf72/SOD1 порівняно з пацієнтами без мутацій (у середньому 225 та 155 кл./мм² відповідно). У різних пацієнтів виявлено значний гістологічний поліморфізм від легкого астрогліозу, виїнятково в білій речовині рухової кори до вираженого дифузного астрогліоза у сірій речовині ПМК. У пацієнтів із сімейним типом ХРН (SOD1) у білій речовині ПМК виявлено не тільки астрогліоз, а й незвичайну морфологію клітин глії у вигляді астроцитарних

бляшок з аномальними бісерними, сегментованими відростками, що може свідчити про фокальні, дистрофічні зміни астроцитів у білій речовині ПМК.

Література у розділі 5

1. V Muoio, Person P B., Sendeski M. «The neurovascular unit — concept review». *Acta Physiologica*. 2014 Apr. 210(4):790-8.
2. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. *Nat Rev Neurosci*. Astrocyte-endothelial interactions at the blood brain barrier. 2006 Jan; 7(1):41-53
3. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance, and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013 Dec; 19(12):1584-96
4. Liebner S, Engelhardt B. Development of the blood–brain barrier. In: “Blood BB and microenvironment: basic physiology to neurological disease”. New York: Taylor and Francis; 2005. p. 1–25.
5. Martin L., Liu Z., Chen K. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death // *J Comp Neurol*.- 2007.- V. 500.- № 1.- P. 20-46.
6. E van der Gucht, F Vandesande, L Arckens. Neurofilament protein: a selective marker for the architectonic parcellation of the visual cortex in adult brain. *J Comp Neurol*. 2001 Dec 24;441(4):345-68.
7. Sean G. Carriedo, Hong Z. Yin, and John H. Weiss Motor Neurons Are Selectively Vulnerable to AMPA/Kainate Receptor-Mediated Injury In Vitro. *J Neurosci*. 1996 Jul 1; 16(13): 4069–4079.
8. Aidong Yuan, Mala V. Rao, Veeranna K, and Ralph A. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 Apr; 9(4)
9. Eriksson E, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest*. 2009;119:1763–71

10. Poesen K., D Schaepdryver, M., Stubendorff, B., Gille, B. et al., «Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease». *Neurology*, 88(24), 2017. 2302–230
11. Ching-Hua Lu, Corrie Macdonald-Wallis, Elizabeth Gray et al. Neurofilament light chain A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* June 02, 2015; 84 (22)
12. J A Kiernan, A J Hudson. Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 1991 Apr;114 (Pt 2):843-53.
13. Yoko Mochizuki, Toshio Mizutani, Toshio Shimizu, Akihiro Kawata. Proportional neuronal loss between the primary motor and sensory cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2011 Sep 26;503(1):73-5
14. Olson A.L., Pessin J.E. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family / *Annu. Rev. Nutr.* 1996. Vol. 16. 235—256.
15. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF *Science*. 1985 Sep 6; 229(4717):941-5.
16. Berislav V Zlokovic. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Review Neuron*. 2008 Jan 24;57(2):178-201
17. M. Tang, G.Guangping, C. B. Rueda et al. «Brain microvasculature defects and Glut1 deficiency syndrome averted by early repletion of the glucose transporter-1 protein.» *Nat Commun*. 2017 Jan 20;8:14152
18. Hermann Koepsell. Glucose transporters in brain in health and disease. *European Journal of Physiology*. volume 472, pages1299–1343(2020)
19. AnthonyL. McCall, Antonia M. V. Bueren, et al.. «Forebrain Ischemia Increases Glut1 Protein in Brain Microvessels and Parenchyma». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16:69-76 1996

20. Garbuzova-Davis S., Hernandez-Ontiveros D., Rodrigues M. et al. «Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients». *Brain Res.* 2012 Aug 21;1469:114-28
21. Desai B. S., Schneider, J. A., Li, J.-L., et al., «Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease». *J. Neural Transm.* 2009.116, 587–597
22. Thomas Philips, Andre Bento-Abreu, Annelies Nonneman. Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.*2013 Feb;136(Pt 2):471-82.
23. Kirschner D., Blaurock A. Myelin. *Biology and chemistry* (R.E. Martenson eds.) (1991) CRC Press: Boca Raton, Florida, pp. 413-448
24. Trapp BD, Vignos M, Dudman J, et al. Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2018 Oct;17(10):870-84.
25. Anni Wang, Bei Ping He. «Characteristics and functions of polydendrocytes cells in normal brain and neuropathology». *A Journal of Progress in Neurosurgery, Neurology and Neurosciences* Volume 31, 2009 Mar;31(2):144-150
26. Akiko Nishiyama, Ryusuke Suzuki, Xiaoqin Zhu. NG cells in brain physiology and repair. *Front Neurosci.* 2014 Jun 27;8:133.
27. Seo, J. H., Miyamoto, N., Hayakawa, K., Pham, L. D., Maki, T., Ayata, C., et al. (2013). Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury. *J. Clin. Invest.* 123, 782–786.
28. L Dimou, V Gallo. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia.* 2015 Aug;63(8):1429-51.

29. Shin H. Kang, Ying Li, Masahiro Fukaya Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci.* 2013 May; 16(5): 571–579.
30. Diniz, L. P., Matias, I. C. P., Garcia, M. N., and Gomes, F. C. A. Astrocytic control of neural circuit formation: highlights on TGF- β signaling. *Neurochem. Int.* 2014 78, 18–27.
31. Matias I, Morgado J., Gomes F. “Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease”. *Front Aging Neurosci.* 2019 Mar 19;11:59.
32. Nicola J. Allen, and Cagla Eroglu. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron.* 2017 Nov 1;96(3):697-708
33. Richard Daneman, Alexandre Prat. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Jan 5;7(1):a020412
34. Richard Daneman. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol.* 2012 Nov;72(5):648-72
35. Amanda M. Haidet Phillips E. Hester D, Carlos J. et al. «Astrocytes from Familial and Sporadic Amyotrophic lateral sclerosis Patients are Toxic to Motor. Neurons». *Nat Biotechnol.* 2011 Sep; 29(9): 824–828
36. Pratibha Tripathi, Natalia Rodriguez-Muela, Joseph R. Klim. Reactive astrocytes promote amyotrophic lateral sclerosis-like degeneration and intracellular protein aggregation in human motor neurons by disrupting autophagy through tgf-b1. *Stem Cell Reports.* 2017 Aug 8;9(2):667-680.
37. Tong J, Huang C, Bi F, et al. Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *The EMBO Journal.* 2013;32(13):1917-1926

38. L.V. Den Bosch et al. «The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis». *Biochim Biophys Acta* Nov-Dec 2006;1762/11-12/-1068-82
39. Bruijn L.I, Becher M.W, Lee K, Anderson KL et al. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*. 1997 Feb; 18(2):327-38
40. Oberheim N. A., Steven A. Goldman S. A., Nedergaard M. "Heterogeneity of Astrocytes and Function". *Methods Mol Biol*. 2012; 814: 23–45
41. Vasile F., Dossi E, Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017; 222(5): 2017–2029
42. Oberheim N. A., Wang X, Goldman S. "Astrocytic complexity distinguishes the human brain" *TRENDS in Neurosciences* Vol. 29 No.10
43. Liddel S. A., Guttenplan K. A., Clarke, L. E., et al. "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia". *Nature*, 2017 541(7638), 481–487.
44. Stevens B., Nicola J. A., Vazquez L.E. et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. 2007. *Cell*- 131, 1164–1178.
45. Yang Z., Wang K.W. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. 2015 June ; 38(6): 364–374
46. Ross D, Brambilla L., Valori C. et al. "Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis" 2008. *Cell Death / Differentiation* volume 15, pages 1691–1700
47. Weisel J. W. Fibrinogen and fibrin. "Advances in Protein Chemistry and Structural Biology" 2005.70.247–299

48. Winkler A.E, Sengillo J.D, Sullivan J. S, "Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis." *Acta Neuropathol.* 2013 Jan.125.111-20
49. Petersen MA., Kyu Ryu J., Akassoglou K. Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging, and therapeutics. *Nat Rev Neurosci.* 2018 May; 19(5): 283–301.
50. Vos C. M, Geurts J, Montagne L. et al. Blood-brain barrier alterations in both focal and diffuse abnormalities on postmortem MRI in multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease.* 20, 953–960.200
51. Yates RL, Esiri MM, Palace J., et al. «Fibrinogen and neurodegeneration in the progressive multiple sclerosis cortex». *Ann. Neurol* 82, 259–27.2017
52. Cortes Canteli M, Mattei L, Richards AT, Norris EH et al. «Fibrin deposited in the Alzheimer’s disease brain promotes neuronal degeneration» *Neurobiol. Aging* 36, 608–617
53. Davalos D., Ryu JK, Merlini M, Baeten K.M et al. Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat. Commun.* 2012; 3:1227.
54. Maekawa S., Al-Sarraj S, M. Kibble M. Cortical selective vulnerability in motor neuron disease: a morphometric study. *Brain*, Volume 127, Issue 6, June 2004, Pages 1237–1251
55. Bell R. D, Ethan A Winkler E. A., Sagare A.P. et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron.* 2010 Nov 4;68(3):409-27
56. Sulimai N., Brown J., Lominadze D. et al Fibrinogen Interaction with Astrocyte ICAM1 and Pr-PC Results in the Generation of ROS and Neuronal Death. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar; 22(5): 2391.

57. Du L., Zhang Y., Yang Chen Y., Zhu J. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. Review Mol Neurobiol. 2017 Dec-54(10)-7567-7584
58. Torres Platas S., Comeau S, Adeline Rachalski A. et al. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. J Neuroinflammation. 2014; 11: 12.
59. Clarke B. Patani R. The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. Brain/ 2020 Dec; 143-12: 3526–3539
60. Tam O.H, Rozhkov N.V, Shaw R, Kim D. et al Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. Cell Rep. 2019 Oct 29; 29(5):1164-1177.e5.
61. Kamuf J., Andreas Garcia-Bardon A., Ziebart A. et al Lung injury does not aggravate mechanical ventilation-induced early cerebral inflammation or apoptosis in an animal model. PLoS One. 2018; 13(8)
62. Ransohoff R., Perry.H Microglial physiology- unique stimuli, specialized responses. Ann. Rev Immunol. 2009. 27-119-45
63. Urushitani M., Sik A, Sakurai T. et al Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci. 2006 Jan; 9(1):108-18.
64. Cardona, Piore E, M. Sasse M, Kostenko V, et al “Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor”. Nat. Neurosci. Vol. 9 N 7

Наукові дані та резюме до розділу № 3 були опубліковані в наступних публікаціях:

J. Chen, PhD, V. Kostenko, MD, E. P. Piore, MD, PhD, B. D. Trapp, PhD
Magnetic Resonance Imaging-Based Estimation of Upper Motor Neuron

Density in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis – a Feasibility Study. Radiology 2018 Jun;287(3):955-964.doi:10.1148/radiol.2018162967. Epub 2018 Jan 23

Jacqueline Chen, Volodymyr Kostenko, Erik Pioro, Bruce Trapp. Myelin density in the primary motor cortex is related to the density of associated lower motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Investigative Medicine Volume 66, Issue 4. P.865-866 5 April 2018 10.1136/jim-2018-000745.150

A. E.Cardona, E. Pioro, M. Sasse, V. Kostenko, Cardona S., Dijkstra I., Huang D, Kidd G., Dombrowski S., Dutta R., Lee J.Dan R Littman R., Ransohoff R. “Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor”. NATURE NEUROSCIENCE volume 9 number 7 July doi:10.1038/nn1715

ДОДАТКИ

Додаток 1

Наукові публікації за темою дисертації

1. Володимир Костенко. Характеристика больового синдрому при хворобі рухового нейрона. Міжнародний неврологічний журнал. Том 16, № 2, 28.02.2020 DOI: 10.22141/2224-0713.16.2.2020.200963
2. Володимир Костенко, Юрій Головченко. Важливість немоторних симптомів у клінічній картині хвороби рухового нейрона. Український неврологічний журнал. 2020. № 3. С. 33.

3. Jacqueline Chen, PhD, Volodymyr Kostenko, MD, Erik P. Pioro, MD, PhD, Bruce D. Trapp, PhD Magnetic Resonance Imaging-Based Estimation of Upper Motor Neuron Density in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis – a Feasibility Study. *Radiology* 2018 Jun;287(3):955-964.doi:10.1148/radiol.2018162967. Epub 2018 Jan 23
4. Jacqueline Chen, Volodymyr Kostenko, Erik Pioro, Bruce Trapp. Myelin density in the primary motor cortex is related to the density of associated lower motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Investigative Medicine* Volume 66, Issue 4. P.865-866 5 April 2018 10.1136/jim-2018-000745.150
5. A. Cardona, E. P. Pioro, Margaret E Sasse, V. Kostenko, S. M. Cardona, Ineke M Dijkstra, DeRen Huang, Grahame Kidd, Stephen Dombrowski, RanJan Dutta, Jar-Chi Lee, Dan R Littman, Richard M Ransohoff. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *NATURE NEUROSCIENCE* volume 9 number 7 July doi:10.1038/nn1715

Додаток 2

Апробація результатів дисертації

Теоретичні та практичні аспекти актуальної проблеми значення немоторних симптомів БАС були предметно вивчено автором, основоположні

висновки обговорювалися на наступних наукових форумах з міжнародною участю:

- «Неврологічні читання – пам’яті Д.І. Панченка» (01.03. 2018 р.)
 - «Шляхи вирішення актуальних проблем у сучасній неврології » (14.12.2018 р.);
 - Тези науково-практичної конференції з міжнародною участю:
 - «Диференціальна діагностика та визначення важливості немоторних симптомів при БАС». «Разом задля покращення неврологічного та психічного здоров’я» (03 травня 2018 р.) м. Запоріжжя.
 - Були опубліковані тези в рамках науково-практичної конференції “Медицина 21 століття” Харків 2018. «Визначення важливості немоторних симптомів при БАС та особливості діагностики».
 - Доклад на тему «Сімейний БАС. Клінічні випадки в практиці» на конференції Асоціації неврологів Києва (15.11.2018) Київ.
 - Доклад на тему “Сімейні форми бічного аміотрофічного склерозую.” клінічні випадки. 3-я Міжнародна конференція “Advances in Neurologie”. 11 квітня 2019, Київ.
 -
 - Доклад на тему “ Генетична діагностика у хворих на БАС -сучасний погляд на проблему” Міжнародна конференція- генетична діагностика в клінічній практиці лікаря, Медичний діагностичний інститут. MDI. 16 травня 1918, Київ
 -

- Стендова доповіді в рамках науково-практичних конференцій «Young Science 2.0» “Хвороба рухового нейрона та больовий синдром”. 19 лютого 2020. Київ

-

-Конференція молодих вчених «Young Science» тези: «Значення немоторних симптомів у пацієнтів із БАС» 20 листопада 2020 року м. Київ

Додаток 3

Міжнародні наукові тези та виступи здобувача:

1. **V. Kostenko**, J. Meinert, A. Rae-Grant, A. Viguera Menopause knowledge among women with multiple sclerosis and major depression. The Cleveland Clinic Foundation’s 30th Annual Research Day, Lerner Research Institute.
2. **V. Kostenko**, J. Meinert, A. Viguera Risk for major depression among women with epilepsy during the menopausal transition. The Cleveland Clinic Foundation’s 30th Annual Research Day, Lerner Research Institute.
3. **V. Kostenko**, A. E. Cardona, R. M. Ransohoff, E. P. Pioro Evidence of Microglial Neurotoxicity in Vivo in ALS Transgenic Mouse Null for Fractalkine Receptor, CX3CR1 The Cleveland Clinic Foundation’s 26th Annual Research Day, Lerner Research Institute.
4. **V. Kostenko**, A Cardona, R. M. Ransohoff, E. P. Pioro. The “double-edged sword” effect of microglial activation in SOD1-G93A ALS mice null for CX3CR1: spinal cord and cortical pathology. 14th annual meeting international alliance of ALS/MND associations and 17th international symposium on ALS/MND Yokohama, Japan.

5. J. Zhang, **V. Kostenko**, Grahame Kidd, E. P. Piro, «Intraneuronal accumulation of ubiquitinated inclusions is associated with impaired proteasome function in wobbler mouse». 14th annual meeting international alliance of ALS/MND associations and 17th international symposium on ALS/MND Yokohama, Japan, 26 November to 2 Decembe

6. **V. Kostenko**, A Cardona, R. M. Ransohoff, E. P. Piro. SOD1-G93A ALS mice null for CX3CR1 have exaggerated microglial activation and accelerated disease progression. Atlanta, Georgia: Society for Neuroscience,

7. J. Zhang, **V. Kostenko**, Q Yu, E. P. Piro, Intraneuronal accumulation of Ubiquitinated inclusions is associated with impaired proteasome function in wobbler motor neurodegeneration. Atlanta, Georgia: Society for Neuroscience, October 14-18.

8. E. P. Piro, **V. Kostenko**, A Cardona, R. M. Ransohoff, Microglial activation in CX3CR1 null- SOD1(G93A) ALS mice worsens disease phenotype. 16th international symposium on ALS/MND 8-10 December 2015, Dublin, Republic of Ireland.

9. A. E. Cardona, R. Dutta, D. Huang, M. E. Sasse, **V. Kostenko**, G. Kidd, Jar-Chi Lee, E. Stein, D. N. Cook, S. Jung, S. A. Lira, E. Piro, D. R. Littman, R. M. Ransohoff. The control of microglial neurotoxicity by CX3CR1. The Cleveland Clinic Foundation's 25th Annual Research Day and Lerner Research Institute 60th Anniversary Symposium, November 29.

10. J. Zhang, **V. Kostenko**, Q Yu, E. P. Piro, Ubiquitinated inclusions in wobbler mouse motor neurons contain proteasome and chaperone proteins: Harmful or Helpful? The Cleveland Clinic Foundation's 25th Annual Research Day and Lerner Research Institute 60th Anniversary Symposium, November 29, 2005.

11. **V. Kostenko**, J. Zhang, Q Yu, E. P. Piro, Rescue of the wobbler mouse Amyotrophic Lateral Sclerosis phenotype by the WLD^S gene. The Cleveland Clinic Foundation's 25th Annual Research Day and Lerner Research Institute 60th Anniversary Symposium, November 29.

12. Zhang, **V. Kostenko***; E. P. Piro, Ubiquitinated inclusions in wobbler mouse motor neurons contain proteasome and chaperone proteins. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015, November 13.
13. A. E. Cardona, R. Dutta, D. Huang, M. E. Sasse, **V. Kostenko**, G. Kidd, Jar-Chi Lee, E. Stein, D. N. Cook, S. Jung, S. A. Lira, E. Piro, D. R. Littman, R. M. Ransohoff. The control of microglial neurotoxicity by CX3CR1. Lerner research institute retreat. Geneva Resort and Conference Center, Geneva-On-The-Lake, Ohio September.
14. E. P. Piro, **V. Kostenko**, M. P. Coleman, J. Zhang. Protection Against Motor Neron Degeneration in Wobbler Mouse by the Slow Wallerian Degeneration (Wld's) gene. 57th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Miami, FL
15. E. P. Piro, **V. Kostenko**, J. Zhang. Rescue of the wobbler mouse MND phenotype by the slow wallerian degeneration gene (WLD^S). 15th International symposium on ALS/MND, December 2004 Philadelphia, PA.
16. E. P. Piro, **V. Kostenko**, J. Zhang. Rescue of the wobbler mouse ALS phenotype by the slow wallerian degeneration gene (WLD^S). Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, CA.
17. **V. Kostenko**, J. Zhang, E. P. Piro "Slow wallerian degeneration gene (WLD^S) rescues the wobbler mouse ALS phenotype" 2nd National Conference Caritas St. Elizabeth Medical Center, Boston, MA, USA.

Ella G. Frolova, Jenna Saraniti, Judith Drazba, **Volodymyr Kostenko**, L. Blech, Christi Harry, Amit Vasanti, Carla Drumm, Guido Jenniskens Edward F. Plow and Olga Stenina Control of Organization and function of Muscle and Tendon by Thrombospondin 4, Matrix Biol.2014 Jul

V. Kostenko, Jialin Zhang, E. P. Piro. Slow wallerian degeneration gene rescues the wobbler mouse ALS phenotype. R-AMA Journal, 2004.

Презентації наукових досліджень

Glial cell abnormalities in sporadic and familial ALS. Department of Neuroscience. The Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute. Cleveland Clinic's annual Innovations in Neuroscience conference.

Protective effect of the WLD^S (Slow wallerian degeneration) mutation in the ALS woobler mouse. Department of Neuroscience. The Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute, Fellow Seminar.

Microglia is Neurotoxic in Receptor Deeficient Transgenic SOD1-G93A ALS Mice". Department of Neuroscience. The Cleveland Clinic Foundation, Lerner Research Institute.

SOD1-G93A ALS mice null for CX3CR1 have exaggerated microglial activation and accelerated disease progression. Society for Neuroscience annual meeting, section: Neuroinflammation and Neurodegeneration, Atlanta, Georgia,