

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
Національна академія наук України

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини  
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ГЛОБА ВЯЧЕСЛАВ ЮРІЙОВИЧ**

УДК 612.085.23:615.014.41:616.62-008.6

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ТА**  
**НЕЙРОТРОФІЧНИХ ФАКТОРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ**  
**ІНФРАВЕЗІКАЛЬНІЙ ОБСТРУКЦІЇ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

\_\_\_\_\_ Глоба В.Ю.

Науковий керівник Легач Євген Іванович, доктор медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділом кріоендокринології

Харків-2021

## АНОТАЦІЯ

*Глоба В.Ю.* Застосування кріоконсервованих культур клітин та нейротрофічних факторів при експериментальній інфравезікальній обструкції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина (22 – Охорона здоров'я). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному застосуванню біологічно активних композицій (БАК): кріоекстракту та кондиційованих середовищ (КС) нативної і кріоконсервованої культур клітин, отриманих зі спінальних гангліїв (СГ), для покращення іннервації сечового міхура (СМ) при інфравезікальній обструкції (ІВО) у щурів.

Порушення функції сечовидільної системи внаслідок ІВО є актуальною проблемою сучасної урології. У понад 50% чоловіків похилого віку з доброякісною гіперплазією передміхурової залози розвивається обструкція нижніх сечових шляхів. Також цей патологічний процес виникає у 8-10% жінок як ускладнення хірургічного лікування нетримання сечі і у дітей з аномаліями розвитку сечовидільної системи. Тривала обструкція СМ викликає порушення кровообігу в тканинах органу, що супроводжується ішемією клітин, гіпертрофією детрузора, розвитком запальних процесів. Одним з наслідків структурно-функціональної перебудови клітинних шарів є втрата рецепторного апарата та денервація стінки СМ, яка може сягати більш 50% при цьому патологічному стані.

На сьогодні реіннервація СМ є актуальним завданням урології, відновлювальної хірургії та тканинної інженерії сечовивідних шляхів. Згідно з сучасними даними для вирішення таких завдань застосовуються секретони від культур клітин нейрального походження. Одним з джерел для отримання культури є спінальні ганглії, які містять ці типи клітин периферичної нервової системи.

З цією метою було отримано БАК двох наступних типів. Кріоекстракт СГ містить біологічно-активні сполуки від усіх клітин ганглію (нейронів, шванівських клітин, мантійних гліоцитів, фібробластів). КС від культури клітин СГ являє собою в основному секретом мантійних гліоцитів, оскільки у використаних умовах культивування вони є основним типом клітин у культурі. В якості препарату порівняння використовували пептидний препарат «Кортексін», який отримують із тканини головного мозку великої рогатої худоби та свиней. Вивчено вплив кріоекстракту та КС нативної і криоконсервованої культур клітин СГ на перебіг і наслідки ІВО у щурів.

Завдяки відтворенню патологічної моделі на щурах з використанням лігатурної методики були отримані морфологічні і функціональні зміни, які завжди супроводжують ІВО. Встановлено збільшення відносної маси СМ щурів з ІВО у 1,5 рази порівняно з інтактною групою. Виявлено зменшення середньої висоти перехідного епітелію на 20,5% та збільшення загальної товщини стінки на 32,7%, м'язового шару на 37,3% і індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ на 6,5% у групі тварин з обструкцією без лікування. Показники активної напруги ізольованих смужок (ІС) СМ після стимуляції розчином КСІ у щурів з ІВО збільшилися у 1,7 рази в порівнянні з інтактними тваринами. Ці зміни виникали внаслідок розвитку денерваційної надчутливості (гіперактивності детрузора), що свідчить про збереження на ранніх стадіях ІВО механізму скорочення, який пов'язаний з деполяризацією клітинних мембран гладеньких м'язів.

Встановлено зменшення активної напруги ІС СМ після стимуляції пілокарпіном у тварин з ІВО у 1,4 рази та показників максимальної амплітуди скорочення у 2,5 рази порівняно з інтактними щурами. Спостерігалось підсилення спонтанної скоротливості на 2,1% внаслідок розвитку денерваційної надчутливості (гіперактивності детрузора), але воно було статистично незначуще. В порівнянні з інтактними щурами у тварин з обструкцією у тканині СМ виявлено зменшення відносної площі експресії

маркеру клітин глії S 100 у 9,5 рази та маркеру гладеньком'язових клітин актину у 9,4 рази.

Встановлено, що після використання кріоекстракту та КС кріоконсервованої культури клітин СГ зменшувалася відносна маса СМ у 1,7 і 1,5 рази відповідно порівняно зі щурами з ІВО без лікування. Поряд з цим приріст маси тіла був найбільш вираженим у групі з введенням кріоекстракту.

Вираженого впливу використаних БАК на висоту перехідного епітелію не спостерігалось, однак встановлено зменшення товщини м'язового шару на 13,7 і 27,3% відповідно у тварин з використанням кріоекстракту (група 1) та КС нативної культури клітин СГ (група 3) порівняно зі щурами з ІВО без лікування. Цьому також відповідало зниження індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ у цих тварин на 5,5 (для групи 1) і 17,0% (для групи 3), окрім щурів з введенням КС кріоконсервованої культури клітин СГ (група 4). Все вищенаведене вказувало на можливу участь нейротрофінів у процесах ремоделювання СМ при патології.

Введення КС нативної і кріоконсервованої культур клітин СГ не знижувало КСІ-індуковану активну напругу ІС СМ, яка підвищується на тлі ІВО. Спонтанна скоротлива активність у тварин групи 4 (введення КС кріоконсервованої культури клітин СГ) зменшувалась на 4,1% на відміну від щурів з ІВО без лікування. Пілокарпін-індукована активна напруга і максимальна амплітуда скорочення ІС СМ підвищувалися у 3,6 і 2,8 рази у групі щурів з введенням кріоекстракту та у 6,5 і 2,7 рази у щурів з введенням КС кріоконсервованої культури порівняно зі щурами з ІВО без лікування. Це підтверджувало позитивний вплив БАК, отриманих зі СГ за умов застосування низьких температур, на основні рецепторні механізми скоротливості СМ на тлі ІВО, а також можливість їх захисту і відновлення після пошкодження.

Використання кріоекстракту та КС нативної і кріоконсервованої культур СГ збільшувало у 54, 12 і 2,6 рази показники відносної площі S 100 – позитивних клітин та у 3, 4,7 і 4,7 рази актин – позитивних клітин у щурів з

ІВО. Одержані результати вказують на позитивний вплив БАК на морфо-функціональний стан СМ у щурів при ІВО, який реалізується шляхом захисту та відтворення нервових і гладеньком'язових клітин.

Встановлено відсутність прямої органоспецифічної дії нейротрофічного препарату «Кортексін» на структурно-функціональні показники СМ при ІВО у щурів. Використання «Кортексіну» статистично значуще не впливало на усі вищезазначені гістоморфометричні показники та скоротливу активність ІС СМ.

Використання БАК не викликало значних змін біохімічних показників крові щурів. Було виявлено збільшення кількості загального білка, який зазвичай знижується на тлі ІВО. На відміну від цього підвищення рівня сечовини в крові не відбувалося, а значить це не приводило до нефротоксичних ефектів. При цьому спостерігалася тенденція зниження рівня сечовини у тварин, яким вводилися БАК, при порівнянні зі щурами без лікування. У тварин, до яких застосовували введення КС кріоконсервованої культури клітин СГ, не спостерігалось підвищення рівня креатиніну в крові на відміну від інших дослідних груп, що демонструє відсутність значного впливу на основні шляхи метаболізму креатиніну на тлі ІВО. Це дає можливість застосування цих БАК при порушенні ниркової функції.

Отримані в даному дослідженні дані дали можливість зробити висновки, що нейротрофічні фактори, які містяться у кріоекстракті та секретомативній/кріоконсервованій культурі клітин СГ позитивно впливають на морфологічні характеристики та уродинамічні показники СМ при ІВО у щурів. В результаті виконання роботи доведена доцільність використання вищеназваних БАК для відновлення структурно-функціональних показників СМ при ІВО. Визначено, що кріоконсервування впливає на характер біологічної активності секретомів культури клітин СГ. При цьому введення КС кріоконсервованої культури виявилось більш ефективним для корегування наслідків ІВО, ніж КС нативної культури.

**Ключові слова:** кріоекстракт, кріоконсервування, кондиційовані середовища, спінальні ганглії, біологічно активні композиції, сечовий міхур, щури, скорочувальна активність, інфравезікальна обструкція, морфологічні показники.

### ANNOTATION

*Globa V.Yu.* Application of cryopreserved cell cultures and neurotrophic factors in experimental infravesical obstruction. – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the Doctor of Philosophy degree in specialty 222 – Medicine (22 – Public Health). – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

Thesis covers the experimental application of biologically active compositions (BACs) obtained by means of cryotechniques to improve the innervation of the bladder during infravesical obstruction (IVO) in rats.

Bladder dysfunction is an urgent problem of modern urology, which is a consequence of bladder obstruction. Lower urinary tract obstruction develops in more than 50% of aged men with benign prostatic hyperplasia. Also, the IVO occurs in 8-10% of women as a complication of surgeries of urinary incontinence and in children with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract. Prolonged bladder obstruction causes the circulatory disorders in tissues of the organ, accompanied with a cell ischemia, detrusor hypertrophy, and development of inflammatory processes. One of the consequences of structural and functional rearrangement of cell layers is the loss of the receptor apparatus and denervation of the bladder wall, which can reach more than 50% in this pathological condition.

Currently, the reinnervation of the bladder is a pressing task in urology, reconstructive surgery and tissue engineering of the urinary tract. According to modern data, the secretomes from cell cultures of neural origin are used to solve such problems. One of the sources for obtaining the culture are the spinal ganglia containing these cell types of the peripheral nervous system.

For this purpose, BACs of the following two types were obtained. The dorsal root ganglia (DRG) cryoextract is a composition that contains biologically active compounds from all ganglion cells (neurons, Schwann cells, satellite glial cells, fibroblasts). The conditioned medium (CM) from the DRG cell culture was mainly the secretome of satellite glial cells, since under the culture conditions they are the main cell type of cells in culture. The peptide-based drug "Cortexin", obtained from the brain tissue of cattle and pigs, was used as a comparator agent. Influence of cryoextract and CM of native and cryopreserved cultures of DRG on the course and consequences of IVO in rats was studied.

Due to the simulation of pathological model using a ligature technique, significant morphological and functional changes were achieved and confirmed, which always accompany the IVO: a strong increase in the relative bladder mass of rats due to its hyperplasia by 1.5 times.

The mean height of transitional epithelium decreased by 20.5%, and the thickness of muscle layer did by 37.3%, as well as the index of the muscular layer/bladder wall ratio was increased by 6.5% in the group of animals with obstruction without treatment. Active tension of isolated strips (IS) of bladder after stimulation with KCl solution in rats with IVO increased 1.7 times compared with intact animals. That is associated with depolarization of smooth muscle cell membranes. But no statistically significant difference was found between the two groups. Stimulated contractile activity decreased, but an increase in spontaneous contractility was observed due to the development of denervation hypersensitivity (detrusor hyperactivity). Verification of the above was a sharp decrease in S 100 and actin-positive cells in the animals with pathology, that also indicated a decrease in the amount of contractile proteins at the early stages of obstruction.

It was found that after the use of cryoextract and CM of cryopreserved culture of DRG, the relative mass of the bladder, increasing with obstruction, decreased 1.7 and 1.5 times. In addition, the weight gain was the most manifested in the group with cryoextract administration.

There was no pronounced effect of BACs on transitional epithelial hyperplasia. The introduction of BACs stimulated the regression of the enlarged muscle layer by 13.7, 24.7 and 27.3%, the thickness of which usually increases with obstruction. This also corresponded to a decrease in the index of the muscular layer / bladder wall ratio in all groups by 5.5, 7.3, 17.0 and 16.6%, the exception were the rats with the introduction of the DRG conditioned culture. All of the above indicated a possible participation of neurotrophins in the bladder remodeling processes in pathology.

Conditioned media of native and cryopreserved cultures of DRG stimulated the KCl-induced active tension in 3.8 and 2.3 times, which increases against the background of obstruction due to the development of denervation hypersensitivity (detrusor hyperactivity), that evidences the preservation of reduction mechanism at the early stages of IVO. In groups of animals with the use of BACs obtained by freeze-thawing, spontaneous contractile activity was the lowest, and pilocarpine - induced active tension and the maximum amplitude of contraction were the largest, that confirms the positive effect on the main receptor mechanisms of urinary tract infection as well as the possibility of their protection and recovery after damage. These effects were apparently due to the action of neurotrophic factors coming from the DRG and from the culture of mantle gliocytes after freeze-thawing. The findings indicate a variety of effects of BACs on the bladder functional state in rats in pathology, which may be implemented with the neuromuscular apparatus of the organ.

Cryoextract and CM of native and cryopreserved cultures of DRG cells increased the relative area of S 100 and actin-positive cells in rats with IVO, that indicates the possibility of protection and reproduction of nerve and smooth muscle cells. This also confirmed the involvement of neurotrophins into the bladder remodeling and changes of its functions in pathology. The absence of direct organ-specific effect of the neurotrophic drug "Cortexin" on structural and functional parameters of bladder of the rats with IVO was established.



The use of BACs did not cause significant changes in biochemical parameters of rat blood. An effect on the increase in protein synthesis, which is usually reduced in IVO, due to the development of proteinuria and an increase in catabolic processes in uropathy and renal failure was found. In contrast, there was no increase in blood urea levels, confirming that it did not lead to nephrotoxic effects. At the same time, there was revealed a tendency to the reduced urea levels in the groups with BACs administered if compared with non-treated animals. In rats treated with a CM of cryopreserved DRG culture, no increase in blood creatinine levels was observed in contrast to other experimental groups, which demonstrates the lack of significant effect on the main pathways of creatinine metabolism in IVO-caused obstructive uropathy. This makes it possible to use these CM, containing neurotrophic factors, in renal dysfunction.

The data obtained in this study allowed us to conclude that the neurotrophic factors contained in the CM of native and cryopreserved cultures of DRG cells positively affect the morphological characteristics and urodynamic parameters of bladder of rats with IVO. As a result of the research, the expediency of using the above-mentioned BACs for the restoration of structural and functional indices of bladder after IVO was proven. It was determined that cryopreservation affected the nature of the biological activity of DRG cell culture secretions. In this case, the CM of cryopreserved culture of DRG cells was more effective for correcting the effects of IVO.

**Keywords:** cryoextract, cryopreservation, conditioned media, dorsal root ganglia, biologically active compositions, bladder, rats, contractile activity, infravesical obstruction, morphological parameters.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Глоба ВЮ**, Бондаренко ТП, Божок ГА, Самбург ЯЮ, Легач ЄІ. Зміна скоротливої активності детрузора щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (2): 188–198. (Scopus)
2. **Глоба ВЮ**, Самбург ЯЮ, Божок ГА, Легач ЄІ. Біохімічні показники крові щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Медицина невідкладних станів. 2020; 16 (4): 115–120.
3. **Globa VYu**, Bozhok GA, Legach EI. Morphological Parameters of Bladder Rats with Infravesical Obstruction with the Introduction of Biologically Active Compositions. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2020; 8: 327–333.
4. **Глоба ВЮ**, Легач ЄІ, Глоба ДВ, Глоба ТО, Свірепо ПВ. Експериментальна модель інфравезикальної обструкції: якій віддати перевагу? Медичний форум. 2020; 21 (21): 12–14.

### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

5. **Глоба ВЮ**. Сократительная активность и патоморфологические особенности детрузора крыс с моделью инфравезикальной обструкции. The international research and practical «The Development of Medical Sciences: Problems and Solutions»; 2018 April 27 – 28; Brno, Czech Republic, p. 106–9.
6. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Влияние кондиционированной среды от культуры мантийных глиоцитов на структурно - функциональные характеристики детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. IX Всероссийский съезд трансплантологов; 2018 Сентября 17 – 19; Москва, Российская Федерация, с. 167.
7. **Глоба ВЮ**, Рудык ДЮ, Али СГ, Божок ГА, Легач ЕИ. Сократительная активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией после введения «Кортексина» и биологически активных продуктов культуры

мантийных глиоцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 172.

8. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Легач ЕИ. Влияние Кортексина на сократительную активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини»; 2018 Червня 22 – 23; Львів, Україна, с. 90 – 1.

9. **Глоба ВЮ**. Морфологічні особливості сечового міхура щурів з моделлю інфравезикальної обструкції. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи розвитку медицини в країнах ЄС та в Україні»; 2018 Грудня 21–22; Влоцлавек, Республіка Польща, с. 106 – 9.

10. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Биологическая подвижность мочевого пузыря крыс с инфравезикальной обструкцией. XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологическая подвижность»; 2019 Мая 17–19; Пущино, Российская Федерация, с. 82 – 4.

11. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Глоба ДВ, Дунаева ОВ, Легач ЄІ. Вікові особливості скорочувальної активності детрузора щурів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання»; 2019 Квітня 12–13; Дніпро, Україна, с. 6 – 8.

12. **Globa VYu**, Bondarenko TP, Ali SG, Bozhok GA, Legach EI. Contractile Activity of Detrusor of Rats with Infravesical Obstruction After Introduced Cryoextract of Spinal Ganglia and Biologically Active Products of Mantle Gliocyte Culture. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29 (2): 164.

13. **Глоба ВЮ**, Бондаренко ТП, Легач ЄІ. Вплив біологічно активних продуктів культури мантийних гліоцитів на морфологічні показники сечового міхура щурів з інфравезикальною обструкцією. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом; 2019 Червня 18 – 21; Яремче, Україна, с. 54.

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ.....                                                                                                                 | 14        |
| ВСТУП.....                                                                                                                                                 | 15        |
| <b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>                                                                                                                     | <b>23</b> |
| 1.1. Морфологічні і функціональні характеристики сечового міхура.....                                                                                      | 23        |
| 1.2. Обструкція сечового міхура і її наслідки.....                                                                                                         | 27        |
| 1.3. Нейротрофічні фактори та їх роль в організмі.....                                                                                                     | 30        |
| 1.4. Перспективи отримання і використання біологічно активних композицій, які містять нейротрофічні фактори.....                                           | 34        |
| <b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>                                                                                                       | <b>38</b> |
| 2.1. Тварини.....                                                                                                                                          | 38        |
| 2.2. Моделювання інфравезікальної обструкції.....                                                                                                          | 38        |
| 2.3. Отримання кріоекстракту зі спінальних гангліїв статевозрілих щурів...                                                                                 | 39        |
| 2.4. Отримання первинної культури клітин зі спінальних гангліїв новонароджених поросят.....                                                                | 40        |
| 2.5. Отримання кріоконсервованої культури клітин зі спінальних гангліїв новонароджених поросят.....                                                        | 42        |
| 2.6. Вимірювання білку у кріоекстракті та кондиційованих середовищах...                                                                                    | 43        |
| 2.7. Введення біологічно активних композицій.....                                                                                                          | 44        |
| 2.8. Дослідження скоротливої активності ізольованих смужок сечового міхура.....                                                                            | 44        |
| 2.9. Гістологічні дослідження тканини сечового міхура.....                                                                                                 | 46        |
| 2.10. Імуногістохімічні дослідження тканини сечового міхура.....                                                                                           | 47        |
| 2.11. Біохімічні дослідження крові експериментальних тварин.....                                                                                           | 47        |
| 2.12. Загальний дизайн дослідження.....                                                                                                                    | 48        |
| 2.13. Статистична обробка результатів.....                                                                                                                 | 48        |
| <b>РОЗДІЛ 3. МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНФРАВЕЗІКАЛЬНОЇ ОБСТРУКЦІЇ У ЩУРІВ ТА ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СЕЧОВОГО МІХУРА.....</b> | <b>50</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Висновки до розділу 3.....                                                                                                                                                                                                                         | 64        |
| <b>РОЗДІЛ 4. ВИВЧЕННЯ ХАРАКТЕРИСТИК СЕЧОВОГО МІХУРА ТВАРИН ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕНОЇ ОБСТРУКЦІЇ ЗА УМОВ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ.....</b>                                                                                                     | <b>65</b> |
| 4.1. Порівняння динаміки патологічних змін сечового міхура після перенесеної інфравезікальної обструкції за умов впливу кріоекстракту спінальних гангліїв та препарату «Кортексін».....                                                            | 65        |
| Висновки до розділу 4.1. ....                                                                                                                                                                                                                      | 76        |
| 4.2. Порівняння динаміки патологічних змін сечового міхура після перенесеної інфравезікальної обструкції за умов впливу секретомів нативної і кріоконсервованої культур клітин спінальних гангліїв, а також базового середовища культивування..... | 76        |
| Висновки до розділу 4.2. ....                                                                                                                                                                                                                      | 89        |
| <b>РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ НА МАСУ ТВАРИН ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕНОЇ ІНФРАВЕЗІКАЛЬНОЇ ОБСТРУКЦІЇ.....</b>                                                                                 | <b>91</b> |
| Висновки до розділу 5. ....                                                                                                                                                                                                                        | 98        |
| <b>РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>                                                                                                                                                                          | <b>99</b> |
| ВИСНОВКИ.....                                                                                                                                                                                                                                      | 115       |
| ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....                                                                                                                                                                                                      | 118       |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                                                                                                                                                                                                    | 119       |
| ДОДАТОК А Список публікацій здобувача за темою дисертації.....                                                                                                                                                                                     | 154       |
| ДОДАТОК Б Відомості про апробацію результатів дисертації.....                                                                                                                                                                                      | 156       |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

|      |                                                 |
|------|-------------------------------------------------|
| БАК  | – біологічно активні композиції                 |
| БСК  | – базове середовище культивування               |
| ГНФ  | – гліальний нейротрофічний фактор               |
| ДГПЗ | – доброякісна гіперплазія передміхурової залози |
| ДМСО | – диметилсульфоксид                             |
| ІВО  | – інфравезікальна обструкція                    |
| ІС   | – ізольована смужка                             |
| МАС  | – максимальна амплітуда скорочення              |
| МГ   | – мантийні гліюцити                             |
| МК   | – масовий коефіцієнт                            |
| НІФ  | – нирковий інтерстиціальний фіброз              |
| НН   | – ниркової недостатності                        |
| НФ   | – нейротрофічні фактори                         |
| ОУ   | – обструктивна уропатія                         |
| ПНС  | – периферична нервова система                   |
| СА   | – скоротлива активність                         |
| СГ   | – спінальні ганглії                             |
| СМ   | – сечовий міхур                                 |
| ФТС  | – фетальна теляча сироватка                     |
| ЦНС  | – центральна нервова система                    |
| ШКФ  | – швидкість клубочкової фільтрації              |
| BACs | – biologically active compositions              |
| CM   | – conditioned medium                            |
| DRG  | – dorsal root ganglia                           |
| IS   | – isolated strip                                |
| IVO  | – infravesical obstruction                      |
| KCl  | – potassium chloride                            |

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Порухення уродинаміки внаслідок інфравезікальної обструкції (ІВО) є актуальною проблемою сучасної урології. До ІВО в зв'язку з доброякісною гіперплазією передміхурової залози (ДГПЗ) схильні більше ніж 50% чоловіків похилого віку [1, 2, 3, 4]. ІВО виникає у 8-10% жінок як ускладнення хірургічного лікування нетримання сечі [5, 6, 7, 8].

За умов тривалої хронічної обструкції сечового міхура (СМ) та підвищення уретрального опору відбувається порушення кровообігу, спостерігається ішемія клітин, гіпертрофія детрузора, можливе виникнення запалювальних процесів. Одним з наслідків структурно-функціональної перебудови клітинних шарів є втрата рецепторного апарата та денервація стінки міхура, яка може сягати більш 50% при цьому патологічному стані [9, 10, 11].

На теперішній час реіннервація СМ є актуальним завданням урології, відновлювальної хірургії та тканинної інженерії сечовивідних шляхів. Згідно з сучасними даними для вирішення таких завдань застосовуються культури клітин нейрального походження, зокрема Шванновські клітини та нервові клітини, отримані з різних джерел [12, 13, 14].

Відомо, що похідні глії здатні виробляти ряд нейротрофічних факторів (НФ), які сприяють регенерації нейронів та стимулюють спрямований ріст аксонів нервових клітин [15, 16]. Це є цінним для реіннервації СМ та відновлення пулу нервових закінчень у його стінці, але досі не було проведено досліджень щодо доцільності застосування такого методу в урології.

Кріоконсервування використовують як один з методів збереження біоматеріалу для клітинної терапії та трансплантації. В сучасній медико-біологічній практиці існують протоколи кріоконсервування стовбурових/прогеніторних клітин мозку у вигляді нейросфер [17, 18, 19, 20].

Основними підходами для кріоконсервування нейросфер є використання швидкості охолодження 1-0,5 град/хв та кріопротектору ДМСО в концентрації 10% [17, 18, 19, 20]. В попередніх дослідженнях, проведених у відділі кріоендокринології, було отримано первинну культуру нейробластоподібних клітин з наднирників новонароджених поросят [21], яка має здібність до формування прикріплених та флотуючих цитосфер. В подальших роботах було розроблено режими кріоконсервування таких клітин у вигляді суспензії та цитосфер [22, 23]. В теперішній час проводяться наукові роботи по культивуванню та кріоконсервуванню культури клітин спінальних гангліїв (СГ) та отриманню безклітинних середовищ, які містять нейротрофічні фактори (НФ) [24, 25]. Однак, на теперішній час не було зроблено спроби застосування культури клітин СГ, секретомів та інших біопродуктів для відновлення рецепторного пула СМ та покращення його скоротливості при ІВО.

Стимулювати ріст нервових закінчень можливо за рахунок НФ, введених парентерально або безпосередньо у порожнину СМ. Однак у останньому випадку ефективність методу буде невисокою, оскільки біодоступність введених речовин буде зменшуватися при наповненні міхура сечею, яка є досить агресивним середовищем для багатьох біологічно-активних сполук, та вимиванні речовин в момент наступного сечовипускання.

Наявні в даний час існує невелика кількість наукових робіт щодо впливу біологічно активних композицій (кріоекстракту та кондиційованих середовищ нативної і кріоконсервованої клітинних культур), які були отримані з спінальних гангліїв, на перебіг і наслідки обструкції СМ.

На особливу увагу заслуговує вивчення можливостей отримання, зберігання та використання культур клітин нервового та гліального походження в комбінації з НФ для покращення іннервації СМ після перенесеної ІВО.



**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дослідження проводилися в рамках основного напрямку наукової діяльності НДР відділу кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (шифр – 2.2.6.104, № державної реєстрації – 0116U003494, 2016-2020, науковий керівник НДР Бондаренко Т.П.).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – дослідження впливу біологічно активних композицій (кріоекстракту, кондиційованих середовищ нативної і кріоконсервованої культур клітин), отриманих зі спінальних гангліїв, а також препарату «Кортексін» на структурно-функціональні характеристики сечового міхура щурів із інфравезікальною обструкцією.

Для досягнення зазначеної мети були поставлені наступні завдання:

- Виявити зміни гістологічних та функціональних показників сечового міхура щурів за умов моделювання інфравезікальної обструкції шляхом накладення лігатури на сечівник.
- Дослідити вплив біологічно активних композицій (кріоекстракту, кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин), отриманих зі спінальних гангліїв, а також препарату «Кортексін» на масу сечового міхура та його гістологічні характеристики (середню висоту перехідного епітелію, товщину м'язового шару, загальну товщину стінки, індекс співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура, експресію білків S 100 та актину) у щурів з інфравезікальною обструкцією.
- Дослідити вплив біологічно активних композицій (кріоекстракту, кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин), отриманих зі спінальних гангліїв, а також препарату «Кортексін» на скоротливу активність сечового міхура у щурів з інфравезікальною обструкцією.
- Вивчити біохімічні показники крові (загального білка, сечовини, креатиніна) у щурів з моделлю інфравезікальної обструкції до та після

введення біологічно активних композицій з метою визначення їх можливої нефротоксичної дії.

**Об’єкт дослідження** – морфологічні та функціональні зміни стану сечового міхура щурів з інфравезикальною обструкцією до та після введення кріоекстракту та кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур спінальних гангліїв, а також препарату «Кортексін».

**Предмет дослідження** – кріоекстракт, нативні та кріоконсервовані культури спінальних гангліїв для отримання кондиційованих середовищ як біологічно активні композиції, застосовані для корекції наслідків інфравезикальної обструкції у щурів.

**Методи дослідження.** В роботі використані наступні методи досліджень: хірургічний – моделювання інфравезикальної обструкції у щурів шляхом накладення лігатури на сечівник, кріобіологічні – отримання культури сателітних клітин з спінальних гангліїв, її кріоконсервування та збір, зберігання кондиційованих середовищ, отримання і зберігання кріоекстракту спінальних гангліїв щурів, імуноцитохімічний та морфометричний аналіз культур клітин, метод органної бані (organ bath) – для вивчення скорочення ізольованих м’язових смужок сечового міхура на різні подразники, гістологічний та морфометричний – для аналізу зрізів тканини сечового міхура, імуногістохімічний – для аналізу зрізів тканини сечового міхура на вміст нервових та м’язових структур, біохімічні – для визначення можливого нефротоксичного впливу біологічно активних композицій на щурів, методи статистичної обробки отриманих результатів – для аналізу отриманих результатів.

**Наукова новизна роботи.** У дисертаційній роботі *вперше* на експериментальній моделі було встановлено позитивний ефект застосування кріоекстракту та кондиційованих середовищ нативної і кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв на морфологічні характеристики та скоротливу активність сечового міхура при інфравезикальній обструкції у щурів. *Вперше* експериментально доведена доцільність використання

вищеназваних біологічно активних композицій для відновлення структурно-функціональних показників сечового міхура при даній патології та опрацьований внутрішньочеревний шлях їх введення. *Вперше* встановлено відсутність прямої органоспецифічної дії нейротрофічного препарату «Кортексін» на структурно-функціональні показники сечового міхура при інфравезікальній обструкції у щурів. *Вперше* досліджено вплив кріоконсервування на характер біологічної дії секретомів культур клітин спінальних гангліїв на сечовий міхур щурів при інфравезікальній обструкції. *Вперше* показана можливість використання ксено- та алогенних клітин спінальних гангліїв і отриманих від них нейротрофічних факторів з метою корекції наслідків обструкції. *Вперше* встановлена відсутність прямих нефротоксичних ефектів при використанні біологічно активних композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, у щурів при інфравезікальній обструкції.

**Практичне значення отриманих результатів.** В результаті розв'язання поставлених в роботі задач зроблені висновки щодо використання біологічно активних композицій, отриманих з спінальних гангліїв, з метою нейротрофічної стимуляції для лікування порушень уродинаміки, зокрема викликаних інфравезікальною обструкцією.

Одержані наукові результати описують особливості структурних змін і механізмів регуляції функції сечового міхура при патології та за умов впливу ендогенних або екзогенних нейротрофічних факторів.

На підставі одержаних даних встановлено ефективність використання безклітинних середовищ та екстрактів отриманих з спінальних гангліїв у якості стимулюючих іннервацію факторів для відновлення структури і функцій сечового міхура з метою корекції наслідків інфравезікальної обструкції.

Наведені результати можна використовувати в науковій та медичній практиці як теоретичне підґрунтя для розробки діагностики і лікування захворювань та патологічних станів, обумовлених різними типами обструкції.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням, основні результати якого отримані безпосередньо здобувачем. Дисертант здійснив інформаційний пошук, аналіз та інтерпретацію літературних даних із проблемної тематики. Здобувач виконав експериментальну частину дослідження та здійснив забір матеріалу для подальшого вивчення. Автор самостійно виконав моделювання патології, цистометричні та морфометричні процедури, підготував матеріали для гістологічних, імуногістохімічних досліджень, а також здійснив статистичне опрацювання та аналіз одержаних даних. За безпосередньої участі дисертанта написано всі розділи дисертаційної роботи. Дизайн експерименту реалізовано на базі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України з розширенням можливостей патоморфологічного та імуногістохімічного дослідження на кафедрі патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти. Спільно з науковим керівником визначені мета та завдання роботи і способи їх вирішення, проаналізовано отримані результати, сформульовані висновки. У наукових працях здобувача, опублікованих одноосібно та в співавторстві, висвітлено матеріал, отриманий під час виконання дисертаційної роботи.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [26–38] – у плануванні дослідження, аналізі, обговоренні результатів та формулюванні висновків та підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [26–35, 37, 38] – у одержанні моделі інфравезікальної обструкції на самках щурів;
- у роботах [26–28, 31, 32, 37, 38] – в отриманні кріоекстракту зі спінальних гангліїв щурів та первинної культури клітин зі спінальних гангліїв неонатальних поросят, кріоконсервування, відігрів та субкультивування культури, отримання безклітинних середовищ;
- у роботах [26, 28, 30–32, 37, 38] – у вивченні впливу біологічно активних композицій (кріоекстракта, кондиційованих середовищ нативної та

кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв на скоротливі властивості та морфологічні характеристики сечового міхура;  
– у роботі [27] – у підготовці та проведенні біохімічних досліджень;  
– у роботах [28–31, 34, 38] – у підготовці гістологічних препаратів, проведенні морфометричного аналізу;  
– у роботах [26, 28, 32, 33] – у вивченні впливу препарату «Кортексін» на скоротливі властивості та морфологічні характеристики сечового міхура.

**Апробація результатів дисертації** здійснювалася на наукових семінарах ІПК і К НАН України. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та обговорені: на конференціях молодих вчених ІПК і К НАН України «Холод в біології та медицині» (Харків, Україна, 2018, 2019 роки); на XII Всеросійському симпозиумі з міжнародною участю «Биологическая подвижность» (Пушино, Російська Федерація, 2019 р.). Результати роботи були представлені на заочних заходах: міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток медичних наук: проблеми та рішення» (Брно, Чеська Республіка, 2018 р.); IX Всеросійському з'їзді трансплантологів (Москва, Російська Федерація, 2018 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (Львів, Україна, 2018 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи розвитку медицини в країнах ЄС та в Україні» (Влоцлавек, Республіка Польща, 2018 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання» (Дніпро, Україна, 2019 р.); 6-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Яремче, Україна, 2019 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, серед них 4 статті у наукових фахових виданнях, 1 з яких входить до міжнародної наукометричної бази Scopus, 1 стаття у іноземному виданні країни ЄС/ОЕСР, 9 тез у матеріалах науково-практичних конференцій та конгресів, в тому числі 4 у міжнародних.

**Обсяг і структура роботи.** Дисертація викладена на 156 сторінках (обсяг основного тексту 105 сторінок) і складається з анотації, введення, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку літератури, який викладений на 35 сторінках і включає 259 джерел, в тому числі 224 закордонних, 2 додатки. Робота ілюстрована 1 таблицею, 45 рисунками, та 19 мікрофотографіями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1. Морфологічні і функціональні характеристики сечового міхура**

Сечовий міхур є одним з важливих елементів нижніх сечових шляхів і всього організму в цілому. Цей орган представляє собою багатокomпонентну динамічну систему. Різноманітні зв'язки між внутрішніми електричними, хімічними (нейрогуморальними) і механічними процесами при накопиченні і виведення сечі необхідні СМ для того, щоб орган функціонував як фізіологічний об'єкт. Хоча він в основному служить резервуаром для зберігання сечі, його механічні, скорочувальні та неврологічні властивості дозволяють людині та тваринам пристосовуватися до різноманітних сценаріїв, таких як сечовипускання у зручний час або прийнятний соціальний спосіб, або затримка сечі під час величезного симпатичного стресу [39, 40, 41, 42].

Сечовий міхур - це непарний порожнистий підочеревенний орган, який повністю знаходиться під нутрощами глибоко в малом тазу. Коли він спорожнюється, то має вигляд тетраедру з дном, шийкою, верхівкою, верхньою і двома нижньолатеральними поверхнями. По мірі наповнення СМ поширюється спереду і переважно в черевну порожнину і має куполоподібний вигляд. У дітей СМ знаходиться переважно в черевній порожнині і продовжує спускатися до порожнини малого тазу після статевого дозрівання [43, 44, 45].

Зберігання та виведення сечі вимагає синхронного скорочення і розслаблення СМ та зони відтоку (шийки сечового міхура, сечівника, сфінктера сечівника та тазової діафрагми), і ці структури повинні працювати як загальна функціональна одиниця. Зазвичай міхур дорослої людини має місткість 400–500 мл. Координація між цими структурами здійснюється через складну нервову систему управління, яка розташована в головному і

спінальному мозку, периферичних гангліях. Це відрізняє нижні сечовивідні шляхи від багатьох інших вісцеральних структур (наприклад, шлунково-кишкового тракту та серцево-судинної системи), які підтримують певний рівень функції навіть після пошкодження зовнішнього нейронного шляху. Нижні сечовивідні шляхи також незвичні за своїм характером діяльності та організації нейронних механізмів управління. СМ має лише два режими операції: зберігання та видалення. Таким чином, багато хто з елементів нейронної схеми мають вимикач або фазовий характер діяльності, на відміну від тонічних моделей, характерних для вегетативних шляхів до серцево-судинних органів. Крім того, сечовипускання знаходиться під свідомим контролем і залежить від навченої поведінки, яка розвивається під час дозрівання нервової системи, тоді як багато інших вісцеральних функцій регулюються мимоволі. Мікція також вимагає інтеграції вегетативних та соматичних еферентних механізмів для координації діяльності вісцеральних органів (СМ та сечівник) з уретральними та поперечно-смугастими м'язами тазового дна. У скорочувальній здатності гладких м'язів детрузора беруть участь ацетилхолін та аденозин трифосфат. Активація мускаринових та пуринаргічних рецепторів викликає зміни рівня кальцію у клітинах та активацію кальцій-залежних каналів, в результаті чого відбувається скорочення м'яза. Скорочувальні рецептори в м'язах детрузора: мускаринові рецептори (M2 і M3), які є домінуючими, і пуринаргічні рецептори (P2X1). Рецептори M3 є основним скорочувальним компонентом. Однак рецептори M2 є більш вираженими і відповідають, головним чином, за відновлення тону м'язів після розслаблення [46,47, 48].

Анатомічно СМ поділяється на три основні частини: верхівку, тіло, і дно (основу), яка складається з трикутника і шийки. Все тіло органу укладене в пухку жирову тканину паравезікальної ямки. Верхівка покрита тонкою розтяжною очеревиною. Остання утворює ряд складок - зв'язок, які не мають будь-якого біомеханічного значення [39, 49, 50].



У жінок СМ тісно пов'язаний з передньою стінкою піхви, у чоловіків - з прямою кишкою. Ректогенітальна перегородка (фасція Денонвіл'є) утворює неповну перегородку між прямою кишкою та сечостатевими органами як у чоловіків, так і у жінок. Вентрокраніально ректогенітальна перегородка становить неповний розділ між прямою кишкою та сечостатевими органами, і каудально завершена тілом промежини. Верхівка міхура у обох статей звернена до верхньої частини лобкового симфізу. Верхня поверхня, приблизно трикутна, покрита повністю очеревиною у чоловіків. У жінок верхня поверхня також значною мірою покрита очеревиною, але ззаду це відображається на матці на рівні внутрішньої ямки матки, утворюючи таким чином міхурово-матковий мішечок. Решта задньої частини верхньої поверхні, позбавлена очеревини, відокремлюється від надпідхвової шийки матки фіброзною тканиною. Нижньолатеральні поверхні відокремлені спереду від лона лобно-передміхуровими зв'язками у чоловіків або пубовезікальними зв'язками у жінок, відповідно, задньою поверхнею лона, а позаду - фасціями м'язу, підіймаючого задній прохід та внутрішнього запираючого м'язу. Основну частину становить тіло СМ. Верхньопередня частина міхура утворює його верхівку, добре помітну при наповненому міхурі, вона подовжується вгору у напрямку до пупка за рахунок серединної пупкової зв'язки. Остання представляє собою облітерований урахус. Задньонижня частина міхура, спрямована у чоловіків в сторону прямої кишки, а у жінок - в сторону піхви. Це дно - найменш рухома частина СМ. Передньонижня витягнута частина органа становить його шийку і в ній розташовано внутрішній отвір сечівника. Тіло СМ поділяється на передню, задню і бічні стінки. Передня стінка розташована між верхівкою і шийкою та звернена до лобкового симфізу, а при наповненому міхурі розташовується позаду передніх черевних м'язів. Задня стінка, звернена догори в черевну порожнину, частина органа, яка покрита очеревиною. Вона розташована над передміхуровою залозою і безпосередньо спереду від прямої кишки у чоловіків, межує ззаду з простором, відомим як ректовезікальний простір,

основу якого складає фасція Денонвільє. У жінок СМ лежить безпосередньо спереду від піхви у просторі відомому як міхурово-матковий мішок Мерінга [42, 51, 52, 53].

Сечовий міхур і сечівник походять з передньої частини клоаки, яка являє загальну кінцеву частину задньої кишки, куди входять мезонефричні протоки і спускаються ембріональні сечоводи. Клоака також сприяє розвитку сечостатевого синусу що, в свою чергу, сприяє розвитку піхви. Традиційно уроректальна перегородка уподібнюється затвору, який спускається, щоб розділити клоаку на сечостатевий канал спереду та аноректальний канал позаду. Цей процес відбувається між четвертим і шостим тижнем вагітності та допомагає боковим вrostанням складок Ратке. Однак останнім часом існування уроректальної перегородки та складок Ратке були поставлені під сумнів результатами досліджень, що використовують сучасну методологію, таку як скануюча електронна мікроскопія та імунофарбування апоптозу. В даний час вважається, що розділення клоаки - результат осадження мезенхіми *in situ* в клоаці та уrogenітальному синусі в поєднанні з одночасним апоптозом та змінами кривизни черевної стінки та хребта. По мірі того, як СМ стає більш чітко визначеним у верхній частині сечостатевого каналу, зони надходження сечоводів і мезонефричні протоки починаються окремо. Коли відстань між ними збільшується, мезонефричні протоки спускаються каудально та відкриваються в задню уретру, що розвивається. Навпаки, сечоводи зберігають своє початкове положення по відношенню до СМ, що розвивається. Хоча трикутна пластинка мезодерми, що охоплює отвори сечоводів і отвори мезонефричних проток, є покритою ентодермальною оболонкою сечостатевого каналу, його обриси зберігаються як тригонум. Найбільш дистальна (промежнинна) частина сечостатевого каналу дає початок утворення по всій довжині сечівника жінки і до задньої частини сечівника у чоловіків. Передня частина чоловічого сечівника створюється закриттям сечостатевої борозенки. Тим часом алантоїс, перетворюється в закритий дивертикул, що виступає з купола міхура плода в

пупок, поступово редукує, але зберігається як серединна пупкова зв'язка [54, 55, 56, 57].

На гістологічному рівні СМ складається з уротелія, власної пластинки, м'язової оболонки, перивезікальної адіпозної тканини, і або серозної оболонки на верхній поверхні, або адвентиції у інших місцях. Уротелій є часто згорнутим в складки в стані скорочення СМ, але може виглядати ослабленим і витонченим, коли орган розширюється. Власна пластинка подібна до субепітеліальної сполучної тканини сечовивідних шляхів в інших місцях і складається з сполучної тканини, кровоносних та лімфатичних судин, нервів, гладеньких м'язів. Слизова мускулатура представлена невеликими гладенькими м'язами, які є часто відокремлені і розташовані безсистемно. Під власною пластинкою лежить м'язова оболонка - або м'яз детрузора. Це гладенька мускулатура, яка забезпечує загальну структуру СМ і складається з трьох великих неподільних шарів. Також у цих м'язах присутні кровоносні судини, лімфатична система, нервові та жирові клітини. Нарешті, зовні стінка міхура складається з шарів серози або адвентиції, залежно від розташування, як описано раніше. Сечівник виходить з нижнього кінця СМ з прилеглими шарами гладенької мускулатури, що утворює внутрішній сфінктер сечівнику [45, 58, 59, 60, 61].

## **1.2. Обструкція сечового міхура і її наслідки**

В даний час порушення сечовипускання, викликані ІВО, спостерігаються у 21,5% населення планети. Обструкція СМ є поширеною медичною проблемою. Більше 80% чоловіків 50-60 років і старше мають різну ступінь обструкції сечового міхура у вигляді доброякісної гіпертрофії передміхурової залози (ДГПЗ). Хоча ДГПЗ є найбільш поширеною причиною обструкції, присутні і інші етіологічні фактори, що включають в себе рак, склероз або фіброз шийки сечового міхура, стриктури і клапани уретри і детрузорно-сфінктерну діссенергію [62, 63, 64, 65, 66].

Справжня поширеність ІВО у жінок невідома, але результати великих ретроспективних досліджень варіюють від 3 до 8%. Основою обструкції у жінок може бути деформація сечівника або шийки сечового міхура (пролапс тазових органів, гінекологічні злоякісні і доброякісні пухлини, післяопераційні ускладнення при корекції нетримання сечі), оклюзія нижніх сечових шляхів (чужорідні тіла, сечові конкременти, пухлини) і функціональні проблеми (неврологічні і запальні захворювання) [5, 67, 68, 69].

Дисфункція СМ частіше вторинна по відношенню до часткової обструкції. Вона зустрічається як у жінок в постменопаузі, так і у жінок з ІВО, в результаті різної етіології, таких як операції з приводу нетримання сечі або пролапсу тазових органів. Крім того, ІВО часто зустрічається у дітей з вродженими аномаліями нижніх сечових шляхів і призводить до дисфункції сечовипускання [6, 70, 71, 72, 73].

ІВО викликає множинні фізіологічні та структурні зміни в гладеньких м'язах, перехідноклітинного епітелію, нервах і судинній мережі. В кінцевому підсумку, це може призводити до втрати функції гладеньких м'язів і скоротливості, або викликати прогресуючу виражену гіпертрофію і підвищення скоротливості СМ [62, 63, 74, 75].

ІВО може викликати значні структурні, функціональні та біохімічні зміни в міхурі. Це характеризується прогресуючим погіршенням скоротливої активності і іншими функціональними порушеннями. Кінцевим результатом є або орган з товстої волокнистої стінкою, низькою ємкістю, поганою піддатливістю і незначною або відсутньою скоротливою функцією; або розширений міхур з тонкою волокнистою стінкою, високою ємністю і з незначною або відсутньою скорочувальною функцією [76, 77, 78, 79].

Також морфологічно доведено, що вихідна обструкція викликає дегенерацію нейронів (часткову денервацію) в гладеньких м'язах СМ [80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87]. Втрата функціональних синапсів може зменшувати вивільнення скорочувальних нейротрансмітерів і таким чином зменшувати

величину скорочувального відповіді міхура [88, 89, 90, 91, 92]. Дослідження з використанням експериментальних тварин також показали, що наявність перешкоди відтоку сечі, впливає на нервовий контроль активності СМ [10, 85, 93, 94, 95]. ІВО зазвичай супроводжується зниженням щільності іннервації гіпертрофованого міхура [96, 97, 98, 99]. ІВО змінює нейронні мережі в центральній нервовій системі, що може викликати дисфункцію органу [77, 81, 93, 95, 100].

Інфравезікальна обструкція викликає численні функціональні і морфологічні зміни в сечовивідних шляхах, одним з проявів яких є обструктивна уropатія (ОУ) [101, 102, 103, 104]. Тривала ОУ може привести до ниркової недостатності (НН), що є значущою соціальною та медичною проблемою в даний час [105, 106, 107]. Поширеність ОУ збільшується з віком і коливається від 5% до 30% [108, 109].

Ниркова недостатність на фоні ОУ характеризується порушенням функції нирок зі зниженням швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) і ниркового кровотоку, прогресуючим нирковим інтерстиціальним фіброзом (НІФ) [110, 111, 112]. Наслідком цього є підвищення вмісту сечовини і креатиніну в крові, посилення процесів катаболізму білків, зменшення рівнів сечовини і креатиніну в виділеній пошкодженими нирками сечі [113, 114, 115, 116, 117].

Вважається, що при своєчасному усуненні обструкції, процеси фіброзу припиняються, нирки повністю відновлюють свою функцію і ниркова недостатність не розвивається [105, 110, 118]. Однак, багато авторів вказують на підвищення індукції апоптозу в епітелії ниркових клубочків і каналців на ранніх термінах ОУ і формування «порочного кола» в розвитку фіброзу нирок [111, 112, 119, 120]. Це може привести до неповного відновлення ниркової функції після обструкції, розвитку ниркової недостатності в більш пізні терміни при відсутності обструкції з виникненням термінальної стадії процесу [121, 122]. Лікування останньої стадії ниркової недостатності

складається в замісної терапії хронічним діалізом і трансплантації нирки, які є далеко не ідеальними довгостроковими альтернативами [123].

Одним із способів розробки нових методів лікування ІВО і її віддалених наслідків, є експерименти на лабораторних тваринах, зокрема на щурах. Існує кілька способів відтворення патологічної моделі ІВО на цих тварин, що розрізняються за складністю технічного виконання, матеріального забезпечення та надійності отримання кінцевих результатів. Всі способи відносяться до оперативних втручань і маніпуляцій, які в тій чи іншій мірі впливають на організм лабораторних тварин, що також може вплинути і на формування самої патологічної моделі. Тому, виходячи з цих положень, отримання моделі ІВО, як і інший моделі патологічного процесу, має базуватися на таких основних принципах:

- максимально повторювати патологічний процес в організмі лабораторних тварин;
- бути мінімально інвазивною;
- включати в себе мінімальну кількість факторів, які можуть вплинути на формування і подальший розвиток патологічного процесу, тобто спотворювати його, а також викликати інші зміни, не властиві йому.

Зазвичай для отримання моделі ІВО у щурів вибираються самки, так як у них на відміну від самців, простіше отримати доступ до будь-якого з відділів уретри, що пов'язано з відмінностями в анатомічній будові сечостатевої системи [124, 125, 126, 127, 128, 129].

### **1.3. Нейротрофічні фактори та їх роль в організмі**

Відомо, що нейротрофіни і ростові фактори відносяться до фізіологічно значимих поліпептидів, які регулюють ріст і диференціювання нейронів, їх функціональну стабільність і пластичність синаптичних процесів [130, 131, 132].

Сімейство нейротрофічних факторів (НФ) включає: фактор росту нервів (NGF), нейротропний фактору мозку (BDNF), нейротрофін 3 (NT-3),

нейротрофін 4/5 (NT-4/5) та нейротрофін 6 (NT-6), гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) [133, 134, 135, 136]. Відомо, що похідні глії здатні секретувати ряд нейротрофічних факторів, що сприяють регенерації нейронів [15, 137].

Гліальний нейротрофічний фактор підтримує виживання різних периферичних і центральних нейронів *in vitro*, включаючи дофамінергічні середнього мозку, спинальні моторні, симпатичні, парасимпатичні, периферичні сенсорні і кишкові нейрони. Було показано, що гліальний нейротрофічний фактор має велике значення для розвитку кишкової нервової системи, а також сечової системи і частини сенсорних гангліїв [138, 139, 140, 141].

Нейротрофіни є факторами росту, які беруть участь в різних функціях нервової системи, включаючи виживання, проліферацію, диференціювання, мієлінізацію, апоптоз, зростання аксонів і синаптичну пластичність [142, 143, 144, 145]. Більш великі сучасні дослідження встановили, що функції НФ включають в себе крім виживання, також регуляцію аксонального і дендритного зростання, утворення та функціонування синапсів, міграцію клітин, проліферацію клітин і виживання дорослих нейронів [146, 147, 148, 149]. Основна роль НФ складається в регуляції виживання, диференціювання і зростання клітин різних тканин і організації основних фізіологічних процесів [133]. НФ являють собою низькомолекулярні білки, які визначають епігенетично виживання нейронів в ембріогенезі і підтримують їх морфофункціональні властивості в дорослому організмі. Високий вміст НФ виявлено і в периферичній глії, і в гліальних клітинах ЦНС, особливо в астроцитах [130, 132, 135]. Головною особливістю гліальних чинників зростання є здатність контролювати розвиток нервової системи, міграцію і диференціацію нервових клітин [100, 135]. Гліальний нейротрофічний фактор має вирішальне значення для виживання клітин Шванна і стимулює їх проліферацію, а також у формуванні нервово-м'язових з'єднань [143, 149]. Системне застосування НФ підсилює м'язову реіннервацію і інтрамускулярне

розгалуження м'язового нерва. Виживання первинних сенсорних нейронів і мотонейронів залежить від безлічі НФ, що діють синергетично або в чітко визначеній послідовності [133]. Багато НФ були ідентифіковані в нейронах гангліїв в області малого тазу і сенсорних нейронах сечового міхура в попереково-крижовому спінальному ганглії [95, 146]. В периферичній нервовій системі (ПНС) тканинні джерела НФ, як правило, не нейрональні клітини, тоді як в центральній нервовій системі (ЦНС) НФ синтезуються переважно нейронами в фізіологічних умовах. З'явилися сучасні наукові праці, які описують недавній прогрес у вивченні сигнальних шляхів, стимулювання яких нейротрофінами, впливає на виживання, диференціювання і функцію клітин всередині нервової системи [133, 135]. Вся ПНС походить від популяція мігруючих клітин, які називаються клітинами нервового гребеня. Ці клітини генерують велику різноманітність типів клітин і тканин під час ембріонального і дорослого розвитку, в тому числі хрящ і кістку, сполучну тканину, пігментні і ендокринні клітини, а також нейрони і глію [150].

Останнім часом з'явилися наукові праці з описом лікування захворювань нирок з використанням стовбурових клітин, які шляхом впливу на регенеративний і репаративний потенціал можуть стимулювати структурне і функціональне відновлення нирок [151, 152]. Інші дослідження показали, що більш значуще позитивний вплив на виникнення і прогресування ПФ при ОУ можна отримати за допомогою безклітинних кондиційованих середовищ, що містять ростові фактори [153]. Так само при моделюванні захворювання нирок було виявлено, що екзогенні стовбурові клітини і фактори, які вони секретують, можуть бути причиною пошкодження нирок [154].

Завдяки своїй анатомічній будові СГ можуть бути використані як джерело нейротрофічних факторів. Вони являють собою кластери сенсорних нейронів, кожний з яких має окремий роздвоєний аксон, який з одного боку досягає спинного мозку, а з іншого закінчується в периферичних органах.



Гістологічно, СГ складається з тіл чутливих нейронів, які передають сенсорні імпульси від периферії до центральної нервової системи. Розрізняють два типи чутливих нейронів: великі світлі та малі темні [155]. Малі нейрони відносяться до термо-, механо- та ноцицепції, тоді як великі являють собою низькопорогові механорецептори. Ці два типи нейронів відрізняються мієлінізацією аксонів: малі мають немієлізовані аксони, тоді як великі – мієлінізовані аксони з високою швидкістю проведення імпульсів.

Обидва типи аксонів знаходяться у прямому контакті з шваннівськими клітинами. Якщо одна шваннівська клітина оточує відразу кілька аксонів, вони називаються немієлінізованими. Якщо шваннівська клітина за рахунок множинних обгортань власної плазматичної мембрани оточує один аксон, то формується мієлінова оболонка аксона (мієлінізований аксон). Шваннівські клітини у комплексі з аксонами обох типів покриті безперервною базальною ламіною. Капіляри знаходяться всередині ендоневрального компартмента, поздовжньо між аксонами наявні волокна колагену. У складі епі-, пері- та ендоневрію присутні фібробласти, тучні клітини, макрофаги, адипоцити [156]. Шваннівські клітини, які втратили контакт з аксонами, проліферують і утворюють довгі трубки в ендоневрії (смуги Бюнгнера). Це є місцями секреції компонентів екстраклітинного матриксу (фібронектину, ламініну) та факторів росту, що сприяють регенерації аксонів [157].

Ще однією з найважливіших клітинних субпопуляцій СГ є мантийні гліоцити (МГ). Вони є спеціалізованими клітинами, які щільно оточують тіла чутливих нейронів та створюють своєрідний бар'єр між ними та кровообігом. Мантийні гліоцити беруть участь у структурній та трофічній підтримці нейронів, а також в регуляції їх хімічного мікрооточення. Вони виділяють гліотрансміттери та сприяють передачі нервового імпульсу [158, 159]. Встановлено, що мантийні гліоцити з ембріональних та неонатальних СГ мають мультипотентні властивості та можуть диференціюватися в шваннівські клітини, астроцити і олігодендроцити [160, 161].

Мантійні гліоцити та шваннівські клітини сприяють виживанню нейронів, регенерації аксонів та формуванню синапсів [162, 163], в тому числі за рахунок секреції біологічно активних речовин, зокрема нейротрофічних факторів. Наприклад, встановлено, що після пошкодження нерва нейронами та МГ вивільняються NGF та VEGF [164]. Імуногістохімічно встановлено експресію GDNF у МГ [165]. Фактор росту нервів і його рецептори описані в СГ людини, причому NGF-подібну імунореактивність було встановлено в основному в тілах малих нейронів, тоді як експресія рецепторів до нього спостерігалася у 65% всіх типів нейронів [166]. Імунореактивність для GDNF і одного з його рецепторів RET була виявлена на 25% і 37% всіх типів нейронів, відповідно [165].

#### **1.4. Перспективи отримання і використання біологічно активних композицій, які містять нейротрофічні фактори**

Сьогодні актуальні методи регенеративної медицини в урології, що дозволяють відновлювати не тільки порушені фізіологічні процеси, а й впливати на регуляцію виживання, диференціювання і зростання клітин різних тканин сечовидільної системи [167, 168]. При цьому основні патогенетичні механізми ІВО, такі як гіпертрофія і гіперконтрактильність, вимагають для їх корекції поєднання багатьох терапевтичних та хірургічних підходів, часто з незадовільними результатами [169]. У той же час існують роботи, що показують участь НФ в розвитку СМ і ремоделюванні його стінки після ІВО [87]. Це дозволяє використовувати БАК (екстракти, кондиціоновані середовища, лізати) для впливу на морфофункціональні властивості СМ в нормі та патології.

Поняття нейропротекції стосовно ролі нейротрофічних чинників включає: 1) запобігання (зупинка) дегенерації нейронів; 2) обмеження або усунення наслідків окисного стресу і апоптозу нервових клітин; 3) відновлення медіаторного дисбалансу та нейротрансмітерних процесів; 4) компенсаторне перемикання трансдукторних, транскрипторних і

епігенетичних сигнальних систем; 5) стимуляцію ендогенного нейрогенезу, утворення нових груп нейрональних клітин, як компонентів репаративної і адаптивної системи захисту мозку [170].

Нервові закінчення в стінці СМ містять багато нейротрансмітерів або модуляторів. Деякі з цих речовин можуть викликати скорочення гладеньких м'язів, а інші можуть блокувати цей процес [100, 144, 174]. Реіннервація може бути здійснена нейротрофічними чинниками, які продукуються у самому сечовому міхурі [135, 146, 172]. Фактори зростання беруть участь в розвитку органу в онтогенезі і можуть змінювати його структуру після ІВО [95, 173, 174].

Спінальні ганглії є потенційним джерелом нейральних стовбурових клітин, оскільки було показано, що вони містять клітини-похідні нервового гребеня, які здатні диференціюватися в нейрони і різні субпопуляції гліальних клітин. Експерименти показують, що нейрогенез в СГ підтримується протягом усього життя за рахунок популяції цих стовбурових/прогеніторних клітин, які знаходяться у стані функціонального покою. Вважається, що мантійні гліоцити (сателітні клітини) беруть участь в регуляції хімічного мікросередовища нейронів, здійснюють структурну і трофічну підтримку нейронів, виділяють гліотрансмітери і полегшують передачу сигналу. Технології культивування, розроблені за минулі роки, дозволили отримати кілька типів культур з СГ: збагачені нейронами, МГ або шванновськими клітинами, а також культури, що містять стовбурові клітини-похідні нервового гребеня. Таким чином, первинна культура клітин, отримана з СГ, може містити різні типи клітин (тіла нейронів, фібробласти, гліальні і ендотеліальні клітини). Наприклад, було встановлено, що МГ як похідні нервового гребеня можуть диференціюватися в шваннівські клітини, астроцити і олігодендроцити. Крім того, було показано, що з експлантатів СГ виселяються прогеніторні клітини, морфологічно подібні до МГ, які при певній стимуляції диференціюються в нейрони. У зв'язку з цим

передбачається, що МГ можуть брати участь в регенеративному нейрогенезі при пошкодженнях ПНС [24].

Є дані про те, що нейротрофічні чинники, отримані з гліальної клітинної лінії, необхідні для розвитку парасимпатичних, кишкових і моторних нейронів, в ході сперматогенезу і морфогенезу нирок, а також є факторами виживання пошкоджених ниркових клітин [86, 108].

З іншого боку, сучасним підходом до отримання НФ є використання кондиційованих середовищ та продуктів секреції від культур клітин певного походження. Взагалі, «секретом» - це термін, що позначає всі фактори, які можуть секретувати клітини. Вони включають розчинні білки, цитокіни, фактори росту, білки позаклітинного матриксу, злучені мембранні рецептори [175, 176, 177, 178]. Секретоми координують клітинне зростання, поділ, диференціювання, апоптоз, діючи як міжклітинні сигнали в багатоклітинних організмах, а також відіграють ключову роль в контролі розвитку патологічних процесів. Відповідно, гліальний секретом включає повний набір білків та пептидів, що секретується гліальними клітинами.

Як було встановлено, фактори зовнішнього середовища, зокрема гіпотермія, може впливати на гліальний секретом. У роботі Jha M.K. та співав. було проведено вивчення секретому, отриманого від культури гліальних клітин, активованих попередньою експозицією у гіпотермічних умовах (29°C). Загальний біологічний профіль секретому культури містив білки, які належали до різних регуляторно-метаболічних функцій: 30% - регуляція апоптозу та виживання клітин; 20% - клітинний гомеостаз; 19% - структурна організація клітини; 13% - міжклітинна передача сигналів і взаємодія; 18% - клітинний рух. Профіль секретому активованих гіпотермією клітин значно відрізнявся від інтактного [179].

Таким чином, КС, отримані від інтактних та кріоконсервованих культур гліальних клітин мають містити секретом, який включає не тільки нейротрофічні фактори, але й низку інших біологічно активних речовин, що впливають на іннервацію органу та її належне функціонування.

В клінічній практиці з метою нейропротекції та нейрорегенерації застосовують зазвичай нейротрофічні препарати, одним з яких є «Кортексін», що містить нейропептидні комплекси, які володіють переважною дією на ЦНС. Препарат «Кортексін» отримують з кори головного мозку великої рогатої худоби та свиней. Його дія заснована на ефектах захисту і компенсації функцій клітин мозку, утворенні нових нейрональних зв'язків і метаболічного забезпечення роботи мозку в цілому. Основний механізм нейропротективної дії «Кортексіну» пов'язаний з попередженням апоптозу і загибелі нервових клітин внаслідок утворення активних форм кисню. Позитивний ефект препарату при інкубації нейронів під час відсутності ростових факторів підтверджує нейротрофічний механізм дії препарату. Це положення базується на інформації про включення сигналу нейротрофінів в систему трансдукторних і транскрипційних біохімічних процесів, каскадна багатофакторна дія яких завершується підсумковою регуляцією на рівні генного апарату клітини. В результаті впливу пептидних і інших компонентів, що входять до складу «Кортексіну», на нейрональні мішені досягається спрямована стимуляція різних популяцій клітин і різних відділів центральної і периферичної нервової системи [170].

## **РОЗДІЛ 2**

### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

#### **2.1. Тварини**

Спінальні ганглії були отримані від поросят першого покоління гібридів порід велика біла/ландрас і макстер/дюрок на 1-3 добу після народження або від статевозрілих білих безпородних щурів.

Дослідження з моделювання інфравезікальної обструкції виконували на 6-місячних білих безпородних щурах-самках масою 250–320 г. Маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних або інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

#### **2.2. Моделювання інфравезікальної обструкції**

Інфравезікальну обструкцію відтворювали хірургічним методом. Щурів наркотизували внутрішньочеревним введенням комбінації «Золетілу» («Virbac», Франція) і «Седазіну» («Biowet», Польща) з розрахунку 1,86 і 1,92 мг відповідно на 100 г маси тіла. Судинний катетер («BD», Іспанія) з зовнішнім діаметром 1,0 мм вводили в сечовий міхур. Постійну часткову обструкцію створювали шляхом прошивання шовковою ниткою 3/0 та зав'язування лігатури навколо дистального відділу сечівника без здавлювання тканин (рис. 2.1). Судинний катетер вилучали наприкінці процедури [180].

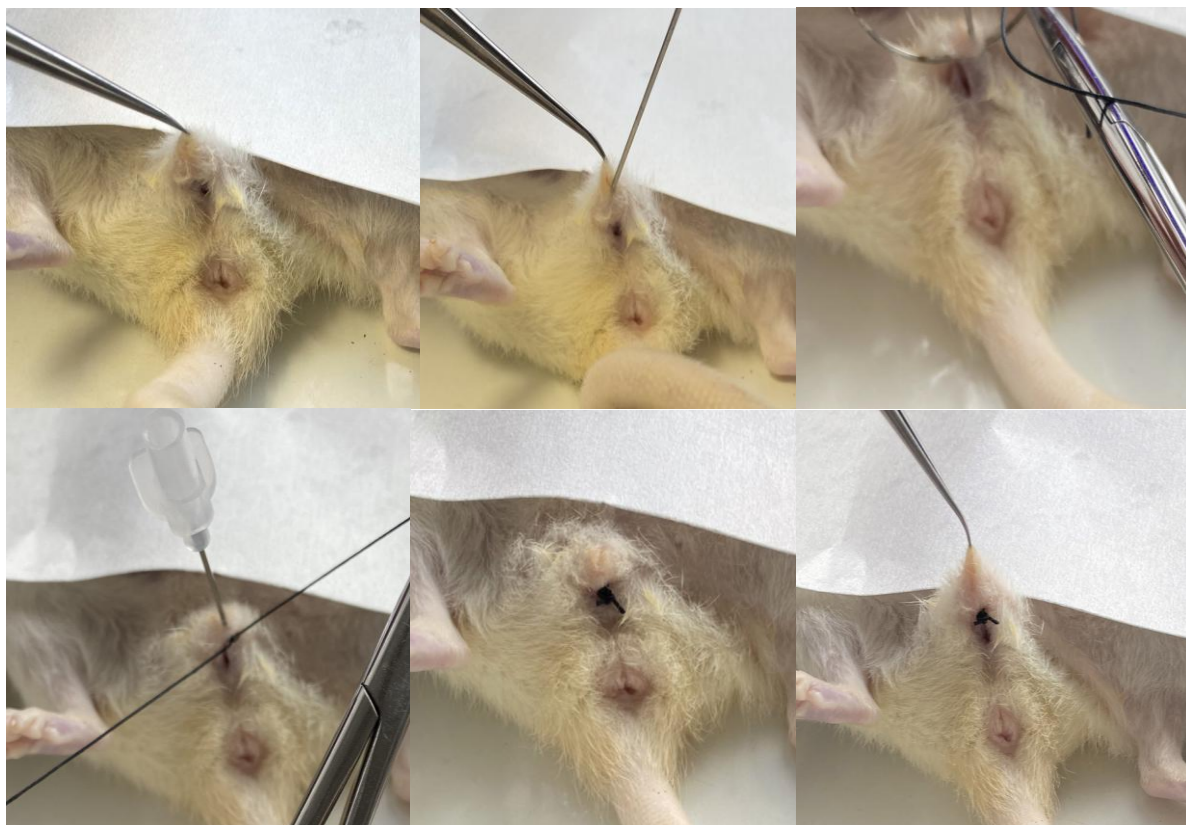


Рис. 2.1. Етапи моделювання інфравезикальної обструкції у щурів.

### **2.3. Отримання кріоекстракту зі спінальних гангліїв статевозрілих щурів**

Кріоекстракт зі СГ отримували за методом з незначною модифікацією [181]. Для цього СГ статевозрілих щурів вилучали під бінокулярним мікроскопом МБС-9 та поміщали в охолоджений фізіологічний розчин («Юрія-Фарм», Україна). Для приготування кріоекстракту використовували СГ, отримані від 5 тварин з грудних, поперекових, крижових і куприкових відділів спинного мозку. Зібрані СГ поміщали у кріопробірки у 1 мл фізіологічного розчину. Заморожували шляхом швидкого занурення у рідкий азот. Витримували у рідкому азоті впродовж 15 хвилин. Розморожували на водяній бані при температурі 42°C при безперервному струшуванні впродовж 1–2 хв. Процедуру заморожування-віддігріву повторювали двічі. Переносили СГ до скляного гомогенізатора та гомогенізували до отримання однорідної субстанції. Гомогенати СГ переносили у центрифужні пробірки та центрифугували при 1300 g впродовж 10 хвилин.

Надосад збирали та фільтрували крізь фільтр із діаметром пор 0,22 мкм («TPP», Швейцарія) з метою стерилізації, фасували по 1,5 мл у мікропробірки («Greiner Bio-One GmbH», Німеччина) і зберігали в холодильнику при  $-18^{\circ}\text{C}$  до початку введення тваринам. Перед використанням кріоекстракт відігрівали на водяній бані ( $42^{\circ}\text{C}$ ) при безперервному струшуванні впродовж 1–2 хв і центрифугували на мініцентрифугі (2000 g) протягом 10 хв.

#### **2.4. Отримання первинної культури клітин зі СГ новонароджених поросят**

Для отримання культури клітин використовували СГ, отримані від 2 тварин з грудних, поперекових, крижових і куприкових відділів спинного мозку. СГ вилучали під бінокулярним мікроскопом МБС-9 та поміщали в охолоджене середовище DMEM/F12 («Biowest», Франція) з розчиненими в ньому 200 Од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину (обидва «Артеріум», Україна) і 5 мкг/мл амфотерицину В («Biowest»). На кожному СГ робили надріз та переносили їх у ферментативний розчин, приготований на середовищі з 1 мг/мл колагенази типу ІА («Sigma», США) і 0,1 мг/мл ДНКаз («Sigma»). СГ у ферментативному розчині переносили на водяну баню ( $37^{\circ}\text{C}$ ) та ферментували впродовж 30 хв при постійному струшуванні. Після цього надосад з клітинами, що відокремились, відбирали в пробірку з охолодженою фетальною телячою сироваткою (ФТС, «Biowest»). До СГ додавали свіжу порцію ферментативного розчину та повторювали процедуру ферментації двічі, але впродовж 10 хвилин. Клітини, отримані після трьох етапів ферментації, об'єднували і відмивали у 0,2% розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА, «Sigma») на середовищі DMEM/F12 шляхом дворазового центрифугування (3 хв при 1500 об/хв). Осад клітин збирали у пробірку та фільтрували через сито з діаметром пір 125 мкм для видалення клітинного дебрису.

Клітини поміщали у базове середовище культивування (БСК), яке містило  $\alpha$ -МЕМ із додаванням 10% ФТС, 100 мкг/мл гентаміцину («ПанЕко»,



Росія); 100 мкг/мл цефотаксиму («Біосинтез», Росія); 2,5 мкг/мл амфотерицину В. Клітини культивували в пластикових чашках Петрі з площею дна 8,8 см<sup>2</sup> («НПЛ Гранум», Україна) і нормальною адгезивною поверхнею. при 37°C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> [24]. Заміну середовища проводили кожні 3 доби. Посівна концентрація становила 2,5-5x10<sup>5</sup>кл/мл, при цьому в чашку Петрі вносили 2 мл БСК. На 10–15 добу в культурі клітин СГ формувався конфлуентний моношар (рис. 2.2).

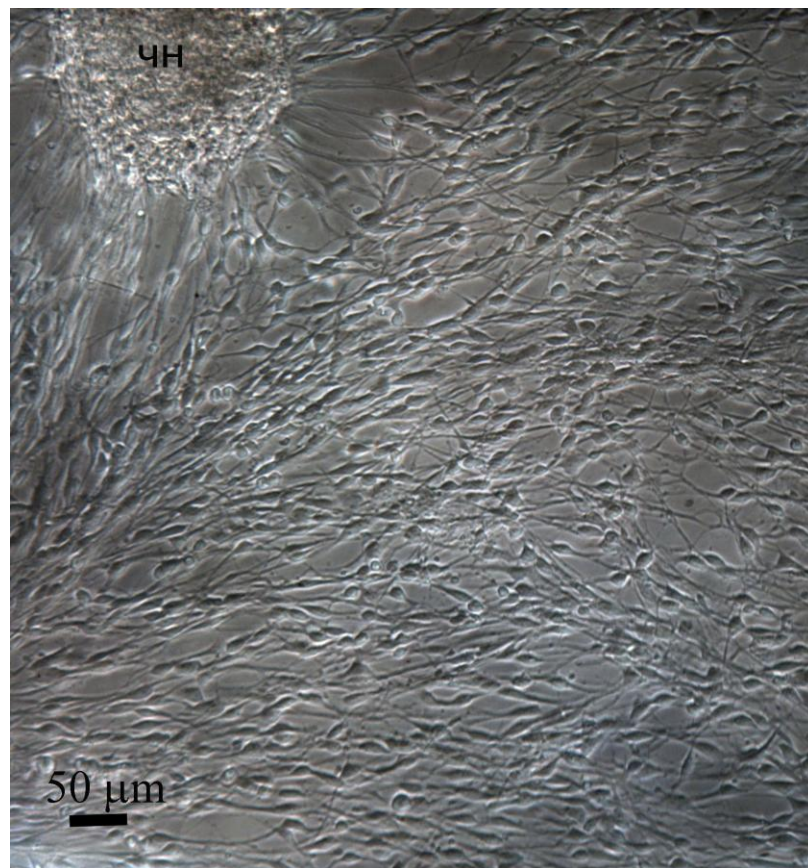


Рис 2.2. Первинна культура клітин СГ неонатальних поросят на 10-ту добу культивування. У культурі розрізняються прикріплені кластери тіл чутливих нейронів (ЧН), від яких відходять радіальні тяжі, та моношар, сформований веретеноподібними клітинами з відростками – мантийними гліоцитами. Прижиттєва світлова мікроскопія.

Морфологічно первинна культура клітин складалася з мантийних гліоцитів та тіл чутливих нейронів, зібраних у кластери. Серед мантийних

гліоцитів спостерігалися полігональні клітини з вираженими сплюсненими відростками або веретеноподібні клітини з двома тонкими відростками.

На 21-шу добу з усіх чашок Петрі збирали середовище і змішували, аліквотували по 1,5 мл у мікропробірки і зберігали в холодильнику при  $-18^{\circ}\text{C}$  до початку введення тваринам.

## **2.5. Отримання кріоконсервованої культури клітин зі СГ новонароджених поросят**

Частину культури клітин СГ після культивування протягом 6 діб відділяли від підкладки 0,25%-м розчином трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко», Росія), відмивали шляхом центрифугування. Осад клітин ресуспендували та в концентрації  $5 \times 10^5$  кл/мл переносили у кріопробірки у 0,5 мл середовища  $\alpha$ -МЕМ. Для кріоконсервування використовували кріозахисне середовище на основі кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО), який раніше виявився успішним для кріоконсервування клітин нервової системи [182, 183]. По краплях додавали 0,5 мл попередньо охолодженого кріозахисного середовища, яке містило 20% та 50% ФТС. Кінцева концентрація ДМСО та ФТС складала 10 та 25% відповідно. Клітини заморожували з використанням програмного заморожувача зі швидкістю охолодження 1 град/хв до  $-40^{\circ}\text{C}$  та подальшим зануренням у рідкий азот. Клітини зберігали при  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом місяця. Зразки відігрівали на водяній бані при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ , переносили з кріопробірок центрифужні пробірки, куди для видалення кріопротектору спочатку по краплях додавали потрібний об'єм середовища DMEM/F12. Потім доводили об'єм до 14 мл та центрифугували як описано вище. Процедуру центрифугування повторювали. Осад ресуспендували у БСК та культивували у стандартних умовах 20 діб. Морфологічно кріоконсервована культура містила тільки мантийні гліоцити (рис. 2.3).

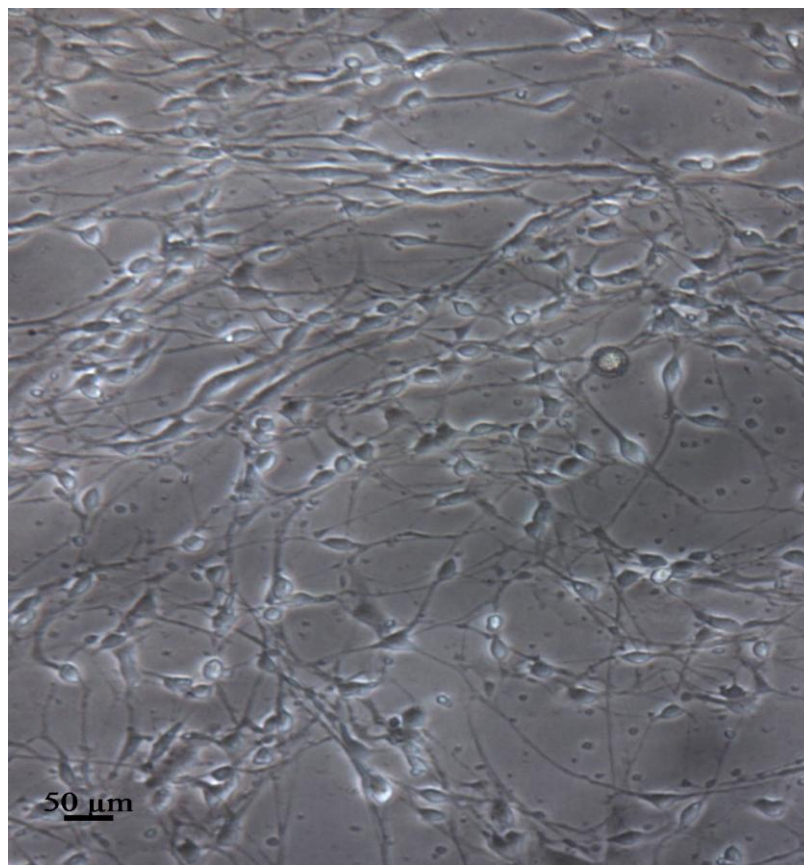


Рис 2.3. Кріоконсервована культура клітин СГ неонатальних поросят на 10-ту добу культивування після розморожування. У культурі спостерігається моношар, сформований мантийними гліоцитами. Прижиттєва світлова мікроскопія.

На 21-шу добу збирали кондиційоване (культуральне) середовище з усіх зразків, змішували, аліквотували по 1,5 мл у мікропробірки і зберігали в холодильнику при  $-18^{\circ}\text{C}$  до початку введення тваринам.

## **2.6. Вимірювання білку у кріоекстракті та кондиційованих середовищах**

Концентрацію білка в кріоекстракті та кондиційованих середовищах, отриманих з культур клітин СГ, визначали за методом Бредфорд [184]. Кінцеву концентрацію білка у використаних біологічно активних композиціях доводили фізіологічним розчином до 0,1 мг/мл.

## **2.7. Введення біологічно активних композицій**

Через 1,5 місяці після моделювання ІВО видаляли лігатуру і на наступний день внутрішньочеревно вводили БАК протягом 10 діб. Кріоекстракт СГ, БСК, кондиційовані середовища (КС), отримані від нативних і кріоконсервованих культур клітин СГ, вводили по 0,6 мл/кг маси тіла, «Кортексін» – по 1,0 мл/кг маси тіла [185].

Експериментальних тварин було розподілено на групи в залежності від введення: 1 –кріоекстракту СГ (n=6); 2 – БСК (n=8); 3 – КС від культури нативних МГ (n=7); 4 – КС від культури кріоконсервованих МГ (n=6); 5 – «Кортексину» (n=6). Група 6 – тварини з ІВО без лікування (n=15); група 7 – інтактний контроль (n=15).

На 56-ту добу від початку моделювання ІВО щурів декапітували під наркозом. Забирали сечовий міхур для приготування ізольованих смужок для визначення скоротливої активності та для приготування гістологічних та імуногістохімічних препаратів.

## **2.8. Дослідження скоротливої активності ізольованих смужок сечового міхура.**

Скоротливу активність детрузора щурів досліджували на ізольованих смужках (ІС) СМ за методом [186]. Для цього вилучали СМ і поміщали в розчин Кребса (рН=7,4) на препарувальний столик. СМ розрізали на 4-ри поздовжні смужки шириною 2–3 мм та довжиною 8 мм. Смужки до визначення скоротливої активності підтримували при 37°C у розчині Кребса в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> та 95% O<sub>2</sub>.

Для визначення скоротливої активності ІС використовували ізометричний режим. Для цього ІС розміщували в термостатованій камері об'ємом 7 мл у розчині Кребса при 37°C і піддавали навантаженню 1г (10 мН) протягом години. Після цього ІС монтували вертикально у проточній камері, заповненої розчином Кребса, таким чином, щоб один кінець був зв'язаний зі стаціонарним тримачем, а другий – з механо-електричним

трансдюсером Grass FT03C («Grass Instruments», США). Трансдюсер був з'єднаний з адаптером-мультиметром OWON B41T+ («Fujian Lilliput Optoelectronics Technology Co., Ltd.», Китай) з програмним забезпеченням, яке інсталиували на нетбук «ASUS» («AsusTek Computer Inc., Тайвань») [187]. Принципова схема устаткування з вивчення скоротливої активності ІС представлена на рисунку 2.4.

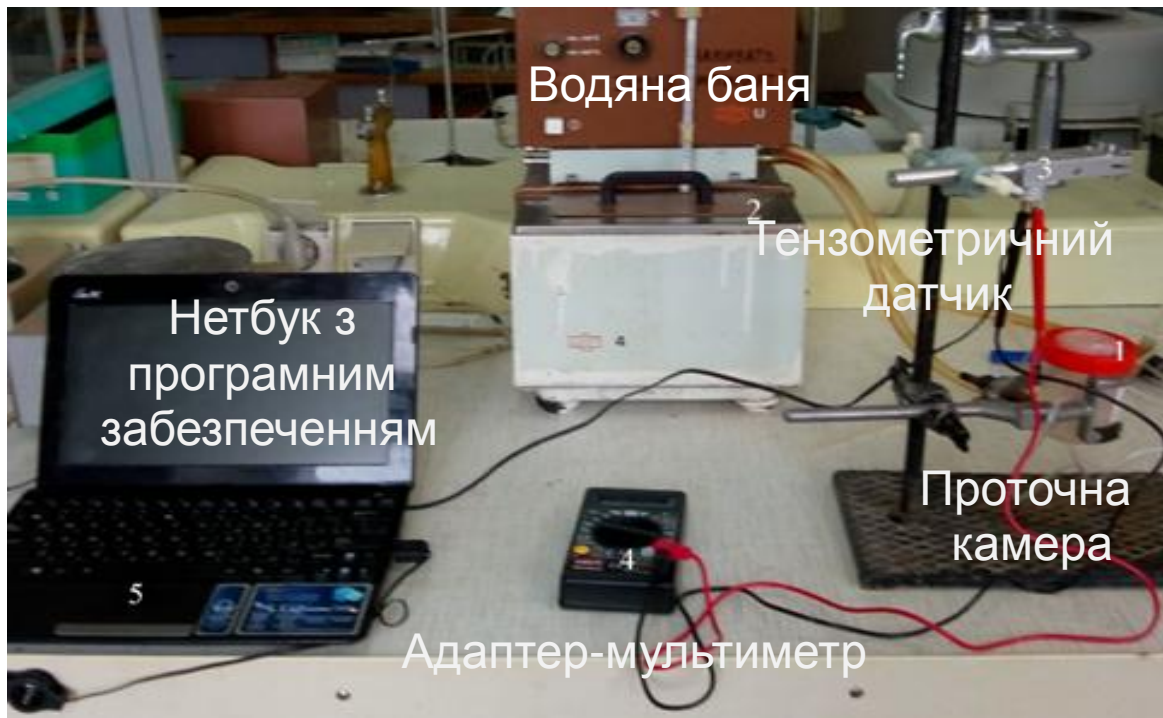


Рис. 2.4. Схема устаткування з вивчення скоротливої активності ІС.

У експерименті реєстрували силу м'язового скорочення ( $F$ , mN) і час досягнення максимальної відповіді ( $t$ , с) на стимуляцію. Вимірювали KCl-індуковану та агоніст-залежну скоротливу активність детрузора. З цією метою застосовували розчин KCl у кінцевій концентрації 80 мМ [186]. Агоністом був препарат «Пілокарпін» («Дослідний завод Державного наукового центру лікарських засобів», Україна) в кінцевій концентрації 0,03 мг/мл [188].

Відносну максимальну амплітуду скорочення ІС після стимуляції «Пілокарпіном» розраховували за формулою:

$$MAC = (F2 / F1) \times 100, \% \quad (2.1)$$



де  $F_2$  – сила м'язового скорочення після стимуляції «Пілокарпіном», мН;  $F_1$  – сила м'язового скорочення після стимуляції розчином KCl, мН.

Площу поперечного перерізу ІС ( $\text{мм}^2$ ) визначали за формулою:

$$CA = m / \rho / l, \quad (2.2)$$

де  $m$  – маса ІС, г;  $\rho$  – щільність гладеньком'язової тканини ( $\rho = 1,0 \text{ г/см}^3$ );  $l$  – довжина ІС, мм [189].

Активну напругу ІС СМ (tension) визначали за формулою [190]:

$$T = (F \times 0,0098) / CA, \quad (2.3)$$

де  $F$  – сила м'язового скорочення після стимуляції розчином KCl або «Пілокарпіном», мН; 0,0098 – коефіцієнт перерахунку;  $CA$  – площа поперечного перерізу ІС,  $\text{мм}^2$ .

Масу детрузора визначали зважуванням ізольованих смужок СМ.

Масовий коефіцієнт вираховували за формулою:

$$MK = m_{\text{см}} / m_{\text{т}} \times 100, \% \quad (2.4)$$

де  $m_{\text{см}}$  – маса сечового міхура, г;  $m_{\text{т}}$  – маса тіла тварини, г.

## 2.9. Гістологічні дослідження тканини сечового міхура

Для гістологічної оцінки фрагменти СМ піддавали гістологічній проводці, фарбували гематоксиліном і еозином за стандартною методикою [191]. Мікрофотос'ємку здійснювали за допомогою світлового мікроскопа AmScore, модель XYL-403 (Китай) з цифровою камерою. Морфометричний аналіз мікрофотографій серійних зрізів СМ здійснювали за допомогою програми для обробки зображень AxioVision Rel 4.7 (Carl Zeiss, Німеччина). На поперечних зрізах вимірювали:

- середню висоту перехідного епітелію,
- товщину м'язового шару,
- загальну товщину стінки СМ,
- індекс співвідношення м'язовий шар/стінка СМ.

Виконували 10 вимірювань на 1 зрізі, для кожного зразка підраховували 5-6 зрізів.

## **2.10. Імуногістохімічні дослідження тканини сечового міхура**

В якості маркера м'язових структур сечового міхура використовували тест-набір Rady-to-Use з моноклональними антитілами (МКАТ) проти актину гладеньких м'язів Smooth Muscle Actin 1A4 («DAKO», Данія). В якості маркера клітин периферичної глії використовували МКАТ проти білку S-100A («Thermo scientific», Німеччина) у розведенні 1:100. Для візуалізації імуногістохімічного забарвлення з першими антитілами застосовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo scientific»). Як хромоген використовувався DAB (діамінобензидін). Зафарбовані зрізи досліджували на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss) з використанням програми AxioCam (ERc 5s).

Якісну оцінку імуногістохімічного забарвлення визначали за наявністю або відсутністю коричневого фарбування клітинних структур [192].

Для кількісної оцінки за допомогою програми для обробки зображень AxioVision Rel 4.7 розраховували відносну площу позитивного мічення як відношення сумарної площі забарвлених структур (в  $\mu\text{m}^2$ ) до стандартної площі зрізу (в  $\mu\text{m}^2$ ), помноженому на 100 % за методом [193].

## **2.11. Біохімічні дослідження крові експериментальних тварин**

Зразки крові (5,0 мл) були взяті за допомогою пункції серця в вакуумні пробірки з активатором згортання (Vacusera®, Туреччина). Зразки центрифугували на центрифугі (ОПН-3.04, Киргизія) при 1300g протягом 10 хв. і отриману плазму переносили в свіжі пробірки для біохімічного аналізу крові.

Стан білкового обміну оцінювали за концентрацією загального білка в плазмі крові. Рівні загального білка визначали біуретовим методом із застосуванням набору реактивів "Філісіт-Діагностика" (Україна) [194]. Концентрацію креатиніну і сечовини - показників екскреторної функції нирок визначали з використанням набору реактивів (Cormaу, Польща) відповідно до інструкції фірми-виробника.

## 2.12. Загальний дизайн дослідження

Загальну схему експерименту наведено на рисунку 2.5.

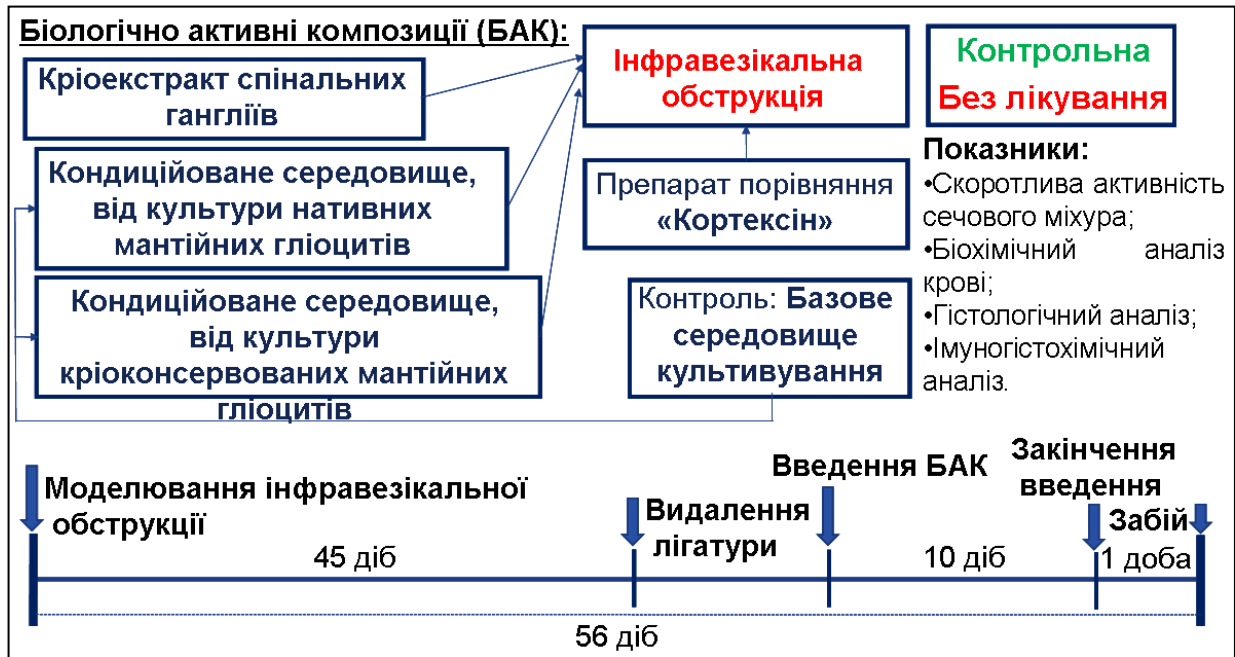


Рис. 2.5. Загальна схема експерименту.

## 2.13. Статистична обробка результатів

Матеріали дослідження були піддані статистичній обробці з використанням методів параметричного і непараметричного аналізу. Накопичення, коригування, систематизація вихідної інформації і візуалізація отриманих результатів здійснювалися в електронних таблицях Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, США). Статистичний аналіз проводився з використанням програми STATISTICA 10 (StatSoft.Inc, США).

Сукупності кількісних показників, розподіл яких відрізнявся від нормального, описувалися за допомогою значень медіани (Me) і нижнього та верхнього кватилей (Q1; Q3).

При порівнянні декількох вибірок кількісних даних, що мали розподіл, який відрізнявся від нормального, використовувався критерій Крассела-Уолліса, який є непараметричною альтернативою однофакторного



дисперсійного аналізу. Критерій Краскела-Уолліса обчислювався після ранжирування всіх елементів аналізованих сукупностей за такою формулою:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1) \quad (2.5)$$

де  $H$  – критерій Краскела-Уолліса,  $n$  – загальне число досліджуваних,  $R_i$  – сума рангів досліджуваних, які стосуються певної вибірки,  $k$  – число порівнюваних вибірок.

Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

У тому випадку, якщо розраховане значення критерію Краскела-Уолліса перевищувало критичне, відмінності показників вважалися статистично значущими. В іншому випадку визнавалася вірною нульова гіпотеза.

У разі виявлення статистично значущих відмінностей між групами, додатково проводилося парне порівняння сукупностей за допомогою апостеріорного критерію Данна.

### РОЗДІЛ 3

## МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНФРАВЕЗІКАЛЬНОЇ ОБСТРУКЦІЇ У ЩУРІВ ТА ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ СЕЧОВОГО МІХУРА

З метою вивчення впливу моделі інфравезікальної обструкції на СМ нами був проведений комплексний аналіз інтегральних та морфологічних показників, а також скоротливих характеристик ізольованого органа інтактних щурів. Отримані результати проведених досліджень допомогли встановити нормативи інтактних тварин, як контрольного маркера вихідних даних.

Встановлено збільшення відносної маси СМ у щурів групи з ІВО на 50% відповідно (рис. 3.1.,  $p = 0,0007$ ) порівняно з контролем.

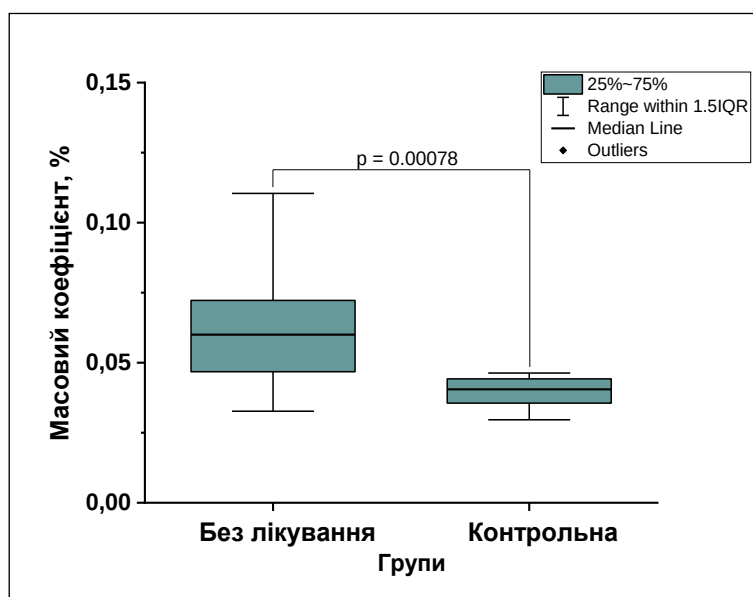


Рис. 3.1. Зміна відносної маси СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

У ході гістологічного дослідження СМ інтактних щурів візуалізовано чітку диференціацію його стінки на слизову оболонку, підслизову основу,

м'язову та зовнішню (серозну або адвентиційну) оболонки, які щільно пов'язані між собою (рис. 3.2).

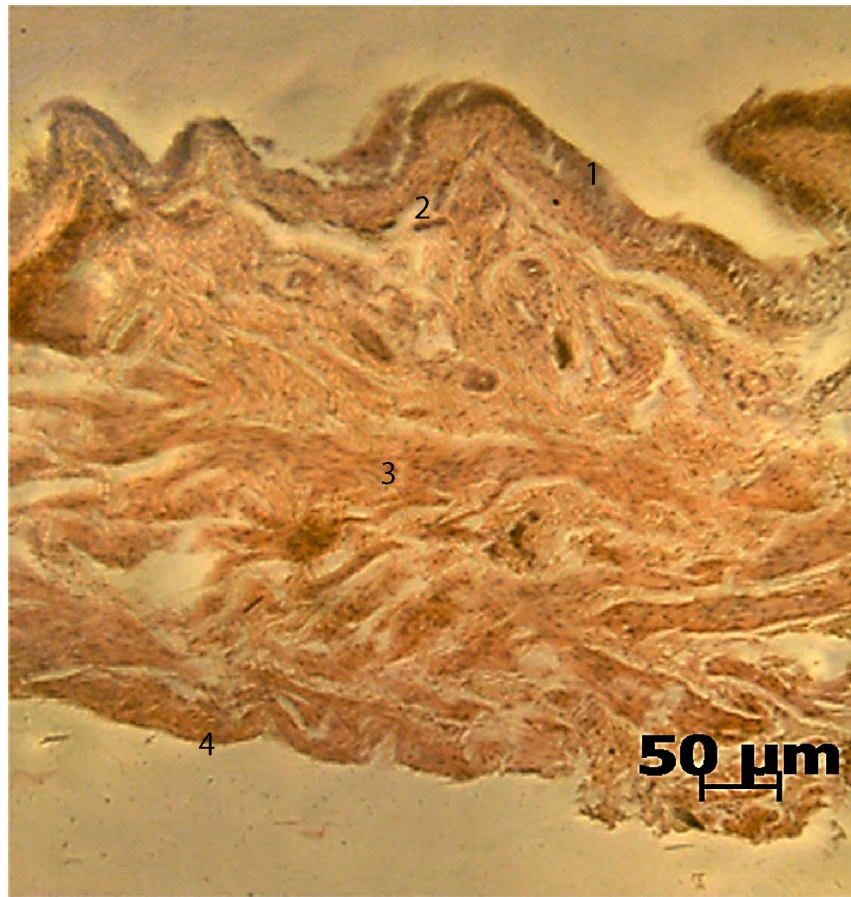


Рис. 3.2. Мікрофотографія стінки СМ щура інтактної групи. Позначення: 1 – слизова оболонка; 2 – підслизова основа; 3 – м'язова оболонка; 4 – зовнішня оболонка. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Слизова оболонка була покрита перехідним епітелієм, який розташовувався на власній пластинці з численними складками, які формують псевдоепітеліальні вирости. Перехідний епітелій побудований з декількох рядів клітин. Форма епітелію та кількість шарів залежить від ступеню розтягування стінки СМ та змінюється від 5-6-шарового (у порожньому стані) до 2-шарового (у наповненому стані).

Власна пластинка утворена рихлою неоформленою сполучною тканиною. Під власною пластинкою розташовується підслизова основа, яка

утворена більш рихлою неоформленою сполучною тканиною з чисельними кровоносними та лімфатичними судинами. Місцями вона пронизана окремими пучками гладких м'язових волокон. Саме завдяки властивостям будови цього пласту відмічається виражена складчастість, що утворена слизовою оболонкою та підслизовою основою. На світлооптичному рівні відмічається значна мінливість її товщини на різних ділянках міхура. Далі візуалізувалася м'язова оболонка, яка є найтовстішою серед усіх оболонок. Вона побудована з м'язових клітин. Гладкі міоцити з'єднуються між собою, формуючи м'язові пласти і утворюючи волокна. У м'язовій оболонці виділяються три шари, які переплітаються між собою. Зовні і до середини чітко розрізняють поздовжні м'язові волокна, які мають косу спрямованість. Між ними пролягає шар циркулярних м'язових волокон з коловим розташуванням. Поміж цих шарів деінде візуалізується тонкий прошарок сполучної тканини між ними з кровоносними судинами. Зовнішня оболонка виконує опорну функцію та слугує каркасом СМ. Його периферія вкрита переважно адвентиційною оболонкою, яка побудована із тонкого шару добре васкуляризованої волокнистої сполучної тканини, що містить багато клітин фібробластичного ряду та аморфний компонент міжклітинної речовини. Зустрічаються відділи, де адвентиція відсутня, а стінка СМ плавно переходить у тонку сполучно-тканинну серозну оболонку (продовженням вісцерального листка очеревини). Кровопостачання СМ здійснюється за рахунок різних судинних елементів: численних дрібних артеріальних судин м'язового типу (правильної округлої форми з товстою стінкою та чіткою виразністю всіх оболонок), тонкостінних капілярів (оболонка розвинена слабо, їх діаметр не великих розмірів), венул (зі значно більшим неправильної форми просвітом, слабо вираженими оболонками). Судинні сплетення пронизують всю стінку органа, а їх найбільша кількість ідентифікується саме у підслизовій основі.

На відміну від інтактних тварин при мікроскопічній оцінці СМ у щурів з моделлю ІВО відмічалася морфологічна трансформація у всіх його структурних компонентах (рис. 3.3).

Перехідний епітелій був місцями різко гіпоплазованим і атрофованим, зустрічалися ділянки його повної відсутності. Значні дефекти слизової оболонки були представлені ознаками набряку, деструкції, десквамації та ерозування епітелію з різноманітною глибиною ураження її шарів, які варіювали від поверхневого пошкодження апікальної частини поодиноких поверхневих клітин до ділянок повної десквамації епітелію.

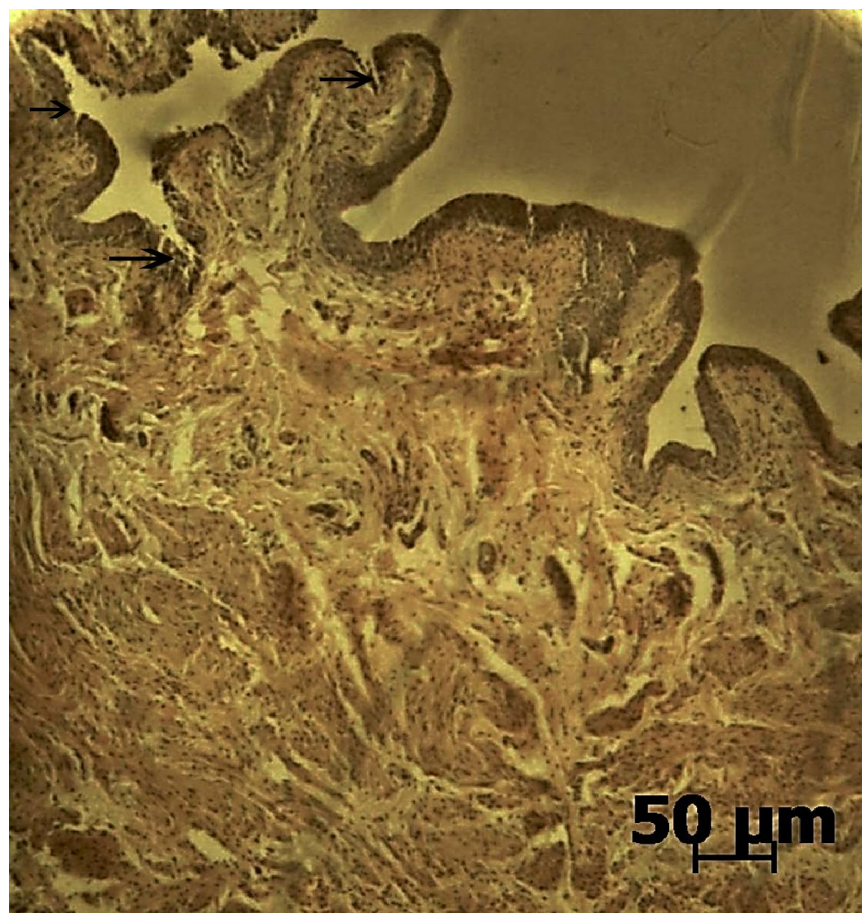


Рис. 3.3. Стінка СМ щура групи з моделлю інфравезикальної обструкції. Стрілками вказані ділянки деструкції, десквамації та ерозування перехідного епітелію. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Дифузна десквамація епітелію слугує свідченням зростання процесів загибелі клітин в умовах експерименту та порушенням процесів фізіологічної регенерації. Власна пластинка була стоншена, повністю заміщена сполучною тканиною, з наявністю гіпертрофованих м'язів у вигляді окремих вогнищ.

Встановлено значне потовщення підслизової основи, її набряк та осередки дифузної змішано-клітинної запальної інфільтрації, що значно погіршувало виразність складок перехідного епітелію. М'язові шари втрачали структурну орієнтацію, були представлені різко гіпертрофованими пучками м'язових волокон, між якими прошарок сполучної тканини був зменшений. Відмічався помірний набряк у м'язах і у між м'язовій сполучній тканині, що призводило до роз'єднання, гіпертрофії, дезорієнтації та фрагментації гладких м'язових волокон. Зустрічалися ділянки з ознаками запалення у вигляді вогнищевої інфільтрації. Серозна оболонка виглядала різко потовщеною. Зміни представлені у вигляді набряку сполучнотканинних елементів, гіпертрофії фібробластів та вогнищ запальної інфільтрації. Світлооптичні дослідження судин СМ за умов експериментальної інфравезикальної обструкції показали порушення гемоциркуляції в усіх оболонках органу. Артеріоли, артерії, вени та венули були виразно змінені з проявами повнокров'я та стазу. Стінка артеріол потовщена за рахунок набряку і спазму. Водночас, стінка вен та венул нерівномірно стоншена та розширена.

Вимірювання середньої висоти перехідного епітелію СМ виявило його зниження в групі з моделлю ІВО на 20,5% ( $p = 0,013$ ) в порівнянні з контролем (рис. 3.4).

Морфометричний аналіз також встановив збільшення загальної товщини стінки СМ у групі щурів з моделлю ІВО на 32,74% ( $p = 1,06E-15$ ), відповідно, в порівнянні з контролем (рис. 3.5).



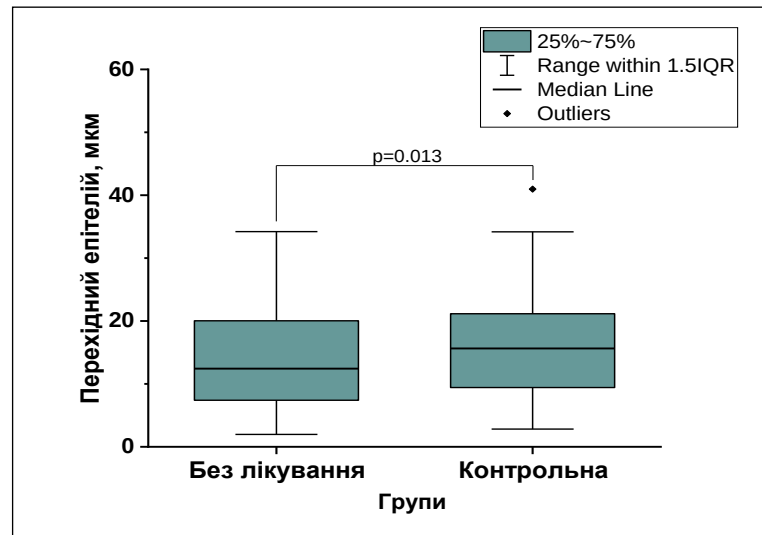


Рис. 3.4. Зміна середньої висоти перехідного епітелію СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

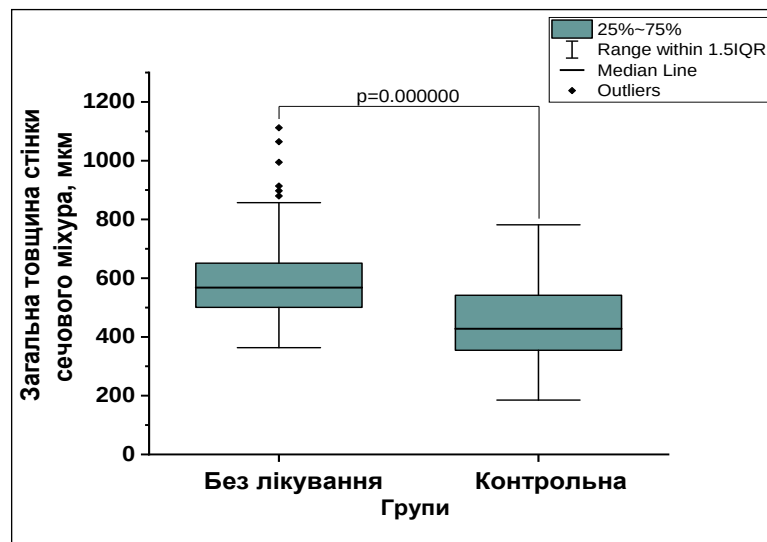


Рис. 3.5. Зміна загальної товщини стінки СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

Основними показниками патологічних морфологічних змін сечового міхура при обструкції вважаються збільшення товщини м'язового шару і індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ. Нами було встановлено збільшення товщини м'язового шару СМ у тварин з патологією на 37,3% ( $p = 9,93E-20$ ), відповідно, в порівнянні з інтактною групою (рис. 3.6). При

дослідженні індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ виявлено його збільшення на 6,5% в групі з моделюванням патології ( $p = 0,009$ ) в порівнянні з інтактною групою (рис. 3.7).

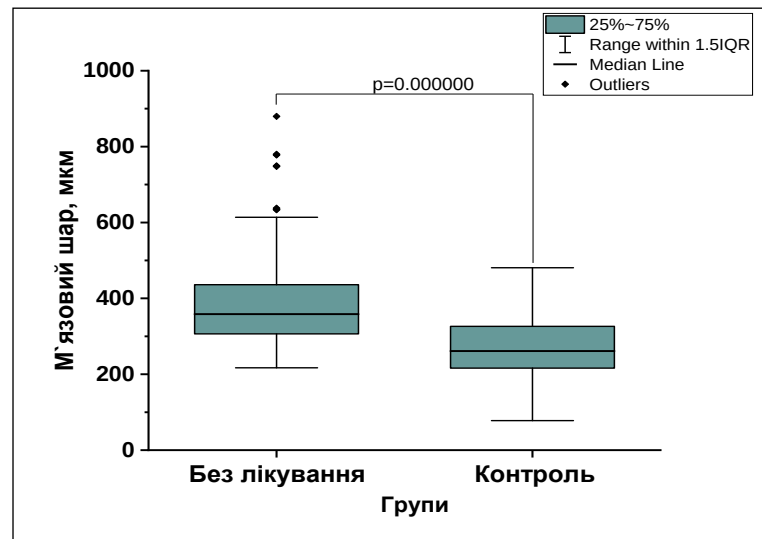


Рис. 3.6. Зміна товщини м'язового шару СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

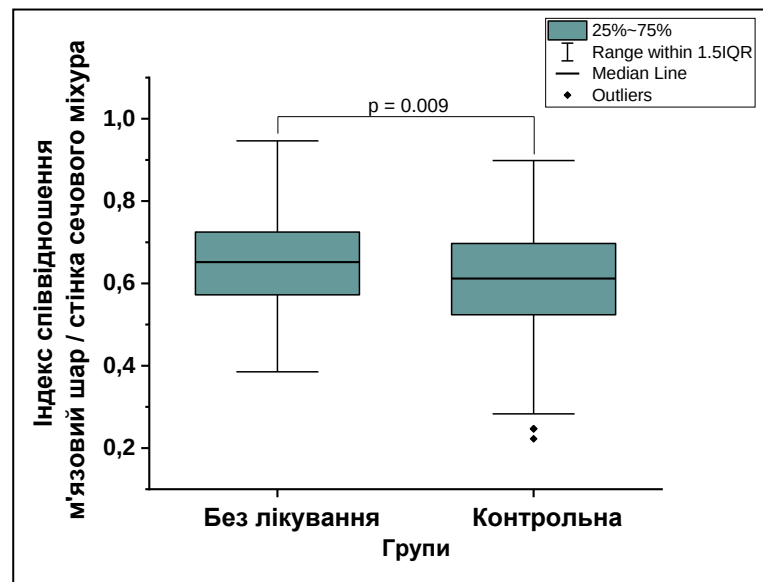


Рис. 3.7. Зміна індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).



На наступному етапі нашої роботи було охарактеризовано функціональні зміни СМ при моделюванні ІВО. Для цього було вивчено параметри скорочувальної активності ІС.

Типові криві КСІ-індукованого і пілокарпін-залежного скорочення ІС інтактного СМ представлені на рис. 3.8. Вони характеризуються присутністю двофазної кривої, яка відображає чередування тонічних і фазових скорочень ІС. При аплікації «Пілокарпіну» спостерігається збільшення сили м'язового скорочення (рис. 3.8 – стрілка). Протягом наступних 2-х хвилин відбувається спонтанне зниження амплітуди скорочення ІС СМ, що свідчить про розслаблення СМ.

У щурів з обструкцією не спостерігалось двофазної кривої, яка характерна для звичайного м'язового скорочення: чередування тонічних і фазових скорочень. Також відмічено зниження амплітуди і частоти скорочень (рис. 3.9).

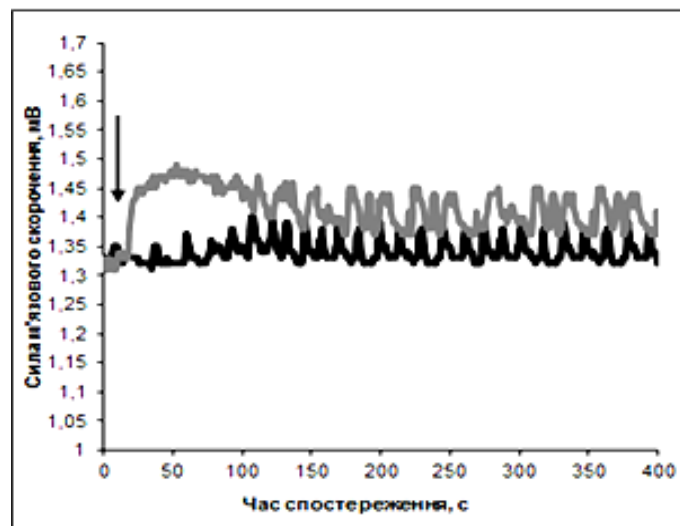


Рис. 3.8. Типові криві КСІ-індукованого (чорний колір) і пілокарпін-залежного (сірий колір) скорочення ІС інтактного СМ. Стрілка – аплікація «Пілокарпіну».

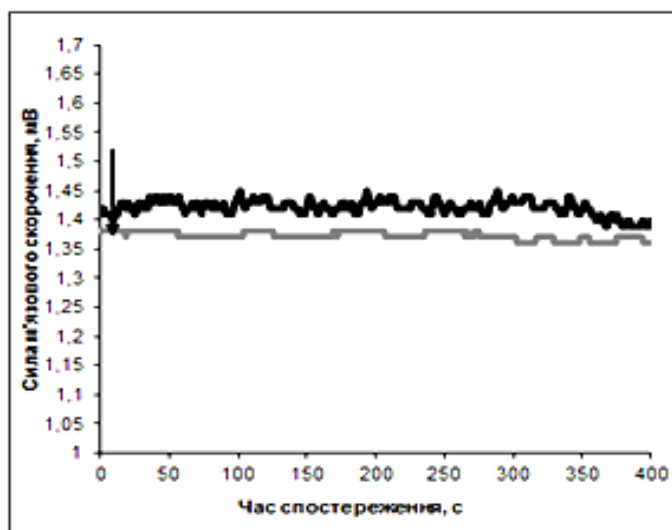


Рис. 3.9. Типові криві KCl-індукованого (чорний колір) і пілокарпін-залежного (сірий колір) скорочення ІС СМ щурів після моделювання інфравезикальної обструкції. Стрілка – аплікація «Пілокарпіну».

Кількісні показники сили м'язового скорочення, стимульованого розчином KCl, у щурів групи з ІВО збільшувалися у 1,7 раза (рис. 3.10,  $p = 0,098$ ) в порівнянні з інтактною групою. Але статистично значущої різниці між двома групами не було знайдено.

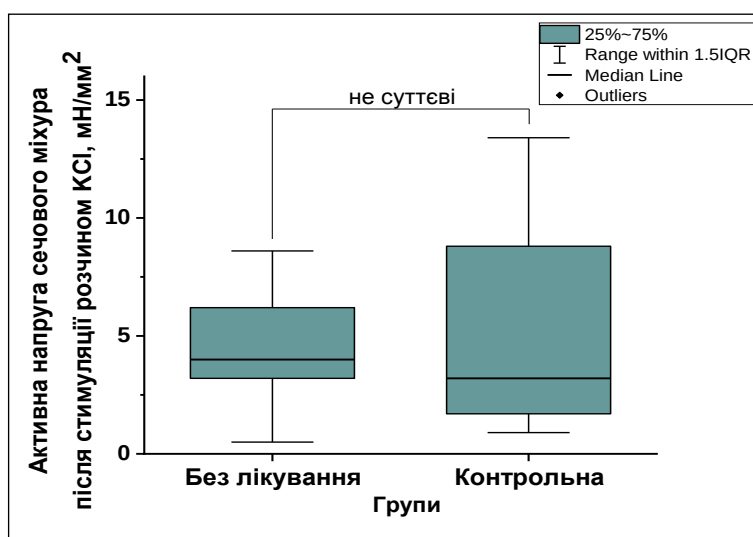


Рис. 3.10. Активна напруга ІС сечового міхура після стимуляції розчином KCl при моделюванні інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично незначущі у порівнянні з контрольними даними ( $p > 0,05$ ).

У наших експериментах було встановлено, що сила пілокарпін-індукованого м'язового скорочення ІС СМ зменшувалася у тварин з моделюванням інфравезікальної обструкції у 1,4 рази або на 30% відповідно, в порівнянні з інтактною групою (рис. 3.11,  $p = 0,027$ ).

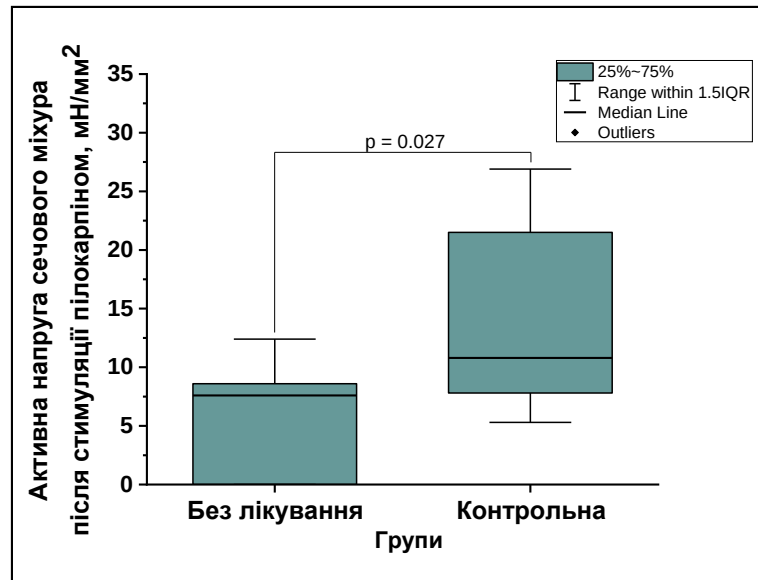


Рис. 3.11. Активна напруга ізольованих смужок сечового міхура після стимуляції пілокарпіном при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

Виявлено незначне збільшення у 1,02 рази або на 2,1% відповідно показників спонтанної скорочувальної активності ІС щурів з ІВО (рис. 3.12,  $p=0,025$ ).

Цікаво, що при цьому показники максимальної амплітуди скорочення зменшувалися у 2,5 рази або на 59,8% в порівнянні з інтактною групою (рис. 3.13,  $p=0,002$ ).

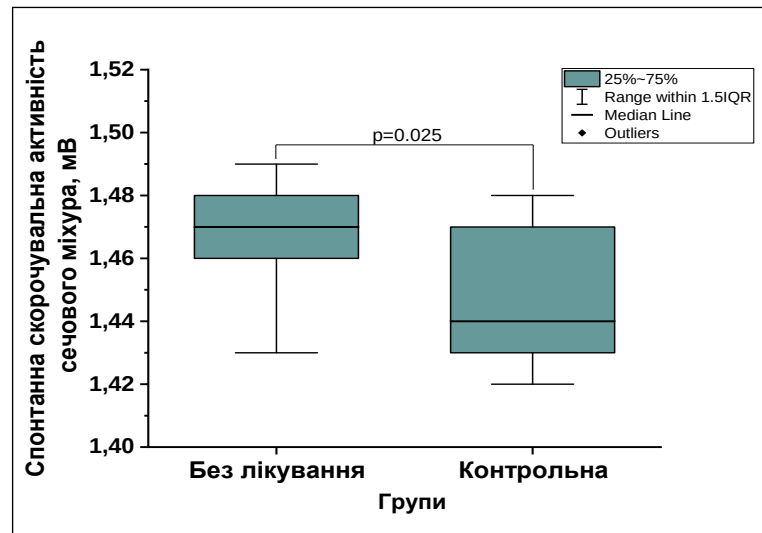


Рис. 3.12. Зміна спонтанної скорочувальної активності ІС СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

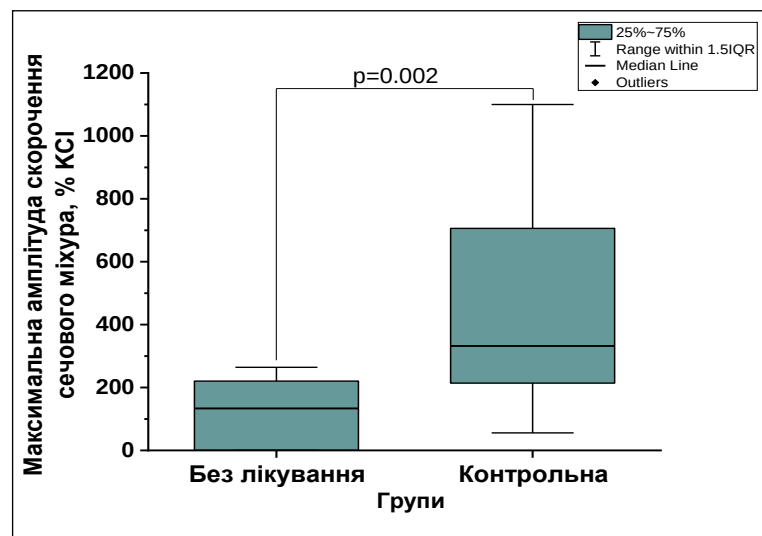


Рис. 3.13. Зміна максимальної амплітуди скорочення ІС СМ при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

Результати імуногістохімічного дослідження СМ продемонстрували значне зменшення позитивного мічення нервових структур антитілами до білка S100, як за відносною площею, так і за інтенсивністю фарбування у

групі тварин з моделлю ІВО у порівнянні з інтактними щурами (рис.3.14, 3.15).

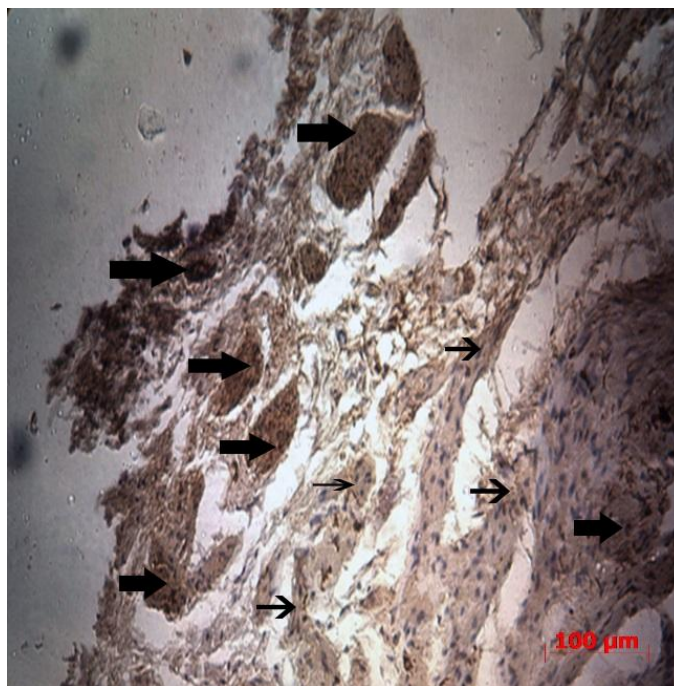


Рис. 3.14. Стінка СМ щурів інтактної групи. Імуногістохімічне дослідження експресії S 100. Стрілками відмічено позитивне мічення: товста стрілка – інтенсивне забарвлення (+++); тонка стрілка – менше забарвлення (++).

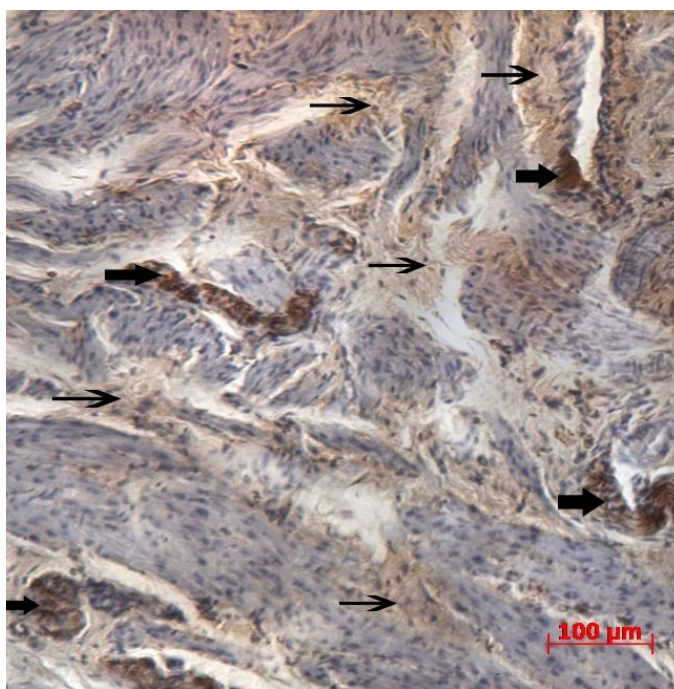


Рис. 3.15. Стінка СМ щурів з моделлю ІВО. Імуногістохімічне дослідження експресії S 100. Стрілками відмічено позитивне мічення: товста стрілка – інтенсивне забарвлення (+++); тонка стрілка – менше забарвлення (++).

Результати вимірювання відносної площі експресії актину у тканинах СМ продемонстрували також значне зменшення площі та інтенсивності забарвлення м'язових структур у щурів з ІВО у порівнянні з інтактними щурами (рис.3.16, 3.17).

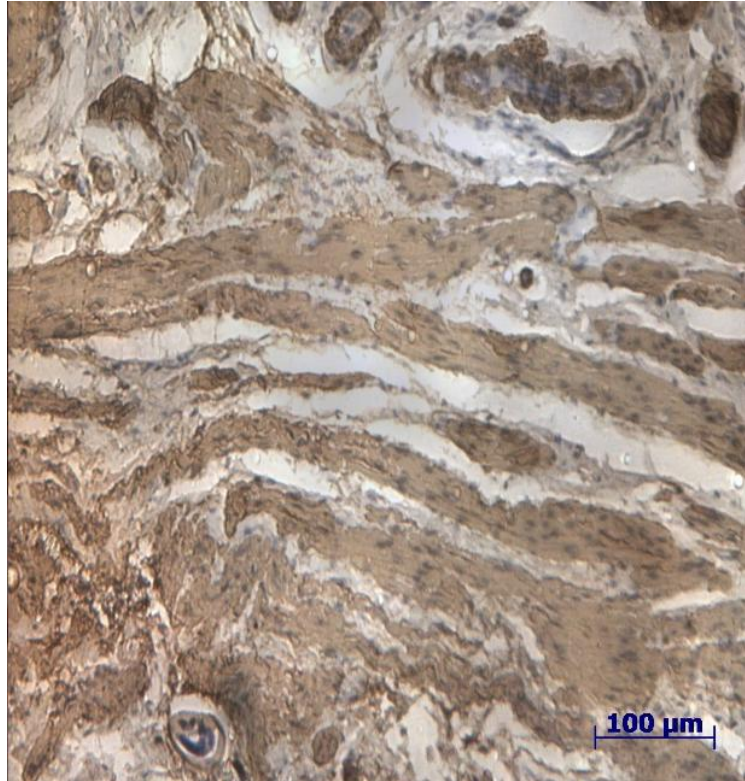


Рис. 3.16. Стінка СМ щурів інтактної групи. Імуногістохімічне дослідження експресії актину. Спостерігаються обширні ділянки позитивного мічення (коричневий колір).

Шляхом кількісного аналізу було встановлено зменшення відносної площі експресії білку S 100 та актину, яка була значно меншою за обома показниками у тварин з патологією на 89,45% та на 89,41% (рис. 3.18,  $p=0,005$ ;  $p=0,003$  відповідно), порівняно з інтактною групою.



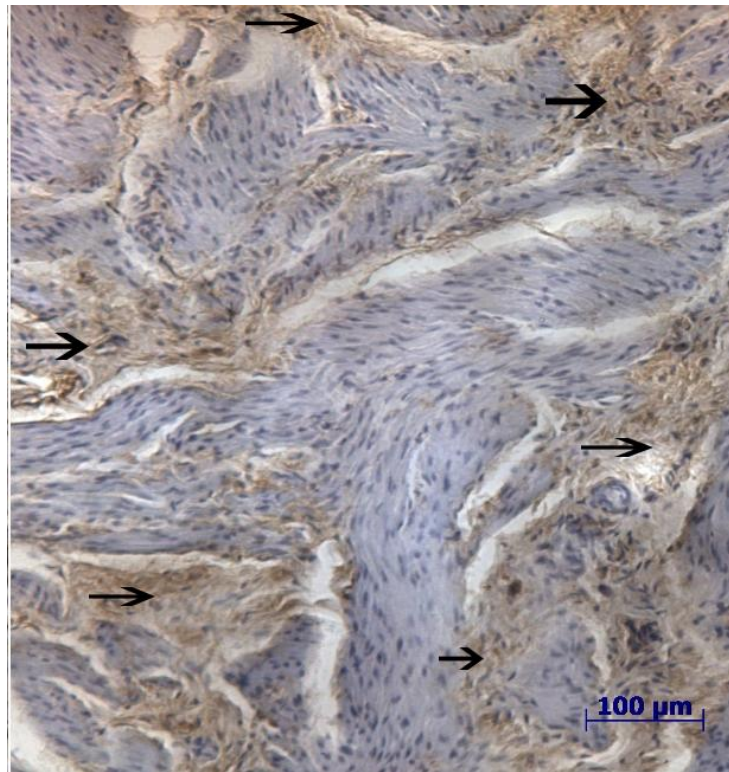
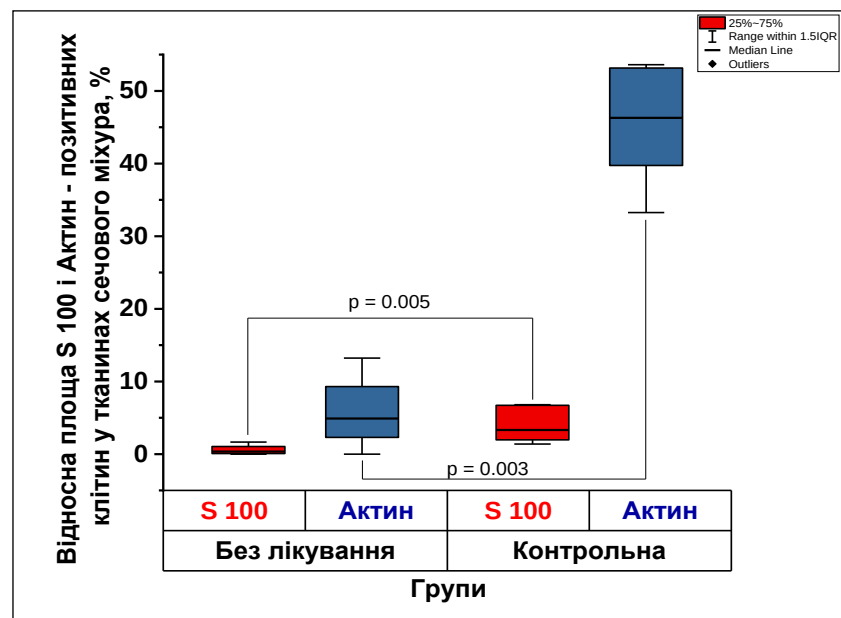


Рис. 3.17. Стінка СМ щурів з моделлю ІВО. Імуногістохімічне дослідження експресії актину. Стрілками відмічено позитивне мічення.



3.18. Відносна площа (%) експресії S100 та актину в сечовому міхурі після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

### **Висновки до розділу 3**

Таким чином у результаті моделювання інфравезікальної обструкції у щурів автором було отримано:

- збільшення відносної маси СМ;
- зменшення середньої висоти перехідного епітелію;
- збільшення загальної товщини стінки СМ;
- потовщення м'язового шару;
- підвищення індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ;
- зменшення відносної площі S100- та актин–позитивних клітин;
- збільшення спонтанної скорочувальної активності;
- зниження показників пілокарпін–стимульованої активної напруги;
- зменшення максимальної амплітуди скорочення.

Всі ці зміни підтверджували адекватність отриманої моделі ІВО, яка характеризувалася значними патологічними структурно-функціональними змінами СМ.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [26–38].



## РОЗДІЛ 4

### ВИВЧЕННЯ ХАРАКТЕРИСТИК СЕЧОВОГО МІХУРА ТВАРИН ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕНОЇ ОБСТРУКЦІЇ ЗА УМОВ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ

На теперішній у медичній практиці існує потреба у розробці нових препаратів, які містять таргетні субстанції, що здійснюють конкретний вплив в організмі на молекулярному рівні. Прикладом цього є моноклональні антитіла, які використовуються для направленої імуносупресії, ростові фактори тощо. У зв'язку з цим, перспективним є застосування НФ або НФ-подібних речовин для покращення іннервації СМ при ІВО.

З цією метою нами було отримано БАК двох типів. Кріоекстракт СГ являє собою композицію, яка містить біологічно активні сполуки від усіх клітин ганглію (нейронів, шваннівських клітин, мантийних гліоцитів, фібробластів). КС від культури клітин СГ є в основному секретом мантийних гліоцитів, оскільки у використаних умовах культивування вони є основним типом клітин у культурі. В якості препарату порівняння використовували нейротропний препарат «Кортексін», який є комплексом низькомолекулярних пептидів, вилучених з тканини головного мозку великої рогатої худоби та свиней.

#### **4.1. Порівняння динаміки патологічних змін сечового міхура після ІВО за умов впливу кріоекстракту спінальних гангліїв та препарату «Кортексін»**

Було перевірено дію кріоекстракту СГ і препарату порівняння «Кортексину» на морфофункціональні характеристики СМ тварин, після перенесеної ІВО. Встановлено нормалізацію різниці у показниках відносної маси СМ у щурів групи 1 (введення кріоекстракту) до 12,5% та її збільшення у групі 5 (введення Кортексину) на 42,5% відповідно (рис. 4.1,  $p > 0,05$ ,  $p = 0,025$ ) порівняно з контролем. При цьому даний показник у групі 1

статистично значуще не відрізнявся від тварин групи 7 (інтактний контроль) та був значно меншим у порівнянні з показниками груп 5 (введення Кортексіну) і 6 (тварини без лікування) на 38,6% та 41,7% (рис. 4.1,  $p = 0,021$ ,  $p = 0,014$  відповідно). При цьому важливо відмітити, що маса щурів групи 5 була найбільшою серед досліджуваних груп. Масові коефіцієнти були пропорційні масі ІС СМ у всіх експериментальних тварин.

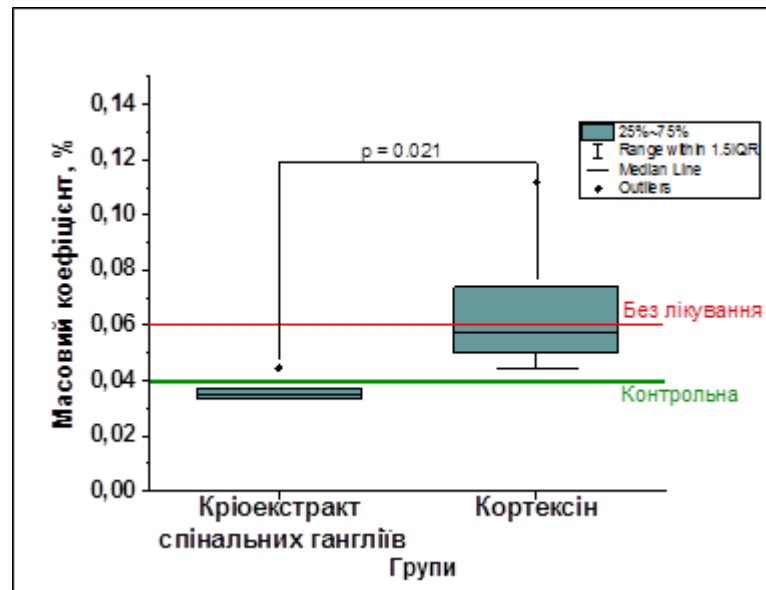


Рис. 4.1. Зміна відносної маси СМ у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 1 та 5; відмінності статистично значущі у порівнянні з групою 6 ( $p < 0,05$ ).

Аналіз мікрофотографій сечового міхура щурів з обструкцією після введення БАК виявив, що у групі 1 (кріоекстракт СГ) слизова оболонка була частково представлена нормальним, подекуди гіпоплазованим перехідним епітелієм. Власна пластина була майже заміщена сполучною тканиною, її м'язові елементи були частково атрофовані. М'язовий шар був помірно гіпертрофованим, складався з регулярно розміщених гладком'язових пучків з незначним вмістом

сполучної тканини. Серозна оболонка була незначно потовщена (рис. 4.2).

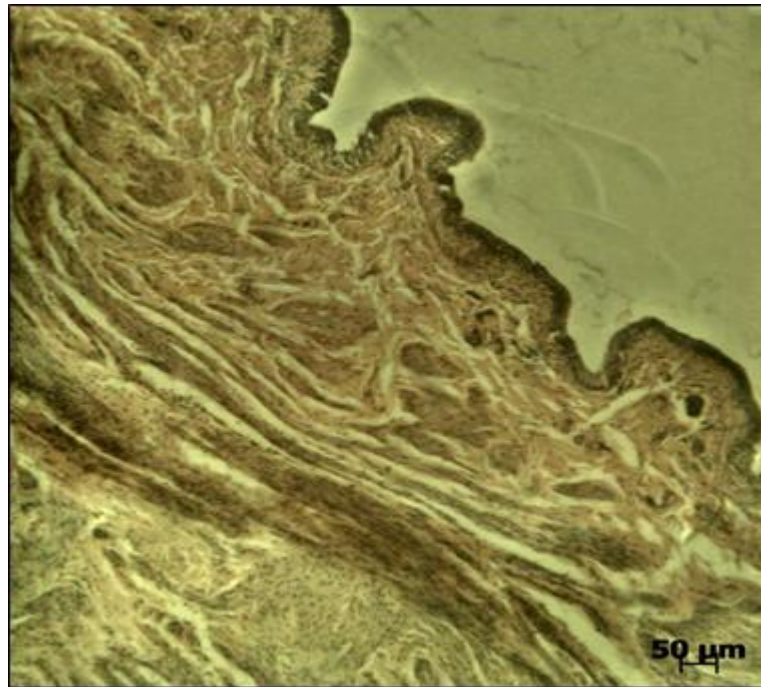


Рис. 4.2. Мікрофотографія стінки СМ щура з моделлю інфравезикальної обструкції після застосування кріоекстракту СГ. Забарвлення гематоксилін-еозином.

На відміну від цього у щурів з обструкцією, які отримували «Кортексін», перехідний епітелій був помірно гіпоплазований, спостерігалось помірне розростання сполучної тканини власної пластинки. М'язи останньої і шари детрузора зберігали нормальну будову, але місцями м'язи були гіпертрофованими та гіперваскуляризованими; простір між м'язовими волокнами збільшувався за рахунок розростання сполучної тканини. Серозна оболонка була помірно потовщеною. (рис. 4.3).

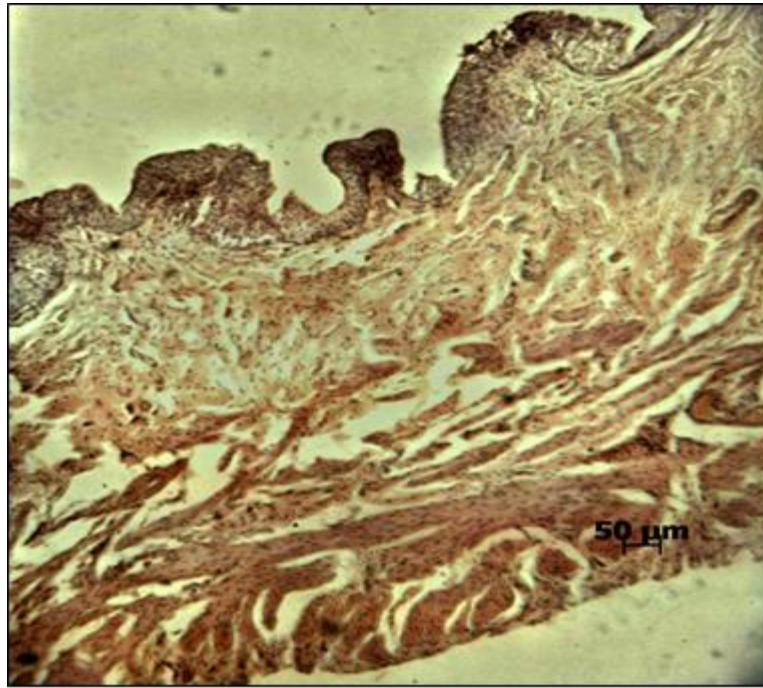


Рис. 4.3. Стінка СМ щура з моделлю інфравезікальної обструкції після застосування «Кортексіну». Збільшення простору між м'язовими волокнами за рахунок розростання сполучної тканини. Забарвлення гематоксилін-еозином.

За кількісною оцінкою, різниці у показниках середньої висоти перехідного епітелію (рис. 4.4,  $p > 0,05$ ) та загальної товщини стінки СМ (рис. 4.5,  $p > 0,05$ ) у щурів досліджуваних груп 1 і 5 не було; статистично значущих відмінностей також не спостерігалось при порівнянні з показниками щурів з обструкцією, які не отримували лікування (група 6).

Однак порівняно з контролем, було встановлено зменшення середньої висоти перехідного епітелію СМ в групі 1 на 24,3% та нормалізацію в групі 5 на 17,8% (рис. 4.4,  $p = 0,024$ ;  $p > 0,05$  відповідно). Збільшеними залишалися показники загальної товщини стінки СМ у груп 1, 5 на 18,5% та 21,7% (рис. 4.5,  $p = 0,0012$ ;  $p = 0,014$  відповідно) порівняно з інтактним контролем.

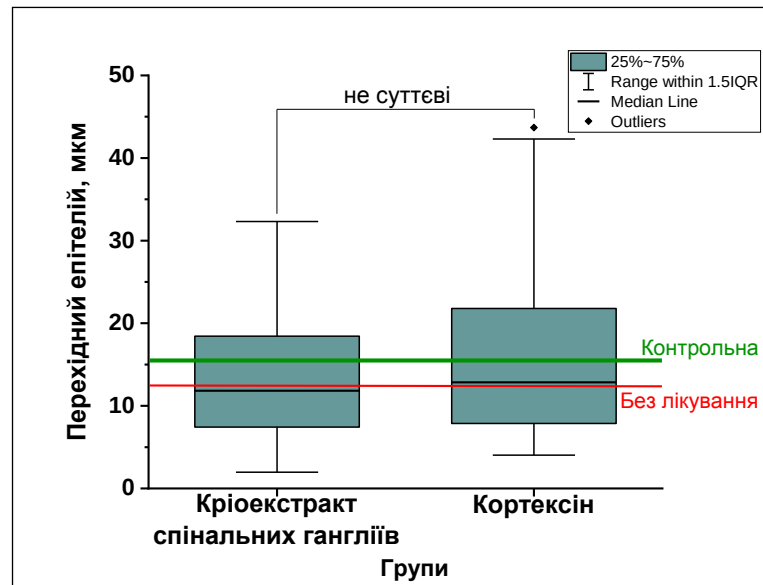


Рис. 4.4. Зміна середньої висоти перехідного епітелію СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 1 та 5.

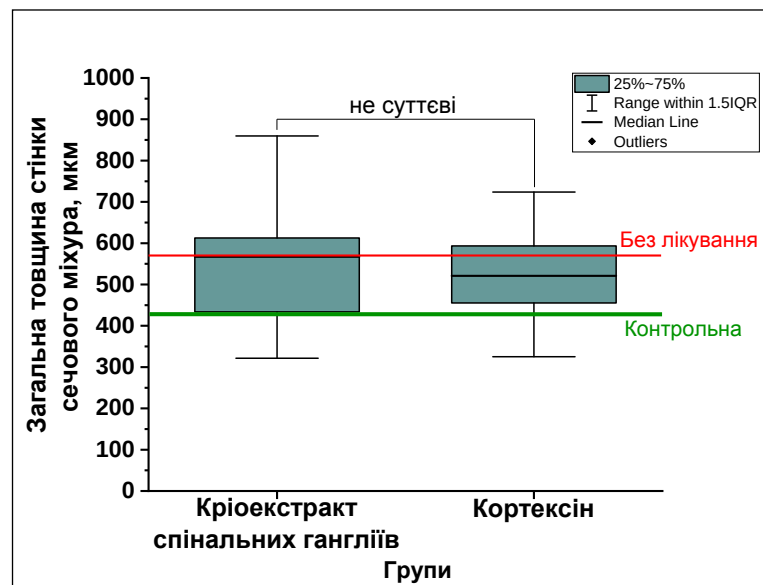


Рис. 4.5. Зміна загальної товщини стінки СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 1 та 5 ( $p > 0,05$ ); статистично значущі у порівнянні між групами 1, 5 та інтактним контролем ( $p < 0,05$ ).

Було встановлено зменшення товщини м'язового шару СМ у групах 1 та 5 досліджуваних тварин на 13,7, і 26,2% (рис. 4.6,  $p = 1E-07$ ;  $p = 0,038$ ),

відповідно, в порівнянні з тваринами без лікування (група 6). Крім того, статистично значуще зниження показника було відзначено у групі 5 в порівнянні з групою 1.

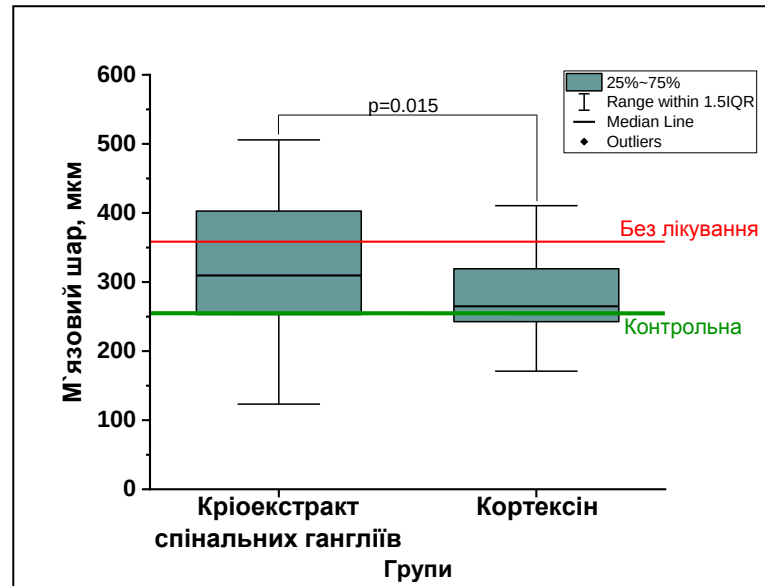


Рис. 4.6. Товщина м'язового шару у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 1 та 5 та у порівнянні з групою 6 (тварини без лікування) ( $p < 0,05$ ).

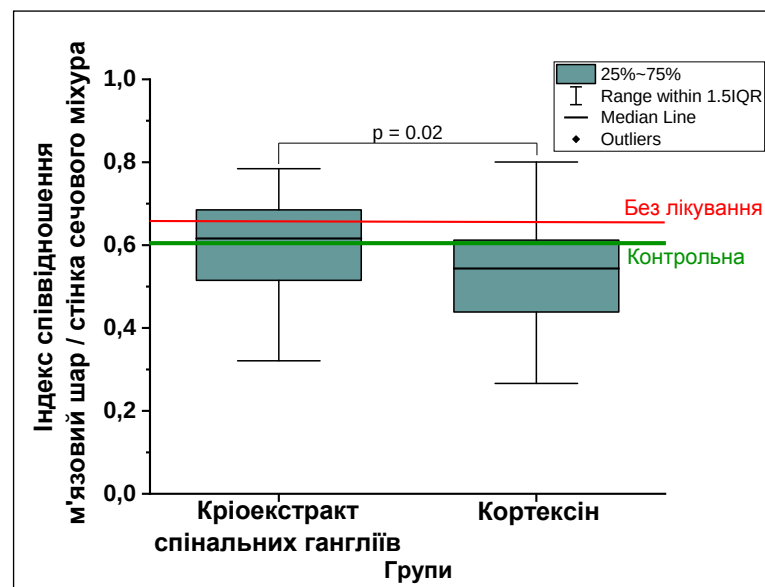


Рис. 4.7. Зміна індексу співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 1 та 5 ( $p < 0,05$ ).

Показник індексу співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура групи 1 нормалізовувався, а у групі 5 був меншим на 11,2% (рис. 4.7,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,01$  відповідно) порівняно з інтактним контролем. Також статистично значуще зниження показника було відзначено у групі 5 в порівнянні з групою 1.

На наступному етапі роботи було охарактеризовано функціональні зміни СМ у відповідь на використання БАК при моделюванні ІВО. Для цього було вивчено параметри скорочувальної активності ІС тварин 1 та 5 груп.

Було визначено, що при майже однакових значеннях KCl-індукованої активної напруги (рис. 4.8,  $p > 0,05$ ), які були вищими за показники інтактного контролю і тварин групи 6, тільки у щурів з введенням кріоекстракту СГ збільшувалася скоротливість у відповідь на стимуляцію пілокарпіном у 2,5 та 3,6 раза (рис. 4.9,  $p = 0,017$ ;  $p = 0,003$  відповідно) порівняно з інтактним контролем і групою без лікування.

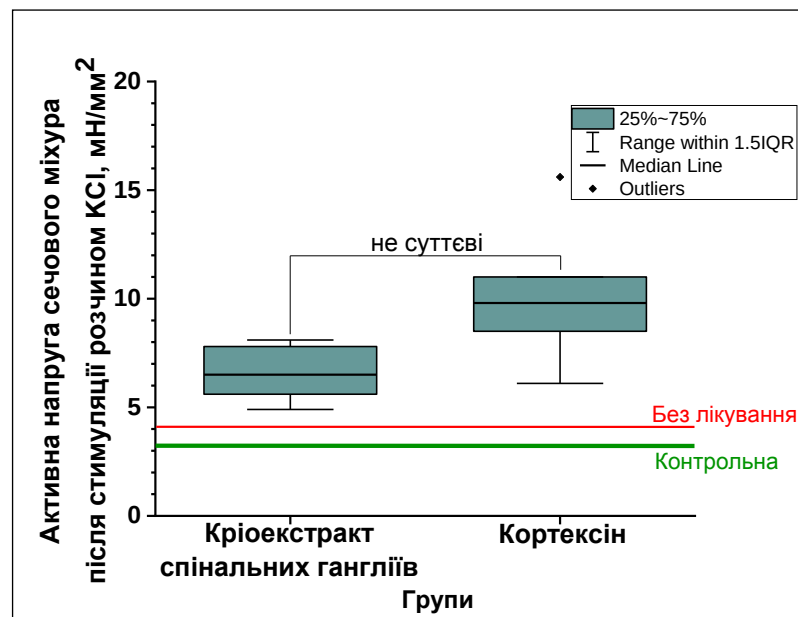


Рис. 4.8. Активна напруга ізольованих смужок сечового міхура після стимуляції розчином KCl у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично незначущі у порівнянні між групами 1 та 5 ( $p > 0,05$ ); статистично значущі у порівнянні з інтактним контролем і групою без лікування ( $p < 0,05$ ).

Цікаво, що у щурів групи 5 збільшувалася KCl-індукована активна напруга у 3 та 2,4 раза (рис. 4.8,  $p = 0,04$ ;  $p = 0,007$  відповідно) порівняно з інтактним контролем і групою без лікування.

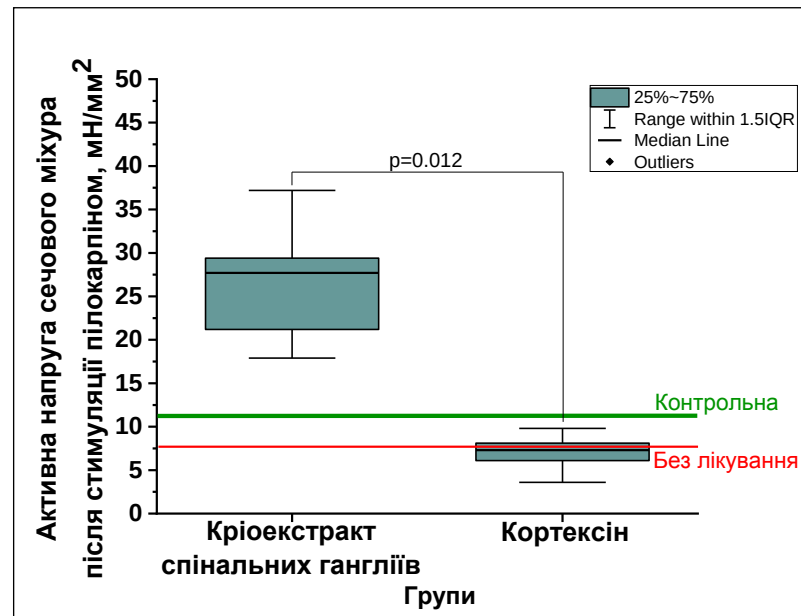


Рис.4.9. Активна напруга ізольованих смужок сечового міхура після стимуляції пілокарпіном у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з між групами 1 та 5 ( $p < 0,05$ ).

Визначено, що у тварин групи 1 відбувалася нормалізація показників спонтанної скорочувальної активності (рис. 4.10,  $p > 0,05$ ) порівняно з інтактним контролем.

Виявлено нормалізацію та збільшення показників максимальної амплітуди скорочення на 12,4 і 179,9% (рис. 4.11,  $p > 0,05$ ;  $p = 0,002$  відповідно) порівняно з інтактним контролем і групою без лікування. На відміну від цього у групи 5 показники спонтанної скорочувальної активності були статистично незначуще вищими на 1,35% (рис. 4.10,  $p > 0,05$ ), а результати максимальної амплітуди скорочення меншими на 82,15% (рис. 4.11,  $p = 0,012$  відповідно) порівняно з результатами групи кріоекстракту СГ (група 1).



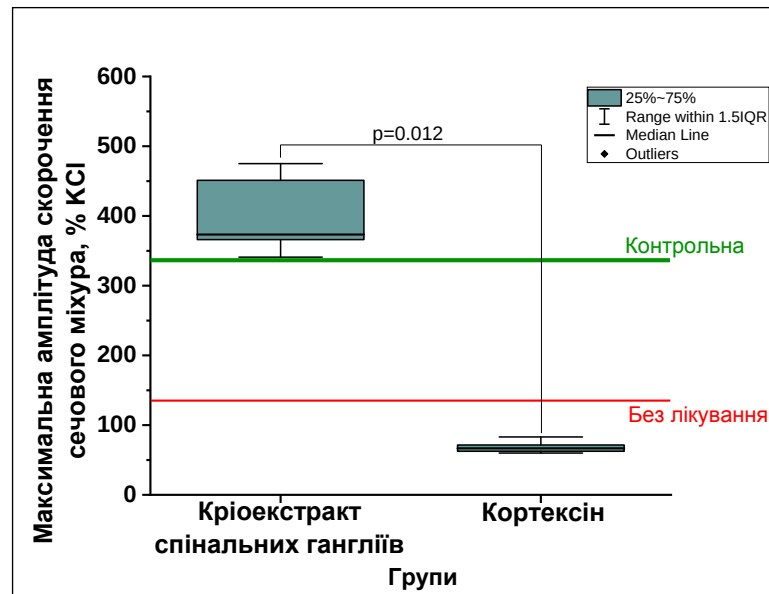


Рис. 4.10. Зміна спонтанної скорочувальної активності ізольованих смужок сечового міхура у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично незначущі між групами 1 та 5 ( $p > 0,05$ ).

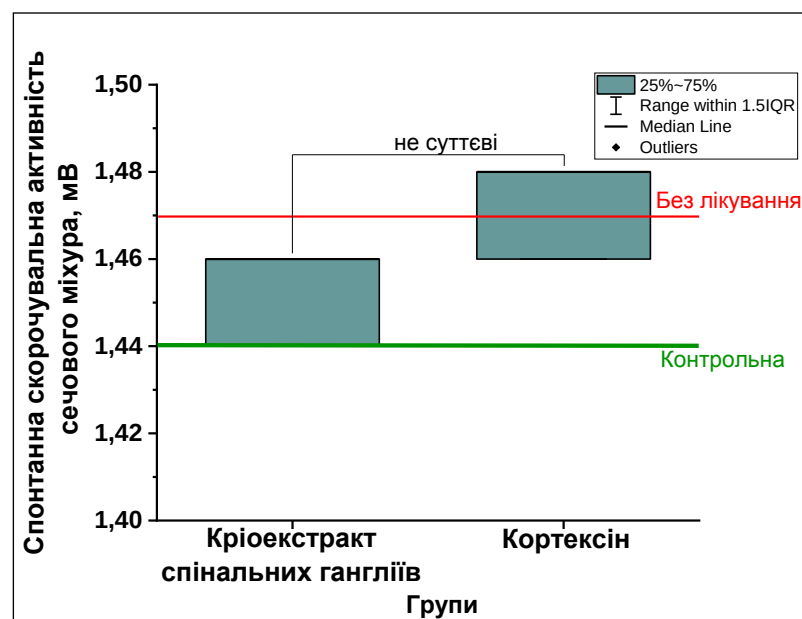


Рис. 4.11. Зміна максимальної амплітуди скорочення ІС СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 1 та 5 та з групою 6 без лікування ( $p < 0,05$ ).

Результати імуногістохімічного дослідження тканини СМ тварин групи 1 продемонструвало присутність обширних ділянок позитивного мічення антитілами до білка S100 (рис. 4.12).

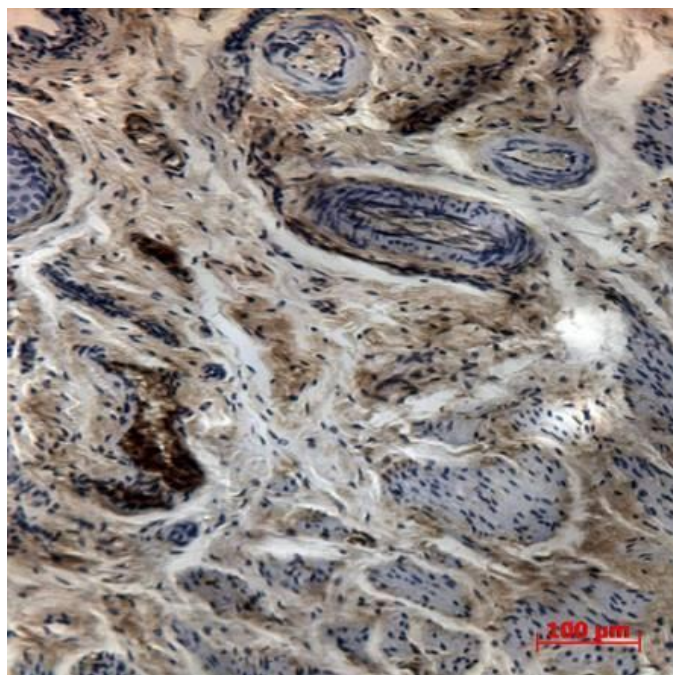


Рис. 4.12. Імуногістохімічне дослідження експресії S 100 у тканині СМ щурів з моделлю ІВО та введенням кріоекстракту СГ.

Результати вимірювання експресії актину у тканинах СМ візуально продемонстрували зменшення площі та інтенсивності забарвлення м'язових структур у групі 1 порівняно з інтактними щурами (рис.4.13).

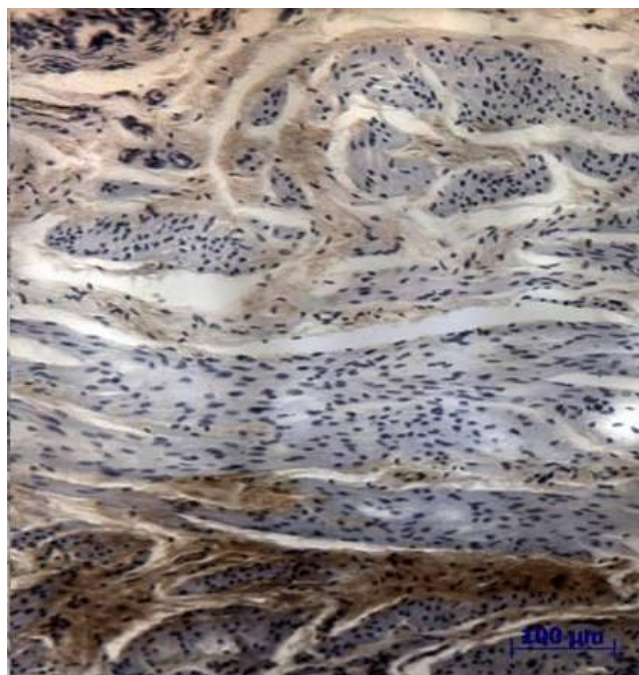


Рис. 4.13. Імуногістохімічне дослідження актину у тканині СМ щурів з моделлю ІВО та введенням кріоекстракту СГ.

Шляхом статистичного аналізу було встановлено збільшення відносної площі експресії досліджуваних маркерів нервових і м'язових структур за обома показниками у тварин групи 1 на 98,15% та на 66,4% (рис.4.14,  $p=0,003$ ;  $p=0,005$  відповідно), порівняно з контрольною групою без лікування. Дещо інша тенденція була при порівнянні з інтактною контрольною групою. Встановлено збільшення відносної площі експресії у тканинах СМ S 100 та значно менші показники досліджуваного маркеру м'язових структур у тварин групи 1 на 472% і на 68,5% (рис.4.14,  $p=0,005$ ;  $p=0,008$  відповідно), порівняно з інтактною контрольною групою.

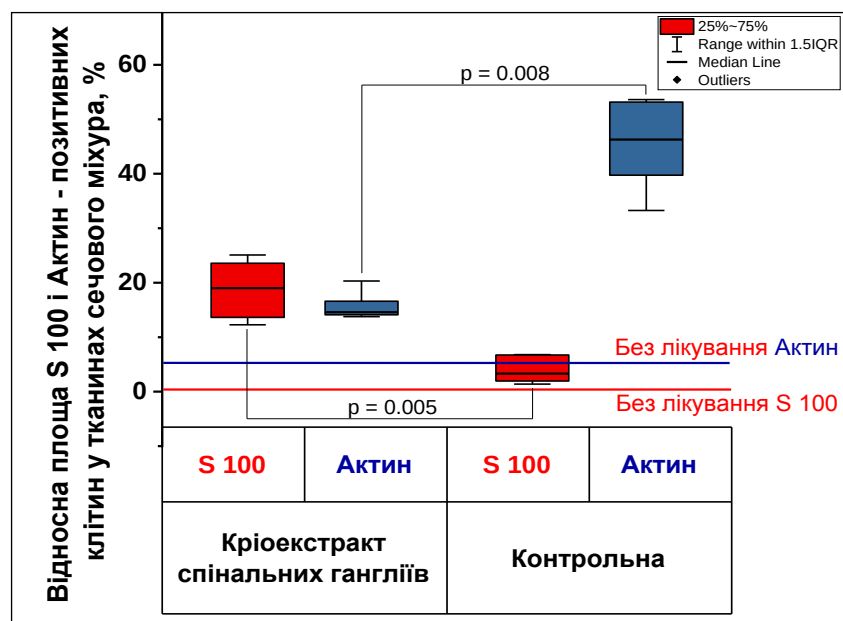


Рис. 4.14. Динаміка змін відносної площі (%) експресії S100 та актину в тканині СМ групи 1 у відповідь на використання кріоекстракту СГ після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з інтактним контролем ( $p<0,05$ ).

Таким чином можна констатувати більш комплексні зміни у відповідь на застосування кріоекстракту СГ, на відміну від «Кортексину» на морфофункціональні показники у щурів після перенесеної ІВО.

### **Висновки до розділу 4.1.**

1. Відносна маса СМ щурів з обструкцією, які отримували кріоекстракт СГ, була найменшою, ніж у інших досліджуваних груп.
2. Товщина м'язового шару і індекс співвідношення м'язовий шар/стінка СМ були більшими у групі кріоекстракту СГ, але нижче ніж у щурів з обструкцією, які не отримували лікування.
3. Пілокарпін-стимульована скоротлива активність і максимальна амплітуда скорочень були значно вищими, а спонтанна скоротливість знижувалася у групі кріоекстракту СГ у порівнянні з групами «Кортексіну» та щурів з обструкцією без лікування.
4. Відносна площа S 100 - позитивних клітин у тварин з патологією після застосування кріоекстракту СГ була вищою, при менших показниках вмісту актину, порівняно з інтактною контрольною групою. Обидва показники маркерів експресії цих білків у тканинах СМ збільшувалися у порівнянні зі щурами з патологією, яких не лікували.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [26–28, 32, 33, 37, 38].

### **4.2. Порівняння динаміки патологічних змін сечового міхура після ІВО за умов впливу секретомів нативної і кріоконсервованої культур клітин спінальних гангліїв, а також базового середовища культивування.**

На третьому етапі, було перевірено дію кондиційованих середовищ нативної і кріоконсервованої культур клітин спінальних гангліїв, а також базового середовища культивування на морфофункціональні характеристики СМ тварин після перенесеної ІВО. Групи тварин та умови експерименту представлені на рисунку 4.15.

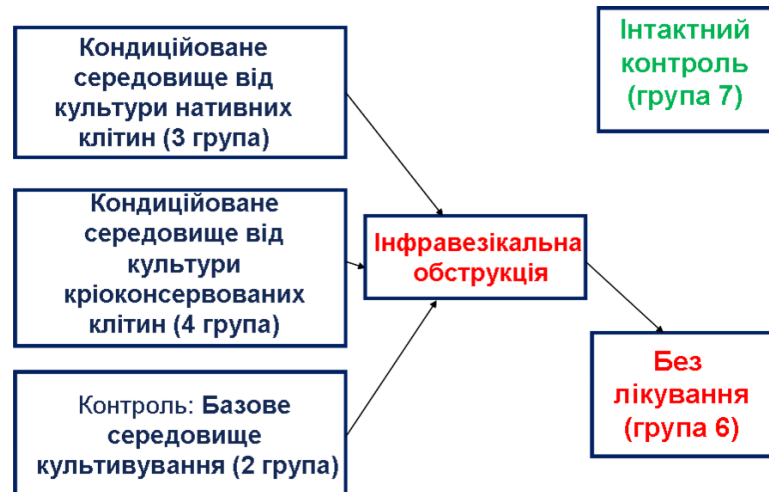


Рис. 4.15. Схема експерименту по введенню БАК, отриманих від культур клітин СГ.

Показники відносної маси СМ у групах 2 (з введенням БСК), 3 (КС від інтактної культури клітин) і 4 (КС від кріоконсервованої культури клітин) суттєво не відрізнялися між собою (рис. 4.16.,  $p > 0,05$ ) та збільшувалися на 30 і 47,5% у тварин 2 і 3 груп (рис. 4.16.,  $p = 0,0007$ ;  $p = 0,005$  відповідно) порівняно з контролем. При цьому важливо відмітити нормалізацію відносної маси сечового міхура до контрольних показників у щурів групи 4, яким вводили КС кріоконсервованої культури СГ (рис. 4.16.,  $p > 0,05$ ). Також відмічається зменшення цього показника у групах 2, 3 і 4 з використанням БАК після перенесеної ІВО (рис. 4.16.,  $p > 0,05$ ), але вони були статистично незначущими.

При цьому важливо відмітити, що маса щурів цих досліджуваних груп була майже однаковою (рис. 4.17.,  $p > 0,05$ ). Показники відносної маси СМ були пропорційні масі ІС СМ у всіх експериментальних тварин.

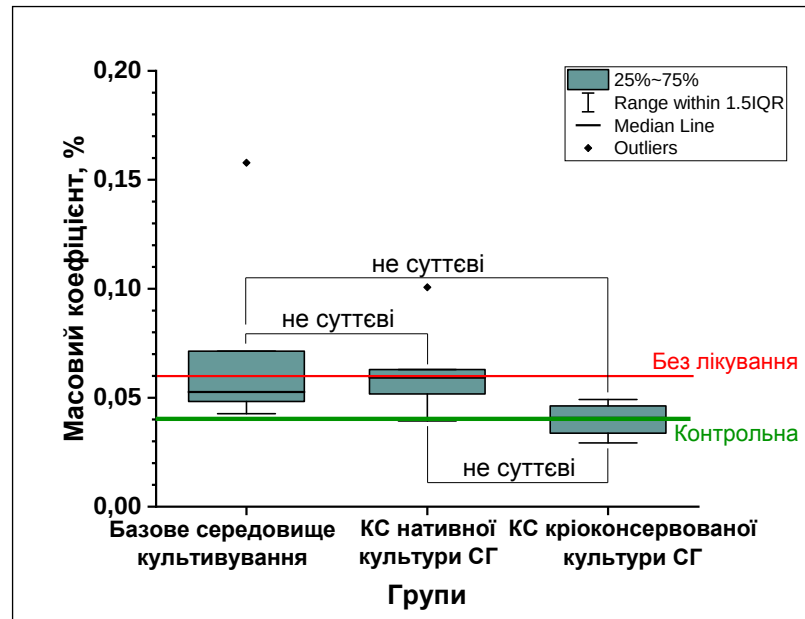


Рис. 4.16. Зміни відносної маси СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3, 4 ( $p>0,05$ ).

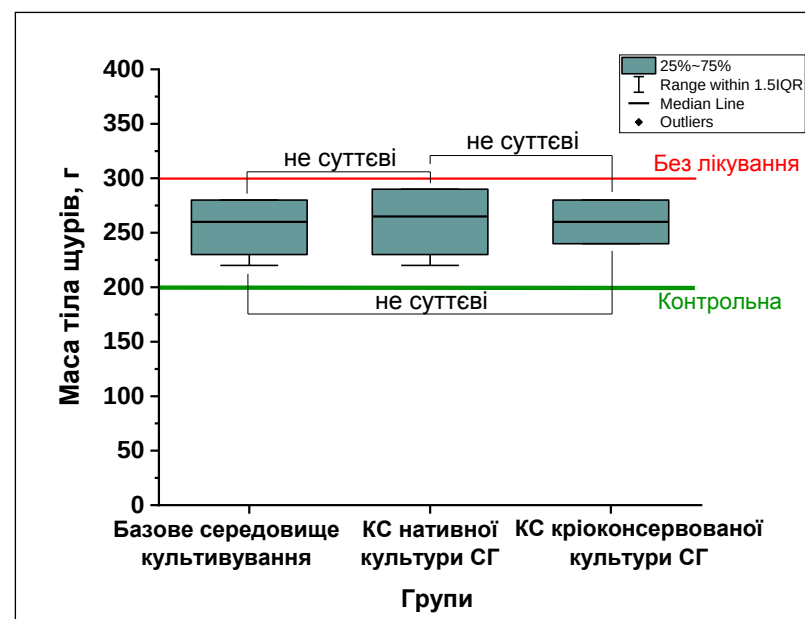


Рис. 4.17. Динаміка маси тіла щурів у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні з вихідними контрольними значеннями ( $p>0,05$ ).

Аналіз мікрофотографій сечового міхура щурів з обструкцією після введення БАК виявив схожі морфологічні зміни у СМ усіх досліджуваних



груп. У тварин 2-ї групи (БСК) поверхня перехідного епітелію слизової оболонки СМ набувала різного ступеня гіперплазії, але місцями зустрічалися ділянки атрофії. Власна пластинка виглядала помірно потовщеною, її м'язовий шар втратив структурну організацію, набував різного ступеню гіпертрофії з розростанням сполучної тканини. М'язи детрузора втрачали впорядкованість, також були гіпертрофованими в різній мірі з великою кількістю кровоносних судин та помірним вмістом сполучної тканини між ними. Серозна оболонка мала вкрай неоднорідну товщину на всьому своєму протязі (рис. 4.18).

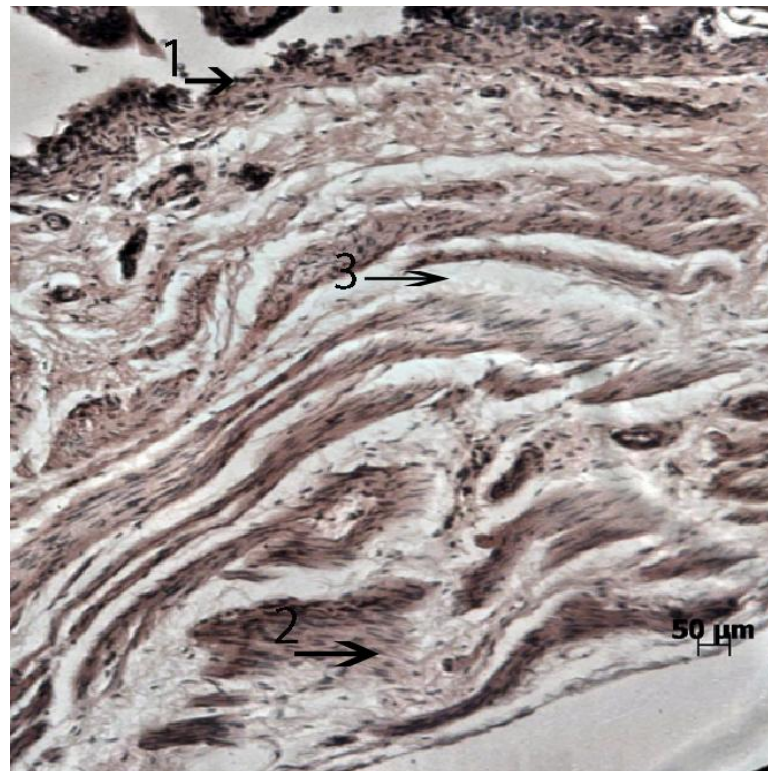


Рис. 4.18. Мікрофотографія стінки СМ щура з моделлю інфравезікальної обструкції після застосування базового середовища культивування. Стрілками позначено: 1 – атрофія епітелію; 2 – гіпертрофія гладеньких м'язів; 3 – розростання сполучної тканини. Забарвлення гематоксилін-еозином.

У тварин 3-ї групи (КС нативної культури клітин СГ) поверхня слизової оболонки СМ була вкрита гіперплазованим перехідним епітелієм. Власна пластинка виглядала різко потовщеною, її м'язовий шар місцями був

атрофованим. М'язовий шар детрузора втрачав структурну організацію, складався з груп потовщених гладеньких м'язових волокон з невеликим вмістом сполучної тканини між ними. Серозна оболонка була різко потовщена на всьому протязі (рис. 4.19).

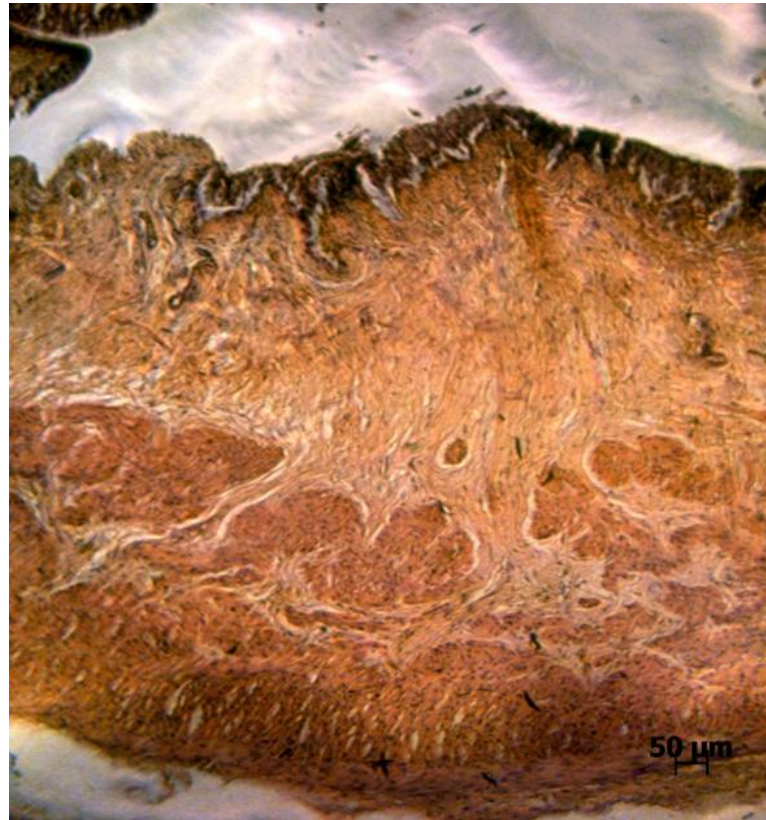


Рис. 4.19. Мікрофотографія стінки СМ щура з моделлю інфравезікальної обструкції після застосування КС нативної культури клітин СГ. Забарвлення гематоксилін-еозином.

У щурів 4-ї групи (КС кріоконсервованої культури клітин СГ) перехідний епітелій СМ виглядав здебільшого гіперплазованим, але місцями зустрічалися ділянки його атрофії. М'язовий шар власної пластинки і гладенькі м'язи детрузора були різко гіпертрофовані, з помірним вмістом сполучної тканини між шарами. Серозна оболонка була різко потовщена на всьому протязі (рис. 4.20).



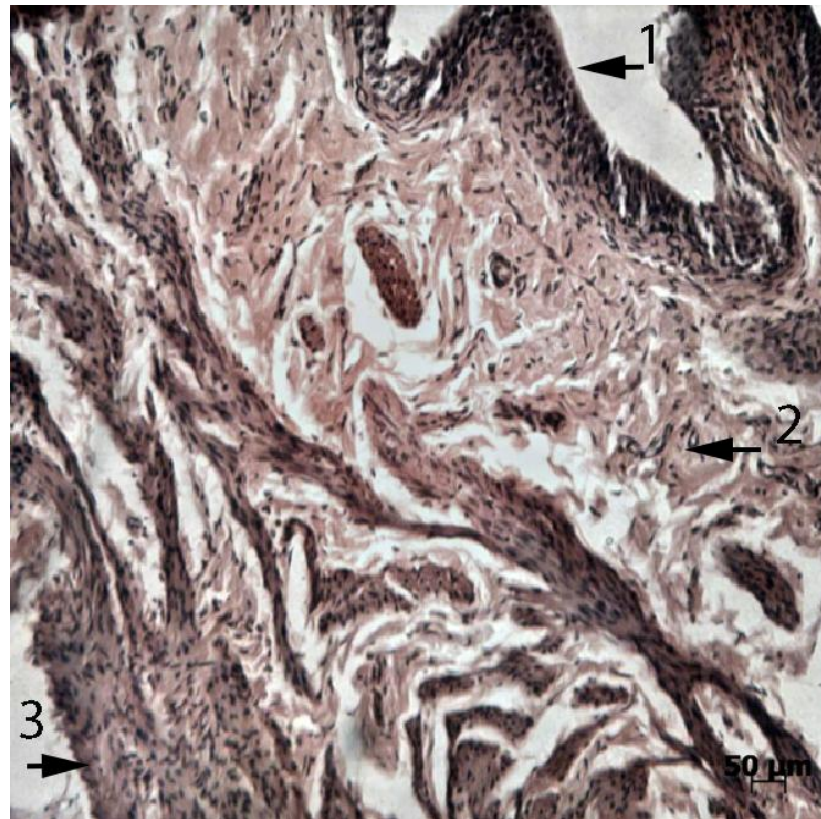


Рис. 4.20. Мікрофотографія стінки СМ щура з моделлю інфравезикальної обструкції після застосування КС кріоконсервованої культури клітин СГ. Позначення: 1 – гіперплазія епітелію; 2 – гіпертрофія м'язів власної пластинки; 3 – розростання серозної оболонки. Забарвлення гематоксилін-еозином.

Шляхом статистичного аналізу встановлено, що показники середньої висоти перехідного епітелію СМ у групах 2, 3 і 4 суттєво не відрізнялися між собою (рис. 4.21.,  $p > 0,05$ ) та були вищими за показники групи 6 (рис. 4.21.,  $p > 0,05$ ). Але тільки у групі 3 спостерігалася нормалізація до показників інтактних щурів (рис. 4.21.,  $p > 0,05$ ).

Виявлено значне зростання загальної товщини стінки СМ тільки у щурів групи 4, яке перевищувало показники груп 2, 3 і 7 на 27,1, 24,6 та 40% відповідно (рис. 4.22.,  $p = 0,0004$ ;  $p = 0,03$ ;  $p = 7,1E-07$  відповідно). Навпаки показники груп 2 і 3 зменшилися на 24,7 та 15,4% (рис. 4.22.,  $p = 1,7E-06$ ;  $p = 0,004$  відповідно) порівняно з групою 6, але не досягли значень інтактного контролю (рис. 4.22.,  $p > 0,05$ ).

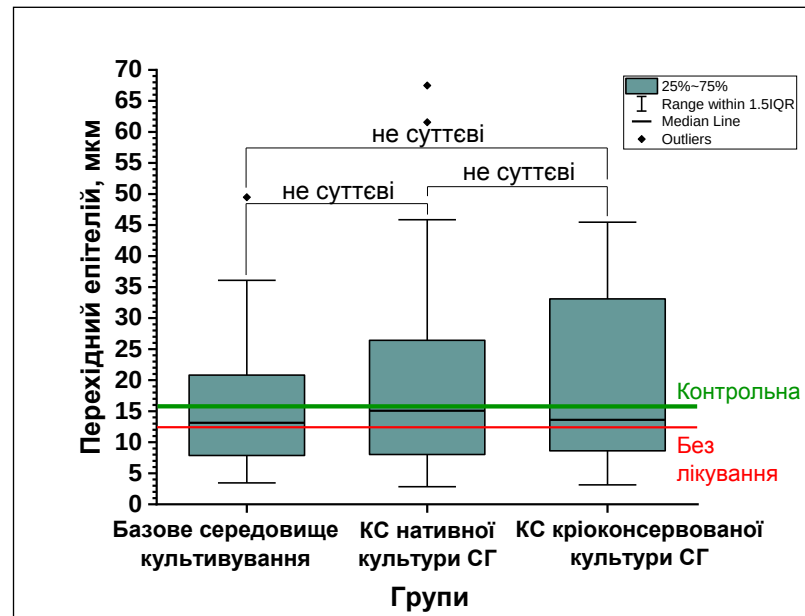


Рис. 4.21. Зміна середньої висоти перехідного епітелію СМ у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3, 4 ( $p > 0,05$ ).

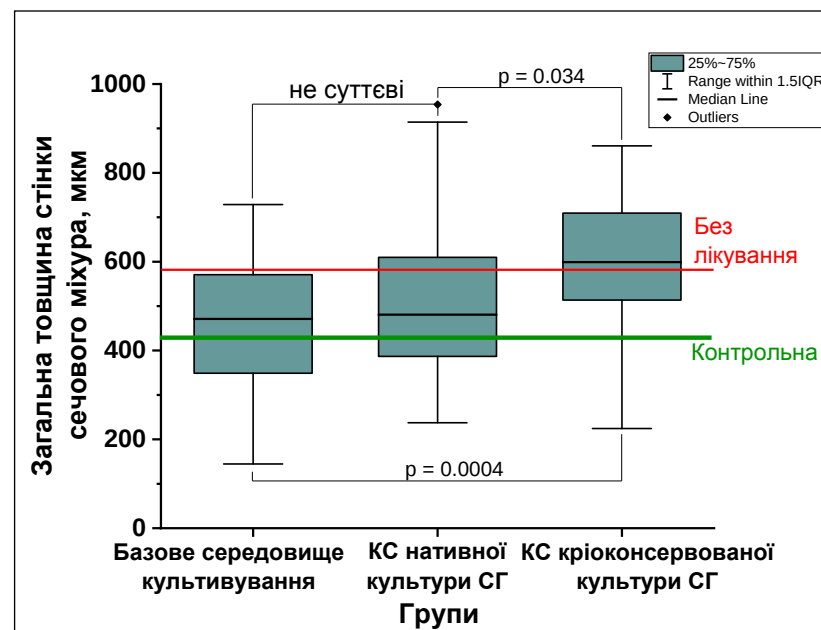


Рис. 4.22. Зміна загальної товщини стінки СМ у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2 та 3 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі між групами 2 та 4, 3 та 4 ( $p < 0,05$ ).

При вимірюванні товщини м'язового шару СМ виявлено аналогічну тенденцію, а саме зростання показників тільки у щурів групи 4, яке перевищувало показники груп 2, 3 і 7 на 37,5, 42,4 та 42,1% відповідно (рис. 4.23.,  $p = 0,002$ ;  $p = 0,0007$ ;  $p = 3,1E-05$  відповідно). Навпаки показники груп 2 і 3 зменшилися на 24,7 та 27,3% (рис. 4.23.,  $p = 2,3E-09$ ;  $p = 2,3E-10$  відповідно) порівняно з групою 6, та нормалізувались до значень інтактного контролю (рис. 4.23.,  $p > 0,05$ ).

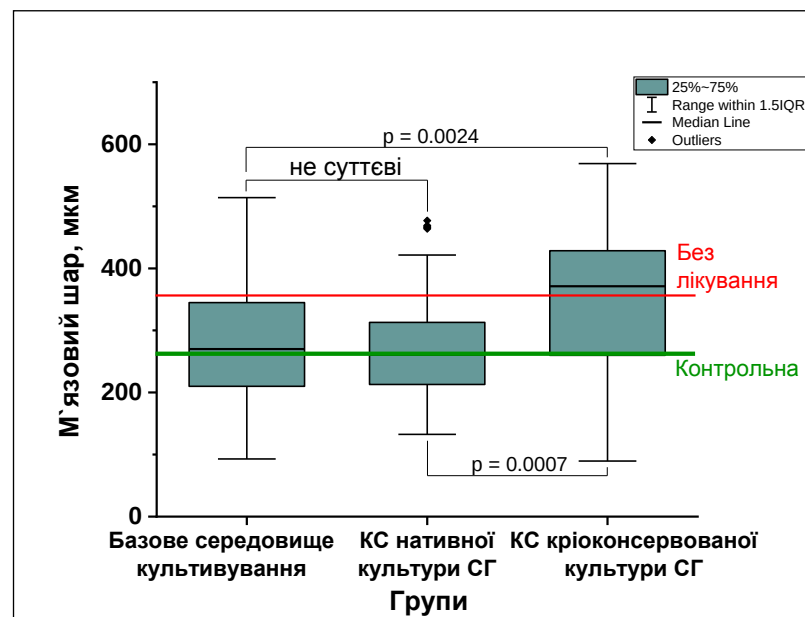


Рис. 4.23. Зміни товщини м'язового шару у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2 та 3 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі між групами 2 та 4, 3 та 4 ( $p < 0,05$ ).

Встановлено зменшення показнику індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ у щурів усіх досліджуваних груп, але статистично значимо тільки група 3 демонструвала результати нижчі, ніж у груп 2, 6 і 7 на 10,5, 17 та 11,6% відповідно (рис. 4.24.,  $p = 0,0017$ ;  $p = 1,8E-07$ ;  $p = 0,003$  відповідно). Показники груп 2 і 4 нормалізувались до значень інтактного контролю (рис. 4.24.,  $p > 0,05$ ).

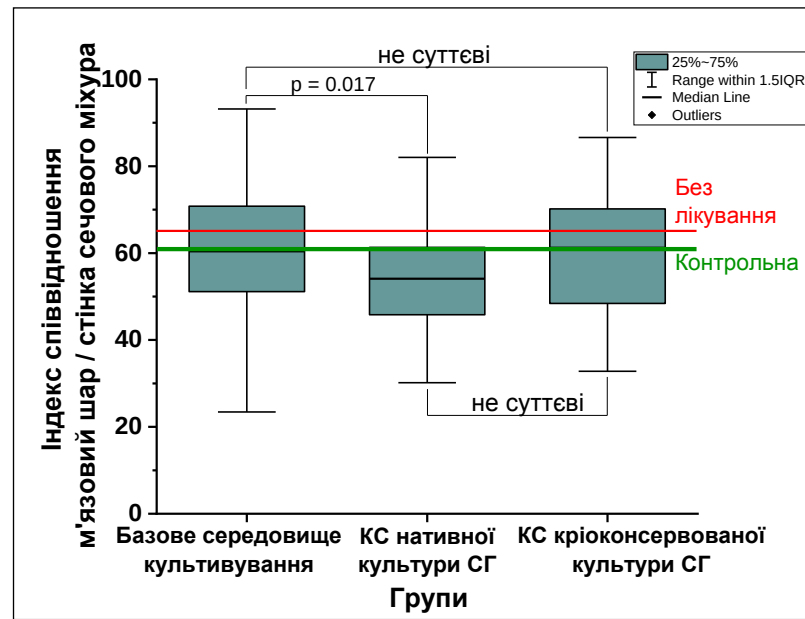


Рис. 4.24. Зміна індексу співвідношення м'язовий шар/стінка СМ у відповідь на використання БАК після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2 та 4, 3 та 4 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 2 та 3 ( $p < 0,05$ ).

На наступному етапі роботи було вивчено параметри скорочувальної активності ІС тварин 2, 3 та 4 груп.

Визначено, що у тварин вказаних досліджуваних груп були майже однакові значення КСІ-індукованої активної напруги (рис. 4.25.,  $p > 0,05$ ), які були вищими за показники груп 6 і 7. Тільки у щурів 3-ї групи (введення КС нативної культури клітин СГ) було досягнуте статистично значуще збільшення у 6,5 та 5,2 раза (рис. 4.25.,  $p = 0,017$ ;  $p = 1,5E-02$  відповідно) порівняно з інтактним контролем і групою без лікування.

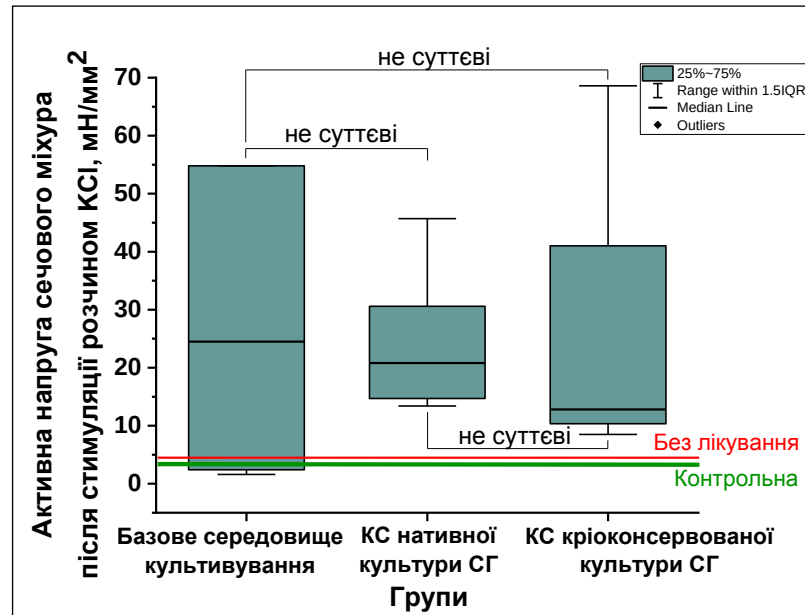


Рис. 4.25. Активна напруга ІС СМ після стимуляції розчином КСІ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2 та 3 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 2 та 4, 3 та 4 ( $p < 0,05$ ).

Встановлено статистично значуще збільшення сили пілокарпін-індукованого м'язового скорочення СМ тільки у тварин групи 4 (застосування КС кріоконсервованої культури СГ) порівняно з групою 2 – у 2,5 рази; групою 3 – у 2,2 рази; групою 6 – у 6,5 рази; групою 7 – у 4,6 рази (рис. 4.26.,  $p = 0,025$ ;  $p = 0,037$ ;  $p = 4,7E-04$ ;  $p = 0,008$  відповідно).

Визначено нормалізацію показника спонтанної скорочувальної активності у тварин групи 4 було до рівня інтактних щурів (рис. 4.27.,  $p > 0,05$ ) та зменшення (рис. 4.27.,  $p = 0,01$  відповідно) порівняно з групою 6.

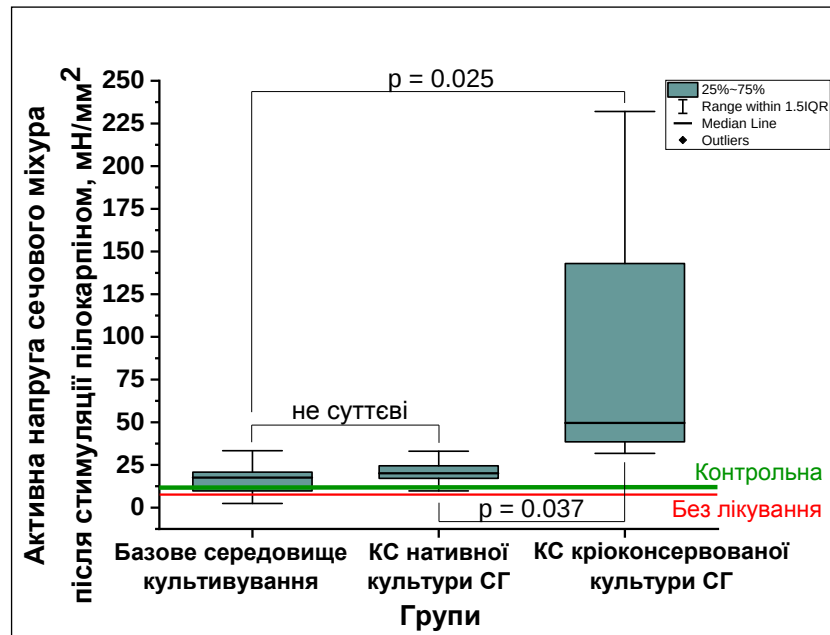


Рис. 4.26. Активна напруга ІС СМ після стимуляції пілокарпіном у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2 та 3 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 2 та 4, 3 та 4 ( $p < 0,05$ ).

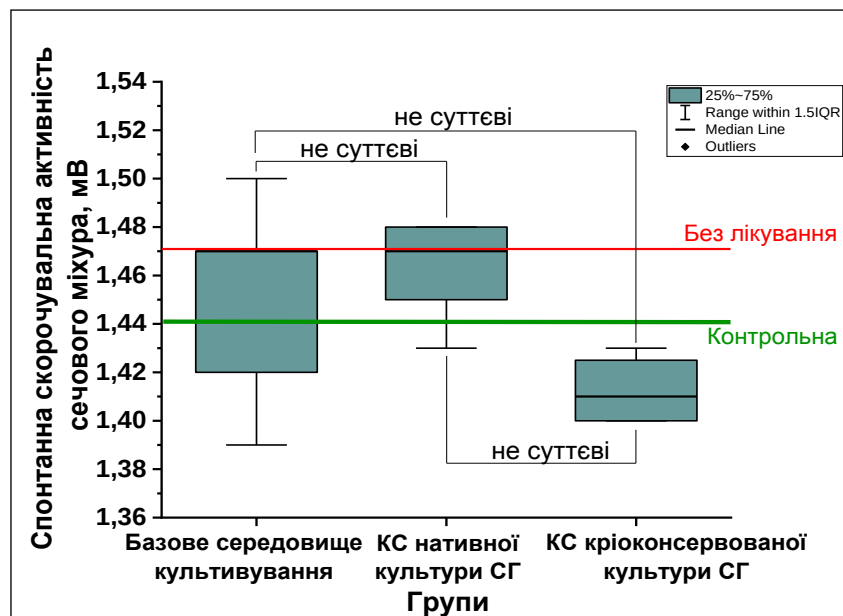


Рис. 4.27. Зміна спонтанної скорочувальної активності ІС СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3 та 4 ( $p > 0,05$ ).

У тварин групи 4 виявлено нормалізацію показника максимальної амплітуди скорочення порівняно з інтактним контролем (рис. 4.28). При цьому, порівняно групою 6 (без лікування), збільшення показника відбувалося на 166,4% ( $p = 0,01$ ). На відміну від цього у тварин груп 2 і 3 показники спонтанної скорочувальної активності не були статистично значуще вищими (рис. 4.27.,  $p > 0,05$ ), а результати максимальної амплітуди скорочення були меншими (рис. 4.28.,  $p > 0,05$ ) порівняно з показниками інтактного контролю.

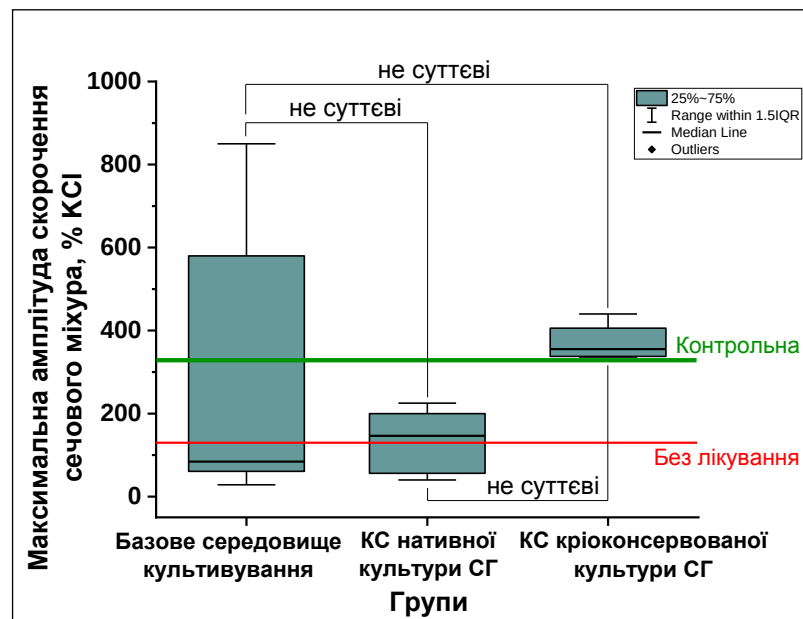
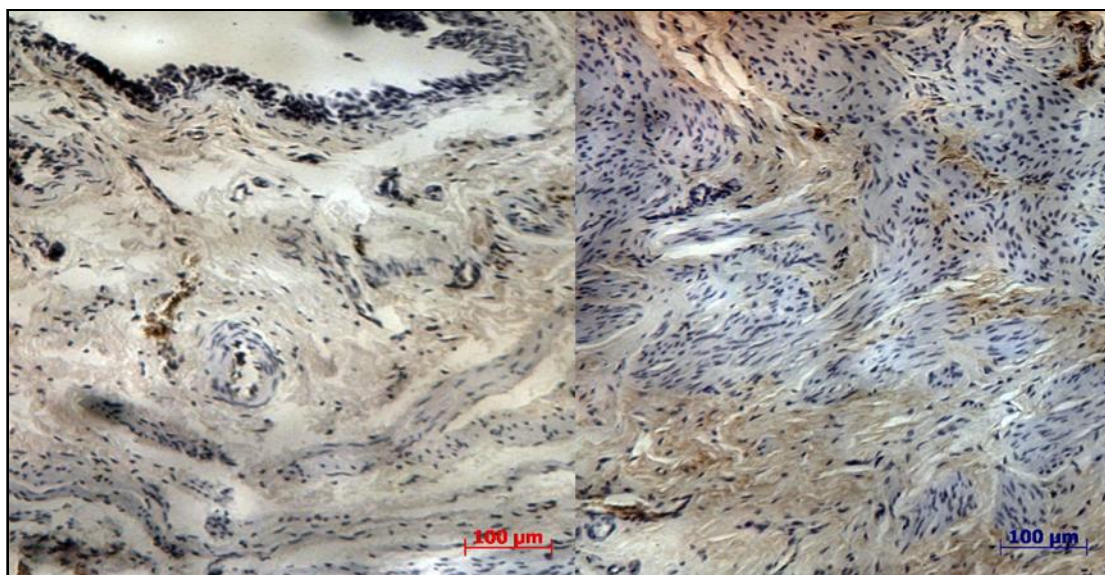


Рис. 4.28. Зміна максимальної амплітуди скорочення ІС СМ у відповідь на використання БАК після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3 та 4 ( $p > 0,05$ ).

За візуальною оцінкою препаратів тканини СМ, які було піддано імуногістохімічному міченню антитілами до білку S100 та актину, встановлено збільшення відносної площі позитивного мічення у тварин групи 3 порівняно з групою 6 (без лікування) (рис. 4.29). Також за візуальною оцінкою встановлено збільшення відносної площі позитивного мічення нервових і м'язових структур антитілами до білків S100 та актину у групи 4 порівняно з групою 6 (без лікування) (рис. 4.30).

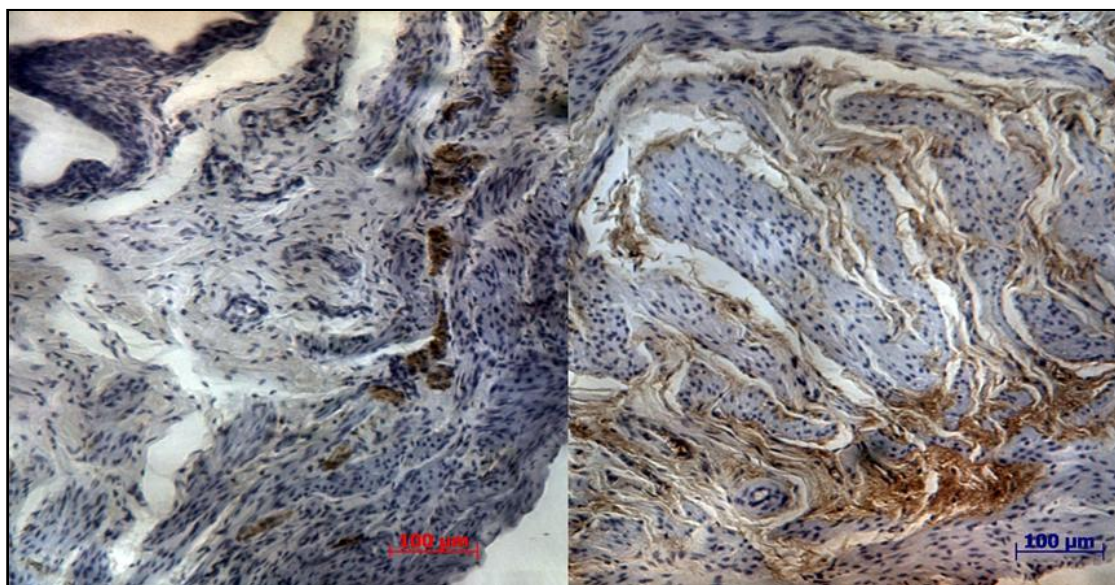




а

б

Рис. 4.29. Тканина СМ щурів групи 3 (введення КС від нативної культури клітин). Імуногістохімічне дослідження експресії S 100 (а) та актину (б).



а

б

Рис. 4.30. Тканина СМ щурів групи 4 (введення КС від кріоконсервованої культури клітин). Імуногістохімічне дослідження експресії S 100 (а) та актину (б).

Шляхом статистичного аналізу було встановлено збільшення відносної площі експресії досліджуваних маркерів нервових і м'язових структур за обома показниками у тварин групи 3 на 91,6% та на 78,9% (рис. 4.31.,  $p = 0,004$ ;



$p = 0,002$  відповідно), порівняно з групою 6 (без лікування). Дещо інша тенденція була при порівнянні результатів групи 4. Встановлено статистично не значуще збільшення відносної площі експресії у тканинах СМ білку S100 (рис. 4.31.,  $p > 0,05$ ) та значно більші показники експресії актину на 78,8% (рис. 4.31.,  $p = 0,001$ ), порівняно з групою без лікування.

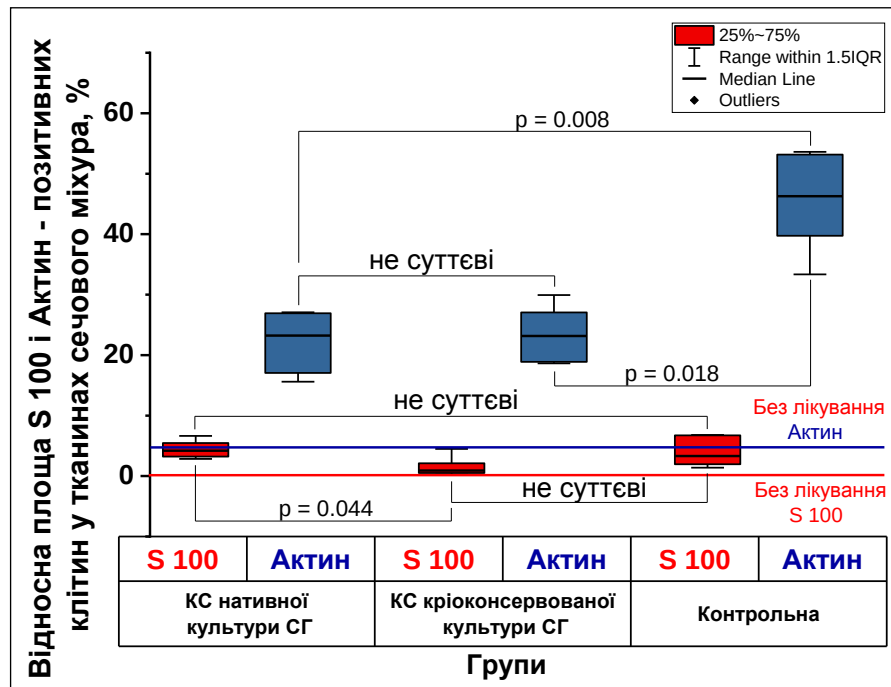


Рис. 4.31. Зміна відносної площі (%) позитивного мічення антитілами до білку S100 та актину в тканині СМ у тварин 3, 4 та 7 груп. Сині стовпчики – позитивне мічення до актину, червоні стовпчики – позитивне мічення до білку S100.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено вплив кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин спінальних гангліїв, а також базового середовища культивування на морфофункціональні характеристики сечового міхура щурів з ІВО.

## Висновки до розділу 4.2.

1. Нормалізація відносної маси сечового міхура спостерігалася у всіх групах з введенням БАК (БСК, КС від нативної та кріоконсервованої культури клітин СГ).

2. Товщина м'язового шару і стінки сечового міхура були найбільшими у групі з введенням КС від кріоконсервованої культури клітин СГ, а індекс співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура був найменшим у групі КС від нативної культури клітин СГ.

3. Спонтанна скоротливість була найменшою, а максимальна амплітуда скорочень найбільшою у групі з введенням КС від кріоконсервованої культури клітин СГ.

4. Показники відносної площі, яку займали у тканині СМ S100- і актин-позитивні клітини, збільшувалися у групах тварин з введенням БАК в порівнянні з групою щурів з ІВО без лікування.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [26, 28, 31–33, 37, 38].

## РОЗДІЛ 5

### ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КОМПОЗИЦІЙ НА МАСУ ТВАРИН ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ПІСЛЯ ПЕРЕНЕСЕНОЇ ІНФРАВЕЗІКАЛЬНОЇ ОБСТРУКЦІЇ

На заключному четвертому етапі дослідження була перевірена можливість БАК впливати на біохімічні показники щурів з ІВО після введення. Це було виконано з метою встановлення можливих негативних наслідків, таких як нефротоксичність. Загально відомий факт, що ІВО може викликати ниркову дисфункцію. Потенційно, будь-яке потрапляння різних біологічно активних речовин до організму, може спричинити різноманітні прояви на тлі вже наявної обструктивної уропатії. Хоча БАК не відносяться до так званих нефротоксикантів, але їх багатокomпонентний склад може чинити мультихімічні реакції та призводити до ще більш негативних наслідків у тварин з патологією.

Було проведено визначення такого інтегративного показника, як маса досліджуваних тварин, яка може змінюватися внаслідок прогресування ниркової недостатності на тлі ІВО, або токсичного впливу речовин, які застосовуються в лікувальних цілях.

Вимірювання маси щурів виявило її збільшення в 1-й (застосування кріоекстракту) на 60% (рис. 5.1.,  $p = 0,002$ ) і 6-й групах (без лікування) на 50% (рис. 5.2.,  $p = 7,4E-05$ ) відповідно порівняно з інтактними тваринами. Але різниці в масі між групою 1 та 5 не було (рис. 5.1.,  $p > 0,05$ ).

Показники маси щурів у групах 2 (з введенням БСК), 3 (КС від інтактної культури клітин) і 4 (КС від кріоконсервованої культури клітин) суттєво не відрізнялися між собою (рис. 4.17.,  $p > 0,05$ ) та порівняно з тваринами 6-ї (без лікування) і контрольної груп.

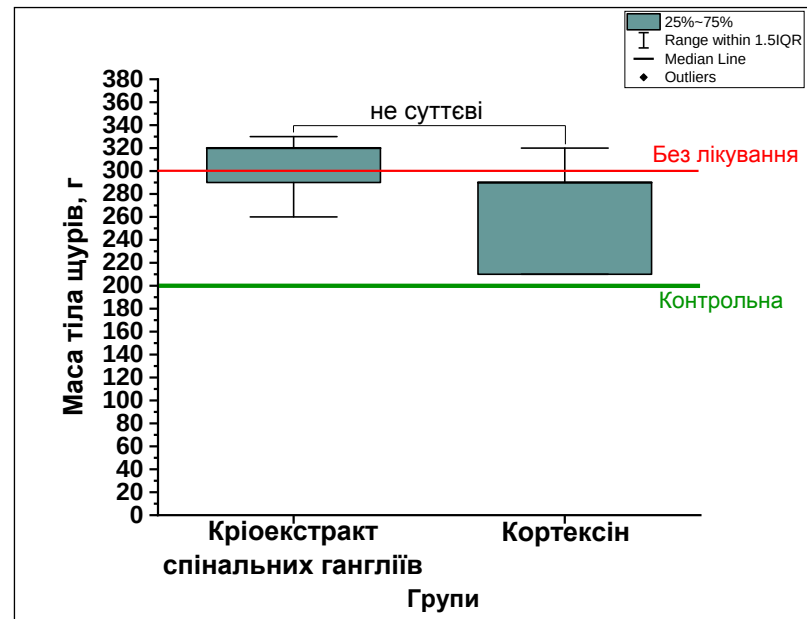


Рис. 5.1. Зміна маси щурів у відповідь на використання кріоекстракту СГ і «Кортексіну» після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 1 та 5, 1 та 6 ( $p>0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p<0,05$ ).

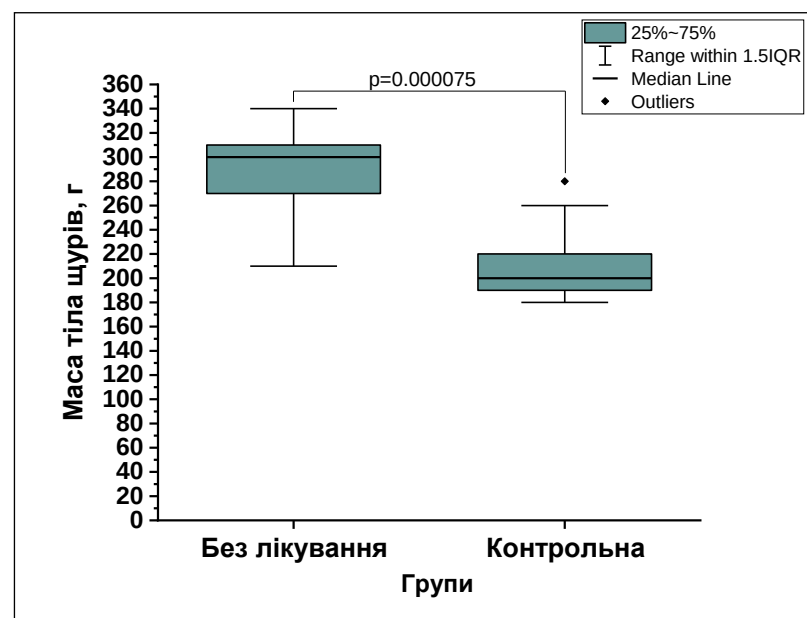


Рис. 5.2. Маса щурів при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p<0,05$ ).

Встановлено відсутність статистично значущої різниці рівня загального білку у щурів з ІВО та інтактного контролю (рис. 5.3.,  $p>0,05$ ).

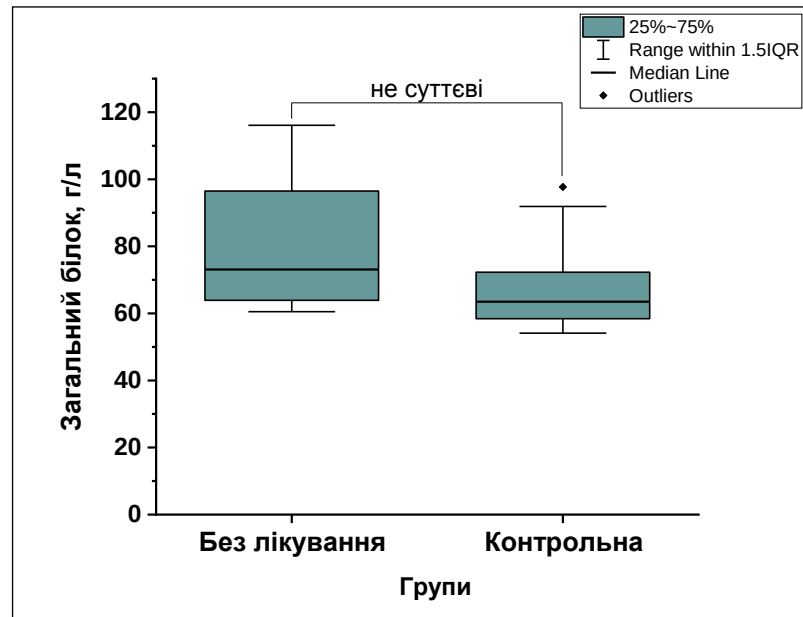


Рис. 5.3. Рівень загального білку при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p > 0,05$ ).

На відміну від цього у тварин групи 1 (введення кріоекстракту) кількість загального білку була більшою у порівнянні з показниками груп 5 (введення Кортексіну) і 7 (інтактний контроль) на 97,2% і 51,5% (рис. 5.4.,  $p = 0,003$ ,  $p = 0,019$  відповідно).

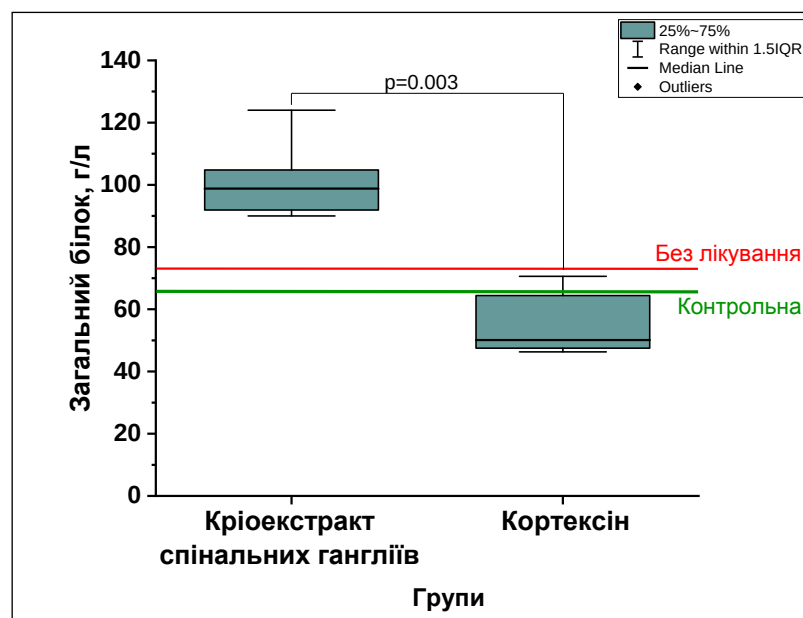


Рис. 5.4. Зміна рівня загального білку у відповідь на використання кріоекстракту СГ і «Кортексіну» після інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 1 та 6 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

Далі було виявлено зниження рівня білку на 31,5% в 5-й групі (введення Кортексіну), в порівнянні з тваринами без лікування (6-а група) (рис. 5.4.,  $p = 0,02$ ).

Показники рівня загального білку крові щурів у групах 2 (з введенням БСК), 3 (КС від інтактної культури клітин) і 4 (КС від кріоконсервованої культури клітин) суттєво не відрізнялися між собою (рис. 5.5.,  $p > 0,05$ ) та порівняно з тваринами 6-ї (без лікування) і контрольної груп.

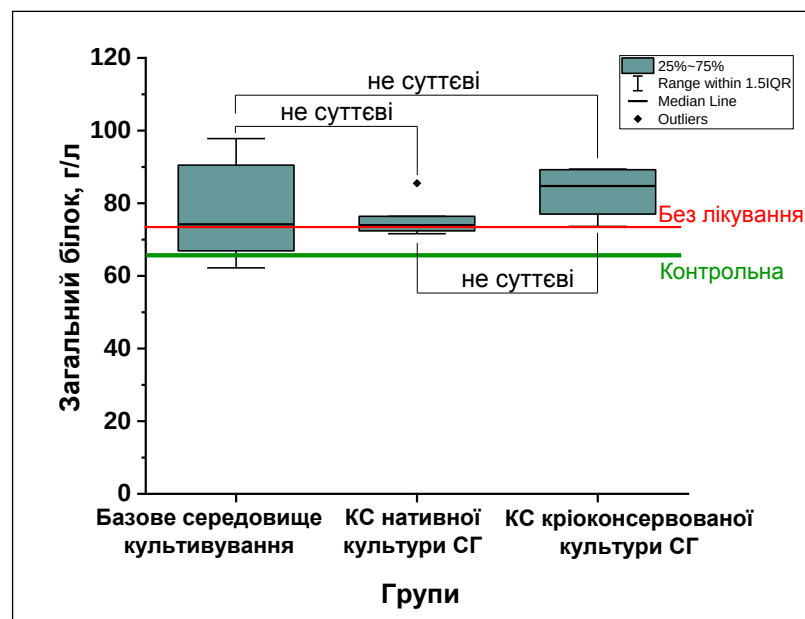


Рис. 5.5. Зміна рівня загального білку у відповідь на використання БСК, КС нативної культури СГ і КС кріоконсервованої культури СГ після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3 та 4 ( $p > 0,05$ ).

Аналіз змісту сечовини в крові у всіх групах показав відсутність статистично значимої різниці (таблиця 5.1,  $p > 0,05$ ).

Таблиця 5.1

Показники сечовини крові інтактних щурів та щурів із ІВО після введення  
БАК і «Кортексину» (n = 63)

| Досліджувана група                     | Me (Q1; Q3)     | p - рівень значимості |
|----------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Кріоекстракт спінальних гангліїв (n=6) | 4,1 (3,6; 4,5)  | 0,93*                 |
| Базове середовище культивування (n=8)  | 4,1 (3,9; 5,8)  | 0,67*                 |
| КС нативної культури СГ (n=7)          | 4,9 (4,4; 5,4)  | 0,31*                 |
| КС кріоконсервованої культури СГ (n=6) | 3,45 (3,3; 4,6) | 0,72*                 |
| «Кортексін» (n=6)                      | 4,0 (2,9; 5,3)  | 0,93*                 |
| Без лікування (n=15)                   | 5,3 (4,3; 6,3)  | 0,097*                |
| Контрольна (n=15)                      | 4,6 (2,9; 5,9)  | 0,097 <sup>#</sup>    |

Примітка: \* – відмінності статистично не значущі стосовно контролю,  
<sup>#</sup> – відносно групи 6 (без лікування),  $p > 0,05$ .

Встановлено відсутність статистично значущої різниці рівня креатиніну крові у щурів з ІВО та інтактного контролю (рис. 5.6.,  $p > 0,05$ ).

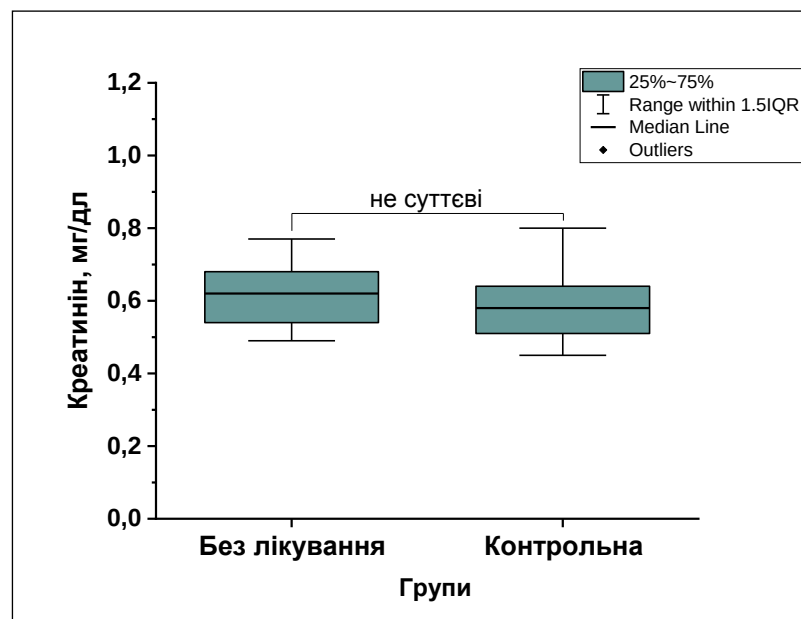


Рис. 5.6. Рівень креатиніну крові при моделюванні інфравезікальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p > 0,05$ ).

Виявлено відсутність статистично значущої різниці між показниками креатиніну крові щурів з ІВО після використання кріоекстракту та «Кортексину» (рис. 5.7.,  $p > 0,05$ ). При цьому встановлено збільшення рівня креатиніну крові у групі 1 (з введенням кріоекстракту) на 30,6% і 37,3% (рис. 5.7.,  $p = 0,03$ ,  $p = 0,006$ ) відповідно у порівнянні з тваринами без лікування (6-а група) та інтактними щурами.

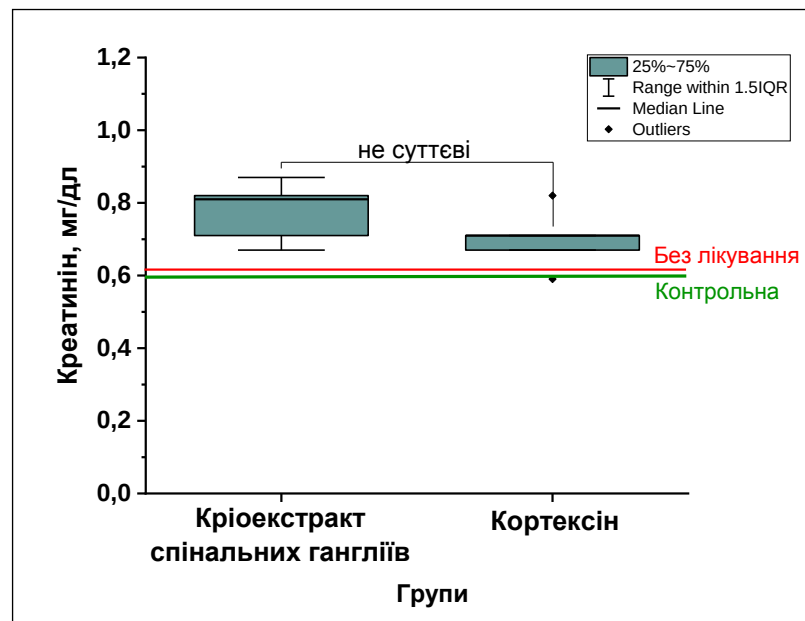


Рис. 5.7. Зміна рівня креатиніну крові у відповідь на використання кріоекстракту СГ і «Кортексину» після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 1 та 5 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні з контрольними даними ( $p < 0,05$ ).

Показники рівня креатиніну крові щурів у групах 2 (з введенням БСК), 3 (КС від інтактної культури клітин) і 4 (КС від кріоконсервованої культури клітин) суттєво не відрізнялися між собою (рис. 5.8.,  $p > 0,05$ ). При цьому встановлено збільшення рівня креатиніну у групі 3 (КС від нативної культури клітин) на 20,3% (рис. 5.8.,  $p = 0,02$ ) порівняно з інтактними щурами.



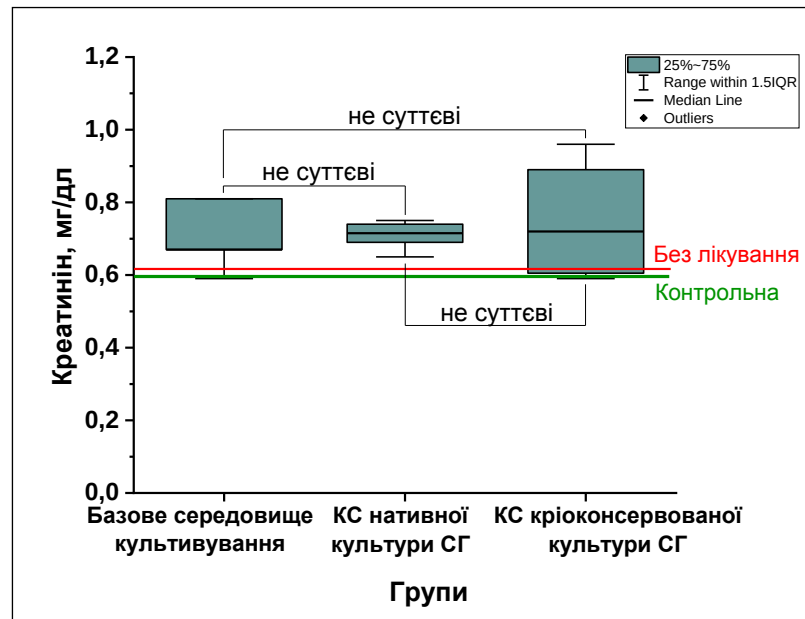


Рис. 5.8. Зміна рівня креатиніну крові у відповідь на використання БСК, КС нативної культури СГ і КС кріоконсервованої культури СГ після інфравезикальної обструкції. Відмінності статистично не значущі у порівнянні між групами 2, 3 та 4 ( $p > 0,05$ ). Відмінності статистично значущі у порівнянні між групами 3 та 7 інтактними щурами ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, на 56-ту добу після моделювання ІВО та зняття лігатури у тварин без лікування спостерігалось статистично значуще збільшення маси тіла, проте рівні загального білку, сечовини та креатиніну не відрізнялися від інтактних тварин. Це свідчило про розвиток компенсаторних реакцій у вигляді підвищення скоротливої функції СМ (більш частішого випорожнення) з метою зниження гідростатичного тиску у сечовивідних шляхах та поліпшення ниркової функції. З цього випливало також можливе збільшення екскреції білків, сечовини та креатиніну на тлі ІВО.

Спираючись на те, що нами не було встановлено значущих відмінностей у показниках сечовини, можна відзначити, що введення використаних БАК не має нефротоксичного впливу у щурів з ІВО. Проте зростання рівню креатиніну при введенні кріоекстракту і КС від нативної культури, можливо, вказує на стимуляцію процесів синтезу м'язів. Відомо, що зміни рівня креатиніну

напряму залежать від маси тіла щурів. А саме найвищі показники маси спостерігалися у тварин груп 1 (введення кріоекстракту) і 3 (КС від нативної культури). У протилежність цьому, КС від кріоконсервованої культури не чинив статистично значущого впливу на рівень креатиніну.

### **Висновки до розділу 5**

1. При експериментальній ІВО у щурів приріст маси тіла був найбільш вираженим у групі введення кріоекстракта СГ.
2. Введення БАК, отриманих з СГ, стимулювало синтез білка, який зазвичай знижується при ІВО внаслідок розвитку протеїнурії і збільшення катаболічних процесів при обструктивній уропатії і нирковій недостатності.
3. Використання всіх БАК не викликало підвищення рівнів сечовини в крові, а значить не приводило до нефротоксичних ефектів. При цьому спостерігалася тенденція зниження рівнів сечовини у груп, яким вводилися БАК, при порівнянні з тваринами без лікування.
4. Застосування КС від культури кріоконсервованих МГ не підвищувало рівнів креатиніну в крові на відміну від інших БАК, що демонструє відсутність значного впливу на основні шляхи метаболізму креатиніну при обструктивній уропатії, яка обумовлена ІВО. Це дає можливість застосування цих КС, які містять НФ, при порушенні ниркової функції.

Основні положення цього розділу викладено у публікаціях автора [26, 27, 29].

## РОЗДІЛ 6

### УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз робіт попередніх авторів, в яких вивчався вплив БАК, отриманих зі СГ, на морфофункціональні показники СМ експериментальних тварин і людини з ІВО, показав наявність незначної кількості досліджень з цієї тематики [195, 196]. В основному в більшості наукових робіт застосовувалися стовбурові клітини з метою тканинної інженерії [197, 198], вивчався вплив підвищеної скоротливості СМ і ендогенних НФ, факторів росту на морфологію і функцію сечовивідних шляхів [199, 200, 201, 202, 203], вплив високого гідростатичного тиску на різні культури клітин [204], роль НФ при нейродегенеративних захворюваннях [135, 147].

Нами було зроблено припущення, що можна поліпшити скоротливу функцію СМ за рахунок відновлення іннервації стінки при застосуванні секретомів від культур клітин нейрального походження. Одним з джерел для отримання культури є спінальні ганглії, які містять ці типи клітин периферичної нервової системи. В попередніх дослідженнях, проведених у відділі кріоендокринології, було отримано первинну культуру нейробластоподібних клітин з наднирників новонароджених поросят [21], яка має здібність до формування прикріплених та флотуючих цитосфер. В подальших роботах було розроблено режими кріоконсервування таких клітин у вигляді суспензії та цитосфер [22, 23]. В теперішній час проводяться наукові роботи по культивуванню та кріоконсервуванню культури клітин спінальних гангліїв (СГ) та отриманню безклітинних середовищ, які містять НФ [24, 25].

Однак, на теперішній час не було зроблено спроби застосування культури клітин СГ, секретомів та інших біопродуктів для відновлення рецепторного пула СМ та покращення його скоротливості при ІВО. З цією метою було отримано БАК двох наступних типів. Кріоекстракт СГ містить біологічно-активні сполуки від усіх клітин ганглію (нейронів, шванівських

клітин, мантийних гліоцитів, фібробластів). КС від культури клітин СГ являє собою в основному секретом мантийних гліоцитів, оскільки у використаних умовах культивування вони є основним типом клітин у культурі.

Основними характерними ознаками патологічних змін СМ у відповідь на ІВО є порушення кровообігу, ішемія клітин, гіпертрофія детрузора, можливе виникнення запалювальних процесів. Одним з наслідків структурно-функціональної перебудови клітинних шарів є втрата рецепторного апарата та денервація стінки міхура, яка може сягати більш 50% при цьому патологічному стані з наступним погіршенням або втратою скоротливої функції СМ [9, 10, 11]. У зв'язку з цим нами було обрано ці показники для аналізу структурно-функціональних особливостей СМ після моделювання ІВО та на фоні введення БАК.

Відомо, що завдяки гіпертрофії гладеньких м'язів і змінами в позаклітинному матриксі, збільшується маса СМ [74, 205]. Еквівалентом її може бути відносна маса СМ або масовий коефіцієнт.

Було виявлено, що у щурів, яким вводилися кріоекстракт СГ і КС, отримане від кріоконсервованої культури клітин СГ, були встановлені найбільш виражений приріст маси тіла, найменші показники ваги МП і масового коефіцієнта.

Встановлено збільшення відносної маси СМ у щурів груп 2, 3, 5, 6 на 30, 47,5, 42,5 і 50% відповідно (рис. 4.1., рис. 4.16.,  $p = 7,1E-04$ ,  $p = 0,005$ ,  $p = 0,003$ ,  $p = 7,8E-04$  відповідно) порівняно з контролем. При цьому даний показник у групах 1 та 4 статистично значуще не відрізнявся від інтактних щурів (рис. 4.1., рис. 4.16.,  $p > 0,05$ ). Масові коефіцієнти були пропорційні масі ІС СМ у всіх досліджуваних групах тварин.

Відомо, що у відповідь на ІВО розвивається гіпертрофія СМ, яка стає більш вираженою за тривалої обструкції [63, 87]. У дослідженні ми вивчали початковий (компенсаторний) – період обструкції 1,5 місяці, якому властиве початкове збільшення маси СМ і більш низькі показники САД у відповідь на стимуляцію агоністами порівняно з контрольними тваринами [206].

Далі було проведене оцінювання функціональних характеристик СМ щурів з моделлю ІВО після впливу БАК. У тварин, яким вводилися кріоекстракт СГ і КС, отримане від кріоконсервованої культури клітин СГ, було встановлено найбільше підвищення скорочувальної активності і максимальної амплітуди скорочень СМ у відповідь на різні стимули.

Встановлено, що значення активної напруги ІС на тлі КСІ-індукованої СА співпадало із силою м'язових скорочень. Даний показник збільшувався у щурів групи 2 у 7,6 раза, групи 3 – 6,5 раза, групи 4 – 4 рази, групи 5 – 3 рази (рис. 4.25., рис. 4.8.,  $p = 0,037$ ;  $p = 0,0006$ ;  $p = 0,016$ ;  $p = 0,04$  відповідно) порівняно з контролем. Активна напруга ІС в групах 3 і 4 збільшувалася в 3,8 і 2,3 раза відповідно порівняно з групою 6 (рис. 4.25.,  $p = 0,002$ ;  $p = 0,04$  відповідно).

За даними деяких авторів скоротлива реакція ІС СМ щурів у відповідь на різні подразники буває значно зниженою, особливо з обструкцією СМ важкого ступеня [207, 208]. Однак було встановлено випадки вираженого посилення СА у відповідь на КСІ-стимуляцію на тлі ІВО, що може бути ознакою денерваційної надчутливості [81, 85]. Результати нашого дослідження показали збільшення КСІ-індукованої СА у тварин всіх груп, які отримували БАК, крім групи 1 (введення кріоекстракту) порівняно з контролем. При цьому СА у тварин груп 3 (введення КС від нативної культури клітин СГ) і 4 (введення кріоконсервованої культури клітин СГ) була статистично вищою, ніж у групі 6 (без лікування).

Одержані результати вказують на можливий вплив БАК на процеси КСІ-індукованої СА, пов'язаною з деполяризацією мембран гладких клітин детрузора, і збереження механізму скорочувальної здатності гладких м'язів СМ. Встановлений нами факт підтверджується даними інших авторів [81, 85, 209].

Відомо, що стимуляція М-холінорецепторів є основним рецепторним механізмом скорочення СМ у ссавців [205, 210], який реалізується холінергічними нейротрансмітерами, зокрема ацетилхоліном. Індукція

«Пілокарпіном», який є агоністом М-холінорецепторів, дозволяє вивчити рецепторний шлях скорочення СМ.

У наших експериментах збільшувалася активна напруга пілокарпін-індукованого м'язового скорочення ІС СМ тільки у тварин групи 1 (введення кріоекстракту СГ) і групи 4 (застосування КС кріоконсервованої культури СГ) у 2,5 і 4,5 рази (рис. 4.9., рис. 4.26.,  $p = 0,036$ ;  $p = 0,008$  відповідно) порівняно з контролем. Цікаво, що активна напруга у відповідь на стимуляцію агоністом у тварин, які не отримували лікування, була меншою та становила 7,6 (0; 8,6) проти 10,8 (7,8; 21,5) відповідно (рис. 3.11.,  $p = 0,027$ ) порівняно з контрольною групою. При цьому у щурів групи 4 вона збільшувалася в 5,6 рази порівняно з групою 6 (рис. 4.26.,  $p = 0,018$ ).

Відомо, що чутливість ІС СМ щурів із ІВО до дії агоністів М-холінорецепторів значно нижча, ніж у здорових. Існує пряма кореляція між вираженістю порушеної функції СМ і цим процесом [76, 207, 211]. Досліджена нами пілокарпін-індукована СА розподілялася в групах тварин у порядку збільшення: група 5 (введення «Кортексіну») – 15 мН; група 6 (тварини без лікування) – 18,3 мН; група 7 (контроль) – 22,2 мН; група 2 (застосування БСК) – 40 мН; група 3 (застосування КС від нативної культури клітин СГ) – 45,6 мН; група 1 (введення кріоекстракту СГ) – 56,6 мН і група 4 (введення КС від кріоконсервованої культури клітин СГ) – 101,2 мН.

Показники пілокарпін-індукованої активної напруги ІС СМ були вищими у тварин після індукції КС від кріоконсервованої культури клітин СГ порівняно з введенням кріоекстракту СГ.

Одержані результати свідчать про позитивний вплив БАК, отриманих із СГ, на СА, яка опосередкована стимуляцією М-холінорецепторів.

Показники медіани МАС ІС СМ в групах 1 – 373,2 (366,0; 451,1) і 4 – 355,3 (337,8; 405,7) були вище, ніж в інших експериментальних групах (рис. 4.10., рис. 4.28., відповідно).

Таким чином, значення скорочувальної активності СМ, яке співпадало з контрольним, було отримано після застосування БСК і КС від нативної

культури клітин СГ. У тварин з введенням кріоекстракту СГ і КС від кріоконсервованої культури клітин СГ воно було вище контрольного. Крім того, у тварин даних груп встановлено виражену відповідь ІС СМ на різні стимули і зафіксовано найвищі показники МАС. Вірогідно, ці ефекти обумовлені дією НФ, які надходять із СГ та від культури клітин СГ після кріоконсервування і відігріву. Доведено, що після впливу низьких температур змінюється співвідношення морфологічних типів клітин, тобто й виробка ними НФ [212]. Одержані результати вказують на вплив БАК на скоротливість, який реалізується нервово-м'язовим апаратом СМ.

Вже відомо, що у початковому періоді ІВО з'являються стійкі високоамплітудні скорочення для адекватного спорожнення СМ, які призводять до зміни структури і фізіології органу [64, 87]. В нижніх сечових шляхах у нервових закінченнях і в не нейрональних структурах, наприклад, перехідноклітинному епітелії відбувається експресія численних НФ.

Внаслідок ІВО підвищене механічне напруження СМ стимулює вивільнення НФ та інших факторів росту клітинами гладеньких м'язів детрузора і перехідноклітинного епітелію, фібробласти, а також тазовими гангліями [195, 213]. У свою чергу НФ опосередковують гіпертрофію клітин гладеньких м'язів, гіперплазію перехідноклітинного епітелію і сполучної тканини [214, 215]. У той же час деякі НФ можуть бути як мітогенами, так і інгібіторами зростання в залежності від типу клітин та стану диференціювання [216, 217]. Різні типи факторів росту і НФ можуть експресувати один одного в тканинах СМ [199]. Якщо причини ІВО усунені, ці структурні і функціональні порушення змінюються в зворотному напрямку. Збільшений СМ регресує в розмірі і вазі до нормальних значень. Відбувається зменшення об'єму гіпертрофованих клітин гладеньких м'язів, так і зміна клітинної структури і складових елементів перехідноклітинного епітелію і сполучної тканини, а також прискорюється процеси природньої загибелі клітин. У той час апоптозу клітин гладеньких м'язів детрузора може не спостерігатися [204, 218]. У роботі

визначено характер впливу НФ і інших факторів росту, що вводяться ззовні, на морфологічні показники СМ самок щурів з ІВО.

Вираженого впливу екзогенних НФ на гіперплазію перехідного епітелію при експериментальній ІВО не відзначалося. Встановлено низькі показники медіани середньої висоти перехідного епітелію в групі кріоекстракту СГ - 11,8 (7,4; 18,4) проти інтактних тварин - 15,6 (9,4; 21,1) відповідно (рис. 4.4.,  $p = 0,024$ ).

Відомо, що перехідноклітинний епітелій характеризується одним з найнижчих (3-6 місяців) показників поновлення клітинного складу серед епітеліальних тканин ссавців. У відповідь на травму або запалення перехідноклітинний епітелій проявляє підвищення здатності до оновлення протягом 24-48 годин. В цьому процесі головну роль відіграють НФ та інші фактори росту, які запускають проліферацію епітеліальних клітин [144, 219, 220, 221]. Однак існують роботи, в яких показано відсутність впливу НФ на гіперплазію перехідноклітинного епітелію [201, 202, 205].

У дослідженні середня висота перехідноклітинного епітелію наближалася до контрольних показників у всіх групах, які отримували БАК. Але відсутність значущих відмінностей між цими групами і 6-ю (без лікування) дозволяє стверджувати відсутність вираженого впливу екзогенних НФ на проліферацію епітелію уротеліального типу. Отримані зміни швидше за все були отримані завдяки підвищенню гідростатичного тиску внаслідок ІВО, що характеризувалося обопільним посиленням як проліферації, так і апоптозу епітеліальних клітин [204].

Введення БСК, секретомів нативної культури клітин СГ та препарату «Кортексін» стимулювало регресію збільшеного в розмірі детрузора СМ до контрольних показників, товщина якого зазвичай підвищується при ІВО. У той же час застосування кріоекстракту СГ та КС кріоконсервованої культури клітин СГ, демонструвало позитивний вплив на гіпертрофію детрузора, імовірно за рахунок додаткових ростових факторів, статистично значуще



збільшуючи медіану до 309,6 (253,0; 402,8) і 371,2 (259,8; 428,3) відповідно порівняно з інтактними щурами 261,3 (216,3; 326,4).

Роботи багатьох авторів довели, що вже на початковій стадії ІВО виникає компенсаторна гіпертрофія гладеньких м'язів СМ, які самі починають продукувати НФ [74, 93, 144, 216]. НФ регулюють ріст клітин і диференціювання гладеньких м'язів перехідноклітинного епітелію і детрузора СМ в нормальних і патологічних умовах. Ріст і розвиток гладеньких м'язів СМ може регулюватися не тільки впливом НФ, але й розтягуванням, внаслідок надлишкових скорочень, спричинених ІВО. [12, 201, 222]. Незважаючи на це, кількість доказів впливу НФ на гладенькі м'язи детрузора і на їх гіпертрофію обмежена [202]. НФ, які покращують регенерацію периферичних нервів, можуть чинити негативний вплив на відновлення і розвиток м'язів після їх пошкодження, так як погіршують утворення нервово-м'язових з'єднань і викликають виснаження процесів розвитку міобластів [147].

Встановлено, що товщина м'язового шару в групі 3 (КС нативної культури клітин СГ) - 260,7 (212,9; 264,8) і 5 («Кортексін») - 264,8 (242,7; 319,2) статистично значуще наближалися до контрольних показників - 261,3 (216,3; 326,4). Групи із застосуванням НФ, отриманих шляхом використання низьких температур, демонстрували гіпертрофію детрузора, подібну до групи 6 (без лікування). У той же час у всіх групах, які отримували БАК, крім 4-ї (КС кріоконсервованої культури клітин СГ) відзначалася регресія збільшених в розмірах м'язових шарів СМ. Наші дослідження підтвердили різнобічне впливу НФ на ріст, диференціювання і апоптоз клітин гладеньких м'язів слизової і детрузора СМ [133, 199, 203, 204, 216, 217, 218].

Відомо, що внаслідок ІВО відбувається збільшення товщини стінки СМ за рахунок усіх тканинних шарів, а також змінюється позаклітинний матрикс за рахунок посилення синтезу колагену [74, 205, 220]. НФ можуть брати участь в гіпертрофічному процесі. НФ є багатофункціональними факторами росту з мітогенною активністю в фібробластах і ендотеліальних клітинах. Рівні цих біологічно активних речовин зростають під час стадії компенсації і

знижуються при декомпенсації ІВО. Більш за все відбувається проліферація гладеньких м'язів детрузора і сполучної тканини, ніж перехідноклітинного епітелію, який має властивості самостійно продукувати різні фактори росту і НФ [201, 215]. Найбільш помітні зміни на початковій стадії ІВО відбуваються у сполучній тканині стінки СМ, яка має властивості каркасу [216]. Збільшення синтезу дезоксирибонуклеїнової кислоти і колагену в усіх тканинах СМ у відповідь на підвищення гідростатичного тиску внаслідок ІВО і на вплив НФ призводить до потовщення стінки органу [144, 195, 200, 216, 223]. Після усунення ІВО відбувається зменшення клітинної структури і складу елементів перехідноклітинного епітелію і сполучної тканини, а також прискорюється апоптоз клітин. Ці явища запрограмованої загибелі клітин спостерігаються як в епітелію уротеліального типу, так і в сполучній тканині. У той час апоптозу клітин гладеньких м'язів детрузора не спостерігалось [218]. НФ та різні фактори росту можуть пригнічувати проліферацію сполучної тканини і гальмувати фіброз стінки СМ [199]. БАК, які продукуються різними типами клітин, наприклад, активованими лімфоцитами, макрофагами, а також клітинами ендотелію, епітелію і сполучної тканини модулюють функцію величезної більшості клітин організму, включаючи клітини нервової системи. Вони також можуть впливати на доставку інших НФ і ростових факторів до клітин-мішеней [133]. Нами було знайдено невелику кількість наукових робіт, які доводять відсутність впливу НФ на структуру сполучної тканини і на проліферацію її клітин внаслідок ІВО.

Застосування БСК та КС нативної культури клітин СГ впливало на проліферацію сполучної тканини. Виявлено зменшення товщини стінки СМ до 471,1 (348,8; 570,6) та 480,7 (386,8; 609,8) відповідно, проти 568,0 (500,8; 651,1) у групі 6.

Ймовірно, в даному випадку це можна пояснити переважним впливом НФ на апоптоз або подальшу диференціацію клітин шарів СМ, ніж на їх проліферацію [133, 199, 203, 204, 216, 217, 218].

На відміну від вищенаведених результатів встановлено збільшення загальної товщини стінки СМ за рахунок сполучнотканинного компонента у групах з ІВО, які отримували кріоекстракт і КС кріоконсервованої культури СГ, в порівнянні з контролем та статистично значимої різниці від показників 6-ї групи (без лікування). З нашої точки зору, це є підтвердженням впливу НФ на підсилення проліферації сполучної тканини.

Результати нинішнього дослідження ймовірно були отримані нами в зв'язку з тим, що НФ опосередковують гіпертрофію гладких клітин, гіперплазію перехідноклітинного епітелію і сполучної тканини [12, 173]. У той же час різні типи факторів росту і НФ можуть бути як мітогенами, так і інгібіторами зростання в залежності від типу клітин та стану клітинної диференціювання, а також можуть експресувати один одного в тканинах СМ [15, 180, 198]. Показовими також отримані індекси м'язовий шар/стінка СМ, які мають доведену ефективність у виявленні гіпертрофії стінки СМ внаслідок ІВО [200]. Виходячи з вищесказаного можна припустити, що в перспективі доцільно застосування НФ, отриманих з СГ і від культури МГ за допомогою впливу низьких температур, в зв'язку з їх широким спектром дії на морфологічні та функціональні властивості СМ. Це можливо завдяки тому, що після кріоконсервування змінюється співвідношення морфологічних типів клітин, тобто і вироблення ними НФ [201]. У той же час застосування нейротрофічних препаратів, таких як «Кортексин», менш виправдано у зв'язку з їх переважною дією в основному тільки на ЦНС. Наші дослідження підтвердили різнобічне впливу НФ нарівні з підвищеним гідростатичним тиском внаслідок ІВО на ріст, диференціювання і апоптоз клітин гладких м'язів перехідноклітинний епітелію і детрузора СМ [180, 219, 224].

Неодноразово робилися спроби запропонувати прості розрахункові показники, що дозволяють виявляти патологічні зміни СМ. Одними з них є індекси співвідношення. Підвищення співвідношення м'язовий шар/стінка СМ може бути пов'язано з гіпертрофією детрузора або посиленням синтезу колагену, які є наслідками ІВО [225, 226, 227]. Збільшення середньої товщини

стілки СМ пов'язане з найбільшим потовщенням м'язового шару на тлі ІВО. Існують повідомлення про феномен взаємозв'язку між зменшенням індексу м'язовий шар/стілка СМ та відновленням функцій СМ. Незважаючи на принципові відмінності у науковій літературі, вимірювання цього індексу має доведену ефективність у виявленні гіпертрофії стінки СМ внаслідок ІВО [228, 229, 230].

Досліджені нами індекси м'язовий шар/стілка МП були розподілені у зростаючому числовому ряду (%): застосування КС нативної культури клітин СГ (група 3) (0,54), застосування препарату «Кортексін» (група 5) (0,54), група інтактних щурів (0,61), застосування КС кріоконсервованої культури клітин СГ (група 4) (0,61), застосування кріоекстракта СГ (група 1) (0,62) і тварини без лікування (0,65).

Таким чином було встановлено, що БАК, отримані з СГ, впливають на індекси співвідношення м'язовий шару/стілка СМ, опосередковані ІВО, у бік зниження значення медіани у середньому на 11,6%.

Інфравезікальна обструкція спричиняє денервацію, яка призводить до зростання маси СМ, характерних змін скоротливої активності і морфології. Відмічається зростання кількості і об'єму гладеньких м'язів міхура на тлі зменшення щільності нервових закінчень та скоротливих білків в тканині органу [231]. Ці зміни демонструють виникнення процесу ремоделювання СМ за участю декількох клітинних компартментів, а саме перехідноклітинного епітелію, власної пластинки слизової, гладеньких м'язів детрузора, сполучної тканини і нейронів [87].

Білок S 100 активно впливає на функції нервової системи, процеси відновлення і регенерації тканин, запалення, перебіг інфекцій та зростання і диференціювання клітин [232]. S 100-позитивні нейрональні структури і нерви присутні в тканинах СМ [233].

Гладеньком'язові клітини СМ містять скоротливі білки (міозин і актин) та білки, що регулюють їхню взаємодію у відповідь на нейроендокринну стимуляцію. Ці клітини також синтезують більшу частину позаклітинного

матриксу, що оточує їх в тканині СМ. Окрім того, гладеньком'язові клітини беруть участь в ремоделюванні СМ при багатьох станах, які впливають на функції органу [234].

Гіпертрофія гладеньких м'язів СМ, яка виникає внаслідок ІВО, може бути пов'язана з коливанням кількості різних ізоформ актину, як у бік збільшення/зменшення, так і взагалі відсутності усіляких змін. Скорочення гладеньких м'язів СМ ініціюється збільшенням концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазмі гладеньком'язових клітин. [235, 236].

Актин являє собою один з компонентів скорочувального апарату і цитоскелету гладеньком'язових клітин. Функціонально він бере участь в скороченні м'язів і інших видах рухливості в клітинах. Актин в гладеньких м'язах СМ накопичується в умовах, коли виникає стресове збільшення механічної роботи, як наслідок збільшується м'язова маса органу. Таким чином гіпертрофія гладеньких м'язів СМ може бути пов'язана зі зміною складу скоротливих білків [237, 238].

Актин використовується у якості маркеру для міобластів і гладеньком'язових клітин. Гіпертрофічні м'язи СМ на тлі ІВО експресують підвищений рівень актину в порівнянні з нормальними тканинами. Достатній рівень актину виявляється необхідною умовою для генерації нормальної сили скорочення СМ [239, 240].

Нейротрофічні фактори або подібні до них біологічно активні речовини запобігають загибелі нервових клітин на ранній стадії ІВО та збільшують щільність нервів у тканині СМ, а також обмежують вираженість гіпертрофії детрузора. Таким чином уповільнюється розвиток функціональної декомпенсації органу при довготривалому перебігу обструкції [241].

Встановлено низькі показники медіани відносної площі експресії білку S 100 та актину в групі 6 (без лікування) - 0,4 (0,07; 1,04) і 4,9 (2,3; 9,3) проти інтактних тварин - 3,3 (1,7; 6,7) і 46,3 (39,7; 53,1) відповідно (рис. 3.18.,  $p < 0,05$ ). На відміну від цього виявлено зростання медіани відносної площі експресії білку S 100 у групі з введенням кріоекстракта СГ (група 1) порівняно

з контролем. Вищезазначений показник в групах 1 (введення кріоекстракта СГ) - 19,0 (13,6; 23,6) і 3 (КС нативної культури клітин СГ) - 4,2 (3,2; 5,5) був значимо вищим, ніж у щурів з ІВО без лікування (рис. 4.14., рис. 4.31.,  $p < 0,05$ ). Встановлено вищі показники медіани відносної площі експресії білку актину в групах 1 (введення кріоекстракта СГ) - 14,6 (14,1; 16,6), 3 (КС нативної культури клітин СГ) - 23,2 (17,1; 26,9) і 4 (КС кріоконсервованої культури клітин СГ) - 23,1 (18,9; 27,1) порівняно зі щурами з ІВО без лікування (рис. 4.14., рис. 4.31.,  $p < 0,05$ ). Але цей показник у вищезазначених груп був меншим ніж у інтактних тварин. Таким чином було встановлено, що БАК, отримані зі СГ, впливають на експресію білків S 100 та актину у тканині СМ щурів на тлі ІВО, що полягає у зміні морфологічних і функціональних показників міхура.

Ниркова недостатність, як наслідок ОУ, на пізніх стадіях захворювання може бути пов'язана з втратою ваги у дорослих і зі значною затримкою розвитку у дітей [242]. У своїй роботі ми досліджували початковий період ОУ (1,5 місяці), який за даними деяких авторів не призводить до стійких порушень метаболізму і НН [206]. Було показано, що застосування НФ може покращувати розвиток у щурів зі зниженою нирковою масою і підвищувати чутливість до інших ростових факторів [243]. Снижение скорости увеличения массы тела было нечувствительным критерием при выявлении повреждения почек [244].

Прогресування ННФ при ОУ зменшує швидкість клубочкової фільтрації і збільшує катаболізм білка, що приводить до втрати білка через нирки, погіршуючи перебіг НН [151]. Протеїнурія може бути викликана підвищенням фільтрації, яка зазвичай спостерігається при втраті функціонуючих нефронів, що в свою чергу призводить до зниження рівня загального білка крові на пізніх стадіях НН [121].

Застосування СК, і в більшій мірі безклітинних КС, можуть зменшувати протеїнурію і посилювати анаболізм білка у тварин в експерименті [152].

У дослідженні виявлене підвищення рівня загального білка при використанні безклітинних КС і кріоекстракта СГ, що містять НФ, підтверджують вищенаведені факти. Зниження ж цього показника в 5-й групі («Кортексін») в порівнянні з 6-ї (без лікування) найімовірніше пов'язано зі ступенем вираженості ОУ і відсутністю терапевтичного ефекту. На відміну від цього, медіани значення рівня загального білка були високі у групи 1 - 98,8 (91,9; 104,8), групи 3 - 73,9 (72,4; 76,4), групи 4 - 84,7 (77,0; 89,2). Ці зміни відбувалися завдяки впливу НФ на анаболічні процеси в організмі щурів, що раніше було підтверджено науковими роботами [242, 245].

Сечовина крові є кінцевим продуктом катаболізму амінокислот або білків, які виробляються печінкою і розподіляються через кровообіг, а потім фільтруються ниркою. Рівні сечовини в плазмі чутливі до екстраренальних впливів. Визначення рівня сечовини в крові використовується для виявлення зниження функції нирок, яке може відбуватися і при нормальних показниках сечовини [101]. Сечовина і креатинін виводяться нирковими клубочками, але тільки сечовина може дифундувати через клітинні мембрани і реабсорбуватися з каналців. Кількість реабсорбованої сечовини визначається швидкістю потоку ультрафільтрату уздовж структур нефрона [246]. Коли швидкість сповільнюється, більше сечовини реабсорбується і швидкість екскреції падає [114]. Підвищення рівнів креатинін і азоту сечовини крові зазвичай з'являються на пізніх етапах розвитку НН [107]. Сечовина використовується для визначення нефротоксичного профілю ксенобіотиків [154]. Існують наукові праці, в яких у початковому періоді ОУ не було виявлено змін рівнів сечовини або креатиніну в сироватці крові [247]. Таким чином виходячи з цього, не можна покладатися на рівні сечовини в сироватці крові, як на ознаку пошкодження нирок у щурів [244]. Є повідомлення, що НФ беруть участь в опосередкуванні зростання, диференціації, виживання і/або відновлення епітеліальних клітин ниркових каналців і процесах регуляції нирками кислотно-лужного стану [248, 249]. Так само НФ і інші ростові фактори знижують рівні сечовини за рахунок зниження її синтезу, а не за рахунок

поліпшення ниркової функції [242, 245]. Для ПФ найбільш важливими є сечовина в плазмі і виміряна ШКФ [154]. ОУ індукує не тільки шкідливі молекули, але також молекули з протилежними захисними ефектами, в ролі яких можуть бути НФ [250].

У роботі даних про вплив БАК, що містять НФ, на підвищення вмісту сечовини в крові щурів з ІВО знайдено не було.

Різниця в рівнях сечовини крові у всіх групах була статистично незначуща (таблиця 5.1,  $p > 0,05$ ). Цікаво, що найвищий показник виявлено у тварин групи 6 (без лікування)

Креатинін - це речовина, що утворюється в крові в ході метаболізму азотистих сполук. При цьому він в основному фільтрується і мало реабсорбується в нирках, тому рівень його екскреції з сечею прямо пропорційний рівню клубочкової фільтрації. У багатьох наукових працях показано, що суттєвих коливань концентрації креатиніну в плазмі крові щурів не відбувається. Як правило, він є стабільним показником, величиною якого можна знехтувати [117, 251]. Креатинін є результатом катаболізму скелетних м'язів і виводиться через нирки [101, 109, 121, 252, 253, 254]. Зниження функції нирок може підвищити рівень креатиніну в крові в результаті порушення його екскреції [255]. У той же час, коливання рівня креатиніну не обов'язково вказує на погіршення ШКФ і НН, а може бути наслідком особливостей харчування і змін м'язової маси [246, 256, 257]. Однак, підвищені рівні креатиніну в сироватці виявляються у половини всіх хворих з ІВО [258]. Існують наукові праці, в яких було показано, що у щурів на ранній стадії ОУ підвищення рівня креатиніну не відбувалося [103, 113]. У той же час ряд авторів показали, що при уремії на тлі НН екзогенні ростові фактори не знижували рівнів креатиніну в крові, незважаючи на ефективність цих методів в подоланні затримки розвитку організму, пов'язаної з НН [248]. За іншими нечисленним даними, терапія стволовими клітинами знижувала розвиток і прогресування експериментальної хронічної НН, що було підтверджено показниками ниркової функції, які зазвичай використовуються в клініці, в тому числі рівнем



креатиніну, проявами ниркового інтерстиціального фіброзу, ступенем зниження ШКФ [103, 114, 120, 152, 242]. Багато авторів відзначають, що оцінювання впливу терапії СК і безклітинними КС, що містять НФ, на хронічний обструктивний фіброз нирки і НН раніше не проводилося [154, 247, 248, 250]. Утворення креатиніну пропорційне масі скелетних м'язів. Якщо організм втрачає або набирає багато м'язів, концентрація креатиніну в сироватці змінюється незалежно від ШКФ. Рівняння, що використовуються для оцінки ШКФ, враховують канальцеву секрецію креатиніну [114, 259]. Деякі науковці стверджують, що при застосуванні НФ та ростових факторів відбувається зменшення екскреції креатиніну з сечею. Але це може бути витлумачено як вказівку на зменшення м'язової маси тіла, оскільки на екскрецію креатиніну впливають зміни розміру пулу креатину в м'язах. В протилежність цьому інші автори підтверджують гіпотезу, що при НН екскреція креатиніну не пропорційна м'язовій масі. Швидше, зниження екскреції креатиніну при НН відбувається через збільшення втрат іншими шляхами, наприклад, через метаболізм в кишківнику або через зменшення кількості креатиніну, оскільки один з етапів біосинтезу креатиніну відбувається в нирці. [245, 250].

У нашому дослідженні рівні креатиніну крові зростали у всіх групах, які отримували БАК, крім 4-ї (введення КС кріоконсервованої культури клітин СГ), в порівнянні з контролем. При цьому креатинін в групах з введенням кріоекстракта СГ (група 1), БСК (група 2) і КС нативної культури клітин СГ (група 3) був значимо вищим, ніж у щурів без лікування (група 6). Цікаво, що дані зміни залежали від маси тіла щурів з ІВО, яким вводилися БАК з НФ при порівнянні з контролем. У той же час цього не спостерігалось при порівнянні з щурами без лікування (група 6) при відсутності різниці в масі між останніми і контролем.

Все вищезазначене вказує на вплив БАК, отриманих з СГ, на рівні креатиніну щурів з ІВО, що може бути пов'язано з дією інших факторів, а не нейротрофінів. Отже, якщо ми хочемо уникнути побічних ефектів, що

впливають на рівні креатиніну, то необхідно застосовувати КС від культури кріоконсервованих МГ.

Таким чином, у роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення на доклінічному етапі актуальної наукової проблеми медицини, а саме кріомедицини і урології – подолання та корекція наслідків інфравезикальної обструкції в експерименті шляхом використання біологічно активних композицій, отриманих з спінальних гангліїв та їх тканинних культури за допомогою кріотехнологій.

Встановлено позитивний вплив нейротрофічних факторів, які містяться у кріоекстракті та секретах нативної/кріоконсервованої культур клітин СГ на морфологічні характеристики та уродинамічні показники СМ при ІВО у щурів. Визначено, що кріоконсервування впливає на характер біологічної активності секретомів культури клітин СГ. При цьому введення КС кріоконсервованої культури виявилось більш ефективним для корегування наслідків ІВО, ніж КС нативної культури.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукового завдання, спрямованого на корекцію наслідків інфравезікальної обструкції та активацію процесів, які сприяють відновленню структурно-функціональних властивостей та реіннервації сечового міхура за рахунок введення біологічно активних композицій з нейротрофічними факторами, отриманих зі спінальних гангліїв (кріоекстракт, кондиційовані середовища від нативної та кріоконсервованої культури клітин).

1. Моделювання інфравезікальної обструкції на самках щурів призводить до збільшення у 1,5 раза відносної маси сечового міхура за рахунок підвищення товщини м'язового шару (на 37,3%) і зростання індексу співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура (на 6,5%) порівняно з інтактними тваринами, а також до різкого зменшення відносної площі гладеньком'язових (у 9,4 раза) та нервових (у 8,2 раза) клітин, визначених за експресією маркерів актину та S 100. Вищевказані гістологічні перебудови сечового міхура на тлі інфравезікальної обструкції негативно впливають на рівень його скоротливої активності, що проявляється у зниженні пілокарпін-індукованої активної напруги (у 1,4 раза) та максимальної амплітуди скорочення (у 2,5 раза), а також збільшенні KCl-індукованої активної напруги (у 1,7 раза).

2. Використання біологічно активних композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, в цілому сприяло нормалізації маси та гістоморфологічних показників сечового міхура у тварин, підданих моделюванню інфравезікальної обструкції. Встановлено статистично значуще зниження індекса співвідношення м'язовий шар/стінка сечового міхура на 5,5 та 17,01% після введення кріоекстракту та кондиційованого середовища нативної культури клітин спінальних гангліїв; товщини м'язового шару на 13,7 та 27,3% після введення кріоекстракту та

кондиційованого середовища нативної культури клітин спінальних гангліїв; відносної маси сечового міхура у 1,7 і 1,5 раза після введення кріоекстракту та кондиційованого середовища кріоконсервованої культури спінальних гангліїв порівняно з тваринами без лікування.

3. Використання біологічно активних композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, сприяло відновленню скоротливої активності сечового міхура у тварин, підданих моделюванню інфравезикальної обструкції. Встановлено статистично значуще зростання пілокарпін-індукованої активної напруги у 3,6, 2,9 та 6,5 раза після введення кріоекстракту, кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин; збільшення максимальної амплітуди скорочення у 2,8 та 2,7 раза після введення кріоекстракту та кондиційованого середовища кріоконсервованої культури; підвищення KCl-індукованої активної напруги у 5,2 і 3,2 раза після введення кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин порівняно з тваринами без лікування.

4. Застосування біологічно активних композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, сприяло зростанню відносної площі експресії білку S 100 та актину у тканині сечового міхура тварин з інфравезикальною обструкцією, що свідчило про їх стимулюючий вплив на процеси реінервації та ремоделювання органу. Встановлено статистично значуще збільшення відносної площі експресії білку S 100 у 47,5 та 10,5 раза після введення кріоекстракта та кондиційованого середовища нативної культури клітин; білку актину у 3, 4,7 та 4,7 раза після введення кріоекстракту та кондиційованих середовищ нативної і кріоконсервованої культур клітин порівняно з тваринами без лікування.

5. Введення препарату «Кортексін» статистично значуще не впливало на масу, гістоморфологічні показники та скоротливу активність сечового міхура у щурів з інфравезикальною обструкцією. Відсутність ефекту вказує на особливості механізму дії препарату, які полягають у більшій спорідненості до центральної нервової системи ніж до периферичної.

6. Використання усіх біологічно активних композицій (кріоекстракту, кондиційованих середовищ нативної та кріоконсервованої культур клітин), отриманих зі спінальних гангліїв, а також препарату «Кортексін», не впливало на масу тварин та рівень сечовини крові після перенесеної інфравезікальної обструкції, а значить не приводило до нефротоксичних ефектів. Введення кріоекстракту спінальних гангліїв статистично значуще підвищувало рівень загального білка на 35,1% та креатиніну на 30,6% на фоні збільшення маси щурів, що може свідчити про стимуляцію анаболічних процесів.

## ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

В результаті розв'язання поставлених в роботі завдань отримані нові дані щодо використання біологічно активних композицій зі спінальних гангліїв з метою нейротрофічної стимуляції для лікування порушень уродинаміки, зокрема викликаних інфравезікальною обструкцією. На підставі одержаних даних встановлено ефективність використання безклітинних кріоекстракту, а також секретомів від нативних та кріоконсервованих культур клітин зі спінальних гангліїв, для стимуляції реіннервації та відновлення структури і функцій сечового міхура після перенесеної інфравезікальної обструкції.

Наведені результати можна використовувати як теоретичне підґрунтя для розробки підходів до лікування захворювань та патологічних станів, обумовлених різними типами обструкції сечового міхура. Практичні результати, одержані при моделюванні інфравезікальної обструкції та за умов введення біологічно активних композицій, які описують особливості патогістологічної перебудови сечового міхура, а також зміни його скоротливої активності, можуть бути використані для курсів лекцій і практичних занять студентів вищих навчальних закладів медичного та біологічного профілю.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Patel ND, Parsons JK. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian J Urol*. 2014; 30: 170–6.
2. Reddy SVK, Shaik AB. Non-invasive evaluation of bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia: a clinical correlation study. *Arab Journal of Urology* [Internet]. Informa UK Limited; 2019 Sep 9; 17 (4): 259–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/2090598x.2019.1660071>
3. Бойко АІ, Шмуліченко ОВ. Pathophysiological changes in the bladder outlet obstruction due benign prostatic hyperplasia in patients with metabolic syndrome. *Health of Man* [Internet]. Professional Event, LLC; 2016 Jan 13; 4 (59): 26–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.30841/2307-5090.4\(59\).2016.104183](http://dx.doi.org/10.30841/2307-5090.4(59).2016.104183)
4. Parsons JK. Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary tract symptoms: epidemiology and risk factors. *Current Bladder Dysfunction Reports* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2010 Sep 7; 5 (4): 212–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11884-010-0067-2>
5. Goldman HB, Zimmern PE. The treatment of female bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2006; 98 (Suppl 1): 17–23.
6. Lin C-D, Kuo H-C, Yang SS-D. Diagnosis and management of bladder outlet obstruction in women. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms* [Internet]. Wiley; 2015 Mar 26; 8 (1): 30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/luts.12094>
7. Vasavada S. Iatrogenic female bladder outlet obstruction. *Interpretation of Basic and Advanced Urodynamics* [Internet]. Springer International Publishing; 2016 Dec 21; 89–92. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-43247-2\\_10](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-43247-2_10)
8. Malde S, Solomon E, Spilotros M, Mukhtar B, Pakzad M, Hamid R, et al. Female bladder outlet obstruction: Common symptoms masking an uncommon

cause. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms [Internet]. Wiley; 2017 Oct 9; 11 (1): 72–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/luts.12196>

9. Cumming JA, Chisholm GD. Changes in detrusor innervation with relief of outflow tract obstruction. *British Journal of Urology* [Internet]. Wiley; 1992 Jan; 69(1):7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.1992.tb15448.x>

10. Gosling JA, Gilpin SA, Dixon JS, Gilpin CJ. Decrease in the autonomic innervation of human detrusor muscle in outflow obstruction. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1986 Aug; 136 (2): 501–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)44930-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)44930-5)

11. Nyirady P, Thiruchelvam N, Fry CH, Godley ML, Winyard PJD, Peebles DM, et al. Effects of in utero bladder outflow obstruction on fetal sheep detrusor contractility, compliance and innervation. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2002 Oct; 168 (4 Part 1): 1615–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(05\)64530-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(05)64530-2)

12. Adamowicz J, Juszczak K, Bajek A, Tworkiewicz J, Nowacki M, Marszałek A, et al. Morphological and urodynamic evaluation of urinary bladder wall regeneration: muscles guarantee contraction but not proper function-a rat model research study. *Transplantation proceedings*. 2012; 44 (5): 1429–34. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.01.144>

13. Drewa T. Using hair-follicle stem cells for urinary bladder-wall regeneration. *Regen Med*. 2008 Nov; 3(6):939-44. doi: 10.2217/17460751.3.6.939.

14. Kim JH, Lee SR, Song YS, Lee HJ. Stem cell therapy in bladder dysfunction: where are we? And where do we have to go? *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 930713. doi: 10.1155/2013/930713.

15. Hansebout CR, Su C, Reddy K, et al. Enteric glia mediate neuronal outgrowth through release of neurotrophic factors. *Neural Regen Res*. 2012; 7 (28): 2165–75. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2012.028.001

16. Collazos-Castro JE, García-Rama C, Alves-Sampaio A. Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized



electroconducting microfibers. *Acta Biomater.* 2016; 35: 42–56. doi:10.1016/j.actbio.2016.02.023

17. Milosevic J, Storch A, Schwarz J. Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem cells* [Internet]. Wiley; 2005 May; 23 (5): 681–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2004-0135>.

18. Tan FC, Lee KH, Gouk SS, et al. Optimization of cryopreservation of stem cells cultured as neurospheres: comparison between vitrification, slow-cooling and rapid cooling freezing protocols. *Cryo Letters.* 2007; 28 (6): 445–60.

19. Chong YK, Toh TB, Zaiden N, et al. Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme. *Stem Cells.* 2009; 27 (1): 29–39. doi:10.1634/stemcells.2008-0009

20. Meneghel J, Kilbride P, Morris GJ. Cryopreservation as a key element in the successful delivery of cell-based therapies—a review. *Frontiers in Medicine* [Internet]. Frontiers Media SA; 2020 Nov 26;7. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2020.592242>

21. Sidorenko OS, Bozhok GA, Legach EI, Bondarenko TP. Morphological and functional features of newborn piglets adrenal cells during culturing. *Eastern European Scientific Journal.* 2014; 2: 11–9. DOI 10.12851/EESJ201404ART02

22. Bozhok GA, Sidorenko OS, Plaksina EM, Gurina TM, Sukach AN, Kholodnyy VS, et al. Neural differentiation potential of sympathoadrenal progenitors derived from fresh and cryopreserved neonatal porcine adrenal glands. *Cryobiology* [Internet]. Elsevier BV; 2016 Oct; 73 (2): 152–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.08.006>

23. Plaksina EM, Sidorenko OC, Bozhok GA. Cryopreservation of multicellular spheroids derived from newborn piglet adrenal glands. *Probl Cryobiol Cryomed* [Internet]. 2017 Dec. 23 [cited 2021 Mar. 17]; 27 (4): 322–33. Available from: <http://cryo.org.ua/journal/index.php/probl-cryobiol-cryomed/article/view/1353>

24. Алі С, Сидоренко О, Божок Г. Вплив складу живильного середовища на морфологічні характеристики культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2018; 30 (30): 49–59. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2018-30-6>

25. Ali SG, Kovalenko IF, Bozhok GA. Some phenotypic characteristics of the dorsal root ganglia cell culture of neonatal piglets. Bulletin of Problems Biology and Medicine [Internet]. Ukrainian Medical Stomatological Academy; 2019; 3(152): 46. Available from: <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2019-3-152-46-50>

26. Глоба ВЮ, Бондаренко ТП, Божок ГА, Самбург ЯЮ, Легач ЄІ. Зміна скоротливої активності детрузора щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (2): 188–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.15407/cryo30.02.188>

27. Глоба ВЮ, Самбург ЯЮ, Божок ГА, Легач ЄІ. Біохімічні показники крові щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Медицина невідкладних станів. 2020; 16 (4): 115–120. doi: <http://dx.doi.org/10.22141/2224-0586.16.4.2020.207940>

28. Globa VYu, Bozhok GA, Legach EI. Morphological parameters of bladder rats with infravesical obstruction with the introduction of biologically active compositions. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2020; 8: 327–333. DOI:10.17265/2328-2150/2020.11.001

29. Глоба ВЮ, Легач ЄІ, Глоба ДВ, Глоба ТО, Свірепо ПВ. Експериментальна модель інфравезикальної обструкції: якій віддати перевагу? Медичний форум. 2020; 21 (21): 12–14. Available from: [http://www.medicinelviv.org.ua/archive/2020/21\\_2020.pdf](http://www.medicinelviv.org.ua/archive/2020/21_2020.pdf)

30. Глоба ВЮ. Сократительная активность и патоморфологические особенности детрузора крыс с моделью инфравезикальной обструкции. In:

Foltynek T, editor. The development of medical sciences: problems and solutions; 2018 April 27 – 28; Brno, Czech Republic. Brno: Izdevnieciba «Baltija Publishing»; 2018. p. 106–9.

31. Глоба ВЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Влияние кондиционированной среды от культуры мантийных глиоцитов на структурно-функциональные характеристики детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. В: Готье СВ, редактор. IX Всероссийский съезд трансплантологов; 2018 сентября 17–19; Москва, Российская Федерация. Москва: ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова" Минздрава России; 2018. с. 167.

32. Глоба ВЮ, Рудык ДЮ, Али СГ, Божок ГА, Легач ЕИ. Сократительная активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией после введения «Кортексина» и биологически активных продуктов культуры мантийных глиоцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 172.

33. Глоба ВЮ, Божок ГА, Легач ЕИ. Влияние кортексина на сократительную активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини; 2018 червня 22–23; Львів, Україна. Львів: ГО «Львівська медична спільнота»; 2018. с. 90–1.

34. Глоба ВЮ. Морфологічні особливості сечового міхура щурів з моделлю інфравезикальної обструкції. In: Zielinski M, editor. Prospects for the development of medicine in EU countries and Ukraine; 2018 December 21–22; Wloclawek, Republic of Poland. Wloclawek: Izdevnieciba «Baltija Publishing»; 2018. p. 106–9.

35. Глоба ВЮ, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Биологическая подвижность мочевого пузыря крыс с инфравезикальной обструкцией. В: Удальцов СН, редактор. XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологическая подвижность»; 2019 мая 17–19; Пущино,

Российская Федерация. Пущино: Товарищество научных изданий КМК; 2019. с. 82–4.

36. Глоба ВЮ, Божок ГА, Глоба ДВ, Дунаєва ОВ, Легач ЄІ. Вікові особливості скорочувальної активності детрузора щурів. *Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання*; 2019 квітня 12–13; Дніпро, Україна. Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2019. с. 6–8.

37. GlobaVYu, Bondarenko TP, Ali SG, Bozhok GA, Legach EI. Contractile activity of detrusor of rats with infravesical obstruction after introduced cryoextract of spinal ganglia and biologically active products of mantle gliocyte culture. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019; 29 (2): 164.

38. Глоба ВЮ, Бондаренко ТП, Легач ЄІ. Вплив біологічно активних продуктів культури мантійних гліоцитів на морфологічні показники сечового міхура щурів з інфравезикальною обструкцією. In: Sibirny AA, editor. 6-й з`їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом; 2019 червня 18–21; Яремче, Україна. Яремче: ФОП Стадник СО; 2019. с. 54.

39. Miftahof RN, Nam HG. *Biomechanics of the human urinary bladder*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-36146-3>

40. Miftahof R. The urinary bladder. *Soft Biological Shells in Bioengineering* [Internet]. IOP Publishing; 2019 Jul; Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/2053-2563/ab1a9ech14>

41. Zhang Y, Atala A. *Regenerative medicine of the bladder*. *Principles of Regenerative Medicine* [Internet]. Elsevier; 2019; 1263–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809880-6.00072-2>

42. Stoffel JT, Dray EV, editors. *Urological care for patients with progressive neurological conditions*. Springer International Publishing; 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-23277-1>

43. Chapple CR, Steers WD, editors. *Practical Urology: Essential Principles and Practice*. Springer London; 2011; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-84882-034-0>

44. Hansel DE, McKenney JK, Stephenson AJ, Chang SS, editors. The Urinary Tract. Springer New York; 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5320-8>
45. Пасечніков СП, Возіанов СО, Лісовий ВМ, та ін. Урологія: підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів ІУ рівня акредитації. Вид. 2-ге, випр. і доповн. Вінниця: Нова книга; 2015. 432 с.
46. De Groat WC, Yoshimura N. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Handb Clin Neurol*. 2015; 130: 61–108. DOI: 10.1016/B978-0-444-63247-0.00005-5
47. Chapple CR, Steers WD, Evans CP, editors. Urologic Principles and Practice. Springer International Publishing; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-28599-9>
48. Andersson K-E, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* [Internet]. American Physiological Society; 2004 Jul; 84 (3): 935–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00038.2003>
49. Pouw M. Urinary bladder: normal anatomy. *Essential Radiology Review* [Internet]. Springer International Publishing; 2019; 341–2. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-26044-6\\_109](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-26044-6_109)
50. Liao L, Madersbacher H, editors. *Neurourology*. Springer Netherlands; 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-7509-0>
51. Corcos J, Przydacz M. *Consultation in Neurourology*. Springer International Publishing; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-63910-9>
52. Mangera A, Osman NI, Chapple CR. Anatomy of the lower urinary tract. *Surgery (Oxford)* [Internet]. Elsevier BV; 2013 Jul; 31 (7): 319–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.04.013>
53. Patel AK, Chapple CR. Anatomy of the lower urinary tract. *Surgery (Oxford)* [Internet]. Elsevier BV; 2008 Apr; 26 (4): 127–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2008.03.011>

54. Thomas D. Embryology. The Scientific Basis of Urology, Third Edition [Internet]. CRC Press; 2010 Jul 26; 438–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/9781841847498-30>
55. Cartwright PC. Congenital anomalies of the urinary bladder. Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract [Internet]. Springer International Publishing; 2016;175–95. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29219-9\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-29219-9_9)
56. Carlson BM. Urogenital system. Human Embryology and Developmental Biology [Internet]. Elsevier; 2014; 376–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-4557-2794-0.00016-4>
57. Johnston A, Eylert MF, Amer T, Aboumarzouk OM. Embryology for the urologist. Blandy's Urology [Internet]. Wiley; 2019 Feb 27; 49–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118863343.ch3>
58. Cheng L, Lopez-Beltran A, Bostwick DG. Bladder Pathology. John Wiley & Sons, Inc.; 2012 Jun 15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118275436>
59. Ruchelli ED, Huff DS. Urinary bladder. Color Atlas of Human Fetal and Neonatal Histology [Internet]. Springer International Publishing; 2019; 125–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-11425-1\\_9](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-11425-1_9)
60. Treuting PM, Kowalewska J. Urinary system. Comparative Anatomy and Histology [Internet]. Elsevier; 2012;229–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-381361-9.00016-0>
61. Rehfeld A, Nylander M, Karnov K. Compendium of histology. Springer International Publishing; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-41873-5>
62. Juan YS, Chuang SM, Jang MY, et al. Basic research in bladder outlet obstruction. Incon Pelvic Floor Dysfunct [Internet]. 2011 [Cited 2019 Oct 24]; 5 (1): 1–6. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/0d7e/fc7092fb5ae4336-f9852ffa060634683172a.pdf>.

63. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, Kato K, Wein AJ. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *The Prostate* [Internet]. Wiley; 1990; 17 (S3): 9–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/pros.2990170503>
64. Wein AJ, Andersson K-E, Drake MJ, Dmochowski RR, editors. Bladder dysfunction in the adult. *Current Clinical Urology* [Internet]. Springer New York; 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0853-0>
65. Reynard J, Brewster SF, Biers S, Neal NL. Bladder outlet obstruction. *Oxford Handbook of Urology* [Internet]. Oxford University Press; 2019 Feb; 71–128. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/med/9780198783480.003.0004>
66. Biers S, Armenakas N, Lamb A, Mark S, Reynard J, Sullivan M, et al. Bladder outlet obstruction and transurethral surgery. *Urological Surgery* [Internet]. Oxford University Press; 2020 Feb; 95–174. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/med/9780198769880.003.0003>
67. Drake M, Mevcha A. Etiology and management of urinary retention in women. *Indian Journal of Urology* [Internet]. Medknow; 2010; 26 (2): 230. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/0970-1591.65396>
68. Juma S. Urinary retention in women. *Current Opinion in Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2014 Jul; 24 (4): 375–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/mou.0000000000000071>
69. Walt CLE, Jansen van Vuuren SP, Heyns CF. Urinary retention in women: Causes and management. *African Journal of Urology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2010 Mar; 16 (1): 7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12301-010-0002-y>
70. Dmochowski RR. Bladder outlet obstruction: etiology and evaluation. *Reviews in Urology*. 2005; 7 (S6): 3–13.
71. Bhat A, Bothra R, Bhat MP, Chaudhary GR, Saran RK, Saxena G. Congenital bladder diverticulum presenting as bladder outlet obstruction in infants and children. *J Pediatr Urol*. 2012; 8 (4):348–53. doi:10.1016/j.jpuirol.2011.07.001

72. Minevich E, Sheldon CA. Reconstruction of the bladder and bladder outlet. *Pediatric Surgery* [Internet]. Elsevier; 2012; 1467–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-07255-7.00117-3>
73. Tambo FFM, Tolefac PN, Ngowe MN, Minkande JZ, Mbouche L, Guemkam G, et al. Posterior urethral valves: 10 years audit of epidemiologic, diagnostic and therapeutic aspects in Yaoundé gynaeco-obstetric and paediatric hospital. *BMC Urol*. 2018 May 21; 18 (1): 46. doi: 10.1186/s12894-018-0364-1.
74. Lin WY, Wu CF, Chen CS. Partial bladder outlet obstruction: bladder dysfunction and related issues in animal studies. *Urol Sci*. 2010; 21 (2): 70–4.
75. Wein AJ. Voiding function and dysfunction. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1989 Sep; 142 (3): 905–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38940-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38940-1)
76. Sezginer EK, Yilmaz-Oral D, Lokman U, et al. Effects of varying degrees of partial bladder outlet obstruction on urinary bladder function of rats: A novel link to inflammation, oxidative stress and hypoxia. *Low Urin Tract Symptoms* [Internet]. Wiley; 2017 Dec 28; 11 (2): 193–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/luts.12211>
77. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* [Internet]. 2014 [Cited 2019 Oct 22]; 55 (2): 81–90. Available from: <https://doi.org/10.4111/kju.2014.55.2.81>.
78. Asafu Adjaye Frimpong G, Aboagye E, Asafu-Adjaye Frimpong A. Diagnostic potential of imaging modalities in the assessment of lower urinary tract dysfunctions. *Lower Urinary Tract Dysfunction - From Evidence to Clinical Practice* [Internet]. IntechOpen; 2020 Apr 22; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86934>
79. Zderic SA, editor. Muscle, matrix, and bladder function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer US; 1995. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1585-6>



80. Levin RM, Haugaard N, Levin SS, Buttyan R, Chen M-W, Monson FC, et al. Bladder function in experimental outlet obstruction: pharmacologic responses to alterations in innervation, energetics, calcium mobilization, and genetics. *Muscle, Matrix, and Bladder Function* [Internet]. Springer US; 1995; 7–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1585-6\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1585-6_3)
81. Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, Dixon JS, Gilpin SA, Gosling JA. Bladder outflow obstruction—a cause of denervation supersensitivity. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1987 Dec; 138 (6): 1461–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)43675-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)43675-5)
82. Mattiasson A, Ekstrom J, Larsson B, Uvelius B. Changes in the nervous control of the rat urinary bladder induced by outflow obstruction. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 1987; 6 (1): 37–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.1930060106>
83. Gabella G, Uvelius B. Structural changes in the rat bladder after acute outlet obstruction. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* [Internet]. Informa UK Limited; 1999 Jan; 33 (201): 32–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/003655999750042123>
84. Levin RM, Ruggieri MR, Velagapudi S, Gordon D, Altman B, Wein AJ. Relevance of spontaneous activity to urinary bladder function: an in vitro and in vivo study. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1986 Aug; 136 (2): 517–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)44934-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)44934-2)
85. Milicic I, Buckner SA, Daza A, Coghlan M, Fey TA, Brune ME, et al. Pharmacological characterization of urinary bladder smooth muscle contractility following partial bladder outlet obstruction in pigs. *European Journal of Pharmacology* [Internet]. Elsevier BV; 2006 Feb; 532 (1-2): 107–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.076>
86. Levin RM, Xia L, Wei W, Schuler C, Leggett RE, Lin AD-Y. Effects of *Ganoderma Lucidum* shell-broken spore on oxidative stress of the rabbit urinary bladder using an in vivo model of ischemia/reperfusion. *Molecular and Cellular*

Biochemistry [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2017 May 8; 435 (1-2): 25–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-3053-6>

87. Fusco F, Creta M, De Nunzio C, Iacovelli V, Mangiapia F, Li Marzi V, et al. Progressive bladder remodeling due to bladder outlet obstruction: a systematic review of morphological and molecular evidences in humans. BMC Urology [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2018 Mar 9; 18 (1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12894-018-0329-4>

88. Tammela TLJ, Wein AJ, Levin RM. Effect of tetrodotoxin on the phasic and tonic responses of isolated rabbit urinary bladder smooth muscle to field stimulation. Journal of Urology [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1992 Dec; 148 (6): 1937–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)37088-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)37088-x)

89. Kato K, Wein AJ, Kitada S, Haugaard N, Levin RM. The functional effect of mild outlet obstruction on the rabbit urinary bladder. Journal of Urology [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1988 Oct; 140 (4): 880–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)41849-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(17)41849-0)

90. Chapple CR, Milner P, Moss HE, Burnstock G. Loss of sensory neuropeptides in the obstructed human bladder. British Journal of Urology [Internet]. Wiley; 1992 Oct; 70(4):373–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.1992.tb15791.x>

91. Chapple CR. Pathophysiological changes in the obstructed bladder. Prostatic Obstruction [Internet]. Springer London; 1994; 43–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4471-1866-4\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4471-1866-4_4)

92. Lin ATL, Juan Y-S. Ischemia, hypoxia and oxidative stress in bladder outlet obstruction and bladder overdistention injury. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms [Internet]. Wiley; 2012 Mar; 4: 27–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-5672.2011.00134.x>

93. Steers WD, Kolbeck S, Creedon D, Tuttle JB. Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. Journal of

Clinical Investigation [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 1991 Nov 1; 88 (5): 1709–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/jci115488>

94. Steers WD, Tuttle JB. Mechanisms of disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nature Clinical Practice Urology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2006 Feb; 3 (2): 101–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncpuro0408>

95. Yoshida S, Orimoto N, Tsukihara H, Noma T, Hakozaki A, Sasaki E. TAC-302 promotes neurite outgrowth of isolated peripheral neurons and prevents bladder denervation related bladder dysfunctions following bladder outlet obstruction in rats. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2017 Jul 26; 37 (2): 681–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.23375>

96. Zeng J, Xie K, Jiang C, Mo J, Lindstrom S. Bladder mechanoreceptor changes after artificial bladder outlet obstruction in the anesthetized rat. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2011 Oct 28; 31 (1): 178–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.21219>

97. Sutherland RS, Baskin LS, Kogan BA, Cunha G. Neuroanatomical changes in the rat bladder after bladder outlet obstruction. *BJU International* [Internet]. Wiley; 1998 Dec; 82 (6): 895–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-410x.1998.00873.x>

98. Harrison SCW, Hunnam GR, Farman P, Ferguson DR, Doyle PT. Bladder instability and denervation in patients with bladder outflow obstruction. *British Journal of Urology* [Internet]. Wiley; 1987 Dec; 60 (6): 519–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.1987.tb05033.x>

99. Lluel P, Duquenne C, Martin D. Experimental bladder instability following bladder outlet obstruction in the female rat. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1998 Dec; 160 (6 Part 1): 2253–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(01\)62305-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(01)62305-x)

100. Ekman M, Zhu B, Swärd K, Uvelius B. Neurite outgrowth in cultured mouse pelvic ganglia - Effects of neurotrophins and bladder tissue. *Autonomic*

Neuroscience [Internet]. Elsevier BV; 2017 Jul; 205: 41–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2017.03.004>

101. Zamzami Z. Blood urea and creatinine levels in obstructive uropathy patients due to benign prostate hyperplasia after transurethral resection of the prostate. *International Journal of Surgery and Medicine* [Internet]. ScopeMed Publishing; 2019; (0): 1. Available from: <http://dx.doi.org/10.5455/ijsm.recovery-of-kidney-function-two-weeks-after-transurethral-resection-of-the-prostate>

102. Reynard J, Brewster S, Biers S. *Oxford Handbook of Urology*. Oxford University Press; 2013 Feb; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/med/9780199696130.001.0001>

103. Tucci Jr S, Molina CAF, Cassini MF, de Andrade MF, de Lima GJ, Martins ACP. Chronic partial urethral obstruction in female rats: description of an experimental model and initial results. *Acta Cirurgica Brasileira* [Internet]. FapUNIFESP (SciELO); 2011; 26 (suppl 2): 111–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502011000800020>

104. O'Reilly PH, Jamison MH. Practical aspects of the management of lower urinary tract obstruction. *Obstructive Uropathy* [Internet]. Springer London; 1986; 299–320. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4471-1380-5\\_13](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4471-1380-5_13)

105. Wilson DR, Wilson DDR. Pathophysiology of obstructive nephropathy. *Kidney International* [Internet]. Elsevier BV; 1980 Sep; 18 (3): 281–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1980.138>

106. Klahr S. Pathophysiology of obstructive nephropathy. *Nephrology* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 1991; 77–93. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-35158-1\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-35158-1_5)

107. Mukamel E, Nissenkorn I, Boner G, Servadio C. Occult progressive renal damage in the elderly male due to benign prostatic hypertrophy. *Journal of the American Geriatrics Society* [Internet]. Wiley; 1979 Sep; 27 (9): 403–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.1979.tb01676.x>

108. Tseng TY, Stoller ML. Obstructive Uropathy. Clinics in Geriatric Medicine [Internet]. Elsevier BV; 2009 Aug; 25 (3): 437–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cger.2009.06.003>
109. Iqbal S, Raiz I, Faiz I. Bilateral hydroureteronephrosis with a hypertrophied, trabeculated urinary bladder. Malaysian Journal of Medical Sciences [Internet]. Penerbit Universiti Sains Malaysia; 2017; 24 (2): 106–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.21315/mjms2017.24.2.14>
110. Танахо Э, редактор. Урология по Дональду Смиту. Серия «Классика современной медицины» № 4. Пер. с англ.—М., Практика; 2005. 819 с.
111. Chevalier RL. Molecular and cellular pathophysiology of obstructive nephropathy. Pediatric Nephrology [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1999 Aug 20; 13 (7): 612–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s004670050756>
112. Chevalier RL. Pathogenesis of renal injury in obstructive uropathy. Current Opinion in Pediatrics [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2006 Apr; 18 (2): 153–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.mop.0000193287.56528.a4>
113. Zhang Z-H, He J-Q, Qin W-W, Zhao Y-Y, Tan N-H. Biomarkers of obstructive nephropathy using a metabolomics approach in rat. Chemico-Biological Interactions [Internet]. Elsevier BV; 2018 Dec; 296: 229–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.004>
114. Rayner HC, Thomas M, Milford D. Understanding Kidney Diseases. Springer International Publishing; 2016; p. 300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23458-8>
115. Speakman MJ, Cheng X. Management of the complications of BPH/BOO. Indian J Urol [serial online] 2014 [cited 2020 Jan 9]; 30: 208–13. Available from: <http://www.indianjurol.com/text.asp?2014/30/2/208/127856>
116. Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobé G, Connor J, O'Toole KM, et al. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during

the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992 Apr; 140 (4): 831–8. PMID: 1562048; PMCID: PMC1886381.

117. Emeigh Hart SG. Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [Internet]. Elsevier BV; 2005 Jul; 52 (1): 30–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2005.04.006>

118. Klahr S, Morrison A, Buerkert J. Effects of urinary tract obstruction on renal function. *Contributions to Nephrology* [Internet]. S. Karger AG; 1980; 20: 34–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000389997>

119. Liu Z-R, Chen S-Q, Zou Y-W, Wu X-Y, Li H-Y, Wang X-Q, et al. Hypochlorite modified albumins promote cell death in the tubule interstitium in rats via mitochondrial damage in obstructive nephropathy and the protective effects of antioxidant peptides. *Free Radical Research* [Internet]. Informa UK Limited; 2018 May 4; 52 (5): 616–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10715762.2018.1457789>

120. Oka M, Sekiya S, Sakiyama R, Shimizu T, Nitta K. Hepatocyte growth factor–secreting mesothelial cell sheets suppress progressive fibrosis in a rat model of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. American Society of Nephrology (ASN); 2019 Jan 11; 30 (2): 261–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1681/asn.2018050556>

121. Lin S, Lian D, Liu W, Haig A, Lobb I, Hijazi A, et al. Daily therapy with a slow-releasing H<sub>2</sub>S donor GYY4137 enables early functional recovery and ameliorates renal injury associated with urinary obstruction. *Nitric Oxide* [Internet]. Elsevier BV; 2018 Jun; 76: 16–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2018.03.002>

122. Chaabane W, Praddaude F, Buleon M, Jaafar A, Vallet M, Rischmann P, et al. Renal functional decline and glomerulotubular injury are arrested but not restored by release of unilateral ureteral obstruction (UUO). *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2013 Feb 15; 304 (4): 432–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00425.2012>

123. Ruiz E, Ferraris J. 25 years of live related renal transplantation in children: The Buenos Aires experience. *Indian Journal of Urology* [Internet]. Medknow; 2007; 23 (4): 443. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/0970-1591.36720>
124. Кирпатовский ВИ, Кудрявцев ЮВ, Мудрая ИС, Белик СМ, Хромов РА. Гетерогенность морфологических и функциональных изменений разных отделов мочевого пузыря крыс при инфравезикальной обструкции мочевых путей. *Бюл. экспер. биол. мед.* 2009; 147 (1): 108–112.
125. Choo MS, Piao S, Oh S-J. The preventive effect of a free radical scavenger on oxidative stress after the relief of partial bladder outlet obstruction in a rat model. Rosier PFWM, editor. *PLOS ONE* [Internet]. Public Library of Science (PLoS); 2018 Oct 22; 13 (10): e0199800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0199800>
126. Andersson K-E, Soler R, Fullhase C. Rodent models for urodynamic investigation. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2011 Jun; 30 (5): 636–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.21108>
127. Fry C. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* [Internet]. Elsevier BV; 2004 May; 49 (3): 201–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.03.002>
128. Jabr RI, Fry CH. Animal models of lower urinary tract dysfunction. *Animal Models for the Study of Human Disease* [Internet]. Elsevier; 2013; 461–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-415894-8.00020-8>
129. McMurray G, Casey JH, Naylor AM. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. Wiley; 2006 Feb; 147 (S2): 62–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706630>
130. Gomazkov OA. Neurotrophins: The therapeutic potential and concept of minipeptides. *Neurochemical Journal* [Internet]. Pleiades Publishing Ltd; 2012 Jul; 6 (3): 163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1134/s1819712412030075>

131. Gomazkov OA, Afanasiev VV, Rumyantseva SA, Stupin VA, Silina EV, Sokhova OA. Current concepts of neurocytoprotective therapy. *Neuroscience and Behavioral Physiology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2013 Mar; 43 (3): 374–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11055-013-9743-y>
132. Леви-Монтальчини Р. Факторы роста нервов и тканей. *Международный неврологический журнал* [Интернет]. 2012 [цитировано 2019 окт. 28]; 3(49):29728. Доступно на: <http://www.mif-ua.com/archive/article/29728>
133. Гомазков ОА. Нейротрофические факторы мозга. Справочно-информационное издание [Интернет]. Москва: НИИ Биомедицинской химии РАМН; 2004 [цитировано 2019 окт. 28]. 311 с. Доступно на: <https://www.booksmed.com/biologiya/2166>
134. Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1994 Nov; 372 (6503): 266–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/372266a0>
135. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. Humana Press; 2012; 1–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_1)
136. Chaves RS, Melo TQ, D'Unhao AM, Farizatto KL, Ferrari MF. Dynein c1h1, dynactin and syntaphilin expression in brain areas related to neurodegenerative diseases following exposure to rotenone. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013; 73 (4): 541–56. PMID: 24457644.
137. Collazos-Castro JE, García-Rama C, Alves-Sampaio A. Glial progenitor cell migration promotes CNS axon growth on functionalized electroconducting microfibers. *Acta Biomaterialia* [Internet]. Elsevier BV; 2016 Apr; 35: 42–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.02.023>
138. Erickson JT, Brosenitsch TA, Katz DM. Brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor are required simultaneously



for survival of dopaminergic primary sensory neurons in vivo. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. Society for Neuroscience; 2001 Jan 15; 21 (2): 581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-02-00581.2001>

139. Poyhonen S, Er S, Domanskyi A, Airavaara M. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: expression and properties in neurodegeneration and injury. *Frontiers in Physiology* [Internet]. Frontiers Media SA; 2019 Apr 26; 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.00486>

140. Bennett DLH, Boucher TJ, Armanini MP, Poulsen KT, Michael GJ, Priestley JV, et al. The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. Society for Neuroscience; 2000 Jan 1; 20(1): 427–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.20-01-00427.2000>

141. Boyd J. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Experimental Neurology* [Internet]. Elsevier BV; 2003 Oct; 183 (2): 610–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00183-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00183-3)

142. Arévalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2006 May 15; 63 (13): 1523–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6010-1>

143. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *Journal of Anatomy* [Internet]. Wiley; 1999 Jan; 194 (1): 1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19410001.x>

144. Cruz CD. Neurotrophins in bladder function: What do we know and where do we go from here? *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2013 Jun 17; 33 (1): 39–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.22438>

145. Cui Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Molecular Neurobiology* [Internet].

Springer Science and Business Media LLC; 2006; 33 (2): 155–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/mn:33:2:155>

146. Keast JR, Smith-Anttila CJA, Osborne PB. Developing a functional urinary bladder: a neuronal context. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. Frontiers Media SA; 2015 Sep 1; 3. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2015.00053>

147. Gill BC, Balog BM, Dissaranan C, Jiang H-H, Steward JB, Lin DL, et al. Neurotrophin therapy improves recovery of the neuromuscular continence mechanism following simulated birth injury in rats. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2012 May 11; 32 (1): 82–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.22264>

148. Kuhn HG. Control of cell survival in adult mammalian neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory; 2015 Oct 28; a018895. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a018895>

149. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology* [Internet]. Wiley; 2006 Apr 5; 9 (2): 313–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00229.x>

150. Yu L, Ding Y, Spencer A, Ma J, Lu R, Rudkin BB, Yuan C. Dorsal root ganglion progenitors differentiate to gamma-aminobutyric acid- and choline acetyltransferase-positive neurons. *Neural Regen Res*. 2012 Mar 5; 7 (7): 485–91. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.07.001. PMID: 25745432; PMCID: PMC4348992.

151. Huang D, Yi Z, He X, Mo S, Dang X, Wu X. Distribution of infused umbilical cord mesenchymal stem cells in a rat model of renal interstitial fibrosis. *Renal Failure* [Internet]. Informa UK Limited; 2013 Jul 23; 35 (8): 1146–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/0886022x.2013.815109>

152. Papazova DA, Oosterhuis NR, Gremmels H, van Koppen A, Joles JA, Verhaar MC. Cell-based therapies for experimental chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Disease Models & Mechanisms* [Internet].

The Company of Biologists; 2015 Jan 29; 8 (3): 281–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.017699>

153. Sugandhi N, Srinivas M, Agarwala S, Gupta DK, Sharma S, Sinha A, et al. Effect of stem cells on renal recovery in rat model of partial unilateral upper ureteric obstruction. *Pediatric Surgery International* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2013 Dec 27; 30 (2): 233–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00383-013-3456-8>

154. Asanuma H, Vanderbrink BA, Campbell MT, Hile KL, Zhang H, Meldrum DR, et al. Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. *Journal of Surgical Research* [Internet]. Elsevier BV; 2011 Jun; 168(1): e51–e59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2010.06.022>

155. Lawson SN. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons, in: A.S. Scott (Ed.), *Sensory Neurons, Diversity, Development and Plasticity*, Oxford University Press, New York, 1992, 27– 59.

156. Wang C, Koh H, Ramakrishna S, Liao S. Nerve tissue regeneration. *Electrospinning for Tissue Regeneration* [Internet]. Elsevier; 2011; 168–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857092915.2.168>

157. Zhou F-Q, Wang R-Y, Gao Y, Hu Y-W, Duan R-S, Yang S-G. Time course analysis of sensory axon regeneration in vivo by directly tracing regenerating axons. *Neural Regeneration Research* [Internet]. Medknow; 2020; 15 (6): 1160–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.270315>

158. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005; 48 (3), 457–476. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.09.001

159. Gu Y, Chen Y, Zhang X, Li GW, Wang C and Huang LY. Neuronal soma-satellite glial cell interactions in sensory ganglia and the participation of purinergic receptors. *Neuron Glia Biol.* 2010; 6 (1): 53–62. doi: 10.1017/S1740925X10000116

160. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells*. 2007; 25 (8): 2053–65. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0080
161. Svenningsen AF, Colman DR, Pedraza L. Satellite cells of dorsal root ganglia are multipotential glial precursors. *Exp Neurol*. 2004; 196 (1): 85–93. doi: 10.1017/S1740925X04000110
162. Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, et al. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth promoting activities. *J Neurosci Res*. 1995; 41: 279–90. <https://doi.org/10.1002/jnr.490410215>
163. Enes J, Haburčák M, Sona S, Gerard N, Mitchell AC, Fu W, et al. Satellite glial cells modulate cholinergic transmission between sympathetic neurons. Blum R, editor. *PLOS ONE* [Internet]. Public Library of Science (PLoS); 2020 Feb 4; 15(2): e0218643. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0218643>
164. Chao T, Pham K, Steward O, Gupta R. Chronic nerve compression injury induces a phenotypic switch of neurons within the dorsal root ganglia. *The Journal of Comparative Neurology* [Internet]. Wiley; 2007; 506 (2): 180–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21537>
165. Bär KJ, F. Saldanha GJ, Kennedy AJ, Facer P, Birch R, Carlstedt T, et al. GDNF and its receptor component Ret in injured human nerves and dorsal root ganglia. *NeuroReport* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1998 Jan; 9 (1): 43–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199801050-00009>
166. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D. Human dorsal root ganglia. *Front Cell Neurosci*. 2019 Jun 19; 13: 271. doi: 10.3389/fncel.2019.00271. PMID: 31293388; PMCID: PMC6598622.
167. Elsayy M, de Mel A. Biofabrication and biomaterials for urinary tract reconstruction. *Research and Reports in Urology* [Internet]. Informa UK Limited; 2017 May; Volume 9:79–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/rru.s127209>

168. Zou Q, Fu Q. Tissue engineering for urinary tract reconstruction and repair: Progress and prospect in China. *Asian Journal of Urology* [Internet]. Elsevier BV; 2018 Apr;5(2):57–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.010>
169. Chapple CR, Milner P, Moss HE, Burnstock G. Loss of sensory neuropeptides in the obstructed human bladder. *British Journal of Urology* [Internet]. Wiley; 1992 Oct; 70 (4): 373–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.1992.tb15791.x>
170. Гомазков О.А. Кортексин: молекулярные механизмы и мишени нейропротективной активности. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2015; 8: 99–104.
171. Sugaya K, De Groat WC. Excitatory and inhibitory influence of pathways in the pelvic nerve on bladder activity in rats with bladder outlet obstruction. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms* [Internet]. Wiley; 2009 Jun; 1 (1): 51–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-5672.2009.00004.x>
172. Berggren T, Gabella G, Malmgren A, Uvelius B. Effects of unilateral pelvic ganglionectomy on urinary bladder function in the male rat. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* [Internet]. Informa UK Limited; 1993 Jan; 27 (2): 181–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/00365599309181246>
173. Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, Hayward SW, Cunha GR. Growth factors and receptors in bladder development and obstruction. *Lab Invest*. 1996 Aug; 75 (2): 157–66. PMID: 8765316.
174. Andersson K-E. Potential of stem cell treatment in detrusor dysfunction. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. Elsevier BV; 2015 Mar; 82-83:117–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.017>
175. Samy ZA, Al-Abdullah L, Turcani M, Craik J, Redzic Z. Rat astrocytes during anoxia: Secretome profile of cytokines and chemokines. *Brain and Behavior* [Internet]. Wiley; 2018 Jun 4; 8 (7): e01013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/brb3.1013>

176. Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells* [Internet]. MDPI AG; 2019 May 16; 8 (5): 467. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8050467>
177. Da Cunha BR, Domingos C, Stefanini ACB, Henrique T, Polachini GM, Castelo-Branco P, et al. Cellular interactions in the tumor microenvironment: the role of secretome. *Journal of Cancer* [Internet]. Ivyspring International Publisher; 2019; 10 (19): 4574–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.21780>
178. Tien W-S, Chen J-H, Wu K-P. Sheddome DB: the ectodomain shedding database for membrane-bound shed markers. *BMC Bioinformatics* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2017 Mar; 18 (S3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-017-1465-7>
179. Jha MK, Seo M, Kim JH, Kim BG, Cho JY, Suk K. The secretome signature of reactive glial cells and its pathological implications. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov; 1834 (11):241828. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.006. Epub 2012 Dec 23. PMID: 23269363
180. Zhang N, Ma L, Zhang J, Chen J. Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *International braz j urol* [Internet]. FapUNIFESP (SciELO); 2014 Jun; 40 (3): 414–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-5538.ibju.2014.03.17>
181. Субота НП, Грищенко ВІ, Розанова КД, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання фетальних препаратів. Патент України № 36466А. 16.04.2001.
182. Сукач АН. Влияние ДМСО на жизнеспособность эмбриональных нервных клеток человека и их поведение в условиях культивирования *in vitro*. *Проблемы кріобіології*. 2005; 15 (3): 429–432.
183. Xiong H, Gendelman HE, editors. *Current laboratory methods in neuroscience research*. Springer Protocols Handbooks [Internet]. Springer New York; 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-8794-4>

184. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* [Internet]. Elsevier BV; 1976 May; 72 (1-2): 248–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

185. Шавловская ОА. Клиническая эффективность нейропептидов при цереброваскулярной патологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016; 116 (8): 88–93.

186. Kullmann FA, Daugherty SL, de Groat WC, Birder LA. Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *J Vis Exp* [Internet]. 2014 Aug 18 [Cited 2019 Oct 24]; (90), e51807. Available from: <https://www.jove.com/video/51807/>.

187. Downib JW, McGuire RP. Antagonism of calcium-induced contraction in potassium-depolarized rabbit detrusor muscle strips by dicyclomine hydrochloride and rodverine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [Internet]. Canadian Science Publishing; 1981 Aug 1; 59 (8): 853–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1139/y81-127>

188. Choppin A. Muscarinic receptors in isolated urinary bladder smooth muscle from different mouse strains. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. Wiley; 2002 Oct; 137 (4):522–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704897>

189. Uvelius B. Isometric and isotonic length-tension relations and variations in cell length in longitudinal smooth muscle from rabbit urinary bladder. *Acta Physiologica Scandinavica* [Internet]. Wiley; 1976 May; 97 (1): 1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1976.tb10230.x>

190. Workshop 3: ICS methodology in basic science [Internet]. Tokyo, International Continence Society; 2016 Sept 13. [Cited 2019 Oct 22]. 25p. Available from: <https://www.ics.org/Workshops/HandoutFiles/000621.pdf>.

191. Багрій ММ, Діброва ВА, Попадинець ОГ, Гришук МІ. Методики морфологічних досліджень: монографія. Вінниця: Нова книга; 2016. 328 с.

192. Кумар Д, Рудбэк Л. Иммуногистохимические методы: руководство. Пер. с англ. под ред. Франка ГА, Малькова ПГ. М.: РМАПО; 2011. 224 с.
193. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
194. Горячковский АМ. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. Одесса: Экология; 2005. 616 с.
195. Arms L, Vizzard MA. Neuropeptides in lower urinary tract function. Handbook of Experimental Pharmacology [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2011; 395–423. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6\\_19](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-16499-6_19)
196. Mundy AR. Neuropeptides in lower urinary tract function. World Journal of Urology [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1984 Nov; 2 (3): 211–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00327003>
197. Beckel JM, de Groat WC. Neural control of lower urinary tract function. Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience [Internet]. Oxford University Press; 2019 May 23; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.270>
198. Imamura T, Ishizuka O, Nishizaw O. Bone marrow–derived cells regenerate structural and functional lower urinary tracts. Regenerative Medicine and Tissue Engineering [Internet]. InTech; 2013 May 22; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/55558>
199. Ku JH, Kim Y, Moon KC, Kim YS, Kim M-S, Kim HH, et al. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer to bladder smooth muscle after bladder outlet obstruction in the rat: a morphometric analysis. Journal of Urology [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2006 Sep; 176 (3): 1230–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2006.04.036>
200. Aikawa K, Ishibashi K, Sakai T, Takahashi N, Ogawa S, Kawashima Y, et al. Effect of the renin-angiotensin system on the obstructed bladder. LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms [Internet]. Wiley; 2012 Mar; 4: 81–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-5672.2011.00125.x>



201. Chul Kim J, Il Seo S, Hyun Park Y, Kon Hwang TA. Changes in detrusor and urinary growth factors according to detrusor function after partial bladder outlet obstruction in the rat. *Urology* [Internet]. Elsevier BV; 2001 Feb; 57 (2): 371–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00886-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00886-4)
202. Sellers D, Chess-Williams R, Michel MC. Modulation of lower urinary tract smooth muscle contraction and relaxation by the urothelium. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2018 May 28; 391 (7): 675–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-018-1510-8>
203. Sidler M, Aitken K, Jiang J, Bijos D, Belik J, Bägli DJ. Finding NeMO—nerve-sparing mid-urethral obstruction: a pathophysiologically accurate model of rodent partial bladder outlet obstruction. *Urology* [Internet]. Elsevier BV; 2017 Jul; 105:208.e1–208.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2017.03.032>
204. Liu S, Tao R, Wang M, Tian J, Genin GM, Lu TJ, et al. Regulation of cell behavior by hydrostatic pressure. *Applied Mechanics Reviews* [Internet]. ASME International; 2019 Jul 1; 71 (4): 0408031–4080313. Available from: <http://dx.doi.org/10.1115/1.4043947>
205. Barendrecht MM, Chichester P, Michel MC, Levin RM. Effect of short-term outlet obstruction on rat bladder nerve density and contractility. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* [Internet]. Wiley; 2007 Jan; 27 (1): 47–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-8673.2006.00393.x>
206. Levin R, Chichester P, Levin S, Buttyan R. Role of angiogenesis in bladder response to partial outlet obstruction. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* [Internet]. Informa UK Limited; 2004 Jan; 38 (215): 37–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03008880410015156>
207. Banks FCL, Knight GE, Calvert RC, Morgan RJ, Burnstock G. Alterations in purinergic and cholinergic components of contractile responses of isolated detrusor contraction in a rat model of partial bladder outlet obstruction.

BJU International [Internet]. Wiley; 2006 Feb; 97 (2): 372–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2006.06010.x>

208. Wein AJ, Rackley RR. Overactive Bladder: A Better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. Journal of Urology [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2006 Mar; 175 (3S). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347\(05\)00313-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5347(05)00313-7)

209. Minagawa T, Imamura T, Igawa Y, Aizawa N, Ishizuka O, Nishizawa O. Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder. European Urology [Internet]. Elsevier BV; 2010 Aug; 58 (2): 299–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2009.12.031>

210. Kim JC, Yoo JS, Park EY, Hong SH, Seo SI, Hwang T-K. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. BJU International [Internet]. Wiley; 2008 Feb; 101 (3): 371–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2007.07251.x>

211. Fry C. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods [Internet]. Elsevier BV; 2004 May; 49 (3): 201–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2004.03.002>

212. Ali S, Bozhok G. Effect of Cryopreservation on Different Passages of Porcine Dorsal Root Ganglion Cell Culture. Recent Advances in Biology and Medicine [Internet]. HATASO Enterprises LLC; 2019; 5: 1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.18639/rabm.2019.941755>

213. Seth JH, Sahai A, Khan MS, van der Aa F, de Ridder D, Panicker JN, et al. Nerve growth factor (NGF): a potential urinary biomarker for overactive bladder syndrome (OAB)? BJU International [Internet]. Wiley; 2013 Feb 27; 111 (3): 372–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2012.11672.x>

214. Atala A, Slade D, editors. Bladder Disease, Part A. Springer US; 2003; p. 952. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8889-8>

215. Imamura M, Kanematsu A, Yamamoto S, Kimura Y, Kanatani I, Ito N, et al. Basic fibroblast growth factor modulates proliferation and collagen expression in urinary bladder smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2007 Oct; 293 (4): 1007–1017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00107.2007>
216. Levin RM, Chichester P, Hass MA, Gosling JA, Buttyan R. Obstructive bladder dysfunction: morphological, biochemical and molecular changes. *European Urology Supplements* [Internet]. Elsevier BV; 2002 Nov; 1 (9): 14–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1569-9056\(02\)00119-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1569-9056(02)00119-7)
217. Yanagiuchi A, Miyake H, Nomi M, Takenaka A, Fujisawa M. Modulation of the microenvironment by growth factors regulates their in vivo growth of skeletal myoblasts. *BJU International* [Internet]. Wiley; 2009 Jun; 103 (11): 1569–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2008.08318.x>
218. Levin RM, Wein AJ, Buttyan R, Monson FC, Longhurst PA. Update on bladder smooth-muscle physiology. *World Journal of Urology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1994 Oct; 12 (5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00191201>
219. Lendvay TS, Sweet R, Han C-H, Soygur T, Cheng J-F, Plaire JC, et al. Compensatory paracrine mechanisms that define the urothelial response to injury in partial bladder outlet obstruction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2007 Oct; 293 (4): 1147–1156. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00006.2007>
220. Levin R, Radu F, Topal T, Schuler C, Hydery T, Leggett R. Role of antioxidants in the treatment of obstruction-mediated rabbit urinary bladder dysfunction. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* [Internet]. ScopeMed Publishing; 2011; 1 (1): 23. Available from: <http://dx.doi.org/10.5455/jeim.020111.ir.004>
221. Birder LA, Wolf-Johnston AS, Chib MK, Buffington CA, Roppolo JR, Hanna-Mitchell AT. Beyond neurons: Involvement of urothelial and glial cells

in bladder function. *Neurourology and Urodynamics* [Internet]. Wiley; 2010 Jan; 29(1): 88–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/nau.20747>

222. Andersson K-E. Potential of stem cell treatment in detrusor dysfunction. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. Elsevier BV; 2015 Mar; 82-83: 117–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.017>

223. Okragly AJ, Niles AL, Saban R, Schmidt D, Hoffman RL, Warner TF, et al. Elevated tryptase, nerve growth factor, neurotrophin-3 and glial cell line-derived neurotrophic factor levels in the urine of interstitial cystitis and bladder cancer patients. *The Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1999 Feb; 442. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00005392-199902000-00022>

224. Kim SJ, Bae WJ, Kim SW. Influence of solifenacin on the improvement of storage symptoms in the early period after photoselective vaporization of the prostate. *Investigative and Clinical Urology* [Internet]. The Korean Urological Association; 2019; 60(6):480. Available from: <http://dx.doi.org/10.4111/icu.2019.60.6.480>

225. Volikova AI, Marshall BJ, Yin JMA, Goodwin R, Chow PEP, Wise MJ. Structural, biomechanical and hemodynamic assessment of the bladder wall in healthy subjects. *Res Rep Urol*. 2019; 11: 233–45. <https://doi.org/10.2147/RRU.S205383>

226. Kai W, Lin C, Jin Y, Ping-Lin H, Xun L, Bastian A, et al. Urethral meatus stricture BOO stimulates bladder smooth muscle cell proliferation and pyroptosis via IL-1 $\beta$  and the SGK1-NFAT2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. Spandidos Publications; 2020 Apr 24; 22 (1): 219–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2020.11092>

227. Bellucci CHS, Ribeiro W de O, Hemerly TS, de Bessa J, Antunes AA, Leite KRM, et al. Increased detrusor collagen is associated with detrusor overactivity and decreased bladder compliance in men with benign prostatic

obstruction. *Prostate International* [Internet]. Elsevier BV; 2017 Jun; 5 (2): 70–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prn.2017.01.008>

228. Bright E, Oelke M, Tubaro A, Abrams P. Ultrasound estimated bladder weight and measurement of bladder wall thickness—useful noninvasive methods for assessing the lower urinary tract? *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2010 Nov; 184 (5): 1847–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2010.06.006>

229. Abdel-Aal A, El-Karamany T, Al-Adl AM, Abdel-Wahab O, Farouk H. Assessment of noninvasive predictors of bladder outlet obstruction and acute urinary retention secondary to benign prostatic enlargement. *Arab Journal of Urology* [Internet]. Informa UK Limited; 2011 Sep; 9 (3): 209–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aju.2011.09.003>

230. Yang L, Liu R, Wang X, He D. Imbalance between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) contributes to bladder compliance changes in rabbits with partial bladder outlet obstruction (PBOO). *BJU International* [Internet]. Wiley; 2013 Jan 10; 112 (4): 391–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410x.2012.11740.x>

231. Zhu B, Ekman M, Svensson D, Lindvall JM, Nilsson B-O, Uvelius B, et al. Array profiling reveals contribution of Cthrc1 to growth of the denervated rat urinary bladder. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2018 May 1; 314 (5): 893–905. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00499.2017>

232. Donato R, Geczy CL, Weber DJ. S100 Proteins. *Encyclopedia of Metalloproteins* [Internet]. Springer New York; 2013; 1863–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6\\_48](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_48)

233. Daub B. Expression of members of the S100 Ca<sup>2+</sup>-binding protein family in guinea-pig smooth muscle. *Cell Calcium* [Internet]. Elsevier BV; 2003 Jan; 33 (1): 1–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00167-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00167-7)

234. Zheng Y, Chang S, Boopathi E, Burkett S, John M, Malkowicz SB, et al. Generation of a human urinary bladder smooth muscle cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 2012 Jan 19; 48 (2): 84–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-011-9473-9>

235. Chacko S, Longhurst PA. Regulation of actomyosin and contraction in smooth muscle. *World Journal of Urology* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1994 Oct; 12 (5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00191210>

236. Hashimoto N, Kiyono T, Saitow F, Asada M, Yoshida M. Reversible differentiation of immortalized human bladder smooth muscle cells accompanied by actin bundle reorganization. Asakura A, editor. *PLOS ONE* [Internet]. Public Library of Science (PLoS); 2017 Oct 19; 12 (10): e0186584. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0186584>

237. Kim YS, Wang Z, Levin RM, Chacko S. Alterations in the expression of the  $\beta$ -cytoplasmic and the  $\gamma$ -smooth muscle actin in hypertrophied urinary bladder smooth muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry* [Internet]. Springer Science and Business Media LLC; 1994; 131 (2): 115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00925947>

238. Zhang EY, Stein R, Chang S, Zheng Y, Zderic SA, Wein AJ, et al. Smooth muscle hypertrophy following partial bladder outlet obstruction is associated with overexpression of non-muscle caldesmon. *The American Journal of Pathology* [Internet]. Elsevier BV; 2004 Feb; 164 (2): 601–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63149-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63149-5)

239. Zimmerman RA, Tomasek JJ, McRae J, Haaksma CJ, Schwartz RJ, Lin HK, et al. Decreased expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin results in decreased contractile function of the mouse bladder. *Journal of Urology* [Internet]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2004 Oct; 172 (4 Part 2): 1667–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ju.0000139874.48574.1b>

240. Duan LJ, Qi J, Huang T, Gu X, Xu D, Kong XJ, et al. Pirfenidone attenuates bladder fibrosis and mitigates deterioration of bladder function in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. Spandidos Publications; 2015 May 21; 12 (3): 3639–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2015.3814>

241. Hughes FM, Sexton SJ, Ledig PD, Yun CE, Jin H, Purves JT. Bladder decompensation and reduction in nerve density in a rat model of chronic bladder outlet obstruction are attenuated with the NLRP3 inhibitor glyburide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2019 Jan 1; 316 (1): 113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00400.2018>

242. Hazel SJ, Gillespie CM, Moore RJ, Clark RG, Jureidini KF, Martin AA. Enhanced body growth in uremic rats treated with IGF-I and growth hormone in combination. *Kidney International* [Internet]. Elsevier BV; 1994 Jul; 46(1): 58–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1994.244>

243. Barnett MW. Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan. *Journal of Cell Science* [Internet]. The Company of Biologists; 2002 Dec 1; 115 (23): 4495–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00114>

244. Sharratt M, Frazer AC. The sensitivity of function tests in detecting renal damage in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* [Internet]. Elsevier BV; 1963 Jan; 5 (1): 36–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008x\(63\)90080-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008x(63)90080-2)

245. Martin AA, Tomas FM, Owens PC, Knowles SE, Ballard FJ, Read LC. IGF I and its variant, des-(1-3) IGF-I, enhance growth in rats with reduced renal mass. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 1991 Oct 1; 261 (4): 626–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.1991.261.4.f626>

246. Emmanuel A, Majesty D, Benjamin A, Peter A, Princess U. Effect of caffeine on some selected biochemical parameters using rat model. *Advances in*

Biology [Internet]. Hindawi Limited; 2017 Jan 19; 2017: 1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9303276>

247. Tsui CC, Shankland SJ, Pierchala BA. Glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor ret is a novel ligand-receptor complex critical for survival response during podocyte injury. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. American Society of Nephrology (ASN); 2006 May 3; 17 (6): 1543–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1681/asn.2005080835>

248. Orth SR, Ritz E, Suter-Crazzolara C. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is expressed in the human kidney and is a growth factor for human mesangial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation* [Internet]. Oxford University Press (OUP); 2000 May 1; 15 (5): 589–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/15.5.589>

249. Good DW, George T. Neurotrophin-3 inhibits HCO<sub>3</sub>–absorption via a cAMP-dependent pathway in renal thick ascending limb. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [Internet]. American Physiological Society; 2001 Dec 1; 281 (6): 1804–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.6.c1804>

250. Herrera GA, editor. Experimental models for renal diseases. *Contributions to Nephrology* [Internet]. S. Karger AG; 2011 Jan 14; Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/isbn.978-3-8055-9538-4>

251. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Лампатов ВВ, Жариков АЮ. Методические подходы к изучению функции почек в эксперименте на животных. *Нефрология*. 2009; 13 (3): 52–62.

252. Кузьмак ІІ. Деякі показники білкового обміну в щурів, отруєних бідною поганкою. *Медична та клінічна хімія*. 2018; 20 (4): 130–5. <http://dx.doi.org/10.11603/mcch.2410-681x.2018.v0.i4.9825>

253. Owoade AO, Adetutu A, Olorunnisola OS. Hematological and biochemical changes in blood, liver and kidney tissues under the effect of tramadol treatment. *Journal of Alcoholism & Drug Dependence* [Internet]. Longdom Group; 2019; 07 (02). Available from: <http://dx.doi.org/10.35248/2329-6488.19.7.326>



254. Andreev E, Koopman M, Arisz L. A rise in plasma creatinine that is not a sign of renal failure: which drugs can be responsible? *Journal of Internal Medicine* [Internet]. Wiley; 1999 Sep; 246 (3): 247–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.1999.00515.x>

255. Vetter I, Pujic Z, Goodhill GJ. The response of dorsal root ganglion axons to nerve growth factor gradients depends on spinal level. *Journal of Neurotrauma* [Internet]. Mary Ann Liebert Inc; 2010 Aug; 27 (8): 1379–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2010.1279>

256. Verge VM, Gratto KA, Karchewski LA, Richardson PM. Neurotrophins and nerve injury in the adult. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* [Internet]. The Royal Society; 1996 Mar 29; 351 (1338): 423–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1996.0038>

257. Kaid F, Alabsi AM, Alafifi N, Ali-Saeed R, Ameen Al-koshab M, Ramanathan A, et al. Histological, biochemical, and hematological effects of goniothalamine on selective internal organs of male sprague-dawley rats. *Journal of Toxicology* [Internet]. Hindawi Limited; 2019 Apr 23; 2019: 1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6493286>

258. Seggio AM, Ellison KS, Hynd MR, Shain W, Thompson DM. Cryopreservation of transfected primary dorsal root ganglia neurons. *Journal of Neuroscience Methods* [Internet]. Elsevier BV; 2008 Aug; 173 (1): 67–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.05.017>

259. Misseri R, Rink RC, Meldrum DR, Meldrum KK. Inflammatory mediators and growth factors in obstructive renal injury. *Journal of Surgical Research* [Internet]. Elsevier BV; 2004 Jun; 119 (2): 149–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2004.02.016>

## ДОДАТОК А

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Глоба ВЮ**, Бондаренко ТП, Божок ГА, Самбург ЯЮ, Легач ЄІ. Зміна скоротливої активності детрузора щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2020; 30 (2): 188–198. (Scopus)
2. **Глоба ВЮ**, Самбург ЯЮ, Божок ГА, Легач ЄІ. Біохімічні показники крові щурів з інфравезикальною обструкцією при введенні біологічно активних композицій, що містять нейротрофічні фактори. Медицина невідкладних станів. 2020; 16 (4): 115–120.
3. **Globa VYu**, Bozhok GA, Legach EI. Morphological Parameters of Bladder Rats with Infravesical Obstruction with the Introduction of Biologically Active Compositions. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2020; 8: 327–333.
4. **Глоба ВЮ**, Легач ЄІ, Глоба ДВ, Глоба ТО, Свірепо ПВ. Експериментальна модель інфравезикальної обструкції: якій віддати перевагу? Медичний форум. 2020; 21 (21): 12–14.

#### Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

5. **Глоба ВЮ**. Сократительная активность и патоморфологические особенности детрузора крыс с моделью инфравезикальной обструкции. The international research and practical «The Development of Medical Sciences: Problems and Solutions»; 2018 April 27 – 28; Brno, Czech Republic, p. 106–9.
6. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Влияние кондиционированной среды от культуры мантийных глиоцитов на структурно - функциональные характеристики детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. IX Всероссийский съезд трансплантологов; 2018 Сентября 17–19; Москва, Российская Федерация, с. 167.
7. **Глоба ВЮ**, Рудык ДЮ, Али СГ, Божок ГА, Легач ЕИ. Сократительная активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией

после введения «Кортексина» и биологически активных продуктов культуры мантийных глиоцитов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2018; 28 (2): 172.

8. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Легач ЕИ. Влияние кортексина на сократительную активность детрузора крыс с инфравезикальной обструкцией. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини»; 2018 Червня 22–23; Львів, Україна, с. 90–1.

9. **Глоба ВЮ**. Морфологічні особливості сечового міхура щурів з моделлю інфравезикальної обструкції. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Перспективи розвитку медицини в країнах ЄС та в Україні»; 2018 Грудня 21–22; Влоцлавек, Республіка Польща, с. 106–9.

10. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Бондаренко ТП, Легач ЕИ. Биологическая подвижность мочевого пузыря крыс с инфравезикальной обструкцией. XII Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологическая подвижность»; 2019 Мая 17–19; Пущино, Российская Федерация, с. 82–4.

11. **Глоба ВЮ**, Божок ГА, Глоба ДВ, Дунаева ОВ, Легач ЄІ. Вікові особливості скорочувальної активності детрузора щурів. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання»; 2019 Квітня 12–13; Дніпро, Україна, с. 6–8.

12. **GlobaVYu**, Bondarenko TP, Ali SG, Bozhok GA, Legach EI. Contractile Activity of Detrusor of Rats with Infravesical Obstruction After Introduced Cryoextract of Spinal Ganglia and Biologically Active Products of Mantle Gliocyte Culture. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29 (2): 164.

13. **Глоба ВЮ**, Бондаренко ТП, Легач ЄІ. Вплив біологічно активних продуктів культури мантийних гліоцитів на морфологічні показники сечового міхура щурів з інфравезикальною обструкцією. 6-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом; 2019 Червня 18–21; Яремче, Україна, с. 54.

## ДОДАТОК Б

### Відомості про апробацію результатів дисертації

**Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:**

– 42-й щорічній конференція молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2018. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (23–24.05.2018 р., Україна, Харків) особиста участь;

– 43-й щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині – 2019. Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (27–29.05.2019 р., Україна, Харків) особиста участь;

– XII Всеросійському симпозиумі з міжнародною участю «Биологическая подвижность» (17–19.05.2019 р., Пушино, РФ) особиста участь;

– міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток медичних наук: проблеми та рішення» (27–28.04.2018 р., Брно, Чеська Республіка); заочна участь;

– IX Всеросійському з'їзді трансплантологів (17–19.09.2018 г., Москва, РФ) заочна участь;

– міжнародній науково-практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (22–23.06.2018 р., Львів, Україна) заочна участь;

– міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи розвитку медицини в країнах ЄС та в Україні» (21–22.12.2018 р., Влоцлавек, Республіка Польща) заочна участь;

– міжнародній науково-практичній конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання» (12–13.04.2019 р., Дніпро, Україна) заочна участь;

– 6-му з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (18–21.06.2019 р., Яремче, Україна) заочна участь.