

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 секрети 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 спостерігалася 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 секретах нативної/кріоконсервованої культур 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 інфравезікальною 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 кріобіології і кріомедицини. 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 ЕІ. 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, Дунаєва 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 мантійних 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.