

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри проф. Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 2023 р.

**ВПЛИВ ТРАВМИ СПИННОГО МОЗКУ НА СТАН ЯЄЧНИКІВ
САМИЦЬ МИШЕЙ ЛІНІЇ FVB**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Стреченої Марії Сергіївни
Науковий керівник від кафедри
Доктор філософії (PhD) в галузі 091-Біологія
Калмикова Олеся Олександрівна

Робота виконана у Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця
під керівництвом наукового співробітника к.б.н. Рибачук Оксани Андріївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ABP - androgen binding protein(андрогензв'язуючий білок);

АФК – активні форми кисню;

GSNO - S-nitrosoglutathione(S-нітрозоглутатіон);

Kb – kilobase(кілобази) – тисяча пар основ;

ЛГ – лютеїнстимулюючий гормон;

мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота;

СМ – спинний мозок;

Т – тестостерон;

ТС – testosterone capsule(тестостеронові капсули);

ТСМ – травма спинного мозку;

УТР - uridine triphosphate(уритидинтрифосфат);

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Спинний мозок та моделі травми спинного мозку	7
1.1. Будова та функції спинного мозку.....	7
1.2. Моделі травми спинного мозку.....	9
1.2.1. Моделі травми спинного мозку <i>in vitro</i>	10
1.2.2. Моделі травми спинного мозку <i>in vivo</i>	12
1.2.2.1. Половинний перетин спинного мозку.....	17
1.3. Загальна характеристика репродуктивної системи у самців гризунів.....	18
1.4. Загальна характеристика репродуктивної системи у самок гризунів.....	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	21
2.1. Половинний перетин спинного мозку на рівні T10-T12 у самиць мишей лінії FVB.....	21
2.2. Функціональне відновлення у самиць мишей лінії FVB за шкалами В, ВВВ та Ashworth.....	22
2.3. Гістологічний аналіз зрізів яєчників самиць мишей лінії FVB на макрорівні.....	23
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та їхнє обговорення	24
3.1. Функціональне відновлення у самиць мишей лінії FVB за шкалами В, ВВВ та Ashworth.....	24
3.2. Оцінка загальної будови яєчників самиць мишей на макрорівні.....	30
3.3. Гістологічний аналіз зрізів яєчників самиць мишей лінії FVB на макрорівні.....	36
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ВСТУП

Кожного року більше 130 мільйонів людей у всьому світі отримують травми спинного мозку (СМ), і приблизно 2 мільйони з них страждають від наслідків цих травм протягом життя. У дорослому віці травми стаються найчастіше, а співвідношення випадків травмування чоловіків і жінок становить 2:1. Чоловіки травмують СМ переважно у ранньому та пізньому зрілому віці (3-тя та 8-ма декади життя), тоді як ризик травмування серед жінок зростає у юному віці (15-19 років) та на 7-й декаді життя [1].

Згідно зі статистикою, в Україні щороку понад 2,5 тисяч людей зазнають травм СМ у мирний період, з яких 80% є пацієнтами працездатного віку. Крім того, вогнепальні та ножові поранення спричиняють травми СМ у чоловіків молодого віку, іноді відбувається це і у жінок [2].

Пошкодження цілісності нервової тканини призводить до порушення проведення нервових імпульсів, що може призвести до тимчасових або постійних змін у функціонуванні СМ. Травми СМ часто супроводжуються саморегенерацією та спонтанною пластичністю нервових відростків, що допомагає відновленню сенсорних та моторних функцій організму. Проте процеси відновлення нервової тканини залежать в основному від синаптичної пластичності на існуючих провідних шляхах та формування нових, завдяки росту аксонів в сусідні деіннервовані ділянки, що потребує колатерального проростання [2].

У США, серед 27 мільйонів недієздатних жінок, 39 тисяч отримали інвалідність внаслідок різних типів травм СМ [3]. Неврологічні зміни, що виникають внаслідок пошкодження СМ, можуть негативно впливати на репродуктивне здоров'я та дітородність у жінок. Травма СМ може призвести до порушення менструального циклу, маткових кровотеч, нейрогенної пролактинемії та нетримання молока. Жінкам з травмою СМ також важче завагітніти та виносити дитину. Крім того, ураження СМ у жінок можуть спричинити захворювання дихальних шляхів, запальні процеси сечовивідних

шляхів та тромбофлебії. Пізніше, у посттравматичному періоді, може розвинутися контрактура, що ускладнює рухи кінцівок, а також може відбуватися осифікація колінних, плечових і ліктьових суглобів [4].

Пошкодження може траплятися у повсякденному житті і викликати повну або неповну травму, а також такі ускладнення, як тетраплегія, параплегія, атрофія м'язів, хронічний біль, інфекції сечовивідних шляхів, труднощі з випорожненням кишечника, пролежнів, глибокого тромбозу, емболії легеневої артерії, проблем з легенями і диханням, вегетативної дизрефлексії, спастичності м'язів, проблем контролю ваги і сексуальної дисфункції [5].

Об'єкт дослідження: яєчники самиць лінії FVB.

Предмет дослідження: вплив травми спинного мозку на органи яєчники самиць мишей лінії FVB.

Мета дослідження: вивчення змін в яєчниках самиць мишей лінії FVB після травми спинного мозку.

Завдання дослідження:

- 1) Проведення половинного перетину спинного мозку на рівні T10-T12 у самиць мишей лінії FVB (як модель травми спинного мозку)
- 2) Оцінка функціонального відновлення та рівня спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки у самиць мишей лінії FVB за шкалами B, BBB та Ashworth.
- 3) Перфузія тварин та забір органів сечостатевої системи(зокрема яєчників) у самиць мишей після моделювання травми спинного мозку (1 день, 1 тиждень, 2 тижні, 1 місяць, 3 місяці, 6 місяців, 1 рік, 1,5 року)
- 4) Оцінка загальної будови яєчників самиць мишей на макрорівні після моделювання травми спинного мозку
- 5) Проведення гістологічного аналізу зрізів яєчників самиць мишей після травми спинного мозку.

РОЗДІЛ 1

СПИННИЙ МОЗОК ТА МОДЕЛІ ТРАВМИ СПИННОГО МОЗКУ

1.1. Будова та функції спинного мозку

Структури спинного мозку та пов'язаних з ним хребетних нервів мають значне функціональне значення, оскільки вони відповідають за:

- обробку і передачу сигналів від чутливих рецепторів кінцівок і стовбуру;
- координацію рухів тулуба і кінцівок;
- автономну іннервацію більшості внутрішніх органів.

Внутрішня організація спинного мозку дозволяє багатьом його функціям працювати автоматично або рефлекторно. Через висхідні та низхідні тракти нервових волокон утворюється велика кількість зв'язків з мозком, які передають аферентну інформацію до вищих центрів або опосередковують контролюючий вплив на спинномозкові механізми [6].

Спинний мозок складається з 4 відділів, які мають сегментарну будову: шийний (С — cervical), грудний (Т — thoracic), поперековий (L — lumbar) та крижовий (S — sacral) [7]. Найбільш досліджується грудний відділ та травми, пов'язані з ним. Він займає канал всередині хребта та підтримується та захищається хребтом. Спинний мозок несиметричний та складається з двох половинок, які розділяються дорсальною серединною борозною з дорсального боку та вентральною серединною щілиною з вентрального боку. Сіра речовина утворює внутрішню масу сегмента та містить дорзальні, латеральні та вентральні роги, а біла речовина знаходиться на периферії та

складається з дорсальних, латеральних та вентральних канатиків. У центрі спинного мозку проходить центральний спинномозковий канал.

У різних сегментах спинного мозку співвідношення сірої до білої речовини неоднакове. Латеральні роги сірої речовини знаходяться в грудному відділі та верхніх сегментах поперекового відділу, і в них містяться тіла прегангліонарних симпатичних нейронів. Дорсальні роги сірої речовини містять колатерали мієлінізованих (група А дельта) та немієлінізованих (група С) аферентів, що пов'язані з ноцицепцією [8]. У VII ламіні глибини дорсального рогу містяться важливі клітинні угруповання. Клітини стовпа Кларка, які знаходяться в сегментах спинного мозку від С8 до L3, є джерелом висхідних волокон дорсального спинно-мозочкового тракту. Вони отримують аферентну інформацію від різних рецепторів, таких як нервово-м'язові веретена, сухожилльні органи Гольджі, тактильні рецептори і рецептори тиску. У грудних і верхніх поперекових сегментах спинного мозку латеральна частина VII ламіни також містить прегангліонарні симпатичні нейрони, які формують латеральний ріг, а на куприковому рівні (S2 — S4) вона містить прегангліонарні парасимпатичні нейрони.

Група мотонейронів, які іннервують скелетну мускулатуру, знаходяться в IX ламіні вентральних рогів сірої речовини спинного мозку [9]. Крім того, вентральні роги мають зв'язок з аферентами, що входять до дорсальних рогів, що дозволяє забезпечити рефлекторну відповідь.

Біла речовина складається з висхідних і низхідних нервових волокон, які повністю оточують сіру речовину спинного мозку. Дорсальні, латеральні і вентральні канатики розділені дорсальним і вентральним рогами. Нервові волокна, що мають спільне походження, закінчення і функції, організовані в тракти. Міжсегментні волокна знаходяться на периферії від сірої речовини і забезпечують міжсегментну координацію, тоді як інші довші волокна служать для з'єднання спинного мозку з головним мозком. Провідні шляхи спинного мозку складаються з нервових волокон, які проходять від спинного до головного мозку [6].

Функції спинного мозку дуже складні та різноманітні [10]. Цей орган не тільки передає інформацію до головного мозку, але й генерує складні послідовності рухів та здійснює відчуття та вегетативне і моторне управління. Якщо б спинний мозок просто передавав інформацію, яку отримує від аферентних входів, і передавав її мотонейронам та прегангліонарним нейронам, то ситуація була б значно простішою. Однак, спинний мозок здатен інтегрувати та модифікувати як аферентні, так і еферентні сигнали, відправляючись від периферії, а також сегментарних афферентів та супраспінальних центрів [11].

У зв'язку з тим, що спинний мозок містить складну мережу нейронів, яка контролює сенсорні, вегетативні та моторні функції, він критично залежить від зв'язків з головним мозком, і його функціональний потенціал не може бути використаний, коли він повністю або частково відокремлений від нього. Ми мало розуміємо складну внутрішню схему спинного мозку, тому коли він травмується і втрачає зв'язки з головним мозком, то проблеми з моторною функцією задніх кінцівок трапляються дуже часто [12]. Незважаючи на успіхи за останні 20 років, які були досягнуті в дослідженні цього питання [13], параліз в результаті травми залишається актуальною проблемою для клінічних досліджень, оскільки потребує кращих терапевтичних підходів.

1.2. Моделі травми спинного мозку

Ушкодження спинного мозку призводить до втрати функцій тіла, що знаходяться нижче місця пошкодження. Це стає причиною значних економічних та соціальних проблем у всьому світі, включаючи Україну. Перед розробкою нових методів лікування центрально-нервової системи

необхідно виконати експериментальне тестування їх ефективності *in vitro* та *in vivo* [14]. Крім того, експериментальні моделі можуть бути використані для оцінки та прогнозування ефективності різних терапевтичних підходів до травмування спинного мозку.

1.2.1. Моделі травми спинного мозку *in vitro*

Для моделювання різних варіантів пошкодження спинного мозку, активно використовують органотипну культуру зрізів спинного мозку *in vitro*, що має декілька переваг порівняно з відповідними моделями *in vivo*. По-перше, ці дослідження потребують менше кількості тварин для виділення нервової тканини, що важливо з точки зору біоетики, оскільки такі системи часто використовуються для попередньої оцінки доцільності подальших досліджень з використанням великої кількості лабораторних тварин. Культура органотипових зрізів дозволяє досліджувати спинний мозок тривалий час, оскільки зрізи знаходяться в стабілізованому стані, зберігаючи цитоархітектоніку, міжклітинні контакти та інші особливості, що є характерними для нативної нервової тканини. Крім того, така система дозволяє детально досліджувати первинне пошкодження нейронів для кращого розуміння його довгострокових ефектів і вибору оптимальних терапевтичних засобів для запобігання повторним пошкодженням тканин. У порівнянні з моделями *in vivo*, це дає змогу досліджувати не лише клітинні, а й молекулярні механізми, а також моделювати більш широкий спектр ушкоджень СМ. Дослідження з використанням органотипних культур зрізів СМ *in vitro* є більш точним та зручним для експериментальних маніпуляцій, що робить їх практичнішими для розробки нових методів лікування патологій центральної нервової системи [15, 16].

У моделюванні травми спинного мозку *in vitro* використовуються різні методики, включаючи компресію органотипових культур тканин, перетин органотипових культур тканин та утворення гліального рубця.

Модель скорочення тканини зрізів спинного мозку *in vitro* була розроблена для кращого розуміння деструктивних процесів в аксонах, що відбуваються при пошкодженні білої речовини. Це пошкодження призводить до втрати рухових та чутливих функцій, інколи часткової або повної, нижче місця ураження. Органотипові культури поперечного зрізу спинного мозку гризунів є основним об'єктом даної моделі, які ушкоджуються методом скидання ваги [17]. Крім того, можуть використовуватись культури клітин із тканини SC, що ростуть на м'яких матрицях, що піддаються механічному стисканню, що опосередковано впливає на інші клітини даної культури [18]. Моделювання розривів сегментів SC проводять на органотипових зрізах грудного або попереково-крижового відділу спинного мозку щура. Особлива увага приділяється моделям пошкоджень поперекового відділу *in vitro*, оскільки він знаходиться саме в зоні з потужною нервовою системою - центральним генератором паттернів для локомоції нижніх кінцівок [19].

Під час культивування органотипні зрізи ростуть і тісно взаємодіють з бічними краями один одного. При моделюванні розрізу аксонального SC *in vitro* власне розріз нервової тканини виконується скальпелем у місцях новоутворених щільних контактів між органотиповими зрізами [20]. Для імітації дегенеративних змін, що відбуваються в розсіченій нервовій тканині в природних умовах, одним із етапів моделювання даного виду травми є додавання каїнату до штучної спинномозкової рідини (АКСР) [19, 20]. Каїнат, як і глутамат, може викликати реактивний астрогліоз. Однак каїнат не є субстратом для переносників глутамату і вважається в 30 разів токсичнішим для нервової тканини [21]. Інша модель аксонального перерізу спинного мозку передбачає використання органотипових культур нервової тканини новонароджених тварин. Перевага цієї моделі полягає в тому, що в

зрізах представлено декілька ділянок СК із збереженням їх нейронної цитоархітекτονіки [22].

1.2.2. Моделі травми спинного мозку *in vivo*

Використання моделей травми спинного мозку на живих організмах, зокрема лабораторних мишей та щурів, є більш доречним методом для дослідження процесу регенерації. До таких моделей належать: повний переріз або видалення частини спинного мозку, ішемічне пошкодження, псевдохімічно індуковані пошкодження, компресія та контузія, та гемісекція. Кожен спосіб травмування має свої переваги та недоліки для різних моделей [23]. Для моделей, які використовують повний переріз або видалення частини спинного мозку, потрібні новонароджені щурі, дорослі самки мишей, примати, кішки, та собаки [7, 24-26]. Хірургічну процедуру проводять, встановивши організм в установку для анестезії. Тварини піддаються глибокій анестезії близько за одну хвилину після розслаблення їх м'язів. Використовується перевірка педальних, очних і рогівкових рефлексів для підтвердження входу в анестезію. Після цього щуру поміщають на грілку в установку для проведення операції з витягнутими передніми і задніми лапами [27].

Процедури хірургічного втручання на спинному мозку надається у наступному порядку:

1. За допомогою дезінфікуючого засобу диглюконату хлоргексидину проводять обробку шкіри між шиєю та задніми кінцівками на відстані ~2 см від хребта перед введенням внутрішньовенного катетера для флюотерапії;
2. Заповнений фізіологічним розчином 0,9% шприц з тримачем підключається до внутрішньовенного катетера;

3. Щоб запобігти очній дегідратації, відбувається застосування офтальмологічного гелю Карбомер 2%;
4. Після розрізання шкіри і м'язів, хребець T9 видаляється спеціальним інструментом ронджером, а частково видаляються латеральні частини кісток на рівні T9 і T8;
5. Тверда мозкова оболонка розрізається з використанням ножа фон Грейфа, і 1 крапля розчину лідокаїну (2%) додається безпосередньо на уражену ділянку;
6. Спинний мозок піднімається за допомогою гачка, і поперечний переріз спинного мозку виконується за допомогою тонких ножиць;
7. Для зменшення кровотечі оброблюються мозкові оболонки вологою хірургічною марлею;
8. Після того, як затискачі та ретрактори хребців видаляються, глибокі і поверхневі м'язові шари та шкіра зашиваються хірургічною ниткою;
9. Тварину виводять з наркозу, чекаючи на появу тремтіння та рухливості.

За перевагами цієї моделі можна відзначити її легку відтворюваність травм, відсутність спонтанної нейронної пластичності, яка може негативно впливати на процес регенерації, а також малий набір інструментів, який необхідний для травмування [14].

З іншого боку, модель має деякі недоліки, такі як важкість для тварин, що призводить до високої смертності, дисфункція сечовивідних шляхів, яка сприяє ретроградній інфекції. Після операції тваринам потрібна регідратація, введення знеболюючих препаратів та виведення сечі через катетер. Незважаючи на належний догляд, у тварини все ж можуть виникнути ускладнення, особливо в роботі сечовивідних шляхів, і в цьому випадку тварину доводиться евтаназувати. Нерідко відбувається раптова смерть навіть після тривалого періоду післяопераційного відновлення, що пов'язується з дисрефлексією на рівні вегетативної нервової системи, яка відповідає за роботу серця [14]. Також варто зазначити, що для ішемічного

пошкодження спинного мозку в якості модельних об'єктів потрібні миші віком 8-12 тижнів [31].

Хірургічна процедура проводиться на тваринах після їх зважування, застосовуючи індукцію анестезії 2,5% галотаном. Підтримка анестезії забезпечується за допомогою вдихання 1-1,5% галотану через маску, яка контролюється потоком 100% кисню. Гепарин вводять підшкірно з дозою 400 МО / кг. Тварину кладуть на спину і роблять вентральний шийно-грудний розріз по середній лінії. Субмаксиллярні залози втягуються, а грудна стінка вирізається [32]. Затискач розміщують на лівій внутрішній грудній артерії, яка є важливою колатеральною судиною спинного мозку. Тимус відводиться вище, а дуга аорти ізолюється між лівою загальною сонною артерією і лівою підключичною артерією, уникаючи блукаючого нерва і лівого зворотного гортанного нерва [33]. Потім поміщають 1 затискач під прямим кутом на дузі аорти між лівою загальною сонною артерією і лівою підключичною артерією, а потім ще один затискач поміщають на початок лівої підключичної артерії на 15 секунд. Судинну оклюзію перевіряють і підтримують протягом 9 або 11 хвилин. Потім затискачі знімають, а грудну клітку пошарово закривають. Після 15 хвилин тварин поміщають в клітку з температурою 31 ° С і підтримують таку температуру протягом наступних 3 годин [34].

Модель має деякі переваги і недоліки. Однією з переваг є її велика актуальність для досліджень, оскільки ішемічні пошкодження спинного мозку є поширеними серед людей [14]. Однак, недоліком є те, що точне відтворення моделі є складним [35].

Для створення модельних об'єктів індукованих псевдохімічно пошкоджень спинного мозку найчастіше використовують щурів [36]. Однак були успішні спроби адаптувати процедуру для мишей [37]. Хірургічна процедура включає введення інтравенозно фоточутливої фарби Бенгальський рожевий в піддослідну тварину, після чого спинний мозок опромінюється світлом з довжиною хвилі $\lambda = 560$ нм на рівні T8, що запускає фотохімічну

реакцію. Перед введенням фарби та опроміненням тварини наркотизуються за допомогою 4,5% галотану в суміші з O₂:N₂O (3:7), а також отримують інтраперитоніально антибіотик цефазолін для попередження постопераційних заражень [38].

Щури піддаються наркозу та поміщаються на стереотаксичну установку для операції. Тіло тварини підігрівається термокровриком для збереження температури в межах 37,0 °C ± 0,5 °C. Здійснюється бетадинова обробка та гоління спини вздовж хребта. Щоб знайти останній грудний хребець T13, використовують пальпацію останньої пари ребер. Розрізаючи шкіру від рівня T13 до верхніх грудних сегментів хребта, відкривають дорсальну поверхню хребта від T6 до T9, розрізаючи фасцію м'язів та самі м'язи. Остистий відросток розсікають на рівні T8. Після цього щурів переміщують в стереотаксичну раму для опромінення. Рівень T8 обирають для опромінення, щоб не пошкодити дихальну функцію. Мінеральну олію краплями наносять на відкритий хребець, щоб забезпечити гладку оптичну поверхню для світла. Через 5 хвилин щурів ін'єктують фарбу Бенгальського рожевого, розчинену в 0,9% сольовому розчині або просто контрольний сольовий розчин (без фарби) [39].

Модель дозволяє більш просте відтворення фотохімічних пошкоджень порівняно з ішемією при оклюзії аорти. Для освітлення використовується лампа з флуоресцентного мікроскопа з відповідними фільтрами, що дозволяє вибрати апертуру освітлення для різного розміру ураження. Ця модель має меншу смертність тварин і дозволяє контролювати процеси запалення та регенерації спинного мозку [40].

Недоліки моделі: модель не повністю відображає реальні умови та не відображає повноти пошкодження тканин, зокрема, відсутня чітка анатомічна ішемічна тінь та півтінь [14].

Для використання як модельних об'єктів для компресії та контузії спинного мозку, найчастіше використовують щурів, мишей, приматів, свиней, собак та кролів [41]. Хірургічна процедура виконується з

використанням різноманітних пристроїв та методик [7]. Для контузії, зазвичай використовують апарати для кидання важких об'єктів, електромагнітні імпаکتори та пневматичну рушницю. Останній пристрій є найновішим та найперспективнішим, принцип дії полягає в направленні потоку повітря під високим тиском в область спинного мозку, яку необхідно пошкодити. Мішенню обирають хребець T10, після чого здійснюють отвір стоматологічним свердлом і проводять цільовий вистріл [42].

Перед проведенням контузії щурів, їх анестезують інтраперитоніально хлоралгідратом (420 мг/кг маси тіла). Тварину розміщують на термоковрику та іммобілізують за допомогою утримуючих голову і хребет затискачів. Шкіра спини голиться, стерилізується і надрізається над остистими відростками дорсолатерально від T9 до T11. Хребет фіксується за допомогою затискачів для хребта на рівні T9 і T11, тим самим стабілізуючи T10 і забезпечуючи його легкий доступ для подальших кроків.

Під час експерименту у хребетну дузу тварини з правого боку просвердлюють невеликий отвір діаметром 2 мм під стереомікроскопом, використовуючи зубне свердло. Щоб уникнути пошкодження, використовують охолоджуючий фосфатно-сольовий буфер. Якщо тверда мозкова оболонка пошкоджена або витік спинномозкової рідини виникає, тварину виключають з експерименту. В контрольній групі цей етап є останнім, і пневматична рушниця не використовується. У експериментальних групах під стереомікроскопом розміщують наконечник пристрою біля отвору, який регулюється мікроманіпулятором для контакту з твердою мозковою оболонкою без тиску на неї. Діаметр наконечника складає 1,7 мм, і після встановлення всіх параметрів система удару активується. Після вистрілу отвір в хребці закривається стерильним воском. Після операції тканини пошарово зашивають, і всім тваринам вводять підшкірно 2 мл стерильного фізіологічного розчину, щоб уникнути зневоднення. Через спінальний шок вегетативна функція сечового міхура пошкоджується, тому сечовий міхур потрібно спорожнювати вручну два рази на день. Ця

процедура повторюється до відновлення функції сечового міхура. Для постопераційного знеболення розчиняють 400 мг парацетамолу (суспензія 125 мг / 5 мл) в 100 мл питної води. Зазвичай моделі компресії спинного мозку представлені гібридною комбінацією контузії та компресії, і для створення такої моделі зазвичай використовують затискачі [43], повітряні кулі [44] та розтягувальні установки [45]. Головними перевагами цього методу є простота та надійність травми, при цьому обладнання недороге та відкаліброване для використання з багатьма модельними об'єктами. Деякі з методів є менш інвазивними, наприклад, пневматична рушниця та розтягування. Однак основним недоліком є те, що деякі спинномозкові шляхи можуть залишатися недоторканими, якщо спинна артерія спини не захоплена [14].

1.2.2.1. Половинний перетин спинного мозку

Для створення моделей напівперетину спинного мозку використовують щурів [46], мишей [47], котів, собак та приматів [7]. Хірургічна процедура виконується шляхом проведення напівперетину та може різнитися в залежності від лабораторії. Зазвичай, тварину наркотизують ізофлураном та медетомідіном (0,03 мг / кг) та розташовують на термоковрику з підігрівом. Посередині вздовж хребта розрізають шкіру від T7 до L1 та руйнують хребці щипцями, після чого роблять напівперетин на рівні хребця T10 офтальмологічним ножом. Після операції всі оболонки та шкіру зашивають. Для зниження болю після операції використовують бупренорфін (0,1 мг / кг, кожні 8 годин протягом 2 діб) та карпрофен (5 мг / кг, кожні 24 години протягом 5 діб).

Якщо в якості модельного об'єкту використовується щур, то його анестезують за допомогою 3% ізофлурану в 100% O₂ в індукційному боксі. Температура тіла підтримується на рівні 36°C за допомогою підігріву.

Дорсальну ламіноктомію проводять на рівні T9-T11. Після відкриття спинного мозку робиться невеликий надріз дури, після чого спинний мозок пронизують гострими тонкими ножницями в дорсо-вентральному напрямку посередині, та робиться переріз однієї зі сторін спинного мозку. Тканини зшиваються після закінчення цього етапу. Післяопераційний догляд включає введення антибіотика широкого спектру дії та знеболювальних препаратів, зокрема бупренорфіну (в дозі 5 мг/кг). На відміну від інших моделей травм спинного мозку, гемісекція не суттєво порушує функції сечового міхура, тому постопераційний догляд обмежується заходами зі знеболювання.

Переваги моделі: цей метод дозволяє порівняти функціонуючі та нефункціонуючі кінцівки, визначити момент появи синергічної координації між задніми кінцівками під час регенерації, а також між пошкодженими задніми та передніми кінцівками на обох сторонах. Цей метод менш травматичний, ніж повна трансекція, оскільки передні спинномозкові артерії не пошкоджені, тому немає кровотечі, а у тварин не виникає паралізу обох задніх кінцівок і сечовидільна система не порушується. Цей метод краще імітує реальну травму цього типу у людей, ніж повний переріз або видалення сегмента [14]. Зокрема, він добре імітує синдром Броуна-Секара у людей.

Недоліки моделі: недоліком цього методу є те, що частина моторних шляхів розташована медіально і може залишитися невелика група непошкоджених волокон, що може спотворити результати відновлення в динаміці. Цю проблему можна вирішити за допомогою ретроградного мічення або, з недавніх пір, соматосенсорних викликаних потенціалів [48].

1.3. Загальна характеристика репродуктивної системи у самців гризунів

У гризунів яєчка, статеві залози самців, являють собою великі частки овальної форми, розташовані в мошонці попереду від заднього проходу на вентральній стороні організму. Всередині яєчка знаходяться сім'яні каналці, де утворюються сперматозоїди. Ставши зрілими, сперматозоїди подорожують до придатків яєчок і зберігаються там. Під час еякуляції сперматозоїди вивільняються з придатків яєчок і потрапляють через сім'явиносну протоку до сечостатевої протоки. Під час подорожі сперматозоїда через сім'явиносну протоку кілька залоз подають у сперму рідину. Пеніс щура закритий оболонкою, яка називається препусом. У гризунів у статевому члені є кістка, яка називається бакула. Перед спарюванням скорочення м'язів переміщує бакулу в пеніс [57].

1.4. Загальна характеристика репродуктивної системи у самок гризунів

Статевими залозами самок гризунів є парні яєчники. Яєчники забезпечують прохід яйцеклітини в яйцеводи. Під час овуляції в яйцеводи, прикріплені до яєчників, надходять зрілі яйцеклітини. При наявності сперматозоїдів запліднення зазвичай відбувається у верхній третині яйцеводу. Після цього відбувається імплантація в один з рогів матки. Довжина і форма кожного рогу матки дозволяє одночасно розвиватися кільком плодам. У щурів вагіна утворюється із зрощення рогів матки. Зовнішній отвір піхви — вульва; цей отвір відокремлений від отвору уретри, через який виділяється сеча.

В середньому термін вагітності становить 22 дні. У перші кілька днів після запліднення кожна зигота ділиться і утворює бластулу. На 6 і 7 дні бластули проходять по яйцеводах і імплантуються в роги матки, де кожна з них починає диференціюватися на ембріональну і позаембріональну тканини.

Оскільки ембріон продовжує розвиватися, він отримує харчування від матері через складну систему сполучних кровоносних судин пуповини. Плацента функціонує для доставки кисню та видалення відходів із середовища ембріона. Амніотичний міхур захищає ембріон під час вагітності. На 9 день ембріон становить близько 1 мм і сформує нервову пластинку, з якої виникнуть головний і спинний мозок. На 11 день стають видимі кінцівки, а ембріон становить близько 3,3 мм. На 13 день стають помітні нюхові ямки, а ембріон становить близько 8 мм. Протягом 19-22 днів ембріон щура виростає до 20-40 мм і має розвинену нервову систему.

Пологи є результатом скорочень м'язів матки, які виштовхують плід через піхву, і тривають 1-2 години. В одному посліді народжується зазвичай від 7 до 12 нащадків. Новонароджені щури безшерсті, їх повіки залишаються закритими, а вушні протоки закупореними. У віці від 50 до 60 днів щури досягають статевої зрілості [57].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Половинний перетин спинного мозку на рівні T10-T12 у самиць мишей лінії FVB

Експеримент був проведений на мишах лінії FVB з дотриманням усіх біотичних норм згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasbourg, 1986 p.). Тварин тримали в стандартних умовах приміщенні віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця з вільним доступом до води та їжі. Тварин ран домно було розподілено на 2 групи:

1. Контроль (9 тварин)
2. Експериментальна група (28 тварин).

Після моделювання травми спинного мозку з різними проміжками часу було проведено оцінку результатів поведінкових тестів за шкалами B, BBB і Ashworth та гістологічне забарвлення зрізів яєчників самиць мишей різних експериментальних груп.

Мишей анестезували внутрішньоочеревинним введенням суміші розчинів ксилазину ["Sedazin", "Biowet", Польща; 15 мг/кг] і кетаміну ["Calypsol", "Гедеон Ріхтер А.О.", Угорщина; 70 мг/кг]), і проводили ламінектомію на T10-T12, оголюючи коло твердої мозкової оболонки (рис.2.1.). Гострими ножицями був здійснений половинний перетин спинного мозку (лівобічне пересічення половини поперечника). Ця травма викликає параліч задніх кінцівок і арефлексію через 1 день з подальшим частковим відновленням функції, яка стабілізується, щоб виявити хронічний функціональний дефіцит через 3 тижні після травми. У тварин усіх експериментальних груп вікно доступу в хребтовий канал прикривали фрагментом підшкірної фасції, м'які тканини та шкіру з'єднували крученими

поліамідними хірургічними нитками (ум. № 1, ПАТ "Київхімволокно") у два ряди вузлових швів, ділянку рани обробляли 5 % спиртовим розчином йоду.



Рис. 2.1. Фотографія миші під час проведення травми спинного мозку методом половинного перетину спинного мозку на рівні T10-T12 у самиць мишей лінії FVB

2.2. Функціональне відновлення у самиць мишей лінії FVB за шкалами В, BBB та Ashworth

Показник функції задньої іпсилатеральної щодо зони травми кінцівки визначали згідно зі шкалою D.M. Basso, M.S. Beattie та J.C. Bresnahan (BBB), показник спастичності на рівні надп'ятково-гомількового та колінного суглобів – за шкалою В. Ashworth [68]. Протягом перших двох місяців та зони травми кінцівки реєстрували наприкінці кожного тижня, у подальшому – наприкінці кожного місяця.

2.3. Гістологічний аналіз зрізів яєчників самиць мишей лінії FVB на мікрорівні

В останній день експерименту тварин декапітували, після чого видалили яєчники для подальшої гістологічної обробки. Орган зважували та фіксували у нейтральному забуференому 4% розчині параформальдегіду протягом 72 годин. Після фіксації тканину зневоднювали, ущільнювали в парафіні та виготовляли парафінові зрізи на роторному мікротомі товщиною 7 мкм. Зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином за стандартним протоколом.

Подальше дослідження препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX41 (Японія). Мікрофотографії отримували з використанням цифрової камери Olympus DP20 (Японія) та програмного забезпечення QucikPHOTO MICRO (Promicra, Чехія).

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 13.0 (StatSoft, США) та Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США). Характер розподілу числових значень оцінювали з використанням W-критерія Шапіро-Уїлка. Оскільки відхилення розподілу цих значень від нормальності були несуттєвими, перевірку для оцінки відмінностей між значеннями виконували із застосуванням параметричних (t-критерій Стьюдента) методів варіативної статистики. Достовірними вважали відмінності при ймовірності нульової гіпотези $P \leq 0,05$. Отримані результати представлені у вигляді середнього значення \pm стандартної похибки середнього.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Функціональне відновлення у самиць мишей лінії FVB за шкалами В, ВВВ та Ashworth

Показник відновлення рухової активності задніх кінцівок у самок мишей, вимірювали за допомогою шкали ВВВ, і вже на першому тижні після травматичного періоду (рис. 3.1) було помічено помітну спонтанну рухову активність, слабкі рухи в одному-двох суглобах задніх кінцівок, а також поширені рухи в третьому суглобі, що відповідало середньому балу за шкалою ВВВ - $1,29 \pm 0,16$.

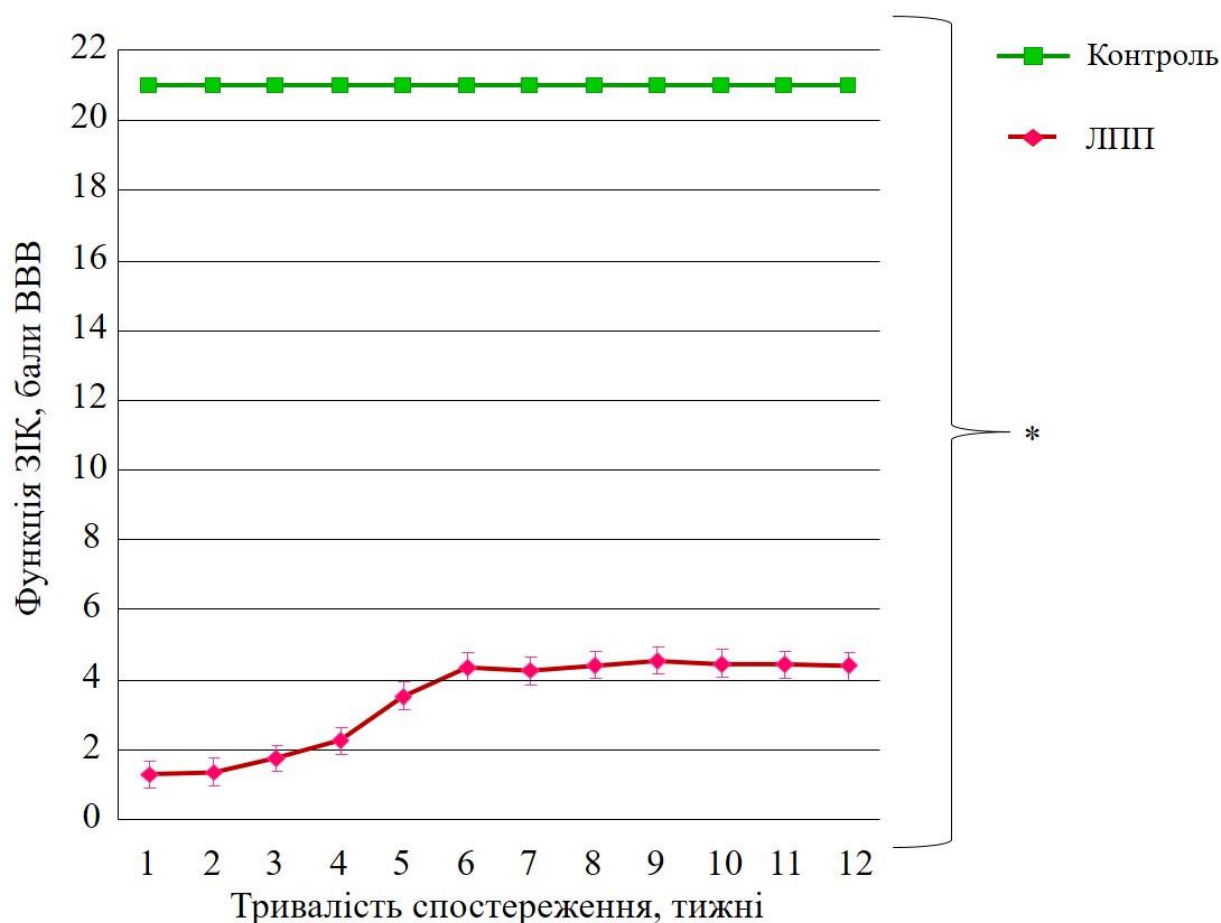


Рис. 3.1. Відновлення локомоторної активності задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) самиць мишей лінії FVB після лівобічного половинного перетину СМ за шкалою ВВВ ($p < 0,001$).

На другому, третьому і четвертому тижні після травматичного періоду середній бал за шкалою ВВВ становив $1,36 \pm 0,16$, $1,75 \pm 0,22$ і $2,26 \pm 0,28$ відповідно, що також відображалося на функціональному рівні у спостережених видимих спонтанних рухах, слабких або поширених рухах в одному-двох або всіх трьох суглобах задніх кінцівок.

Протягом п'ятого тижня після травматичного періоду спостерігалося значне покращення рухової активності задніх кінцівок у більшості самок мишей, яке виявлялося в слабких або поширених рухах в одному-двох або всіх трьох суглобах кінцівок, а також в крокових рухах підшвою вниз з підтриманням маси тіла у стаціонарному положенні - середній бал за шкалою ВВВ склав $3,54 \pm 0,44$. На шостому тижні після травматичного періоду продовжували спостерігати зростання показника, який становив $4,37 \pm 0,54$, що на функціональному рівні виявлялося переважно у поширених рухах в одному-двох або всіх трьох суглобах кінцівок, крокових рухах підшвою вниз, постійному підтриманні маси тіла та частковій координації рухів передніх і задніх кінцівок.

На 7-му, 8-му, 9-му та 10-му тижнях спостерігали подальше активне поліпшення рухової активності задніх кінцівок у самок мишей за допомогою шкали ВВВ: $4,24 \pm 0,54$, $4,41 \pm 0,58$, $4,56 \pm 0,60$ та $4,46 \pm 0,59$ відповідно. Це виявлялося в поширених рухах в одному-двох або всіх трьох суглобах кінцівки, підтриманні маси тіла під час всього руху, плантарній (стопній) поставі, крокових рухах підшвою вниз та частій або постійній підтримці маси тіла (протягом понад 95% часу руху). Під час 11-го та 12-го тижнів після травми були помічені незначні коливання середніх значень за шкалою ВВВ: $4,43 \pm 0,60$ та $4,39 \pm 0,61$ відповідно, але на функціональному рівні спостерігалися поширені рухи у всіх трьох суглобах кінцівки, часті або

постійне підтримання маси тіла, плантарна постава стопи, крокові синергії підшвою вниз та часті або постійне підтримання маси тіла (протягом понад 95% часу руху).

Шкала В була розроблена спеціально для оцінки рухової активності задніх кінцівок у мишей після травми спинного мозку (СМ). Це пов'язано з тим, що ці лабораторні тварини часто використовуються для створення клінічно-релевантних моделей різного походження, зокрема моделей СМ. Відмінності від шкали ВВВ, шкала В дозволяє детальніше оцінити рухову активність колінного суглобу на тій самій кінцівці, що в значній мірі визначає загальну рухову активність кінцівки, поставу стопи, синергію руху кінцівок та положення тіла тварини.

Так, на першому тижні після лівої пошкодження спинного мозку у самок мишей лінії FVB середній показник за шкалою В становив $0,79 \pm 0,09$ (рис.3.2), що виявлялося відсутністю або слабкими інтенсивними рухами у колінному суглобі та плантарній поставі стопи задньої кінцівки.

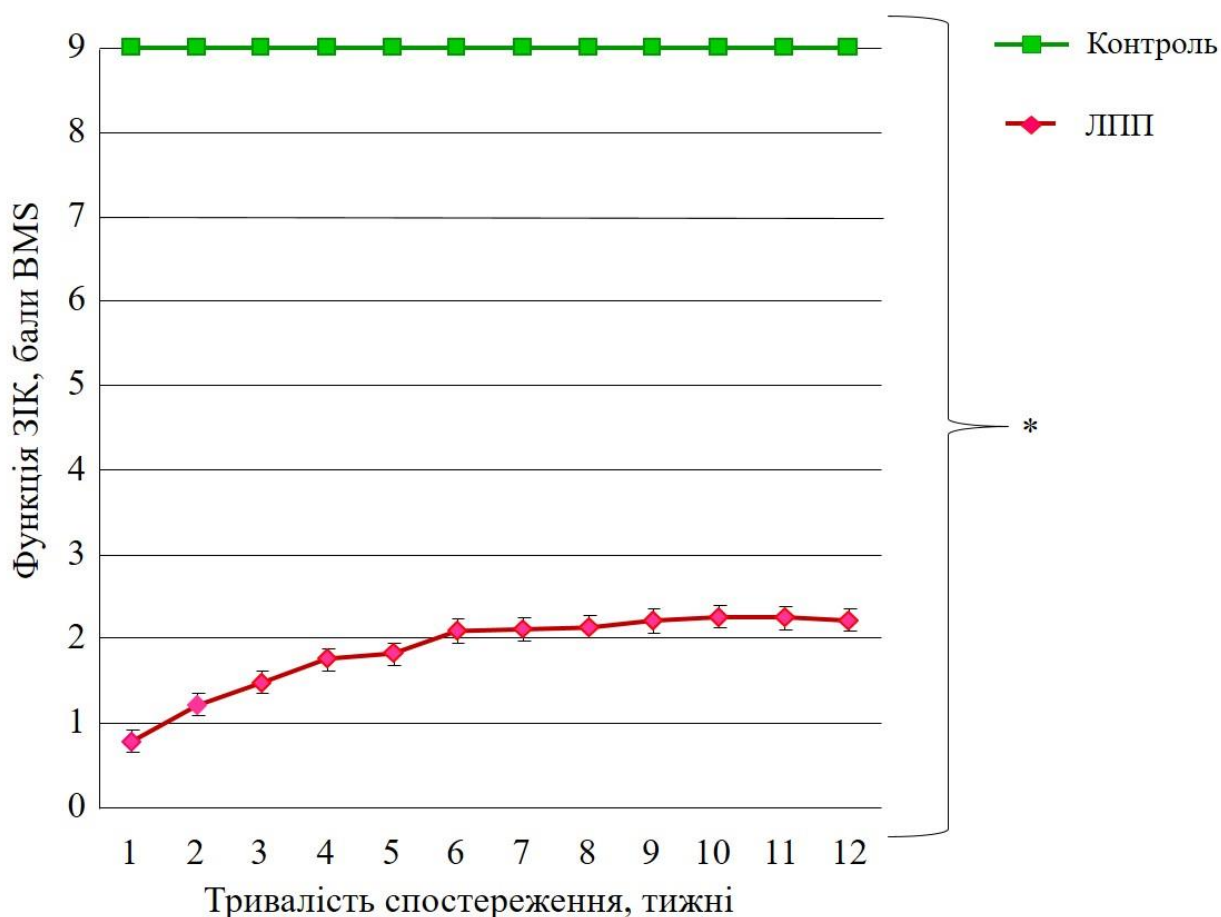


Рис. 3.2. Відновлення локомоторної активності задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) самиць мишей лінії FVB після лівобічного половинного перетину СМ за шкалою В ($p < 0,001$).

Проте, починаючи з другого тижня і протягом третього та четвертого тижнів після травми, більшість травмованих тварин відзначала значне підвищення рухової активності у колінному суглобі задньої кінцівки, часту або постійну плантарну поставу стопи без координації задньої кінцівки. Це відповідало показникам $1,22 \pm 0,15$, $1,48 \pm 0,18$ та $1,75 \pm 0,22$ відповідно.

На п'ятому тижні після травми вже спостерігали активні рухи у колінному суглобі, часту або постійну плантарну поставу стопи, незначну координацію задньої кінцівки та її паралельну поставу - середній показник за шкалою В збільшився до $1,82 \pm 0,22$. На шостому, сьомому та восьмому тижні після травми спостерігалось подальше покращення рухової активності

задньої кінцівки - $2,1 \pm 0,26$, $2,11 \pm 0,27$ та $2,14 \pm 0,28$ відповідно. Це виявлялося у активній роботі колінного суглобу задньої кінцівки, плантарній поставі стопи з або без тимчасової координації задньої кінцівки. Протягом дев'ятого та десятого тижнів після травми середній показник за шкалою В зріс до $2,21 \pm 0,29$ та $2,26 \pm 0,30$ відповідно, що свідчило про подальше покращення рухової активності задньої кінцівки, а детальні функціональні характеристики не відрізнялися від попередніх тижнів після травми.

На 11-му та 12-му тижні спостереження середній показник за шкалою В залишався незмінним: $2,25 \pm 0,30$ та $2,22 \pm 0,31$ відповідно. У цей період післяопераційного періоду, подібно до попередніх результатів, спостерігали активну роботу колінного суглобу іпсилатеральної кінцівки, часту або постійну плантарну поставу стопи та координовані паралельні рухи задньої кінцівки.

За даними інших дослідників, після моделювання часткового перерізу на рівні T10 спинного мозку у період від 1-ї до 3-ї доби посттравматичного періоду середній показник за шкалою В становив в дослідженні від 0 до 1 балу. Вже з 7-ї доби спостереження середній показник в середньому досягав 2-3 балів, а з 14-ї до 42-ї доби стабілізувався на плато і становив від 3,5 до 4,5 балів. Це дослідження проводилося на самицях мишей лінії C57BL-6, віком 10-15 тижнів [40].

Для оцінки рівня спастичності задньої кінцівки у самок мишей лінії FVB використовували шкалу Ashworth. Так, на першому тижні посттравматичного періоду середній показник становив $3,63 \pm 0,44$ (рис.3.3), що функціонально проявлялося переважно в грубих порушеннях м'язового тону, складнощах у руханні та виконанні простих рухів або значному м'язовому тону задньої кінцівки та складнощах у виконанні пасивних рухів у більшості тварин дослідної групи.

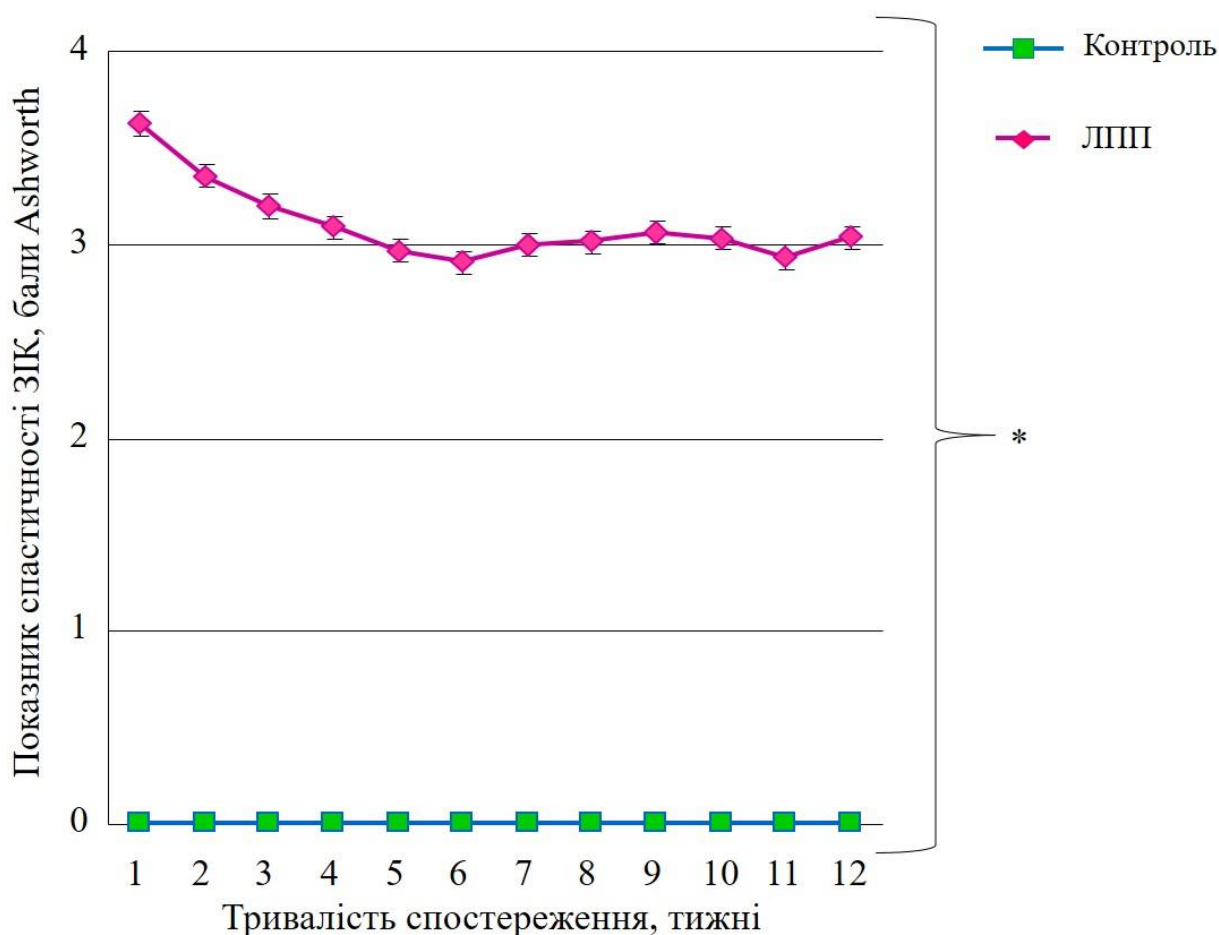


Рис. 3.3. Рівень спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки самиць мишей лінії FVB після лівобічного половинного перетину СМ за шкалою Ashworth ($p < 0,001$).

Проте, на другому, третьому і четвертому тижні після травмування спинного мозку відзначалося поступове зменшення рівня спастичності задньої кінцівки. Середні показники склали $3,35 \pm 0,41$, $3,2 \pm 0,40$ і $3,09 \pm 0,38$ відповідно, що вказувало на виражені або помітні порушення м'язового тону задньої кінцівки. Пасивні рухи виконувалися складно або вільно.

На п'ятому і шостому тижні посттравматичного періоду спостерігалося незначне зниження рівня спастичності до $2,97 \pm 0,36$ і $2,91 \pm 0,36$ відповідно. Функціонально це характеризувалося помітним рівнем м'язового тону, вільним виконанням пасивних рухів або незначним підвищенням м'язового

тону, супроводжуваним хапанням, напруженням або розслабленням при мінімальному супротиву в кінці руху.

Протягом сьомого, восьмого і дев'ятого тижнів після моделювання локомоторної пошкодження спостерігалось незначне збільшення середніх показників спастичності: $3,0 \pm 0,38$, $3,02 \pm 0,4$ і $3,07 \pm 0,39$ відповідно. Це також вказувало на виражений рівень м'язового тону, вільне виконання пасивних рухів або незначне підвищення м'язового тону, супроводжуване хапанням, напруженням або розслабленням при мінімальному супротиву в кінці руху. Незначні коливання цього показника спостерігалися на подальших етапах після пошкодження спинного мозку, зокрема на десятому, одинадцятому і дванадцятому тижні: $3,03 \pm 0,39$, $2,93 \pm 0,38$ і $3,03 \pm 0,39$ відповідно. Як і раніше, ці періоди посттравматичного періоду характеризувалися значним м'язовим тоном задньої кінцівки, складнощами у виконанні або вільним виконанням пасивних рухів та хапанням.

Крім того, шкалу Ashworth також використовують для оцінки рівня спастичності кінцівки після відтворення контузії спинного мозку. Наприклад, після відтворення контузії спинного мозку на рівні T9 у мишей лінії C57BL/6N, використовуючи шкалу Ashworth, було встановлено рівень спастичності задньої кінцівки на рівні 2,8 бала [46].

3.2. Оцінка загальної будови яєчників самиць мишей лінії FVB на макрорівні

Діапазон структурних характеристик яєчників мишей, спостережуваних на макрорівні, після різних стадій травми спинного мозку, досліджувався з метою виявлення можливих змін, які можуть виникнути в результаті цього процесу. Проаналізувавши отримані результати, можна зробити висновок про відсутність помітних морфологічних або структурних змін в яєчниках мишей після травматичного ушкодження спинного мозку.

Спостереження на макрорівні не показали відхилень від звичайного морфологічного організаційного патерну яєчників, що можуть бути пов'язані з травматичною подією. Вищезазначений висновок підкріплює високий ступінь стабільності структурних характеристик яєчників мишей незалежно від розвитку травматичного ушкодження спинного мозку та етапу післятравматичного відновлення.

Яєчники мишей у нормальному стані мають сферичну або овальну форму без помітних деформацій або асиметрії. Природна пігментація яєчників мишей включає в себе відтінки жовтуватого, рожевого або білого кольору. Консистенція яєчників щільна, форма гладенька (рис. 3.4).



Рис. 3.4. Яєчники мишей лінії FVB у контрольній групі на макрорівні.

Після двох тижнів після травми спинного мозку на макрорівні спостерігається збереження типової форми та розміру яєчників, які

відповідають нормальним контрольним спостереженням. Форма яєчників залишається сферичною або овальною, без помітних деформацій або асиметрії, що відповідає нормальному контрольному стану. Колір яєчників після травматичного пошкодження спинного мозку не відрізняється від колірної гами нормальних яєчників своєю і зберігає типову пігментованість. Консистенція яєчників також не виявляє жодних відхилень із стандартною текстурою, залишаючись стабільною і не знаючи помітних змін (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Яєчники мишей лінії FVB через 2 тижні після травми спинного мозку на макрорівні.

Спостереження на макрорівні після 3 місяців після травми спинного мозку, демонструють збереження незмінної форми, кольору та консистенції яєчників мишей. Не виявлено аномальних деформацій, змін у розмірах або порушень у формі яєчників, що підтверджує стабільність їх зовнішнього

вигляду. Колір яєчників також залишається незмінним у порівнянні з нормальним контрольним станом. Яєчники після 3 місяців після травми спинного мозку зберігають типову консистенцію, яка відповідає контрольному стану. Не виявлено змін у текстурі, щільності або еластичності яєчників, що підтверджує їх стійкість до патологічних змін після травматичного впливу (рис. 3.6).



Рис. 3.6. Яєчники мишей лінії FVB через 3 місяці після травми спинного мозку на макрорівні.

Після 1 року від травми спинного мозку не виявлено помітних змін у формі, кольорі та консистенції яєчників мишей. Зовнішній вигляд яєчників зберігає типову овальну або округлу форму, яка характерна для контрольної групи яєчників у нормальних умовах. Щодо кольору яєчників, спостережені зразки відображали подібний відтінок та інтенсивність кольору порівняно з

нормальними контрольними яєчниками. Консистенція яєчників після 1 року від травми спинного мозку залишається стійкою та однорідною. Не спостерігається змін у текстурі, що вказує на збереження нормальної консистенції у післятравматичних яєчниках (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Яєчники мишей лінії FVB через 1 рік після травми спинного мозку на макрорівні.

Після 1,5 року після травми спинного мозку у мишей форма, колір та консистенція яєчників залишається незмінною порівняно з нормальним контрольним станом. Щодо форми яєчників, спостереження не виявило жодних деформацій, асиметрій або аномалій у їх зовнішньому зображенні. Вони зберегли свою типову овальну або округлу форму, яка є характерною для здорових яєчників мишей. Це свідчить про збереження структурної цілісності яєчників протягом досліджуваного періоду. Щодо кольору

яєчників, їх візуальна оцїнка не показала нїяких змін у порівнянні з нормальним контрольним станом. Яєчники зберегли свою звичайну кольорову гаму, яка може варїюватися від світло-рожевого до жовтуватого відтїнку в залежності від індивїдуальних особливостей мишей. Відсутність змін у колорї свїдчить про збереження нормального функціонування яєчників після травматичного впливу на спинний мозок.

Щодо консистенції яєчників, дослідження не виявило жодних помітних відхилень або змін. Яєчники мають нормальну консистенцію, яка характеризується м'яким і еластичним відчуттям при пальпації. Відсутність змін у консистенції підтверджує збереження нормального структурного і функціонального стану яєчників (рис. 3.8).



Рис. 3.8. Яєчники мишей лінії FVB через 1,5 року після травми спинного мозку на макрорівні.

3.3. Гістологічний аналіз зрізів яєчників самиць мишей лінії FVB на мікрорівні

На рис. 3.9. представлено мікрофотографія зрізу яєчників контрольної групи, які характеризуються звичайною будовою, присутні фолікули та жовте тіло.

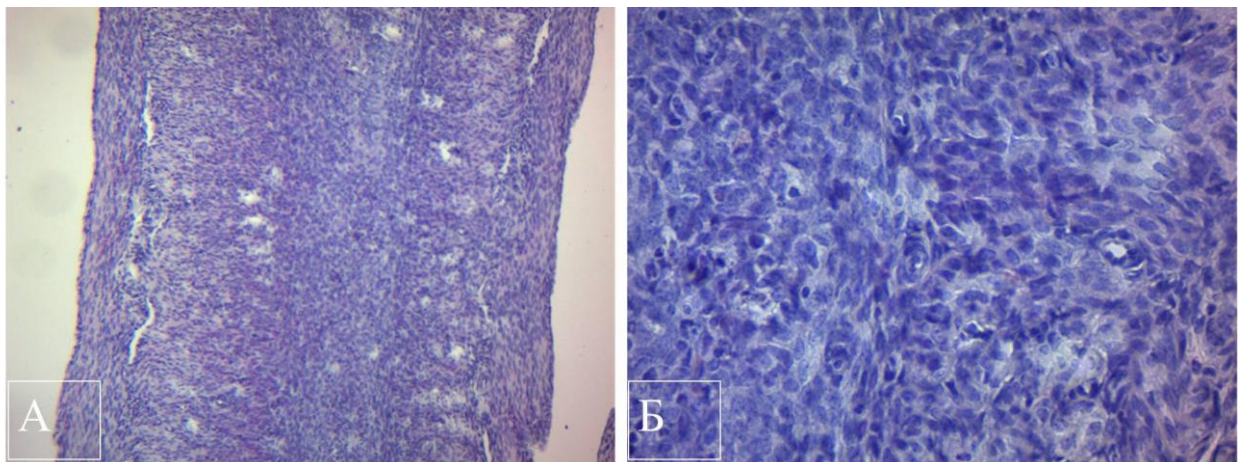


Рис. 3.9. Мікрофотографія зрізу яєчників контрольної групи, забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення – А x200, В x400.

На рис. 3.10. представлено мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи 1 тиждень після травми, які характеризуються звичайною будовою, наявні фолікули та Граафові міхурці.

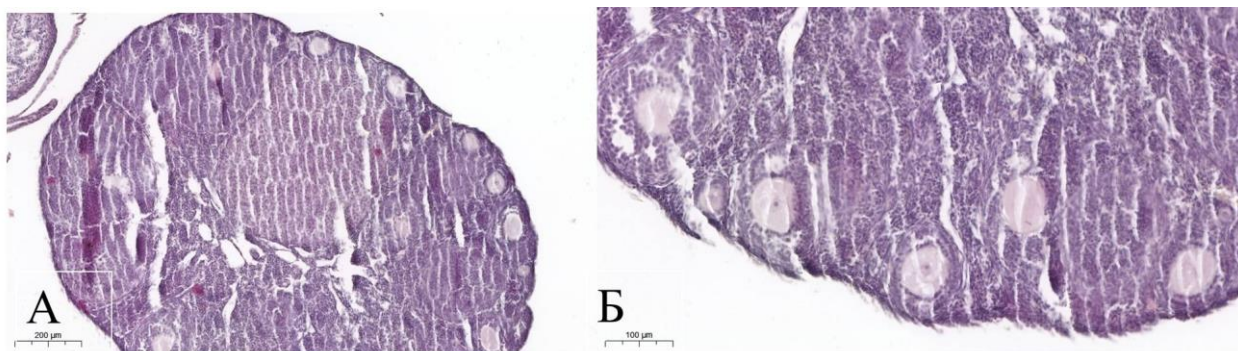


Рис. 3.10. Мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи (1 тиждень після травми), забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення – А x200, В x400.

На рис. 3.11. представлено мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи 1 місяць після травми. Тканина яєчника з жовтими тілами у стадії розквіту (за типом менструального жовтого тіла чи жовтого тіла вагітності).

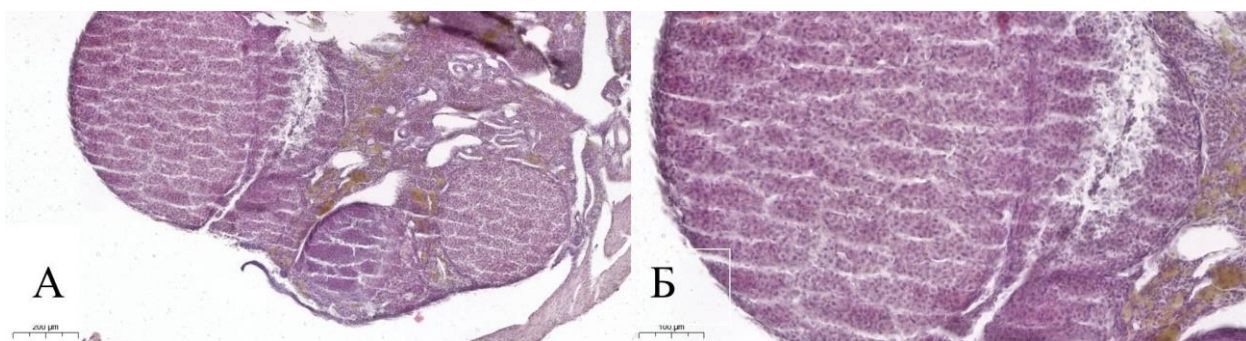


Рис. 3.11. Мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи (1 місяць після травми), забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення – А x200, В x400.

На рис. 3.12. представлено мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи 3 місяць після травми. Тканина яєчника звичайної будови, наявні зрілі фолікули з ооцитами.

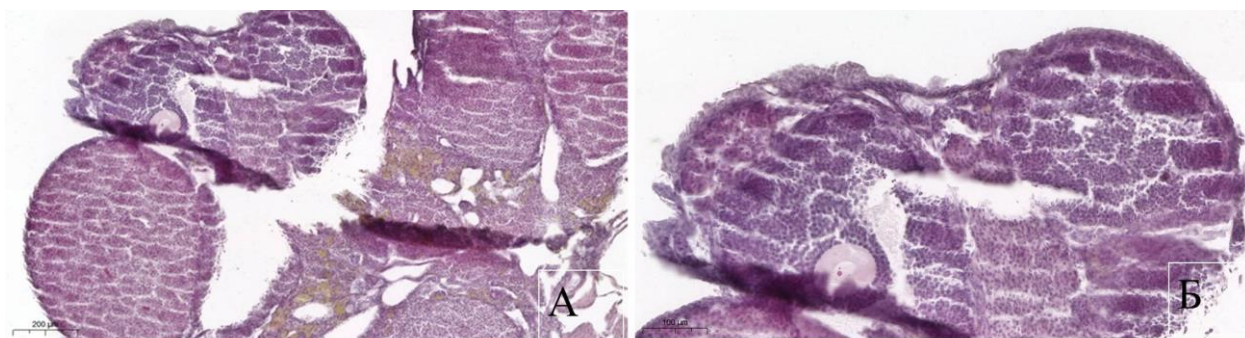


Рис. 3.12. Мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи (3 місяці після травми), забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення – А х200, В х400.

На рис. 3.13. представлено мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи 6 місяць після травми. Тканина звичайної будови, переважають примордіальні фолікули.

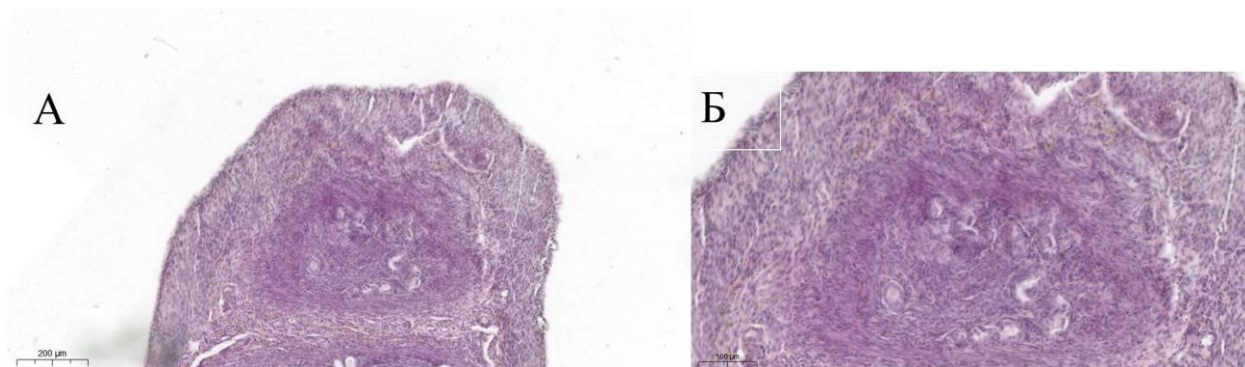


Рис. 3.13. Мікрофотографія зрізу яєчників експериментальної групи (6 місяців після травми), забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення – А х200, В х400.

ВИСНОВКИ

- 1) Оптимізовано модель половинного перетину спинного мозку на рівні T10-T12 у самиць мишей лінії FVB та сформовано повноцінну групу для подальшого експерименту
- 2) За шкалами B, BBB та Ashworth спостерігалось відновлення:
Для шкали BBB: $4,39 \pm 0,61$ бали (з 21 можливого)
Для шкали B: $2,22 \pm 0,31$ бали (з 9 можливих)
Для шкали Ashworth: $3,03 \pm 0,39$ (з 4 можливих)
- 3) Всі тварини взяті в експеримент були проперфузовані та був проведений забір органів сечостатевої системи(зокрема яєчників) самиць мишей після травми спинного мозку у зазначені вище терміни
- 4) На макрорівні була оцінена загальна будова яєчників самиць мишей після моделювання травми спинного мозку. Отримані результати не відрізняються від контрольної групи.
- 5) Оцінка яєчників самиць мишей лінії FVB та їх зрізів на мікрорівні після травми спинного мозку не показала суттєвої різниці із контрольною групою.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Frontiers in neurology, 10*, p. 282.
2. Tsymbaliuk, V. I., Medvediev, V. V., & Semenova, V. M. (2016). Grydina NYa, Yaminsky YuYa, Senchyk YuYu, et al. Clinical and pathomorphological features of penetrating spinal cord injury model with prolonged persistence of a foreign body in the vertebral canal. *Ukrainian Neurosurgical Journal, 4*, pp. 16-25.
3. SCI forum (2021). *Report Women and Spinal Cord Injury*. Available at: https://sci.washington.edu/info/forums/reports/women_sci.asp [Accessed 19 Sep. 2021].
4. Courtois, F., Alexander, M., & McLain, A. B. (2017). Women's sexual health and reproductive function after SCI. *Topics in spinal cord injury rehabilitation, 23*(1), pp. 20-30.
5. Abrams, G. M., & Ganguly, K. (2015). Management of chronic spinal cord dysfunction. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 21*(1 Spinal Cord Disorders), p. 188.
6. Crossman, A. R., and David Neary. (2015). *Neuroanatomy an Illustrated Colour Text*. Fifth edition.
7. Cheriyan, T., Ryan, D. J., Weinreb, J. H., Cheriyan, J., Paul, J. C., Lafage, V., ... & Errico, T. J. (2014). Spinal cord injury models: a review. *Spinal cord, 52*(8), pp. 588-595.
8. Felten, D. L., O'Banion, M. K., & Maida, M. E. (2015). *Netter's atlas of neuroscience*. Elsevier Health Sciences.
9. Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neurons diversity. *Frontiers in cellular neuroscience, 8*, p. 293.
10. Prochazka, A., & Mushahwar, V. K. (2001). Spinal cord function and rehabilitation—an overview. *The Journal of physiology*, p. 533(Pt 1), 3.

11. Mori, S., Stuart, D. G., & Weisendanger, M. (2003). *Brain mechanisms for the integration of posture and movement*. Elsevier.
12. Tadie, M., Liu, S., Robert, R., Guiheneuc, P., Pereon, Y., Perrouin-Verbe, B., & Mathe, J. F. (2002). Partial return of motor function in paralyzed legs after surgical bypass of the lesion site by nerve autografts three years after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*, 19(8), pp. 909-916.
13. Fong, A. J., Roy, R. R., Ichiyama, R. M., Lavrov, I., Courtine, G., Gerasimenko, Y., ... & Edgerton, V. R. (2009). Recovery of control of posture and locomotion after a spinal cord injury: solutions staring us in the face. *Progress in brain research*, 175, pp. 393-418.
14. Rybachuk, O. A., Arkhynchuk, I. V., & Lazarenko, Y. A. (2017). In vivo and in vitro models of traumatic injuries of the spinal cord. *Клітинна та органна трансплантологія*, (5, № 1), pp. 87-93.
15. Abu-Rub, M., McMahon, S., Zeugolis, D. I., Windebank, A., & Pandit, A. (2010). Spinal cord injury in vitro: modelling axon growth inhibition. *Drug discovery today*, 15(11-12), pp. 436-443.
16. Lee, M., Lee, E. S., Kim, Y. S., Choi, B. H., Park, S. R., Park, H. S., ... & Ha, Y. (2005). Ischemic injury-specific gene expression in the rat spinal cord injury model using hypoxia-inducible system. *Spine*, 30(24), pp. 2729-2734.
17. Shi, R., & Whitebone, J. (2006). Conduction deficits and membrane disruption of spinal cord axons as a function of magnitude and rate of strain. *Journal of neurophysiology*, 95(6), pp. 3384-3390.
18. Shearer, M. C., Niclou, S. P., Brown, D., Asher, R. A., Holtmaat, A. J., Levine, J. M., ... & Fawcett, J. W. (2003). The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(4), pp. 913-925.

19. Taccola, G., Mladinic, M., & Nistri, A. (2010). Dynamics of early locomotor network dysfunction following a focal lesion in an in vitro model of spinal injury. *European Journal of Neuroscience*, *31*(1), pp. 60-78.
20. Mandadi, S., Nakanishi, S. T., Takashima, Y., Dhaka, A., Patapoutian, A., McKemy, D. D., & Whelan, P. J. (2009). Locomotor networks are targets of modulation by sensory transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential melastatin 8 channels. *Neuroscience*, *162*(4), pp. 1377-1397.
21. Yoo, J. Y., Hwang, C. H., & Hong, H. N. (2016). A model of glial scarring analogous to the environment of a traumatically injured spinal cord using kainate. *Annals of rehabilitation medicine*, *40*(5), pp. 757.
22. Bregman, B. S., McAtee, M., Dai, H. N., & Kuhn, P. L. (1997). Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Experimental neurology*, *148*(2), pp. 475-494.
23. Paterniti, I., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2018). An in vivo compression model of spinal cord injury. In *Neurotrophic Factors* (pp. 379-384). Humana Press, New York, NY.
24. Takiguchi, M., Atobe, Y., Kadota, T., & Funakoshi, K. (2015). Compensatory projections of primary sensory fibers in lumbar spinal cord after neonatal thoracic spinal transection in rats. *Neuroscience*, *304*, pp. 349-354.
25. Wang, X., Li, Y., Gao, Y., Chen, X., Yao, J., Lin, W., ... & Wang, X. (2013). Combined use of spinal cord-mimicking partition type scaffold architecture and neurotrophin-3 for surgical repair of completely transected spinal cord in rats. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *24*(8), pp. 927-939.
26. DePaul, M. A., Lin, C. Y., Silver, J., & Lee, Y. S. (2015). Peripheral nerve transplantation combined with acidic fibroblast growth factor and

- chondroitinase induces regeneration and improves urinary function in complete spinal cord transected adult mice. *PLoS One*, 10(10), e0139335.
27. Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Okano, H. (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *Journal of neuroscience research*, 80(2), pp. 182-190.
28. Meerbaum, S. (Ed.). (2013). *Myocardial perfusion, reperfusion, coronary venous retroperfusion*. Springer Science & Business Media.
29. Basso, D. M., Beattie, M., & Bresnahan, J. (1995). A new sensitive locomotor rating scale for locomotor recovery after spinal cord contusion injuries in rats. *J. Neurotrauma*, 12, pp. 1-21.
30. Lukovic, D., Moreno-Manzano, V., Lopez-Mocholi, E., Rodriguez-Jimenez, F. J., Jendelova, P., Sykova, E., ... & Erceg, S. (2015). Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation. *Scientific reports*, 5(1), pp. 1-7.
31. Nguyen, B. N., Albadawi, H., Oklu, R., Crawford, R. S., Fink, M. P., Cambria, R. P., & Watkins, M. T. (2016). Ethyl pyruvate modulates delayed paralysis following thoracic aortic ischemia reperfusion in mice. *Journal of vascular surgery*, 64(5), pp. 1433-1443.
32. Newcomer, C. E., & Fox, J. G. (2007). Zoonoses and other human health hazards. In *The mouse in biomedical research* (pp. 719-745). Academic Press.
33. Awad, H., Ankeny, D. P., Guan, Z., Wei, P., McTigue, D. M., & Popovich, P. G. (2010). A mouse model of ischemic spinal cord injury with delayed paralysis caused by aortic cross-clamping. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 113(4), pp. 880-891.
34. Lang-Lazdunski, L., Matsushita, K., Hirt, L., Waeber, C., Vonsattel, J. P. G., & Moskowitz, M. A. (2000). Spinal cord ischemia: development of a model in the mouse. *Stroke*, 31(1), pp. 208-213.

35. Albadawi, H., Chen, J. W., Oklu, R., Wu, Y., Wojtkiewicz, G., Pulli, B., ... & Watkins, M. T. (2017). Spinal cord inflammation: molecular imaging after thoracic aortic ischemia reperfusion injury. *Radiology*, 282(1), pp. 202-211.
36. Watson, B. D., Prado, R., Dietrich, W. D., Ginsberg, M. D., & Green, B. A. (1986). Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain research*, 367(1-2), pp. 296-300.
37. Piao, M. S., Lee, J. K., Jang, J. W., Kim, S. H., & Kim, H. S. (2009). A mouse model of photochemically induced spinal cord injury. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 46(5), p. 479.
38. Cavanaugh, D. L., Berry, J., Yarboro, S. R., & Dahners, L. E. (2009). Better prophylaxis against surgical site infection with local as well as systemic antibiotics: an in vivo study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume.*, 91(8), p. 1907.
39. Watson, B. D., Prado, R., Dietrich, W. D., Ginsberg, M. D., & Green, B. A. (1986). Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain research*, 367(1-2), pp. 296-300.
40. Batista, C. M., Bianqui, L. L. T., Zanon, B. B., Ivo, M. M. A. A., de Oliveira, G. P., Maximino, J. R., & Chadi, G. (2014). Behavioral improvement and regulation of molecules related to neuroplasticity in ischemic rat spinal cord treated with PEDF. *Neural Plasticity*, 2014.
41. Verma, R., Viridi, J. K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2019). Animals models of spinal cord contusion injury. *The Korean Journal of Pain*, 32(1), p. 12.
42. Marcol, W., Ślusarczyk, W., Gzik, M., Larysz-Brysz, M., Bobrowski, M., Grynkiewicz-Bylina, B., ... & Lewin-Kowalik, J. (2012). Air gun impactor—a novel model of graded white matter spinal cord injury in rodents. *Journal of reconstructive microsurgery*, 28(08), pp. 561-568.
43. Krinke, G. J., Bullock, G. R., & Bunton, T. (2000). The laboratory rat (Handbook of experimental animals).

44. Tarlov, I. M., Klinger, H., & Vitale, S. (1953). Spinal cord compression studies: I. experimental techniques to produce acute and gradual compression. *AMA Archives of Neurology & Psychiatry*, 70(6), pp. 813-819.
45. da Costa, E. S. A., Carvalho, A. L., Martinez, A. M. B., De-Ary-Pires, B., Pires-Neto, M. A., & de Ary-Pires, R. (2008). Strapping the spinal cord: an innovative experimental model of CNS injury in rats. *Journal of neuroscience methods*, 170(1), pp. 130-139.
46. Arvanian, V. L., Schnell, L., Lou, L., Golshani, R., Hunanyan, A., Ghosh, A., ... & Mendell, L. M. (2009). Chronic spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. *Experimental neurology*, 216(2), pp. 471-480.
47. Battistuzzo, C. R., Rank, M. M., Flynn, J. R., Morgan, D. L., Callister, R., Callister, R. J., & Galea, M. P. (2016). Gait recovery following spinal cord injury in mice: Limited effect of treadmill training. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 39(3), pp. 335-343.
48. Cloud, B. A., Ball, B. G., Chen, B. K., Knight, A. M., Hakim, J. S., Ortiz, A. M., & Windebank, A. J. (2012). Hemisection spinal cord injury in rat: the value of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring. *Journal of neuroscience methods*, 211(2), pp. 179-184.
49. Agache, P., & Humbert, P. (2004). *Measuring the skin*. Springer Science & Business Media.
50. Nas, K., Yazmalar, L., Şah, V., Aydın, A., & Öneş, K. (2015). Rehabilitation of spinal cord injuries. *World journal of orthopedics*, 6(1), p. 8.
51. Alizadeh, A., Dyck, S. M., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2019). Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Frontiers in neurology*, 10, p. 282.
52. Al Taweel, W., & Seyam, R. (2015). Neurogenic bladder in spinal cord injury patients. *Research and reports in urology*, 7, p. 85.

53. Krassioukov, A., Eng, J. J., Claxton, G., Sakakibara, B. M., & Shum, S. (2010). Neurogenic bowel management after spinal cord injury: a systematic review of the evidence. *Spinal cord*, 48(10), pp. 718-733.
54. Stahel, P. F. (2013). *Essentials of Spinal Cord Injury: Basic Research to Clinical Practice*.
55. Osunronbi, T., & Sharma, H. (2019). International standards for neurological classification of spinal cord injury: factors influencing the frequency, completion and accuracy of documentation of neurology for patients with traumatic spinal cord injuries. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 29(8), pp. 1639-1648.
56. Onifer, S. M., Smith, G. M., & Fouad, K. (2011). Plasticity after spinal cord injury: relevance to recovery and approaches to facilitate it. *Neurotherapeutics*, 8(2), pp. 283-293.
57. Gordon Reese and Heather Ferguson (2010). *Rat Reproduction*. [online] Biological Supply Company. Available at: <https://www.carolina.com> [Accessed 11 Jan. 2010]
58. Huang, H. F. S., Linsenmeyer, T. A., Li, M. T., Giglio, W., Anesetti, R., Von Hagen, J., ... & Pogach, L. (1995). Acute effects of spinal cord injury on the pituitary-testicular hormone axis and Sertoli cell functions: a time course study. *Journal of andrology*, 16(2), pp. 148-157.
59. Hubscher, C. H., Armstrong, J. E., & Johnson, J. R. (2006). Effects of spinal cord injury on the rat estrous cycle. *Brain research*, 1100(1), pp. 118-124.
60. Patki, P., Woodhouse, J., Hamid, R., Craggs, M., & Shah, J. (2008). Effects of spinal cord injury on semen parameters. *The journal of spinal cord medicine*, 31(1), pp. 27-32.
61. Berezin, M., Ohry, A., Shemesh, Y., Zeilig, G., & Brooks, M. E. (1989). Hyperprolactinemia, galactorrhea and amenorrhea in women with a spinal cord injury. *Gynecological Endocrinology*, 3(2), pp. 159-163.
62. Huang, H. F., Wang, S., Molina, C. A., & Ottenweller, J. E. (2004). Preservation of spermatogenesis in spinal cord injured rats with exogenous

- testosterone. Relationship with serum testosterone levels and cellular localization of cAMP responsive element modulator. *Journal of andrology*, 25(1), pp. 95-103.
63. Shunmugavel, A., Khan, M., Peter, C., & Singh, I. (2012). Spinal cord injury induced arrest in estrous cycle of rats is ameliorated by S-nitrosoglutathione: Novel therapeutic agent to treat amenorrhea. *The journal of sexual medicine*, 9(1), pp. 148-158.
64. Huang, H. F. S., Linsenmeyer, T. A., Anesetti, R., Giglio, W., Ottenweller, J. E., & Pogach, L. (1998). Suppression and recovery of spermatogenesis following spinal cord injury in the rat. *Journal of andrology*, 19(1), pp. 72-80.
65. Choobineh, H., Kazemi, M., Gilani, M. A. S., Heydari, T., Shokri, S., Bazrafkan, M., & Hassanzadeh, G. (2018). Testosterone reduces spinal cord injury-induced effects on male reproduction by preventing CADM1 Defect. *Cell Journal (Yakhteh)*, 20(2), p. 138.
66. Huang, H. F., Li, M. T., Giglio, W., Anesetti, R., Ottenweller, J. E., & Pogach, L. M. (1999). The detrimental effects of spinal cord injury on spermatogenesis in the rat is partially reversed by testosterone, but enhanced by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 140(3), pp. 1349-1355.
67. Sipski, M. L. (1991). The impact of spinal cord injury on female sexuality, menstruation and pregnancy: a review of the literature. *The Journal of the American Paraplegia Society*, 14(3), pp. 122-126.
68. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, 12(1), pp. 1-21.



Марія СТРЕЧЕНА