НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

НЕСТЕРЕНКО Юлія Анатоліївна

УДК 616-001:612.83:612.822+612.6

ДИСЕРТАЦІЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ СПОНТАННОГО ВІДНОВЛЕННЯ ПІСЛЯ ТРАВМУВАННЯ СПИННОГО МОЗКУ У МИШЕЙ РІЗНОЇ СТАТІ

Спеціальність 091 – Біологія та біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело Нестеренко Ю. А.

Науковий керівник: Рибачук Оксана Андріївна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

АНОТАЦІЯ

Нестеренко Ю. А. Морфофункціональні особливості спонтанного відновлення після травмування спинного мозку у мишей різної статі – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню морфофункціональних відмінностей та особливостей відновлення нервової тканини після моделювання травми спинного мозку (TCM) у мишей різної статі, а також впливу TCM на органи видільної (нирки та сечовий міхур) та репродуктивної систем (сім'яники, придатки сім'яників та сім'яні міхурці – у самців; яєчники та матка – у самиць) мишей.

У роботі оптимізовано модель ТСМ – лівобічний половинний перетин та вперше проведено її на мишах лінії *FVB* різної статі. З використанням поведінкових тестів були встановлені показники локомоторної активності ((за шкалою (Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) та шкалою Basso (B)) та рівень спастичності (за шкалою Ashworth) за задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) у тварин обох статей після ТСМ протягом тривалого періоду (до 12-ти місяців). Виявлено достовірні відмінності показників локомоторної функції та рівня спастичності ЗІК самців і самиць мишей з ТСМ у порівнянні з контролем та між групами. Показано кореляцію показників функції та показників спастичності на різних термінах посттравматичного періоду, що свідчить про посттравматичне відновлення у тварин після ТСМ.

Після та імуногістохімічного забарвлення та додаткового забарвлення гематоксилін-еозином нервової тканини встановлено особливості нейродегенеративних процесів у спинному мозку (СМ) тварин після травми. Так, у СМ експериментальних самців на всіх термінах дослідження (до 12-ти місяців)

виявлено ознаки запалення тканини СМ, довготривалий процес формування рубця із проявами запалення суміжних із рубцем тканин. У порівнянні із самцями, у самиць з ТСМ ознаки запалення тканини СМ були недовготривалими, формування рубця відбувалось швидше, а суміжна інтактна із зоною рубцювання тканина відзначалась короткотривалими незначними ознаками запалення.

У дисертаційній роботі також виявлено морфофункціональні зміни в органах видільної та репродуктивної систем у самців та самиць мишей після TCM. Зокрема, при морфологічному дослідженні показано ознаки активного запального процесу і набряку в нирках та сечовому міхурі експериментальних самців і самиць мишей на різних термінах посттравматичного періоду. Органи репродуктивної системи самців з TCM, а саме, сім'яники, сім'яні міхурці та придатки яєчок, також зазнавали змін у вигляді застійних та дегенеративних процесів на довготривалих термінах дослідження. Тоді як у самиць лише на пізніх термінах посттравматичного періоду відзначали незначні дегенеративні зміни в матці та появу кістозних утворень в яєчниках.

Ключові слова: спинний мозок, травма, гемісекція, нейродегенерація, моторна функція, спастичність, нейрони, астрогліоз, мікрогліоз, імуногістохімія, конфокальна мікроскопія, сечовий міхур, репродуктивні органи, сім'яники, яєчники, запалення, набряк, гіперплазія, рубець.

SUMMARY

Nesterenko Yu.A. Morphofunctional features of spontaneous recovery after spinal cord injury in mice of different sexes – Qualifying scientific work on manuscript rights.

The dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy in Biology, specialty – 091– Biology and biochemistry – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2025. The manuscript is devoted to the investigation of morphofunctional features of nervous tissue recovery after spinal cord injury (SCI) modelling, and the effect of nervous tissue damage on the organs of mice's genitourinary system (kidneys and urinary bladder; testes, epididymal appendages and seminal vesicles – in males; ovaries and uterus – in females). Using behavioral tests, the features of motor activity recovery ((Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale and Basso (B) scale)) and the spasticity level (Ashworth scale) of the ipsilateral hindlimb (IH) spasticity in animals of both sexes after SCI were determined. By means of immunohistochemical analysis and hematoxylin-eozin staining, the features of neurodegenerative processes in the spinal cord (SC), as well as morphological changes in the organs of the genitourinary system, were investigated.

In the work, the model of SCI – left-sided hemisection (LSH) was optimized, and it was performed for the first time on *FVB* mice of different sexes. Using behavioral tests, the indicators of locomotor activity and the level of spasticity of the IH were determined in animals of both sexes after SCI for a long period (up to 12-th month). Significant differences in indicators of locomotor functions and spasticity level of male and female mice's IH with SCI compared to control and between groups were revealed. The correlation of function and spasticity indicators at different longterm terms of the post-traumatic period is shown, which indicates the post-traumatic recovery of the IH functional activity.

After immunohistochemical evaluation and additional hematoxylin-eozin staining of nervous tissue, the features of neurodegenerative processes in the SC of animals after trauma were demonstrated. Thus, signs of SC tissue's inflammation, a long-term process of scar formation with manifestations of inflammation of tissues adjacent to the scar were found in the SC of experimental males during all the time of the study (up to 12-th month). Compared to males, in females with SCI, the signs of SC tissue's inflammation were short-lived, a scar formation occurred faster, and the tissue adjacent to the intact scar zone showed short-term minor signs of inflammation.

The manuscript also shows morphofunctional changes in organs of genitourinary system in male and female mice after SCI. In particular, hematoxylin-eozin staining

revealed signs of an active inflammatory process and swelling of kidneys and bladder in experimental male and female mice at various long-term post-traumatic periods. The reproductive system of males with SCI, namely, the testes and their appendages, also underwent changes in the form of stagnant and degenerative processes during the longterm study period. At the same time, in females only in the late stages of the posttraumatic period, slight degenerative changes in the uterus and the appearance of cystic formations in the ovaries were noted.

Key words: spinal cord, injury, hemisection, neurodegeneration, motor activity, spasticity, neuron, astrogliosis, microgliosis, immunohistochemistry, confocal microscopy, urinary bladder, reproductive organs, testes, ovaries, inflammation, edema, hyperplasia, scar.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ У яких опубліковано основні результати роботи:

- Rybachuk O. A., Lazarenko (Nesterenko) Yu. A., Krotov V. V., Voitenko N. V. Structural/functional characteristics of organotypic spinal cord slices under conditions of long-lasting culturing. Neurophysiology. 2017 Apr; 49(2):162–164. doi:10.1007/s11062-017-9647-5.
- Rybachuk O., Arkhypchuk I., Lazarenko (Nesterenko) Yu. *In vivo* and *in vitro* models of traumatic injuries of the spinal cord. Cell and Organ Transplantology. 2017 May; 5(1):87–93. doi:10.22494/cot.v5i1.71.
- Nesterenko Yu., Rybachuk O. Locomotor activity and spasticity level of the limb in female mice with a spinal cord injury model. Cell and Organ Transplantology. 2022 May; 10(1):38-44. doi:10.22494/cot.v10i1.136.
- 4. Нестеренко Ю. А., Рибачук О. А. Спонтанне посттравматичне відновлення рухової функції задньої кінцівки самців мишей. Фізіологічний журнал. 2022; 68(3):15–23. doi:10.15407/fz68.03.015.
- 5. Rybachuk O., Nesterenko Yu., Pinet É., Medvediev V., Yaminsky Y., Tsymbaliuk V. Neuronal differentiation and inhibition of glial differentiation of murine neural stem cells by pHPMA hydrogel for the repair of injured spinal

 cord.
 Experimental
 Neurology.
 2023;
 368:114497.

 doi:10.1016/j.expneurol.2023.114497.

 <td

 Rybachuk O, Nesterenko Yu, Zhovannyk V. Modern advances in spinal cord regeneration: Hydrogel combined with Neural Stem Cells. Frontiers in Pharmacology. 2024 Jun 27; 15. doi:10.3389/fphar.2024.1419797.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. RybachukO.A., Lazarenko (Nesterenko) Yu.A., Kyryk V. M., Medvedev V.V., Metelova M.O., Proshkina I.O., Arkhypchuk I.V., Yaminsky Yu.Ya., Tsymbaliuk V.I. Cultivation of bone marrow stromal cells with phpma hydrogel and their further immunocytochemical assessment. XVI internetional conference of students and young scientists "shevchenkivska vesna: bioscience advances", Kyiv, 24-27 April 2018, p. 248.

2. Rybachuk O. A., Metelyova M.O., Lazarenko Yu. A., Medvedev V.V., Kyryk V. M., Voitenko N. V., Tsymbaliuk V. I. (2018): Effects at culturing of BMSCs with heterogeneous PHPMA hydrogel. Proceedings of the Scientific-practical conference with international participation "Achievements and perspectives of modern histology" at Kyiv, Ukraine, October 2018, 48-49.

3. Nesterenko Yu. A. Differentiation of murine hippocampal neural stem cells after cultivation with neurogelTM. XVI Міжнародна наукова конференція студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини», Харків, Україна, Березень 28-29, 2019, с. 360.

4. Рибачук О. А, Лазаренко Ю. А. (Нестеренко Ю. А.), Кирик В. М, Войтенко Н. В., Бутенко Г. М. Оптимізація моделі травми спинного мозку у мишей лінії FVB. 20-й Конгрес Українського фізіологічного товариства, з міжнародною участю, присвячений 95-й річниці народження академіка П. Г. Костюка. Київ, Україна, Травень 27-30, 2019, Том 65, №3 (Додаток), с. 63.

5. Нестеренко Ю. А., Кочергіна Д. С., Кушніренко А. А., Рибачук О. А. Посттравматичне відновлення функцій у самок мишей лінії FVB після моделювання травми спинного мозку. Науково-практична конференція

«Інноваційний розвиток сучасної науки: нові підходи та актуальні дослідження», Запоріжжя, 26-27 березня 2021, с.64.

6. Нестеренко Ю. А., Рибачук О. А. Відмінності спонтанного відновлення моторної активності та зміна рівня спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки у мишей різної статі на пізніх термінах після моделювання травми спинного мозку. The XXVII International Scientific and Practical Conference «Trends of young scientists regarding the development of science», at Edmonton, Canada, 11 - 14 July, 2023, p.21.

7. Нестеренко Ю. А., Рибачук О. А. Кореляція показників функції та покаників спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки у мишей різної статі на пізніх термінах після моделювання травми спинного мозку. The VI International scientific and practical conference «Innovations and prospects in modern science», at Stockholm, Sweden, 29-31 July, 2023, p.16.

8. Нестеренко Ю. А., Рибачук О. А. Посттравматичні морфологічні зміни тканини спинного мозку мишей різної статі. The XI International scientific and practical conference «Science and technology: problems, prospects and innovations», Osaka, Japan, 3-5 August, 2023, p.23.

9. Нестеренко Ю. А., Москаленко Р. А., Рибачук О. А. Морфологічні зміни в органах сечостатевої системи мишей різної статі після моделювання травми спинного мозку. VII International Scientific and Practical Conference, at Madrid, Spain, 7-9 August 2023, p.18.

10. O. A. Rybachuk, Yu. A. Nesterenko, V. O. Zhovannyk. Locomotor activity of the ipsilateral hindlimb of male and female mice after spinal cord injury and stem cell injection. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, Kyiv, May 21-22 2024, p. 48.

11. O. A. Rybachuk, Yu. A. Nesterenko, V. O. Zhovannyk. Effects of exogenous stem cells in locomotor activity and spasticity male and female mice following spinal cord injury. XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / Advancements in life sciences», Київ, 24-26 квітня 2024, с. 196 – 197.

12. Nesterenko Yu. A., Rybachuk O. A. Morphological changes in spinal cord nervous tissue of male and female mice after spinal cord injury modelling. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці», Київ, 13-14 червня 2024; Український науково-медичний молодіжний журнал, Suppl. №2 (147) 2024, с. 91 – 92.

13. Rybachuk O. A., Nesterenko Yu. A. Spasticity of the ipsilateral hindlimb of male and female mice after spinal cord injury and stem cell injection. XXV Національний конгрес кардіологів України, Київ, 24 – 27 вересня 2024 р.//Ukrainian Journal of Cardiology, 2024, Vol. 3, Supplement 1, p. 25-6.

14. Yu. A. Nesterenko, R. A. Moskalenko, O. A. Rybachuk, Morphofunctional changes in reproductive organs of female mice after spinal cord injury. Міжнародна конференція з нейронаук та Наукові читання, присвячені вісцеральній фізіології та патофізіології, Київ, 19-21 листопада 2024 р.// Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 5, додаток, С. 72-73.

15. Nesterenko Yu.A., Rybachuk O.A. Spontaneous post-traumatic recovery of motor functions of ipsilateral hindlimb in mice of different sexes during long-term observation. Перша студентська науково-практична конференція "MEDsynergy", Івано-Франківськ, 22-24 листопада 2024 р., Збірник тез с. 23.

3MICT

3MICT9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ
ВСТУП12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ19
1.1. Особливості будови нервової тканини19
1.1.1. Будова та функції спинного мозку19
1.1.2. Моделі травм спинного мозку
1.1.3. Модель половинного перетину спинного мозку
1.1.4. Морфологічні зміни в тканині спинного мозку після травми
1.1.5. Природа посттравматичного рубця34
1.2. Будова органів видільної та репродуктивної системи мишей
1.3. Відмінності наслідків травмування спинного мозку у тварин різної статі40
1.4. Вплив різного типу травм спинного мозку на органи видільної та
репродуктивної системи тварин42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ46
Методичні підходи46
2.1. Об'єкт дослідження46
2.2. Моделювання травми спинного мозку47
2.3. Поведінкові тести
2.3.1. Тестування моторної активності задньої іпсилатеральної кінцівки у мишей
різної статі за шкалою BBB49
2.3.2. Тестування моторної активності задньої іпсилатеральної кінцівки у мишей
різної статі за шкалою В49
2.3.3. Оцінка рівня спастичності за шкалою Ashworth50
2.4. Транскардіальна перфузія51

2.5. Забарвлення гематоксилін-еозином зрізів спинного мозку, органів видільної
та репродуктивної систем мишей51
2.6. Імуногістохімічний аналіз зрізів спинного мозку мишей
2.7. Реактиви
2.8. Статистичний аналіз даних
РОЗДІЛ З. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ
3.1. Моторна активність задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою BBB
3.2. Моторна функція задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою В
3.3. Спастичність задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою Ashworth
3.4. Розподіл значень показників функції та рівня спастичності задньої
іпсилатеральної кінцівки тварин74
3.5. Кореляція показників функції та показників спстичності задньої
іпсилатеральної кінцівки тварин
3.6 Морфологічні зміни в тканині спинного мозку у мишей обох статей90
3.6.1. Зміни в тканині спинного мозку тварин різної статі після травми,
забарвлення гематоксилін-еозином90
3.6.2. Структурні зміни в тканині спинного мозку тварин, імуногістохімічна
оцінка
3.7. Морфологічні зміни в органах видільної та репродуктивної систем тварин,
забарвлення гематоксилін-еозином127
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ144
ВИСНОВКИ
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ – головний мозок

ЕПС – ендоплазматичний ретикулум

ЗІК – задня іпсилатеральна кінцівка

ЛПП – лівобічний половинний перетин

ПС – показник спастичності

ПФА – параформальдегід

 $\Pi \Phi$ – показник функції

СМ – спинний мозок

ТСМ – травма спинного мозку

ЦНС – центральна нервова система

 ΦB – фосфатний буфер

 $\Phi P - \phi$ ізіологічний розчин

ЦК – центральний канал

β(III)-tubulin – білок мікротрубочок (маркер нейробластів, нейронів)

GFAP – гліальний фібрилярний кислий білок (маркер астроцитів)

Іbа-1 – іонізована кальцій-зв'язана-адаптерна молекула 1 (маркер мікрогліальних клітин)

NO – оксид азоту

МВР – основний білок мієліну (маркер мієліну)

ВСТУП

У всьому світі травми спинного мозку (СМ) завжди вважались одним із найбільш тяжких станів з великою кількістю ускладнень та високим ступенем смертності. У більшості країн щорічно від 20 до 40 людей на мільйон зазнають травмування СМ [1]. Найчастіше пошкодження СМ виникає внаслідок падінь і дорожньо-транспортних пригод. Так, травмування СМ відбувається після перелому, роздроблення, зміщення хребців або внаслідок розвитку інфекційних процесів в організмі, чи пошкодження судин СМ. Внаслідок травмування нервової тканини СМ порушується больова, тактильна і температурна чутливість частини тіла нижче місця пошкодження. Травмування СМ спричиняє не лише порушення роботи головного мозку (ГМ), зокрема, цереброваскулярні порушення, больовий шок, автономну дисрефлексію, психологічні проблеми, а й також негативно впливає на функціонування соматичних органів. Так, травмування СМ з часом призводить до порушення регуляції нейроендокринних факторів, що, в свою чергу, призводить до раптової появи дефектів кісток, їх крихкості та остеопорозу. Брадикардія, зупинка серця, кардіогенний набряк легень, зупинка дихання, гострий респіраторний стрес-синдром, пневмонія – також є результатами пошкодження СМ. Травма СМ (TCM) негативно впливає і на роботу інших систем органів, викликаючи гастрит, панкреатит, спричиняє дисфункцію сечівника, а саме інфікування сечовивідних шляхів, зниження репродуктивної функції як у осіб чоловічої так і у осіб жіночої статі [2, 3].

Травмування СМ найчастіше зазнають чоловіки (до 80% випадків), на відміну від жінок. Проте, частота травмувань СМ у жінок почала невпинно зростати останнім часом [4].

На сьогодні є певні клінічні результати, що вказують на відмінності відновлення тканини СМ та рухової активності кінцівок у різних статей. Вважають, що жінки більш схильні до появи афективних розладів та невропатичного болю внаслідок пошкодження тканини СМ. Останні експериментальні дані вказують, що це питання донині лишається дискусійним [4, 5]. Оскільки існують дослідження, у яких показано більш активне відновлення моторних функцій у жінок після ТСМ з однієї сторони; з іншої сторони є результати інших авторів, в яких не вказана різниця ефективності посттравматичного відновлення у обох статей [6, 7]. Наразі, дегенеративні зміни та можливості відновлення в тканині СМ після травми на довготривалих термінах спостереження як у чоловіків, так і у жінок недостатньо досліджені. Крім того, негативний вплив ТСМ на інші органи і системи органів, зокрема, на органи видільної та репродуктивної систем обох статей описано недостатньо.

Актуальність. Травмування СМ залишається одним з найскладніших станів, що виникають на виробництвах та у дорожньо-транспортних пригодах. Зважаючи на політичну ситуацію в Україні, дослідження наслідків травм СМ як у чоловіків, так і у жінок сьогодні є особливо актуальним.

Найчастіше відбувається половинний перетин, забій та/або стиснення СМ. Загалом, пошкодження СМ викликає парез або параліч частини тіла нижче місця травми, що, призводить до зниження якості життя та, часто, інвалідизації постраждалих. ТСМ впливає на здатність людини до самообслуговування та суттєво знижує її працездатність. Наслідки спинномозкової травми щорічно наносять значні соціальні та економічні збитки в усіх країнах світу. Відновлення тканини СМ ускладнюється ексайтоточністю позаклітинного середовища та формуванням щільного рубця. Більш того, травми СМ згодом спричиняють порушення роботи інших систем органів, в першу чергу, роботу органів видільної та репродуктивної системи. Так, травмування СМ нерідко призводить до порушення сечовиспускання, набряку органів видільної та репродуктивної систем, їх інфікування, і як наслідок – зниження репродуктивної функції [3].

Проте, досі відсутні дані щодо особливостей дегенеративних процесів у тканині СМ після травми та відновлення локомоторних функцій на довготривалих термінах спостереження як у самців, так і у самиць. Крім того, наразі недостатньо описано наслідки впливу ТСМ на структуру та функції низхідних органів та систем органів, а саме органів видільної та репродуктивної систем.

Мета роботи: виявити морфофункціональні особливості спонтанного відновлення після травмування спинного мозку мишей різної статі.

Завдання:

1. Провести моделювання TCM у самців і самиць мишей – лівобічний половинний перетин (ЛПП).

2. Оцінити локомоторну активність задньої іпсилатеральної кінцівки (ЗІК) самців і самиць мишей після моделювання ТСМ за шкалою Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) на 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях (порівняння у межах груп «ТСМ самців» і «ТСМ самиць» за критерієм Фрідмана та між групами тварин за критерієм Краскела-Уоліса).

3. Оцінити моторну активність ЗІК самців і самиць мишей після моделювання TCM за шкалою Basso (B) на 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях (порівняння у межах груп «TCM самців» і «TCM самиць» за критерієм Фрідмана та між групами тварин за критерієм Краскела-Уоліса).

4. Встановити рівень спастичності ЗІК самців і самиць мишей після моделювання TCM за шкалою Ashworth на 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях (порівняння у межах груп «TCM самців» і «TCM самиць» за критерієм Фрідмана та між групами тварин за критерієм Краскела-Уоліса).

 Провести кореляційний аналіз (за коефіцієнтом Спірмена між групами тварин та з часом) показників локомоторної активності та рівня спастичності ЗІК у тварин обох статей після моделювання ТСМ на 1-му тижні та 1-12-му місяцях.
Встановити структурні зміни в тканині СМ мишей різної статі після моделювання ТСМ на 1-му тижні та 1-, 3-, 6- та 12-му місяцях за допомогою забарвлення нервової тканини гематоксилін-еозином.

7. Оцінити морфологічні зміни у тканині СМ мишей різної статі після ТСМ протягом 1-го тижня, 1-, 3-, 6- та 12-го місяців імуногістохімічним методом.

8. Вивчити морфофункціональні зміни в органах видільної (нирки, сечовий міхур) та репродуктивної систем (сім'яники, придатки яєчок та сім'яні міхурці у самців; яєчники та матка у самиць) у мишей різної статі після моделювання TCM

на 1-му тижні, 1-, 3-, 6- та 12-му місяцях при забарвленні тканин відповідних органів гематоксилін-еозином.

Методи дослідження: моделювання TCM у мишей обох статей, оцінка показників функції ЗІК за шкалою BBB та B у самців і самиць мишей, оцінка показників спастичності ЗІК за шкалою Ashworth у самців і самиць мишей, забарвлення гематоксилін-еозином та імуногістохімічне забарвлення тканини CM, забарвлення гематоксилін-еозином тканини органів видільної та репродуктивної системи тварин обох статей, статистична обробка результатів.

Об'єкт дослідження: ЗІК мишей після ЛПП, тканина СМ, органи видільної і репродуктивної системи мишей обох статей.

Предмет дослідження:

- зміни показників функціональної активності та спастичності ЗІК після моделювання ТСМ при довготривалому спостереженні (до 12-ти місяців); кореляція цих показників у мишей різної статі;
- морфологічні посттравматичні зміни у тканині СМ тварин обох статей після ЛПП при довготривалому спостереженні (до 12-ти місяців);
- морфологічні зміни в органах видільної та репродуктивної систем мишей різної статі після моделювання ТСМ при довготривалому спостереженні (до 12-ти місяців).

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі оптимізовано модель травми СМ – ЛПП; для моделювання ТСМ вперше використано мишей лінії *FVB* різної статі.

У дисертаційній роботі встановлено достовірні відмінності відновлення моторної активності ЗІК самців і самиць мишей на довготривалих термінах посттравматичного періоду. А також вперше показано достовірні відмінності рівня спастичності ЗІК між групами мишей обох статей. Крім того, в роботі показано кореляцію показників функції та спастичності ЗІК тварин. Представлено розподіл показників функціональної активності та рівня спастичності ЗІК тварин на всіх досліджуваних часових проміжках.

У дисертаційній роботі здійснено імуногістохімічний аналіз тканини СМ самців і самиць, а саме зони рубцювання в місці перетину та суміжних інтактних ділянок тканини поперечника СМ. Крім посттравматичних змін у нервовій тканині СМ, у роботі показано характер впливу ТСМ на органи видільної та репродуктивної систем у самців і самиць мишей. Зокрема, поглиблено уявлення про тривалість розвитку запальної реакції, застійних явищ, кістозних змін тощо в органах видільної і репродуктивної систем еспериментальних тварин.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Результати експериментального дослідження мають фундаментальне значення у з'ясуванні морфологічних та функціональних процесів у нервовій тканині СМ та органах видільної і репродуктивної систем обох статей після травмування СМ. Крім того, отримані результати можуть слугувати підґрунтям для розробки клінічних протоколів ендогенних та екзогенних шляхів відновлення пошкодженої нервової тканини, а також інших органів і систем органів після ТСМ.

Отримані результати вказують на відмінності посттравматичного відновлення локомоторної активності та рівня спастичності ЗІК у самців і самиць мишей. Зокрема, вже з 2-го місяця та протягом наступних місяців посттравматичного періоду у порівнянні із самцями, у самиць відзначали достовірно вищі показники моторної активності ЗІК. А спастичність ЗІК у самиць з ТСМ, на відміну від самців, була достовірно нижчою протягом 1-3-го та 9-12-го місяців спостереження. Встановлено морфологічні відмінності у посттравматичному відновленні тканини СМ, які проявлялись у появі ознак запалення та його різній тривалості, формування рубця та його походження у самців і самиць. Варто зазначити, що в органах видільної системи, зокрема, нирках та сечовому міхурі самців з ТСМ спостерігали активні процеси запалення (клітинно-запальна інфільтрація), на відміну від таких у самиць. В органах репродуктивної системи самців, а саме сім'яниках та їх сім'яних міхурцях, виявляли ознаки запалення стінок сім'яників (їх набряк) та накопичення сім'яної рідини у сім'явивідних пухирцях на всіх термінах посттравматичного періоду. В яєчниках та матці експериментальних самиць відзначали лише незначні дегенеративні зміни на пізніх термінах спостереження. Отже, на сьогодні недостатньо вивчено особливості впливу ТСМ на органи видільної та репродуктивної систем тварин обох статей. Зважаючи на вказані особливості дегенеративних процесів у органах видільної і репродуктивної систем самців і самиць, постає необхідність підбору індивідуальних терапевтичних підходів.

Особистий внесок здобувача. Опрацювання літературних джерел, моделювання ТСМ у самців і самиць мишей, проведення поведінкових тестів з оцінкою локомоторної активності ЗІК за шкалами ВВВ та В, визначення рівня спастичності ЗІК за шкалою Ashworth у тварин. Статистичну обробку даних, забарвлення гематоксилін-еозином та імуногістохімічний аналіз тканини СМ, морфофункціональне дослідження органів видільної і репродуктивної систем тварин різної статі проведено здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Всі розділи дисертаційної роботи були написані здобувачем особисто.

Апробація результатів дисертації. Результати експериментального дослідження були представлені на XVI internetional conference of students and young scientists "Shevchenkivska vesna: bioscience advances" (Kyiv, Ukraine, 2018); Proceedings of the Scientific-practical conference with international participation "Achievements and perspectives of modern histology" (Kyiv, Ukraine, 2018); XVI Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, Україна, 2019); 20-му Конгресі Українського фізіологічного товариства, з міжнародною участю, присвяченому 95-й річниці народження академіка П. Г. Костюка (Київ, Україна, 2019); науковопрактичній конференції «Інноваційний розвиток сучасної науки: нові підходи та актуальні дослідження» (Запоріжжя, Україна, 2021); the XXVII International Scientific and Practical Conference «Trends of young scientists regarding the

development of science» (Edmonton, Canada, 2023); the VI International scientific and practical conference «Innovations and prospects in modern science» (Stockholm, Sweden, 2023); the XI International scientific and practical conference «Science and technology: problems, prospects and innovations» (Osaka, Japan, 2023); VII International Scientific and Practical Conference (Madrid, Spain, 2023); XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists (Kyiv, Ukraine, 2024); XXI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / Advancements in life sciences» (Київ, Україна, 2024); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці» (Київ, Україна, 2024); XXV Національному конгресі кардіологів України (Київ, Україна, 2024); міжнародній конференції з нейронаук та Наукових читаннях, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології (Київ, Україна, 2024); першій студентській науковопрактичній конференції "MEDsynergy" (Івано-Франківськ, Україна, 2024).

Публікації. За результатами роботи було опубліковано шість статтей у фахових наукових журналах: чотири статті у наукових фахових виданнях України категорії A за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія, що індексуються в базах даних Scopus / Web of Science; дві статті, у закордонних виданнях, проіндексованих у Scopus / Web of Science, віднесених до 1-го квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank / Journal Citation Reports; та п'ятнадцять тез доповідей на українських та міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із наступних частин: вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів дослідження, результати досліджень, обговорення результатів, висновки та список використаних джерел. Робота містить 57 рисунків, 2 таблиці. Обсяг використаних джерел – 187 найменувань. Загальний обсяг дисертаційної роботи – 174 сторінки.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості нервової тканини

1.1.1. Будова та функції спинного мозку. Спинний мозок – циліндрична структура центральної нервової системи (ЦНС), що виходить зі стовбура ГМ та закінчується мозковим конусом. СМ залягає в хребтовому каналі, омивається ліквором та має три захисні оболонки: тверду (лат. *dura mater*), павутинну (лат. *tunica arachnoidea*) і м'яку (лат. *pia mater*). Довжина СМ у чоловіків складає приблизно 45 см, у жінок – приблизно 43 см.

Виділяють чотири відділи СМ: шийний, грудний, поперековий та крижовий. Кожен з відділів СМ утворений сегментами: вісім шийних «С» (<u>лат.</u> *collum*), дванадцять грудних «Т» (<u>лат.</u> *thorax*), п'ять поперекових («L» (<u>лат.</u> *lumbus*), п'ять крижових «S» (<u>лат.</u> *os sacrum*) та один куприковий (лат. *nervi coccygei*). Сегменти СМ переходять у 31-у пару спинномозкових нервів із корінцями [8, 9].

У тканині СМ виділяють білу та сіру речовину. Біла речовина організована у вигляді трактів: висхідні тракти надсилають інформацію від сенсорних органів до вищих рівнів центральної нервової системи (ЦНС), тоді як низхідні тракти білої речовини проводять сигнали від ЦНС до периферії. У межах сірої речовини СМ виділяють І-Х ламіни, кожна з яких містить певний тип нейронів, що характеризує особливості цитоархітектоніки СМ.

СМ виконує такі функції:

 Забезпечує зв'язок між ГМ та тілом шляхом проведення нервових імпульсів від моторної кори ГМ до м'язів, та від рецепторів до сенсорної кори ГМ;

2. СМ без участі ГМ забезпечує рефлекторні реакції організму;

3. Завдяки роботі інтернейронів СМ також викликає ритмічні скорочення м'язів [9, 10].

1.1.2. Моделі травм СМ. Травми СМ – один із тяжких станів, якого щорічно зазнають люди у всьому світі. Так, у США в середньому 30 людей щодня травмують СМ внаслідок дорожньо-транспортних пригод (38%), падінь (22%), фізичних навантажень (13,5%) та спортивних вправ (9%). У мирний час в Україні щорічно понад 2500 людей зазнає травм СМ, 80 % з них – пацієнти працездатного віку [10]. Співвідношення випадків травмування чоловіків і жінок становить 2:1. ТСМ у чоловіків трапляється переважно у ранньому та пізньому зрілому віці (3-тя та 8-ма декади життя), тоді як ризик травмування СМ серед жінок зростає в юному віці (15-19 років) та на 7-й декаді життя [11].

Загалом, пошкодження нервової тканини СМ спочатку призводять до втрати моторних та сенсорних функцій частин тіла, розташованих нижче місця травмування. До подальших довготривалих функціональних ускладнень після травмування СМ належать: поява пролежнів, хронічний біль, дистрофія м'язів, запалення та інфікування органів видільної системи, зниження репродуктивної функції та загальне зниження якості життя. На наслідки ТСМ впливають вік пацієнта, ступінь травмування, а також соціальні й економічні умови, у яких перебуває людина після ТСМ [12, 13].

З метою детального з'ясування особливостей морфологічних та фізіологічних змін у тканині СМ, розуміння механізмів захворювання, анатомічних та функціональних наслідків ушкодження СМ проводять моделювання різного типу ТСМ на лабораторних тваринах. На сьогодні розроблено моделі ТСМ з метою дослідження морфологічних та функціональних особливостей відновлення у тварин в посттравматичний період, а також подальшого підбору терапевтичних підходів для регенерації нервової тканини, пришвидшення процесу реабілітації, покращення психо-емоційного стану та підвищення рівня життя пацієнтів з ТСМ.

Так, моделювання травми СМ проводять переважно на лабораторних щурах, мишах, а також на котах, собаках, карликових свинях та нелюдиноподібних приматах [14]. До найбільш поширених моделей травм СМ на тваринах належать: контузія, компресія, забій, розтяг, ішемія, фотохімічна

модель СМ, повний перетин, половинний перетин СМ тощо [15]. Кожна модель ТСМ характеризується своїми перевагами та недоліками, які пов'язані із відтворенням фізіологічних особливостей трамування у людей.

Однією з перших розроблених моделей ТСМ на лабораторних тваринах була контузія СМ. Так, модель контузії СМ на собаках була запропонована Аленом ще у 1911. «Техніка Алена» полягає у моделюванні контузії СМ вантажем 20 г; хоча, ступінь контузії у такій установці та початкову швидкість падіння вантажу точно визначити неможливо. Така модель травми стала основою для розробки й удосконалення інших типів травм СМ на нелюдиноподібних приматах з метою поглиблення розуміння посттравматичних патофізіологічних процесів у нервовій тканині [16, 17].

Кух та Ратхол вперше розробили модель розміреної контузії СМ на мишах з використанням ударного елементу. Так, для моделювання контузії на мишах здійснюють ламінектомію; за допомогою щипців МакПерсона фіксують СМ, після чого нейлоновою ниткою (діаметром 1,5 мм) огортають тканину СМ. Латунна штанга, через яку перекинута нитка з вантажем, з'єднується із стереотаксичною рамкою, що дозволяє максимально точно визначити місце травмування. Зазвичай, параметри вантажу складають від $1r \times 2,5cm$ до $3r \times 5cm$ [18]. Нині для моделювання контузії СМ на лабораторних тваринах використовують більш сучасну установку Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS). Значною перевагою такої установки вважають його високостандартизованість [19].

Часто первинна травма СМ у людей включає забій або стиснення. Тому на сьогодні розрізняють кілька типів інструментів для моделювання ТСМ типу забою. Так, використовують ударний елемент NYU, розроблений у 1992 році в Нью-Йоркському університеті, що передбачає ламінектомію на потрібному рівні хребта та власне забій тканини СМ ударним цилінтром (масою 10 г). Ступінь забою визначають збільшенням маси ударного циліндра, відстанню між ним та тканиною СМ, а також періодом травмування [20]. Для моделювання забою СМ також використовують Infinite horizon (IH) ударний елемент: після ламінектомії необхідної ділянки хребта, металічний елемент здійснює стиснення нервової тканини, під контролем під'єднаного сенсора, що визначає силу натиску елемента на тканину СМ. Використання такого типу установки, у порівнянні із попереднім приладом, мінімізує помилки падіння ударного елемента [21].

Пневматичний молоток, розроблений у 2012 році, – також новітня розробка серед інструментів для моделювання забою СМ, яка найчастіше використовується в експериментальних дослідженнях (лабораторні щури). Пошкодження тканини СМ відбувається внаслідок направленого потоку повітря під високим тиском. Період впливу потоку повітря на СМ складає від 0,1 сек до 15хв [20, 21, 22].

Модель стиснення СМ у лабораторних тварин дозволяє постійно підтримувати канал СМ в стані оклюзії, а також досліджувати не лише наслідки стиснення, але й встановити оптимальний часовий проміжок декомпресії. З метою моделювання стиснення СМ використовують щипці, балон, затискачі залежно від бажаного типу моделі стиснення. На сьогодні, виділяють кілька видів моделі стиснення СМ. Найбільш уживаними вважаються модель стиснення за допомогою затискачів та з використанням балону [16].

Модель стиснення за допомогою затискачів подібна до моделі забою. Так, після ламінектомії, щипці стискають дорзо-вентрально по всій довжині СМ, а силу стиснення контролюють калібруванням щипців [16].

Модель стиснення за допомогою балону вперше була апробована на собаках у 1953 році. Така модель повторює затиснення СМ міжхребцевими дисками у людей. Ця модель травми досі поширена завдяки простоті виконання та забезпечення цілісності оточуючих структур СМ. Загалом, модель стиснення за допомогою балону включає введення катетеру з надувним балоном на кінці в епідуральний чи субдуральний простір СМ із подальшим наповненням балону розчином чи повітрям. Сила роздування балону визначається не лише бажаним ступенем травмування, а й розміром експериментальної тварини [16, 23].

Новітня модель травми стиснення нервової тканини передбачає введення зігнутої хірургічної голки з ниткою в один бік тіла піддослідної тварини. Після цього необхідний відділ СМ огортають ниткою в епідуральному просторі та витягують назад через шкіру з іншого боку тіла. Один з кінців нитки прикріпляють до експериментального приладу, а інший – до блока певної маси. Після падіння блоку, стиснення нервової тканини триває, всередньому, протягом 1-ї хв [21].

Моделі розтягу СМ також передбачають використання різних інструментів для моделювання травми [21, 24]. Так, інструмент Хантінгтона, розроблений у 2004 році, використовується і дотепер для моделювання розтягу СМ у щурів. Процедура травмування вимагає проведення ламінектомії відповідної зони тіла з подальшим розміщенням гачків Хантінгтона на рівні одного сегменту каудально та растрально до майбутнього місця ушкодження. Гачки приєднані до мотора, з'єднаного з комп'ютером для контроля товщини, швидкості та тривалості розтягнення нервової тканини СМ. Товщина розтягнення може складати 3, 5 або 7 мм, для моделювання слабкого, середнього та сильного травматичного ушкодження відповідно [21].

Інструмент для розтягнення UTA, сконструйований у University of Texas at Arlington, на відміну від попередньо інструменту, використовується для розтягнення тканини CM у обох напрямках [21]. Так, кліпси UTA міцно прикріплюють до тіла хребців, після чого мотори, приєднані до кліпсів, одночасно розтягують два хребці (наприклад T9 та T11) у каудорастральному напрямках. Такий спосіб моделювання TCM у вигляді розтягнення вважається малоінвазивним, оскільки не вимагає ламінектомії, а сила розтягу контролюється комп'ютерною установкою. Крім того, така модель травми дозволяє визначати ступінь пошкодження тканини CM [21, 24].

Ішемічна модель травми СМ вперше була запропонована Лангом-Лаздунським [25]. Цей метод передбачає використання антеріоральної стернотомії з тимчасовою оклюзією аорти, створеної завдяки розміщенню аневризматичних кліпсів на дузі аорти та лівій підключичній артерії. Така процедура викликає запальний процес, що характерний для гострої стадії посттравматичного періоду СМ у природних умовах [24, 25].

Для моделювання ексайтотоксичної ТСМ у спинномозковий канал або порожнину хребтового каналу вводять екзотоксини (наприклад, антагоніст Аметаботропних рецепторів – квіскалову кислоту або амінокислоти, зокрема, глутамат, N-метиласпартат та каінатну кислоту). Це призводить до процесів, притаманних ішемічному або травматичному пошкодженню нервової тканини, а саме до активного запалення, апоптозу нейронів, пошкодження аксонів, формування астроцитарного рубця, утворення порожнини в тканині СМ, сирингомієлії, довготривалого спонтанного болю та механічної аллодинії [16, 26].

Фотохімічна модель ТСМ, розроблена у 1986 році Ватсоном, була визнана однією з найбільш надійних та відтворюваних експериментальних моделей ішемії СМ [25]. Зберігаючи стовбур СМ інтактним, опромінення лазером довжиною хвилі 560 нм дорзальної поверхні СМ викликає збудження барвника бенгальського рожевого у мікроциркуляторному руслі СМ, що і призводить до появи ішемічних проявів. Головною перевагою цієї методики вважають відсутність механічного пошкодження нервової тканини, оскільки відсутня потреба у ламінектомії [27].

Для детального морфофункціонального дослідження СМ, а також встановлення рівня відновлення нервової тканини використовують різні модифікації перетину СМ [28, 29]. Зокрема, використовують такі варіанти моделі перетину СМ як повний, та неповний перетин СМ.

Варіант повного перетину СМ у людей трапляється нечасто. Тому така експериментальна модель на лабораторних гризунах найбільш доцільна для дослідження регенерації аксонів після травмування тканини СМ та підбору різного типу полімерних матриксів з метою відновлення пошкодженої тканини. Модель повного перетину СМ ефективна також і для проведення електрофізіологічних досліджень. Процес моделювання такого типу травми полягає у повному перетині всього поперечника СМ та усіх його оболонок. Слід зазначити, що однією з важливих переваг такої моделі є виключення розвитку спонтанної нейральної пластичності та простота відтворення експерименту. Однак, модель повного перетину має і значні недоліки, головним з яких є високий відсоток смертності у тварин внаслідок перетину хребтової артерії та подальшої крововтрати [16, 30, 31, 32]. Більш того, травма у вигляді повного перетину СМ пов'язана і з серйозними посттравматичними порушеннями функціонування органів видільної та репродуктивної систем експериментальних тварин внаслідок анатомічних особливостей будови та іннервації цих соматичних органів [33]. Саме тому моделювання повного перетину СМ проводять переважно на дорослих щурах (з обов'язковою катетеризацією сечівника) та статевозрілих самицях мишей [34]. Крім того, такий тип ТСМ з часом призводить і до ретроградного інфікування сечівника Escherichia coli, Klebsiella, Enterococcus, Staphylococcus, що, в свою чергу, негативно впливає на виживання та загальну якість життя піддослідних тварин [33, 34]. Не зважаючи на ряд недоліків, модель повного перетину СМ досі використовується нейрофізіологами з різною метою. Так, модель повного перетину на рівні Т9-Т10 СМ мишей вважається оптимальною для дослідження нейродегенеративних процесів, адже викликає мінімальне пошкодження колатералей СМ [35, 36]. Моделювання повного перетину проводять і на інших тваринах, наприклад, котах і собаках. Зокрема, на котах здійснюють моделювання повного перетину СМ на рівні Т5-Т10 або Т10-Т11 з подальшою імплантацією різноманітних полімерних матриксів задля дослідження особливостей відновлення СМ [37, 38, 39]. На собаках моделюють повний перетин СМ, зокрема, на рівні Т8, Т8-Т9, Т9 та Т12 з метою детального дослідження дегенеративних процесів у тканині СМ внаслідок травми [40].

Модель половинного перетину СМ (гемісекція), у порівнянні з моделлю повного пересічення СМ, має ряд переваг. По-перше, на відміну від повного перетину, половинне пересічення СМ у людей трапляється частіше, тому така модель найбільш наближена до клінічних випадків травмування СМ у людей. По-друге, половинний перетин вважається найбільш адаптивним типом травми

СМ для дослідження ефективності імплантації різноманітних матриксів, біоматеріалів та нейротропних факторів. По-третє, модель половинного використовують для дослідження перетину також посттравматичного відновлення моторної активності у тварин після травмування. По-четверте, ще однією вагомою перевагою моделі половинного перетину є наявність контрольної частини поперечника СМ у межах одного організму. По-п'яте, така модель не передбачає перетин хребтової артерії, що унеможливлює появу небажаних крововтрат і, таким чином, знижує ризик смертності тварин [16, 41, 42]. Так, модель половинного перетину СМ на собаках дозволяє досліджувати результати імплантації різноманітних матриксів та стовбурових клітин у травмовану тканину СМ [41]. Після половинного перетину на рівні L1, у місце травмування імплантують Matrigel окремо та сумісно з нейральними стовбуровими клітинами людини [43]. Такий регенеративний підхід сприяє достовірному зростанню показників функціонального відновлення, у порівнянні групою тварин без імплантації [43]. У деяких експериментальних 3 дослідженнях, після половинного перетину на рівні нижніх грудних сегментів СМ, проводять тренування мишей протягом 4 тижнів, що сприяє підвищенню показників локомоторної активності [44]. Моделювання половинного перетину на рівні L3 CM, зазвичай, проводять на самицях мишей. Результати такого лослілження свідчать про запуск сигнальних каскадів, що сприяють проростанню колатералей СМ у зоні травмування [45].

Однією з новітніх і тому менш оптимізованих моделей СМ нині вважають модель вторинного ураження, що розвивається за лічені хвилини після первинної травми СМ та триває від кількох тижнів до кількох місяців, спричиняючи пошкодження тканин СМ навколо місця ураження [24]. Вперше концепція вторинного травмування СМ була описана Аленом у 1911 році. Так, під час собак, проведення контузії CM V дослідник відзначив покращення неврологічного стану після видалення посттравматичної гематомієлії, що наштовхнуло на припущення про наявність певних «біохімічних факторів» у некротичному геморагічному розрізі, який і спричиняє власне вторинне

ураження СМ. Нині вторинним ураження СМ вважають різноманітні клітинні, молекулярні та біохімічні процеси, що призводять до саморуйнування тканини СМ та уповільнення посттравматичної регенерації [42].

Більше того, сучасна нейрофізіологія передбачає комбінування кількох із вищезгаданих методик задля наближення експериментальних моделей до таких у клінічній практиці. Поєднання кількох моделей ТСМ на ранніх етапах експериментального дослідження також необхідне для виявлення найбільш ефективних терапевтичних підходів з метою регенерації тканини СМ [16, 21].

Виживання лабораторних тварин, зокрема, мишей вважається одним із важливих факторів під час моделювання ТСМ і відрізняється між самцями і самицями: 58% летальності у самців та 61% – у самиць [47]. Важливо, що у 20% самиць відзначають спонтанну загибель, пов'язану, в першу чергу, з нейроендокринними розладами, що можуть викликати мутації, як, наприклад, у субліній *FVB/NCr* та похідних від неї *NCr stock2* [47]. Згідно іншого припущення синдром «спонтанної загибелі» є довготривалим станом виключно у самиць мишей лінії *FVB* [46]. Загалом описаний синдром зумовлює нейрональний некроз СМ, асоційований з гіпоксемією та, як наслідок, змінами у поведінці тварин. Синдром часто супроводжується епілептичними нападами, утворенням пухлин у сечівнику і жовчному міхурі, а також гіпертрофією наднирників. Серед самців мишей спонтанної загибелі не відзначають [46, 47].

1.1.3. Модель половинного перетину спинного мозку. Модель половинного (неповного) перетину включає гемісекцію, однобічний перетин, та переріз заднього стовпа СМ. Половинний перетин СМ призводить до часткової або повної втрати моторних, автономних функцій та сенсорної чутливості нижче рівня пошкодження. Згідно із даними європейських та американських досліджень, співвідношення людей з неповним перетином СМ налічує 52,80% та 44,30% відповідно серед усіх постраждалих [48]. Нині розрізняють п'ять синдромів неповного травмування СМ: синдром центрального каналу, синдром

Брауна-Секара, синдром переднього стовпа, синдром мозкового конуса та синдром кінського хвоста [48, 49].

Синдромом, що дозволяє сформувати більш повну картину фізіологічних та анатомічних наслідків половинного перетину, вважається синдром Брауна-Секара [49]. Ще у 1862 році Чарльз-Едвард Браун-Секар вперше описав травму неповного перетину СМ, згодом названу синдром Брауна-Секара, що призводить до ослаблення, палічу та втрати пропріорецепції іпсилатеральної сторони тіла внаслідок пошкодження латерального кортикоспінального шляху та заднього стовпа СМ. Такий синдром призводить до втрати больової і температурної чутливості контрлатеральною частиною тіла людини і тварин. Синдром Брауна-Секара також супроводжується дисфункцією спино-таламічного провідного шляху [49, 50, 51, 52].

Популярність використання в експерименті моделі половинного перетину особливостей зумовлена рядом виконання цієї моделі травми. Так, використовуючи модель половинного перетину, можливо здійснювати вибіркове переривання нервових шляхів, наприклад, моторного тракту руброспінальний (кортикоспінальний, стовбур) або сенсорного тракту (дорзальний стовбур) задля збереження зв'язку між проксимальним та дистальним кінцями СМ, таким чином, підтримуючи цілісність частини тканини СМ. Крім того, такий тип пошкодження СМ не впливає на цілісність та роботу стуктур ГМ, що відповідають за моторну активність. За половинного перетину СМ інтактними також залишаються локальні спинномозкові мережі, а саме, центральна патернова генераторна мережа, що проходить напряму від супраспінальних центрів або опосередковано через пропріоспінальну релейну систему. Проте, неповний перетин СМ зумовлює втрату низхідних специфічних командних імпульсів від кортико-, рубро-, вестибуло-, ретикулоспіальних трактів та неспецифічних бульбоспінальних шляхів, що утворені серотонін-, дофамін- та норадреналінергічниими нейронами [53].

Варто зазначити, що при неповному перетині СМ зберігаються деякі нервові зв'язки на рівні розрізу, що у свою чергу може сприяти спонтанному

функціональному відновленню тканини СМ. Так, пошкодження аксонів індукує спонтание утворения нових синапсів за допомогою уцілілих терміналей. Така пластичність нервової тканин дозволяє незначною мірою відновити CM, функціональну активність а саме v випадку втрати низхідних супраспінальних зв'язків у місці розрізу за участі спонтанного проростання уцілілих супраспінальних аксонів кортикоспінального та ретикулоспінального трактів спостерігається відновлення пропріоспінальних аксонів. Такий тип ТСМ функціонально також індукує відновлення релевантних зв'язків між супраспінальними аферентними відростками у корі та стовбурі ГМ [53].

Найчастіше моделювання половинного перетину проводять на лабораторних щурах і мишах. Травма СМ у самців мишей, на відміну від самиць, викликає більший відсоток летальності, у зв'язку з анатомічними особливостями органів видільної та репродуктивної системи самців. Зокрема, регуляція м'язів детрузорів та сфінктерів сечового міхура у самців знаходиться під прямим контролем СМ, а також симпатичної і парасимпатичної нервової системи. У той час як відновлення моторної функції після травми СМ у самиць відбувається краще, ніж у самців, оскільки ЦНС по-різному відповідає на травму, а особливості патофізіологічних процесів можуть бути зумовлені статевими автори – особливостями відмінностями, а саме, як зазначають деякі гормонального фону [53, 54].

Варто зауважити, що наслідки такого типу травми також залежать від рівня пошкодження СМ. Встановлено, що половинний перетин СМ мишей на рівні С3/С4 призводить до порушення моторної активності іпсилатеральної кінцівки мишей [55]. Проте, через 56-ть діб після травмування спостерігається спонтанне функціональне відновлення. Крім того, існують також відмінності у відновленні активності передніх та задніх кінцівок. Так, показано, що на 58-у добу функція передніх кінцівок лише частково відновлюється, тоді як задніх – повністю протягом 7-ми діб після пошкодження. Такі відмінності можуть бути зумовлені локальним запальним процесом поблизу місця перетину, що знаходиться ближче до передньої кінцівки [55, 56]. А неповний перетин СМ у поперековому відділі, призводить до сенсоромоторних порушень вище та нижче ділянки травмування [56].

Підтипом половинного перетину вважають гемісекцію СМ, що передбачає лише надріз поперечника, а не повний його перетин. Тому розрізнять два типи гемісекції нервової тканини: дорзальна, за якої здійснюють пошкодження всієї твердої оболонки СМ та частини тканини власне СМ на дорзальному боці стовбура СМ; і латеральна гемісекція, що вимагає такого ж надрізу на латеральній частині стовбура СМ [16].

Дорсолатеральний розріз CM здійснюють для переривання руброспінального тракту [16]. У випадку дорзальної гемісекції шийних відділів СМ з пошкодженням кортикоспінального тракту, здійснюють оцінку регенерації активністю передньої кінцівки нервової тканини моторною за експериментальних тварин, використовуючи різні поведінкові тести, наприклад, підняття по драбині, сила стискання предмету та утримання кульки [20].

Латеральна гемісекція передбачає перерізання всіх трактів СМ з одного боку, зберігаючи цілісність деяких чи всіх трактів з протилежної сторони [20, 57].

Загалом, патоморфологічні ознаки гемісекції включають повний розрив аксонів у зоні надрізу, нашарування сполучної тканини та гліального рубця, що складається з менінгіальних фібробластів та астроцитів. На сьогодні, модель гемісекції вважається ефективною для експериментальних досліджень, зокрема, росту аксонів в межах гліального рубця [16, 20, 57].

1.1.4. Морфологічні зміни тканини спинного мозку після травми Клітинна смерть, як різновид вторинного ураження СМ вважається одним із ключових патогістологічних характеристик травмованого СМ. Так, загибель нервових клітин відбувається різними шляхами у відповідь на виділення певних медіаторів, синтез яких зумовлений травмою. Апоптоз та некроз тривалий час вважали основними типами загибелі нервових клітин внаслідок пошкодження тканини СМ. Проте, нещодавно виявлено дванадцять додаткових форм загибелі клітин, зокрема, некроптоз, піроптоз та аутофагію [58, 59].

Апоптоз нині є найбільш дослідженим механізмом клітинної смерті. Під апоптозом розуміють запрограмований енергозалежний шлях загибелі клітин, що розвивається вже у перші години після травми та характеризує її гострий період [60]. Апоптоз нейронів характеризується зморщенням їх соми і фагоцитозом без індукції запальної відповіді. Такий тип загибелі, як комплекс процесів, характеризується біохімічними змінами в ядрі та цитоплазмі. Апоптоз проходить у дві фази, обидві з яких зумовлені запуском відповідних генетичних каскадів [60, 61]. Перша, оборотна, фаза апоптозу нейронів не викликє морфологічних змін у клітинах. Ця фаза клітинної загибелі характеризується лише активністю внутрішньоклітинних факторів та індукторів апоптозу [62].

Більш помітні зміни морфології нейронів спостерігаються після другої, вже незворотної, фази апоптозу [63]. Так, спостерігається фрагментація ядра, збільшення щільності в клітинах та утворення цитоплазматичних пухирців. Також за другої фази апоптозу нейронів відзначається цитоплазматичне "зпінювання" або кластеризація – процес утворення на поверхні клітин кластерів у вигляді везикул. Після цього відбувається набухання мітохондрій внаслідок відкриття мембранних пор та вивільнення в цитоплазму білків з міжмембранного простору. Такий процес, в свою чергу, призводить до підвищення щільності органел, але при цьому не впливає на їх цілісність протягом всіх стадій апоптозу [63]. Згодом відбувається майже повна деградація крист мітохондрій з паралельним зростанням мітохондріальної щільності. Загалом, апоптична загибель клітин опосередковується індукцією генів, передбачає синтез сигнальних молекул та активацію ендонуклеаз [64]. Важливою ознакою апоптозу нейронів вважають і агрегацію рибосом у кристалоподібні структури, появу пучків мікрофіламентів над плазмолемою, розширення гладенького ендоплазматичного ретикулуму (ЕПС) та утворення везикул, наповнених рідиною. Врешті решт, відбувається деградація ДНК нейронів та перетворення

органел на мембранні фрагменти, зокрема, апоптичні тільця різної форми [24, 62, 63, 64].

ТСМ призводить також до некрозу нейронів, що зумовлює порушення механічної цілісності тканини, і виступає основою для розвитку гострої та субгострої стадій пошкодження [64]. На відміну від апотозу, некроз – неконтрольований процес спонтанної загибелі клітин, зумовлений запуском неапоптотичних механізмів клітинної смерті внаслідок сильного стресу. Некроз нейральних клітин виникає внаслідок ряду факторів, зокрема, накопичення токсичних компонентів крові, глутаматної токсичності, йонного дисбалансу, вивільнення прозапальних цитокінів нейтрофілами та лімфоцитами, утворення вільних радикалів, а також виснаження пулу АТФ. Вважають, що такі процеси призводять до миттєвого набухання клітин та їх лізису [24].

На відміну від апоптозу, процес некрозу, не супроводжується компактизацією ядра, конденсацією хроматину, утворенням пухирців на цитоплазматичній мембрані та дезінтеграцією клітин у численні везикули. Неконтрольований лізис клітин під час некрозу відбувається без формування лізосомальних везикул [65]. Натомість, некроз нейронів характеризується пермеабілізацією мембран, набряком клітин, пошкодженням органел, розривом лізосом, деградацією клітин власними ферментами, денатурацією білків, збільшенням площі шорсткого ЕПС. Збільшення щільності та зернистості цитоплазми завершується каріолізисом. Усі ці процеси, врешті, призводять до запалення нервової тканини внаслідок вивільнення у міжклітинний простір компонентів некротизованих нейронів та пошкодження сусідніх клітин [66].

Некроптоз – запрограмований некроз, високо регульований, каспазонезалежний тип загибелі клітин, подібний за морфологічними характеристиками до некрозу [65, 66, 67, 68].

До інших форм загибелі нервових клітин, зокрема, нейронів, належить аутофагія [69]. У нормі аутофагія відіграє ключу роль у підтримці гомеостазу клітин шляхом постачання їх білками та органелами. За умови патологічного стану, а саме, TCM, аутофагія нейронів супроводжується денатуацією білків, набуханням мітохондрій, збільшенням площі ЕПС і апарату Гольджі та, як наслідок, руйнуванням органел [69]. Залишки зруйнованих білків, пошкоджені органели огортаються двомембранними структурами аутофагосомами, що, зазвичай, розташовуються в аксонах, синаптичних терміналях та дендритах, та надалі транспортуються до соми для розщеплення лізосомами [70].

Нині виділяють три форми аутофагії. Шаперон-опосередкована аутофагія передбачає розпізнавання фрагментів білків трансмембранними лізосомними протеїнами та їх спрямоване транспортування через мембрану лізосом. Мікроаутофагія, як друга форма аутофагії, включає переміщення лізосомних мембран до невеликих ділянок нейроплазми чи нуклеоплазми [71]. За макроаутофагії спостерігається власне ізоляція цитоплазматичних білків та органел у аутофагосоми. Подальше дозрівання аутофагосом включає розчинення внутрішньої мембрани, ацидофікацію, **ïï** транспотування та ЗЛИТТЯ аутофагосомних везикул з лізосомами. Ця ланка аутофагії отримала назву хроматолізис [69]. Порушення процесу лізосомного протеолізу пошкоджених білків та органел, зазвичай, зумовлює додаткове накопичення патогенного клітинного дебрису, що призводить до загибелі нейронів [24, 69, 70, 71].

Крім того, серед наслідків ТСМ окремо виділяють нейрозапалення, як основний процес вторинного механізму пошкодження СМ у посттравматичний період [69]. Основними клітинами, що беруть участь у розвитку нейрозапалення вважають нейтрофіли, резидентні мікрогліальні клітини, астроцити та дендритні клітини, макрофаги гематоенцефалічного бар'єру, В- та Т-лімфоцити [24].

Загибель макроглілальних клітин, тобто, астроцитів та олігодендроцитів має свої особливості, а саме, супроводжується фрагментацією нуклеосомної ДНК, зупинкою реплікації ДНК, протеолізом поліпептидів та набуханням мітохондрій [74].

Окремої уваги заслуговує такий патологічний процес при ТСМ як астрогліоз, що характеризується морфологічними та функціональними змінами астроцитів внаслідок пошкодження нервової тканини різного ґенезу. Морфологічно астрогліоз характеризується гіпертрофією гліальних клітин, протеолітичною деградацією структурних білків з подальшим утворенням білкових кластерів, сигнальних молекул та ферментів репарації ДНК [71, 72, 73, 74].

Гліальні клітини, як і нейрони, зазнають некротичних змін. Некроз гліальних клітин супроводжується загальним знебарвленням клітин, їх розм'якшенням та запаленням [74]. Запуск патофізіологічних каскадів у гліальних клітинах призводить до руйнування наявного мієліну та порушення синтезу нових ліпідно-білкових речовин. Крім того, для гліальних клітин характерний процес розщеплення мієлінового дебрису та компонентів некротизованих клітин [75].

1.1.5. Природа посттравматичного рубця. Дегенеративні процеси нейронів, пов'язані з ТСМ різного генезу, призводять до руйнування синаптичних контактів, демієлінізації та порушення проведення нервового імпульсу внаслідок ушкодження аксонів [75].

Первинне ураження нервової тканини активує вторинні патофізіологічні механізми, зокрема, судинні, запальні та біохімічні зміни, що напряму впливають на функціональний стан нервових клітин [76]. Як первинні, так і вторинні процеси в травмованій тканині СМ активують гліальні клітини (а саме астроцити), фібробласти, періоцити, Шваннівські клітини та мікрогліальні клітини. У відповідь на пошкодження активована глія виділяє токсини, цитокіни. Подальший розвиток ураження зумовлюється надходженням із судин імунних клітин. Фібробласти інфільтруються або з периферії, або диференціюються з інших нерезидентних клітин, та закладають основу позаклітинного матриксу з інгібіторними властивостями [75, 76].

Недостатня регенерація нервової тканини після ТСМ зумовлена переважно позаклітинним посттравматичним середовищем, адже його визначальним компонентом є рубець, що відіграє ключову роль у обмеженні функціонального відновлення СМ після травми [78]. Рубець вміщує певну частину ураженої тканини СМ та ізолює її від неушкоджених нервових клітин

[79]. У той же час відновлення цитоархітектоніки СМ є неможливим у межах тканини рубця та навколо нього внаслідок такої ізоляції від інтактної тканини та у зв'язку із розвитком активних процесів окислювального стресу, що відбуваються в тканині рубця. Окрім того, ускладнюють регенерацію ушкодженої нервової тканини і власні позаклітинні інгібуючі фактори рубця [79]. Роль рубця, зокрема, гліального походження досі однознозначно не встановлена. Адже, реактивний астрогліоз нині вважають незворотним патофізіологічним процесом [77, 79]. З одного боку, доведено, що нейральна пластичність під час астрогліозу може коригуватись складом позаклітинного середовища; а негайне після травми утворення рубця необхідне для стабілізації нервової тканини [78, 79].

Експериментальні дослідження встановили особливості рубця у ГМ та СМ [79]. Так, після ушкодження ГМ щурів було показано, що посттравматичний рубець складається з клітин та позаклітинного матриксу, зокрема, хондроїтинсульфатних протеогліканів. Така травма ГМ підтверджує суперечливу функцію рубця в процесі дегенерації тканини ГМ, адже загоєння рани у цьому випадку є малоефективним, а спричинені травмою патологічні зміни майже не підлягають коригуванню [72]. Крім того, існує відмінність в утворенні посттравматичних рубців ГМ і СМ, яка зумовлена кількома факторами. Так, типи клітин, залучені до цих частин ЦНС фенотипово різняться. Крім того, існують відмінності в рівнях запалення нервової тканини: на відміну від травми ГМ, ушкодження СМ у більшості випадків супроводжується розвитком астроцитозу, що підвищує виділення цитокінів та лейкоцитів. відмінності прозапальних Істотні спостерігаються і на рівні позаклітинного середовища ГМ та СМ [80].

Рубець, що утворюється внаслідок TCM складається з ядра ушкодження, що формується фібробластами стромального походження і запальними імунними клітинами, та межі ушкодження/пенумбри, яка оточує ядро і скаладається з гіпертрофованих астроцитів. Першопочатково, термін «гліальний рубець» використовували для означення астроцитарної складової рубця. Але з часом, деякі дослідники почали використовувати цей термін для означення всієї зони рубця СМ [81]. Вважається, що всі компоненти зони ТСМ (ядро, астроцитарна пенумбра та оточуюча тканина) взаємодіють в обох напрямках. Після травми СМ, астроцити також регулюють експресію гліального кислого фібрилярного білка. Крім того, астрогліоз призводить до синтеза ряду цитокінів, молекул клітинної адгезії та молекул позаклітинного матриксу [80, 81]. Деякі з останніх, а саме, хондроїтинсульфатні протеоглікани, пригнічують ріст аксонів. Нині, рубець вже не вважають ізольованою структурою, тому все частіше нейрофізіологи вживають термін «рубець ТСМ» [79, 80, 81, 82].

Особливості та період формування гліального рубця СМ різниться у різних видів тварин [83]. Період формування гліального рубця у лабораторних мишей не встановлено, проте, виявлено, що гліальний рубець у їх СМ характеризується великою щільністю, адже формується юкставаскулярними астроцитами та астроцитами, що диференціюються з епендимальних клітин центрального каналу СМ [81, 83]. За умови видалення гліального рубця на ранніх етапах посттравматичного періоду спостерігають збільшення зони ураження нервової тканини та зниження відновлення функціональної активності у мишей. У лабораторних щурів астроцити створюють фізичний бар'єр на місці гемісекції вже на 1-2-й тижні після ТСМ та експресують речовини, що пригнічують ріст аксонів [83, 84]. На 2-3-му тижнях посттравматичного періоду гліальний рубець повністю сформований. На відміну від щурів, у людей формування гліального рубця припадає на 4-6-й місяць після травмування СМ, хоча реактивний астрогліоз розвивається значно раніше, зокрема вже на 1-2-му тижнях після травмування. У людей гліальний рубець вважають хронічним, адже клінічні дані підтверджують його наявність і протягом 30-ти років посттравматичного періоду [83].

Таким чином, астроцити можуть здійснювати позитивний або негативний вплив на процес відновлення тканини СМ, залежно від терміну посттравматичного періоду та особливостей взаємодії реактивних астроцитів з іншими типами клітин.
Фібрилярний рубець, формується при більшості видів ТСМ. Такий тип рубця характеризується утворенням порожнини в м'якій оболонці СМ та накопиченням у місці травмування фібробластів, що синтезують щільний позаклітинний матрикс [83, 85].

У мишей при ТСМ виявлено перицитні клітини, що накопичуючись у фібрилярному рубці, сприяють його активній васкуляризації [78, 83]. У щурів фібрилярний рубець формується фібробластами або ж фіброцитами, білками позаклітинного матриксу, зокрема, колагеном 4, ламініном та фібронектином. На 3-7-му добу після травмування, тобто на стадії незрілого фібрилярного рубця, спостерігається ангіогенез в місці травмування СМ. Проте, згодом формуються шари базальної мембрани, що призводить до погіршення васкуляризації [83].

У людей фібрилярний рубець складається з неклітинних компонентів, а саме колагену, ламініну та фібронектину, що більше концентруються в місці ядра травми, менше – у місці зосередження астроцитів, пенумбрі [82, 86, 87].

Зважаючи на структурні особливості, усунення терапевтичним методами гліального рубця значно складніше, ніж фібрилярного [82]. Адже, з одного боку, гліальний рубець багатий на ламінін, фібронектин, тобто основні складові сполуки позаклітинного середовища, а, з іншого боку, гліальний рубець має інгібіторну зону, клітини якої синтезують хондроїтинсульфатні протеоглікани [82, 86, 87]. Загалом, астрогліоз – складний наслідок травми, адже зберегти позитивний вплив глії надзвичайно складно під час усунення інгібіторного впливу рубця [82].

1.2. Будова органів видільної та репродуктивної системи мишей

Органи видільної та репродуктивної системи – одні з перших систем соматичних органів, на які впливає ТСМ як у самців, так і у самиць. Видільна система мишей представлена парними нирками, парними сечоводами, сечовим міхуром та сечовивідним каналом [88].

Нирки – бобоподібний орган, розташований на дорзальному боці черевної стінки тіла тварини. Права нирка у мишей обох статей фізіологічно роміщена вище лівої. Проте, у самців нирки більші за розміром, ніж у самиць [88, 89].

Сечовий міхур мишей – порожнистий, м'язовий, еластичний орган, що розташований у дорзо-каудальній ділянці черевно-тазової порожнини, а саме: над простатою у самців та на рівні вагіни у самиць мишей [88]. Сечовий міхур поділяється на дві ділянки: тіло міхура, що складається переважно із детрузорних гладеньких м'язів, та основу міхура – невелику ділянку, що має вигляд трикутника та пролягає від сечовода до сечовивідного каналу. Сечовий міхур виконує роль резервуару для зберігання та періодичного вивільнення сечі. Сеча надходить до міхура через сечоводи та виходить з організму через сечовивідний канал. Наповнений сечею міхур має форму кулі. Після вивільнення сечі, міхур набуває овальної форми з максимальним діаметром 4 мм [88].

Органи видільної та репродуктивної систем самців мишей представлені сечовим міхуром, сечовивідним каналом, сім'яниками, допоміжними статевими залозами (великі сім'яні міхурці, багатопелюсткова передміхурова залоза, ампулоподібні пухирці, бульбоуретральна залоза) та статевим членом. Пубертатний вік самців мишей в середньому складає 5 тижнів після народження (рис.1.1) [88, 89, 90].

Видільна система самиць мишей складається із нирок, сечовивідних шляхів та сечового міхура [88]. Загальна анатомічна структура репродуктивної системи самиць мишей подібна до такої у більшості ссавців, які дають багато потомства. Так, жіноча репродуктивна система мишей складається з парних яєчників, дворогої матки з відносно коротким тілом і довгими рогами, шийки та піхви [88, 91] (рис. 1.3).

38



Рис.1.1 Схематичне зобаження органів видільної та репродуктивної системсамців мишей: 1 – сечовий міхур; 2 – сім'яний пухирець; 3 – сім'явивідні протоки; 4 – передня частина передміхурової залози; 5 – дорсальна частина передміхурової залози; 6 – латеральна частина передміхурової залози; 7 – вентральна частина передміхурової залози; 8 – уретра [89]



Рис. 1.2 Схематичне зображення органів видільної та репродуктивної систем самиць мишей: 1 – яєчник; 2 – яйцепровід; 3 – маткова труба; 4 – сечовий міхур; 5 – уретра; 6 – шийка матки; 7 – вагіна; 8 – кліторальна залоза [90]

У зрілих фертильних самиць мишей, віком від 5-6-ти місяців, гастральний цикл, зазвичай, триває 4 дні за умови, якщо тварина не спарювалась. У проміжку між пубертатним періодом та зрілістю тривалість циклу складає не більше 5 днів. 3 віку 12-ти місяців репродуктивна система самок починає старіти, тому тривалість циклу збільшується з можливою втратою нормальної циклічності [88, 91].

1.3. Відмінності наслідків травмування спинного мозку у тварин різної статі

Деякі клінічні та експериментальні дослідження вказують на відмінності відновлення тканини СМ після травмування. Особливості фізіологічного та анатомічного відновлення у обох статей, у першу чергу, пов'язують із відмінностями гормонального фону. Проте, досі вчені не дійшли єдиної думки щодо впливу статевих гормонів на відновлення СМ після травмування [92].

Дослідження відмінностей посттравматичного відновлення тканини СМ у тварин різної статі вперше почали проводити на мишах. Так, було виявлено, що відновлення моторної функції після травми СМ у самиць гризунів відбувається краще, ніж у самців, оскільки ЦНС у самців і самиць по-різному відповідає на травму СМ.

На сьогодні відомо кілька фізіологічних механізмів, що зумовлюють різний ступінь пошкодження та ефективність подальшого відновлення тканини СМ у тварин різних статей. Так, значну роль у відновленні нервової тканини після травмування відводять мікрогліальним клітинам, що відповідають за локальну імунну відповідь нервової тканини та впливають на формування нейронних мереж.

На моделі розрізу СМ встановлено, що у самиць, завдяки статевим гормонам, які впливають на активність мікрогліальних клітин, спостерігається активніше відновлення тканини СМ. Визначальним гормоном вважають жіночий

статевий гормон естроген. Так, естроген здійснює нейропротекторний вплив шляхом покращення притоку крові до нервової тканини завдяки зниженню синтезу окису азоту (NO). Таким чином, естроген спричиняє розслаблення судин NO-незалежним шляхом завдяки прямій стимуляції К-каналів гладеньких м'язів. Наприклад, у мишей, нокаутованих за геном *ICAM-1* та P-селектину, спостерігається краще відновлення моторної функції кінцівок після TCM, що може вважатись механізмом нейпротекції естрогеном. Проте, у ряді досліджень підтверджена незалежність відновлення моторної функції від активності NOсинтаз після TCM [93].

Інший можливий нейропротекторний механізм естрогену у самиць мишей зумовлений його антиоксидантними властивостями, що, в свою чергу, у самців призводить до високого рівня оксислювального стресу. Окрім того, краще відновлення нервової тканини у самиць може бути спричинене впливом естрогену на антиапоптотичні протеїни, зокрема, Bcl-2, рівень яких зростає у посттравматичний період. Встановлено, що додавання 17β-страдіолу до культури нейронів *in vitro* знижує рівень Bcl-2 та підсилює стійкість нейронів до ексайтотоксичності [93, 94].

Зважаючи на вищевказані дані, було провено дослідження наслідків лікування самців щурів з ТСМ естрадіолом. Виявлено покращення моторної функції задніх кінцівок, анаболічний вплив на скелетні м'язи, зменшення запалення в тканині СМ, пригнічення апоптозу нервових клітин, реактивного астрогліозу, нейтралізації вільних радикалів, завчасне вивільнення цитокінів, поява астрогліальної відповіді та, як наслідок, зменшення площі пошкодженої тканини і регенерації білої речовини СМ самців [94].

Проте, введення з терапевтичною метою естрадіолу сумісно з дигідротестостероном не призводило до вищезгаданих бажаних результатів внаслідок андроген-опосередкованої імуносупресії, що необхідно враховувати під час розробки та оптимізації терапевтичних підходів для регенерації травмованої тканини СМ у самців [94].

41

різноманітних Ha моделях TCM щурів підтверджено також нейропротекторний вплив не лише естрогену, а й тестостерону – чоловічого статевого гормону. Як і естроген, тестостерон, попереджає клітинну смерть, сприяє функціональному відновленню нервової тканини, покращенню моторної функції кінцівок та стимулює ріст аксонів мотонейронів після пошкодження периферичних нервових відростків. Механізми, за якими чоловічий статевий гормон здійснює нейропротекторний вплив, включають регуляцію апоптозу нервових клітин, підвищення рівня гліофібрилярного кислого білка (GFAP) та забезпечення гліальної відповіді. Тестостерон також регулюює дію протеїнів, що володіють нейропротекторними, антиоксилантними i прозапальними властивостями, та впливає на активність нейротропного фактору мозку (BNDF – brain derived neurotrophic factor) [94].

На моделі контузії СМ самців мишей та щурів також виявлено участь тестостерону у посттравматичній імуносупресії. Для підтвердження андрогенопосередкованої імуносупресії, групу експериментальних тварин стерилізували. У результаті дослідження на 13-ту добу після моделювання травми було встановлено, кращу моторну активність стерилізованих тварин, у порівнянні із псевдооперованими [96, 96, 97].

1.4. Вплив різного типу травм спинного мозку на органи видільної та репродуктивної систем тварин

ТСМ призводить не лише до дегенеративних змін у нервовій тканині, а й до негативного впливу на соматичні органи. У першу чергу внаслідок пошкодження тканини СМ, дегенеративних змін зазнають органи видільної та репродуктивної систем у обох статей. Ряд статистичних даних свідчать про відмінності наслідків травмування СМ на органи видільної та репродуктивної системи у чоловіків і жінок [98].

42

Молоді чоловіки, віком 16-30-и років, у 4 рази частіше страждають від наслідків ТСМ, що виявляється в труднощах сечовиспускання, зниженні фертильності і загального рівня життя загалом, еректильній, ендокринній та сексуальній дисфункціях, а також слабкому сперматогенезі та анормальній еякуляції [98, 99].

Зовнішньосфінктерна диссинергія – патологія сечовидільної системи, що виявляється у порушенні скорочення детрузорів та анормальному скороченню сфінктеру сечівника, і вважається однією з найбільш складних наслідків ТСМ. А лікування такого стану передбачає катетеризацію сфінктера, яка пов'язана із великим ризиком геморагії, еректильної дисфункції та вимагає повторюваних терапевтичних процедур [100, 101].

ТСМ призводить до порушення гломерулярної фільтрації нирками [101]. Наприклад, повний перетин СМ на рівні Т11 у людей призводить до гідронефрозу та ниркової недостатності. Гіпергідроз пов'язаний із нейрогенним міхуром та проявляється у зростанні внутрішньовезикулярного тиску. Лікування таких патологій здійснюється шляхом катетеризації [102]. З часом внаслідок ТСМ спостерігається загальна дегенерація нирок [103].

У 95% чоловіків з ТСМ виявлено інфертильність, аспермію та анеякуляцію [104, 105]. Пролонгована анеякуляція, в свою чергу, призводить до некрозу та лейкоспермії, що унеможливлює вагітність у жінок [106, 107].

Зниження функції тестикул внаслідок ТСМ пов'язане зі зміною рівня тестостерону та гонадотропінів, що надалі призводить до розвитку гонадотропного гіпогонадизму [108].

ТСМ призводить і до зміни характристик сперматозоїдів: їх виживаності та порушення цілісності ДНК. Тому утворення сперматозоїдів із менш конденсованим хроматином та вищим рівнем апоптозу гамет вважається основною причиною інфертильності у чоловіків [109, 110].

Супутніми наслідками впливу ТСМ також вважають інфікування органів видільної та репродуктивної систем. У пацієнтів з ТСМ внаслідок необхідності катетеризації уретри відзначають інфікування уретри, промежини та крайньої плоті статевого члена Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Proteus stuartii та Staphylococcus epidermidis [109, 110, 110].

Дослідження морфофункціональних змін в органах видільної та репродуктивної систем після ТСМ на експериментальному рівні найчастіше проводять на самцях собак та лабораторних гризунах [112, 113, 114].

Варто зазначити, що все частіше пошкодження СМ зазнають жінки. Так, щороку в США фіксують близько 2 400 нових випадків ТСМ саме у жінок. У свою чергу, у США налічується 27 млн недієздатних жінок, 39 000 з них отримали інвалідність внаслідок ТСМ різних типів [116].

Як і у чоловіків, робота сечовивідних шляхів у жінок після ТСМ також порушується. А саме, відзначають нетримання сечі внаслідок дисфункцій сечового міхура, за якого спостерігається гіперактивність міхура, що може виявлятися у нетриманні сечі, гіперактивний роботі уретрального сфінктера та паралічі нижніх м'язів сечівника, що в результаті призводить до його нейрогенного стресу [116, 117].

Автономна дисрефлексія сечівника у жінок, яка розвивається внаслідок TCM, проявляється підвищенням систолічного та діастолічного тисків його судин. Причиною автономної дисрефлексії вважають посттравматичне збільшення рівня простагландинів та катехоламінів, які і сприяють вазоконстрикції та гіпертензії. Така патологія, у свою чергу, призводить до дисменореї, контрактури матки і сечового міхура, а також супутнього інфікування органів видільної та репродуктивної систем [118].

Як у чоловіків, так і у жінок, внаслідок TCM спостерігаються патології нирок, зокрема, сечокам'яна хвороба та ниркова недостатність, що в свою чергу погіршує сечовиспускання [119].

Пошкодження СМ у жінок призводять до аменореї у 77,50% випадків: більшість із них відзначають відновлення менструального циклу, хоча тривалість та об'єм виділень значно зменшується внаслідок травмування [120, 121, 122]. Як і у чоловіків, катетеризація сечівника у жінок з часом призводить до інфікування сечовивідних шляхів *Escherichia coli* та *Enterococcus* species, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus* species [123, 124, 125, 127]. Вагінальне інфікування, зазвичай, спостерігається внаслідок зростання кількості *Trichomonas vaginalis* та *Candida* species, а цервікальні інфекції повязані із *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* та *Mycoplasma* species [127, 128, 129, 130].

Репродуктивна функція у жінок з ТСМ не зазнає настільки тяжких наслідків, як це спостерігається у чоловіків. Так, у статевозрілих пацієнток із ТСМ (віком 18 – 49-ти років) відзначають можливість завагітніти: так, у 2% оглянутих жінок вагітність наставала протягом перших 12-ти місяців після травмування [131, 132]. Проте, нерідко протягом першого триместру вагітності у таких пацієнток відзначають високий ризик абортів внаслідок численних мальформацій, інсультів, перепадів кров'яного тиску та гіпоксії [133, 134].

Дослідження наслідків впливу травмувань СМ на органи видільної та репродуктивної систем самиць проводять переважно на лабораторних гризунах, зокрема, на мишах [135, 136]. Хоча даних, які б описували цілісну картину таких негативних змін в органах видільної і репродуктивної систем саме у самиць, досі недостатньо.

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Методичні підходи

З метою дослідження морфофункціональних змін у тканині СМ та органах видільної і репродуктивної систем самців і самиць мишей було використано наступні методи:

- 1. моделювання ТСМ ЛПП;
- 2. поведінкові тести для визначення функціональної активності ЗІК за шкалою ВВВ та В;
- 3. поведінкові тести для визначення рівня спастичності ЗІК тварин за шкалою Ashworth;
- 4. транскардіальна перфузія;
- 5. забарвлення гематоксилін-еозином тканини СМ;
- імуногістохіміче забарвлення тканини СМ (маркер мікротрубочок нейронів β(III)-tubulin, маркер соми астроцитів GFAP, маркер білка мієліну MBP, маркер соми мікрогліальних клітин Iba-1) з подальшим аналізом на лазерному скануючому конфокальному мікроскопі;
- забарвлення гематоксилін-еозином органів видільної та репродуктивної систем;
- 8. статистичний аналіз даних.

2.1. Об'єкт дослідження

На самцях і самицях мишей лінії *FVB*, віком 2-3 місяці та масою 20-25 г, моделювали травму СМ (ЛПП) на рівні нижніх грудних сегментів (Т10-Т11). Мишей розділили на чотири групи: 1 – контрольні самці (далі «Контроль самці») (n=12), 2 – контрольні самиці («Контроль самиці») (n=12), 3 – самці з ЛПП СМ (далі «ТСМ самиці») (n=38) та 4 – самиці з ЛПП СМ (далі «ТСМ самиці») (n=36).

Варто зазначити, що така модель ТСМ на цій лінії мишей нами проведена вперше.

Тварин утримували у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на стандартному раціоні харчування. Усі роботи з експериментальними тваринами було проведено з дотриманням Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" [137], "Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою", принципів біоетики та норм біологічної безпеки [138], що було підтверджено Комітетом біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Витяг з протоколу №2/24 від 22.05.2024).

2.2. Моделювання травми спинного мозку

Усі маніпуляції з тваринами проводили в асептичних умовах з використанням дезінфікуючих розчинів для обробки місця оперативного втручання та стерильних інструментів для власне моделювання TCM.

Для анестезії тварин було використано суміш 50 мг/кг кетаміну ("ALFASAN", Нідерланди) та 25 мг/кг ксилазину ("БІОЛЕК", Україна) у розрахунку на масу тіла тварин. Місце для внутрішньоочеревинного уколу знезаражували 70% розчином спирту. Хвіст тварини брали правою рукою, щоб затримати на одному місці, а лівою рукою — за загривок так, щоб тварина не змогла поворухнути головую, але при цьому не задихнулась. Потім мишу перевертали вентральною стороною вгору, її ліву ногу та хвіст закріплювали в розтягнутому положенні мізинцем лівої руки; місце правіше і трохи вище від сечового міхура знезаражували 70% розчином спирту і вводили голку під кутом 45% з розчином кетаміну та ксилазину. Надалі перевіряли наявність надмірної кровотечі, яка свідчила б про неуспішність анестезування. Введення тварин в наркоз проводили за кімнатної температури в умовах темноти. Для оцінки стану наркозу перевіряли наявність двох рефлексів: кліпання ока у відповідь на легке подразнення вій та відсмикування лапи у відповідь на натискання. Після досягнення потрібного рівня анестезії та аналгезії, тварину розміщували на операційній поверхні.

Потім очі тварин змащували 0,2% гелем «Відісік» (Німеччина) з метою попередження їх пересихання під час оперативного втручання. Шляхом пальпацій визначали останні два ребра тварини, що відповідало хребцю Т11. Після підстригання шерсті в необхідній ділянці шкіру обробляли 10% розчином «Бетадину» («Egis», Угорщина). Спочатку розрізали шкіру вздовж хребта довжиною приблизно 2 см, далі жирову оболонку та міжхребцеві м'язи над 1-2ма хребцями. Після ламінектомії верхніх дуг Т11 хребця проводили ЛПП СМ шляхом перетину СМ на рівні T10-11 за допомогою офтальмологічних ножиць шляхом введення однієї з бранш у лівий поперечних СМ впритул до хребтової артерії (без її перетину) та перерізання всього лівого поперечника. Під час моделювання такого типу травми важливо не пошкодити хребтову артерію задля попередження кровотечі.

Після досягнення гемостазу зшивали м'язи, жирову клітковину та шкіру тварин. Шкіру тварин для знезараження обробляли 10% розчином «Бетадину» («Egis», Угорщина).

Введення та виведення тварин з наркозу та увесь процес моделювання ЛПП СМ проводили на електричній грілці за температури 32-35°С та в умовах денного освітлення.

2.3. Поведінкові тести

На 1-, 2-му тижні, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- та 12-му місяцях після ЛПП СМ у самців та самиць мишей оцінювали показники локомоторної активності ЗІК за шкалою ВВВ та В, а оцінку рівня спастичності ЗІК проводили з використанням шкали Ashworth.

2.3.1. Тестування моторної активності ЗІК у мишей різної статі за шкалою ВВВ. Шкалу моторної активності ВВВ (0-21 бал) було розроблено в 1995 році і нині широко застосовують для визначення посттравматичної локомоторної активності кінцівок у гризунів. Ця шкала дозволяє оцінити посттравматичне відновлення рухів у суглобах ЗІК, координацію задніх кінцівок тварин, а також крокування, положення хвоста та підтримання маси тіла [139, 140].

Загалом виділяють три стадії відновлення у межах шкали ВВВ:

- рання стадія (0-7 балів) характеризується видимою спонтанною руховою активністю ЗІК, слабкими або поширеними рухами в одному-двох суглобах ЗІК, слабкими рухами у всіх трьох суглобах ЗІК, поширеними рухами у двох чи у всіх трьох суглобах ЗІК;

- середня стадія (8-13 балів) відображає крокові синергії стопою вниз без підтримання маси тіла або з підтриманням у стаціонарній позиції, поодинокі моменти крокового руху з частим або постійним підтриманням маси тіла, координація крокового ритму передніх і задніх кінцівок;

- пізня стадія (14-21 бал) описує постійне підтримання маси тіла, плантарну поставу стопи з постійною координацією передніх і задніх кінцівок, постійну передньо-задню координацію рухів лап, повний відрив стопи ЗІК від горизонтальної поверхні у межах крокового циклу при первинно латеральній поставі стопи [141, 142].

2.3.2. Тестування моторної активності ЗІК у мишей різної статі за шкалою В. Шкала В, розроблена у 2006 році виключно для встановлення ступеню відновлення локомоторної активності саме у мишей; дозволяє оцінити відновлення рухів у колінному суглобі ЗІК, координацію кінцівок та плантарну поставу стопи ЗІК [142, 143]. Виділяють чотири фази у межах шкали В для опису функціональної активності:

- рання фаза (0-2 бали) посттравматичного періоду відзначається відсутністю рухів у колінному суглобі ЗІК, слабкими або інтенсивними рухами в колінному суглобі ЗІК;

- середня фаза (3-4 бала) після моделювання травми характеризується плантарною поставою стопи із/без підтримання маси тіла, або періодичним крокуванням;

- за пізньої фази (5-8 балів) відновлення спостерігають часту або постійну поставу стопи без/із частковою координацією задніх кінцівок;

- остання фаза (9 балів) відповідає нормальній локомоторній активності ЗІК,
стабільному положенні тіла та повній координації передніх і задніх кінцівок
[143].

2.3.3. Оцінка рівня спастичності за шкалою Ashworth. За шкалою Ashworth, розробленою в 1964 році, оцінювали рівень спастичності м'язів ЗІК у тварин обох статей [144]. Шкала Ashworth, характеризує ступінь ригідності м'язів ЗІК та здатність виконання пасивних і активних рухів, складається з чотирьох балів:

- 0 балів відповідають відсутності м'язового тонусу;

- 1 бал характеризує незначне зростання м'язового тонусу та незначний супротив під час згинання-розгинання кінцівки;

- 2 бали свідчать про зростання м'язового тонусу та середнього ступеню супротиву під час згинання-розгинання кінцівки;

- 3 бали відображають значний м'язовий тонус та складнощі у виконанні пасивних рухів;

-4 бали характеризують ригідність м'язів кінцівки під час згинаннярозгинання [145].

50

2.4. Транскардіальна перфузія

Перфузія вважається одним з найбільш оптимальних класичних методів довготривалої фіксації тканин, зокрема, нервової тканини [146, 147].

Для проведення транскардіальної перфузії, спочатку тваринам вводили суміш 50 мг/кг кетаміну ("ALFASAN", Нідерланди) та 25 мг/кг ксилазину ("БІОЛЕК", Україна) у розрахунку на масу тіла тварин. Після анестезії тварину поміщали спиною донизу на платформу та фіксували кінцівки. На рівні нижніх ребер проводили горизонтальний розріз шкіри та діафрагми та вертикальні розрізи ребер з обох сторін. Потім проводили розріз на рівні правого передсердя, а в лівий шлуночок вводили голку системи для власне здійснення перфузії. Спочатку промивали судини мишей фізіологічним розчином (ФР) (18-20 мл/тварину, кімнатної температури), а потім – 4% розчином параформальдегіду (ПФА) (Sigma, США), проводили префіксацію тканин тварини. Після цього виділяли хребет тварин (по 1-1,5 см від місця травми), органи видільної і репродуктивної систем: нирки, сечовий міхур, сім'яники із сім'яними міхурцями у самців; та нирки, сечовий міхур, матку і яєчники у самиць мишей. Протягом 7-10-ти діб ізольовані органи зберігали в 4% ПФА. Після виділення СМ з хребтового каналу нервову тканину поміщали в свіжий 4% розчин ПФА на 5 діб для заключної фіксації. Після повної фіксації СМ та органи видільної і репродуктивної систем зберігали у 0,1М фосфатному буфері (ФБ) (pH=7,4) (за температури +4-8°С).

2.5. Забарвлення гематоксилін-еозином зрізів спинного мозку, органів видільної та репродуктивної систем мишей

Для дослідження морфологічних змін у тканині СМ самців і самиць мишей на різних термінах спостереження після ЛПП СМ проводили забарвлення гематоксилін-еозином. Такий метод забарвлення дозволяє оцінити ступінь порушення цілісності нервової тканини, формування рубця та кістозної порожнини у місці травмування на різних термінах посттравматичного періоду [148, 149]. Такий метод забарвлення нервової тканини вважається класичним методом для ряду нейрофізіологічних досліджень [149, 150].

Перед проведенням забарвлення гематоксилін-еозином виготовляли парафінові блоки із СМ тварин, для цього поетапно розміщували нервову тканину в розчинах різної концентрації: спирт 70% (Sigma, CША) (30 хв), спирт 80% (Sigma, CША) (30 хв), спирт 90% (Sigma, CША) (30 хв), спирт 96% I (Sigma, CША) (30 хв), спирт 96% II (Sigma, CША) (на ніч), спирт/ксилол (1:1) (Sigma, CША) (30 хв), ксилол I (Sigma, CША) (30 хв), ксилол II (Sigma, CША) (30 хв), ксилол III (Sigma, США) (30 хв), парафін I (Plastiwax) (40 хв), парафін II (Plastiwax) (40 хв) та заливка в парафін (Plastiwax) (табл.1).

Таблиця 1.

Спирт 70%	30 хв
Спирт 80%	30 хв
Спирт 90%	30 хв
Спирт 96% I	30 хв
Спирт 96% II	на ніч
Спирт/ксилол (50:50)	30 хв
Ксилол I	30 хв
Ксилол II	30 хв
Ксилол III	30 хв
Парафін I	40 хв
Парафін II	40 хв
Заливка в парафін	

Проводка/Заливка в парафін

На мікротомі «Містот НМ 325» (Німеччина) виготовляли зрізи СМ, товщиною 4-5 мкм. Далі проводили депарафінізацію отриманих зрізів шляхом почергового поміщення в ксилол I (Sigma, CША) (5 хв), ксилол II (Sigma, CША) (5 хв), спирт 96% I (Sigma, CША) (5 хв), спирт 96% I (Sigma, CША) (5 хв), спирт 96% II (Sigma, CША) (5 хв), дистильовану воду (2 зміни) (5 хв), гематоксилін (кислий гемалаун Майєра) (Diapath, Італія) (10 хв), під проточну воду (10 хв), дистильовану воду (5 хв),

еозин (водний р-н, 0,5%) (Diapath, Італія) (2 хв), дистильовану воду (5 хв), спирт 96% I (Sigma, США) (5 хв), спирт 96% II (Sigma, США) (5 хв), ксилол I (Sigma, США) (5 хв), ксилол II (Sigma, США) (5 хв) (табл. 2).

Таблиця 2.

Ксилол I	5 хв
Ксилол II	5 хв
Спирт 96% I	5 хв
Спирт 96% II	5 хв
Дистилят (2 зміни)	5 хв
Гематоксилін (кислий гемалаун Майєра)	10 хв
Проточна вода	10 хв
Дистилят	5 хв
Еозин (водний р-н, 0.5%)	2 хв
Дистилят	5 хв
Спирт 96% I	5 хв
Спирт 96% II	5 хв
Ксилол I	5 хв
Ксилол II	5 хв
Заключення в бальзам	

Забарвлення гематоксилін-еозином

Після цього проводили забарвлення заключених зрізів в бальзам та аналізували за допомогою люмінесцентному мікроскопі «Carl Zeiss Axio Z1» (Німеччина) із використанням програмного забезпечення «Zeiss Zen 2.0».

2.6. Імуногістохімічний аналіз зрізів спинного мозку мишей

Якісне імуногістохімічне забарвлення зрізів СМ тварин (n=4 для забарвлення гематоксилін-еозином та імуногістохімічного аналізу відповідно, n=6 – оцінка макрорівня) проводили для більш детального аналізу

морфологічних змін у тканині СМ з метою додаткової оцінки ступеню його пошкодження та встановлення походження рубця.

Для візуалізації нейронів та гліальних клітин проводили подвійне імуногістохімічне забарвлення антитілами до білків: кроляче поліклональне β(III)-tubulin (1:300, Sigma, CША) – маркер білків мікротрубочок нейронів; мишаче моноклональне GFAP (1:200, Sigma, CША) – маркер астроцитів; куряче поліклональне MBP (1:2000, Sigma, США) – маркер основного білка мієліну; кроляче поліклональне Iba-1 (1:500, Sigma, США) – маркер мікрогліальних клітин.

Із фіксованих в 4% розчині ПФА поперечників СМ із ділянкою травми виготовляли зрізи. Заливали СМ в 2% розчин агарози (Sigma, США) з подальшим виготовленням зрізів (товщиною 70-80 мкм) на автоматизованому вібраційному мікротомі «NVSL vibratome» (США); та в парафін з виготовленням зрізів (товщиною 4-5 мкм) на звичайному мікротомі, з їх подальшою депарафінізацією. Далі зрізи обробляли блокуючим розчином: 0,3% TritonX-100 та 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (БСА). Протягом наступних 24-х год зрізи СМ інкубували у суміші первинних антитіл при температурі 4-8°С. Після триразового відмивання у 0,1М ФБ зрізи СМ обробляли сумішшю вторинних Alexa Fluor-488-кон'югованих (1:1000, Invitrogen, антикурячих США), антимишачих Alexa Fluor-555-кон'югованих (1:1000, Invitrogen, США) та антикролячих Alexa Fluor-647-кон'югованих (1:1000, Invitrogen, CША) антитіл візуалізації протягом 2-х годин. Для ядер клітин використовували флуоресцентний барвник Hoechst 33342 (1:2000, Sigma, США).

Зрізи СМ фіксували покривним склом у бальзамі Fluoromount[™] Aqueous Mounting Medium (Sigma, США) та аналізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа FluoView[™] FV1000 (Olympus Inc., Японія) з цифровою фотокамерою, поєднаною з комп'ютером.

54

2.7. Реактиви

Реактиви були придбані в компанії Sigma-Aldrich, Gibco (США).

Приготування ФР здійснювали шляхом розчинення 9 г NaCl у 991 мл бідистильованої води (кінцева концентрація солі – 0,9%). Для приготування 0,1 М ФБ (pH=7,4) використовували розчин солі натрій фосфату одноосновного двозаміщеного та натрій фосфату двоосновного однозаміщеного у відношенні 2:8. Приготування 4% розчину ПФА здійснювали шляхом розведення стандартного 37% розчину ПФА бідистильованою водою у співвідношенні 1:9. Для приготування 2% розчину агарози, 2 г полісахариду розчиняли в 98 мл бідистильованої води до повного розчинення, далі поступово доводили розчин до кипіння задля полімеризації.

2.8. Статистичний аналіз даних

Результати поведінкових тестів, оцінених за шкалами BBB, В та Ashworth, порівнювали між групами самців і самиць та всередині груп тварин обох статей за допомогою програми Statistica 12. Числові результати представлені як «середнє значення \pm стандартна похибка середнього», розміри вибірки зазначені в дужках. Для визначення рівня значущості розбіжностей в порівнянні з контролем та між середніми значеннями в експериментальних групах самців і самиць на різних термінах дослідження використовували критерій Краскела-Уоліса. Достовірні відмінності показників функцій (ПФ) та показників спастичності (ПС) ЗІК у межах кожної групи тварин оцінювали за критерієм Достовірність відмінностей вважали Фрідмана. значущою при р<0.05. Кореляцію показників функціїї та спастичності ЗІК тварин груп самців і самиць на відповідних термінах спостереження оцінювали за допомогою коефіцієнту рангової кореляції Спірмена, результати оцінки виражали у вигляді значення коефіцієнтів r_s із звичайним їх трактуванням.

РОЗДІЛ З РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Моторна активність задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою BBB

ПФ ЗІК самців і самиць мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ оцінювали за допомогою шкали BBB, починаючи з 1-го тижня по 12-й місяць посттравматичного періоду. Достовірну різницю ПФ визначали всередині груп (однієї і тієї ж групи у динаміці) тварин обох статей за допомогою критерію Фрідмана; за критерієм Краскела-Уоліса у порівнянні з контролем та між групами самців і самиць мишей з TCM.

На 1-му тижні спостереження достовірної різниці ПФ ЗІК за шкалою ВВВ всередині груп «ТСМ самці» і групи «ТСМ самиці», та між групами тварин не було виявлено. У групі самців середній бал за шкалою ВВВ становив 1,21±0,23 (n=38) (рис. 3.1, 3.3); тоді як у самиць – 1,39±0,13 бали (n=36) (рис. 3.2, 3.3). Ці показники відповідали видимій руховій активності ЗІК при пересуванні по горизонтальній поверхні, слабких рухах (менше 50%) в одному-двох суглобах ЗІК мишей обох статей.

На 2-му тижні у групі «ТСМ самці» середній показник за шкалою ВВВ складав 1,66±0,23 (n=38) (рис. 3.1, 3.3); у той же час у групі «ТСМ самиці» ПФ ЗІК сягав 1,72±0,20 (n=36) (рис. 3.2, 3.3). У тварин обох статей спостерігали переважно слабкі або поширені рухи у одному-двох суглобах ЗІК у самців і самиць, а у деяких самиць вже відзначали поширені рухи у двох суглобах ЗІК.

Вже на 1-му місяці посттравматичного періоду середній ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у групі «ТСМ самці» становив 2,81±0,27 (n=38) (рис.3.3); р≤0,001 всередині групи у порівнянні з 1-м тижнем (рис. 3.1). А у самиць – 2,86±0,25 (n=36) (рис. 3.3); р≤0,001, всередині групи, у порівнянні з 1-м тижнем (рис. 3.2). На функціональному рівні це виявляли у слабких або поширених рухах у одномудвох або слабких рухах у всіх трьох суглобах ЗІК самців і самиць мишей; у

деяких самців також спостерігали слабкі рухи в одному суглобі і поширені у третьому; а у одиничних самиць групи – поширені рухи у трьох суглобах ЗІК.



Рис. 3.1 Показники моторної активності ЗІК самців мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою BBB: т – тижні, м – місяці; *** – p≤0,001 у порівнянні група «TCM самці» з контролем за шкалою BBB; # – p≤0,05; ### – p≤0,001 всередині групи ЛПП самців за шкалою BBB; ns – достовірність відсутня

У порівнянні з 1-м місяцем спостереження, на 2-му місяці після моделювання ТСМ всередині групи самиць виявили достовірну різницю ($p \le 0,001$) показників за шкалою ВВВ (рис. 3.1), та їх подальший вихід на плато (по 12-й місяць включно); що вказує на незмінність показників функціональної активності ЗІК. На 2-му місяці спостереження показали достовірні відмінності ПФ за шкалою ВВВ між групами самців – 3,24±0,35 (n=38) та самиць – 4,42±0,28 (n=36) (p≤0,05) (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У вказаний термін у самців спостерігали переважно поширені рухи в одному чи двох суглобах ЗІК, і лише у деяких тварин групи – слабкі або поширені рухи в усіх трьох суглобах ЗІК. Тоді як у самиць у

цей період відзначали слабкі або поширені рухи у двох-трьох суглобах ЗІК. Важливо зазначити, що починаючи з 2-го місяця та протягом всього терміну спостереження ПФ за шкалою ВВВ як самців, так і самиць вийшли на плато (рис. 3.1, 3.2, 3.3).



Рис. 3.2 Показники моторної активності ЗІК самиць мишей лінії FVB після ЛПП СМ за шкалою BBB: т – тижні, м – місяці; *** – p≤0,001 у порівнянні група «TCM самиці» з контролем за шкалою BBB; # – p≤0,05, ### – p≤0,001 всередині групи ЛПП самиць за шкалою BBB; пѕ – достовірність відсутня

На 3-му місяці після ЛПП СМ за критерієм Фрідмана достовірних відмінностей ПФ ЗІК за шкалою ВВВ всередині груп самців і групи самиць не виявили. Проте, встановили достовірні відмінності (р≤0,05) ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між групами «TCM самці» та «TCM самиці»: 3,26±0,34 (n=38) та 4,50±0,32 (n=36) відповідно (рис. 3.1, 3.2, 3.3). Так, у самців виявляли незначне зниження рівня локомоторної активності, що виявлялось у слабких та поширених рухах у одному-двох суглобах ЗІК, а у деяких тварин групи – у всіх трьох суглобах. На відміну від самців, у самиць відзначали слабкі або поширені рухи у двох-трьох суглобах ЗІК, а у деяких з них спостерігали крокові синергії стопою вниз без підтримання маси тіла.



Рис. 3.3 Показники моторної активності ЗІК самців і самиць мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою BBB: т – тижні, м – місяці; *** – p≤0,001 у порівнянні група «TCM самці» і «TCM самиці» з контролем за шкалою BBB; # – p≤0,05, ## – p≤0,01 у порівнянні група ЛПП самців з групою ЛПП самиць за шкалою BBB

Вже на 4-му місяці, у порівнянні з 1-м місяцем після ЛПП СМ, всередині групи експериментальних самців спостерігали достовірну різницю (р≤0,05) показників за шкалою ВВВ (рис. 3.1) та їх подальший вихід на плато (по 12-й місяць включно), що вказує на зупинку значущого функціонального покращення локомоторних функцій ЗІК тварин. Так, на 4-му місяці дослідження у тварин обох статей показники за шкалою ВВВ продовжували достовірно (р≤0,05)

відрізнятись: 3,55±0,33 (n=38) у самців та 4,47±0,29 (n=36) у самиць (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У самців спостерігали слабкі або поширені рухи в трьох суглобах ЗІК; тоді як у самиць – переважно поширені рухи в трьох суглобах ЗІК, плантарну поставу стопи без підтримання маси тіла.

На 5-му місяці після ТСМ продовжували виявляти достовірні (р≤0,05) відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ: у самців середній показник складав 3,60±0,32 (n=38), а у самиць – 4,53±0,27 (n=36) (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У самців спостерігали переважно слабкі рухи у трьох суглобах ЗІК, у деяких – поширені рухи в одному-двох суглобах і слабкі у третьому. У той же час у самиць виявляли переважно слабкі рухи в одному-трьох суглобах ЗІК, поширені рухи в трьох суглобах і плантарну поставу стопи без підтримання маси тіла.

На 6-му місяці також відзначали достовірні ($p \le 0,05$) відмінності показників локомоторної активності за шкалою BBB: 3,66±0,34 (n=38) у групі «TCM самці» та 4,56±0,24 (n=36) у групі «TCM самиці» (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У самців мишей на функціональному рівні це відображалось у слабких або поширених рухах в одному-двох чи всіх трьох суглобах ЗІК, у деяких тварин групи – крокових синергіях стопою вниз без підтримання маси тіла. У самиць спостерігали переважно поширені рухи в одному-двох або всіх трьох суглобах ЗІК та плантарну поставу стопи без підтримання маси тіла.

На 7-му місяці після ТСМ продовжували відзначати достовірні (р≤0,05) відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у самців і самиць: 3,68±0,36 (n=38) та 4,58±0,23 (n=36) відповідно (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У самців спостерігали появу слабких рухів в одному суглобі та поширених – у двох суглобах ЗІК, або ж поширених рухах у двох і слабких рухах у третьому суглобі ЗІК. На відміну від самців, у самиць відзначали переважно поширені рухи у двох і слабкі рухи в одному суглобі ЗІК, або поширені рухи у всіх трьох суглобах ЗІК, а також крокові синергії стопою вниз без підтримання маси тіла.

Показники моторної активності ЗІК за шкалою ВВВ на 8-му місяці після ТСМ також достовірно (р≤0,01) відрізнялись між групами самців і самиць: 3,71±0,31 (n=38) та 4,72±0,24 (n=36) відповідно (рис. 3.1, 3.2, 3.3). Так, у самців відзначали поширені рухи у двох суглобах ЗІК, слабкі рухи у двох і поширені рухи в третьому суглобі, а у деяких тварин групи – крокові синергії стопою вниз без підтримання маси тіла. У самиць спостерігали поширені рухи у двох суглобах і слабкі в третьому суглобі ЗІК, або поширені рухи в усіх трьох суглобах ЗІК.

На 9-му місяці посттравматичного періоду у самців і самиць також спостерігали достовірні ($p \le 0,01$) відмінності ПФ ЗІК за шкалою BBB: 3,79±0,29 (n=38) у групі «TCM самці» та 4,80±0,31 (n=36) у групі «TCM самиці» (рис. 3.1, 3.2, 3.3). На функціональному рівні у самців відзначали переважно поширені рухи у двох суглобах або слабкі рухи у всіх трьох суглобах ЗІК. У той же період у самиць спостерігали слабкі рухи у двох суглобах і поширені рухи в третьому суглобі, або поширені рухи у всіх трьох суглобах ЗІК.

Показники локомоторної активності за шкалою ВВВ у самців і самиць достовірно ($p \le 0,05$) відрізнялись на 10-му місяці після ЛПП СМ: 3,74±0,34 (n=38) та 4,75±0,28 (n=36) відповідно (рис. 3.1, 3.2, 3.3). Так, у самців спостерігали переважно слабкі рухи у всіх трьох суглобах, у деяких тварин групи – поширені рухи у двох і слабкі рухи у третьому суглобі ЗІК. У самиць виявляли, переважно, поширені рухи у двох суглобах і слабкі рухи у третьому суглобі, або поширені рухи у всіх трьох суглобах.

На 11-му місяці після ТСМ у межах групи експериментальних самців показано достовірну різницю (р≤0,05) показників за шкалою ВВВ, у порівнянні з 4-м місяцем спостереження (рис. 3.1, 3.2, 3.3). Також продовжували відзначати достовірні (р≤0,01) відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у групах «ТСМ самці» і «ТСМ самиці»: 3,80±0,29 (n=38) та 4,86±0,29 (n=36) відповідно (рис. 3.1, 3.2, 3.3). У самців спостерігали поширені рухи у двох суглобах ЗІК, у деяких – поширені рухи в двох і слабкі в третьому суглобі ЗІК. У самиць цей період відзначався поширеними рухами у двох суглобах і слабкими рухами у третьому суглобі ЗІК.

На 12-му місяці посттравматичного періоду всередині груп тварин обох статтей показано достовірну (р≤0,001) різницю показників, у порівнянні з 1-м тижнем спостереження (рис. 3.1, 3.2). Між групами тварин також встановлено достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ: 3,81±0,34 (n=38) у групі «ТСМ

самці», та 4,89±0,24 (n=36) (p≤0,01) у групі «ТСМ самиці» (рис. 3.1, 3.2, 3.3). На функціональному рівні у самців продовжували спостерігати поширені рухи у двох суглобах ЗІК, у деяких – поширені рухи в двох суглобах і слабкі рухи в третьому суглобі ЗІК. У самиць спостерігали, переважно, поширені рухи у двох або у всіх трьох суглобах ЗІК.

3.2. Моторна функція задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою В

За шкалою В, розробленою виключно для оцінки моторної активності мишей, також визначали рівень локомоторної активності ЗІК самців і самиць з TCM.

На 1-му тижні після ЛПП СМ у самців ПФ ЗІК за шкалою В становили $0,81\pm0,14$ (n=38) у самців та $0,86\pm0,11$ (n=36) у самиць (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців спостерігали відсутність рухів у колінному суглобі і лише в деяких самців відзначали появу слабких рухів у колінному суглобі ЗІК. У самиць на функціональному рівні, як і у самців, відзначали відсутність рухів або появу слабких рухів у колінному суглобі ЗІК.

Вже на 2-му тижні посттравматичного періоду у самців показники локомоторної активності за шкалою В становили: 1,18±0,15 (n=38) в порівнянні з 1-м тижнем (p≤0,05 всередині групи) (рис. 3.4, 3.6). У цей же час у групі «TCM самиці» середній ПФ ЗІК за шкалою В сягав 1,25±0,18 (n=36) (рис. 3.5, 3.6). У самців відзначали відсутність рухів або слабкі рухи у колінному суглобі ЗІК, а у самиць спостерігали переважно слабкі рухи в колінному суглобі ЗІК, у деяких з самиць – активні рухи в колінному суглобі ЗІК.

3 1-го місяця по 8-й місяць посттравматичного періоду ПФ ЗІК за шкалою В всередині групи самців динамічно змінювались (р≤0,05) (рис. 3.4). Максимальний приріст ПФ ЗІК за шкалою В всередині групи самиць з ЛПП СМ спостерігали вже з 1-го по 3-й місяць посттравматичного періоду.



Рис. 3.4 Показники моторної активності ЗІК самців мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою В: т – тижні, м – місяці; *** – р≤0,001 у порівнянні група «TCM самці» з контролем за шкалою В; # – р≤0,05; ## – р≤0,01; ### – р≤0,001 всередині групи ЛПП самців за шкалою В; ns – достовірність відсутня

На 1-му місяць спостереження у групі «ТСМ самці» середні ПФ ЗІК за шкалою В становили 1,61±0,18 (n=38), а у групі «ТСМ самиці» – 1,80±0,19 (n=36) (рис. 3.4, 3.5, 3.6). На функціональному рівні у самців спостерігали переважно слабкі або активні рухи в колінному суглобі ЗІК, а у деяких тварин групи – плантарну поставу стопи із/без підтримання маси тіла. У самиць на цей період відзначали переважно активні рухи в колінному суглобі ЗІК, а в деяких – плантарну поставу стопи із/без підтримання маси тіла.

На 2-му місяці після ТСМ продовжували спостерігати зростання показників за шкалою В як у самців, так і у самиць: 1,68±0,19 (n=38) та 2,19±0,21 (n=36) відповідно (рис. 3.4, 3.5, 3.6). На функціональному рівні у самців відзначали, переважно, активні рухи в колінному суглобі ЗІК, плантарну поставу стопи, а в деяких самців – періодичне некоординоване крокування стопою вниз. У самиць

спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК та плантарну поставу стопи із/без підтримання маси тіла.



Рис. 3.5 Показники моторної активності ЗІК самиць мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою В: т – тижні, м – місяці; *** – р≤0,001 у порівнянні група «ТСМ самиці» з контролем за шкалою В; # – р≤0,05; ### – р≤0,001 всередині групи ЛПП самців за шкалою В; ns – достовірність відсутня

Вже на 3-му місяці посттравматичного періоду відзначали перший пік зростання ПФ ЗІК за шкалою В всередині групи самиць із подальшим виходом на плато по 12-й місяць включно (рис. 3.5). Також на цей термін продемонстровано достовірні відмінності ($p \le 0.05$) середніх ПФ ЗІК за шкалою В у тварин обох статей: 1,76±0,17 (n=38) у групі «TCM самці» та 2,39±0,19 (n=36) у «TCM самиці» (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, плантарну поставу стопи із/без підтримання маси тіла, а у деяких самців – періодичну некоординовану плантарну поставу стопи задніх

кінцівок. У самиць цей період після ЛПП СМ характеризувався активними рухами в колінному суглобі ЗІК, плантарній поставі стопи із/без підтримання маси тіла, а в деяких тварин групи – постійній або періодичній поставі стопи ЗІК із координацією задніх кінцівок.



Рис. 3.6 Показники моторної активності ЗІК самців і самиць мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою В: т – тижні, м – місяці; *** – p≤0,001 у порівнянні група «TCM самці» і «TCM самиці» з контролем за шкалою В; # – p≤0,05, ## – p≤0,01 у порівнянні група ЛПП самців з групою ЛПП самиць за шкалою В

На 4-му місяці посттравматичного періоду показники локомоторної активності ЗІК за шкалою В становили: 1,71±0,19 (n=38) у групі «TCM самці» та 2,30±0,24 (n=36) у групі «TCM самиці» (рис. 3.4, 3.5, 3.6). Функціональна різниця полягала у активних рухах в колінному суглобі ЗІК, плантарній поставі стопи із/без підтримання маси тіла у самців; а у самиць спостерігали активну роботу

колінного суглобу ЗІК та координоване періодичне або постійне крокування стопою вниз.

На 5-му місяці спостереження також показали незначне зростання показників за шкалою В як у групі «TCM самці», так і у групі «TCM самиці»: 1,73±0,19 (n=38) та 2,36±0,25 (n=36) відповідно (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, координоване періодичне або постійне крокування стопою вниз. У самиць у цей період відзначати активні рухи в колінному суглобі ЗІК та, переважно, координовані плантарні крокові рухи ЗІК.

На 6-му місяці після ТСМ у самців продовжували відзначати зростання показників за шкалою В, тоді як у самиць ці показники незначно знижувались, у порівнянні з попереднім терміном спостереження: 1,84±0,19 (n=38) та 2,33±0,25 (n=36) відповідно (рис. 3.4, 3.5, 3.6). Так, у самців відзначали активну роботу колінного суглобу ЗІК та періодичне або постійне крокування стопою вниз без координації задніх кінцівок. У самиць спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, періодичну або постійну поставу стопи вниз без або із координацією задніх кінцівок.

На 7-му місяці посттравматичного періоду також показали незначне зростання ПФ ЗІК за шкалою В як у групі «ТСМ самці», так і у групі «ТСМ самці», що на функціональному рівні мало такі ж прояви, як і у 6-му місяці після ЛПП СМ: $1,87\pm0,21$ (n=38) та $2,36\pm0,22$ (n=36) відповідно (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців продовжували відзначати активну роботу колінного суглобу ЗІК та періодичне або постійне крокування стопою вниз без координації задніх кінцівок. Тоді як у самиць спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, періодичну або постійну поставу стопи вниз без або із координацією задніх кінцівок.

На 8-му місяці дослідження продовжували спостерігати зростання показників моторної активності за шкалою В: 2,00±0,22 (n=38) у групі «TCM самції» та 2,50±0,24 (n=36) у групі «TCM самиці» (рис. 3.4, 3.5, 3.6). Починаючи з 8-го місяця і по 12-й місяць включно у групі «TCM самці» відзначали вихід ПФ ЗІК на плато (рис. 3.4). Зокрема, у самців спостерігали переважно активні рухи

колінного суглобу ЗІК та періодичне, чи постійне крокування стопою вниз без координації, або з частковою координацією задніх кінцівок. У самиць також спостерігали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, переважно, координовані крокові рухи задніх кінцівок, а у деяких самиць групи – крокові рухи задніх кінцівок із паралельним їх розміщенням.

На 9-му місяці спостереження відзначати достовірну (р≤0,05) різницю ПФ ЗІК за шкалою В між групами експериментальних тварин: 1,97±0,23 (n=38) у самців та 2,61±0,25 (n=36) у самиць (рис. 3.4, 3.5, 3.6). При цьому у самців спостерігали незначне зниження локомоторної активності ЗІК: переважно, активні рухи в колінному суглобі ЗІК, періодичне крокування стопою вниз, у більшості тварин групи – без координації задніх кінцівок. У той же час у самиць продовжували спостерігали покращення моторних функцій: активна робота колінного суглобу ЗІК, періодичне, частіше – постійне крокування стопою вниз із координацією задніх кінцівок.

У тварин обох статей також спостерігали зростання показників за шкалою В на 10-му місяці після ЛПП СМ: 2,06±0,19 (n=38) у самців та 2,69±0,27 (n=36) у самиць (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців відзначали активні рухи у колінному суглобі ЗІК, плантарну поставу стопи із постійним або періодичним крокування стопою вниз. У самиць спостерігали активну роботу колінного суглобу ЗІК та плантарну поставу стопи із/без підтримання маси тіла, а також, переважно, координовану плантарну поставу стопи ЗІК.

На довготривалих термінах експериментального дослідження виявляли достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою В. Так, на 11-му місяці після ЛПП СМ ці показники у тварин обох статей достовірно (р≤0,05) відрізнялись: 1,97±0,17 (n=38) у самців та 2,72±0,27 (n=36) у самиць (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців спостерігали переважно активну роботу колінного суглобу ЗІК, періодичне або постійне крокування стопою вниз із/без координації задніх кінцівок. У самиць відзначали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, переважно, постійні координовані рухи ЗІК стопою вниз, а в деяких тварин групи – природну поставу ЗІК та піднятий хвіст.

У порівнянні з 1-м тижнем, на 12-му місяці після ТСМ всередині групи самців і самиць встановлено достовірну різницю (р \leq 0,001) ПФ ЗІК за шкалою В (рис. 3.4, 3.5). У цей термін (12-ть місяців) також продемонстровано достовірну (р \leq 0,01) різницю ПФ ЗІК за шкалою В між групами самців і самиць мишей з TCM: 2,09±0,15 (n=38) та 2,80±0,18 (n=36) відповідно (рис. 3.4, 3.5, 3.6). У самців спостерігали активні рухи у колінному суглобі ЗІК, переважно, постійному плантарному крокуванні ЗІК із/без підтримання маси тіла. У самиць на цей період відзначали активні рухи в колінному суглобі ЗІК, переважно, постійні координовані рухи ЗІК, а також природну поставу ЗІК відносно інших кінцівок, та підтримання хвоста в піднятому положенні.

3.3. Спастичність задньої іпсилатеральної кінцівки тварин за шкалою Ashworth

За шкалою Ashworth порівнювали рівень спастичності ЗІК у самців і самиць мишей у різні терміни після ТСМ.

ПС ЗІК за шкалою Ashworth на 1-му тижні спостереження ПС в групі «ТСМ самці» сягав 3,68±0,10 (n=38), а у групі «ТСМ самиці» – 3,61±0,08 (n=36) (рис. 3.3). На функціональному рівні у самців спостерігали переважно грубі порушення м'язового тонусу ЗІК, складнощі в пересуванні та виконанні елементарних дій. У самиць цей період характеризувався грубими порушеннями м'язового тонусу, ускладненням пересування і виконання елементарних дій, хоча в деяких самиць відзначали значне збільшення м'язового тонусу та складнощі у виконанні пасивних рухів.



Рис. 3.7 Показники спастичності ЗІК самців мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою Ashworth: т – тижні, м – місяці; *** – р≤0,001 у порівнянні група «TCM самці» з контролем за шкалою Ashworth; # – р≤0,05; ## – р≤0,01 всередині групи ЛПП самців за шкалою Ashworth

На 2-му тижні посттравматичного періоду у самців і самиць відзначали зниження ПС ЗІК: 3,53±0,12 (n=38) та 3,33±0,11 (n=36) відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). Як у самців, так і у самиць на цей термін спостерігали переважно грубі порушення м'язового тонусу, ускладнення пересування, або збільшення м'язового тонусу, складнощі у виконанні пасивних рухів.

На 1-му місяці дослідження всередині групи «ТСМ самці» встановили достовірні (р \leq 0,05) відмінності ПС ЗІК за шкалою Ashworth (рис. 3.7, 3.9). У динаміці в групі експериментальних самиць також показано достовірні (р \leq 0,01) відмінності ПС ЗІК (рис. 3.8, 3.9). На 1-му місяці посттравматичного періоду у тварин обох статей ПС ЗІК достовірно (р \leq 0,05) відрізнялись між групами тварин: 3,39±0,17 (n=38) у групах «ТСМ самці» та 3,08±0,51 (n=36) у «ТСМ самиці» (рис. 3.7, 3.8, 3.9). На функціональному рівні у самців спостерігали зменшення рівня

спастичності ЗІК, тобто, переважно, грубі порушення м'язового тонусу, труднощі у виконанні елементарних рухів, а в деяких тварин групи – значний тонус м'язів ЗІК. На відміну від самців, у самиць з ЛПП СМ виявляли, переважно, значне збільшення тонусу м'язів ЗІК і труднощі у виконанні пасивних рухів.



Рис. 3.8 Показники спастичності ЗІК самиць мишей лінії FVB після ЛПП СМ за шкалою Ashworth: т – тижні, м – місяці; *** – р≤0,001 у порівнянні група «TCM самиці» з контролем за шкалою Ashworth; # – р≤0,05; ## – р≤0,01; ### – р≤0,001 всередині групи ЛПП самиць за шкалою Ashworth; ns – достовірність відсутня

На 2-му місяці після ТСМ продовжували відзначати достовірну (р≤0,05) різницю ПС ЗІК за шкалою Ashworth між групами тварин обох статей: 3,42±0,16 (n=38) у самців та 2,89±0,18 (n=36) у самиць (рис. 3.7, 3.8, 3.9). Так, у самців спостерігали грубі порушення м'язового тонусу ЗІК, а в деяких самців – значне збільшення тонусу м'язів ЗІК та труднощі у виконанні пасивних рухів. А у

самиць цей період після моделювання ТСМ відзначався значним збільшенням рівня спастичності ЗІК, а в деяких самиць – незначним збільшенням тонусу м'язів ЗІК.



Рис. 3.9 Показники рівня спастичності ЗІК самців і самиць мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ за шкалою Ashworth: т – тижні, м – місяці; *** – $p \le 0,001$ у порівнянні група «TCM самці» і «TCM самиці» з контролем за шкалою Ashworth; # – $p \le 0,05$, ## – $p \le 0,01$ у порівнянні група ЛПП самців з групою ЛПП самиць за шкалою Ashworth

На 3-му місяці посттравматичного періоду також показали достовірну ($p \le 0.05$) різницю між ПС ЗІК: 3.31 ± 0.17 (n = 38) у групі «TCM самці» та 2.92 ± 0.16 (n = 36) у групі «TCM самиці» відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців відзначали як грубі, так і значні порушення тонусу м'язів ЗІК і труднощі у виконанні пасивних рухів. Тоді як у самиць також спостерігали як грубі, так і значні порушення тонусу м'язів ЗІК, труднощі у виконанні пасивних рухів, а в деяких самиць – значне збільшення тонусу м'язів ЗІК.

На 4-му місяці після ЛПП СМ у тварин обох статей, у порівнянні з попереднім терміном спостереження, виявляли незначне збільшення ПС ЗІК за шкалою Ashworth: $3,35\pm0,14$ (n=38) у самців і $2,97\pm0,23$ (n=36) у самиць (рис. 3.7, 3.8, 3.9). Функціональні прояви у самців і самиць не відрізнялись від відповідних, як на 3-й місяць дослідження. А саме, у групі самців спостерігали грубі або значні порушення тонусу м'язів ЗІК, труднощі у виконанні пасивних рухів; у самиць також відзначали грубі або значні порушення тонусу м'язів ЗІК, і труднощі у виконанні пасивних рухів, і лише в деяких тварин групи – значне збільшення тонусу м'язів ЗІК.

Проте, вже на 5-му місяці експериментального дослідження відзначали незначне зниження рівня спастичності ЗІК тварин обох статей. Так у групі «TCM самці» ПС ЗІК сягав 3,26±0,14 (n=38) (з подальшим виходом показників на плато до кінця дослідного періоду); та 2,92±0,22 (n=36) – у групі «TCM самиці» (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців спостерігали грубі та значні порушення м'язового тонусу, труднощі у виконанні пасивних рухів, і лише в деяких з них – значне збільшення рівня спастичності ЗІК. У самиць у цей період відзначали переважно значне збільшення тонусу м'язів ЗІК, а в деяких самиць – незначне підвищення тонусу м'язів ЗІК.

На 6-му місяці посттравматичного періоду ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «ТСМ самці» дещо зростав, тоді як у «ТСМ самиць» – продовжував знижуватись: 3,29±0,16 (n=38) та 2,86±0,20 (n=36) відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців на цей період спостерігали переважно значне збільшення м'язового тонусу, труднощі у виконанні пасивних рухів, а в деяких тварин групи – вільне виконання рухів. У самиць відзначали переважно значне збільшення тонусу м'язів ЗІК і труднощі у виконанні пасивних рухів, в деяких самиць – незначне збільшення м'язового тонусу.

На 7-му місяці продовжували спостерігати зниження рівня спастичності у тварин обох статей: 3,25±0,15 (n=38) у групі «ТСМ самці» та 2,78±0,19 (n=36) у «ТСМ самиці» (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців на функціональному рівні спостерігали переважно значний рівень тонусу м'язів ЗІК, труднощі у виконанні
елементарних рухів. Тоді як у самиць відзначали переважно значне збільшення м'язового тонусу ЗІК і труднощі у виконанні або вільне виконання елементарних рухів.

На 8-му місяці посттравматичного періоду ПС ЗІК знизився до 3,16±0,20 (n=38) у групі «TCM самці»; а у групі «TCM самиці» до 2,72±0,18 (n=36) (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців спостерігали значне збільшення тонусу м'язів, труднощі або вільне виконання пасивних рухів. Тоді як у самиць відзначали значне збільшення тонусу м'язів ЗІК, складнощі чи вільне виконання пасивних рухів, а в деяких самиць – незначне підвищення м'язового тонусу, що проявлялось у хапанні та мінімальному супротиві під час напруги і розслаблення ЗІК.

Починаючи з 9-го місяця після ТСМ показано достовірні (р≤0,01) відмінності ПС ЗІК між групами експериментальних мишей: 3,18±0,19 у групі «ТСМ самці» (n=38) та 2,69±0,15 у «ТСМ самиці» (n=36) відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). Так, у самців відзначали грубі і значні порушення тонусу м'язів, труднощі або простоту у виконанні пасивних рухів. У самиць спостерігали значний рівень тонусу м'язів ЗІК і у більшості тварин групи – простоту у виконанні пасивних рухів, а в деяких з них – незначне зростання рівня спастичності ЗІК.

На 10-му місяці після ЛПП СМ як у самців, так і у самиць також відзначали достовірне (р≤0,01) зростання ПС ЗІК за шкалою Ashworth: 3,21±0,17 (n=38) та 2,72±0,13 (n=36) відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). У самців цей період характеризувався, переважно, значним рівнем спастичності ЗІК, труднощами або вільним виконанням елементарних рухів. У самиць спостерігали значний рівень спастичності м'язів ЗІК і, переважно, простоту виконання пасивних рухів.

На 11-му місяці спостереження ПС ЗІК у тварин обох статей достовірно (р≤0,01) знижувались: 3,18±0,18 (n=38) у «ТСМ самці» та 2,67±0,13 (n=36) у «ТСМ самиці» відповідно (рис. 3.7, 3.8, 3.9). Зокрема, у самців спостерігали значне збільшення тонусу м'язів і, переважно, простоту у виконанні елементарних рухів. Тоді як у частини групи «ТСМ самиці» відзначали, переважно, значне зростання рівня спастичності ЗІК, у порівнянні з такими у

попередні терміни спостереження, а в деяких тварин групи – незначне зростання рівня спастичності м'язів ЗІК, та вільне виконання рухів.

На 12-му місяці, у порівнянні з 1-м тижнем дослідження, ПС ЗІК за шкалою Ashworth як всередині групи самців, так і всередині групи самиць мишей достовірно ($p \le 0,001$) зменшувались. Цей показник також достовірно ($p \le 0,01$) відрізнявся між групами тварин у 12-му місяці посттравматичного періоду: 3,20±0,18 (n=38) – у самців; 2,64±0,13 (n=36) – у самиць (рис. 3.7, 3.8, 3.9). На функціональному рівні у самців відзначали, переважно, значний тонус м'язів ЗІК, труднощі у виконанні елементарних рухів, а в деяких самців – незначний рівень тонусу м'язів і вільне виконання рухів. У той же час у самиць спостерігали значний або незначний рівень спастичності ЗІК, переважно, вільне виконання рухів, хапання та мінімальний супротив під час скорочення і розслаблення м'язів ЗІК.

3.4. Розподіл значень показників функції та рівня спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки тварин

Розподіл значень ПФ ЗІК ЗІК за шкалою ВВВ у самців з ТСМ представлено на рис. 3.10 (шкала ВВВ для визначення локомоторної активності кінцівок тварин з ТСМ має максимально 21 бал). На 1-му тижні після травми ПФ ЗІК рівний нулю мала найбільша кількість тварин групи «ТСМ самці» (n=16 із n=38); незначна кількість тварин групи мала ПФ ЗІК рівні 2 (n=3 із n=38), 3 (n=3 із n=38) і 4 (n=5 із n=38) бали (n=3 з n=38) (рис. 3.10). На 2-му тижні спостереження більшість тварин групи «ТСМ самці» мала ПФ ЗІК рівний 1 (n=11 із n=38) балу, а також 0 (n=9 із n=38) балів; у порівнянні з 1-м тижнем спостереження кількість тварин з 2 (n=4 із n=38), 3 (n=8 із n=38) і 4 (n=5 із n=38) балами зросла (рис. 3.10). На 1-му місяці після ТСМ найбільша кількість експериментальних самців мала 3 (n=9 із n=38) та 4 (n=9 із n=38) бали за шкалою ВВВ; незначна їх кількість – 0





Рис. 3.10 Розподіл показників функції ЗІК за шкалою ВВВ у самців на різні терміни спостереження

На 3-му місяці спостереження відзначали найбільшою кількість самців з ПФ ЗІК рівним 4 (n=10 із n=38); незначна кількість тварин групи «TCM самці» мала ПФ ЗІК – 1 (n=8 із n=38) та 3 (n=8 із n=38) бали; а найменша їх кількість мала 0 (n=3 із n=38), 2 (n=2 із n=38), 5 (n=4 із n=38), 7 (n=2 із n=38) та 8 (n=2 із n=38) бали за шкалою BBB (рис. 3.10). На 6-му місяці після ЛПП СМ максимальна кількість самців мала 3 (n=10 із n=38) і 4 (n=9 із n=38) бали за

шкалою BBB; незначна їх частина – 1 (n=6 із n=38), 5 (n=4 із n=38) та 8 (n=4 із n=38) балів; і найменша кількість самців мала ПФ ЗІК рівний 0 (n=1 із n=38), 2 (n=1 із n=38) та 6 (n=2 із n=38) бали (рис. 3.10).





На 12-му місяці спостереження розподіл ПФ ЗІК у групі «ТСМ самці» мав такий вигляд: найбільша кількість тварин групи мали ПФ ЗІК рівний 3 (n=10 із n=38) балам; невелика кількість із них – 4 (n=8 із n=38) бали; і мінімальна кількість самців мали 0 (n=2 із n=38), 1 (n=4 із n=38), 2 (n=1 із n=38), 5 (n=3 із

n=38), 6 (n=2 із n=38), 7 (n=4 із n=38), 8 (n=2 із n=38) бали за шкалою ВВВ (рис. 3.10).

На рис. 3.11 продемонстровано розподіл значень ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у групі «ТСМ самиці» на різні терміни дослідження. Так, на 1-му тижні посттравматичного періоду найбільша кількість самиць мали ПФ ЗІК за шкалою ВВВ рівний 1 (n=19 із n=36) балу; деякі тварини групи мали ПФ ЗІК рівний 2 (n=11 із n=36) балам; і відповідно мінімальна кількість самиць мала ПФ ЗІК рівні 0 (n=3 із n=36) та 3 (n=3 із n=36) бали, що відрізняється від розподілу таких ПФ ЗІК у «ТСМ самці» у той же термін спостереження (рис. 3.11).

На 2-у тижні після ТСМ максимальна кількість самиць мала ПФ ЗІК за шкалою BBB рівний 2 (n=13 із n=36) балам; у незначної кількості самиць цей показник складав 1 (n=11 із n=36) та 2 (n=13 із n=36) бали; найменша кількість самиць мала ПФ ЗІК рівні 0 (n=5 із n=36), 3 (n=5 із n=36) та 5 (n=2 із n=36) балів (рис. 3.11). На 1-му місяці посттравматичного періоду виявляли такий розподіл значень: найбільша кількість самиць після ЛПП СМ мала 2 (n=10 із 36) бали: деякі тварини групи «ТСМ самиці» – 1 (n=5 із n=36), 3 (n=9 із n=36) та 4 (n=7 із n=36) бали; тоді як найменша кількість тварин групи мала ПФ ЗІК рівний 5 (n=2 із n=36), 6 (n=2 із n=36), 7 (n=1 із n=36) балам (рис. 3.11). На 3-му місяці посттравматичного періоду найбільша кількість самиць мала 4 (n=9 із n=36), 5 (n=5 із n=36) та 6 балів (n=6 із n=36); незначна кількість тварин групи «TCM самиці» мала ПФ ЗІК рівні 1 (n=3 із n=36), 2 (n=3 із n=36), 3 (n=4 із n=36) та 7 (n=4 із n=36) балів; у найменшої кількості самиць показник за шкалою BBB становив 8 (n=2 із n=36) балів (рис. 3.11). На 6-му місяці після ТСМ максимальна кількість самиць мала ПФ ЗІК рівний 6 (n=10 із n=36) та 4 (n=9 із n=36) балам; у незначної кількості самиць виявляли ПФ ЗІК рівний 3 (n=6 із n=36) та 5 (n=6 із n=36) балам; тоді як найменша кількість самиць мала 2 (n=3 із n=36) та 7 (n=2 із n=36) балів за шкалою ВВВ (рис. 3.11). На 12-му місяці після ЛПП СМ у групі експериментальних самиць відзначали такий розподіл значень ПФ ЗІК за шкалою BBB: максимальна кількість тварин мала 5 (n=15 із n=36) балів; деякі – 3 (n=4 із n=36), 4 (n=6 із n=36) та 6 (n=4 із n=36) балів; найменша кількість тварин групи мала 2 (n=2 iз n=36), 7 (n=3 iз n=36) та 8 (n=2 iз n=36) балів за шкалою ВВВ. Слід зауважити, що на відміну від групи самців з ТСМ, у самиць після ЛПП СМ вже у 6-му та 12-му місяцях спостереження 0 та 1 бал за шкалою ВВВ не відзначали (рис. 3.11).

Розподіл значень ПФ ЗІК за шкалою В у тварин групи «ТСМ самці» (рис. 3.12) на 1-му тижні мав такі особливості: найбільша кількість тварин групи мала ПФ ЗІК рівний 0 (n=17 із n=38) та 1 (n=12 із n=38) бали; деякі з них – 2 (n=8 із n=38) бали; а мінімальна кількість самців відзначались ПФ ЗІК рівним 3 (n=1 із n=38) балам. На 2-му тижні посттравматичного періоду найбільша кількість самців мала ПФ ЗІК рівний 1 (n=15 із n=38) бали; ПФ ЗІК у деяких тварин групи становив 0 (n=10 із n=38) та 2 (n=10 із n=38) бали; мінімальна кількість «ТСМ самців» мали ПФ ЗІК рівний 3 (n=4 із n=38) балам (рис. 3.12). На 1-му місяці після ЛПП СМ незначна кількість самців мали ПФ ЗІК за шкалою В рівний 0 (n=6 із n=38) балам; тоді як ПФ ЗІК у більшості тварин групи сягав 1 (n=12 із n=38) 2 (n=11 із n=38) та 3 (n=9 із n=38) бали (рис. 3.12). Вже на 3-му місяці посттравматичного періоду найбільша кількість самців мали ПФ ЗІК – 1 (n=13 із n=38) та 2 (n=14 із n=38), 3 (n=1 із n=38), 4 (n=2 із n=38) та 5 (n=2 із n=38) балам (рис. 3.12).

На довготривалих термінах спостереження, а саме, на 6-му місяці після TCM, ПФ ЗІК за шкалою В у максимальної кількості самців складав 1 (n=15 із n=38) та 2 (n=13 із n=38) бали; найменша кількість тварин групи «TCM самці» мали ПФ ЗІК, рівний 0 (n=2 із n=38), 3 (n=1 із n=38), 4 (n=2 із n=38), 5 (n=2 із n=38) балам (рис. 3.12). На 12-му місяці дослідження ПФ ЗІК найбільшої кількості тварин групи становив 2 (n=17 із n=38) бали; деяка кількість таких самців мала ПФ ЗІК – 1 (n=8 із n=38) та 3 (n=9 із n=38) бали за шкалою В; найменша кількість самців мала ПФ ЗІК – 1 (n=8 із n=38) та 3 (n=9 із n=38), 4 (n=5 із n=38) та 5 (n=2 із n=38) балів (рис. 3.12).



Рис. 3.12 Розподіл показників функції ЗІК за шкалою В у самців на різні терміни спостереження

На рис. 3.13 продемонстровано розподіл значень ПФ ЗІК за шкалою В у самиць мишей після ТСМ. На 1-му тижні спостереження максимальна кількість тварин групи мала ПФ ЗІК рівний 1 (n=19 із n=36) та 0 (n=11 із n=36) балу; найменша кількість самиць мала ПФ ЗІК рівний 2 (n=6 із n=38) балам (рис. 3.13).

На 2-му тижні після ЛПП СМ максимальна кількість самиць мали ПФ ЗІК 0 (n=11 із n=36) та 1 (n=11 із n=36) бали за шкалою В; деякі з тварин мали ПФ ЗІК рівний 2 (n=9 із n=36) та 3 (n=4 із n=36) балам; мінімальна кількість самиць мали ПФ рівний 4 (n=1 із n=36) балам (рис. 3.13). На 1-му місяці спостереження ПФ ЗІК за шкалою В у тварин групи «ТСМ самиці» розподілялись таким чином: найбільша кількість тварин групи мала ПФ рівний 1 (n=12 із n=36) та 2 (n=10 із

n=36) бали; деякі самиці мали ПФ рівні 2 (n=10 із n=36) і 3 (n=7 із n=36) бали за шкалою В; у найменшого числа самиць ПФ ЗІК дорівнювали 0 (n=4 із n=36) та 4 (n=3 із n=36) бали (рис. 3.13).



Рис. 3.13 Розподіл показників функції ЗІК за шкалою В у самиць на різні терміни спостереження

На 3-му місяці ПФ ЗІК максимальної кількості експериментальних самиць становили 2 (n=17 із n=36) бали; деяке число тварин групи – ПФ ЗІК рівні 1 (n=7 із n=36) та 3 (n=6 із n=36) бали найменша кількість тварин групи «TCM самиці» мала ПФ ЗІК рівні 4 (n=3 із n=36) і 5 (n=3 із n=36) балів (рис. 3.13). Надалі у експеримаентальних самиць відзначали такий розподіл ПФ ЗІК за шкалою В: на 6-му місяці посттравматичного періоду максимальне число тварин мало ПС ЗІК рівні 1 (n=10 із n=36) та 2 (n=10 із n=36) бали; у деяких тварин групи – 4 (n=3

із n=36) та 5 (n=3 із n=36) балів; а мінімальна кількість тварин мала ПС ЗІК рівні 0 (n=2 із n=36) та 6 (n=1 із n=36) балів (рис. 3.13). На 12-му місяці посттравматичного періоду ПФ у максимальної кількості самиць складали 2 (n=16 із n=36) та 3 (n=12 із n=36) бали; у деяких із експериментальних самиць – 4 (n=4 із n=36) бали за шкалою В; мінімальна кількість самиць мала ПФ ЗІК за шкалою В рівні 1 (n=1 із n=36), 5 (n=2 із n=36) та 6 (n=1 із n=36) балів (рис. 3.13).

Розподіл ПС ЗІК за шкалою Ashworth у тварин групи «ТСМ самці» відображено на рис. 3.14. На 1-му тижні після ЛПП СМ у більшості тварин групи ПС ЗІК складав 4 бали (n=29 із 38); а найменша кількість тварин групи мала ПС ЗІК рівний 2 (n=3 із 38) та 3 (n=6 із 38) бали (рис. 3.14).

На 2-му тижні посттравматичного періоду у найбільшого числа тварин цей показник відповідав 2 (n=25 iз 38), 3 (n=25 iз 38) та 4 (n=25 iз 38) балам; найменша кількість самців мала ПС ЗІК рівний 1 (n=1 iз n=38) балу (рис. 3.14). На 1-му місяці після ЛПП СМ максимальна кількість тварин групи відзначалась ПС ЗІК рівним 4 балам (n=24 iз n=38); незначна кількість тварин групи «TCM самці» мала ПС ЗІК рівний 3 (n=10 із n=38) балам; у найменшої кількості самців ПС ЗІК становив 0 (n=2 із 38), 1 (n=1 із 38) та 2 (n=1 із 38) бали (рис. 3.14).

На 3- му місяці спостереження у тварин групи «ТСМ самці» розподіл ПС ЗІК був такий: найбільша кількість самців мала 1 (n=13 із 38) та 2 (n=14 із 38) бали; деякі самці сами 0 (n=4 із 38) та 3 (n=4 із 38) бали за шкалою В; а найбільше число тварин групи мали ПФ ЗІК рівний 4 (n=1 із 38) і 5 (n=2 із 38) балів (рис. 3.14). На 6-му місяці після ТСМ у більшості експериментальних самців – становив 4 (n=21 із n=38) бали; у деяких тварин групи цей показник становив 2 (n=6 із 38) та 3 (n=6 із 38) та 1 (n=1 із 38) бал (рис. 3.14). На 12-му місяці спостерігали такий же розподіл ПС ЗІК за шкалою Ashworth, як і на 6-му місяці спостереження (рис. 3.14).



самців на різні терміни спостереження

На 1-му тижні посттравматичного періоду максимальне число тварин групи «ТСМ самиці» мали ПС ЗІК за шкалою В рівний 4 (n=22 із n=36) бали; незначна кількість тварин групи мала ПС ЗІК рівний 3 (n=14 із n=36) балам (рис. 3.15).

На 2-му тижні після ЛПП СМ у більшості експериментальних самиць цей показник складав 3 (n=16 із n=36) та 4 (n=16 із n=36) бали; у той же час найменша кількість самиць мала ПС ЗІК рівний 2 (n=4 із n=36) балам (рис. 3.15). На 1-му місяці посттравматичного періоду найбільше число самиць (n=19 із n=36) мало ПС ЗІК рівний 3 (n=11 із n=36) балам; у деяких тварин групи «TCM самиці» цей показник сягав 4 (n=3 із n=36)бали; у той час як найменша кількість тварин мала ПС ЗІК рівний 1 (n=2 із n=36) та 2 (n=4 із n=36) балам (рис. 3.15).



гис. 5.15 гозподіл показників спастичності 51К за шкалою Азпоогіп у самиць на різні терміни спостереження

На 3-му місяці спостереження розподіл ПС ЗІК у тварин групи «ТСМ самиці» мав такий вигляд: найбільша кількість тварин групи мала 2 (n=17 із n=36) бали за шкалою В; деякі самиці – 1 (n=7 із n=36) та 3 бали (n=6 із n=36); найменаша кількість самиць мала ПФ ЗІК рівний 4 (n=3 із n=36) та 5 балів (n=3 із n=36)(рис. 3.15). На 6-му місяці після ТСМ максимальна кількість самиць мала ПС ЗІК рівний 4 (n=15 із n=36) балам; у деяких тварин групи відзначали ПС ЗІК – 1 (n=6 із n=36), 2 (n=5 із n=36) та 3 (n=9 із n=36) балів; найменше число самиць (n=1 із n=36) мало ПС ЗІК рівний нулю балів (рис. 3.15). На 12-му місяці посттравматичного періоду у тварин групи «ТСМ самиці» спостерігали такий розподіл ПС ЗІК: найбільша кількість тварин групи мала ПС ЗІК рівний 3 (n=24 із n=36) балам; незначна кількість самиць відзначалась ПС ЗІК – 1 (n=5 із n=36)

та 2 (n=5 із n=36) бали; а найменше число тварин мало ПС ЗІК рівний 4 (n=2 із n=36) балам (рис. 3.15).

3.5. Кореляція показників функції та показників спастичності задньої іпсилатеральної кінцівки тварин

Наявність кореляції ПФ ЗІК за шкалою ВВВ та В і ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групах «ТСМ самці» і «ТСМ самиці» визначали за значенням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена. Так, на 1-му тижні посттравматичного періоду у самців мишей відзначали слабку позитивну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: $r_s=0,17$ (p= -0,02) (рис. 3.16). На 2-му тижні після ЛПП у самців ПФ ЗІК та ПС ЗІК також мали слабку позитивну кореляцію: $r_s=0,07$ (рис. 3.16). На 1-му, 2-му та 3-му місяці спостереження у самців з ТСМ виявляли слабку негативну кореляцію ПФ ЗІК між ПС ЗІК: $r_s=(-0,02)$, $r_s=(-0,002)$ та $r_s=(-0,18)$ відповідно (рис. 3.16).

На 4-му, 5-му, 6-му та 7-му місяці у самців після ЛПП ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між ПС ЗІК за шкалою Ashworth мали низьку негативну кореляцію: r_s =(-0,09), r_s =(-0,002), r_s =(-0,17) та r_s =(-0,17) відповідно (рис. 3.16).

На 8-му та 9-му місяці після ЛПП СМ у групі «ТСМ самці» виявляли слабку позитивну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою BBB між ЗІК за шкалою Ashworth: $r_s=0,03$ та $r_s=0,19$ відповідно (рис. 3.16).

На довготривалих термінах, а саме, на 10-му та 11-му місяці спостереження відзначали слабку негативну кореляцію (однакові показники) ПФ ЗІК за шкалою BBB між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: r_s =(-0,16) (рис. 3.16). На 12-му місяці посттравматичного періоду у самців спостерігали слабку позитивну кореляцію досліджуваних показників: r_s =0,27 (рис. 3.16).



Рис. 3.16 Кореляція ПФ ЗІК за шкалою ВВВ та ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «ТСМ самці» мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ: т – тижні, м – місяці; відсутність достовірності кореляції ПФ та ПС ЗІК

На 1-у тижні спостереження у групі «ТСМ самиці» спостерігали помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: r_s =(-0,3) (рис. 3.17). На 2-му тижні посттравматичного періоду у групі «ТСМ самиці» виявляли слабку позитивну кореляцію відповідних ПФ ЗІК та ПС ЗІК – r_s =0,13 (рис. 3.17). У 1-му місяці після ЛПП у самиць спостерігали помірну позитивну кореляцію: r_s =0,3 (рис. 3.17). На 2-му, 3-му, 4-му місяці після ТСМ у самиць спостерігали слабку негативну кореляцію (з помітним наростанням) досліджуваних показників: r_s =(-0,03), r_s =(-0,17) та r_s =(-0,21) відповідно (рис. 3.17). На 5-му місяці спостереження у експериментальних самиць мишей відзначали достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: r_s =(-0,49) (р≤0,01) (рис. 3.17).



Рис. 3.17 Кореляція середніх ПФ ЗІК за шкалою ВВВ та ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «ТСМ самиці» мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ: т – тижні, м – місяці; ** – р≤0,05 достовірність кореляції ПФ ЗІК та ПС ЗІК

На 6-му місяці посттравматичного періоду у самиць спостерігали наявність слабкої негативної кореляції досліджуваних показників: r_s =(-0,29) (рис. 3.17). На 7-му місяці спостереження відзначали слабку позитивну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою BBB між ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «TCM самиці»: r_s =0,001 (рис. 3.17). Слабку негативну кореляцію ПФ ЗІК та ПС ЗІК у самиць спостерігали на 8-му, 9-му та 10-му місяці після ЛПП СМ: r_s =(-0,17), r_s =(-0,11) та r_s =(-0,14) відповідно (рис. 3.17). Вже на 11-му та 12-му місяці спостереження, у самиць з ТСМ виявляли слабку позитивну кореляцію: r_s =0,02 та r_s =0,04 відповідно (рис. 3.17).

Також визначали кореляцію ПФ ЗІК за шкалою В та ПС ЗІК за шкалою Ashworth як у групі «TCM самці», так і у групі «TCM самиці». Так, у самців на 1-му та 2-му тижнях спостереження виявляли достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою В між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: r_s =(-0,32) (p≤0,05) та r_s =(-0,34) (p≤0,05) відповідно (рис. 3.18). Слабку негативну кореляцію ПФ ЗІК та ПС ЗІК у групі самців виявляли на 1-му та 2-му місяці після ТСМ: r_s =(-0,17) та r_s =(-0,20) відповідно (рис. 3.18).



Рис. 3.18 Кореляція ПФ ЗІК за шкалою В та ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «ТСМ самці» мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ: т – тижні, м – місяці. # – $p \le 0.05$, ## – $p \le 0.01$ достовірність кореляції ПФ ЗІК та ПС ЗІК

На 3-му та 4-му місяці відзначали достовірно помірну негативну кореляцію відповідних показників: $r_s=(-0,35)$ (p $\leq 0,05$) та $r_s=(-0,43)$ (p $\leq 0,01$) відповідно (рис. 3.18). Слабку негативну кореляцію ПФ ЗІК та ПС ЗІК виявляли у групі «ТСМ самці» мишей у 5-му місяці після ЛПП СМ: $r_s=(-0,24)$ (рис. 3.18). На 6-му, 7-му та 8-й місяці спостереження у самців з ТСМ відзначали достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою В між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: $r_s=(-0,37)$ (p $\leq 0,05$), $r_s=(-0,35)$ (p $\leq 0,05$) та $r_s=(-0,46)$ (р $\leq 0,01$) відповідно (рис. 3.18).

На 9-му та 10-му місяці після ЛПП СМ у тварин групи «ТСМ самці» спостерігали слабку негативну кореляцію відповідних показників: r_s =(-0,26) та r_s =(-0,24) відповідно (рис. 3.18). На довготривалих термінах спостереження відзначали достовірно помірну негативну кореляцію досліджуваних показників:

r_s=(-0,34) (р≤0,05) у 11-му місяці; та r_s=(-0,32) (р≤0,05) у 12-му місяці посттравматичного періоду (рис. 3.18).

У групі самиць з ТСМ на 1-му тижні посттравматичного періоду відзначали низьку позитивну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою В між ПС ЗІК за шкалою Ashworth: $r_s=0,01$ (рис. 3.19). На 2-му тижні виявляли слабку позитивну кореляцію відповідних показників, а саме, $r_s=0,22$ (рис. 3.19). Слабку негативну кореляцію ПФ ЗІК між ПС ЗІК в тварин групи «ТСМ самиці» визначали на 1-му місяці після ЛПП: $r_s=0,04$ (рис. 3.19).



Рис. 3.19 Кореляція ПФ ЗІК за шкалою В та ПС ЗІК за шкалою Ashworth у групі «ТСМ самиці» мишей лінії *FVB* після ЛПП СМ: т – тижні, м – місяці. # – p≤0,05, ## – p≤0,01 достовірність кореляції ПФ ЗІК та ПС ЗІК

Надалі, на 2-му та 3-му місяці посттравматичного періоду відзначали низьку негативну кореляцію досліджуваних показників: $r_s=(-0,19)$ та $r_s=(-0,027)$ (рис. 3.19). Достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою В між ПС ЗІК за шкалою Ashworth у самиць з ЛПП СМ виявляли на 4-му та 5-му місяці спостереження: $r_s=(-0,44)$ (p≤0,01) та $r_s=(-0,43)$ (p≤0,01) відповідно (рис. 3.19). Продовжували визначати достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК та ПС ЗІК у експериментальних самиць на 6-му та 7-му місяці посттравматичного періоду: r_s =(-0,39) (p≤0,01) та r_s =(-0,39) (p≤0,01) відповідно (рис. 3.19). Слабку негативну кореляцію досліджуваних показників визначали на 8-й місяць після моделювання ТСМ у самиць: r_s =(-0,14) (рис. 3.19). Достовірно сильну негативну кореляцію відзначали у самиць після ЛПП СМ на 9-му місяці спостереження: r_s =(-0,51) (p≤0,001) (рис. 3.19). На 10-му, 11-му місяці посттравматичного періоду встановили слабку негативну кореляцію (однакові показники) ПФ ЗІК за шкалою В між ПС ЗІК за шкалою Ashworth у експериментальних самиць мишей: r_s =(-0,15) (рис. 3.19). На 12-му місяці посттравматичного періоду також відзначали слабку негативну кореляцію вказаних показників r_s =(-0,04) (рис. 3.19).

Крім того, визначали кореляцію ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між ПС ЗІК за шкалою Ashworth самців і самиць мишей після ЛПП у часі. Так, як у тварин групи «TCM самці», так і у тварин групи «TCM самиці» виявлено сильну позитивну кореляцію ПФ ЗІК за шкалою ВВВ в часі: $r_s=0,99$ (однакові показники). Відзначали також сильну позитивну кореляцію ПФ за шкалою В в часі у тварин обох статей: $r_s=0,97$ та $r_s=0,95$ та відповідно. Такий коефіцієнт кореляції свідчить про динамічне зростання ПФ ЗІК, тобто відновлення моторної активності ЗІК у самців і самиць мишей після ТСМ.

Сильну негативну кореляцію ПС ЗІК за шкалою Ashworth з часом виявлено як у самців, так і у самиць мишей: r_s =(-0,92) та r_s =(-0,96) відповідно; що вказує на зниження рівня спастичності ЗІК з часом.

Загалом позитивна кореляція показників вказує на одночасне зростання обох досліджуваних показників або зростання одного показника без зміни іншого. Тому за позитивної кореляції у групах «TCM самці» і «TCM самиці» мишей відзначали зростання ПФ ЗІК за шкалою BBB та B при незмінному рівні або зростанні ПС ЗІК за шкалою Ashworth; що вказує на негативний вплив нейродегенерації тканини CM на локомоторну активність тварин. Відповідно, негативна кореляція досліджуваних показників свідчить про збільшення одного з показників у міру зменшення іншого показника. Так, за негативної кореляції відзначали зростання ПФ ЗІК за шкалами ВВВ та В з одночасним зниженням ПС ЗІК за шкалою Ashworth, що вказує на функціональне відновлення моторних показників ЗІК у тварин обох статей з ТСМ. Позитивна кореляція ПФ ЗІК в часі вказує на покращення локомоторної активності ЗІК як самців, так і самиць. Тоді як негативна кореляція ПС ЗІК в часі свідчить про зниження рівня спастичності ЗІК, тобто також покращення функціонального стану ЗІК тварин обох статей.

3.6. Морфологічні зміни в тканині спинного мозку у мишей обох статей

3.6.1. Зміни в тканині спинного мозку тварин різної статі після травми, забарвлення гематоксилін-еозином. На зрізах СМ самців і самиць мишей (рис. 3.20) візуалізували зону перетину із формуванням рубця, починаючи з 1-го тижня посттравматичного періоду та впродовж 12-ти місяців спостереження.



Рис. 3.20 Макрофотографії СМ мишей лінії *FVB*, нижній грудний відділ (T10-11): А – самці; Б – самиці. Червоний овал – зона перетину СМ

У контрольних груп тварин СМ зберігав нативну цитоархітектоніку (рис. 3.21, А, Б). На 1-му тижні посттравматичного періоду у тканині СМ групи «ТСМ самці» спостерігали порожнину, заповнену мієліновим та аксональним дебрисом, гранулоцитами і макрофагами (рис. 3.21, В).

Уся пошкоджена тканина СМ мала ознаки гострої стадії запалення. Так, центральна частина пошкодженої ділянки тканини СМ містила велику кількість мононуклеарних клітин, гранулоцитів, макрофагів, зокрема, мікрогліальних клітин та пінистих макрофагів; останні з яких, синтезуючи прозапальні фактори, посилюють процес вторинного пошкодження тканини СМ (рис. 3.21, Г, Г). Крім того, на 1-му тижні після ЛПП СМ у самців показали активну васкуляризацію та набряк не лише безпосередньо в зоні перетину СМ, а і в суміжних ділянках тканини СМ. Так, суміжна з місцем пошкодження тканина СМ «ТСМ самців» містила велику кількість аксональних сфероїдів (дистрофічні аксони), що свідчить про пошкодження та демієлінізацію аксонів (рис. 3.21, Д).

У той же період спостереження у самиць мишей з ТСМ в тканині СМ спостерігали чітко відмежований від суміжної тканини незрілий фіброзний рубець, сформований гетерогенною клітинною популяцією із фіброцитів, великою кількістю фібробластів, клітинами гострої фази запалення та незначною кількістю волокнистого компоненту рубця (рис. 3.21, E). Прилегла до фіброзного рубця тканина СМ самиць виявляла ознаки активної васкуляризації та набряку, була наповнена великою кількістю пінистих макрофагів, що є ознакою очищення зони перетину тканини СМ від мієлінового дебрису. Більш того, суміжна тканина СМ самиць з ТСМ містила гліальні клітини, ділянки лейкоцитарного інфільтрату, а також крововиливи (рис. 3.21, ε).

Таким чином, вже в кінці 1-го тижня посттравматичного періоду спостерігали морфологічні відмінності в нервовій тканині самців і самиць після ЛПП СМ. На цей термін спостереження у СМ самиць вже було видно рубець та відзначали менш виражені прояви запалення тканини СМ, на відміну від СМ тварин групи «TCM самці», тканина СМ яких мала ознаки активного запального процесу не лише безпосередньо в зоні перетину, а і в суміжних зонах.

91



Рис. 3.21 Мікрофотографії зрізів СМ самців і самиць мишей лінії *FVB*, нижній грудний відділ (T10-11); забарвлення гематоксилін-еозином: $A - \overline{b} - K$ онтроль; $B - \overline{A} - 1$ -й тиждень після ЛПП, самці; $E - \overline{C} - 1$ -й тиждень після ЛПП, самиці. Зелені стрілки — фіброцити, чорні стрілки — пінисті макрофаги, жовті стрілки — фібробласти, білі стрілки — аксональні сфероїди, блакитні стрілки еритроцити; чорний прямокутник — зона перетину. Масштабна лінійка: A - 200мкм; \overline{b} , $\overline{E} - 40$ мкм; B - 80 мкм; $\overline{\Gamma} - \overline{D}$, $\overline{C} - 20$ мкм

На 2-му тижні після ЛПП у СМ тварин обох статей відзначали появу аксональних сфероїдів навколо зони перетину, що вказує на продовження розвитку нейродегенеративних змін у тканині СМ та паралельне очищення від дебрису зони пошкодження СМ за участі великої кількості пінистих макрофагів (рис. 3.22, А – Г).

У самців також спостерігали прояви лейкоцитарної інфільтрації у зоні травми, периваскулярної лейкоцитарної інфільтрації, розширення судин та мікрогліоз, що вказує на процес гострої фази запалення; у тканині СМ тварин групи «ТСМ самці» також виявляли ознаки хроматолізу (втрата субстанції Ніссля, збільшення ядра нейрона і його зміщення на периферію) та некрозу (пікноз ядра, каріолізис) нейронів внаслідок вторинного пошкодження тканини СМ (рис. 3.22, А, Б).

У самиць на 2-му тижні після ЛПП СМ виявляли ознаки гострої стадії запалення тканини СМ. Хоча в цей період вже візуалізували зони щільного волокнистого та гліального рубця, які були чітко відмежовані від інтактних ділянок тканини СМ (рис. 3.22, В, Г).

А вже на кінець 1-го місяця після ЛПП СМ як у самців (рис. 3.22, Ґ – Е), так і у самиць мишей (рис. 3.22, Є) спостерігали наявність активного волокнистого рубця із відкладеннями позаклітинного матриксу, утвореного фібробластами та фіброцитами. Крім того, утворений рубець був чітко відмежований від суміжної тканини (рис. 3.22, Ґ, Д, Є). Суміжна з рубцем тканина у СМ тварин групи «ТСМ самці» мала ознаки набряку, вакуолізації, а також містила велику кількість аксональних сфероїдів, що утворюються на місці демієлінізованих аксонів, та пінистих макрофагів, що забезпечували подальший фагоцитоз мієлінового дебрису (рис. 3.22, Д). На межі волокнистого рубця та суміжної з ним тканини СМ тварин обох статей відзначали збільшення числа клітин з невеликими овальними ядрами – ймовірно, гліальний рубець (рис. 3.22, Е, Є).



Рис. 3.22 Мікрофотографії зрізів СМ самців і самиць мишей лінії *FVB*, нижній грудний відділ (T10-11); забарвлення гематоксилін-еозином: $A - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - \overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці; $\overline{b} - 2$ -й тиждень після ЛПП, самиці;

зона (Д); чорний овал – краї зони перетину. Масштабна лінійка: А – 60 мкм; Б, В, Ґ, Д – 40 мкм; Г, Є – 20 мкм; Е – 80 мкм

Крім того, на 1-й місяць у СМ самців і самиць з ТСМ спостерігали відсутність гострого запального інфільтрату в тканині СМ, хоча зона безпосереднього пошкодження характеризувалась таким же рівнем васкуляризації, як і на 2-му тижні після травмування СМ (рис. 3.22, Д, Є).

Отже, вже на 1-й місяць після ЛПП у мишей обох статей спостерігали згасання гострої стадії запалення із паралельним формуванням волокнистого і гліального рубця, формування молодого активного рубця, наповненого фібробластами та фіброцитами (рис. 3.22, Д, Є).

На 2-му місяці після ЛПП СМ у тварин обох статей відзначали переважання кількості фіброцитів над кількістю фібробластів, що свідчить про розростання і дозрівання волокнистого рубця в СМ (рис. 3.23, А – Є).

Так, волокнистий рубець у СМ «ТСМ самців» і «ТСМ самиць», утворений перпендикулярними до осі СМ волокнами, мав чіткі межі із суміжною тканиною, містив велику кількість позаклітинного матриксу та фіброцитів (рис. 3.23, А, Б). Крім того, навколо волокнистого рубця спостерігали гліальний рубець, а суміжна тканина була вакуолізована та містила аксональні сфероїди (рис. 3.23, А, В). На деяких зрізах в суміжній до рубця тканині СМ мишей обох статей спостерігали наявність пінистих макрофагів, які виконують функцію очищення пошкодженої тканини СМ від мієлінового дебрису (рис. 3.23, А, В, Г). У групі «ТСМ самці» на 2-му місяці посттравматичного періоду волокнистий рубець мав значно більші розміри, у порівнянні з попередніми термінами спостереження.

На 3-му місяці після ЛПП у самців і самиць мишей продовжували спостерігати дозрівання волокнистого рубця і збільшення його щільності (рис. 3.23, Ґ – Є). Також відзначали збільшення клітинності гліального рубця на межі з волокнистим (рис.3.23, Ґ – Є).

95



Рис. 3.23 Мікрофотографії зрізів СМ самців і самиць мишей лініх *FVB*, нижній грудний відділ (T10-11); забарвлення гематоксилін-еозином: A - E - 2-й місяць після ЛПП, самці; $B - \Gamma - 2$ -й місяць після ЛПП, самиці; $\Gamma - E - 3$ -й місяць після ЛПП, самці; C - 3-й місяць після ЛПП, самиці. Зелені стрілки – фіброцити, чорні стрілки – пінисті макрофаги, жовті стрілки – фібробласти, білі стрілки – аксональні сфероїди, оранжеві стрілки – некротизовані нейрони; білий квадрат – судини; чорний квадрат – зона рубця (В); чорний прямокутник –

скупчення фібробластів і фіброцитів (Ґ, Е). Масштабна лінійка: А – 60 мкм; Б, В, Ґ, Д – 40 мкм; Г, Є – 20 мкм; Е – 80 мкм

У прилеглій до рубця тканині СМ тварин обох статей спостерігали набряк, наявність аксональних сфероїдів, дезінтегрованих і фрагментованих сфероїдів, а в зоні перетину – велику кількість розширених судин (рис. 3.23, Ґ, Е, Є).

Морфологічні зміни в тканині СМ самців і самиць після ЛПП СМ також показали і на довготривалих термінах спостереження: у 6-му та 12-му місяці (рис. 3.24, A – €).

У 6-му місяці після ТСМ у самців в зоні пошкодження спостерігали наявність чітко відмежованого від суміжної тканини волокнистого рубця зі значною кількістю позаклітинного матриксу та фіброцитів; волокнистий рубець виглядав більш ущільненим, у порівнянні з таким на більш ранніх термінах спостереження – виявлено підвищену клітинність на межі волокнистого рубця та нервової тканини (рис. 3.24, А – Б). Такі морфологічні особливості вказують на пізню стадію формування/дозрівання рубця.

Крім того, суміжна із рубцем тканина СМ була активно вакуолізована та містила аксональні сфероїди, наявність яких вказує на процес демієлінізації аксонів (рис. 3.24, Б).

У самиць на 6-й місяць спостереження був наявний волокнистий рубець неправильної форми, що містив велику кількість вакуоль та судин. Як і у групі «ТСМ самці», у складі рубця СМ «ТСМ самиці» також відзначали значну кількість позаклітинного матриксу та фіброцитів, набряк суміжної з рубцем тканини і наявність аксональних сфероїдів (рис. 3.24, В – Г).



Рис. 3.24 Мікрофотографії зрізів СМ самців і самиць мишей лінії *FVB*, нижній грудний відділ (T10-11); забарвлення гематоксилін-еозином: $A - \overline{b} - \overline{b}$ б-й місяць після ЛПП, самці; $B - \overline{\Gamma} - \overline{b}$ -й місяць після ЛПП, самиці; $\overline{\Gamma} - \overline{d} - 12$ -ть місяців після ЛПП, самці; $E - \overline{C} - 12$ -ть місяців після ЛПП, самиці. Зелені стрілки – фіброцити, чорні стрілки – пінисті макрофаги, жовті стрілки – фібробласти, білі стрілки – аксональні сфероїди; чорний прямокутник – зона рубця; чорний і білий овал – зона рубця з фіброцитами та фібробластами; білі прямокутники – краї

рубця (Е), аксональні сфероїди (Г). Масштабна лінійка: А – 60 мкм; Б, В, Ґ, Д – 40 мкм; Г, Є – 20 мкм; Е – 80 мкм

На 12-му місяці після ЛПП СМ як у групі «ТСМ самці», так і у «ТСМ самиці» мишей спостерігали характерні ознаки сформованого гліальноволокнистого рубця; підвищену клітинність у суміжній з волокнистим рубцем зоні, що свідчить про переважання/ущільнення рубця за рахунок гліального компоненту (рис. 3.24, $\Gamma - \varepsilon$).

Структурні зміни в тканині спинного 3.6.2. мозку тварин. імуногістохімічна оцінка. Оцінку тканини СМ самців і самиць мишей контрольної групи та мишей обох статей з ЛПП проводили за допомогою лазерного (лазери довжиною хвилі 488, 543 та 633 нм) скануючого конфокального мікроскопу FluoView FV1000 (Olympus Inc., Japan) поєднаною з 10x. 20x об'єктиви. цифровою камерою. Використовували та 40x Мікрофотографії представлені з масштабною лінійкою 20 мкм, 50 мкм та 100 мкм.

На зрізах СМ самців контрольної групи показали наявність центрального каналу однорідної структури без деструктивних змін; клітини нервової тканини – олігодендроцити (рис. 3.25, А), астроцити (рис. 3.25, Б) та нейрони (рис. 3.25, В) мали нормальну будову (рис. 3.25, А – Д). Тканина СМ самиць контрольної групи мишей була з усіма ознаками, характерними для інтактної тканини. На зрізах СМ тварин ЦК мав однорідну структуру; мікрогліальні клітини (рис. 3.26, А) та астроцити (рис. 3.26, Б) мали сому звичайної морфології і тонкі відростки. А мікрогліальні клітини (рис. 3.26, В) мали невеликі відростки, що вказує на їх стабільний морфофункціональний стан (рис. 3.26, А – Д).

Окрім клітин макро- та мікроглії (рис. 3.27, A, B) на зрізах СМ самиць контрольної групи, нейрони (рис. 3.27, Б) були звичної морфології: мали один довгий відросток та ядро нормального розміру. Отже, тканина СМ як самців, так і самиць мишей зберігала природну цитоархітектоніку (рис. 3.27, А – Д).



Рис. 3.25 Мікрофотографії зрізів СМ самців (контроль): подвійне імуногістохімічне забарвлення: A – за маркером основного білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); В – за маркером цитоскелету нейронів β(III)-tubulin (червоний колір); Г – за маркерами MBP + β(III)-tubulin; Ґ – за маркерами GFAP + β(III)-tubulin; Д – за маркерами MBP + GFAP + β(III)-tubulin. ЦК – центральний канал. Масштабна лінійка – 100 мкм



Рис. 3.26 Мікрофотографії зрізів СМ самиць (контроль): подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Іba-1 (синій колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. Білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія; ЦК – центральний канал СМ. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.27 Мікрофотографії зрізів СМ самиць (контроль): подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером цитоскелету нейронів β (III)-tubulin (червоний колір); В – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); Г – за маркерами β (III)-tubulin + GFAP; Ґ – за маркерами MBP + β (III)-tubulin; Д – за маркерами MBP + β (III)tubulin + GFAP. Білі стрілки – астроцити. Масштабна лінійка – 50 мкм

На 1-2-му тижнях посттравматичного періоду у тканині СМ тварин групи «ТСМ самці» відзначали деградацію білка мієліну (рис. 3.28, A) у зоні травми та в суміжних із нею зонах тканини СМ. У місці пошкодження СМ спостерігали наявність реактивних астроцитів (рис. 3.28, Б), що характеризувались збільшенням соми, зкороченням та потовщенням їх відростків (реактивний астрогліоз), у порівнянні з контролем. А також спостерігали незначну кількість тіл нейронів та велику кількість дезорієнтованих β (III)-tubulin-позитивних відростків (рис. 3.28, В). Такі дегенеративні зміни в тканині СМ самців вказують на початок розвитку гострої фази запалення з одночасним початком формування рубця (рис. 3.28, А – Д).

У тканині СМ самців з ТСМ на 1-2-у тижнях спостереження окрім, появи реактивних астроцитів (рис. 3.29, А, Б), відзначали також наявність значної кількості реактивних мікрогліальних клітин (рис. 3.29, В) із гіпертрофованою сомою та відростками, що також вказує на активний процес нейрозапалення. Крім того, у цей період виявляли відмежування зони рубцювання від суміжної тканини СМ (рис. 3.29, А – Д).

На 1-2-му тижнях після ТСМ у самиць мишей також відзначали дегенеративні зміни в тканині СМ: деградацію мієліну (рис. 3.30, А) та появу реактивних астроцитів (рис. 3.30, Б). Проте, на відміну від самців мишей, у СМ самиць спостерігали значно активніший реактивний мікрогліоз (рис. 3.30, В), проявами якого було наявність мікрогліальних клітин з гіпертрофованими сомами та потовщеними відростками. Натомість активацію реактивних мікрогліальних клітин як у зоні перетину, так і в ділянках суміжної тканин поперечника СМ не відзначали. Крім того, у СМ тварин групи «ТСМ самиці» на цей термін спостереження не виявляли формування рубця із чіткими межами у місці пошкодження, як це спостерігали у тканині СМ самців на відповідному терміні після ЛПП СМ (рис. 3.30, А – Д).

У зоні пошкодження СМ самців на 1-му місяці після ЛПП також відзначали дегенерацію мієліну (рис. 3.31, A).



Рис. 3.28 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 1-2-й тиждень, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); В – за маркером цитоскелету нейронів β (III)-tubulin (червоний колір); Г – за маркерами GFAP + β (III)-tubulin; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + β (III)-tubulin. p – зона формування рубця; білі стрілки – астроцити в рубці; оранжеві стрілки – β (III)-tubulin-позитивні відростки в рубці; овал – зона рубця. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.29 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 1-2-й тиждень, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (ціановий колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. Овал – зона перерізу, рубець; білі стрілки – астроцити; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 100 мкм



Рис. 3.30 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 2-й тиждень, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (ціановий колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. Оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 25 мкм

На 1-й місяць після ТСМ нейрони СМ зазнавали дегенерації (рис. 3.31, Б), а саме спостерігали округлення їх ядра та утворенням пустот на місці їх соми.



Рис. 3.31 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 1-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером нейронів β(III)-tubulin (червоний колір); В – за маркером астроцитів GFAP (ціановий колір); Г – за маркерами β(III)-tubulin + GFAP; Ґ – за маркерами MBP + β(III)-tubulin; Д – за маркерами MBP + β(III)-107 tubulin + GFAP. ЦК – центральний канал СМ; білі стрілки – астроцити в суміжній зоні. Масштабна лінійка – 50 мкм

Була порушена клітинність та рівномірність країв ЦК, у порівнянні із контрольними зрізами СМ. А реактивний астрогліоз (рис. 3.31, В) спостерігали не лише в ділянці рубця, а й в суміжних із ним ділянках СМ (рис. 3.31, А – Д).

На 1-му місяці спостереження у зрізах СМ тварин групи «ТСМ самиць» відзначали формування рубця в зоні перетину. У межах рубця виявляли незначні фрагменти мієліну (рис. 3.32, А), а також ознаки астрогліозу (рис. 3.32, Б), що проявлялись гіпертрофією соми астроцитів та потовщенням їх відростків.

На межі пошкодженої та суміжної нервової тканини відзначали наявність реактивного мікрогліозу (рис. 3.32, В). Усі ці дегенеративні зміни вказують на продовження гострої фази запалення в тканині СМ самиць після ЛПП на цей термін спостереження (рис. 3.32, А – Д).

Вже на 2-му місяці посттравматичного періоду у СМ самців мишей спостерігали значне збільшення площі кістозної порожнини в місці пошкодження нервової тканини. На цей період було видно значне руйнування мієліну (рис. 3.33, А) та ознаки реактивного астрогліозу (рис. 3.33, Б). А безпосередньо в зоні формування рубця були наявні реактивні мікрогліальні клітини (рис. 3.33, В), що вказує на продовження гострих запальних змін у тканині СМ тварин групи «ТСМ самці» (рис. 3.33, А – Д).

Важливо зазначити, що суміжні з місцем пошкодження зони СМ у самців на 2-му місяці після ТСМ були дещо змінені (рис. 3.34, А – Д), спостерігали фрагментацію та деградацію мієліну (рис. 3.34, А), набряк соми нейронів (рис. 3.34, Б) та появу порожнин на місці деградації. У той же час в суміжних ділянках спостерігали реактивний мікрогліоз (рис. 3.34, В).

На 2-му місяці посттравматичного періоду у тканині СМ самиць мишей відзначали деградацію мієліну (рис. 3.35, А) як у зоні травми, так і в суміжній тканині. Прояви реактивного астрогліозу (рис. 3.35, Б) та мікрогліозу (рис. 3.35, В) також виявляли як всередині рубця, так і навколо нього (рис. 3.35, А – Д).


Рис. 3.32 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 1-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (синій колір); Г – за маркерами MBP + GFAP; Ґ – за маркерами GFAP + Iba-1; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. р – зона рубцювання; сз – суміжна зона рубцю; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 25 мкм



Рис. 3.33 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 2-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (синій колір); Г – за маркерами MBP + Iba-1; Ґ – за маркерами GFAP + Iba-1; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. Білі стрілки – астроцити в рубці; жовті стрілки – мікроглія в рубці; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну в рубці. Масштабна лінійка – 25 мкм



Рис. 3.34 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 2-й місяць (суміжна зона): подвійне імуногістохімічне забарвлення: A - за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б - за маркером цитоскелету нейронів β (III)-tubulin (червоний колір); B - за маркером астроцитів GFAP (синій колір); $\Gamma - за$ маркерами β (III)-tubulin + GFAP; $\Gamma - за$ маркерами MBP + β (III)-tubulin; $\Pi - за$ маркерами MBP + β (III)-tubulin + GFAP. ЦК – центральний канал СМ; білі стрілки – астроцити; білі овали – набряк соми нейронів. Масштабна лінійка – 50 мкм

У порівнянні з 2-м місяцем, на 3-му місяці після ЛПП у тканині СМ тварин групи «ТСМ самці» спостерігали менш виражену фрагментацію мієліну (рис. 3.36, А).

На 3-му місяці відзначали зменшення активності астроцитів (рис. 3.36, Б) та мікрогліальних клітин (рис. 3.36, В), як у місці травмування, так і в суміжній зоні. Такі морфологічні зміни вказують на незначне згасання запалення в тканині СМ самців та початок формування/дозрівання рубця. ЦК на цей термін спостереження мав нерівномірні краї та неоднорідний розподіл клітин (рис. 3.36, А – Д).

У тканині СМ тварин групи «ТСМ самиці» на 3-му місяці спостереження, як і на попередніх термінах, спостерігали продовження фрагментації мієліну та активну демієлінізацію (рис. 3.37, А) у зоні травми. У зоні пошкодження СМ самиць було чітко видно наявність реактивних астроцитів (рис. 3.37, В). У той час як в суміжних зонах астроцити морфологічно не відрізнялись від контрольних. Нейрони (рис. 3.37, Б) в суміжній із зоною рубця нервовій тканині та безпосередньо в зоні травми характеризувались наявністю деформованої клітинної мембрани (ознака преапоптозу) (рис. 3.37, А – Д).

На довготривалий термін посттравматичного періоду, а саме на 6-му місяці після ЛПП у СМ самців, спостерігали подальше дозрівання та ущільнення рубця, який містив переважно мієліновий дебрис (рис. 3.38, А), поодинокі астроцити (рис. 3.38, Б), а також реактивні мікрогліальні клітини (рис. 3.38, В). Слід зазначити, що реактивний мікрогліоз відзначали не лише в зоні рубця, а і в оточуюючих зонах нервової тканини. Такі ознаки вказують на тривалі запальні зміни в тканині СМ самців (рис. 3.38, А – Д).

Тоді як, у суміжній тканині СМ (рис. 3.39, А – Д) на цей посттравматичний термін не відзначали жодних ознак дегенерації мієліну (рис. 3.39, А) та були помітні незначні прояви астро- (рис. 3.39, Б) та мікрогліозу (рис. 3.39, В).



Рис. 3.35 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 2-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (синій колір); Г – за маркерами MBP + GFAP; Ґ – за маркерами GFAP + Iba-1; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. р – рубець; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 25 мкм



Рис. 3.36 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 3-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером олігодендроцитів MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (синій колір); Г – за маркерами MBP + GFAP; Ґ – за маркерами GFAP + Iba-1; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. ЦК – центральний канал СМ; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.37 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 3-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером цитоскелету нейронів β (III)-tubulin (червоний колір); В – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); Г – за маркерами β (III)-tubulin + GFAP; Г – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + β (III)-tubulin + GFAP. Білі стрілки – астроцити; кола – нейрони з деформованою клітинною мембраною (преапоптоз). Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.38 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 6-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (ціановий колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. р – рубець; коло – зона рубця; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.39 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 6-й місяць (суміжна тканина), подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Іba-1 (ціановий колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. Білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 50 мкм

На 6-му місяці посттравматичного періоду у СМ тварин групи «ТСМ самиці» (рис. 3.40, А – Д) виявляли ознаки порушення структури центрального каналу СМ, а саме порушення клітинності та нерівномірність країв.



Рис. 3.40 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 6-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (ціановий колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. ЦК – центральний канал CM; р – рубець; зт – зона травми; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 100 мкм

Стосовно рубця, спостерігали його дозрівання та ущільнення і формування чітких меж із суміжними тканинами (рис. 3.40, А – Д). У зоні пошкодження не відзначали ознак активної деградації мієліну, були наявні лише поодинокі його дебриси (рис. 3.40, А); спостерігали незначні прояви реактивного астрогліозу (рис. 3.40, Б) та мікрогліозу (рис. 3.40, В).

Тканина СМ самиць (рис. 3.41, А – Д), яка найближче розташована до рубця містила невелику кількість мієлінового дебрису (рис. 3.41, А), астроцитів з гіпертрофованими сомами та потовщеними відростками (рис. 3.41, Б) та відростків нейронів (рис. 3.41, В).

На 12-му місяці після ЛПП у СМ самців мишей виявляли ознаки дозрівання рубця (а саме його ущільнення), який мав більш чітко виражені краї, однорідну структуру та містив поодинокі фрагменти мієліну (рис. 3.42, А), у порівнянні із попередніми термінами спостереження. Слід зазначити, що найближча до рубця суміжна тканина СМ містила велику кількість активних астроцитів (рис. 3.42, А) та мікроглії (рис. 3.42, В), тобто прозапальних клітин (рис. 3.42, А – Д).

У тканині СМ самців на 12-му місяці після ТСМ відзначали значну дегенерацію мієліну, лише його поодинокі фрагменти містились у складі рубця (рис. 3.43, А). Також виявляли дезорієнтацію відростків нейронів (рис. 3.43, Б) та ознаки реактивного астрогліозу (рис. 3.43, В) у суміжній рубцю зоні. Ці результати вказують на тривалий процес запалення в тканині СМ самців після ТСМ (рис. 3.43, А – Д).

На відміну від самців, у тканині СМ самиць через 12-ть місяців після ТСМ характерних ознак активного запалення не відзначали у зоні травми та у суміжній тканині (рис. 3.44).



Рис. 3.41 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 6-й місяць: подвійне імуногістохімічне забарвлення: A - за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); B - за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); B - за маркером цитоскелету β (III)-tubulin (синій колір); $\Gamma - за$ маркерами GFAP + β (III)-tubulin; $\Gamma - за$ маркерами MBP + GFAP; $\Pi - за$ маркерами MBP + GFAP + β (III)-tubulin. р – рубець; білі стрілки – астроцити в рубці; жовті стрілки – тубулінові відростки; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.42 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 12-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером астроцитів GFAP (червоний колір); В – за маркером мікрогліальних клітин Іba-1 (синій колір); Г – за маркерами GFAP + Iba-1; Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + GFAP + Iba-1. p – рубець; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; білі стрілки – астроцити в рубці, гліальний рубець; жовті стрілки – мікроглія. Масштабна лінійка – 50 мкм



Рис. 3.43 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самці», 12-й місяць: подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером цитоскелету нейронів β (III)-tubulin (червоний колір); В – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); Г – за маркерами β (III)-tubulin + GFAP; Ґ – за маркерами MBP + β (III)-tubulin; Д – за маркерами MBP + β (III)-tubulin + GFAP. р – рубець; оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; білі стрілки – астроцити; жовті стрілки – дезорієновані тубулінові відростки. Масштабна лінійка – 25 мкм



Рис. 3.44 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 12-й місяць, подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за маркером білка мієліну MBP (зелений колір); Б – за маркером мікрогліальних клітин Iba-1 (синій колір); B – за маркерами MBP + Iba-1; Г – за маркерами астроцитів GFAP + Iba-1 (червоний колір); Ґ – за маркерами MBP + GFAP; Д – за маркерами MBP + Iba-1 + GFAP. Оранжеві стрілки – фрагменти мієліну; жовті стрілки – мікроглія; білі стрілки – астроцити в рубці. Масштабна лінійка – 25 мкм

У суміжних із рубцем зонах тканини СМ самиць на 12-й місяць спостереження були наявні ознаки гіпертрофії соми астроцитів та потовщення їх відростків (рис. 3.45, В), дещо дезорієнтовані відростки нейронів (рис. 3.45, Б), зменшення щільності сом і відростків нейронів (внаслідок зменшення кількості нейронів і, як наслідок, порушення цілісності нервової тканини).



Рис. 3.45 Мікрофотографії зрізів СМ тварин групи «ТСМ самиці», 12-й місяць (суміжна тканина): подвійне імуногістохімічне забарвлення: А – за

маркером білка мієліну МВР (зелений колір); Б – за маркером цитоскелету нейронів β(III)-tubulin (червоний колір); В – за маркером астроцитів GFAP (синій колір); Г – за маркерами β(III)-tubulin + GFAP; Ґ – за маркерами MBP + β(III)-tubulin; Д – за маркерами MBP + β(III)-tubulin + GFAP. Білі стрілки – астроцити. Масштабна лінійка – 50 мкм

На цей термін у суміжній із рубцем зонах СМ самиць також відзначали зменшення рівня мієлінізації їх відростків (рис. 3.45, А), на відміну від зрізів СМ самиць контрольної групи (рис. 3.45, А – Д).

Отже, при проведенні морфологічного дослідження показали відмінності у тривалості запалення тканини CM самців і самиць мишей та різницю в дозріванні рубця. У тварин групи «TCM самці» вже з 1-го тижня і до 12-ти місяців відзначали ознаки гострого запалення не лише в зоні пошкодження, а і в суміжній зоні тканини. На відміну від самиць, у CM самців процес формування і дозрівання рубця тривав довше. У той же час у CM самиць ознаки гострого запалення зникали швидше, починаючи з 1-го місяця і до 6-го місяця після TCM. А суміжна із зоною пошкодження тканина CM не зазнавала таких активних і довготривалих дегенеративних змін, як це спостерігали в CM самців з TCM. Щодо формування рубця, то у самиць цей процес відбувався значно активніше, на відміну від самців; зона рубця у CM самиць була чітко відмежована від суміжної зони.

3.7. Морфологічні зміни в органах видільної та репродуктивної системи тварин, забарвлення гематоксилін-еозином

На різних термінах посттравматичного періоду оцінювали вплив ТСМ на структурні особливості органів видільної та репродуктивної систем тварин обох статей (макрорівень) (рис. 3.46).



Рис. 3.46 Макрофотографії органів видільної і репродуктивної систем: А – самець (контроль, 1-2-й тиждень); Б – самиця (контроль, 1-2-й тиждень); В – самець (1-й тиждень після ТСМ); Г – самиця (1-й тиждень після ТСМ); Ґ – самець (1-й місяць після ТСМ), Д – самиця (1-й місяць після ТСМ). Синя зірка – сечовий міхур

У порівнянні з контрольними тваринами, віком 1-2 місяці (рис. 3.46, A), на 1-му тижні та 1-му місяці спостереження, у самців з ТСМ відзначали ознаки нейрогенного сечового міхура, що проявлялись у нерівномірному потовщенні його стінок (рис. 3.46, В, Ґ), збільшенні загального об'єму (внаслідок запальних процесів) і, як наслідок, ускладненому сечовипусканні. Нирки самців з ТСМ на макрорівні структурно не відрізнялись від контрольних (рис. 3.46, А), зокрема, мали нормальну форму та не мали ознак дегенерації і набряку (рис. 3.46, В, Ґ). Сім'яники і їх епідиди у таких самців не мали ознак набряку чи повнокров'я судин (надлишкове наповнення кров'ю, що призводить до підвищення тиску) (рис. 3.46, В, Ґ), як і у самців контрольної групи (рис. 3.46, А).

У той же час, як і у самиць контрольної групи, віком 1-2 тижні (рис. 3.46, Б), так і у групи «ТСМ самиці» на 1-му тижні та на 1-му місяці спостереження ознак нейрогенного сечового міхура (з потовщеними стінками та збільшеного загального розміру) не спостерігали (рис. 3.46, Г, Д). Нирки на макрорівні у самиць з ТСМ (рис. 3.46, Г, Д) не відрізнялись від таких у самиць контрольної групи (рис. 3.46, Б), а саме не мали зовнішніх ознак запалення чи набряку. Матка та яєчники тварин групи «ТСМ самиці» мали природні форму та розміри (рис. 3.46, Г, Д), як і у самиць контрольної групи (рис. 3.46, Б).

У подальшому, на 3-му, 6-му та 12-му місяці після ТСМ на макрорівні у самців також виявляли ознаки нейрогенного сечового міхура (продовження ущільнення стінок та збільшення його об'єму з порушенням процесу сечовиспускання) (рис. 3.47, В, Г), у порівнянні з контролем (рис. 3.47, А).

У нирках тварин групи «ТСМ самці», як і у самців контрольної групи, віком 12-ть місяців (рис. 3.47, А) на ці терміни спостереження не відзначали ознак набряку чи запалення (рис. 3.47, В, Ґ). Як і в контролі (рис. 3.47, А), розміри та структура сім'яників і сім'яних міхурців мали нормальну форму та розміри (рис. 3.47, В, Ґ).

У експериментальних самиць на 3-му місяці посттравматичного періоду, як і у самиць контрольної групи (рис. 3.47, Б), структурних змін у досліджуваних органах видільної і репродуктивної систем не відзначали (рис. 3.47, Г, Д).



Рис. 3.47 Макрофотографії органів видільної і репродуктивної систем: А – самець (3-й місяць після ТСМ); Б – самиця (3-й місяць після ТСМ); В – самець (6-й місяць після ТСМ); Г – самиця (6-й місяць після ТСМ); Ґ – самець (12-ть місяців після ТСМ), Д – самиця (12-ть місяців після ТСМ). Синя зірка – сечовий міхур

Але, на 6-му та 12-му місяці в самиць з ТСМ виявляли ознаки нейрогенного сечового міхура, а саме збільшення його об'єму, набряк і ущільнення стінок (рис.

3.47, Г, Д), на відміну від контролю (рис. 3.47, Б). Ознак запалення нирок на ці терміни спостереження, як і в контрольних самиць (рис. 3.44, Б), не було виявлено (рис. 3.47, Г, Д). Як і в контролі (рис. 3.47, Б), матка та яєчники самиць після ТСМ також зберігали звичну морфологію на макрорівні (рис. 3.47, Г, Д).

Для подальшого більш детального морфологічного дослідження зрізів органів видільної і репродуктивної систем тварин обох статей проводили забарвлення зрізів гематоксилін-еозином.

У порівнянні із контролем (рис. 3.48, А), на 1-му тижні після ЛПП у самців були нирки звичайної будови, в яких відзначали незначну запальну інфільтрацію клубочків та міжканальцевих просторів (локальне наднормове накопичення клітинних елементів, що супроводжується запаленням, набряком і болем), а також повнокров'я судин (переповнення кров'ю і, як наслідок, підвищення тиску в цих судинах) (рис. 3.48, В). На відміну від самців контрольної групи (рис. 3.48, Б), у сечовому міхурі тварин групи «ТСМ самці» спостерігали стоншення стінок, явиша десквамації епітелію також були помітні слизової оболонки (відшарування епітеліальних клітин) та поява залишків густого слизу біля слизової оболонки сечівника (рис. 3.48, Г).

Ну 1-му місяці у групі «ТСМ самці» в нирках відзначали незначний набряк, а між канальцями спостерігали незначну інфільтрацію (надлишкове депонування рідини, що викликає набряк і запалення тканини нирок) (рис. 3.48, Ґ).

Стінка сечового міхура у самців на цей термін спостереження була стоншена, слизова оболонка характеризувалась десквамацією епітелію (відшаруванням від внутрішнього повздовжнього м'язового шару сечового міхура), а просвіт був заповнений густим детритом та слизом (рис. 3.48, Д).

На 3-му місяці посттравматичного періоду нирки самців мали ряд ознак запалення: кістозне розширення канальців (внаслідок зменшення обсягів функціональної паренхіми нирок), запалення в клубочках, дистрофічні зміни епітелію та загальний набряк тканини (рис. 3.48, E).



Рис. 3.48 Мікрофотографії зрізів органів видільної системи тварин групи «ТСМ самці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – нирки (контроль, 2-й місяць), Б – сечовий міхур (контроль, 2-й місяць), В – нирки (1-й тиждень), Г – сечовий міхур (1-й тиждень), Г – нирки (1-й місяць), Д – сечовий міхур (1-й місяць), Е – нирки (3-й місяць), Є – сечовий міхур (3-й місяць); блакитні стрілки – ексудат; жовті стрілки – розширені канальці; чорні стрілки –

епітеліальний детрит; зелені стрілки – потовщена слизова оболонка; помаранчеві стрілки – потовщений м'язовий шар

У сечовому міхурі таких тварин спостерігали потовщення м'язового шару (на 30%) та гіперплазію слизової оболонки (рис. 3.48, Є). Також був присутній вміст зі слизом та десквамованим епітелієм, що є наслідком активного запального процесу.

На 6-му місяці після ЛПП у самців загальна структура нирок була збережена, хоча виявлено явища дистрофії епітелію канальців (ймовірно внаслідок інфільтрації глікогену або ліпопротеїнів), набряк та незначна запальна інфільтрація клубочків (рис. 3.49, А). Сечовий міхур у тварин групи «ТСМ самці» мав стоншену і розтягнуту м'язову стінку, спостерігали набряк підслизової з великими ділянками розшарування від внутрішнього повздовжнього м'язового шару, також візуалізовали дрібнозернистий вміст у розширеному просвіті сечівника (рис. 3.49, Б).

На 12-му місяці після ЛПП СМ у самців в нирках визначили наявність дистрофії епітелію канальців, набряк та запальну інфільтрацію клубочків (рис. 3.49, В), у порівнянні з контролем (рис. 3.49, Г).

На відміну від сечового міхура самців контрольної групи, віком 12-ть місяців (рис. 3.49, Д), стінка сечівника тварин після ТСМ на цей термін спостереження була стоншена, з ознаками відшарування слизової оболонки від внутрішнього повздовжнього м'язового шару та прикріплення до слизової оболонки незначної кількості ущільненого вмісту (рис. 3.49, Г).

Щодо репродуктивної системи самців, на відміну від контролю, віком 2 місяці (рис. 3.50, А), у сім'яниках тварин групи «ТСМ самці» на 1-му тижні після ЛПП СМ виявлено ознаки виразного набряку та початкові дистрофічні зміни сперматогенного епітелію (рис. 3.50, В).



Рис. 3.49 Мікрофотографії зрізів органів видільної системи тварин групи «ТСМ самці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – нирки (6-ть місяців), Б – сечовий міхур (6-ть місяців), В – нирки (12-ть місяців), Г – сечовий міхур (12-ть місяців), Ґ – нирки (контроль, 12-ть місяців), Д – сечовий міхур (контроль, 12-ть місяців); блакитні стрілки – ексудат; жовті стрілки – розширені канальці; чорні стрілки – епітеліальний детрит; синя стрілка – розшарування м'язових шарів



Рис. 3.50 Мікрофотографії зрізів органів репродуктивної системи тварин групи «ТСМ самці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – сім'яники (контроль, 2-й місяць), Б – сім'яні міхурці (контроль, 2-й місяць), В – сім'яники (1-й тиждень), Г – придатки яєчок (1-й тиждень), Г – сім'яники (1-й місяць), Д – сім'яні міхурці (1-й місяць), Е – сім'яники (3-й місяць), Є – придатки яєчок (3-й місяць); червоні стрілки – потовщені міжчасточкові перегородки; 133

чорні стрілки – епітеліальний детрит; коричневі стрілки – еритроцитарний дебрис

Придатки яєчок самців після ТСМ були переповнені густим секретом, десквамованим (відшарованим) епітелієм та сперматозоїдами (рис. 3.50, Г), що не відзначали у зрізах відповідних органів самців контрольної групи (рис. 3.50, Б). На 1-му місяці спостереження у групі «ТСМ самці» відзначали набряк тканин сім'яників (рис. 3.50, Г). Сім'яні міхурці таких самців містили застійну рідину, епітеліальний детрит та сперматозоїди (рис. 3.50, Д), що в подальшому може спричиняти порушення сперматогенезу.

На 3-му місяці посттравматичного періоду у самців відзначали потовщення сполучнотканинних міжчасточкових перегородок сім'яників, незначні ознаки десквамації (відшарування) сперматогенного епітелію та набряк їх канальців (рис. 3.50, Е). А придатки яєчок таких самців були заповнені непрозорим секретом рожевого кольору: дебрис еритроцитів (рис. 3.50, Є).

На 6-му місяці спостереження у тканині яєчок групи «ТСМ самці» виявляли ознаки набряку, спустошення сім'яних канальців (можливим наслідком чого може бути погіршення утворення і дозрівання сперматозоїдів), явища порушення структури сперматогенного епітелію, округлення та дистрофії клітин Сертолі (які виконують трофічну функцію для сперматозоїдів, що розвиваються) (рис. 3.51, А). Сім'яні міхурці у таких тварин були розширені, їх стінки стоншені, заповнені зернистим вмістом та клітинним детритом (рис. 3.51, Б).

На 12-му місяці, на відміну від самців контрольної групи, віком 12-ть місяців (рис. 3.51, Г) у тварин групи «ТСМ самці» відзначали наявність деструктивних змін у сім'яниках (рис. 3.51, В). Придатки яєчок таких тварин містили прозорий безклітинний секрет (рис. 3.51, Г), у порівнянні із сім'яними міхурцями контрольних тварин (рис. 3.51, Д).



Рис. 3.51 Мікрофотографії зрізів органів репродуктивної системи тварин групи «ТСМ самці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – сім'яники (6-ть місяців), Б – сім'яні міхурці (6-ть місяців), В – сім'яники (12-ть місяців), Г – придатки яєчок (12-ть місяців), Г – сім'яники (контроль, 12-ть місяців), Д – сім'яні міхурці (контроль, 12-ть місяців); чорні стрілки – епітеліальний детрит; помаранчеві стрілки – безклітинний секрет

В органах видільної та репродуктивної систем самиць мишей після TCM також відзначали певні морфологічні зміни на різних довготривалих термінах посттравматичного періоду. На 1-му тижні після ЛПП CM у самиць мишей, як і у тварин контрольної групи, віком 2 місяці (рис. 3.52, A), дегенеративних змін у нирках не відзначали (рис. 3.52, B).



Рис. 3.52 Мікрофотографії зрізів органів видільної системи тварин групи «ТСМ самиці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – нирки (контроль, 2-й місяць), Б – сечовий міхур (контроль, 2-й місяць), В – нирки (1-й тиждень), Г – сечовий міхур (1-й тиждень), Г – нирки (1-й місяць), Д – сечовий міхур (1-й місяць), Є – сечовий міхур (3-й місяць);

блакитні стрілки – ексудат; чорні стрілки – епітеліальний детрит; фіолетові стрілки – склеротичні зміни підслизової оболонки

Хоча, на відміну від контролю (рис. 3.52, Б), у групі «ТСМ самиці» спостерігали потовщення стінки сечового міхура внаслідок контрактури (стягування внаслідок рубцювання) його колового м'язового шару, а також були дистрофічні зміни всіх трьох шарів м'язів, незначна інфільтрація (просочування рідини), повнокров'я судин (переповнення судин із подальшим підвищенням у них тиску) та явища десквамації епітелію його слизової оболонки (рис. 3.52, Г).

На 1-му місяці у групі «ТСМ самиці» спостерігали незначний набряк нирок і мінімальну запальну інфільтрацію клубочків (наповнення рідиною) (рис. 3.52, Г). Сечовий міхур таких самиць мав потовщену стінку внаслідок набряку всіх трьох шарів м'язової та слизової оболонки; також виявляли незначну запальну інфільтрацію (накопичення рідини) (рис. 3.52, Д).

Вже на 3-му місяці посттравматичного періоду у самиць нирки мали звичайну будову, проте спостерігали незначну запальну інфільтрацію (наповнення рідиною) між канальцями та набряк (рис. 3.52, Е). М'язи сечового міхура були в тонусі, мали ознаки дистрофічних змін у вигляді вакуолізації (дистрофічний процес, що характеризується накоченням води у вигляді пухирців), набряку, десквамації епітелію та склеротичних змін підслизового шару (заміна паренхіми м'язів сечівника сполучною тканиною внаслідок запалення) (рис. 3.52, Є).

На подальших термінах спостереження виявляли динамічні дистрофічні зміни в сечовивідних органах експериментальних самиць. Так, на 6-му місяці у самиць після ЛПП спостерігали кістозне розширення клубочків нирок (утворення порожнин, наповнених в'язкою рідиною, що мають здатність рости або зменшуватись), як наслідок посиленого набряку разом з запаленням клубочків нирок (рис. 3.53, А).

Сечовий міхур таких самиць мав ознаки гіперплазії та констрикції повздовжніх і колових м'язів (спазм внаслідок рубцювання після запалення)

(рис. 3.53, Б). На 12-му місяці спостереження у групі «ТСМ самиці» відзначали розвиток вогнищевого хронічного запалення клубочків нирок, склероз та кістозні зміни канальців нирок (рис. 3.53, В), на відміну від таких органів контрольних тварин, віком 12-ть місяців (рис. 3.53, Г).



Рис. 3.53 Мікрофотографії зрізів органів видільної системи тварин групи «ТСМ самиці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – нирки (б-й місяць), Б – сечовий міхур (б-й місяць), В – нирки (12-й місяць), Г – сечовий міхур – (12-й місяць), Ґ – нирки (контроль, 12-й місяць), Д – сечовий міхур (контроль, 12-й місяць); блакитні стрілки – ексудат; чорні стрілки – епітеліальний детрит; червоні стрілки – гірплазовані м'язи; рожеві стрілки – кістозні зміни канальців

Стінка сечового міхура таких самиць була стоншена, а також було виявлено явища десквамації слизової оболонки та запальної вогнищевої інфільтрації сечівника (накопичення рідини) (рис. 3.53, Г), у порівнянні з контролем (рис. 3.53, Д).

Органи репродуктивної системи самиць після моделювання ТСМ також зазнавали деструктивних змін (рис. 3.54). На 1-му тижні спостереження як і у самиць контрольної групи (рис. 3.54, А), так і у самиць з ТСМ, яєчники були звичайної будови, містили фолікули та Граафові міхурці (рис. 3.54, В). Матка таких тварин, як і у контролі (рис. 3.54, Б), мала звичайну будову, хоча порожнина її була дещо розширена (рис. 3.54, Г).

На 1-му місяці посттравматичного періоду у групі «ТСМ самиці» спостерігали наявність жовтих тіл в яєчниках, морфологічно подібних до таких, як під час менструального циклу чи вагітності (рис. 3.54, Г). Матка таких тварин мала звичайну будову, проте спостерігали прояви незначної гіперплазії ендометрію та кістозного розширення залоз (рис. 3.54, Д).

На 3-му місяці після ЛПП СМ у самиць мишей яєчники мали звичайну будову та зрілий фолікул з яйцеклітиною (рис. 3.54, Е). Матка таких самиць мала звичайну будову, проліферативна активність ендометрію також була у нормі (рис. 3.54, Є).

На 6-му місяці посттравматичного періоду у самиць яєчники були звичайної будови із переважанням примордіальних фолікулів (рис. 3.55, А). Матка самиць у цей період мала кістозні зміни ендометрію (утворення порожнин, наповнених рідиною, які здатні збільшуватись і зменшуватись) (рис. 3.55, Б).

У порівнянні із яєчниками, які були нормальної будови у самиць контрольної групи, віком 12-ть місяців (рис. 3.55, Ґ), у експериментальних самиць на 12-му місяці посттравматичного періоду спостерігали наявність яєчника звичайної будови із зрілими фолікулами, хоча, також були помітні відкладення гемосидерину (аморфний пігмент, полімер феритину, що утворюється при розщепленні гема) та фолікулярні кісти (рис. 3.55, В).



Рис. 3.54 Мікрофотографії зрізів органів репродуктивної системи тварин групи «ТСМ самиці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – яєчник (контроль, 2-й місяць), Б – матка (контроль, 2-й місяць), В – яєчник (1-й тиждень), Г – матка (1-й тиждень), Г – яєчник (1-й місяць), Д – матка (1-й місяць), Е – яєчник (3-й місяць), Є – матка (3-й місяць); жовті стрілки – фолікули; сині стрілки – Граафові тільця; чорні стрілки – гіперплазований ендометрій

Матка таких самиць на цей термін спостереження мала кістозні та запальні зміни ендометрію (рис. 3.55, Г), у порівнянні з контролем (рис. 3.55, Д).



Рис. 3.55 Мікрофотографії зрізів органів репродуктивної системи тварин групи «ТСМ самиці», забарвлення гематоксилін-еозином: А – яєчник (6-й місяць), Б – матка (6-й місяць), В – яєчник (12-й місяць), Г – матка (12-й місяць), Г – матка (12-й місяць після ТСМ), Г – яєчник (контроль, 12-й місяць), Д – матка (контроль, 12-й місяць); жовті стрілки – фолікули; зелені стрілки – ендометріоїдні кісти

Таким чином, органи видільної та репродуктивної систем як самців, так і самиць зазнають дегенеративних змін внаслідок ТСМ. У самців вже з 1-го тижня посттравматичного періоду спостерігали довготривалу запальну реакцію в

нирках; повнокров'я судин і десквамацію епітелію слизової оболонки сечового міхура, а також потовщення (внаслідок запалення) його м'язового шару (за 30%). З боку репродуктивної системи самців з ТСМ також вже на ранніх термінах спостереження відзначали набряк та дистрофічні зміни сперматогенного епітелію яєчок; згодом, дистрофію клітин Сертолі; стоншення стінок сім'яних міхурців, а також накопичення в них рідини. У самиць дегенеративні зміни в нирках та сечовому міхурі виявляли починаючи з 1-го місяця після ЛПП СМ. А саме, у таких самиць нирки мали незначні ознаки запалення та інфільтрації, навіть на довготривалих термінах. Сечовий міхур таких тварин мав ознаки незначного набряку слизової оболонки та потовщення м'язового шару. В органах репродуктивної системи тварин групи «ТСМ самиці» лише з 6-го місяця спостерігали ознаки кістозних змін ендометрію матки та яєчників.

Встановили, що травмування СМ у самців мишей, на відміну від такого у самиць, спричиняє більш помітні дегенеративні зміни як у органах видільної, так і репродуктивної систем.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Травмування СМ досі вважається одним з найбільш складних станів сучасного людства. Від травм СМ страждають приблизно 54 людини із 1 млн людей у США; крім того, щорічно фіксують близько 17 700 нових випадків травмування СМ [151]. Пошкодження тканини СМ призводить не лише до втрати моторних функцій, порушення кровопостачання, а й порушення больової і температурної чутливості тіла нижче місця травмування. Хоча, особливості наслідків травмування СМ залежать від рівня пошкодження СМ та типу травми [152].

Травми СМ найчастіше зустрічаються у чоловіків, проте, нерідко пошкодження СМ зазнають і жінки. Деякі експериментальні та клінічні дані вказують на морфологічні та функціональні відмінності відновлення нервової тканини у різних статей [153]. Хоча, не зважаючи на ряд дегенеративних змін, нерідко відзначають природнє відновлення тканини СМ, що відбувається шляхом реполімеризації актину, тубуліну та нейрофіламентів аксонів нейронів, і попередження виділення продуктів окислення. Крім того, у нейронах пошкодженої тканини активується метаболізм та відновлення енергетичного балансу, що в свою чергу, посилює мітохондріальний транспорт, спрямований на регенерацію аксонів та відновлення синаптичних контактів. Хоча, регенерація аксонів не завжди гарантує правильний напрямок проростання аксонів у місці травмування [153].

З метою детального дослідження особливостей відновлення тканини СМ людей після травмування проводять моделювання різного типу травм СМ на лабораторних тваринах, зокрема, щурах, мишах, собаках, нелюдиноподібних приматах [154]. На сьогодні найпоширенішими моделями травм СМ вважають забій, контузію, ексайтотоксично-індуковану модель, повний перетин, неповний/половинний перетин СМ тощо [155, 156]. Важливо зазначити, що дослідження наслідків ТСМ (відновлення моторних функцій та регенерація

нервової тканини) переважно, проводять на тваринах однієї статі (зокрема, на самцях) і на короткотривалих термінах посттравматичного періоду.

При моделюванні забою СМ у самиць мишей ряд авторів відзначали ознаки активного запалення в нервовій тканині вже на 14-ту добу: реактивний астрогліоз та дегенерацію нейронів [157]. На моделі контузії СМ у самиць щурів спостерігали дегенерацію нейронів, загальну деструкцію сірої речовини СМ, збільшення порожнини в нервовій тканині та появу реактивних астроцитів на 1й день після ТСМ. За результатами досліджень інших авторів після контузії СМ (самиць щурів) на 1-2-му та 4-12-му тижні посттравматичного періоду відзначали повну відсутність нейронів у місці травмування, розширення некротизованої ділянки СМ до ЦК та формування щільного гліального рубця. На цій же моделі представлено П Φ за ВВВ на різні терміни дослідження: 3,40±0,60 бали на 1-й день; 11,90±0,30 балів на 2-му тижні та 13,10±0,40 на більш пізніх термінах; що вказує на суттєве відновлення локомоторних функцій у таких тварин [158]. При моделюванні ексайтотоксично-індукованої ТСМ у самиць щурів автори також відзначали ознаки запалення, апоптозу і формування порожнини на місці деградованих клітин вже на 28-му добу спостереження [159].

Більш складним типом травми вважають повний перетин СМ, але вагомим недоліком такої моделі є висока смертність тварин. Так, за даними деяких досліджень у C57BL/6 мишей вже на 4-му тижні після ТСМ виявляли сформований гліальний рубець та ознаки гострого запалення не лише в зоні травми, а і в суміжних зонах СМ [160].

Найбільш поширена та наближена до клінічних випадків є модель ТСМ: неповний/половинний перетин. Така модель ТСМ має ряд переваг: на відміну від моделі повного перетину СМ, не спричиняє високий рівень летальності (завдяки збереженню цілісності хребтової артерії), інша половина СМ може бути контрольною в межах одного організму, зона пошкодження кісткової тканини незначна (це в свою чергу зменшує ризик додаткового травмування) [161, 162, 163]. Така модень травми також є перспективною для дослідження регенеративного впливу стовбурових клітин різного походження, а також
полімерних природних і синтетичних матриксів без або сумісно із стовбуровими клітинами [164].

При оцінці ПФ ЗІК у щурів (за шкалою ВВВ) на 1-й місяць після половинного перетину СМ автори встановили ПФ ЗІК: 1,50±0,33 бала з подальшим зростанням на 11-й місяць до 3,20±0,58 балів; що вказує на природне відновлення тканини СМ та відповідно моторної активності [165].

У даній дисертаційній роботі продемонстрували зміни ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у самців і самиць мишей у різні терміни послідження. А саме показали поступове зростання ПФ ЗІК за шкалою ВВВ у тварин групи «TCM самці»: $1,21\pm0,23$ бала на 1-му тижні після ЛПП CM; $3,26\pm0,34$ на 3-му місяці після TCM; $3,60\pm0,34$ на 6-му місяці посттравматичного періоду та $3,81\pm0,34$ на 12-му місяці після TCM самиці» на 1-му тижні після TCM ПФ ЗІК за шкалою ВВВ сягав $1,39\pm0,13$ бали; після чого зростав до $4,50\pm0,32$ на 3-му місяці після TCM.

За такого ж типу ТСМ у щурів на 28-му тижні спостереження середній бал ПФ ЗІК за шкалою ВВВ становив 1,60 ± 0,5 бала; що вказує на відновлення функціональної та локомоторної активності ЗІК тварин [166].

Крім того, у дисертаційній роботі продемонстровано достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ на 1-му, 2-му тижнях та на 1-12-му місяці після ТСМ у самців і самиць мишей, у порівнянні з контролем, та в межах груп тварин; на 2-12-му місяцях посттравматичного періоду показано достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між групами самців і самиць мишей з ТСМ. Також показано достовірні відмінності ПФ ЗІК самців і самиць мишей з ТСМ, у порівнянні з контрольними тваринами на 1-му, 2-му тижнях та на 1-12-му місяцях посттравматичного періоду; на 3-му, 9-му та 11-му і 12-му місяцях посттравматичного періоду показано достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою В між групами самців і самиць.

Після моделювання травм СМ також проводять оцінку рівня спастичності ЗІК, зокрема, за шкалою Ashworth. Автори вказують, що на 1-му тижні після половинного перетину СМ (T12 – T13) у щурів середній ПФ ЗІК за шкалою

Ashworth складав 0,30±0,10 бал, а на 5-му місяці – зріс до 0,80±0,20 балів. ПФ ЗІК за шкалою ВВВ на згадані терміни складав 5,90±1,10 та 9,50±1,00 (р≤0,05) бали відповідно [167].

У даній дисертаційній роботі на 1-му тижні після ЛПП СМ самців ПС за шкалою Ashworth становив 3,68±0,1 бали; 3,31±0,17 бали – на 3-му місяці та 3,29±0,16 бали – на 6-му місяці. Також в роботі встановлено достовірні відмінності ПС ЗІК за шкалою Ashworth у самців і самиць мишей, у порівнянні з контрольними тваринами на 1-му, 2-му тижні та 1-12-му місяцях спостереження. На 1-2-му та 9-12-му місяцях посттравматичного періоду показано достовірні відмінності ПС ЗІК за шкалою Ashworth між групами самців і самиць після ЛПП СМ.

Як відомо ТСМ призводять до деструктивних структурних змін у нервовій тканині, а саме астогліозу, мікрогліозу, появі кістозних змін та з часом формування рубця. За результатами морфологічних досліджень авторів, показано структурні зміни в тканині СМ людей після вогнепального поранення або зміщення хребта на рівні шийного або грудного відділів. Так, відразу після травмування відзначають появу хаотично розміщеної глибокої геморагії, а в центрі місця травмування – набряк із високим вмістом нейтрофілів [168]. Вже на 3-тю добу після ТСМ глибока геморагія та набряк поширюються і на суміжні зони тканини СМ. На 1-му тижні посттравматичного періоду спостерігають геморагію і набряк у місці травмування, що свідчить про гостру стадію запалення; проте, набряк аксонів у білій речовині СМ значно збільшився. На 3-4-му внаслідок реабсорбції некротизованих нервових клітин тижнях спостерігають утворення порожнин у тканині СМ [168].

У даній роботі показали морфологічні зміни в тканині СМ як самців, так і самиць з ТСМ. Так, у тканині СМ самців і самиць мишей відзначали ознаки дегенеративних змін з подальшим утворенням волокнистого рубця в місці травмування СМ. Проте, у порівнянні із самицями, розміри, термін формування і дозрівання рубця у самців був значно тривалішим.

Також у дисертаційній роботі після проведеного імуногістохімічного дослідження тканини СМ продемонстуровали результати морфологічних змін у тканині СМ після ЛПП у тварин обох статей. На відміну від самиць, у самців відзначали довготривалу стадію гострої фази запалення, що виявляли наявністю реактивного астро- та мікрогліозу. Формування рубця на місці ТСМ у самців також відбувалось повільніше, ніж у СМ самиць мишей. Суміжні із рубцем інтактні ділянки тканини СМ у самиць мали короткотривалі незначні ознаки запалення, тоді як у самців інтактна тканина СМ мали ознаки гострої стадії запалення навіть на довготривалих термінах посттравматичного періоду.

Деякі автори зазначають, що при моделюванні ТСМ шляхом половинного перетину (на щурах) у нервовій тканині на 1-28-й днях спостерігали ознаки активного апоптозу нервових клітин [169]. За даними інших авторів (на 4-му місяці) за такого ж типу травми у тканині СМ щурів виявляли прояви активного астрогліозу та мікрогліозу, що вважають передумовою формування гліального рубця [170].

Слід зауважити, що ТСМ будь-якого типу, окрім, безпосереднього впливу на нервову тканину, призводять до морфологічних та функціональних змін в інших органах і системах органів, зокрема, в органах видільної та репродуктивної систем як чоловіків, так і жінок, викликаючи вторинні системні ураження [169]. Проте, отриманих даних на сьогодні недостатньо для того, щоб сформулювати повну картину морфофункціональних змін у таких системах органів після травмування СМ.

Так, ряд авторів описують дегенеративні процеси не лише в СМ, а і в органах видільної та репродуктивної систем, які значно відрізняються у обох статей. Ряд експериментальних досліджень вказує на те, що такі статеві гормони як естроген, прогестерон та тестостерон можуть сприяти зниженню ступеню пошкодження нервової тканини і, відповідно, покращувати функціональну активність у тварин [171]. Зокрема, прогестерон знижує запалення, пригнічує активність мікрогліальних клітин, попереджає набряк клітин, їх апоптоз, а, з іншого боку, посилює дозрівання олігодендроцитів, стимулює синтез мієліну для ремієлінізації пошкоджених аксонів у СМ. Естроген виявляє нейропротекторні властивості завдяки зміні транспорту мітохондріального Ca²⁺, підтриманні стабільного мембранного потенціалу мітохондрій за умов клітинного стресу та активації синтезу і розподілу антиапоптотичного білка. Естроген також захищає від токсичності глутамату шляхом активації утворення Bcl-2 протеїна, дозволяючи нейронам обмежити концентрацію цитозольного Ca²⁺ [171, 172]. Тестостерон також попереджає розвиток посттравматичних нейродегенеративних процесів у СМ. Хоча існує ряд даних, що свідчать про відсутність відмінностей посттравматичного відновлення за участі чоловічого статевого гормону [173, 174, 175].

Загалом ТСМ негативно впливають на морфофункціональний стан видільної та репродуктивної систем, як чоловіків, так і жінок. Так, в першу чергу розвивається ниркова недостатність та детрузорно-сфінктерна диссинергія (уродинамічний синдром, що виникає внаслідок запальних процесів у сечовивідній системі, та призводить до порушення координації функціонування м'язів детрузора та сфінктера). Зрештою, такі ускладнення безпосередньо впливають на сечовипускання: спричиняють труднощі в сечовипусканні у вигляді нетримання сечі, частому сечовипусканні, болісному і ускладненому сечовипусканні [176, 177]. Нерідко такі дисфункції у видільній системі чоловіків викликають супутнє інфікування не лише органів видільної, а й органів репродуктивної системи [178, 179]. З боку репродуктивної системи, спостерігають анеякуляцію у чоловіків з ТСМ, що в свою чергу, негативно впливає на їх фертильність (з часом призводячи до стерильності) [180, 181].

У жінок після ТСМ також відзначають значні порушення структури та функцій органів видільної і репродуктивної систем. Як і чоловіки, жінки страждають від запалення сечівника, труднощів сечовипускання, а також порушення роботи нирок, що призводить до розвитку сечокам'яної хвороби [182, 183, 184].

Реакція репродуктивної системи жінок у посттравматичний період виявляється у порушенні менструального циклу, аменореї, маткових кровотечах,

нейрогенній пролактинемії, нетриманні молока під час лактації. Жінкам із ТСМ також складніше завагітніти і виносити дитину, хоча, безпліддя, як це спостерігають у чоловіків, зустрічається рідко [185, 186, 187].

Проте, досі відсутні детальні експериментальні дослідження на лабораторних тваринах щодо впливу ТСМ на морфофункціональний стан інших низхідних органів. Зокрема, наразі оцінки морфофункціональних змін в органах видільної і репродуктивної системи лабораторних тварин різної статі на довготривалих термінах після моделювання ТСМ не було проведено. У даній роботі аналізуємо морфофункціональні зміни в органах як видільної (нирки та сечовий міхур для самців і самиць), так і репродуктивної систем (сім'яники, придатки сім'яників та сім'яні міхурці – у самців; та матка і яєчники – у самиць) мишей обох статей після ЛПП СМ.

За даними проведеного забарвлення гематоксилін-еозином органів видільної та репродуктивної систем експериментальних самців і самиць мишей лінії *FVB* з 1-го тижня по 12-й місяць посттравматичного періоду: у самців вже з початкових термінів спостереження виявляли дистрофію, набряк та запалення нирок; стоншення стінок сечівника та посилену інфільтрацію, що призводить до формування нейрогенного сечового міхура внаслідок тривалих запальних процесів, порушення аферентної та еферентної іннервації, а також порушення роботи м'язів шийки сечівника. З боку репродуктивної системи у самців виявили дегенеративні зміни та застійні процеси у сперматогенному епітелії сім'яників і сім'явивідних протоках сім'яних міхурців.

У самиць на відповідні терміни спостереження виявляли незначний набряк нирок; потовщення стінок сечівника, його набряк та незначну інфільтрацію на більш пізніх термінах після TCM, у порівнянні із самцями. Репродуктивна система самиць з TCM лише на пізніх термінах спостереження зазнавала незначних деструктивних змін у вигляді появи фолікулярних кіст у яєчниках; матка таких зберігала звичайну форму з кістозними змінами ендометрію.

Отже, в роботі вперше показали достовірні відмінності відновлення моторних функцій у мишей обох статей на різних термінах спостереження.

Також продемонстрували зменшення рівня спастичності ЗІК у самців і самиць мишей після ТСМ. Крім того, виявили, що внаслідок ТСМ у самців і самиць мишей відбуваються довготривалі запальні процеси та формування рубця в нервовій тканині. Крім того, продемонстровали дегенеративні зміни в органах видільної та репродуктивної системи самців і самиць з ТСМ. Отримані дані можуть бути враховані в клінічній практиці для розробки протоколів з подальшого лікування наслідків травмування нервової тканини. Крім того, отримані дані мофологічних досліджень можуть слугувати основою для подальшого вивчення впливу ТСМ на органи видільної, репродуктивної та інших систем органів у тварин обох статей.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, згідно з поставленою метою та завданнями, проведено дослідження морфофункціональних особливостей спонтанного відновлення у мишей різної статі після ТСМ.

- Проведено моделювання ТСМ ЛПП у самців і самиць мишей лінії FVB (з високим рівнем виживаності тварин) та з подальшим спостереженням до 12-го місяця.
- 2. На 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях після ТСМ за шкалою ВВВ виявлено достовірні відмінності ПФ ЗІК у груп «ТСМ самці» і «ТСМ самиці» мишей у порівнянні з контрольними тваринами та в межах груп експериментальних тварин; на 2-12-му місяцях посттравматичного періоду показано достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою ВВВ між групами експериментальних самців і самиць мишей.
- 3. Продемонстровано достовірні відмінності ПФ ЗІК самців і самиць мишей після ТСМ, у порівнянні з контрольними тваринами на 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях посттравматичного періоду; на 3-му, 9-му та 11-12-му місяцях після ЛПП СМ виявлено достовірні відмінності ПФ ЗІК за шкалою В між групами експериментальних самців і самиць.
- 4. На 1-му, 2-му тижнях та 1-12-му місяцях після ЛПП СМ за шкалою Ashworth виявлено достовірні відмінності ПС ЗІК самців і самиць мишей, у порівнянні з контрольними тваринами. На 1-3-му та 9-12-му місяцях спостереження встановлено достовірні відмінності ПС ЗІК за шкалою Ashworth між групами «ТСМ самці» і «ТСМ самиці».
- 5. Встановлено кореляцію ПФ ЗІК (за шкалою ВВВ та В) між ПС ЗІК (за шкалою Ashworth) у тварин обох статей після ЛПП СМ на всіх термінах спостереження. У самців виявлено достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК (за шкалою В) та ПС ЗІК (за шкалою Ashworth) на 1-2-му тижнях, 3-4-му, 6-8-му та 11-12-му місяцях спостереження. Показано достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК (за шкалою BBB) між ПС ЗІК (за шкалою Ashworth) у тварин групи «ТСМ самиці» на 5-му місяці

після ТСМ; достовірно помірну негативну кореляцію ПФ ЗІК (за шкалою В) між ПС ЗІК (за шкалою Ashworth) встановлено на 4-7-му місяці після ТСМ, та достовірно сильну негативну кореляцію досліджуваних показників на 9-му місяці спостереження. На всіх термінах дослідження встановлено сильну позитивну кореляцію ПФ ЗІК (за шкалою BBB та B) з часом, що свідчить про динамічне посттравматичне відновлення моторної активності ЗІК у тварин обох статей. Виявлено сильну негативну кореляцію ПС ЗІК за шкалою Ashworth в часі на всіх досліджуваних термінах посттравматичного періоду, що вказує на достовірне зниження рівня спастичності ЗІК експериментальних самців і самиць мишей.

- 6. Після морфологічного дослідження виявлено дегенеративні зміни в CM мишей обох статей після ЛПП. У тканині тканині CM експериментальних самців показано довготривалу запальну реакцію та формування волокнистого рубця в зоні травмування із ознаками запалення в суміжній тканині СМ на всіх термінах посттравматичного періоду (до 12го місяця). Встановлено, що в тварин групи «ТСМ самиці» запалення тканини СМ було короткотривалим та незначним (починаючи з 1-го місяця і до 6-го місяця після ТСМ); формування та дозрівання рубця в зоні травми СМ відбувалось швидше (до 6-го місяця після ЛПП), у порівнянні з групою «ТСМ самці»; суміжні із рубцем ділянки СМ не виявляли значних ознак запалення.
- 7. Показано морфологічні посттравматичні відмінності відновлення тканини СМ у мишей обох статей за допомогою імуногістохімічного забарвлення. У самців запальну реакцію, яка проявлялась у вигляді реактивного астрогліозу та мікрогліозу безпосередньо в зоні травмування і в суміжних тканинах СМ спостерігали навіть на довготривалих термінах дослідження. У тварин групи «ТСМ самиці» процес реактивного астрогліозу та мікрогліозу у зоні перетину був незначно вираженим та короткотривалим, а у суміжній із рубцем тканині на всіх термінах спостереження не виявляли видимих ознак запалення.

8. Встановлено морфофункціональні зміни в органах видільної (нирки, сечовий міхур) та репродуктивної систем мишей обох статей (сім'яники, сім'яні міхурці та придатки сім'яників – для самців; матка та яєчники – для самиць) після ТСМ. У експериментальних самців (з 1-го місяця і впродовж всього терміну спостереження) відзначали ознаки активного довготривалого запалення нирок, запалення і стоншення стінок сечівника; а також застійні та дегенеративні зміни у сім'яниках і сім'яних міхурцях. На відміну від групи «ТСМ самці», у групі «ТСМ самиці» процеси набряку і запалення як в нирках, так і в сечівнику були незначними (найбільш помітні лише на 3-й місяць після ТСМ). Матка зберігала таку ж форму, як і у самиць групи «Контроль», і лише на деяких термінах (6-ть та 12-ть місяців) посттравматичного періоду візуалізували кістозні зміни ендометрію та яєчників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Jazayeri SB, Maroufi SF, Mohammadi E, Dabbagh Ohadi MA, Hagen E-M, Chalangari M, et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: A systematic review, data integration, and update. World Neurosurgery: X. 2023;18:100171. doi:10.1016/j.wnsx.2023.100171.

2. Ding W, Hu S, Wang P, Kang H, Peng R, Dong Y, et al. Spinal Cord Injury: The global incidence, prevalence, and disability from the global burden of disease study 2019. Spine. 2022;47(21):1532–40. doi:10.1097/brs.00000000004417.

3. Mataliotakis GI, Tsirikos AI. Spinal cord trauma: Pathophysiology, classification of spinal cord injury syndromes, treatment principles and controversies. Orthopaedics and Trauma. 2016;30(5):440–9. doi:10.1016/j.mporth.2016.07.006.

4. Chambel SS, Tavares I, Cruz CD. Chronic pain after spinal cord injury: Is there a role for neuron-immune dysregulation? Frontiers in Physiology. 2020 Jul 7;11. doi:10.3389/fphys.2020.00748.

5. Lee SE, Greenough EK, Oancea P, Scheinfeld AR, Douglas AM, Gaudet AD. Sex differences in pain: Spinal cord injury in female and male mice elicits behaviors related to neuropathic pain. Journal of Neurotrauma. 2023 May 1;40(9–10):833–44. doi:10.1089/neu.2022.0482.

6. Li Y, Ritzel RM, Lei Z, Cao T, He J, Faden AI, et al. Sexual dimorphism in neurological function after SCI is associated with disrupted neuroinflammation in both injured spinal cord and brain. Brain, Behavior, and Immunity. 2022;101:1–22. doi:10.1016/j.bbi.2021.12.017.

7. Raguindin PF, Muka T, Glisic M. Sex and gender gap in Spinal Cord Injury Research: Focus on cardiometabolic diseases. A Mini Review. Maturitas. 2021;147:14–8. Doi:10.1016/j.maturitas.2021.03.004.

8. Fisch AJ. The Spinal Cord & Spine. Neuroanatomy. 2017;139–64. Doi:10.1093/med/9780190259587.003.0006.

9. Spinal Cord, meninges and spinal nerves. Anatomy for Problem Solving in Sports Medicine. 2012;36–51. doi:10.7313/upo9781908062864.009.

10.G; H-MMV. Physiology, Spinal Cord [Internet]. U.S. National Library ofMedicine;[cited2023Dec25].Availablefrom:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334987/.

11. [Internet]. [cited 2023 Dec 24]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559056/.

12. Tsymbaliuk V, Medvediev V, Semenova V, Grydina N, Iaminskiy I, Senchyk Y, 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. 2016;0(4):16–25. doi:10.25305/unj.86577.

13. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. Frontiers in Neurology. 2019;10. doi:10.3389/fneur.2019.00282.

14. Sezer N. Chronic complications of Spinal Cord Injury. World Journal of Orthopedics. 2015;6(1):24. doi:10.5312/wjo.v6.i1.24.

15. Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: From pathology to potential therapies. Disease Models & amp; Mechanisms. 2016;9(10):1125–37. doi:10.1242/dmm.025833.

16. Lilley E, Andrews MR, Bradbury EJ, Elliott H, Hawkins P, Ichiyama RM, et al. Refining rodent models of spinal cord injury. Experimental Neurology. 2020;328:113273. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113273.

17. Marques SA, de Almeida FM, Mostacada K, Martinez AM. A highly reproducible mouse model of compression spinal cord injury. Methods in Molecular Biology. 2014;149–56. doi:10.1007/978-1-4939-0777-9_12.

18. Sharif-Alhoseini M, Rahimi-Movaghar V. Animal models in traumatic spinal cord injury. Topics in Paraplegia. 2014; doi:10.5772/57189.

19. Anderson TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. Journal of Neuroscience Methods. 1982;6(4):327–33. doi:10.1016/0165-0270(82)90033-4.

20. Deep A, Adeeb N, Hose N, Rezaei M, Fard SA, Tubbs RS, et al. Mouse models of spinal cord injury and Stem Cell Transplantation. Translational Research in Anatomy. 2015;1:2–10. doi:10.1016/j.tria.2015.10.001.

21. Young W. Chapter 17 spinal cord contusion models. Progress in Brain Research. 2002;231–55. doi:10.1016/s0079-6123(02)37019-5.

22. McDonough A, Martínez-Cerdeño V. Endogenous proliferation after spinal cord injury in animal models. Stem Cells International. 2012;2012:1–16. doi:10.1155/2012/387513.

23. Cheriyan T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyan J, Paul JC, Lafage V, et al. Spinal Cord Injury Models: A Review. Spinal Cord. 2014;52(8):588–95. doi:10.1038/sc.2014.91.

24. Wu X, Zhang YP, Qu W, Shields LB, Shields CB, Xu X-M. A tissue displacement-based contusive spinal cord injury model in mice. Journal of Visualized Experiments. 2017;(124). doi:10.3791/54988.

25. A Geissler S. Rodent models and behavioral outcomes of cervical spinal cord injury. Journal of Spine. 2013; doi:10.4172/2165-7939.s4-001.

26. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. Frontiers in Neurology. 2019;10. doi:10.3389/fneur.2019.00282.

27. Ding M, Zhang N, Fang M, Chen H, Gou F. Evaluation of Spinal Cord Injury Animal Models. Neural Regeneration Research. 2014;9(22):2008. doi:10.4103/1673-5374.143436.

28. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. Journal of Neurotrauma. 2004;21(6):754–74. doi:10.1089/0897715041269641.

29. Deep A, Adeeb N, Hose N, Rezaei M, Fard SA, Tubbs RS, et al. Mouse models of spinal cord injury and Stem Cell Transplantation. Translational Research in Anatomy. 2015;1:2–10. doi:10.1016/j.tria.2015.10.001.

30. Ju G, Wang J, Wang Y, Zhao X. Spinal Cord Contusion. Neural Regeneration Research. 2014;9(8):789. doi:10.4103/1673-5374.131591.

31. Reshamwala R, Eindorf T, Shah M, Smyth G, Shelper T, St. John J, et al. Induction of complete transection-type spinal cord injury in mice. Journal of Visualized Experiments. 2020;(159). doi:10.3791/61131-v.

32. Rybachuk OA, Lazarenko YuA, Krotov VV, Voitenko NV. Structural/functional characteristics of organotypic spinal cord slices under conditions of long-lasting culturing. Neurophysiology. 2017;49(2):162–4. doi:10.1007/s11062-017-9647-5.

33. Cloud BA, Ball BG, Chen BK, Knight AM, Hakim JS, Ortiz AM, et al. Hemisection spinal cord injury in rat: The value of intraoperative somatosensory evoked potential monitoring. Journal of Neuroscience Methods. 2012;211(2):179–84. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.08.024.

34. Ahmed RU, Alam M, Zheng Y-P. Experimental Spinal Cord Injury and behavioral tests in laboratory rats. Heliyon. 2019;5(3). doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01324.

35. Zychlinsky Scharff A, Albert ML, Ingersoll MA. Urinary tract infection in a small animal model: Transurethral catheterization of male and female mice. Journal of Visualized Experiments. 2017;(130). doi:10.3791/54432-v.

36. Girard BM, Tooke K, Vizzard MA. PACAP/receptor system in urinary bladder dysfunction and pelvic pain following urinary bladder inflammation or stress. Frontiers in Systems Neuroscience. 2017;11. doi:10.3389/fnsys.2017.00090.

37. Reshamwala R, Eindorf T, Shah M, Smyth G, Shelper T, St. John J, et al. Induction of complete transection-type spinal cord injury in mice. Journal of Visualized Experiments. 2020;(159). doi:10.3791/61131-v.

38. Li C, Zhu X, Lee C-M, Wu Z, Cheng L. A mouse model of completecrush transection spinal cord injury made by two operations. Annals of Translational Medicine. 2020;8(5):210–210. doi:10.21037/atm.2020.01.58.

39. Woerly S, van Doan D, Sosa N, de Vellis J, Espinosa A. Reconstruction of the transected Cat Spinal Cord following NeuroGelTM implantation: Axonal

Tracing, immunohistochemical and ultrastructural studies. International Journal of Developmental Neuroscience. 2001;19(1):63–83. doi:10.1016/s0736-5748(00)00064-2.

40. Barrière G, Leblond H, Provencher J, Rossignol S. Prominent role of the spinal central pattern generator in the recovery of locomotion after partial spinal cord injuries. The Journal of Neuroscience. 2008;28(15):3976–87. doi:10.1523/jneurosci.5692-07.2008.

41. Escalona M, Delivet-Mongrain H, Kundu A, Gossard J-P, Rossignol S. Ladder treadmill: A method to assess locomotion in cats with an intact or lesioned spinal cord. The Journal of Neuroscience. 2017;37(22):5429–46. doi:10.1523/jneurosci.0038-17.2017.

42. Ren S, Zhang W, Liu H, Wang X, Guan X, Zhang M, et al. Transplantation of a vascularized pedicle of hemisected spinal cord to establish spinal cord continuity after removal of a segment of the Thoracic Spinal Cord: A proof-of-principle study in dogs. CNS Neuroscience & amp; Therapeutics. 2021;27(10):1182–97. doi:10.1111/cns.13696.

43. Rybachuk O, Arkhypchuk I, Lazarenko Yu. In vivo and in vitro models of traumatic injuries of the spinal cord. Cell and Organ Transplantology. 2017;5(1):87–93. doi:10.22494/cot.v5i1.71.

44. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. Frontiers in Neurology. 2019;10. doi:10.3389/fneur.2019.00282.

45. Lee S-H, Chung Y-N, Kim Y-H, Kim Y-J, Park J-P, Kwon D-K, et al. Effects of human neural stem cell transplantation in canine spinal cord hemisection. Neurological Research. 2009;31(9):996–1002. doi:10.1179/174313209x385626.

46. Goldshmit Y, Lythgo N, Galea MP, Turnley AM. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves Motor Recovery. Journal of Neurotrauma. 2008;25(5):449–65. doi:10.1089/neu.2007.0392.

47. Collyer E, Catenaccio A, Lemaitre D, Diaz P, Valenzuela V, Bronfman F, et al. Sprouting of axonal collaterals after spinal cord injury is prevented by delayed axonal degeneration. Experimental Neurology. 2014;261:451–61. doi:10.1016/j.expneurol.2014.07.014.

48. Mahler JF, Stokes W, Mann PC, Takaoka M, Maronpot RR. Spontaneous lesions in aging FVB/N Mice. Toxicologic Pathology. 1996;24(6):710–6. doi:10.1177/019262339602400606.

49. Diagnosis | "space cadet" syndrome of female FVB/N Mice. Lab Animal. 2007;36(6):16–16. doi:10.1038/laban0607-16.

50. Wirz M, Zörner B, Rupp R, Dietz V. Outcome after incomplete spinal cord injury: Central Cord versus brown-sequard syndrome. Spinal Cord. 2009;48(5):407–14. doi:10.1038/sc.2009.149.

51. Brown-sequard syndrome. Definitions. 2020; doi:10.32388/3dh35f.

52. Lin X-J, Wen S, Deng L-X, Dai H, Du X, Chen C, et al. Spinal cord lateral hemisection and asymmetric behavioral assessments in adult rats. Journal of Visualized Experiments. 2020;(157). doi:10.3791/57126-v.

53. Diabira S, Henaux P-L, Riffaud L, Hamlat A, Brassier G, Morandi X. Brown-sequard syndrome revealing intradural thoracic disc herniation. European Spine Journal. 2010;20(1):65–70. doi:10.1007/s00586-010-1498-3.

54. Witiw CD, Shamji MF. Brown-séquard syndrome from Herniation of a thoracic disc. Canadian Medical Association Journal. 2014;186(18):1395–1395. doi:10.1503/cmaj.140117.

55. Sofroniew MV. Dissecting spinal cord regeneration. Nature. 2018;557(7705):343–50. doi:10.1038/s41586-018-0068-4.

56. Villa A, Della Torre S, Maggi A. Sexual differentiation of microglia. Frontiers in Neuroendocrinology. 2019;52:156–64. doi:10.1016/j.yfrne.2018.11.003.

57. [Internet]. [cited 2023 Dec 24]. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118789568.fmatter.

58. Filli L, Zörner B, Weinmann O, Schwab ME. Motor deficits and recovery in rats with unilateral spinal cord hemisection mimic the brown-séquard syndrome. Brain. 2011;134(8):2261–73. doi:10.1093/brain/awr167.

59. Fischer I, Hou S. Using neural stem cells to enhance repair and recovery of spinal circuits after injury. Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience. 2018; doi:10.1093/acrefore/9780190264086.013.218.

60. Shi Z, Yuan S, Shi L, Li J, Ning G, Kong X, et al. Programmed cell death in Spinal Cord Injury Pathogenesis and therapy. Cell Proliferation. 2021;54(3). doi:10.1111/cpr.12992.

61. Zhao Q, Liu F, Zhou B, Liu H, Wang X, Li S. Ferroptosis: A novel therapeutic direction of Spinal Cord Injury. Computational and Mathematical Methods in Medicine. 2022:1–11. doi:10.1155/2022/7906218.

62. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, et al. A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(17):4133. doi:10.3390/ijms20174133.

63. Hollville E, Romero SE, Deshmukh M. Apoptotic cell death regulation in neurons. The FEBS Journal. 2019;286(17):3276–98. doi:10.1111/febs.14970.

64. Chen Q, Kang J, Fu C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2018;3(1). doi:10.1038/s41392-018-0018-5.

65. Kalinichenko SG, Matveeva NYu. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2008;38(4):333–44. doi:10.1007/s11055-008-0046-7.

66. Alu A, Han X, Ma X, Wu M, Wei Y, Wei X. The role of lysosome in regulated necrosis. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2020 Oct;10(10):1880–903. doi:10.1016/j.apsb.2020.07.003.

67. Zuo H, Lin T, Wang D, Peng R, Wang S, Gao Y, et al. Neural cell apoptosis induced by microwave exposure through mitochondria-dependent caspase-3

pathway. International Journal of Medical Sciences. 2014;11(5):426–35. doi:10.7150/ijms.6540.

68. Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: Implications for development of Neuroprotective Treatment Strategies. NeuroRX. 2004;1(1):5–16. doi:10.1602/neurorx.1.1.5.

69. Yuan J, Lipinski M, Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. Neuron. 2003;40(2):401–13. doi:10.1016/s0896-6273(03)00601-9.

70. Syntichaki P, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: Rogue biology? Nature Reviews Neuroscience. 2003;4(8):672–84. doi:10.1038/nrn1174.

71. Li Y, Lei Z, Ritzel RM, He J, Li H, Choi HM, et al. Impairment of autophagy after spinal cord injury potentiates neuroinflammation and Motor Function Deficit in mice. Theranostics. 2022;12(12):5364–88. doi:10.7150/thno.72713.

72. Son JH, Shim JH, Kim K-H, Ha J-Y, Han JY. Neuronal autophagy and Neurodegenerative Diseases. Experimental & amp; Molecular Medicine. 2012;44(2):89. doi:10.3858/emm.2012.44.2.031.

73. Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. Journal of Neuropathology & 2006;65(5):423–32. doi:10.1097/01.jnen.0000229233.75253.be.

74. D'Brant LY, Desta H, Khoo TC, Sharikova AV, Mahajan SD, Khmaladze A. Methamphetamine-induced apoptosis in glial cells examined under marker-free imaging modalities. Journal of Biomedical Optics. 2019;24(04):1. doi:10.1117/1.jbo.24.4.046503.

75. Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AM, Selvi Naicker A, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Oct 13;21(20):7533. doi:10.3390/ijms21207533.

76. Zhang Y, Yang S, Liu C, Han X, Gu X, Zhou S. Deciphering glial scar after spinal cord injury. Burns & amp; Trauma. 2021 Jan 1;9. doi:10.1093/burnst/tkab035.

77. Miller MA, Zachary JF. Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 2017; doi:10.1016/b978-0-323-35775-3.00001-1.

78. Bradbury EJ, Burnside ER. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. Nature Communications. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11707-7.

79. Orr MB, Gensel JC. Spinal cord injury scarring and inflammation: Therapies targeting glial and inflammatory responses. Neurotherapeutics. 2018;15(3):541–53. doi:10.1007/s13311-018-0631-6.

80. Calderone A, Cardile D, De Luca R, Quartarone A, Corallo F, Calabrò RS. Brain plasticity in patients with spinal cord injuries: A systematic review. International Journal of Molecular Sciences. 2024 Feb 13;25(4):2224. doi:10.3390/ijms25042224.

81. Zhang C, Kang J, Zhang X, Zhang Y, Huang N, Ning B. Spatiotemporal dynamics of the cellular components involved in glial scar formation following spinal cord injury. Biomedicine & amp; Pharmacotherapy. 2022 Sept;153:113500. doi:10.1016/j.biopha.2022.113500.

82. A Geissler S. Rodent models and behavioral outcomes of cervical spinal cord injury. Journal of Spine. 2013; doi:10.4172/2165-7939.s4-001.

83. Khazaei M, Ahuja CS, Fehlings MG. Induced pluripotent stem cells for traumatic spinal cord injury. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2017;4. doi:10.3389/fcell.2016.00152.

84. Xia L, Qi J, Tang M, Liu J, Zhang D, Zhu Y, et al. Continual deletion of spinal microglia reforms astrocyte scar favoring axonal regeneration. Frontiers in Pharmacology. 2022 Jun 27;13. doi:10.3389/fphar.2022.881195.

85. Li Z, Yu S, Hu X, Li Y, You X, Tian D, et al. Fibrotic scar after spinal cord injury: Crosstalk with other cells, cellular origin, function, and mechanism. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021 Aug 26;15. doi:10.3389/fncel.2021.720938.

86. Zhu Y, Soderblom C, Trojanowsky M, Lee D-H, Lee JK. Fibronectin matrix assembly after Spinal Cord Injury. Journal of Neurotrauma. 2015 Aug;32(15):1158–67. doi:10.1089/neu.2014.3703.

87. Ayazi M, Zivkovic S, Hammel G, Stefanovic B, Ren Y. Fibrotic scar in CNS injuries: From the cellular origins of fibroblasts to the molecular processes of fibrotic Scar Formation. Cells. 2022 Aug 2;11(15):2371. doi:10.3390/cells11152371.

88. Reis LO, Sopena JM, Fávaro WJ, Martin MC, Simão AF, Reis RB, et al. Anatomical features of the urethra and urinary bladder catheterization in female mice and rats. An Essential Translational Tool. Acta Cirurgica Brasileira. 2011;26(suppl 2):106–10. doi:10.1590/s0102-86502011000800019.

89. Toivanen R, Shen MM. Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. Development. 2017;144(8):1382–98. doi:10.1242/dev.148270.

90. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice - necropsy support [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services; [cited 2023 Dec 25]. Available from: https://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/index.cfm.

91. Female reproductive system [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services; [cited 2024 Apr 28]. Available from: https://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/female-repro.

92. Chan W-M, Mohammed Y, Lee I, Pearse DD. Effect of gender on recovery after Spinal Cord Injury. Translational Stroke Research. 2013;4(4):447–61. doi:10.1007/s12975-012-0249-7.

93. Farooque M, Suo Z, Arnold PM, Wulser MJ, Chou C-T, Vancura RW, et al. Gender-related differences in recovery of locomotor function after spinal cord injury in mice. Spinal Cord. 2005;44(3):182–7. doi:10.1038/sj.sc.3101816.

94. Villa A, Della Torre S, Maggi A. Sexual differentiation of microglia. Frontiers in Neuroendocrinology. 2019;52:156–64. doi:10.1016/j.yfrne.2018.11.003.

95. Sengelaub D, Xu X-M. Protective effects of gonadal hormones on spinal motoneurons following spinal cord injury. Neural Regeneration Research. 2018;13(6):971. doi:10.4103/1673-5374.233434.

96. Hauben E, Mizrahi T, Agranov E, Schwartz M. Sexual dimorphism in the spontaneous recovery from Spinal Cord Injury: A gender gap in beneficial

autoimmunity? European Journal of Neuroscience. 2002;16(9):1731–40. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02241.x.

97. Walker CL, Fry CME, Wang J, Du X, Zuzzio K, Liu N-K, et al. Functional and histological gender comparison of age-matched rats after moderate thoracic contusive Spinal Cord Injury. Journal of Neurotrauma. 2019;36(12):1974–84. doi:10.1089/neu.2018.6233.

98. Sipski ML, Jackson AB, Gómez-Marín O, Estores I, Stein A. Effects of gender on neurologic and functional recovery after Spinal Cord Injury. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 2004;85(11):1826–36. doi:10.1016/j.apmr.2004.04.031.

99. Falavigna A, Finger G, Souza OE, Pasqualotto FF. Spinal Cord Injury and male infertility: A Review. Coluna/Columna. 2012;11(4):322–5. doi:10.1590/s1808-18512012000400015.

100. Anderson R, Moses R, Lenherr S, Hotaling JM, Myers J. Spinal Cord Injury and male infertility—a review of current literature, knowledge gaps, and future research. Translational Andrology and Urology. 2018;7(S3). doi:10.21037/tau.2018.04.12.

101. Ahmed HU, Shergill IS, Arya M, Shah PJ. Management of detrusor– external sphincter dyssynergia. Nature Clinical Practice Urology. 2006;3(7):368–80. doi:10.1038/ncpuro0521.

102. Pettersson-Hammerstad K, Jonsson O, Svennung IB, Karlsson A-K. Impaired renal function in newly spinal cord injured patients improves in the chronic state—effect of clean intermittent catheterization? Journal of Urology. 2008;180(1):187–91. doi:10.1016/j.juro.2008.03.051.

103. Vaidyanathan S, Selmi F, Abraham K, Hughes P, Singh G, Soni B. Hydronephrosis and renal failure following inadequate management of neuropathic bladder in a patient with spinal cord injury: Case report of a preventable complication. Patient Safety in Surgery. 2012;6(1):22. doi:10.1186/1754-9493-6-22.

104. Elmelund M, Oturai PS, Toson B, Biering-Sørensen F. Forty-five-year follow-up on the renal function after spinal cord injury. Spinal Cord. 2016;54(6):445–51. doi:10.1038/sc.2015.242.

105. Arafa MM, Zohdy WA, Shamloul R. Prostatic massage: A simple method of semen retrieval in men with Spinal Cord Injury. International Journal of Andrology. 2007;30(3):170–3. doi:10.1111/j.1365-2605.2006.00733.x.

106. Nassau DE, Ramasamy R. Sperm retrieval options for men with SpinalCordInjury.FertilityandSterility.2021;115(5):1190.doi:10.1016/j.fertnstert.2021.02.037.

107. Brackett NL, Ibrahim E, Grotas JA, Aballa TC, Lynne CM. Higher sperm DNA damage in semen from men with spinal cord injuries compared with controls. Journal of Andrology. 2008;29(1):93–9. doi:10.2164/jandrol.107.003574.

108. Song G, Graham MC, Lewis V. Sperm mitochondrial DNA copy number and integrity in infertile men: A comparison with nuclear DNA integrity. Fertility and Sterility. 2005;84. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.07.011.

109. Gaspar AP, Brandão CM, Lazaretti-Castro M. Bone Mass and hormone analysis in patients with spinal cord injury: evidence for a gonadal Axis Disruption. The Journal of Clinical Endocrinology & amp; Metabolism. 2014;99(12):4649–55. doi:10.1210/jc.2014-2165.

110. Talebi AR, Khalili MA, Vahidi S, Ghasemzadeh J, Tabibnejad N. Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury. The Journal of Spinal Cord Medicine. 2013;36(2):140–6. doi:10.1179/2045772312y.000000055.

111. Restelli AE, Bertolla RP, Spaine DM, Miotto A, Borrelli M, Cedenho AP. Quality and functional aspects of sperm retrieved through assisted ejaculation in men with Spinal Cord Injury. Fertility and Sterility. 2009;91(3):819–25. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.12.060.

112. Schaeffer AJ, Chmiel J. Urethral meatal colonization in the pathogenesis of catheter-associated bacteriuria. Journal of Urology. 1983;130(6):1096–9. doi:10.1016/s0022-5347(17)51701-2.

113. Hamamci N, Dursun E, Akbas E, Aktepe OC, Çake A. A quantitative study of genital skin flora and urinary colonization in spinal cord injured patients. Spinal Cord. 1998;36(9):617–20. doi:10.1038/sj.sc.3100661.

114. Krebs J, Bartel P, Pannek J. Bacterial persistence in the prostate after antibiotic treatment of chronic bacterial prostatitis in men with Spinal Cord Injury. Urology. 2014;83(3):515–20. doi:10.1016/j.urology.2013.11.023.

115. Kobayashi T, Kihara K, Kageyama Y, Yamada T, Liu S, Sato K. Spontaneous reconstruction of the canine hypogastric nerve over a long period after removing half of its length. Autonomic Neuroscience. 2001;86(3):151–62. doi:10.1016/s1566-0702(00)00254-x.

116. Walter JS, Wheeler JS, Wang X, Wurster RD. A balloon-tipped catheter for measuring urethral pressures. The Journal of Spinal Cord Medicine. 2009;32(5):578–82. doi:10.1080/10790268.2009.11754564.

117. Sarabia-Estrada R, Zadnik PL, Molina CA, Jimenez-Estrada I, Groves ML, Gokaslan ZL, et al. A rat model of metastatic spinal cord compression using human prostate adenocarcinoma: Histopathological and functional analysis. The Spine Journal. 2013;13(11):1597–606. doi:10.1016/j.spinee.2013.05.021.

118. SCI Forum Report [Internet]. [cited 2023 Dec 25]. Available from: https://sci.washington.edu/info/forums/reports/women_sci.asp.

119. Elmelund M, Klarskov N, Biering-Sørensen F. Prevalence of urinary incontinence in women with Spinal Cord Injury. Spinal Cord. 2018;56(12):1124–33. doi:10.1038/s41393-018-0157-0.

120. Pannek J, Wöllner J. Management of stress urinary incontinence in female patients with spinal cord injury by autologous fascial sling: Time for a revival? Spinal Cord Series and Cases. 2022;8(1). doi:10.1038/s41394-022-00524-8.

121. Allen JB, Stover SL, Jackson AB, Richards JS. Autonomic Dysreflexia and the menstrual cycle in a woman with Spinal Cord Injury. NeuroRehabilitation. 1991;1(4):58–62. doi:10.3233/nre-1991-1408.

122. Sekar P, Wallace DD, Waites KB, DeVivo MJ, Lloyd LK, Stover SL, et al. Comparison of long-term renal function after spinal cord injury using different

urinary management methods. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1997;78(9):992–7. doi:10.1016/s0003-9993(97)90063-0.

123. Charls AC, Rawat N, Zachariah K. Menstrual changes after spinal cord injury. Spinal Cord. 2022;60(8):712–5. doi:10.1038/s41393-022-00765-2.

124. Rutberg L, Fridén B, Karlsson A-K. Amenorrhoea in newly spinal cord injured women: An effect of hyperprolactinaemia? Spinal Cord. 2007;46(3):189–91. doi:10.1038/sj.sc.3102095.

125. Verduyn WH. Spinal Cord injured women, pregnancy and delivery. Spinal Cord. 1986;24(4):231–40. doi:10.1038/sc.1986.32.

126. Montgomerie JZ, Gilmore DS, Ashley MA, Schick DG, Jimenez EM. Long-term colonization of spinal cord injury patients with Klebsiella pneumoniae. Journal of Clinical Microbiology. 1989;27(7):1613–6. doi:10.1128/jcm.27.7.1613-1616.1989.

127. Gilmore DS, Aeilts GD, Alldis BA, Bruce SK, Jimenez EM, Schick DG, et al. Effects of bathing on pseudomonas and klebsiella colonization in patients with spinal cord injuries. Journal of Clinical Microbiology. 1981;14(4):404–7. doi:10.1128/jcm.14.4.404-407.1981.

128. Levendoglu F, Ugurlu H, Ozerbil OM, Tuncer I, Ural O. Urethral cultures in patients with spinal cord injury. Spinal Cord. 2004;42(2):106–9. doi:10.1038/sj.sc.3101554.

129. Darouiche RO, Hull RA. Bacterial interference for prevention of urinary tract infection: An overview. The Journal of Spinal Cord Medicine. 2000;23(2):136–41. doi:10.1080/10790268.2000.11753521.

130. Pires CVG, Linhares IM, Serzedello F, Fukazawa EI, Baracat EC, Witkin SS. Alterations in the genital microbiota in women with Spinal Cord Injury. Obstetrics & amp; Gynecology. 2016;127(2):273–8. doi:10.1097/aog.00000000001257.

131. Iezzoni LI, Chen Y, McLain AB. Current pregnancy among women with spinal cord injury: Findings from the US National Spinal Cord Injury Database. Spinal Cord. 2015;53(11):821–6. doi:10.1038/sc.2015.88.

132. Smeltzer S, Wetzel-Effinger L. Pregnancy in women with Spinal Cord Injury. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation. 2009;15(1):29–42. doi:10.1310/sci1501-29.

133. Engel S, Ferrara G. Obstetric outcomes in women who sustained a spinal cord injury during pregnancy. Spinal Cord. 2012;51(2):170–1. doi:10.1038/sc.2012.125.

134. Arsh A, Darain H. Obstetric outcomes of women who sustained traumatic spinal injury during pregnancy: A systematic review. Asian Spine Journal. 2022;16(2):290–300. doi:10.31616/asj.2020.0192.

135. Wada N, Karnup S, Kadekawa K, Shimizu N, Kwon J, Shimizu T, et al. Current knowledge and novel frontiers in lower urinary tract dysfunction after Spinal Cord Injury. Urological Science. 2022;33(3):101–13. doi:10.4103/uros.uros_31_22.

136. Gandara CK, Palacios JL, Luis Quintanar J, Zhang Y, Li X, Munoz A. Improvement of neurogenic urinary dysfunctions in female rats treated with an injection of botulinum toxin A at the epicenter of the spinal cord injured site. Neurourology and Urodynamics. 2023 Oct 30;43(1):246–57. doi:10.1002/nau.25311.

137. Закон України "Про захист тварин від жорстокого поводження". 2012:5456-VI (5456-17).

138. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986:48.

139. Kim WR, Kang M, Park H, Ham H-J, Lee H, Geum D. Functional test scales for evaluating cell-based therapies in animal models of Spinal Cord Injury. Stem Cells International. 2017;2017:1–12. doi:10.1155/2017/5160261.

140. Lin X-J, Wen S, Deng L-X, Dai H, Du X, Chen C, et al. Spinal cord lateral hemisection and asymmetric behavioral assessments in adult rats. Journal of Visualized Experiments. 2020 Mar 24;(157). doi:10.3791/57126.

141. Semler J, Wellmann K, Wirth F, Stein G, Angelova S, Ashrafi M, et al. Objective measures of motor dysfunction after compression spinal cord injury in adult rats: Correlations with locomotor rating scores. Journal of Neurotrauma. 2011 Jul;28(7):1247–58. doi:10.1089/neu.2010.1737.

142. Pajoohesh-Ganji A, Byrnes KR, Fatemi G, Faden AI. A combined scoring method to assess behavioral recovery after Mouse Spinal Cord Injury. Neuroscience Research. 2010 Jun;67(2):117–25. doi:10.1016/j.neures.2010.02.009.

143. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. Journal of Neurotrauma. 2006 May;23(5):635–59. doi:10.1089/neu.2006.23.635.

144. Dunning K. Ashworth spasticity scale (and modified version). Encyclopedia of Clinical Neuropsychology. 2011;254–5. doi:10.1007/978-0-387-79948-3_1792.

145. Ansari NN, Naghdi S, Mashayekhi M, Hasson S, Fakhari Z, Jalaie S. Intrarater reliability of the modified modified Ashworth Scale (MMAS) in the assessment of upper-limb muscle spasticity. NeuroRehabilitation. 2012 Jul 26;31(2):215–22. doi:10.3233/nre-2012-0791.

146. McFadden WC, Walsh H, Richter F, Soudant C, Bryce CH, Hof PR, et al. Perfusion fixation in Brain Banking: A systematic review. Acta Neuropathologica Communications. 2019 Sept 5;7(1). doi:10.1186/s40478-019-0799-y.

147. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. Journal of Visualized Experiments. 2012 Jul 30;(65). doi:10.3791/3564.

148. Jung S-Y, Seo T-B, Kim D-Y. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats. Journal of Exercise Rehabilitation. 2016 Aug 26;12(4):284–92. doi:10.12965/jer.1632698.349.

149. Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Kawakami Y. A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Journal of Neurosurgery: Spine. 2002 Jul;97(1):142–7. doi:10.3171/spi.2002.97.1.0142.

150. Jung S-Y, Seo T-B, Kim D-Y. Treadmill exercise facilitates recovery of locomotor function through axonal regeneration following spinal cord injury in rats.

Journal of Exercise Rehabilitation. 2016 Aug 26;12(4):284–92. doi:10.12965/jer.1632698.349.

151. Skelton F, Salemi JL, Akpati L, Silva S, Dongarwar D, Trautner BW, et al. Genitourinary complications are a leading and expensive cause of emergency department and Inpatient encounters for persons with Spinal Cord Injury. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 2019 Sept;100(9):1614–21. doi:10.1016/j.apmr.2019.02.013.

152. Cai M, Chen L, Wang T, Liang Y, Zhao J, Zhang X, et al. Hydrogel scaffolds in the treatment of Spinal Cord Injury: A Review. Frontiers in Neuroscience. 2023 May 31;17. doi:10.3389/fnins.2023.1211066.

153. Quinta H. Locomotor recovery after spinal cord injury: Intimate dependence between axonal regeneration and re-connection. Neural Regeneration Research. 2022;17(3):553. doi:10.4103/1673-5374.320977.

154. Lilley E, Andrews MR, Bradbury EJ, Elliott H, Hawkins P, Ichiyama RM, et al. Refining rodent models of spinal cord injury. Experimental Neurology. 2020 Jun;328:113273. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113273.

155. Kim WR, Kang M, Park H, Ham H-J, Lee H, Geum D. Functional test scales for evaluating cell-based therapies in animal models of Spinal Cord Injury. Stem Cells International. 2017;2017:1–12. doi:10.1155/2017/5160261.

156. Bareyre FlorenceM, Loy K. Rehabilitation following spinal cord injury: How animal models can help our understanding of exercise-induced neuroplasticity. Neural Regeneration Research. 2019;14(3):405. doi:10.4103/1673-5374.245951.

157. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. The Journal of Neuroscience. 2004 Mar 3;24(9):2143–55. doi:10.1523/jneurosci.3547-03.2004.

158. James ND, Bartus K, Grist J, Bennett DL, McMahon SB, Bradbury EJ. Conduction failure following spinal cord injury: Functional and anatomical changes from acute to chronic stages. The Journal of Neuroscience. 2011 Dec 14;31(50):18543–55. doi:10.1523/jneurosci.4306-11.2011. 159. Anjum A, Cheah YJ, Yazid MD, Daud MF, Idris J, Ng MH, et al. Protocol paper: Kainic acid excitotoxicity-induced spinal cord injury paraplegia in Sprague– Dawley Rats. Biological Research. 2022 Dec 9;55(1). doi:10.1186/s40659-022-00407-0.

160. Li C, Zhu X, Lee C-M, Wu Z, Cheng L. A mouse model of completecrush transection spinal cord injury made by two operations. Annals of Translational Medicine. 2020 Mar;8(5):210–210. doi:10.21037/atm.2020.01.58.

161. Wilson S, Nagel SJ, Frizon LA, Fredericks DC, DeVries-Watson NA, Gillies GT, et al. The hemisection approach in large animal models of spinal cord injury: Overview of methods and applications. Journal of Investigative Surgery. 2018 Oct 31;33(3):240–51. doi:10.1080/08941939.2018.1492048.

162. Csomó KB, Varga G, Belik A, Hricisák L, Borbély Z, Gerber G. A minimally invasive, fast spinal cord lateral hemisection technique for modeling open spinal cord injuries in rats. Journal of Visualized Experiments. 2022 Mar 23;(181). doi:10.3791/63534.

163. Desai D, Desai S, Gami V. Brown-Séquard Syndrome: Understanding the complexities of Spinal Cord Injury. 2023 Dec 21; doi:10.20944/preprints202312.1595.v1.

164. Medvediev VV, Oleksenko NP, Pichkur LD, Verbovska SA, Savosko SI, Draguntsova NG, et al. Effect of implantation of a fibrin matrix associated with neonatal brain cells on the course of an experimental spinal cord injury. Cytology and Genetics. 2022 Apr;56(2):125–38. doi:10.3103/s0095452722020086.

165. Tsymbaliuk V, Medvediev V, Semenova V, Grydina N, Senchyk Y, Velychko O, et al. The model of lateral spinal cord hemisection. part I. the technical, pathomorphological, clinical and experimental peculiarities. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2016 Jun 26;0(2):18–27. doi:10.25305/unj.72605.

166. Medvediev VV, Abdallah IM, Draguntsova NG, Savosko SI, Vaslovych VV, Tsymbaliuk VI, et al. Model of spinal cord lateral hemi-excision at the lower thoracic level for the tasks of reconstructive and experimental neurosurgery. Ukrainian Neurosurgical Journal. 2021 Sept 27;27(3):33–53. doi:10.25305/unj.234154.

167. (PDF) the effect of implantation of Neurogeltm used with xenogenic bone marrow stem cells on motor function recovery after experimental spinal cord injury. (n.d.).

168. Leonard AV, Manavis J, Blumbergs PC, Vink R. Changes in substance P and NK1 receptor immunohistochemistry following human spinal cord injury. Spinal Cord. 2013 Nov 12;52(1):17–23. doi:10.1038/sc.2013.136.

169. Zhou, X., Chu, X., Yuan, H., Qiu, J., Zhao, C., Xin, D., Li, T., Ma, W., Wang, H., Wang, Z., & Wang, D. (2019). Mesenchymal stem cell derived evs mediate neuroprotection after spinal cord injury in rats via the microrna-21-5p/FASL gene axis. *Biomedicine & amp; Pharmacotherapy, 115, 108818.* https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108818

170. Wu, J., Pajoohesh-Ganji, A., Stoica, B. A., Dinizo, M., Guanciale, K., & Faden, A. I. (2012). Delayed expression of cell cycle proteins contributes to astroglial scar formation and chronic inflammation after rat spinal cord contusion. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-169

171. Pearse D, Datto J, Yang J, Dietrich Wd. Does being female provide a neuroprotective advantage following spinal cord injury? Neural Regeneration Research. 2015;10(10):1533. doi:10.4103/1673-5374.165213.

172. Shvetcov A, Ruitenberg MJ, Delerue F, Gold WA, Brown DA, Finney CA. The neuroprotective effects of estrogen and estrogenic compounds in spinal cord injury. Neuroscience & amp; Biobehavioral Reviews. 2023 Mar;146:105074. doi:10.1016/j.neubiorev.2023.105074.

173. Sipski ML, Jackson AB, Gómez-Marín O, Estores I, Stein A. Effects of gender on neurologic and functional recovery after Spinal Cord Injury. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 2004 Nov;85(11):1826–36. doi:10.1016/j.apmr.2004.04.031.

174. Datto JP, Bastidas JC, Miller NL, Shah AK, Arheart KL, Marcillo AE, et al. Female rats demonstrate improved locomotor recovery and greater preservation of white and gray matter after traumatic spinal cord injury compared to males. Journal of Neurotrauma. 2015 Aug;32(15):1146–57. doi:10.1089/neu.2014.3702.

175. Stewart AN, MacLean SM, Stromberg AJ, Whelan JP, Bailey WM, Gensel JC, et al. Considerations for studying sex as a biological variable in Spinal Cord Injury. Frontiers in Neurology. 2020 Aug 5;11. doi:10.3389/fneur.2020.00802.

176. Hourié A, Nouhaud F, Baron M, Rebibo J, Pfister C, Grise P, et al. The maximum detrusor pressure as a predictive factor of success after sphincterotomy in Detrusor-Sphincter Dyssynergia. Neurourology and Urodynamics. 2018 Sept 11;37(8):2758–62. doi:10.1002/nau.23759.

177. Chen S, Bih L, Huang Y, Tsai S, Lin T, Kao Y. Effect of single botulinum toxin a injection to the external urethral sphincter for treating detrusor external sphincter dyssynergia in spinal cord injury. Journal of Rehabilitation Medicine. 2008;40(9):744–8. doi:10.2340/16501977-0255.

178. Waites KB, Canupp K, Brookings SE, DeVivo JM. Effect of oral ciprofloxacin on bacterial flora of perineum, urethra, and lower urinary tract in men with Spinal Cord Injury. The Journal of Spinal Cord Medicine. 1999 Jan;22(3):192–8. doi:10.1080/10790268.1999.11719569.

179. Krebs J, Bartel P, Pannek J. Bacterial persistence in the prostate after antibiotic treatment of chronic bacterial prostatitis in men with Spinal Cord Injury. Urology. 2014 Mar;83(3):515–20. doi:10.1016/j.urology.2013.11.023.

180. Qiu Y, Wang L-G, Zhang L-H, Li J, Zhang A-D, Zhang M-H. Sperm chromosomal aneuploidy and DNA integrity of infertile men with anejaculation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2012 Jan 4;29(2):185–94. doi:10.1007/s10815-011-9688-4.

181. Brackett NL. Infertility in men with spinal cord injury: Research and treatment. Scientifica. 2012;2012:1–12. doi:10.6064/2012/578257.

182. Elmelund M, Klarskov N, Biering-Sørensen F. Prevalence of urinary incontinence in women with Spinal Cord Injury. Spinal Cord. 2018 Jun 12;56(12):1124–33. doi:10.1038/s41393-018-0157-0.

183. Al Taweel W, Seyam R. Neurogenic bladder in spinal cord injury patients. Research and Reports in Urology. 2015 Jun;85. doi:10.2147/rru.s29644.

184. Dekalo A, Myers JB, Kennelly M, Welk B. General and bladder-related quality of life: A focus on women living with Spinal Cord Injury. Neurourology and Urodynamics. 2022 Mar 29;41(4):980–90. doi:10.1002/nau.24912.

185. Courtois F, Alexander M, McLain AB. Women's sexual health and reproductive function after sci. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation. 2017 Jan;23(1):20–30. doi:10.1310/sci2301-20.

186. Crane DA, Doody DR, Schiff MA, Mueller BA. Pregnancy outcomes in women with spinal cord injuries: A population-based study. PM&R. 2019 Apr 26;11(8):795–806. doi:10.1002/pmrj.12122.

187. Charls AC, Rawat N, Zachariah K. Menstrual changes after spinal cord injury. Spinal Cord. 2022 Feb 15;60(8):712–5. doi:10.1038/s41393-022-00765-2.