

УДК 616.62 - 008.22: 577.112

В.Ю. Глоба<sup>1\*</sup>, Т.П. Бондаренко<sup>1</sup>, Г.А. Божок<sup>1</sup>, Я.Ю. Самбург<sup>2</sup>, Є.І. Легач<sup>1</sup>

## Біологічно активні композиції, які містять нейротрофічні фактори, змінюють скоротливу активність детрузора щурів із інфравезикальною обструкцією

UDC 616.62 - 008.22: 577.112

V.Yu. Globa<sup>1\*</sup>, T.P. Bondarenko<sup>1</sup>, G.A. Bozhok<sup>1</sup>, Y.Yu. Samburg<sup>2</sup>, E.I. Legach<sup>1</sup>

### Biologically Active Compositions Containing Neurotrophic Factors Change the Contractile Activity of Detrusor of Rats with Infravesical Obstruction

**Реферат:** Досліджували скоротливу активність сечового міхура (СМ) після введення біологічно активних композицій (БАК), що містять нейротрофічні фактори, у самок щурів із інфравезикальною обструкцією, яку моделювали шляхом накладення лігатури на дистальний відділ сечового тракту. У якості БАК використовували кріоекстракт спінальних гангліїв (СГ), кондиційовані середовища від культур нативних і кріоконсервованих мантийних гліоцитів (МГ), базове середовище культивування, препарат «Кортексін». Тваринам протягом 10 діб вводили БАК і визначали скоротливу активність (СА) ізольованих смужок СМ вимірюванням КСІ-індукованої та агоніст-залежної відповіді. Застосування БАК, крім «Кортексіну», сприяло відновленню СА. Кондиційоване середовище від культури кріоконсервованих МГ і кріоекстракт СГ підвищували агоніст-залежну відповідь у 4,6 і 2,5 рази відповідно порівняно з СА контрольних тварин. У щурів цих груп виявлено найвищі показники максимальної амплітуди скорочення, подібні до контрольних.

**Ключові слова:** скоротлива активність, сечовий міхур, інфравезикальна обструкція, спінальний ганглії, мантийні гліоцити, кріоекстракт, кріоконсервування.

**Abstract:** The contractile activity of urinary bladder (UB) after introduction of biologically active compositions (BAC) containing neurotrophic factors in female rats with infravesical obstruction, which was modeled by a ligature to the urinary tract distal part, was investigated. Cryo-extract of the spinal ganglia (SG), conditioned culture media of native and cryopreserved mantle gliocytes (MG), the bulk medium, the drug 'Cortexin' were used as BAC. Animals were injected with BAC for 10 days and the contractile activity (CA) of isolated UB strips was determined by measuring KCl-induced and agonist-dependent responses. The use of BAC, in addition to 'Cortexin', contributed to the CA restoration. The conditioned culture medium of cryopreserved MG and cryoextract of SG increased the agonist-dependent response by 4.6 and 2.5 times, respectively, compared to the CA of the control animals. The rats in these groups showed the highest indices of maximal amplitude of contraction, similar to the control ones.

**Key words:** contractile activity, urinary bladder, infravesical obstruction, spinal ganglion, mantle gliocytes, cryoextract, cryopreservation.

За даними ВООЗ обструкція сечового міхура (СМ) діагностується у 80% чоловіків старшої вікової групи, 8% жінок і у дітей із вродженими аномаліями нижніх сечових шляхів [19, 20, 24, 26].

Інфравезикальна обструкція (ІВО) може викликати дисфункцію СМ внаслідок зменшення скоротливої активності детрузора (САД), дегенерації нейронів і часткової денервації у гладких м'язах, порушення нейронної мережі в центральній нервовій системі (ЦНС) [16, 18, 25, 40].

Одним із перспективних методів відновлення скоротливої здатності СМ є застосування препа-

According to the WHO, the obstruction of urinary bladder (UB) is diagnosed in 80% of aged men, 8% of women and children with congenital abnormalities of the lower urinary tract [14, 17, 22, 24].

Infravesical obstruction (IVO) can cause the UB dysfunction as a result of a decrease in detrusor contractility (DC), neuronal degeneration and partial denervation in smooth muscles, disruption of the neural network in the central nervous system (CNS) [11, 13, 23, 40].

One of the promising methods to restore the UB contractility is the use of drugs with neuro-

<sup>1</sup>Відділ кріоендокринології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків, Україна

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: globa.1978@gmail.com

Надійшла 07.11.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

<sup>1</sup>Department of cryoendocrinology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkiv Medical Academy of Post-graduate Education, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: globa.1978@gmail.com

Received November, 07, 2019

Accepted April, 23, 2020

ратів із нейрорегенераторною і нейропротекторною дією. У клінічній практиці використовують препарат «Кортексін» («Герофарм», Росія), який отримують із тканини головного мозку великої рогатої худоби та свиней. Результати лікування «Кортексіном» продемонстрували переважний вплив на ЦНС, якого недостатньо для відновлення функцій СМ, оскільки на тлі ІВО відбуваються часткова або повна втрата рецепторного апарату і денервація стінки СМ, які спостерігаються більш ніж у 50% пацієнтів [14].

На даний час результати проведених досліджень довели терапевтичну перспективність біологічно активних композицій (БАК) – екстрактів, кондиційованих середовищ, які містять нейротрофічні фактори (НФ). Вони є низькомолекулярними білками, які епігенетично забезпечують виживання нейронів у ембріогенезі та підтримують їх морфофункціональні властивості в дорослому організмі. Крім того, НФ беруть участь у розвитку СМ і ремодельованні його стінки внаслідок розвитку ІВО [8, 11, 39]. Доведено, що системне введення НФ підсилює м'язову реіннервацію та інтрамускулярне розгалуження м'язового нерва [3, 34].

Високий вміст НФ виявлено в периферичній глії та гліальних клітинах ЦНС, особливо в астроцитах [2, 4, 31, 33]. Спінальні ганглії (СГ) і культури клітин із них є потенційним джерелом одержання НФ [36]. Однак дослідження щодо можливості застосування НФ, отриманих із СГ, для корекції наслідків ІВО, на даний час не проводилися.

Мета роботи – вивчення скоротливої активності детрузора щурів із інфравезикальною обструкцією після внутрішньочеревного введення біологічно активних композицій (кріоекстракт спінальних гангліїв, базове середовище культивування, кондиційовані середовища, отримані від культур нативних і кріоконсервованих мантийних гліоцитів) та препарату «Кортексін».

### Матеріали та методи

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

regenerative and neuroprotective effects. In clinical practice, the drug Cortexin (Geropharm, Russia), derived from the brain tissue of cattle and pigs, is used. The results of treatment with Cortexin have shown a predominant effect on the CNS, which is insufficient to restore UB function, since there is partial or complete loss of the receptor apparatus and denervation of the UB wall, observed in more than 50% of patients [9].

Now the research findings have proven the therapeutic potential of biologically active compositions (BAC), *i. e.* the extracts, conditioned media containing neurotrophic factors (NFs). They are low molecular weight proteins that epigenetically ensure the survival of neurons in embryogenesis and maintain their morphofunctional properties in adult body. In addition, NFs are involved into the development of UB and its wall remodeling due to the IVO appearance [3, 6, 39]. Systemic administration of NFs has been shown to enhance the muscle re-innervation and intramuscular branching of the muscle nerve [15, 34].

A high content of NFs has been found in peripheral glia and glial cells of the CNS, especially in astrocytes [16, 20, 30, 32]. Spinal ganglia (SG) and cell cultures derived from them are potential sources of NFs production [36]. However, a feasible use of the NFs derived from SG to correct the effects of IVO has not yet been studied.

The research aim was to study the contractility of detrusor of the rats with infravesical obstruction after intraperitoneal administration of biologically active compositions (cryoextract of spinal ganglia, bulk medium, conditioned media obtained from cultures of native and cryopreserved mantle gangliocytes and Cortexin drug).

### Materials and methods

Investigations were performed in 6-month-old white outbred rats weighing 250–320 g. Manipulations in animals were performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (No. 3447-IV dated of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv), in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Cryoextract was derived from SG of mature rats after 3-fold freezing in liquid nitrogen, followed by homogenization and centrifugation at 1300g [33]. The cryoextract was passed through a filter



Кріоекстракт отримували з СГ статевозрілих щурів після 3-кратного заморожування в рідкому азоті з подальшою гомогенізацією і центрифугуванням при 1300g [5]. Кріоекстракт пропускали через фільтр із діаметром пор 0,22 мкм («ТРР», Швейцарія) з метою стерилізації, фасували по 1,5 мл у мікропробірки «Еппендорф» («Greiner Bio-One GmbH», Німеччина) і заморожували в холодильнику при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Концентрацію білка в кріоекстракті СГ визначали за методом Бредфорда і доводили фізіологічним розчином до 0,1 мг/мл [12]. Перед використанням кріоекстракт відігрівали на водяній бані ( $42^{\circ}\text{C}$ ) при безперервному струшуванні впродовж 1–2 хв і осаджували на мініцентрифугі (2000g) протягом 10 хв.

Клітини СГ, отримані ферментативним способом, культивували 20 діб у базовому середовищі культивування (БСК), яке містить  $\alpha$ -МЕМ, із додаванням 10% фетальної телячої сироватки (ФТС, «BioSera», Франція); 100 мкг/мл гентаміцину («ПанЕко», Росія); 100 мкг/мл цефотаксиму («Біосинтез», Росія); 2,5 мкг/мл амфотерицину В («Biowest», Франція). Клітини культивували в пластикових чашках Петрі з площею 9 см<sup>2</sup>, які було оброблено полі-D-лізином («Orange Scientific», Бельгія) при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> [1]. Заміну середовища проводили кожні 3 доби. На 10–15 добу в культурі клітин СГ формувалася конфлуентний моношар. На 21-шу добу з усіх чашок Петрі збирали середовище і змішували, брали аліквоту і використовували в подальших експериментах.

Частину культури клітин СГ після культивування протягом 6 діб відділяли від підкладки 0,25%-м розчином трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко», Росія) і кріоконсервували у вигляді суспензії в кріозахисному середовищі з 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) зі швидкістю охолодження 1 град/хв до  $-40^{\circ}\text{C}$  та подальшим зануренням у рідкий азот. Клітини зберігали при  $-196^{\circ}\text{C}$  протягом місяця, далі їх розморожували, відмивали від ДМСО і культивували 20 діб. На 21-шу добу збирали культуральне середовище з усіх зразків, змішували, брали аліквоту і використовували у подальших експериментах. Початкова посівна концентрація в обох культурах клітин СГ становила  $6 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup>.

Інфравезикальну обструкцію відтворювали хірургічним методом. Щурів наркотизували внутрішньочеревним введенням комбінації «Золетилу» («Virbac», Франція) і «Седазину» («Biowet», Польща) з розрахунку 1,86 і 1,92 мг відповідно на 100 г маси тіла. Судинний катетер («BD», Іспанія) з зовнішнім діаметром 1,0 мм вводили

with a diameter of 0.22  $\mu\text{m}$  (TPP, Switzerland) for sterilization, packed by 1.5 ml in microtubes Eppendorf (Greiner Bio-One GmbH, Germany) and frozen in the freezing chamber at  $-18^{\circ}\text{C}$ . The protein concentration in the cryoextract of SG was determined by the Bradford method and brought with saline to 0.1 mg / ml [7]. Before use, the cryoextract was warmed in a water bath ( $42^{\circ}\text{C}$ ) with continuous shaking for 1–2 min and precipitated using a mini-centrifuge (2000g) for 10 min.

Enzyme-derived SG cells were cultured for 20 days in bulk medium (BM) containing  $\alpha$ -MEM with the addition of 10% fetal bovine serum (FBTS, BioSera, France); 100  $\mu\text{g}$  / ml gentamicin (PanEco, Russia); 100  $\mu\text{g}$  / ml cefotaxime (Biosintez, Russia); 2.5  $\mu\text{g}$  / ml amphotericin B (Biowest, France). Cells were cultured in plastic Petri dishes with an area of 9 cm<sup>2</sup>, which was treated with poly-D-lysine (Orange Scientific, Belgium) at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> [2]. The medium was changed every 3 days. On days 10–15, a confluent monolayer formed in the cell culture of SG. On the 21<sup>st</sup> day, the medium was collected from all the Petri dishes and mixed, aliquoted and used in further experiments.

Part of the SG cells after culturing for 6 days was separated from the substrate with 0.25% trypsin-EDTA solution with Hanks salts (PanEco, Russia) and cryopreserved as a suspension in cryoprotective medium with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 deg / min to  $-40^{\circ}\text{C}$  and then immersed into liquid nitrogen. The cells were stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  for a month, then thawed, washed with DMSO and cultured for 20 days. On the 21<sup>st</sup> day, the culture medium was collected from all samples, mixed, aliquoted and used in further experiments with Hanks' salts. The initial plating concentration in both cultures of SG cells was  $6 \times 10^4$  cells / cm<sup>2</sup>.

Infravesical obstruction was surgically reproduced. The rats were anesthetized by intraperitoneal administration of the combination of Zoletil (Virbac, France) and Sedazin (Biowet, Poland) at a rate of 1.86 and 1.92 mg, respectively, per 100g of a body weight. A vascular catheter (BD, Spain) with an external diameter of 1.0 mm was introduced into UB. Permanent partial obstruction was initiated by stitching and tying the ligature around the distal urethra without squeezing the tissues. The vascular catheter was removed at the end of the procedure [27]. After 6 weeks in animals the ligature was removed and the next day the BAC were intraperitoneally injected for 10 days. Cryoextract of SG, BAC, conditioned media (CM) obtained from cultures of native and cryopre-





в СМ. Постійну часткову обструкцію створювали шляхом прошивання та зав'язування лігатури навколо дистального відділу сечівника без здавлювання тканин. Судинний катетер вилучали наприкінці процедури [29]. Через 1,5 місяці у тварин видаляли лігатуру і на наступний день внутрішньочеревно вводили БАК протягом 10 діб. Кріоекстракт СГ, БСК, кондиційовані середовища (КС), отримані від культур нативних і кріоконсервованих мантийних гліоцитів (МГ), вводили по 0,6 мл/кг маси тіла, «Кортексін» – по 1,0 мл/кг маси тіла [6]. На 56-ту добу від початку моделювання ІВО щурів декапітували під наркозом.

Експериментальних тварин було розподілено на групи: 1 – введення кріоекстракту СГ; 2 – БСК; 3 – КС від культури нативних МГ; 4 – КС від культури кріоконсервованих МГ; 5 – «Кортексину»; 6 – без лікування; 7 – контроль.

Масу детрузора внаслідок розвитку ІВО визначали зважуванням ізольованих смужок (ІС) СМ.

Масовий коефіцієнт за формулою:

$$MK = m_{cm} / m_t \times 100\%,$$

де  $m_{cm}$  – маса сечового міхура, г;  $m_t$  – маса тіла тварини, г.

Скоротливу активність детрузора щурів досліджували на ІС СМ [22]. Для цього вилучали СМ і поміщали в охолодженій розчин Кребса; рН 7,4 підтримували газовою сумішшю 5% CO<sub>2</sub> та 95% O<sub>2</sub>, потім розрізали на чотири поздовжні смужки шириною 2–3 мм та довжиною 8 мм. У експерименті використовували одну ІС СМ.

Для визначення скоротливої активності ІС використовували ізометричний режим: розміщували в проточній камері (7 мл) у розчині Кребса (37°C) і розтягували на металевих гачках із попереднім навантаженням 1 г (10 мН) протягом години. Силу м'язового скорочення (F, Н) і час досягнення максимальної відповіді (t, с) на стимуляцію реєстрували на установці з тензометричним датчиком «Grass FT03C» («Grass Instruments», США) та адаптер-мультиметром «OWON B41T+» («Fujian Lilliput Optoelectronics Technology Co., Ltd.», Китай) з програмним забезпеченням, яке інстальювали на нетбук «ASUS» («AsusTek Computer Inc., Тайвань») [15].

Скоротливу активність детрузора – вимірювали КСІ-індуковану та агоніст-залежну відповіді. З цією метою застосовували розчин КСІ у кінцевій концентрації 80 мМ [22]. Агоністом був препарат «Пілокарпін» («Дослідний завод Державного наукового центру лікарських засобів», Україна) в кінцевій концентрації 0,03 мг/мл [13].

served mantle gliocytes (MG) were injected with 0.6 ml / kg body weight, Cortexin – 1.0 ml / kg body weight [29]. On day 56 from the beginning of the IVO simulation the rats were decapitated under anesthesia. Experimental animals were divided into groups: 1 – introduction of cryoextract of SG; 2 – BAC; 3 – CM from the culture of native MG; 4 – CM from the culture of cryopreserved MG; 5 – 'Cortexin'; 6 – without treatment; 7 – control.

The detrusor mass due to the IVO development was determined by weighing the isolated strips (IS) of the UB.

Mass ratio by the formula:

$$MR = m_{UB} / m_b \times 100\%,$$

where  $m_{UB}$  is the mass of the urinary bladder, g;  $m_b$  is the mass of animal body, g.

The contractility of the rat detrusor was investigated by IS [19]. For this purpose, the UB was removed and placed in a cooled Krebs solution; pH 7.4 was maintained by a gas mixture of 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>, then it was cut into 4 longitudinal strips of 2–3 mm wide and 8 mm long. One UB IS was used in the experiment.

An isometric mode was used to determine the contractile activity of the IS: it was placed in a flow chamber (7 ml) in a Krebs solution (37°C) and stretched on metal hooks with 1 g preload (10 mN) for one hour. Muscle contraction force (F, N) and maximum response time (t, s) for stimulation were recorded with a Grass FT03C strain gauge (Grass Instruments, USA) and OWON B41T+ multimeter (Fujian Lilliput Optoelectronics Technology Co., Ltd., China) with software installed to the ASUS netbook (AsusTek Computer Inc., Taiwan) [10].

The contractile activity of detrusor was measured by KCl-induced and agonist-dependent responses. With this aim, a solution of KCl at a final concentration of 80 mm was used [19]. The agonist was the drug pilocarpine (State Enterprise State Scientific Center on Medicines and Medical Products, Ukraine) at a final concentration of 0.03 mg/ml [8]. This index was evaluated as follows.

The relative maximum amplitude of IS contraction after Pilocarpine stimulation was calculated by the formula:

$$MAC = (F_2 / F_1) \times 100\%,$$

where  $F_2$  is the muscle contraction force after Pilocarpine stimulation, N;  $F_1$  is the force of muscle contraction after stimulation with KCl solution, N.



Даний показник оцінювали за наступними показниками.

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

$$\text{MAC} = (F_2 / F_1) \times 100\%,$$

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

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

$$\text{CA} = m / \rho / l,$$

де  $m$  – маса ІС, г;  $\rho$  – щільність гладком'язової тканини ( $\rho = 1,0 \text{ г/см}^3$ );  $l$  – довжина ІС, мм [35].

Активну напругу ІС  $\text{CM}$  tension визначали за формулою [38]:

$$T = (F \times 0,0098) / \text{CA},$$

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

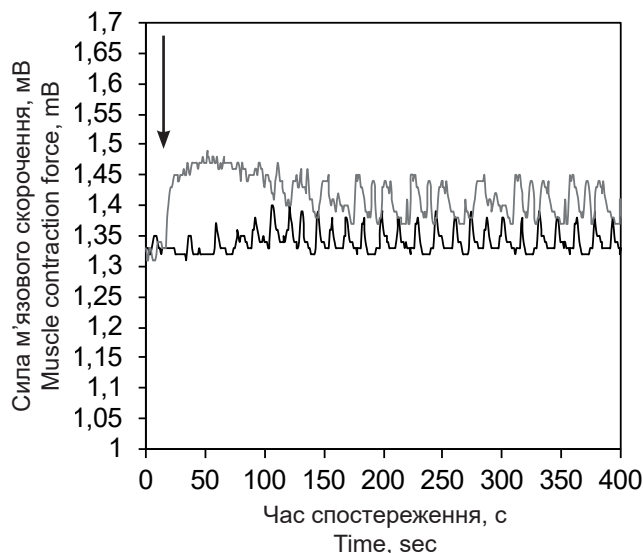
Для статистичної обробки результатів використовували програми «Excel» («Microsoft», США) і «Statistica 10» («StatSoft», США) і непараметричні методи. Дані представляли у вигляді медіани (Me) та кватилей (Q1; Q3) і оцінювали з використанням U-тесту за методом Манна-Уїтні. Відмінності вважали значущими при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Типові криві КСІ-індукованого і пілокарпін-залежного скорочення ІС інтактного СМ представлені на рисунку. Помітно збільшення сили м'язового скорочення у відповідь на стимуляцію «Пілокарпіном» в 3,36 раза (таблиця). Протягом наступних 2-х хвилин відбувається спонтанне зниження амплітуди скорочення ІС СМ, що свідчить про розслаблення СМ.

Встановлено збільшення маси ІС СМ у щурів груп 2, 3, 5, 6 на 35, 175, 120, 70% відповідно (таблиця,  $p = 0,007$ ,  $p = 0,003$ ,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,001$  відповідно) порівняно з контролем. При цьому даний показник у групах 1 та 4 статистично значуще не відрізнявся від контрольної. Масові коефіцієнти були пропорційні масі ІС СМ у всіх досліджуваних групах тварин (таблиця).

Відомо, що у відповідь на ІВО розвивається гіпертрофія СМ, яка стає більш вираженою за



Типові криві КСІ-індукованого і пілокарпін-залежного скорочення ІС інтактного СМ. Стрілкою зазначений момент додавання «Пілокарпіну».

Typical curves of KCl-induced and pilocarpine-dependent contraction of IS of intact UB. The arrow indicates the moment when Pilocarpine added.

The cross-sectional area IS ( $\text{мм}^2$ ) was determined by the formula:

$$\text{CA} = m / \rho / l,$$

where  $m$  is the IS mass, g;  $\rho$  is the density of smooth muscle tissue ( $\rho = 1.0 \text{ г/см}^3$ );  $l$  is the IS length, mm [35].

The active tension of UB IS was determined by the formula [38]:

$$T = (F \times 0.0098) / \text{CA},$$

where  $F$  is the force of muscle contraction after stimulation with KCl or pilocarpine solution, mN; 0.0098 – conversion factor;  $\text{CA}$  is the cross-sectional area of IS,  $\text{мм}^2$ .

For statistical processing of the results used Excel (Microsoft, USA) and Statistica 10 (StatSoft, USA) and non-parametric methods were used. Data were presented as median (Me) and quartiles (Q1; Q3) and evaluated using the Mann-Whitney U-test. The differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### Results and discussion

Typical curves of KCl-induced and pilocarpine-dependent reduction of IS of intact UB are presented in Figure. Considerable increase in muscle contraction force in response to Pilocarpine stimulation by 3.36 times (Table) has been noted. During the next 2 minutes, there is a spontaneous



Показники KCl-індукованого і пілокарпін-залежного скорочення ІС СМ інтактних щурів та щурів із ІВО після введення різних видів БАК і «Кортексіну» (Ме (Q1; Q3);  $n = 57$ ).

Indices of KCl-induced and pilocarpine-dependent reduction of UB IS of intact rats and rats with IVO after administration of different types of BAC and Cortexin (Me (Q1; Q3);  $n = 57$ ).

Показник Index	Група Group						
	1 ( $n = 5$ )	2 ( $n = 7$ )	3 ( $n = 6$ )	4 ( $n = 4$ )	5 ( $n = 5$ )	6 ( $n = 15$ )	7 ( $n = 15$ )
Маса ІС СМ, мг IS UB weight, mg	23,0 <sup>#</sup> (23,0; 25,0)	27,0* (26,0; 42,0)	35,0* (35,0; 51,0)	25,5 (24,0; 28,0)	44,0* (40,0; 47,0)	34,0* (27,0; 44,0)	20,0 <sup>#</sup> (17,0; 25,0)
Масовий коефіцієнт, % Mass ratio, %	0,035 <sup>#</sup> (0,033; 0,037)	0,052* (0,048; 0,071)	0,059* (0,051; 0,062)	0,04 (0,033; 0,046)	0,057* (0,05; 0,073)	0,06* (0,046; 0,072)	0,04 <sup>#</sup> (0,035; 0,044)
F1, Н F1, N	1,33 <sup>^</sup> (1,16; 1,6)	5,0** (0,5; 11,2)	4,25** (3,0; 6,25)	2,62** <sup>^</sup> (2,12; 8,37)	2,0* (1,75; 2,25)	1,14 (0,66; 1,77)	0,66 (0,36; 1,8)
F2, Н F2, N	5,66** <sup>^</sup> (4,33; 6,0)	4,0 (2,0; 6,8)	4,56 (3,5; 6,75)	10,12** <sup>^</sup> (7,87; 29,25)	1,5 (1,25; 1,66)	1,83 (0,14; 6,66)	2,22 (1,54; 4,66)
t KCl, с t KCl, s	39,0 (15,0; 84,0)	36,0 (16,0; 84,0)	59,0 (40,0; 71,0)	48,0 (10,0; 96,0)	21,0 (19,0; 44,0)	57,0 (13,0; 97,0)	64,0 (36,0; 123,0)
t пілокарпін, с t pilocarpine, s	25,0* (23,0; 38,0)	94,0 (49,0; 169,0)	95,5 (66,0; 137,0)	44,0 (40,5; 49,0)	124,0 (76,0; 133,0)	46,0 (18,0; 129,0)	78,0 (51,0; 133,0)
T KCl, мН/мм <sup>2</sup> T KCl, mN/mm <sup>2</sup>	6,5 <sup>^</sup> (5,6; 7,8)	24,5** (2,4; 54,8)	20,8** (14,7; 30,6)	12,8** <sup>^</sup> (10,3; 41,0)	9,8* (8,5; 11,0)	5,5 (3,2; 8,6)	3,2 (1,7; 8,8)
T пілокарпін, мН/ мм <sup>2</sup> T pilocarpine, mN/ mm <sup>2</sup>	27,7** <sup>^</sup> (21,2; 29,4)	19,6 (9,8; 33,3)	22,3 (17,1; 33,0)	49,6** <sup>^</sup> (38,5; 142,9)	7,3 (6,1; 8,1)	8,9 (0,6; 32,6)	10,8 (7,5; 22,8)
MAC % MAC %	373,2 (366,0; 451,1)	84,3 (60,7; 580,0)	146,3* (56,0; 200,0)	355,3 (337,8; 405,7)	66,6* (62,5; 71,4)	220,5 (12,28; 402,27)	332,0 (213,88; 706,0)

**Примітки:** відмінності значущі порівняно з контролем (\*); групою 6 (#); між групами 1 і 4 (^),  $p < 0,05$ . У дужках вказано квартилі.

**Notes:** differences are significant if compared with group 1 (\*); group 6 (#); between groups 1 and 4 (^),  $p < 0.05$ . The quartiles are indicated in parentheses.

тривалої обструкції [18, 24]. У дослідженні ми вивчали початковий (компенсаторний) – період обструкції 1,5 місяці, якому властиве початкове збільшення маси СМ і більш низькі показники САД у відповідь на стимуляцію агоністами порівняно з контрольними тваринами [23]. При цьому збільшення маси ІС СМ було статистично значущим у тварин усіх груп з ІВО, крім груп 1 та 4.

Сила м'язового скорочення, стимульована розчином KCl у щурів групи 2, збільшувалася у 7,6 раза; групи 3 – 6,4 раза; у групі 4 – 3,9 раза; у групі 5 – у 3 рази (таблиця,  $p = 0,037$ ;  $p = 0,0006$ ;  $p = 0,016$ ;  $p = 0,04$  відповідно) порівняно з контролем. У тварин групи 3 САД збільшилася у 3,7 раза, групи 4 – 2,3 раза порівняно з щурами групи 6 (таблиця,  $p = 0,002$ ;  $p = 0,04$  відповідно).

За даними деяких авторів [9, 37], скоротлива реакція ІС СМ щурів у відповідь на різні под-

decrease in the amplitude of the reduction of the UB IS, which indicates the relaxation of the CM.

An increase in the mass of UB IS in the rats of groups 2, 3, 5, 6 was found by 35, 175, 120, 70%, respectively (Table,  $p = 0.007$ ,  $p = 0.003$ ,  $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$ , respectively) compared to the control. However, this index in groups 1 and 4 was not significantly different from the control one. The mass coefficients were proportional to the mass of the IS UB in all the studied groups of animals (Table).

It is known that, in response to IVO, the UB hypertrophy develops, which becomes more pronounced with a prolonged obstruction [13, 22]. In this research we studied an initial (compensatory), 1.5-month obstruction period characterized by an initial increase in UB mass and lower DCs in response to agonist stimulation compared with control animals [21]. In this case, the increase in



разниці буває значно зниженою, особливо з обструкцією СМ важкого ступеня. Однак було встановлено випадки вираженого посилення САД у відповідь на КСІ-стимуляцію за умов ІВО, що може бути ознакою денерваційної надчутливості [27, 32]. Результати нашого дослідження показали збільшення КСІ-індукованої САД у тварин всіх груп, які отримували БАК, крім групи 1 (введення кріоекстракту) порівняно з контролем. При цьому САД у тварин груп 3 (введення КС від культур нативних МГ) і 4 (введення кріоконсервованих МГ) була статистично вищою, ніж у групі 6 (без лікування).

Різниця в часі досягнення максимальної амплітуди скорочення ІС у відповідь на індукцію розчином КСІ у тварин всіх груп була статистично незначущою (таблиця).

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

Одержані результати вказують на можливий вплив БАК на процеси КСІ-індукованої САД, пов'язану з деполаризацією мембран гладких клітин детрузора, і збереження механізму скорочувальної здатності гладких м'язів СМ. Встановлений нами факт підтверджується даними інших авторів [27, 28, 32].

Відомо, що стимуляція М-холінорецепторів є основним рецепторним механізмом скорочення СМ у ссавців [10, 21], який реалізується холінергічними нейротрансмітерами, зокрема ацетилхоліном. Індукція «Пілокарпіном», який є агоністом М-холінорецепторів, дозволяє вивчити рецепторний шлях скорочення СМ.

У наших експериментах збільшувалася сила пілокарпін-індукованого м'язового скорочення СМ тільки у тварин групи 1 (введення кріоекстракту СГ) і групи 4 (застосування КС від культури кріоконсервованих МГ) у 2,5 і 4,5 рази відповідно (таблиця,  $p = 0,036$ ;  $p = 0,008$  відповідно) порівняно з контролем. Збільшення САД також було виявлено у тварин групи 4 у 5,5 рази порівняно з групою 6 (таблиця,  $p = 0,018$ ).

Відомо, що чутливість ІС СМ щурів із ІВО до дії агоністів М-холінорецепторів значно нижча, ніж у здорових. Існує пряма кореляція між вираженістю порушеної функції СМ і цим про-

UB IS mass was statistically significant in animals of all groups with IVO except groups 1 and 4.

The muscle contraction force stimulated by KCl solution in group 2 rats increased in 7.6 times; in group 3 it did in 6.4 times; in group 4 this was in 3.9 times; in group 5 it enhanced in 3 times (Table,  $p = 0.037$ ;  $p = 0.0006$ ;  $p = 0.016$ ;  $p = 0.04$ , respectively) compared to the control. In animals of group 3, the DC increased in 3.7 times, in group 4 this was a 2.3-fold rise compared with the rats of group 6 (Table,  $p = 0.002$ ;  $p = 0.04$ , respectively).

As some authors reported [4, 37], the contractile response of UB IS rats in response to various stimuli is significantly reduced, especially with severe obstruction of UB. However, there have been cases of marked increase in DC in response to KCl-stimulation as the IVO consequence, that may be a sign of denervation hypersensitivity [25, 31]. The results of our study showed an increase in KCl-induced DC in animals of all BAC-treated groups except group 1 (cryoextract administration) compared to the controls. In this case, the DC in animals of groups 3 (introduction of CM from native MG cultures) and 4 (introduction of cryopreserved MG) was statistically higher than in group 6 (without treatment).

The time difference between the maximum amplitude of the IS reduction in response to the induction of the KCl solution in animals of all groups was insignificant (Table).

It was found that the value of the active IS tension on the background of KCl-induced DCA coincided with the strength of muscle contractions. This index increased in rats of group 2 in 7.6 times, groups 3 – 6.5 times, groups 4 – 4 times, groups 5 – 3 times (Table,  $p = 0.037$ ;  $p = 0.0006$ ;  $p = 0.016$ ;  $p = 0.04$ , respectively) compared to the control. The active IS is tension in groups 3 and 4 increased 3.8 and 2.3 times, respectively, compared with group 6 (Table,  $p = 0.002$ ;  $p = 0.04$ , respectively).

The obtained results indicate a possible influence of the BAC on the processes of KCl-induced DC associated with the depolarization of detrusor mast cells and preservation of the mechanism of UB smooth muscle contractility. The established fact is confirmed by the data of other authors [25, 26, 31].

It is known that stimulation of M-cholinoreceptors is the main receptor mechanism for reducing UB in mammals [5, 18], which is implemented by cholinergic neurotransmitters, in particular acetylcholine. Induction with pilocarpine, which is an agonist of M-cholinoreceptors, allows to investigate the receptor pathway of UB contraction.





цесом [9, 17, 30]. Досліджена нами пілокарпін-індукована САД розподілялася в групах тварин у порядку збільшення: група 5 (введення «Кортексіну») – 1,5 Н; група 6 (тварини без лікування) – 1,83 Н; група 7 (контроль) – 2,22 Н; група 2 (застосування БСК) – 4,0 Н; група 3 (застосування КС від культури нативних МГ) – 4,56 Н; група 1 (введення кріоекстракту СГ) – 5,66 Н і група 4 (введення КС від культури кріоконсервованих МГ) – 10,12 Н. Одержані результати свідчать про позитивний вплив БАК, отриманих із СГ, на САД, яка опосередкована стимуляцією М-холінорецепторів.

Аналогічну тенденцію було встановлено під час оцінювання активності напруги скорочення ІС СМ. Після введення «Пілокарпіну» даний показник у тварин групи 1 збільшувався в 2,5 раза, групи 4–4,6 раза (таблиця,  $p = 0,036$ ;  $p = 0,008$  відповідно) порівняно з контролем. При цьому у щурів групи 4 вона збільшувалася в 5,6 раза порівняно з групою 6 (таблиця,  $p = 0,018$ ). Показники МАС ІС СМ в групах 1 і 4 були вище, ніж в інших експериментальних групах.

Час досягнення максимального скорочення у групі 1 був найменшим і становив 32% від контролю (таблиця,  $p = 0,005$ ), що свідчило про виражений вплив кріоекстракту СГ на пілокарпін-залежне скорочення ІС СМ.

Враховуючи високі показники САД у тварин груп 1 та 4 порівняно з контролем, доцільно було провести їх порівняльний аналіз. Показники сили м'язових скорочень, активної напруги ІС СМ були вищими у тварин після індукції КС від культури кріоконсервованих МГ порівняно з введенням кріоекстракту СГ (таблиця,  $p = 0,02$ ;  $p = 0,037$ ).

Таким чином, значення скорочувальної активності СМ, яке співпадало з контрольним, було отримано після застосування БСК і КС від культури нативних МГ. У тварин із введенням кріоекстракту СГ і КС від культури кріоконсервованих МГ воно було вище контрольного. Крім того, у тварин даних груп встановлено виражену відповідь ІС СМ на різні стимули і зафіксовано найвищі показники МАС. Вірогідно, ці ефекти обумовлені дією НФ, які надходять із СГ та від культури МГ після заморожування-відігріву. Доведено, що після кріоконсервування змінюється співвідношення морфологічних типів клітин, тобто й виробка ними НФ [7]. Одержані результати вказують на позитивний вплив БАК на перебіг ІВО у щурів, який, можливо, реалізується нервово-м'язовим апаратом СМ.

In our experiments, the power of pilocarpine-induced muscle contraction of UB was increased only in the animals of group 1 (introduction of cryoextract of SG) and group 4 (use of CM from cryopreserved MG culture) 2.5 and 4.5 times, respectively (Table,  $p = 0.036$ ;  $p = 0.008$ , respectively) compared to the control. An increase in DC was also found in the animals of group 4 in 5.5 times compared with group 6 (Table,  $p = 0.018$ ).

It is known that the sensitivity of IS UB rats with IVO to the action of M-cholinoreceptor agonists is much lower than in healthy subjects. There is a direct correlation between the severity of impaired UB function and this process [4, 12, 28]. The studied pilocarpine-induced DC was distributed in groups of animals in ascending order: group 5 (administration of Cortexin) made 1.5 N; group 6 (animals without treatment) did 1.83 N; group 7 (control) was 2.22 N; group 2 (application of BAC) was 4.0 N; group 3 (application of CM from native MG culture) did 4.56 N; group 1 (introduction of CM cryoextract) made 5.66 N and group 4 (introduction of CM from the culture of cryopreserved MG) did 10.12 N. The obtained results indicate a positive effect of BAC obtained from SG on DC, which is mediated by stimulation of M-cholinoreceptors.

A similar trend was found during the evaluation of the activity of the tension of the UB IS contractility. After the introduction of Pilocarpine, this index in the animals of group 1 increased 2.5 times, in group 4 it did in 4.6 times (Table,  $p = 0.036$ ;  $p = 0.008$ , respectively) compared with the control. In rats of group 4, it increased 5.6 times compared with group 6 (Table,  $p = 0.018$ ). The indices of MC of UB IS in the groups 1 and 4 were higher than in other experimental groups.

The time to reach the maximum contractility in group 1 was the shortest and amounted to 32% of the control (Table,  $p = 0.005$ ), which indicated a pronounced effect of cryoextract of SG on pilocarpine-dependent UB IS contractility.

Assuming the high rates of DC in the animals of groups 1 and 4 compared with the controls, it was advisable to perform their comparative analysis. The power of muscle contractions, the active tension of UB IS were higher in the animals after the induction of CM by the culture of cryopreserved MG compared with the introduction of cryoextract of SG (Table,  $p = 0.02$ ;  $p = 0.037$ ).

Thus, the value of the UB contractile activity, which coincided with the control, was obtained after the application of bulk medium and CM from the culture of native MG. In animals with the cryoextract of SG and CM from the culture of cryopreserved





## Висновки

1. У шурів на тлі експериментальної ІВО маса ІС СМ і масовий коефіцієнт були найменшими в групі з введенням кріоекстракту СГ.

2. Дія БАК, крім кріоекстракту СГ, стимулювала КСІ-індуковану САД, яка підвищується на тлі ІВО внаслідок розвитку денерваційної надчутливості (гіперактивності детрузора), що свідчить про збереження на ранніх стадіях ІВО механізму скорочення, який пов'язаний з деполаризацією клітинних мембран гладких м'язів.

3. Застосування кріоекстракту СГ і КС від культури кріоконсервованих МГ підвищувало пілокарпін-індуковану САД і МАС, що підтверджує позитивний вплив на основні рецепторні механізми роботи СМ на тлі ІВО, а також можливість їх захисту і відновлення після пошкодження.

## Література

1. Алі СГ, Сидоренко ОС, Божок ГА. Вплив складу живильного середовища на морфологічні характеристики культури клітин спінальних гангліїв неонатальних поросят. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2018; 30 (30): 49–59.
2. Гомазков ОА. Нейротрофическая терапия и концепция «минипептидов». *Consilium medicum*. 2013; (2): 105–9.
3. Гомазков ОА. Нейротрофические факторы мозга. Справочно-информационное издание [Интернет]. Москва: НИИ Биомедицинской химии РАМН; 2004 [цитировано 2019 окт. 28]. 311 с. Доступно на: <https://www.booksmed.com/biologiya/2166>.
4. Леви-Монтальчини Р. Факторы роста нервов и тканей. *Международный неврологический журнал* [Интернет]. 2012 [цитировано 2019 окт. 28]; 3(49): 29728. Доступно на: <http://www.mif-ua.com/archive/article/29728>.
5. Субота НП, Грищенко ВІ, Розанова КД, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання фетальних препаратів. Патент України № 36466А. 16.04.2001.
6. Шавловская ОА. Клиническая эффективность нейропептидов при цереброваскулярной патологии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016; 116 (8): 88–93.
7. Ali S, Bozhok G. Effect of cryopreservation on different passages of porcine dorsal root ganglion cell culture. *Recent Adv Biol Med* [Internet]. 2019 [Cited 2020 Mar 17]; 5: 1–5. Available from: <https://rabm.scholasticahq.com/article/10899>.
8. Andersson KE. Potential of stem cell treatment in detrusor dysfunction. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; (82–83): 117–22.
9. Banks FC, Knight GE, Calvert RC, et al. Alterations in purinergic and cholinergic components of contractile responses of isolated detrusor contraction in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2006; 97 (2): 372–8.
10. Barendrecht MM, Chichester P, Michel MC, Levin RM. Effect of short-term outlet obstruction on rat's bladder nerve density and contractility. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2007; 27 (1): 47–53.
11. Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, et al. Growth factors and receptors in bladder development and obstruction. *Lab Invest*. 1996; 75 (2): 157–66.

MG, it was above the control. In addition, the animals of these groups showed a pronounced response of the UB IS to different stimuli and recorded the highest MC scores. These effects are likely due to the action of NF coming from the SG and from the MG culture after freezing and warming. It has been proven that after cryopreservation the ratio of morphological types of cells changes, namely, their production of NFs as well [1]. The findings indicate a positive effect of BACs on the course of IVO in rats, which may be implemented by the UB neuromuscular apparatus.

## Conclusions

1. In rats, on the background of experimental IVO, the mass of UB IS and the mass ratio were the lowest in the group with the cryoextract of SG.

2. BAC action, except the cryoextract of SG, stimulated KCl-induced DC, which increases against the background of IVO due to the development of denervation hypersensitivity (detrusor hyperactivity), which indicates the preservation of the contractility mechanism at the early stages of IVO, which is associated with depolarization of cell membranes of smooth muscles.

3. The use of cryoextract of SG and CS from the culture of cryopreserved MG increased pilocarpine-induced DC and MAC, which confirms the positive effect on the main receptor mechanisms of UB on the background of IVO, as well as the possibility of their protection and recovery after damage.

## References

1. Ali S, Bozhok G. Effect of cryopreservation on different passages of porcine dorsal root ganglion cell culture. *Recent Adv Biol Med* [Internet]. 2019 Nov 2 [Cited 2020 Mar 17];5: 941755. Available from: <https://rabm.scholasticahq.com/article/10899-effect-of-cryopreservation-on-different-passages-of-porcine-dorsal-root-ganglion-cell-culture>.
2. Ali SG, Sidorenko OS, Bozhok GA. [Influence of nutrient medium composition on the morphological characteristics of culture of dorsal root ganglion cells of neonatal piglets]. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series «Biology»*. 2018; 30 (30): 49–59. Ukrainian.
3. Andersson KE. Potential of stem cell treatment in detrusor dysfunction. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; (82–83): 117–22.
4. Banks FC, Knight GE, Calvert RC, et al. Alterations in purinergic and cholinergic components of contractile responses of isolated detrusor contraction in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *BJU Int*. 2006; 97 (2): 372–8.
5. Barendrecht MM, Chichester P, Michel MC, Levin RM. Effect of short-term outlet obstruction on rat's bladder nerve density and contractility. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2007; 27 (1): 47–53.



12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72 (1–2): 248–54.
13. Choppin A. Muscarinic receptors in isolated urinary bladder smooth muscle from different mouse strains. *Br J Pharmacol.* 2002; 137 (4): 522–8.
14. Cumming JA, Chisholm GD. Changes in detrusor innervation with relief of outflow tract obstruction. *Br J Urol.* 1992; 69 (1): 7–11.
15. Downi JW, McGuire RP. Antagonism of calcium-induced contraction in potassium-depolarized rabbit detrusor muscle strips by dicyclomine hydrochloride and rodoferine. *Can J Physiol Pharmacol.* 1981; 59 (8): 853–6.
16. Ekman M, Zhu B, Swärd K, Uvelius B. Neurite outgrowth in cultured mouse pelvic ganglia - Effects of neurotrophins and bladder tissue. *Auton Neurosci.* 2017; 205: 41–9.
17. Fry CH. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004; 49 (3): 201–10.
18. Fusco F, Creta M, De Nunzio C, et al. Progressive bladder remodeling due to bladder outlet obstruction: a systematic review of morphological and molecular evidences in humans. *BMC Urol* [Internet]. 2018 Mar 09 [Cited 2019 Oct 22]; 18 (1): 15. Available from: <https://bmcuro.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0329-4>.
19. Goldman HB, Zimmern PE. The treatment of female bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2006; 98 (Suppl 1):S17–S23.
20. Juan YS, Chuang SM, Jang MY, et al. Basic research in bladder outlet obstruction. *Incon Pelvic Floor Dysfunct* [Internet]. 2011 [Cited 2019 Oct 24]; 5 (1):1–6. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/0d7e/fc7092fb5ae4336f9852ffa060634683172a.pdf>.
21. Kim JC, Yoo JS, Park EY, et al. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2008; 101 (3): 371–5.
22. Kullmann FA, Daugherty SL, de Groat WC, Birder LA. Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *J Vis Exp* [Internet]. 2014 Aug 18 [Cited 2019 Oct 24]; (90), e51807. Available from: <https://www.jove.com/video/51807/bladder-smooth-muscle-strip-contractility-as-method-to-evaluate-lower>.
23. Levin R, Chichester P, Levin S, Buttyan R. Role of angiogenesis in bladder response to partial outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2004; 38 (215): 37–47.
24. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, et al. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *The Prostate.* 1990; 17 (Suppl 3): S9–S26.
25. Levin RM, Ruggieri MR, Velagapudi S, et al. Relevance of spontaneous activity to urinary bladder function: an *in vitro* and *in vivo* study. *J Urol.* 1986; 136 (2): 517–21.
26. Lin WY, Wu CF, Chen CS. Partial bladder outlet obstruction: bladder dysfunction and related issues in animal studies. *Urol Sci.* 2010; 21 (2): 70–4.
27. Milicic I, Buckner SA, Daza A, et al. Pharmacological characterization of urinary bladder smooth muscle contractility following partial bladder outlet obstruction in pigs. *Eur J Pharmacol.* 2006; 532 (1–2): 107–14.
28. Minagawa T, Imamura T, Igawa Y, et al. Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder. *European Urology.* 2010; 58 (2): 299–306.
29. Zhang NZ, Ma L, Zhang JB, Chen J. Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *Int Braz J Urol.* 2014; 40 (3): 414–22.
30. Sezginer EK, Yilmaz-Oral D, Lokman U, et al. Effects of varying degrees of partial bladder outlet obstruction on urinary bladder function of rats: A novel link to inflammation, oxidat-
6. Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, et al. Growth factors and receptors in bladder development and obstruction. *Lab Invest.* 1996; 75 (2): 157–66.
7. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72 (1–2): 248–54.
8. Choppin A. Muscarinic receptors in isolated urinary bladder smooth muscle from different mouse strains. *Br J Pharmacol.* 2002; 137 (4): 522–8.
9. Cumming JA, Chisholm GD. Changes in detrusor innervation with relief of outflow tract obstruction. *Br J Urol.* 1992; 69 (1): 7–11.
10. Downi JW, McGuire RP. Antagonism of calcium-induced contraction in potassium-depolarized rabbit detrusor muscle strips by dicyclomine hydrochloride and rodoferine. *Can J Physiol Pharmacol.* 1981; 59 (8): 853–6.
11. Ekman M, Zhu B, Swärd K, Uvelius B. Neurite outgrowth in cultured mouse pelvic ganglia - Effects of neurotrophins and bladder tissue. *Auton Neurosci.* 2017; 205: 41–9.
12. Fry CH. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004; 49 (3): 201–10.
13. Fusco F, Creta M, De Nunzio C, et al. Progressive bladder remodeling due to bladder outlet obstruction: a systematic review of morphological and molecular evidences in humans. *BMC Urol* [Internet]. 2018 Mar 09 [Cited 2019 Oct 22]; 18 (1): 15. Available from: <https://bmcuro.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0329-4>.
14. Goldman HB, Zimmern PE. The treatment of female bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2006; 98 (Suppl 1):S17–S23.
15. Gomazkov OA. [Neurotrophic factors of the brain]. Reference-informational edition. [Internet]. Moscow: Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Sciences; 2004 [Cited 2019 Oct 28]. 311p. Available from: <https://www.booksmed.com/biologiya/2166>. Russian.
16. Gomazkov OA. [Neurotrophic therapy and concept of «mini-peptides»]. *Consilium medicum.* 2013; (2): 105–9. Russian.
17. Juan YS, Chuang SM, Jang MY, et al. Basic research in bladder outlet obstruction. *Incon Pelvic Floor Dysfunct* [Internet]. 2011 [Cited 2019 Oct 24]; 5 (1):1–6. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/0d7e/fc7092fb5ae4336f9852ffa060634683172a.pdf>.
18. Kim JC, Yoo JS, Park EY, et al. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. *BJU Int.* 2008; 101 (3): 371–5.
19. Kullmann FA, Daugherty SL, de Groat WC, Birder LA. Bladder smooth muscle strip contractility as a method to evaluate lower urinary tract pharmacology. *J Vis Exp* [Internet]. 2014 Aug 18 [Cited 2019 Oct 24]; (90), e51807. Available from: <https://www.jove.com/video/51807/bladder-smooth-muscle-strip-contractility-as-method-to-evaluate-lower>.
20. Levi-Montalcini R. [Factors of tissue and nerve growth]. *Mezhdunarodnyi nevrologicheskii zhurnal* [Internet]. 2012 [Cited 28.10.2019]; 3 (49): 29728. Available from: <http://www.mif-ua.com/archive/article/29728/>. Russian.
21. Levin R, Chichester P, Levin S, Buttyan R. Role of angiogenesis in bladder response to partial outlet obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2004; 38 (215): 37–47.
22. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, et al. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *The Prostate.* 1990; 17 (Suppl 3): S9–S26.
23. Levin RM, Ruggieri MR, Velagapudi S, et al. Relevance of spontaneous activity to urinary bladder function: an *in vitro* and *in vivo* study. *J Urol.* 1986; 136 (2): 517–21.
24. Lin WY, Wu CF, Chen CS. Partial bladder outlet obstruction: bladder dysfunction and related issues in animal studies. *Urol Sci.* 2010; 21 (2): 70–4.



- tive stress and hypoxia. *Low Urin Tract Symptoms*. 2019; 11 (2): 193–201.
31. Skaper SD. Neurotrophic Factors. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 846. Totowa, USA: Humana Press; 2012. Chapter 1, The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview; p. 1–12.
  32. Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, et al. Bladder outflow obstruction—a cause of denervation supersensitivity. *J Urol*. 1987; 138 (6): 1461–6.
  33. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology*. 2006; 9 (2): 313–25.
  34. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999; 194 (1): 1–14.
  35. Uvelius B. Isometric and isotonic length-tension relations and variations in cell length in longitudinal smooth muscle from rabbit urinary bladder. *Acta Physiol Scand*. 1976; 97 (1): 1–12.
  36. Vetter I, Pujic Z, Goodhill GJ. The response of dorsal root ganglion axons to nerve growth factor gradients depends on spinal level. *J Neurotrauma*. 2010; 27 (8): 1379–86.
  37. Wein AJ, Rackley RR. Overactive bladder: a better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *J Urol*. 2006; 175(3S): S5–S10.
  38. Workshop 3: ICS methodology in basic science [Internet]. Tokyo, International Continence Society; 2016 Sept 13. [Cited 2019 Oct 22]. 25p. Available from: <https://www.ics.org/Workshops/HandoutFiles/000621.pdf>.
  39. Yoshida S, Orimoto N, Tsukihara H, et al. TAC-302 promotes neurite outgrowth of isolated peripheral neurons and prevents bladder denervation related bladder dysfunctions following bladder outlet obstruction in rats. *Neurourol Urodyn*. 2017; 37 (2): 681–9.
  40. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* 2014; 55 (2): 81–90.
  25. Milicic I, Buckner SA, Daza A, et al. Pharmacological characterization of urinary bladder smooth muscle contractility following partial bladder outlet obstruction in pigs. *Eur J Pharmacol*. 2006; 532 (1–2): 107–14.
  26. Minagawa T, Imamura T, Igawa Y, et al. Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder. *European Urology*. 2010; 58 (2): 299–306.
  27. Zhang NZ, Ma L, Zhang JB, Chen J. Improved model for the establishment and evaluation of detrusor overactivity in female Wistar rats. *Int Braz J Urol*. 2014; 40 (3): 414–22.
  28. Sezginer EK, Yilmaz-Oral D, Lokman U, et al. Effects of varying degrees of partial bladder outlet obstruction on urinary bladder function of rats: A novel link to inflammation, oxidative stress and hypoxia. *Low Urin Tract Symptoms*. 2019; 11 (2): 193–201.
  29. Shavlovskaya OA. [Clinical efficacy of neuropeptides in cerebrovascular pathology]. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016; 116 (8): 88–93. Russian.
  30. Skaper SD. Neurotrophic Factors. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 846. Totowa, USA: Humana Press; 2012. Chapter 1, The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview; p. 1–12.
  31. Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, et al. Bladder outflow obstruction—a cause of denervation supersensitivity. *J Urol*. 1987; 138 (6): 1461–6.
  32. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathology*. 2006; 9 (2): 313–25.
  33. Subota NP, Gryschenko VI, Rozanova KD, inventors; Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. [Method for producing fetal preparations]. Ukraine patent № 36466 A. 2001 April 16. Ukrainian.
  34. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999; 194 (1): 1–14.
  35. Uvelius B. Isometric and isotonic length-tension relations and variations in cell length in longitudinal smooth muscle from rabbit urinary bladder. *Acta Physiol Scand*. 1976; 97 (1): 1–12.
  36. Vetter I, Pujic Z, Goodhill GJ. The response of dorsal root ganglion axons to nerve growth factor gradients depends on spinal level. *J Neurotrauma*. 2010; 27 (8): 1379–86.
  37. Wein AJ, Rackley RR. Overactive bladder: a better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *J Urol*. 2006; 175(3S): S5–S10.
  38. Workshop 3: ICS methodology in basic science [Internet]. Tokyo, International Continence Society; 2016 Sept 13. [Cited 2019 Oct 22]. 25p. Available from: <https://www.ics.org/Workshops/HandoutFiles/000621.pdf>.
  39. Yoshida S, Orimoto N, Tsukihara H, et al. TAC-302 promotes neurite outgrowth of isolated peripheral neurons and prevents bladder denervation related bladder dysfunctions following bladder outlet obstruction in rats. *Neurourol Urodyn*. 2017; 37 (2): 681–9.
  40. Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* 2014; 55 (2): 81–90.

