

ВІДТВОРЕННЯ СТРЕСОВОЇ МОДЕЛІ НЕТРИМАННЯ СЕЧІ У ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

О. І. Яцина, І. М. Савицька, Ю. О. Фурманов, Ф. І. Костев, С. В. Вернигородський,
О. А. Гейленко, Н. В. Дячкова

Інститут урології НАМН України,
Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України, м. Київ,
Одеський національний медичний університет МОЗ України,
Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України

SIMULATION OF THE STRESS MODEL OF THE URINE INCONTINENCE IN LABORATORY ANIMALS

O. I. Jatsyna, I. M. Savytska, Yu. O. Furmanov, F. I. Kostev, S. V. Vernygorodskiy,
O. A. Geilenko, N. V. Dyachkova

Institute of Urology,
Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology, Kyiv,
Odessa National Medical University,
Vinnytsya National Medical University named after M. I. Pyrogov

Реферат

Стресове нетримання сечі (СНС), особливо у жінок, є найпоширенішим ускладненням урогінекологічних захворювань. Створено адекватну і стабільно відтворювану модель СНС у лабораторних білих щурів шляхом двобічного перев'язування соромітних нервів. Це забезпечувало стійкі прояви СНС, що прогресували у міру збільшення тривалості експерименту. За даними уродинамічних досліджень, реєстрували зниження тиску витікання першої краплини сечі в оперованих тварин; результати гістологічних та морфометричних досліджень свідчили про збільшення просвіту сечівника, зниження тону м'язів. За даними дослідження, денервація сечівника та його сфінктера була стійкою, використання моделі дозволяло отримати стабільно відтворювані результати.

Ключові слова: стресове нетримання сечі; перев'язування соромітних нервів; уродинаміка; експеримент.

Abstract

The stress urinary incontinence (SUI), especially in women, constitutes most frequent complication of urogynecological diseases. Adequate and a stably reproducible model of SUI in white laboratory rats was created, using bilateral ligature of pudendal nerves. This guarantees a stable signs of SUI, which had progressed while the experiment duration enhanced. In accordance to the urodynamical investigations data, the leak pressure of the urine first drop in operated laboratory animals was registered; results of histological and morphometric investigations had witnessed about the ureter's diameter enhancement and the muscles tone lowering. In accordance to the investigation data, the ureter's and its sphincter denervation was stable, and the model application had permitted to obtain stably reproducible results.

Keywords: the stress urinary incontinence; ligature of pudendal nerves; urodynamics; experiment.

Нетримання сечі, особливо у жінок, є актуальною проблемою в усьому світі, незалежно від віку та етнічної належності. Найпоширенішим видом нетримання сечі є СНС, або нетримання сечі при напруженні, його частота становить близько 50%, частота ургентного і змішаного видів нетримання сечі — відповідно 14 і 32%. СНС є мультифакторним захворюванням, його етіологія та патогенез недостатньо вивчені, тому дуже складно створити еквівалентну модель на тваринах [1]. Натомість, використовують непрямі маркери, проте, їх не слід переоцінювати.

Дослідження мають відбуватися за трьома ключовими аспектами.

Перший аспект — це сенсорна активність нижніх сечових шляхів, що включає поняття аферентної сигналізації, в тому числі передачі сигналу і аферентного трафіку, пропускання сигналів, сенсibiliзації і свідомого сприйняття. Нервові закінчення нижніх сечових шляхів щільно сконцентровані під уротелієм. У цьому місці вони зазнають впливу медіаторів, що вивільняються з уротелію [2], клітинного впливу і дії цитокінів [3].

Другий аспект — це руховий контроль, зумовлений наявністю гіперактивності м'яза—випорожнювача сечового міхура (МВСМ) у багатьох пацієнтів при синдромі гіперактивного сечового міхура. Рухова функція включає процеси, що спричиняють скорочення МВСМ. Описані численні зміни властивостей гладеньких м'язів сечового міхура при синдромі гіперактивного сечового міхура і активності МВСМ, на підставі чого запропоновано "міогенну гіпотезу активності МВСМ". Цим підтверджено тезу про те, що гіперактивні скорочення МВСМ виникають внаслідок підвищення збудливості і поширення скорочення в м'язі [4, 5]. Цей процес може бути додатково модифікований еферентними нервовими волокнами, інтерстиційними клітинами та локальними медіаторами [6]. Такий стан є нормальним при сечовипусканні, проте, не має проявлятися при депонуванні сечі, оскільки гальмівні впливи центральної нервової системи (ЦНС) пригнічують його.

Третій аспект — це рефлексії нижніх сечових шляхів; оскільки для депонування сечі в сечовому міхурі необхідне пригнічення МВСМ [7], можна припустити, що активація

моторики сечового міхура або його спорожнення зумовлює гіперактивність МВСМ або мимовільне виділення сечі при імперативному позиві. Рухова діяльність рефлексів нижніх сечових шляхів базується на висхідних аферентах сенсорної інформації, інтегрованих на різних рівнях ЦНС [8], і є чутливою до стресових чинників.

Поширення СНС обґрунтовує необхідність проведення досліджень з використанням адекватних моделей на тваринах. Одна з таких моделей розроблена й використана нами у дослідженнях.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В експерименті білі щури розподілені на дві групи. У контрольній групі щурам здійснювали тільки розріз шкіри з двох боків над великим сідничним м'язом, після чого рану шкіри зашивали.

У тварин основної групи для відтворення моделі СНС перев'язували соромітні нерви з двох боків під наркозом. Знеболювання під час оперативного втручання виконували шляхом внутрішньоочеревинного введення 0,2 мл розчину тіопентал—натрію 5% та 0,4 мл розчину пропофолу 1%. Після розсічення шкіри над великим сідничним м'язом по перимітрию розділяли м'яз до візуалізації сідничного нерва, перев'язували його гілки, що формували соромітний нерв. Рану пошарово зашивали. Всі тварини задовільно перенесли оперативне втручання.

Під час виконання експерименту керувались Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (2006), стандартами Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Revised, 1996) та American Heart Association's "Guidelines for the Use of Animal in Research" [9].

Перед моделюванням СНС та через 14 і 30 діб після відтворення моделі у щурів реєстрували тиск у сечовому міхурі, необхідний для витікання першої краплини сечі (LPP — Leak Point Pressure). Перед дослідженням тварин вводили у наркоз, як при оперативному втручанні. В сечовий міхур через сечівник вводили катетер PE 50, заповнювали його водою. Об'єм сечового міхура вважали таким, за якого відбувалось сечовипускання після введення максимального об'єму води. Цей показник необхідний для подальшого визначення об'єму рідини при вимірюванні LPP. Тиск витікання першої краплини сечі визначали шляхом введення рідини, що дорівнювала половині об'єму сечового міхура. Обережно натискали на передню черевну стінку, реєстрували тиск, за якого виділялась перша краплина сечі. Послідовно проводили 6 вимірювань LPP.

Уродинамічні дослідження проводили за спеціально розробленою системою "Uro—Pro", що включала такі пристрої.

1. Вимірювач тиску багатоканального приладу "Ритм" виробництва ВАТ "НВП Сатурн".
2. Блок обробки інформації.
3. Насос перистальтичний SR15 фірми Thomas.
4. Модуль протяжки катетера для профілометрії сечівника і сфінктерів (пат. України 72059 від 10.08.12).
5. Пересувну стійку з реєстратором даних.
6. Комплект датчиків, зібраних у вимірювальну систему.

Розроблене спеціальне програмне забезпечення для реєстрації, обробки і друку отриманих даних. В меню установки використана стандартна термінологія ICS (International Continence Society), що відповідає міжнародним вимогам. Установка виконана відповідно до стандартів безпеки для медичного електрообладнання ІЕС 601—1 тип ВF, що передбачала особливий ступінь захисту від електричного удару.

Уродинамічні дослідження підтвердили створення моделі СНС через 14 діб, через 2 тиж та 1 міс тварин обох груп виводили з експерименту шляхом передозування 5% розчину тіопентал—натрію. Виділяли сечовий міхур разом з сечівником, макропрепарати фіксували у 10% розчині формальдегіду протягом 24 год, препарати готували за загальноприйнятою методикою. Препарати поперечних зрізів сечівника товщиною 5 — 7 мкм забарвлювали гематоксилином і еозином, пікрофуксином за ван—Гізон, використовували метод Шифф—йодна кислота (ШЙК) за Мак Манусом. Мікрофото отримували за допомогою світлооптичного мікроскопа Leica ICC50 HD, морфометричні дослідження здійснювали за допомогою програмного забезпечення аналізу зображень Paradis.

Для підтвердження відтворення моделі СНС за даними морфометричного дослідження визначали площу зовнішнього периметра циркулярного шару м'язової оболонки сечівника. Обчислювали індекс площі провіту сечівника ($IS_{\text{провіт}}$) як відношення $S_{\text{провіт}}/S_{\text{сечівн}}$ $\times 100$, який оцінювали як морфометричний показник, що відображав наявність моделі СНС. Площу сечівника вимірювали в межах зовнішнього периметру циркулярного шару м'язової оболонки, межі адвентиційної оболонки складно визначити, тому її не брали до уваги. Оцінка співвідношення саме двох показників за даними морфометричного дослідження дозволила нівелювати помилки вимірювань, що виникали при отриманні поперечних зрізів сечівника внаслідок деформації при фіксації та ущільнення [10]. Використання такого



Рис. 1.
Мікрофото.
Сечівник щура контрольної групи
через 14 діб.
Забарвлення гематоксилином та еозином.
36. $\times 120$.

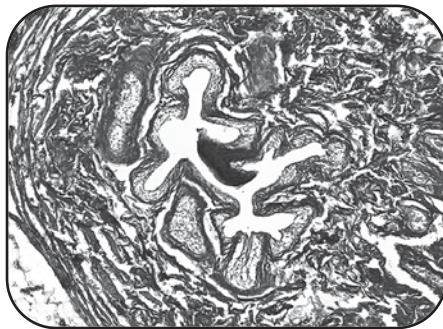


Рис. 2.
Мікрофото.
Сечівник щура основної групи
через 14 діб після відтворення моделі.
Забарвлення пікрофуксином за ван-Гізон.
36. $\times 100$.

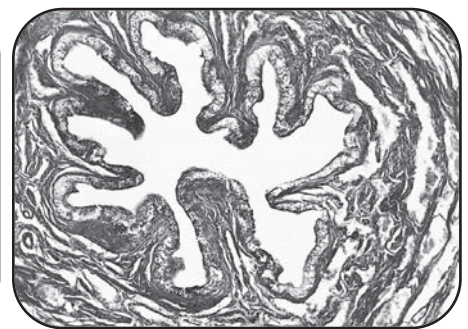


Рис. 3.
Мікрофото.
Сечівник щура основної групи
через 30 діб після відтворення моделі.
ШЙК-реакція.
36. $\times 100$.

показника, як площа просвіту сечівника ($IS_{\text{просв}}$) дозволило отримати більш достовірні дані.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В контрольній групі у щурів показники LPP достовірно не відрізнялись від таких в інтактних тварин. У тварин основної групи через 14 діб після створення моделі вони зменшувались на 28,6%, через 30 діб — на 39,7%.

За даними гістологічних досліджень, у щурів контрольної групи просвіт сечівника переважно щілиноподібної форми (рис. 1), його площа у міру збільшення тривалості спостереження вірогідно не змінювалась.

Тварин основної групи через 14 діб після відтворення моделі виводили з експерименту, проводили гістологічні та морфометричні дослідження. За даними гістологічних досліджень патологічні зміни в обох групах тварин не виявлені, проте, у щурів основної групи спостерігали дещо збільшену десквамацію епітелію з поверхні епітеліальної пластинки слизової оболонки, помірно виражену атонію м'язової оболонки сечового міхура і сечівника без вираженого її стоншення. В сечівнику виявлене утворення глибоких складок слизової оболонки (рис. 2), збільшення площі просвіту у порівнянні з такою в контролі, про що свідчило збільшення діаметра еквівалентного кола просвіту сечівника в 1,4 разу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Parsons BA, Drake MJ. Animal models in overactive bladder research. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;202:15—43.
2. Birder L, Andersson KE. Urothelial signaling. *Physiol Rev*. 2013;93(2):653—80.
3. Andersson KE, McCloskey KD. Lamina propria: the functional center of the bladder? *NeuroUrol Urodyn*. 2014;33(1):9—16.
4. Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*. 1997;50(6):57—67.
5. Савчук РВ, Костев ФІ, Сейфулліна ІІ, Шматкова НВ. Регуляція сократительной активности мочевого пузыря in vitro и in vivo. *Здоровье мужчины*. 2009;2(29):179—82.
6. Drake MJ, Mills IW, Gillespie JI. Model of peripheral autonomous modules and a myovesical plexus in normal and overactive bladder function. *Lancet*. 2001;358(9279):401—3.
7. Sadananda P, Drake MJ, Paton JF. A functional analysis of the influence of β_3 -adrenoreceptors on the rat micturition cycle. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(2):506—15.
8. Drake MJ, Fowler CJ, Griffiths D. Neural control of the lower urinary and gastrointestinal tracts: supraspinal CNS mechanisms. *NeuroUrol Urodyn*. 2010;29(1):119—27.
9. Денисов СД, Морозкина ТС. Требования к научному эксперименту с использованием животных. *Здравоохранение*. 2001;(4):40—2.
10. Макаров АВ, Фатхудинов ТХ, Тухольская ЕА, Аполихина ИА, Арутюнян ИВ, Исмаилова АМ, и др. Экспериментальные модели стрессового недержания мочи. *Урология*. 2015;(4):24—8.

Через 30 діб у тварин основної групи відзначали збільшення площі просвіту сечівника, атонія м'язової оболонки прогресувала, про що свідчило збільшення площі сечівника (рис. 3), епітеліальна пластинка слизової оболонки на деяких ділянках стоншувалась як через втрату тонусу, так і підвищену десквамацію клітин.

$IS_{\text{просв}}$ сечівника у тварин основної групи через 14 діб після відтворення моделі становив 19,73, у контрольній групі — 7,93; через 30 діб — 26,17, тобто, його збільшення на 14—ту добу та збереження тенденції до збільшення у подальшому свідчило про отримання відтворюваних результатів.

ВИСНОВКИ

1. При відтворенні шляхом перев'язування соромітних нервів моделі СНС відзначали стійке зменшення показників уродинаміки та відповідні морфологічні й морфометричні зміни сечівника.

2. Модель СНС є адекватною, відтворюваною, не затратною, може бути використана під час проведення доклінічних досліджень з метою розробки сучасних методів лікування СНС.

