ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК [57.084:57.089]:612.884
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412

Поступила в редакцию 15.10.2021
Received 15.10.2021

А.-М. В. Ерофеева, А. Ю. Молчанова

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА НОЦИЦЕПТИВНЫЕ РЕАКЦИИ И ПАРАМЕТРЫ ПОХОДКИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ

Аннотация. Периферические нейропатии сопровождаются хроническим изнурительным болевым синдромом и трудно поддаются лечению. В связи с этим актуальной представляется разработка клеточной терапии нейропатии с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) жировой ткани.

В работе изучено влияние однократной локальной трансплантации МСК жировой ткани на ноцицептивные реакции в ответ на механический и термический стимулы, а также на параметры походки крыс при моделировании периферической нейропатии методом аксотомии седалищного нерва.

Установлено, что однократное локальное введение МСК в дозе $1{\cdot}10^6$ клеток/кг устраняет вызванную травмой седалищного нерва механическую и термическую гипералгезию ипсилатеральной конечности к 14-м суткам после трансплантации, способствует восстановлению функционального индекса седалищного нерва и динамических параметров походки к 7-м суткам после трансплантации клеток, а также нивелирует развитие нарушений походки в долгосрочном периоде.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, нейропатия, боль, седалищный нерв, функциональный седалищный индекс, походка

Для цитирования: Ерофеева, А.-М. В. Влияние трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на ноцицептивные реакции и параметры походки крыс с экспериментальной периферической нейропатией / А.-М. В. Ерофеева, А. Ю. Молчанова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 404–412. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412

Anna-Maria V. Yerofeyeva, Alla Yu. Molchanova

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

IMPACT OF ADIPOSE-DERIVED ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON NOCICEPTIVE REACTIONS AND GAIT PARAMETERS IN RATS WITH EXPERIMENTAL PERIPHERAL NEUROPATHY

Abstract. Peripheral neuropathy is associated with chronic debilitating pain and is difficult to treat. In this regard, the development of cell therapy of neuropathic pain using adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) seems to be relevant.

The work was devoted to study the impact of adipose-derived allogeneic MSC transplantation on nociceptive reactions in response to mechanical and thermal stimuli and gait parameters in rats with sciatic nerve injury.

It is found that a single local injection of MSCs at a dose of $1{\cdot}10^6$ cells/kg eliminates axotomy-induced mechanical and thermal hyperalgesia on the 14th day after transplantation, contributes to the recovery of the sciatic functional index and the dynamic gait parameters on the 7th day after transplantation, and prevents the development of gait disturbances in the long-term period.

Keywords: mesenchymal stem cells, neuropathy, pain, sciatic nerve, sciatic functional index, gait

For citation: Yerofeyeva A.-M. V., Molchanova A. Yu. Impact of adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cell transplantation on nociceptive reactions and gait parameters in rats with experimental peripheral neuropathy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 4, pp. 404–412 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412

Введение. Периферическая нейропатия (НП) представляет собой хронический болевой синдром, возникающий вследствие органического поражения или дисфункции периферических волокон соматосенсорной нервной системы [1]. Данное патологическое состояние встречается, по разным источникам, у 7–20 % взрослого населения, и, как правило, сопровождается значительным ухудшением качества жизни пациентов вплоть до инвалидизации [2, 3]. Этиология периферической

© Ерофеева А.-М. В., Молчанова А. Ю., 2022

НП включает перенесенные травмы, прогрессирующий сахарный диабет, дегенеративно-дистрофические изменения костно-мышечной системы, некоторые вирусные инфекции и онкологические заболевания, однако отмечаются и случаи идиопатической нейропатической боли [1, 2].

Современные схемы терапии периферической НП, направленные на конкретные патофизиологические механизмы болевого синдрома, показывают клиническую эффективность при верно выявленных причинах возникновения нейропатической боли. Вместе с тем данные фармакотерапевтические методы зачастую не способны устранить истинную причину повреждения нервных волокон, в силу чего пациентам необходим длительный, даже пожизненный, прием препаратов, которые нередко обладают побочными эффектами, затрудняющими нормальную жизнедеятельность [2, 3].

В этой связи весьма актуальной представляется разработка клеточной терапии НП с использованием мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) [4, 5]. Данные клетки обладают, в частности, иммуномодулирующими, противовоспалительными и антиапоптотическими свойствами, что было показано в исследованиях *in vitro* [4–7], а также легко выделяются по сравнению с другими клетками [5]. Имеются экспериментальные доказательства анальгетического эффекта локального введения МСК ЖТ в область каррагинан-индуцированного воспаления у крыс [8]. Ранее авторами на модели травмы Ахиллова сухожилия у крыс показан антиноцицептивный эффект локального введения МСК ЖТ [9]. Вместе с тем для внедрения этого метода в клиническую практику данных об антиноцицептивном и репаративном потенциале МСК ЖТ при введении в область повреждения периферических нервных волокон пока недостаточно.

Целью работы являлось изучение влияния однократного локального введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на ноцицептивную чувствительность и параметры походки крыс при моделировании периферической нейропатии седалищного нерва.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на 20 крысах-самцах стока Wistar с исходной массой 200–220 г. Животных содержали в условиях вивария ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» при температуре 22,0 ± 1,0 °C и 12-часовым циклом освещения день/ночь с доступом к воде и пище *ad libitum*. Все манипуляции выполняли в утренние часы. Эксперименты проведены с соблюдением законодательства, принципов биоэтики и согласно положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986). Протоколы экспериментов одобрены комиссией по биоэтике при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Моделирование периферической НП осуществляли путем аксотомии участка седалищного нерва размером 1 см, расположенного выше трифуркации левой задней конечности крыс. Все хирургические манипуляции проводили под общим наркозом (50 мг/кг тиопентала натрия внутривенно) с местной анестезией (100 мкл 1 %-ного раствора лидокаина гидрохлорида (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) внутримышечно). Раны ушивали узловым швом с использованием шовного материал Сургикрол 3-0 («Футберг», Беларусь). После операции животные находились под визуальным контролем в индивидуальных боксах до выхода из наркоза. Для профилактики постоперационной раневой инфекции животным однократно подкожно вводили антибиотик цефтриаксон (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) в дозе 200 мг/кг.

Аллогенную трансплантацию МСК ЖТ осуществляли на 7-е сутки после аксотомии. МСК ЖТ аллогенного происхождения предварительно выделяли из жировой ткани интактных крыс и впоследствии культивировали на базе ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» согласно ранее изложенной методике [10]. Далее в исследовании использовали МСК ЖТ 4-го пассажа. Клеточный трансплантат в дозе $1 \cdot 10^6$ клеток/кг, разведенный в апирогенном физиологическом растворе, вводили по периметру места аксотомии седалищного нерва (4 инъекции по воображаемому циферблату).

Ноцицептивные реакции исследовали до операции и на 7, 14, 21, 28, 60 и 90-е сутки после моделирования НП. Порог ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул, измеряемый минимальной силой надавливания пластикового конуса на стопу животного, вызывающей

ноцицептивную реакцию, определяли с помощью алгезиметра «Рэндалла-Селитто» (PanLab, Испания) [11]. Латентный период ноцицептивной реакции (ЛПНР) на тепловую стимуляцию горячей пластиной, нагретой до 50,0 ± 1,0 ºС, оценивали с использованием алгезиметра Hot-plate (PanLab, Испания) [11]. Тесты для каждого животного проводили троекратно, с интервалом 5–7 мин, далее использовали усредненные значения.

Параллельно тестам на ноцицептивные реакции регистрировали параметры походки крыс с помощью аппаратно-программного комплекса CatWalk XT 10.6 (Noldus, Голландия). Данная система позволяет количественно оценивать параметры походки во время непринужденного передвижения животного по специальному коридору, оснащенному красной LED-подсветкой контура животного и зеленой LED-подсветкой мест контакта животного с поверхностью стеклянного пола. Интенсивность освещения места контакта лап с поверхностью стекла фиксировали высокоскоростной видеокамерой, расположенной под коридором, и затем анализировали с помощью программного обеспечения [12].

До начала исследования животных адаптировали к прибору. Тестирование каждого животного осуществляли до получения трех адекватных пробежек. Для оценки степени тонических болевых ощущений (аллодинии) при произвольном передвижении изучали параметры походки, связанные с болью, а также общие параметры походки (их краткая характеристика представлена в таблице).

Характеристика исследуемых параметров походки у экспериментальных животных

Characteristics of the investigated gait parameters in experimental animals

Параметр	Описание
Параметры походки, связанные с болью	
Stand time	Длительность фазы опоры лапы на поверхность
Swing time	Длительность фазы переноса лапы в воздухе
Duty cycle	Рабочий цикл лапы, отношение длительности фазы опоры лапы к длительности полного цикла шага
Max intensity	Максимальная интенсивность отпечатка лапы
Mean intensity	Средняя интенсивность отпечатка лапы
Max contact max intensity	Максимальная интенсивность отпечатка лапы при максимальном контакте с поверхностью
Max contact mean intensity	Средняя интенсивность отпечатка лапы при максимальном контакте с поверхностью
Общие параметры походки	
Print length	Длина отпечатка
Print width	Ширина отпечатка
Print area	Площадь отпечатка
Max contact area	Площадь отпечатка при максимальном контакте лапы с поверхностью

Исследуемые параметры походки регистрировали для левой и правой задних конечностей, после чего вычисляли отношение каждого параметра левой (оперированной) лапы к здоровой правой лапе.

Для оценки функциональной активности седалищного нерва рассчитывали функциональный седалищный индекс – *Sciatic Functional Index (SFI)*, показывающий степень нарушения моторной функции стопы поврежденной конечности относительно стопы здоровой контралатеральной конечности. Индекс *SFI* рассчитывался программой автоматически по формуле [13]:

$$SFI = -38{,}3(PL_E - PL_N)/PL_N + 109{,}5(TS_E - TS_N)/TS_N + 13{,}3(ITS_E - ITS_N)/ITS_N - 8{,}8,$$

где *TS* – расстояние между 1-м и 5-м пальцами оперированной (TS_E) и здоровой (TS_N) конечности; *ITS* – расстояние между 2-м и 4-м пальцами оперированной (ITS_E) и здоровой (ITS_N) конечности; *PL* – расстояние между 3-м пальцем и пяткой оперированной (PL_E) и здоровой (PL_N) конечности.

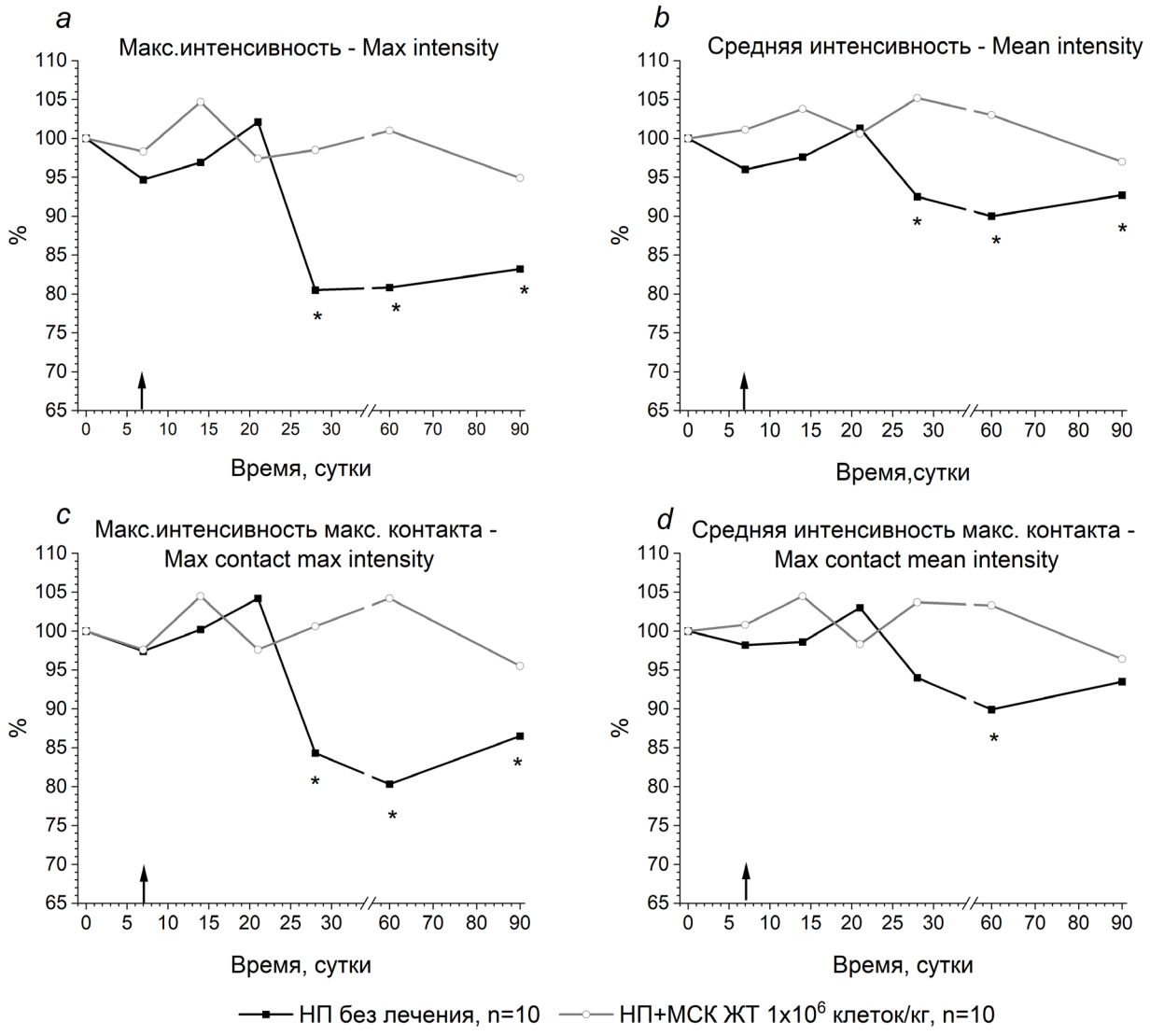

Рис. 3. Изменение параметров интенсивности отпечатков задних лап крыс (*a–d*) при моделировании НП и трансплантации аллогенных МСК ЖТ. Стрелками отмечено время трансплантации. *– $p < 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП

Fig. 3. Changes in the parameters of hind paw print intensities (*a–d*) in rats with sciatic NP and allogeneic ADMSC transplantation. The arrow indicates the ADMSC transplantation time. * – $p < 0.05$ compared to the value before NP

метров: *print length* – на 14,2 % (здесь и далее $p < 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП) (рис. 4, *a*); *print width* – на 20,0 % ($p < 0,001$) (рис. 4, *b*); *print area* – на 30,9 % ($p < 0,01$) (рис. 4, *c*), *max contact area* – на 29,3 % ($p < 0,001$) (рис. 4, *d*).

Однократное введение исследуемой дозы МСК ЖТ, помимо интенсивности отпечатков, нивелировало также нарушения общих параметров походки (рис. 4, *a–d*).

Изменение функционального седалищного индекса (SFI). Моделирование НП приводило к снижению функциональной активности седалищного нерва поврежденной конечности к 7-м суткам после аксотомии, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение *SFI* во всех группах животных ($p < 0,001$) (рис. 5).

Вместе с тем трансплантация аллогенных МСК ЖТ в исследуемой дозе способствовала восстановлению *SFI* до исходного уровня в группе НП + МСК ЖТ уже к 7-м суткам после инъекции (14-е сутки после аксотомии) ($p > 0,05$).

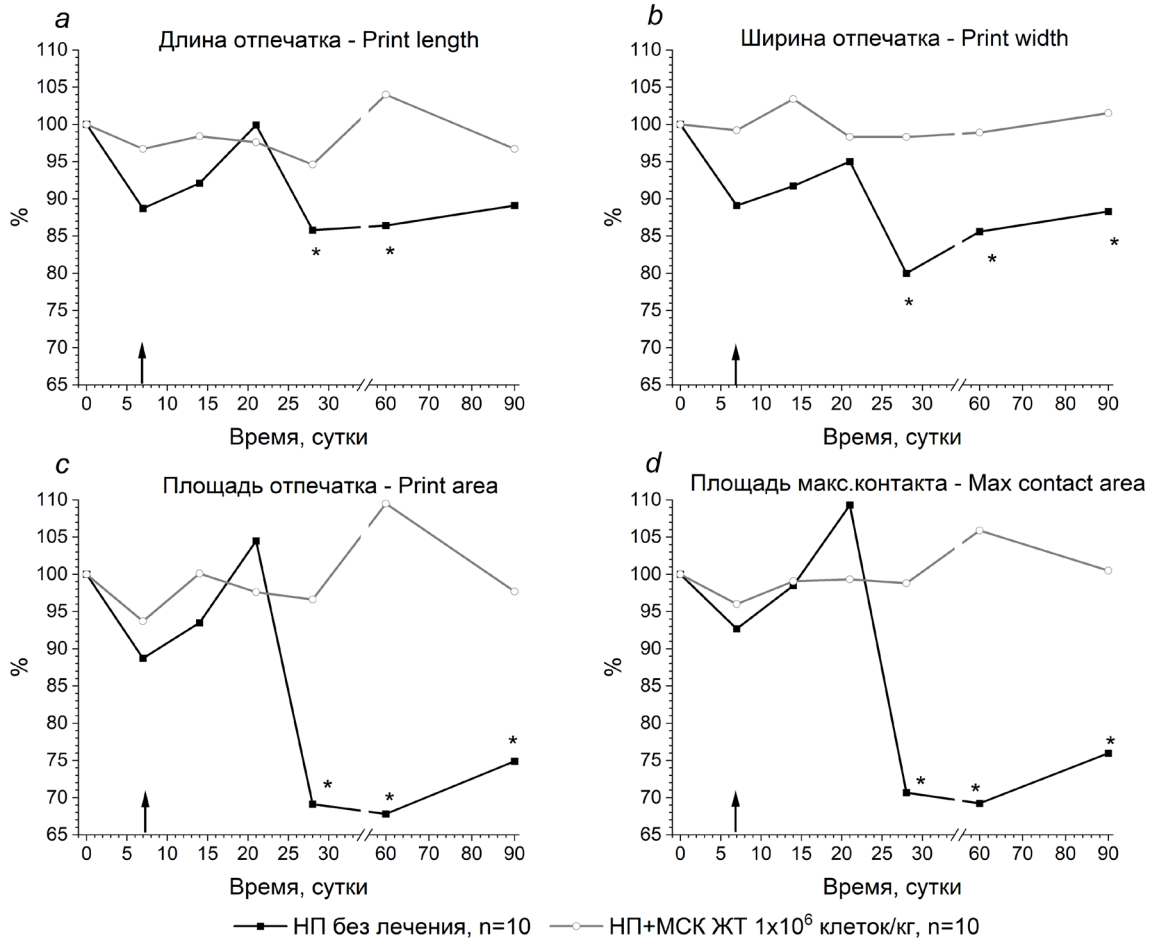

Рис. 4. Изменение общих параметров походки крыс (*a–d*) при моделировании нейропатии НП и трансплантации аллогенных МСК ЖТ. Стрелками отмечено время трансплантации. * – $p < 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП

Fig. 4. Changes in the general gait parameters (*a–d*) in rats with sciatic NP and allogeneic ADMSC transplantation. The arrow indicates the ADMSC transplantation time. * – $p < 0.05$ compared to the value before NP

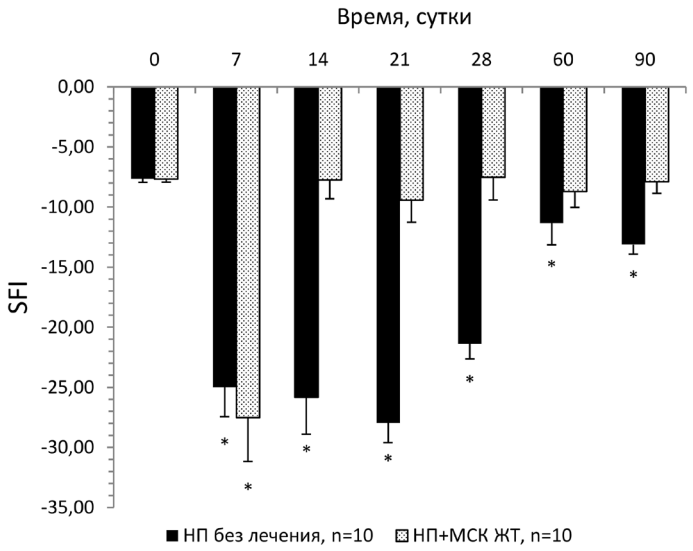

Рис. 5. Динамика изменения *SFI* крыс при моделировании НП и трансплантации аллогенных МСК ЖТ. Стрелкой отмечено время трансплантации. * – $p < 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП

Fig. 5. Changes in *SFI* in rats with sciatic NP and allogeneic ADMSC transplantation. The arrow indicates the ADMSC transplantation time. * – $p < 0.05$ compared to the value before NP

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение МСК ЖТ в дозе $1 \cdot 10^6$ клеток/кг в зону аксотомии седалищного нерва крыс оказывает антиноцицептивный эффект, выраженный в устранении механической и термической гипералгезии, восстановлении функциональной активности седалищного нерва, а также в устранении нарушений походки как в ранние сроки после введения, так и в долгосрочном периоде. Однако для выяснения механизмов антиноцицептивного и репаративного действия МСК ЖТ необходимы дальнейшие исследования изменения морфологической картины и молекулярного профиля области повреждения периферических нервных волокон на фоне трансплантации МСК ЖТ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Bouhassira, D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology / D. Bouhassira // Rev. Neurologique. – 2019. – Vol. 175, N 1–2. – P. 16–25. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016

2. Murnion, B. P. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment / B. P. Murnion // Aust. Prescr. – 2018. – Vol. 41, N 3. – P. 60–63. https://doi.org/10.18773/austprescr.2018.022

3. Smith, B. H. Neuropathic pain in the community: prevalence, impact, and risk factors / B. H. Smith, H. L. Hébert, A. Veluchamy // Pain. – 2020. – Vol. 161, suppl. 1. – P. S127–S137. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001824

4. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine / Y. Han [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8, N 8. – Art. 886. https://doi.org/10.3390/cells8080886

5. Adipose tissue derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts / S. M. Melief [et al.] // Stem Cells Transl. Med. – 2013. – Vol. 2, N 6. – P. 455–463. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184

6. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome / C. R. Harrell [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8, N 5. – P. 467–501. https://doi.org/10.3390/cells8050467

7. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity / Y. Zhou [et al.] // J. Clin. Med. – 2019. – Vol. 12, N 8. – P. 1025–1042. https://doi.org/10.3390/jcm8071025

8. Anti-inflammatory and anti-nociceptive actions of systemically or locally treated/adipose-derived mesenchymal stem cells in experimental inflammatory model / T. Mert [et al.] // Inflammation. – 2015. – Vol. 38, N 3. – P. 1302–1310. https://doi.org/10.1007/s10753-014-0101-1

9. Влияние аллогеной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на ноцицептивную чувствительность и репаративные процессы при экспериментальной травме Ахиллова сухожилия у крыс / А.-М. В. Ерофеева [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 5. – С. 574–582.

10. Использование гемостатического препарата Спонгостан в качестве носителя мезенхимальных стволовых клеток при лечении экспериментального недержания мочи у крыс / С. В. Пинчук [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 457–465.

11. Deuis, J. R. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents / J. R. Deuis, L. S. Dvorakova, I. Vetter // Front. Mol. Neurosci. – 2017. – Vol. 10. – Art. 284. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284

12. Эволюция методик оценки моторной функции лабораторных грызунов, моделирующих нейродегенеративные заболевания / М. М. Чичёва [и др.] // Biomed. Chem. Res. Meth. – 2018. – Vol. 1, N 3. – P. e00030.

13. Bain, J. R. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat / J. R. Bain, S. E. Mackinnon, R. T. Hunter // Plas. Reconstr. Surg. – 1989. – Vol. 83, N 1. – P. 129–136. https://doi.org/10.1097/00006534-198901000-00024

References

1. Bouhassira D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Revue Neurologique*, 2019, vol. 175, no. 1–2, pp. 16–25. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016

2. Murnion B. P. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. *Australian Prescribers*, 2018, vol. 41, no. 3, pp. 60–63. https://doi.org/10.18773/austprescr.2018.022

3. Smith B. H., Hébert H. L., Veluchamy A. Neuropathic pain in the community: prevalence, impact, and risk factors. *Pain*, 2020, vol. 161, suppl. 1, pp. S127–S137. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001824

4. Han Y., Li X., Zhang Y., Han Yu., Chang F., Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*, 2019, vol. 8, no. 8, art. 886. https://doi.org/10.3390/cells8080886

5. Melief S. M., Zwaginga J. J., Fibbe W. E., Roelofs H. Adipose tissue derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, vol. 2, no. 6, pp. 455–463. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184

6. Harrell C. R., Fellabaum C., Jovicic N., Djonov V., Arsenijevic N., Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells*, 2019, vol. 8, no. 5, pp. 467–501. https://doi.org/10.3390/cells8050467

7. Zhou Y., Yamamoto Y., Xiao Z., Ochiya T. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, vol, 12, no. 8, pp. 1025–1042. https://doi.org/10.3390/jcm8071025

8. Mert T., Kurt A. H., Arslan M., Çelik A., Tugtag B., Akkurt A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive actions of systemically or locally treated adipose-derived mesenchymal stem cells in experimental inflammatory model. *Inflammation*, 2015, vol. 38, no. 3, pp. 1302–1310. https://doi.org/10.1007/s10753-014-0101-1

9. Erofeeva A.-M. V., Zhavoronok I. P., Antipova O. A., Ryzhkovskaya E. L., Kuznetsova T. E., Vasilevich I. B., Pinchuk S. V., Volotovskii I. D., Molchanova A. Yu. Effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on nociceptive sensitivity and repair processes at Achilles tendon injury model in rats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 5, pp. 574–582 (in Russian).

10. Pinchuk S. V., Molchanova A. Yu., Vasilevich I. B., Zhavoronok I. P., Pekhtereva E. I., Antipova O. A., Zalutskii I. V., Volotovskii I. D. Use of hemostatic drug Spongostan as a carrier of mesenchymal stem cells in the treatment of experimental urinary incontinence in rats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 4, pp. 457–465 (in Russian).

11. Deuis J. R., Dvorakova L. S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017, vol. 10, art. 284. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284

12. Chicheva M. M., Vikhareva E. V., Mal'tsev A. V., Ustyugov A. A. Evolution of methods for assessing the motor function of laboratory rodents – neurodegenerative diseases models. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, 2018, vol. 1, no. 3, p. e00030 (in Russian).

13. Bain J. R., Mackinnon S. E., Hunter R. T. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1989, vol. 83, no. 1, pp. 129–136. https://doi.org/10.1097/00006534-198901000-00024

Информация об авторах

Ерофеева Анна-Мария Вадимовна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: amyerofeyeva@zoho.eu. https://orcid.org/0000-0002-9407-9295

Молчанова Алла Юрьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alla@fizio.bas-net.by. https://orcid.org/0000-0001-5053-6602

Information about the authors

Anna-Maria V. Yerofeyeva – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: amyerofeyeva@zoho.eu. https://orcid.org/ 0000-0002-9407-9295

Alla Yu. Molchanova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alla@fizio.bas-net.by. https://orcid.org/0000-0001-5053-6602