

УДК 616-089.843:611.018.26.013:616.832-009.55
doi: 10.22494/cot.v8i2.111

Вплив трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини на моторну активність та функціональний стан сідничого нерва в мишей з периферичною нейропатією



Рубцов В.¹, Говбах І. О.², Устименко А. М.^{3,4}, Кирик В. М.^{3,4}, Цупиков О. М.^{3,5}

¹ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

²Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, Харків, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

⁴ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова Національної академії медичних наук України», Київ, Україна

⁵Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна

e-mail: tsupykov@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Однією з найбільш поширених спадкових моторно-сенсорних периферичних нейропатій є хвороба Шарко-Мари-Тута типу 1А, яка спричинена процесами демієлінізації рухових і сенсорних нервових волокон та призводить до порушення функцій нерва. Зараз відсутні ефективні методи лікування спадкових нейропатій, але останні дослідження вказують на низку потенційно ефективних терапевтичних агентів, зокрема – мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК).

МЕТОЮ РОБОТИ була оцінка впливу трансплантації ММСК жирової тканини на моторну активність та функціональний стан сідничого нерва трансгенних мишей з периферичною нейропатією.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Мишам лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з периферичною нейропатією внутрішньом'язово вводили ММСК, які виділяли з жирової тканини мишей лінії FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенних за GFP. Моторну активність експериментальних тварин досліджували в динаміці через 2, 4, 6, 8 і 10 тижнів за допомогою поведінкового тесту «балансування на перекладині». Функції сідничого нерва аналізували за даними тесту «відбитки стопи» шляхом розрахунку індексу функціональності сідничого нерва (ІФСН).

РЕЗУЛЬТАТИ. Протягом 2-10 тижнів у тварин з нейропатією спостерігалось прогресування захворювання, що виражалось в наростаючому збільшенні кількості зісковзувань задніх кінцівок з перекладини та часу, необхідного для подолання тестової дистанції. ІФСН у тварин цієї групи знижувався протягом усього часу дослідження і на 10-му тижні становив $-47,0 \pm 2$ одиниць.

На противагу, вже починаючи з 2-го тижня експерименту, миші з нейропатією після трансплантації ММСК здійснили на 20 % менше зісковзувань та витратили на 11 % менше часу при проходженні тесту «балансування на перекладині» в порівнянні з тваринами без трансплантації клітин. У ці ж строки було зафіксовано зростання показника ІФСН до $-30,2 \pm 2$ проти $-34,6 \pm 0,9$ одиниць відповідно. На 10-й тиждень після введення ММСК значення ІФСН становило $-10,1 \pm 2,3$ одиниць та корелювало зі зменшенням кількості зісковзувань та часу, витраченого на проходження тесту «балансування на перекладині».

РЕЗЮМЕ

ВИСНОВКИ. Трансплантація ММСК сприяє покращенню індексу функціональності сідничого нерва та дрібної моторики в мишей з периферичною нейропатією. ММСК потенційно можуть стати ефективним терапевтичним агентом у лікуванні периферичної нейропатії при хворобі Шарко-Марі-Тута типу 1А.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини; демієлінізація; периферична нейропатія; індекс функціональності сідничого нерва

Хвороба Шарко-Марі-Тута типу 1А (Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, CMT1A) – одна з найбільш поширених спадкових периферичних нейропатій. Частота її виявлення становить від 1:1500 до 1:10000 у різних популяціях [1]. Ця патологія спричинена процесами демієлінізації рухових та сенсорних нервових волокон, які супроводжуються атрофією їх аксонів, що призводить до порушення функцій нерва [1]. Симптоми CMT1A, зазвичай, проявляються в перші двадцять років життя у вигляді симетричної м'язової слабкості, швидкої втомлюваності при навантаженнях та зниження чутливості дистальних ділянок кінцівок. При цьому нижні кінцівки переважно вражаються сильніше в порівнянні з верхніми [2].

Причиною CMT1A є дуплікація фрагменту хромосоми 17p.11.2, яка призводить до появи третього алелю гена периферичного мієлінового білка 22кДа (PMP22), що є причиною його надмірної експресії [2]. Білок PMP22 – це інтегральний мембранний білок з родини тетраспанів, який складає 2-5 % від загальної кількості білків компактного мієлінового шару периферичної нервової системи [1, 3]. Специфічні функції PMP22 остаточно ще не встановлені, але відомо, що PMP22 бере участь у підтриманні стабільності ліпідних рафтів на мембранах Шваннівських клітин та процесах формування мієлінових мембран при мієлінізації аксона [3, 4].

Механізми демієлінізації, індукованої надекспресією PMP22, досі не встановлені, але існує гіпотеза, яка полягає в тому, що в нормальних умовах експресія PMP22 відбувається на рівнях, близьких до насичення системи контролю фолдингу білків в ендоплазматичному ретикулумі, тому введення додаткової копії гена PMP22 переважує клітинні системи фолдингу та, як наслідок, призводить до накопичення незгорнутих молекул PMP22. Це призводить до стресового пошкодження ендоплазматичного ретикулума і спричиняє порушення внутрішньоклітинного везикулярного транспорту та кальцієвого обміну [4, 5]. Ця гіпотеза підтверджується тим, що стимуляція аутофагії підсилює деградацію таких білкових агрегатів і сприяє поліпшенню мієлінізації в мишей [5].

На сьогоднішній день відсутні ефективні методи терапії периферичних нейропатій, спричинених хворобою CMT1A. Дослідження останніх років вказують на низку терапевтичних агентів, які потенційно можуть мати позитивний ефект при лікуванні CMT1A [6]. До них належать антагоністи пуринового рецептора P2X7, антисмислові олігонуклеотиди та різні типи мезенхімальних стовбурових клітин, зокрема з кісткового мозку, жирової тканини та пуповинного каналу [6-9].

У нашому дослідженні як засіб для регенерації сідничого нерва були обрані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК) з жирової тканини, оскільки підшкірна жирова клітковина є багатим джерелом ММСК, а секретом цих клітин, зокрема фактори росту родини нейротрофінів, сприяє аксональному росту та виживанню Шваннівських клітин [9, 10]. Крім того, ММСК жирової клітковини виявляють типові ознаки ММСК, такі як мультипотентність, здатність без негативних наслідків витримувати довготривале культивування та криоконсервацію [11].

МЕТОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ була оцінка впливу трансплантації ММСК жирової тканини на моторну активність та функціональний стан сідничого нерва трансгенних мишей з периферичною нейропатією.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі експерименти на тваринах виконані з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (European convention, Strasburg, 1986), статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до їжі та води *ad libitum*.

У дослідженні використовували 3 групи мишей віком 7 міс. обох статей масою тіла 23-29 г. I група (контроль) – здорові тварини лінії C57Bl (n = 6). II група (ПН) – трансгенні миші зі спадковою периферичною нейропатією лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, яка була отримана на основі C57Bl/6J (придбані в The Jackson Laboratory, США) (n = 6). III група (ПН+ММСК) – миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J (n = 10) після трансплантації ММСК з жирової тканини.

Для отримання ММСК використовували самців мишей лінії FVB-C-Tg(GFP)5Nagy/J, трансгенних за зеленим флуоресцентним білком (GFP), віком 5 міс. (n = 8). Миші були люб'язно надані Європейською лабораторією молекулярної біології (Monterotondo, Italy).

Отримання ММСК з жирової клітковини. Миші лінії FVB-C-Tg(GFP)5Nagy/J підлягали евтаназії шляхом цервікальної дислокації під наркозом 2,5 % розчину 2,2,2-триброметанолу (авертин в дозі 400 мг/кг). У стерильних умовах виділяли підшкірну жирову тканину, подрібнювали ножицями на фрагменти розмірами 1x1 мм в середовищі DMEM/F12 (Sigma, США) та інкубували в 0,1 % розчині колагенази типу IA (Sigma, США) протягом 90 хв при 37 °C та постійному перемішуванні на шейкері зі швидкістю обертання 100 об/хв. Отриману суспензію клітин відмивали в поживному середовищі DMEM (Sigma, США) шляхом центрифугування при 300 xg, видаляли надосадову рідину із зрілими адипоцитами і дебрисом та пропускали клітини через стерильний нейлоновий фільтр EASYstrainer з діаметром пор 100 мкм (Greiner bio-one, Австрія). Клітини стромально-васкулярної фракції культивували в CO₂-інкубаторі в умовах зволоженого повітря з 5 % CO₂ при температурі +37 °C у повному поживному середовищі DMEM-LG (Sigma, США), яке містило 15 % фетальної сироватки корів (ФСК) (HyClone, США), пеніцилін 100 од/мл, стрептоміцин 100 мкг/мл, (Sigma-Aldrich, США), 1:100 nonessential amino acids (Sigma-Aldrich, США). Заміну поживного середовища проводили кожні 3 доби. Клітини субкультивували при досягненні 80 % конфлуентності моношару з використанням 0,25 % розчину трипсину (Sigma, США) та 0,02 % версену (Біо-Тест-Лабораторія, Україна).

На 2-му пасажі проводили імунофенотипування отриманих культур та направлене диференціювання в остеогенному і адипогенному напрямках за стандартними методиками, як описано раніше [12]. Клітини аналізували методом проточної цитометрії за допомогою клітинного сортера BD FACSAria (Becton Dickinson, США) з використанням rat anti-mouse моноклональних антитіл проти антигенів CD44, CD73, CD90, CD105, CD34, CD45 (BD Bioscience, США). Була встановлена висока експресія специфічних маркерів CD44, CD73, CD90, CD105, при одночасно низькому рівні гемопоетичних маркерів CD34,

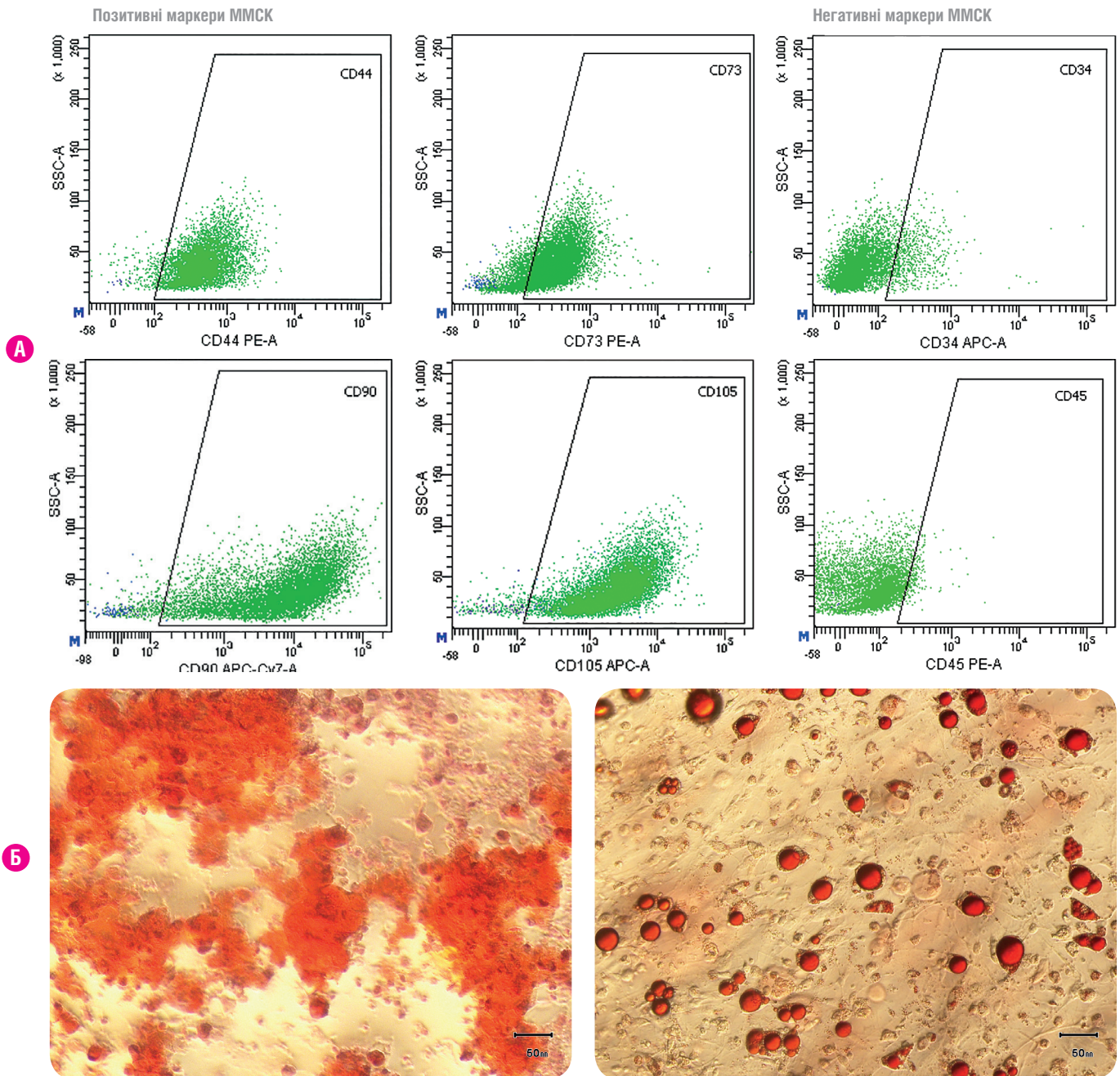


Рис. 1. Підтвердження мінімальних критеріїв ММСК жирової тканини.

А – гістограми експресії маркерів CD44, CD73, CD90, CD105, CD34 і CD45 у культурі ММСК жирової клітковини мишей за даними проточної цитометрії, 2-й пасаж.

Б – мікрофото препаратів культур ММСК жирової тканини мишей після спрямованого остеогенного (ліворуч) та адипогенного (праворуч) диференціювання на 14 і 21 добу культивування відповідно. Клітини з ліпідними включеннями забарвлені Oil Red (червоний колір), мінералізований позаклітинний матрикс, забарвлений Alizarin Red S на солі кальцію (рожевий колір); світлова мікроскопія, шкала – 50 мкм.

CD45 (рис. 1 А). При направленому адипогенному диференціюванню було встановлено наявність ліпідних гранул в цитоплазмі клітин, а при остеогенному – відкладання солей кальцію в екстрацелюлярному матриксі (рис. 1 Б). Таким чином, за морфологією, адгезивними властивостями, імунофенотипом та потенціалом до направлено диференціювання отримані культури відповідали мінімальним критеріям ММСК [13].

Клітини 2-го пасажу ресуспендували в концентрації $1 \cdot 10^6$ клітин/мл у кріосередовищі, що складалось з 90 % ФСК та 10 % диметилсульфоксиду (Sigma, США), заморожували до -80 °C в кріоконтейнерах CoolCell® (Corning, США) та зберігали в кріосховищі з рідким азотом при -196 °C.

Трансплантація ММСК жирової тканини. Перед трансплантацією клітини відтаювали на водяній бані при 37 °C, відмивали в 10 мл живинного середовища DMEM/F12, що містило 10 % ФСК, та ресуспендували в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) (HyClone, США). Мишам лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J зі периферичною нейропатією трансплантували $0,5 \cdot 10^6$ GFP-позитивних ММСК у 50 мкл ФСБ внутрішньом'язово в *m. gastrocnemius* з обох боків під внутрішньочеревною анестезією (каліпол + ксилазин, 75 та 2 мг/кг маси тіла відповідно). Тваринам групи II (ПН) вводили 50 мкл ФСБ без клітин внутрішньом'язово в *m. gastrocnemius* з обох боків.

На початку експерименту та через 2, 4, 6, 8 і 10 тижнів у експериментальних тварин досліджували моторну активність та функції

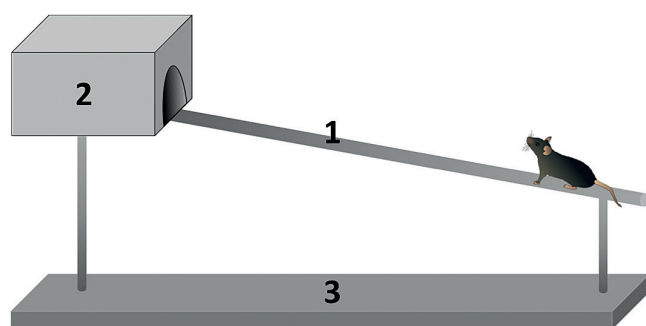


Рис. 2. Схематичне зображення установки для тесту «балансування на перекладині». 1 – перекладина циліндричної форми діаметром 2 см та довжиною 110 см; 2 – затемнена коробочка розміром 13 x 22 см і вхідним отвором розміром 5 x 6 см; 3 – підставка, на якій встановлена установка.

сідничого нерва за допомогою поведінкового тесту «балансування на перекладині», тесту «відбитки стопи» та розраховували індекс функціональності сідничого нерва (ІФСН).

Тест «балансування на перекладині». Для проведення цього тесту була сконструйована спеціальна установка, яка складалася з дерев'яної перекладини циліндричної форми діаметром 2 см та довжиною 110 см і розміщувалася на висоті 50-60 см над підлогою під кутом 10° до горизонтальної площини. Перекладина з'єднувалася з затемненою коробочкою розміром 13 x 22 см, що мала вхідний отвір розміром 5 x 6 см (Рис. 2) [14].

На нижньому кінці перекладини біла лінія вказувала на стартову позицію тварини. Інша лінія була проведена на відстані 100 см від старту на верхньому кінці перекладини на вході в коробку, щоб показати місце фінішу. Навпроти перекладини була розміщена відеокамера для відеозапису поведінки мишей під таким кутом, щоб охопити всю довжину перекладини і забезпечити чітку видимість стартової та фінішної ліній.

У тесті «балансування на перекладині» вимірювали такі показники: час, за який тварина проходила від стартової до фінішної лінії, та кількість зісковзувань при проходженні тестової дистанції. Тест виконувався протягом 3-х днів поспіль: 2 дні для навчання та 1 день тестування. Кожна тварина виконувала тест 7 разів з інтервалом 40 с для відпочинку.

Тест «відбитки стопи». Для проведення цього тесту тваринам змащували задні лапи тушшю та давали можливість проходити коридором довжиною 60 см та шириною 8 см, вимощеним білою паперовою стрічкою. У тесті «відбитки стопи» вимірювали два параметри: довжину відбитку стопи (ДВС) та ширину розведення пальців кінцівки (ШРП) (Рис. 3). Кожна тварина виконувала тест 3 рази поспіль, а з кожної стрічки для аналізу відбирали як мінімум 5 відбитків лап.

Розрахунок індексу функціональності сідничого нерва. Показник індексу функціональності сідничого нерва вираховували за формулою, запропонованою R. Vaïne з модифікацією Insegra та ін. [15]:

$$\text{ІФСН} = 118,9 \left(\frac{\text{ШРПп} - \text{ШРПк}}{\text{ШРПк}} \right) - 51,2 \left(\frac{\text{ДВСп} - \text{ДВСк}}{\text{ДВСк}} \right) - 7,5$$

де ШРПп – ширина розведення пальців кінцівки тварини з патологією, ШРПк – ширина розведення пальців кінцівки здорової тварини, ДВСп – довжина відбитку стопи тварини з патологією, ДВСк – довжина відбитку стопи здорової тварини.

Значення ІФСН оцінювалося за балами від 0-100. Числове значення ≥ 0 позначає нормальну функцію, а -100 дорівнює повністю нефункціональному стану сідничого нерва.

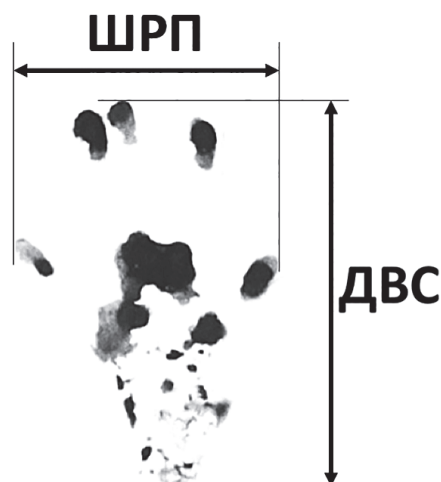


Рис. 3. Фотографія відбитку стопи миші із зазначенням параметрів, які аналізували. ШРП – ширина розведення пальців кінцівки миші, ДВС – довжина відбитку стопи миші.

Статистичний аналіз. Для порівняння даних досліджень експериментальних груп був застосований метод дисперсійного аналізу ANOVA з використанням програмного забезпечення Origin Pro 8.5 (Origin Lab. Corp., США). Різницю вважали достовірною при $p \leq 0,05$, усі експерименти проводили щонайменше тричі. Результати поведінкових тестів представлені у вигляді середнє \pm стандартна похибка середнього значення (SEM).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було встановлено, що на початку експерименту перед трансплантацією ММСК експериментальним тваринам миші контрольної групи проходили тест «балансування на перекладині» за $6,5 \pm 0,8$ с, а миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)^{C3Fbas/J} з периферичною нейропатією (група «ПН») проходили цю ж відстань за $15,6 \pm 1,7$ с. Тварини експериментальної групи «ПН+ММСК» витрачали на проходження дистанції $15,8 \pm 1,7$ с (рис. 4).

Також протягом проведення тесту «балансування на перекладині» було розраховано кількість зісковзувань задніх кінцівок тварин контрольної та експериментальних груп «ПН» і «ПН+ММСК». Тварини контрольної групи та групи «ПН» при проходженні тестової відстані здійснили в середньому $1,5 \pm 0,6$ та $8,5 \pm 0,8$ зісковзувань відповідно (рис. 5). Кількість зісковзувань у мишей групи «ПН+ММСК» становила $8,7 \pm 1,0$.

Протягом усього періоду спостереження (10 тижнів) показники часу, за який тварини проходили відстань від лінії старту до лінії фінішу, та кількості зісковзувань задніх лап тварин зростали в контрольній групі та групі «ПН». У групі тварин ПН+ММСК спостерігалось прогресуюче зниження цих показників, але на жодному з часових інтервалів це значення не сягало результатів нормальних тварин (рис. 4, 5).

Статистично достовірні відмінності в часі та кількості зісковзувань при проходженні тесту «балансування на перекладині» між експериментальними групами «ПН» та «ПН+ММСК» почали проявлятися на другому тижні експерименту: тварини групи «ПН+ММСК» здійснили на 20 % менше зісковзувань та витратили на 11 % менше часу в порівнянні з групою «ПН». У той же час, тварини контрольної групи на момент виявлення відмінностей в результатах тесту «балансування на перекладині» зробили на 86 % менше зісковзувань та пройшли дослідну дистанцію на 62 % швидше в порівнянні з тваринами групи «ПН». Тоді як аналогічні значення при порівнянні з тваринами групи «ПН+ММСК» були меншими на 81 % та 57,5 % відповідно.

Показник індексу функціональності сідничого нерва (ІФСН) визначали за допомогою обрахування таких параметрів відбитка стопи як ширина розведення пальців та довжина відбитку стопи. На початку дослідження в тварин контрольної групи показник ІФСН становив $2,5 \pm 0,9$ одиниць (рис. 6). Тоді як у тварин груп «ПН» та «ПН+ММСК» аналогічного віку цей показник становив $-30,6 \pm 2$ та $-31,2 \pm 4$ одиниць відповідно.

За допомогою аналізу функціонального стану сідничого нерва та за результатами тесту «балансування на перекладині» було відмічено поліпшення рухової активності тварин групи «ПН+ММСК» на 2, 4, 6, 8 та 10-му тижні після трансплантації ММСК. Протягом 2-10 тижнів у тварин контрольної групи відзначалося незначне зниження рухової функції, пов'язане з віком, що проявлялося в поступовому зниженні показника ІФСН від $2,5 \pm 0,9$ на початку дослідження до $-2,2 \pm 1,5$ одиниць на 10-му тижні та незначному підвищенні кількості зісковзувань (з $1,5 \pm 0,6$ до $2,9 \pm 0,8$) і, як наслідок, зростанні часу

(з $6,5 \pm 0,8$ с до $7,8 \pm 0,9$ с), необхідного для проходження тесту «балансування на перекладині» (рис. 4-6).

У тварин групи «ПН» спостерігалось подальше прогресування захворювання. Це виражалося в наростаючому збільшенні кількості зісковзувань задніх кінцівок з перекладини та часу, необхідного для подолання тестової дистанції (рис. 4, 5). Індекс функціональності сідничого нерва в тварин групи «ПН» знижувався протягом усього часу дослідження та на 10-му тижні дослідження становив $-47,0 \pm 2$ одиниць (рис. 6). У тварин цієї групи також відзначали значні порушення соматосенсорної чутливості дистальних ділянок кінцівок та рухової координації.

У тварин групи «ПН+ММСК» зростання показника індексу функціональності сідничого нерва відносно тварин групи «ПН» було зафіксоване на 2-му тижні після трансплантації ММСК та становило $-30,2 \pm 2$ проти $-34,6 \pm 0,9$ одиниць у групі «ПН» (рис. 6). На 10-й тиждень після введення ММСК середнє значення ІФСН у тварин

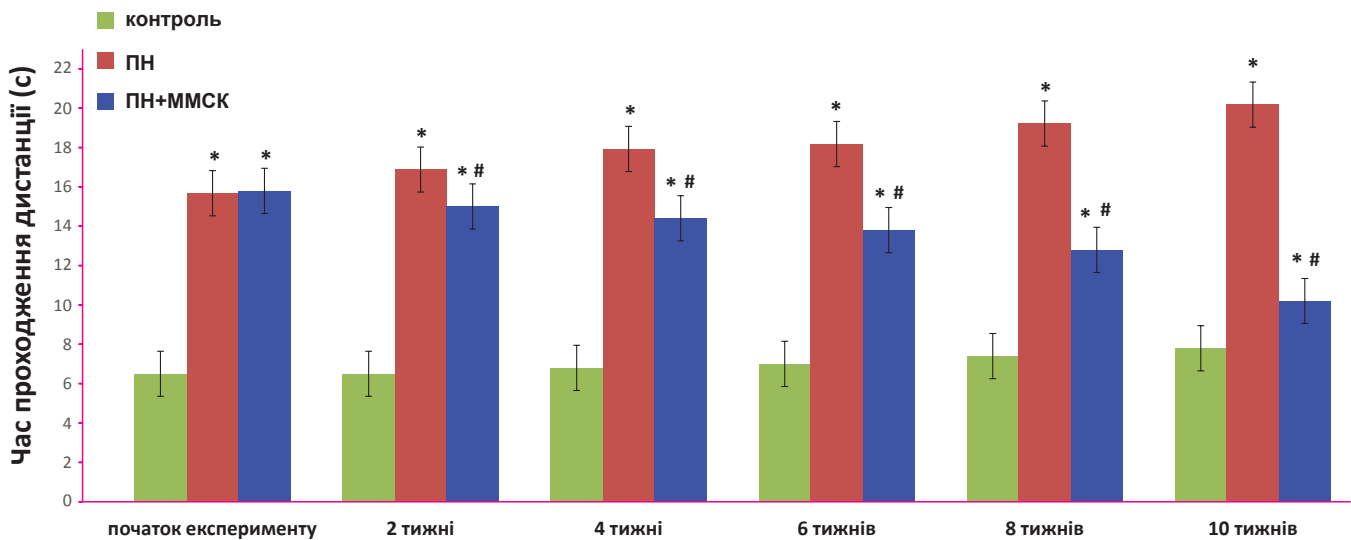


Рис. 4. Середній час проходження дистанції для мишей кожної групи: контроль – нормальні тварини лінії С57В1 (n = 6); ПН – миші лінії В6.Сg-Tg(PMP22)С3Fbas/J з периферичною нейропатією (n = 6); ПН+ММСК – миші лінії В6.Сg-Tg(PMP22)С3Fbas/J, яким трансплантували ММСК жирової тканини (n = 10). По вісі абсцис відкладений час (у тижнях) після трансплантації ММСК. Примітки: * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин «ПН».

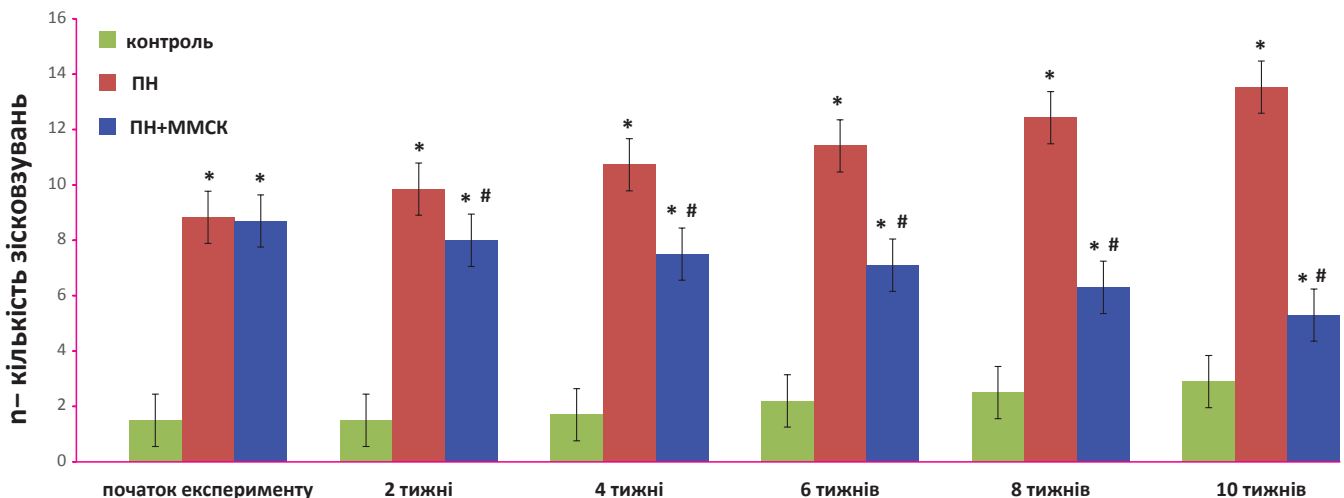


Рис. 5. Середня кількість зісковзувань задніх лап для мишей кожної групи: контроль – нормальні тварини лінії С57В1 (n = 6); ПН – миші лінії В6.Сg-Tg(PMP22)С3Fbas/J з периферичною нейропатією (n = 6); ПН+ММСК – миші лінії В6.Сg-Tg(PMP22)С3Fbas/J, яким трансплантували ММСК жирової тканини (n = 10). По вісі абсцис відкладений час (у тижнях) після трансплантації ММСК. Примітки: * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин «ПН».

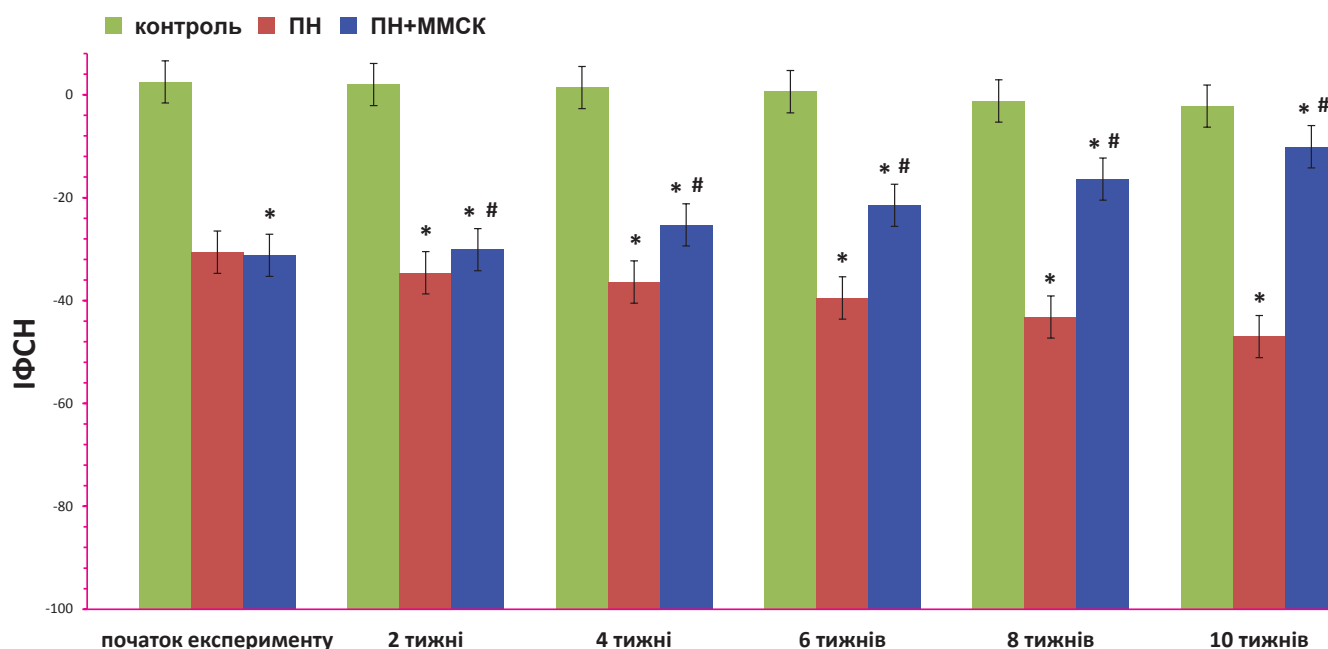


Рис. 6. Показник індексу функціональності сідничного нерва (ІФСН) для мишей кожної групи: контроль – нормальні тварини лінії C57Bl (n = 6); ПН – миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з периферичною нейропатією (n = 6); ПН+ММСК – миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, яким трансплантували ММСК жирової тканини (n = 10). По вісі абсцис відкладений час (у тижнях) після трансплантації ММСК. Примітки: * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин «ПН».

групи «ПН+ММСК» становило $-10,1 \pm 2,3$ одиниць, тоді як в групі «ПН» середнє значення показника SFI було $-47,0 \pm 2$ одиниць. Підвищення числового значення ІФСН корелювало зі зменшенням кількості зісковзувань та часу, витраченого на проходження тесту «балансування на перекладині» у тварин III групи «ПН+ММСК» (рис. 4-6). Отже, трансплантація ММСК жирової клітковини індукувала покращення індексу функціональності сідничного нерва та дрібної моторики в мишей зі спадковою периферичною нейропатією.

Відомо, що розвиток нейропатії супроводжується моторними та сенсорними порушеннями, які проявляються у вигляді прогресуючої м'язової слабкості, порушенням координації та зниженням тактильної чутливості дистальних ділянок кінцівок. Морфологічно СМТ1А проявляється у вигляді потоншення мієлінового шару нервових волокон, утворення ділянок абнормальної мієлінізації (onion bulbs), та дистрофії аксонів [1]. З прогресуванням цього захворювання відмічається порушення аксонального транспорту і трофічних функцій Шваннівських клітин, що призводить до атрофії дистальних ділянок аксонів [1, 4].

Як зазначалося вище, в основі розвитку хвороби Шарко-Мари-Тута лежить збільшення кількості алелів гена *PMP22* та, як наслідок, зростання рівня експресії білка. До інших поширених мутацій цього гена, які лежать в основі патологічної мієлінізації, належать делеція одного із його алелів, яка призводить до спадкової нейропатії зі схильністю до паралічів від стиснення (hereditary neuropathy with pressure palsy, HNPP) внаслідок недостатнього рівня експресії білка *PMP22*, а також інсерції, які викликають заміни окремих амінокислот у складі білка *PMP22*, та є причиною розвитку СМТ1А [2, 16]. Ступінь важкості протікання таких нейропатій є досить різним та залежить безпосередньо від функціональної ролі заміненої амінокислоти в складі білкової молекули [16].

У нашому дослідженні, як модель СМТ1А, були обрані трансгенні миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з трьома копіями гена *PMP22*, оскільки перебіг периферичної нейропатії у цих тварин добре корелює з перебігом СМТ1А у людини. Як терапевтичний агент нами були використані мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової клітковини. Для визначення впливу ММСК жирової клітковини на стан сідничного нерва нами був використаний тест «відбитків стопи», оскільки він дозволяє провести надійне визначення функціональності ураженого нерва.

Як було показано Bain та ін. на моделі щурів, недостатня функція сідничного нерва внаслідок травми або демієлінізації спричиняє зміни у ході в ураженій кінцівці та проявляється у зміні довжини відбитку стопи, а також розведення пальців та проміжних параметрів розведення пальців лап [17].

Численні *in vivo* та *in vitro* дослідження продемонстрували паракринну активність ММСК жирової клітковини, яка проявляється шляхом секреції широкого спектру цитокінів терапевтичного та імуномодуючого значення, таких як інтерлейкіни IL-1Ra, IL-10, IL-13, фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor, VEGF) та ціліарний нейротрофічний фактор (ciliary neurotrophic factor, CNTF) [18, 19]. Окрім того, до складу секретому ММСК входять такі фактори росту, як нейротрофічний фактор головного мозку (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) та фактор росту нервів (nerve growth factor, NGF), які мають антиапоптичний ефект та здатні сприяти росту аксонів та їх ремієлінізації [20].

Таким чином, можна припустити, що ММСК жирової клітковини потенційно можуть стати ефективним терапевтичним агентом у лікуванні периферичних нейропатій, зокрема при хворобі Шарко-Мари-Тута типу 1А.

ВИСНОВКИ

1. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини, трансплантовані мишам з периферичною нейропатією, поліпшують моторну активність у тварин за показниками тесту «балансування на перекладині».
2. Трансплантація ММСК жирової тканини покращує функцію сідничого нерва в мишей з периферичною нейропатією за показниками індексу функціональності сідничого нерва.

СПИСОК ЦИТОВАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Boutary S., Echaniz-Laguna A., Adams D., Loisel-Duwattez J., Schumacher M., Massaad C., et al. Treating PMP22 gene duplication-related Charcot-Marie-Tooth disease: the past, the present and the future. *Transl Res.* 2021. **227**. P. 100-111. DOI: 10.1016/j.trsl.2020.07.006.
2. Birouk N., Gouider R., Le Guern E., Gugenheim M., Tardieu S., Maisonobe T., et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain.* 1997. **120**, № 5. P. 813-23.
3. Lee S., Amici S., Tavori H., Zeng W. M., Freeland S., Fazio S., et al. PMP22 is critical for actin-mediated cellular functions and for establishing lipid rafts. *J Neurosci.* 2014. **34**, № 48. P. 16140-52.
4. Marinko J. T., Carter B. D., Sanders C. R. Direct relationship between increased expression and mistrafficking of the Charcot-Marie-Tooth-associated protein PMP22. *J Biol Chem.* 2020. **295**, № 34. P. 11963-70.
5. Vanoye C. G., Sakakura M., Follis R. M., Trevisan A. J., Narayan M., Li J., et al. Peripheral myelin protein 22 modulates store-operated calcium channel activity, providing insights into Charcot-Marie-Tooth disease etiology. *J Biol Chem.* 2019. **294**, № 32. P. 12054-65.
6. Morena J., Gupta A., Hoyle J. C. Charcot-Marie-Tooth: From molecules to therapy. *Int J Mol Sci.* 2019. **20**, № 14. P. 1-15.
7. Zhao H. T., Damle S., Ikeda-Lee K., Kuntz S., Li J., Mohan A., et al. PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *J Clin Invest.* 2018. **128**, № 1. P. 359-68.
8. Sociali G., Visigalli D., Prukop T., Cervellini I., Mannino E., Venturi C., et al. Tolerability and efficacy study of P2X7 inhibition in experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) neuropathy. *Neurobiol Dis.* 2016. **95**. P. 145-57. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.07.017.
9. Mazini L., Rochette L., Amine M., Malka G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *Int J Mol Sci.* 2019. **20**, № 10. P. 1-30.
10. Zhou L. N., Wang J. C., Zilundu P. L. M., Wang Y. Q., Guo W. P., Zhang S. X., et al. A comparison of the use of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther.* 2020. **11**, № 1. P. 153. DOI: 10.1186/s13287-020-01661-3.
11. Si Z., Wang X., Sun C., Kang Y., Xu J., Wang X., et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed Pharmacother.* 2019. **114**. P. 108765. doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108765.
12. Ustyenko A., Kyryk V., Lutsenko T., Tsypkov O., Butenko G. Morphofunctional properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells in vitro in ovariectomized mice of different ages. *Cell Organ Transplant.* 2019. **7**, № 2. P. 158-67. doi:10.22494/cot.v7i2.102
13. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006. **8**, № 4. P. 315-317.
14. Joseph S., Vingil S.I., Jahn O., Fledrich R., Werner H. B., Katona I., et al. Myelinating glia-specific deletion of Fbxo7 in mice triggers axonal degeneration in the central nervous system together with peripheral neuropathy. *J Neurosci.* 2019. **39**, № 28. P. 5606-26. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3094-18.2019
15. Inerra M. M., Bloch D. A., Terris D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery.* 1998. **18**, № 2. P. 119-24. DOI: 10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:2<119::aid-micr10>3.0.co;2-0.
16. Xiaoxuan L., Xiaohui D., Yingshuang Z., Dongsheng F. Clinical and genetic diversity of PMP22 mutations in a large cohort of Chinese patients with Charcot-Marie-Tooth disease. *Front Neurol.* 2020. **11**. P. 630. DOI: 10.3389/fneur.2020.00630.
17. Bain J. R., Mackinnon S. E., Hunter D. A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1989. **83**, № 1. P. 129-38. DOI: 10.1097/00006534-198901000-00024.
18. Xing X., Han S., Cheng G., Ni Y., Li Z., Li Z. Proteomic analysis of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells: a novel therapeutic strategy for tissue injury. *Biomed Res Int.* 2020. **2020**. P. 6094562. DOI: 10.1155/2020/6094562.
19. Redondo-Castro E., Cunningham C., Miller J., Martuscelli L., Aoulad-Ali S., Rothwell N. J., et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2017. **8**, № 1. P. 79. DOI: 10.1186/s13287-017-0531-4.
20. Harrell C., Fellbaum C., Jovicic N., Djonov V., Arsenijevic N., Volarevic V. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome. *Cells.* 2019. **8**, № 5. P. 467.



СТАТТЯ НА САЙТІ
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори заявили про відсутність потенційного конфлікту інтересів щодо дослідження, авторства та/або публікації даної статті.