

А.-М.В. Ерофеева

АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФОНЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2-ГО ТИПА В МОДЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Научный руководитель: канд. мед. наук С.Н. Рябцева

Лаборатория биологического моделирования

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск

A.-M. V. Yerofeyeva

ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS AFTER PHARMACOLOGICAL BLOCKAGE OF TYPE 2 CANNABINOID RECEPTORS IN PERIPHERAL NEUROPATHY MODEL

Tutor: PhD S.N. Rjabceva

Laboratory of biological modeling

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

Резюме. В работе показано влияние блокады каннабиноидных рецепторов CB₂ селективным антагонистом AM630 на восстановление ноцицептивной чувствительности крыс после локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в область травматического повреждения седалищного нерва.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, нейропатическая, каннабиноидные рецепторы.

Resume. The study shows the effect of blockade of cannabinoid CB₂ receptors by a selective AM630 antagonist on the restoration of nociceptive sensitivity in rats after local transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells into the area of sciatic nerve injury.

Keywords: mesenchymal stem cells, neuropathic pain, cannabinoid receptors.

Актуальность. Периферическая нейропатическая боль затрагивает 7-20 % взрослого населения планеты, и ежегодно количество таких пациентов растёт [2]. Сложность патогенеза, а также широкая вариабельность этиологических факторов, вызывающих нейропатический болевой синдром затрудняет подбор эффективного способа лечения. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ) способны купировать болевой синдром при периферической нейропатии (НП), в большей степени при их локальном введении [4]. Одним из вероятных механизмов анальгетического действия МСК ЖТ является взаимодействие с компонентами эндоканнабиноидной системы, преимущественно через каннабиноидные рецепторы 2-го типа (CB₂) [5]. Экспериментальное изучение эффектов блокады CB₂-рецепторов позволит определить роль и степень участия данного рецептора в развитии анальгетического и других эффектов МСК ЖТ при локальной трансплантации в область повреждения периферического нерва.

Цель: исследовать влияние фармакологической блокады CB₂-рецепторов на антиноцицептивный эффект МСК ЖТ при их локальной трансплантации в область травматического повреждения седалищного нерва крыс.

Задачи:

1. Изучить влияние фармакологической блокады СВ₂-рецепторов селективным антагонистом АМ630 в мягких тканях области повреждения седалищного нерва крыс на ноцицептивные реакции на механический и термический стимулы при локальной трансплантации МСК ЖТ.

2. Изучить влияние фармакологической блокады СВ₂-рецепторов селективным антагонистом АМ630 на мембранах МСК ЖТ на ноцицептивные реакции крыс на механический и термический стимулы после локальной трансплантации.

3. Сравнить антиноцицептивный эффект МСК ЖТ на фоне фармакологической блокады СВ₂-рецепторов и без неё.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены на 48 крысах самцах Wistar массы 200±20 г. Периферическую нейропатию (НП) моделировали методом аксотомии седалищного нерва [3]. В исследовании включены группы: крысы с НП без лечения (n=10); крысы с НП + локальное введение МСК ЖТ (n=10); крысы с НП + локальное введение антагониста СВ₂ рецепторов АМ630 + локальное введение МСК ЖТ (n=10); крысы с НП + локальное введение МСК ЖТ, предварительно инкубированных с АМ630 (2µМ, 24ч) (n=10); крысы с ложной операцией (n=8). МСК ЖТ предварительно выделяли и культивировали в стандартных условиях до 3-го пассажа [1]. Трансплантацию МСК ЖТ осуществляли на 7-е сутки после моделирования НП в дозе 1 млн клеток/кг внутримышечно в место перерезки седалищного нерва. Доза локального введения антагониста АМ630 была 100 мкг/кг. Оценку антиноцицептивного действия МСК ЖТ проводили с использованием неинвазивных тестов. Тест Рэндалла-Селитто применяли для определения порога ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул, тест «Горячая пластина» – для определения латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) на термический стимул. Длительность исследования составила 90 суток. Измерения проводили еженедельно в течении 28 суток, а также на 60 и 90-е сутки. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси. Значимость различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа повторных измерений (repeated-measures ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями. Различия считали как статистически значимые при p<0,05.

Результаты и их обсуждение. В модели НП без лечения на 7-е сутки исследования наблюдали снижение показателей ПНР ипсилатеральной конечности на 35,5% (с 136,0±1,9 г до 87,7±2,0 г) и ЛПНР на 34,3% (с 18,1±0,6 с до 11,9±0,4 с) относительно исходных значений (p<0,001). Пик развития механической и термической гипералгезии отмечен на 21-е сутки исследования, где показатель ПНР снизился до 84,3±2,4 г (p<0,001 по сравнению с 0-ми сутками), а ЛПНР – до 10,5±0,3 с (p<0,001 по сравнению с 0-ми сутками). По 90-е сутки включительно не отмечено тенденции к восстановлению исходной ноцицептивной чувствительности на механический и термический стимулы. При этом не наблюдали статистически значимых изменений ПНР контралатеральной конечности у крыс с НП без лечения (p>0,05 по сравнению с 0-ми сутками). У ложнооперированных крыс также не отмечены статистически значимые изменения показателей ноцицептивной чувствительности на протяжении всего периода исследования (p>0,05 по сравнению с 0-ми сутками).

Однократное внутримышечное введение исследуемой дозы МСК ЖТ на 7-е сутки после моделирования НП приводило к увеличению ПНР ипсилатеральной конечности к 14-ым суткам исследования на 32,3% (с $85,4 \pm 2,0$ г до $113,0 \pm 1,9$ г по сравнению с 7-ми сутками ($p < 0,001$), что на 26,2% выше значений относительно группы с НП без лечения ($p < 0,001$) (рис.1а), ЛПНР – на 17,1 % (с $11,7 \pm 0,5$ с до $13,7 \pm 0,5$ с, $p < 0,001$ к 7-м суткам), что на 20,2% выше значений относительно группы с НП без лечения ($p < 0,001$) (рис.1б). К 21-м суткам исследования ПНР ипсилатеральной конечности в данной группе увеличился до $129,4 \pm 2,0$ г, что на 51,5% выше значений на 7-е сутки ($p < 0,001$ к 7-м суткам, $p > 0,05$ к исходным значениям) и на 53,5% выше по сравнению с группой животных с НП без лечения ($p < 0,001$) (рис.1а). К 21-м суткам ЛПНР увеличился до $16,2 \pm 0,5$ с, на 38,5% относительно значений на 7-е сутки ($p < 0,001$ к 7-м суткам, $p > 0,05$ к с исходным значениям) и на 54,3% сравнению с группой животных с НП без лечения ($p < 0,001$) (рис.1б). Далее по 90-е сутки включительно ПНР и ЛПНР не отличались статистически значимо от исходных значений ($p > 0,05$) (рисунок 1а, б).

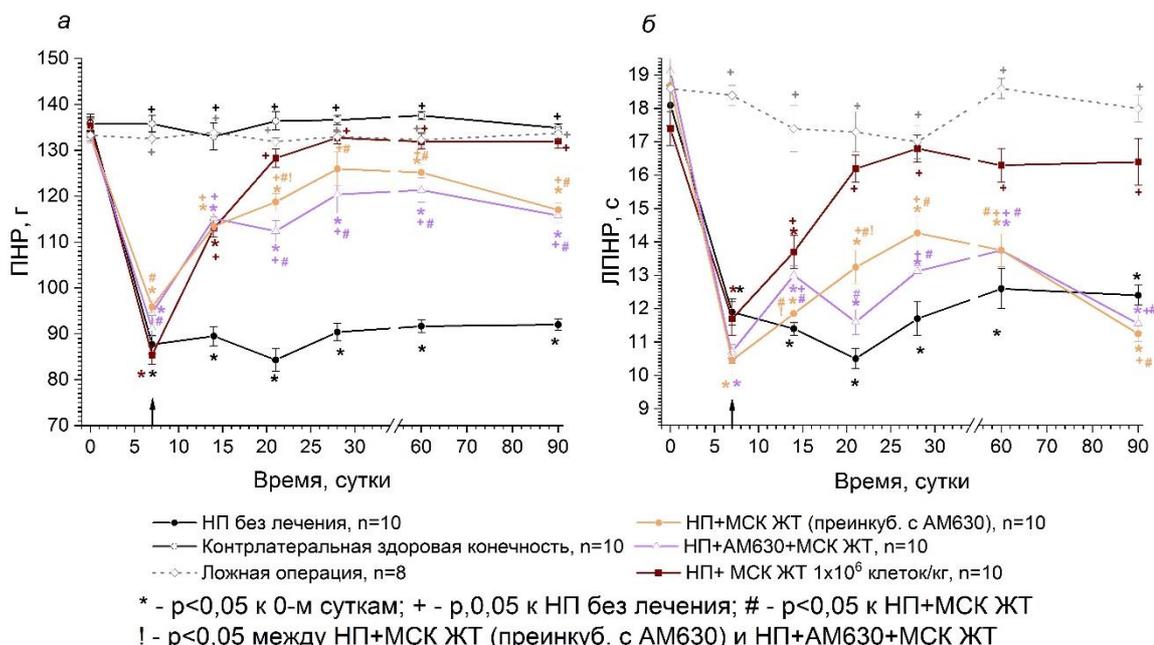


Рис. 1 – Изменения порога ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул (а) и латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) на термический стимул (б) у крыс с периферической нейропатией (НП) при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) в область травмы седалищного нерва на фоне фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов 2-го типа (CB₂)

Фармакологическая блокада CB₂ рецепторов тканей в зоне перерезки седалищного нерва на 7-е сутки после моделирования НП не приводила к статистически значимым изменениям ПНР ипсилатеральной конечности, а также ЛПНР (рис.1а, б). Локальная трансплантация исследуемой дозы МСК ЖТ после блокады CB₂-рецепторов приводила к увеличению ПНР на 14-е сутки эксперимента на 21,9% относительно значений на 7-е сутки (с $94,5 \pm 2,1$ г до $115,2 \pm 2,6$ г, $p < 0,001$; $p > 0,05$ по сравнению с группой НП+МСК ЖТ) (рис.1а), что на 18,7% выше относительно группы НП без лечения ($p < 0,001$) и на 13,5% меньше исходных

значений ($p < 0,001$). Показатель ЛПНР увеличился на 21,5% относительно значений на 7-е сутки ($с\ 10,7 \pm 0,3$ с до $13,0 \pm 0,3$ с, ($p < 0,001$; $p > 0,05$ к группе НП+МСК ЖТ), что на 31,9% меньше исходных значений ($p < 0,001$), и на 14,0% выше значений относительно группы НП без лечения ($p < 0,05$) (рис.1б). К 21-м суткам и далее не отмечено тенденции к восстановлению ПНР ипсилатеральной конечности (рис.1а), при этом среднегрупповые значения данного показателя были ниже на 13,1% относительно крыс с НП+МСК ЖТ ($p < 0,001$) и выше на 33,3% относительно крыс с НП без лечения ($p < 0,001$). Показатель ЛПНР на 21-е сутки исследования составлял $11,6 \pm 0,4$ с ($p > 0,05$ к НП без лечения), что на 28,4% ниже значений относительно группы НП+МСК ЖТ (рис.1б). К 28-м суткам отмечено увеличение ПНР ипсилатеральной конечности до $120,4 \pm 4,1$ г, что на 9,3% было ниже значений относительно группы НП+МСК ЖТ ($p < 0,001$) и на 33,2% выше значений относительно животных с НП без лечения ($p < 0,001$) (рис.1а). В дальнейшем по 90-е сутки включительно наблюдали тенденцию к снижению ПНР. В отношении ЛПНР, на 28-е сутки эксперимента отмечено его увеличение до $13,1 \pm 0,2$ с, что на 12,0% больше значений группы НП без лечения ($p < 0,001$) и на 22,0% ниже значений относительно группы НП+МСК ЖТ ($p < 0,001$). К 90-м суткам исследования наблюдали выраженное снижение ЛПНР до $11,5 \pm 0,3$ с, что на 29,9 % ниже значений группы крыс с НП+МСК ЖТ ($p < 0,001$) и вместе с тем не отличался статистически значимо от группы НП без лечения ($p > 0,05$) (рис.1б).

Трансплантация МСК ЖТ, преинкубированных с АМ630, приводила к увеличению ПНР ипсилатеральной конечности на 14-е сутки исследования на 18,3% относительно значений на 7-е сутки ($с\ 95,9 \pm 1,4$ г до $113,4 \pm 2,0$ г, $p < 0,001$), при этом показатель не отличался от значений в группе НП+МСК ЖТ ($p > 0,05$), и от группы НП+АМ630+МСК ЖТ ($p > 0,05$). Вместе с тем, ЛПНР увеличился на 13,3 % относительно значений на 7-е сутки ($с\ 10,5 \pm 0,4$ с до $11,9 \pm 0,3$ с, $p < 0,001$), что на 13,1% ниже значений группы НП+МСК ЖТ и не отличалось статистически значимо от группы с НП без лечения ($p > 0,05$). На 21-е сутки исследования оба показателя в данной группе были статистически значимо ниже таковых у крыс, получивших только МСК ЖТ на 8,3% ($p < 0,05$) и 18,5% ($p < 0,001$) соответственно. Вместе с тем, ПНР ипсилатеральной конечности и ЛПНР были выше относительно группы НП+АМ630+МСК ЖТ на 5,6 % и 13,8 % соответственно ($p < 0,05$).

К 28-м суткам исследования отмечали увеличение ПНР ипсилатеральной конечности до $126,0 \pm 3,7$ г, что на 5,0% было ниже значений группы НП+МСК ЖТ ($p < 0,05$) и на 39,4% выше значений группы НП без лечения ($p < 0,001$). К 90-м суткам наблюдали снижение ПНР до $117,0 \pm 1,5$ г ($p < 0,001$ к исходным значениям). Показатель ЛПНР в данной группе к 28-м суткам исследования увеличился до $14,3 \pm 0,5$ с, что на 22,2% выше значений относительно группы НП без лечения ($p < 0,001$) и на 14,9% ниже, чем в группе НП+МСК ЖТ ($p < 0,001$). В дальнейшем наблюдали прогрессирующее снижение ЛПНР, к 90-м суткам показатель снизился до $11,3 \pm 0,2$ с ($p > 0,05$ к НП без лечения).

По сравнению с фармакологической блокадой СВ₂-рецепторов в мягких тканях, после трансплантации преинкубированных с АМ1241 МСК ЖТ наблюдали повышение ПНР на 21-е сутки исследования на 5,6 % ($p < 0,05$), а также снижение ЛПНР на 14-е сутки на 8,5% ($p < 0,05$) с последующим повышением на 21-е сутки

исследования на 13,8% ($p < 0,02$). На более поздних сроках исследования не обнаружено статистически значимых различий исследуемых показателей между группами с фармакологической стимуляцией СВ₂-рецепторов.

Выводы: полученные данные свидетельствуют о том, что фармакологическая блокада СВ₂-рецепторов как на мембранах мезенхимальных стволовых клеток, так и в мягких тканях, окружающих место повреждения седалищного нерва в эксперименте, оказывает негативное влияние на развитие антиноцицептивного действия МСК ЖТ при их трансплантации в область перерезки седалищного нерва крыс. Блокада СВ₂-рецепторов в мягких тканях перед локальным введением МСК ЖТ по сравнению с преинкубированными с антагонистом МСК ЖТ приводит к более выраженному ослаблению анальгетического эффекта МСК ЖТ в краткосрочном периоде, но в одинаковой степени приводит к его нивелированию в долгосрочном периоде.

Литература

1. Морфофункциональное состояние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс в условиях подавления окислительного стресса / И. Б. Василевич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси Сер. біял. навук. - 2014. - № 2. - С. 82-88.
2. Finnerup N.B., Kuner R., Jensen T.S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment // *Physiological Reviews*. – 2021. – Vol. 101. – № 1. – P. 259-301.
3. Huh Y., Ji R.R., Chen G. Neuroinflammation, bone marrow stem cells, and chronic pain // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – № 1014. – P. 1-9.
4. Jaggi A.S., Jain V., Singh N. Animal models of neuropathic pain // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 25. – Iss. 1. – P. 1-28.
5. Up-regulation of immunomodulatory effects of mouse bone-marrow derived mesenchymal stem cells by tetrahydrocannabinol pre-treatment involving cannabinoid receptor CB2 / J. Xie [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 6436-6447.