ISBN 978-985-21-1397-7
УДК 61:615.1(06)
ББК 52.82
И 66

А.-М.В. Ерофеева

ПАРАМЕТРЫ ПОХОДКИ КРЫС С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ ПРИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ МОДУЛЯЦИИ CB1 И CB2 КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Научный руководитель: канд. мед. наук С.Н. Рябцева
Лаборатория биологического моделирования
Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск

A.-M.V. Yerofeyeva

GAIT PARAMETERS IN RATS WITH PERIPHERAL NEUROPATHY UPON PHARMACOLOGICAL MODULATION OF CB1 AND CB2 CANNABINOID RECEPTORS AND MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION

Tutor: PhD S.N. Rjabceva
Laboratory of biological modeling
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

Резюме. Установлено, что активация каннабиноидных рецепторов CB_1 и CB_2 мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани способствует развитию их элиминирующего эффекта на нарушения походки у крыс с периферической нейропатией, индуцированной травматическим повреждением седалищного нерва.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, нейропатическая боль, каннабиноидные рецепторы, параметры походки

Resume. It was found that activation of CB_1 and CB_2 cannabinoid receptors of adipose-derived mesenchymal stem cells contributes to their eliminating effect on gait disturbances in rats with peripheral neuropathy induced by sciatic nerve injury.

Keywords: mesenchymal stem cells, neuropathic pain, cannabinoid receptors, gait parameters

Актуальность. Понятие «периферическая нейропатия (НП)» включает совокупность состояний, индуцированных повреждением структурных компонентов периферической нервной системы, которые характеризуются комплексом нарушений ноцицептивной, тактильной, температурной и проприоцептивной чувствительности, а также двигательной активности в иннервируемой пораженным нервом области и за ее пределами [1]. Частота встречаемости НП достигает 17-20%, и в настоящее время наблюдается тенденция к росту заболеваемости [2]. Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК ЖТ) представляются эффективным подходом к терапии НП, их эффективность показана в ряде экспериментальных исследований [4]. Вызываемые МСК ЖТ эффекты могут быть обусловлены вовлечением эндоканнабиноидной системы организма в месте трансплантации, а также собственно стволовых клеток, о чем свидетельствуют результаты недавних исследований [5,6]. Следовательно, изучение эффектов фармакологической активации и блокады каннабиноидных рецепторов CB_1 и CB_2 в экспериментальном исследовании *in vivo* и их роли в развитии эффектов МСК является актуальным направлением.

ISBN 978-985-21-1397-7
УДК 61:615.1(06)
ББК 52.82
И 66

Цель: исследовать влияние фармакологической активации и блокады CB_1- и CB_2-рецепторов на изменения параметров походки крыс после трансплантации МСК ЖТ в область травматического повреждения седалищного нерва.

Задачи:

1. Исследовать влияние фармакологической активации/блокады периферических CB_1-рецепторов на изменения параметров походки крыс после трансплантации МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва.

2. Исследовать влияние фармакологической активации/блокады периферических CB2-рецепторов на изменения параметров походки крыс после трансплантации МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва.

3. Исследовать влияние фармакологической активации/блокады CB1-рецепторов на мембранах МСК ЖТ на изменения параметров походки крыс после трансплантации МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва.

4. Исследовать влияние фармакологической активации/блокады CB2-рецепторов на мембранах МСК ЖТ на изменения параметров походки крыс после трансплантации МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования выполнены на 100 крысах-самцах линии Wistar с исходной массой 180-200 г. Модель НП выполняли путем иссечения участка левого седалищного нерва согласно методу, предложенному A.S. Jaggi et al. [3]. На 7-е сутки после операции в область повреждения седалищного нерва вводили МСК ЖТ в дозе 1 млн клеток/кг аллогенного происхождения: 1) без дополнительных воздействий; 2) на фоне фармакологической стимуляции периферических CB_1-рецепторов агонистом анандамидом (AEA, 100 мкг/кг, в/м) либо блокады антагонистом AM251 (100 мкг/животное, в/м); 3) на фоне фармакологической стимуляции периферических CB_2-рецепторов агонистом AM1241 (1 мг/кг, в/м) либо блокады антагонистом AM630 (100 мкг/кг, в/м); 4) МСК ЖТ, предварительно инкубированные с AEA, AM251, AM1241 либо AM630. Для сравнения исследовали крыс с НП без лечения. На 0, 7, 14, 21, 28, 60 и 90-е сутки эксперимента у крыс регистрировали походку на аппаратно-программном комплексе CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия). Данный комплекс позволяет на основании непринужденной ходьбы животного провести качественный и количественный анализ походки. Видеозапись ходьбы крысы внутри подсвечиваемого коридора в дальнейшем подвергается обработке в программном обеспечении установки, где происходит классификация отпечатков лап, а также визуализация параметров походки. На основании полученных данных можно оценить степень болевых ощущений, а также выявить нарушения двигательной активности и координации экспериментальных животных (рис. 1).

ISBN 978-985-21-1397-7
УДК 61:615.1(06)
ББК 52.82
И 66

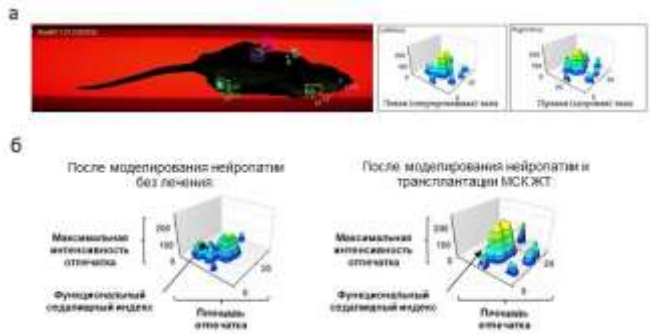

Рис. 1 – Анализ походки крысы на аппаратно-программном комплексе CatWalk XT: а – классификация отпечатков лап на видеозаписи пробежки крысы; б – 3D-визуализация отпечатка левой задней лапы крыс с периферической нейропатией

В данном исследовании в анализ включили площадь отпечатка и максимальную интенсивность отпечатка, которые отражают степень хронической боли, а также функциональный седалищный индекс (ФСИ), косвенно отражающий функциональную активность седалищного нерва. Для исключения артефактов, для каждого параметра рассчитывали отношение значений левой (оперированной) конечности к правой здоровой лапе, кроме ФСИ. Полученные данные сравнивали методом дисперсионного анализа повторных измерений с последующими апостериорными сравнениями. Вывод о статистической значимости делали при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Перерезка седалищного нерва у крыс без лечения приводила к выраженному снижению ФСИ на 7-е сутки исследования с -7,65±0,30 ед. до -24,99±2,45 ед. ($p<0,001$ по сравнению с 0-ми сутками). С 28-х суток и далее у крыс данной группы наблюдали нарушения площади и максимальной интенсивности отпечатка травмированной лапы. Площадь отпечатка ипсилатеральной конечности снизилась с 106,7±4,7% до 84,5±5,2% ($p<0,001$ по сравнению с 0-ми сутками). Максимальная интенсивность отпечатка снизилась с 109,6±2,1% до 91,5±5,0% ($p<0,001$ по сравнению с 0-ми сутками). По 90-е сутки эксперимента восстановления исследуемых параметров походки не отмечено.

После трансплантации МСК ЖТ без дополнительных воздействий наблюдали восстановление ФСИ до исходного уровня на 14-е сутки эксперимента (с -27,5±3,7 ед. до -7,8±1,6 ед., $p>0,05$ по сравнению с 0-ми сутками, $p<0,001$ по сравнению с крысами с НП без лечения). В данной группе статистически значимые изменения площади и максимальной интенсивности отпечатка травмированной лапы по сравнению с 0-ми сутками не выявлены.

Фармакологическая модуляция периферических CB_1-рецепторов как агонистом АЕА, так антагонистом АМ251 с последующей трансплантацией МСК ЖТ в область повреждения седалищного нерва приводили к восстановлению ФСИ до исходного уровня к 14-м суткам после операции. На протяжении исследования не наблюдали значимых изменений площади и максимальной интенсивности отпечатка травмированной лапы. Статистически значимых различий всех исследуемых параметрах походки данной экспериментальной группы по сравнению с крысами, которым вводили только МСК ЖТ, не установлено.

ISBN 978-985-21-1397-7
УДК 61:615.1(06)
ББК 52.82
И 66

Трансплантация преинкубированных с АЕА МСК ЖТ крысам с НП также приводила к восстановлению ФСИ, росту площади и максимальной интенсивности отпечатка к 14-м суткам после операции. При этом достоверных различий исследуемых параметров походки по сравнению с группой крыс, получивших только МСК ЖТ, не выявлено. Вместе с тем, после трансплантации преинкубированных с АМ251 МСК ЖТ крысам с НП на 21-е сутки эксперимента наблюдали тенденцию к снижению ФСИ ($p<0,02$ по сравнению с 0-ми сутками; $p<0,001$ по сравнению с животными с НП без лечения и $p<0,005$ по сравнению с группой крыс после трансплантации только МСК ЖТ). С 28-х по 90-е сутки показатель ФСИ не отличался статистически значимо от животных без лечения. С 28-х суток эксперимента отмечали снижение площади отпечатка ипсилатеральной лапы по сравнению с группой крыс, которым вводили только МСК ЖТ ($p<0,02$). При этом данный параметр не отличался статистически значимо от животных без лечения на протяжении исследования. Максимальная интенсивность отпечатка травмированной лапы не менялась статистически значимо как по сравнению с 0-ми сутками, так по сравнению с группой крыс с трансплантацией только МСК ЖТ.

После трансплантации МСК ЖТ на фоне активации периферических CB_2-рецепторов агонистом АМ1241 наблюдали восстановление ФСИ к 14-м суткам эксперимента (с -26,1±2,3 до -8,25±0,44; $p>0,05$ к 0-м суткам; $p<0,001$ к группе животных с НП без лечения). Статистически значимых изменений площади отпечатка травмированной лапы и максимальной интенсивности параметров походки по сравнению с 0-ми сутками ($p>0,05$), а также по сравнению с группой крыс с трансплантацией только МСК ЖТ ($p>0,05$) не выявлено.

Фармакологическая блокада периферических CB_2-рецепторов антагонистом АМ630 перед трансплантацией МСК ЖТ приводила к торможению восстановления ФСИ. На это указывало частичное восстановление ФСИ к 14-м суткам исследования (до -16,75±1,74 ед., $p<0,002$ к 0-м суткам, $p<0,05$ к крысам с НП без лечения) с последующим снижением данного показателя на 21-е сутки до уровня нелеченых животных (до -26,69±3,05 ед., $p>0,05$ к крысам с НП без лечения). Далее по 90-е сутки включительно параметр ФСИ не отличался статистически значимо от группы животных без лечения. ПО сравнению с группой крыс, которым вводили только МСК ЖТ, отмечено снижение ФСИ с 14-х суток исследования ($p<0,001$). В данной группе выявлено снижение площади отпечатка ипсилатеральной конечности с 21-х суток исследования (с 105,4±1,9 % до 90,2±4,5%, $p<0,002$ к 0-м суткам). По сравнению с нелеченными животными, на 21-е сутки исследования наблюдали снижение максимальной интенсивности отпечатка травмированной лапы (с 110,5±2,1% до 102,5±4,9%; $p<0,001$). Относительно группы животных с НП после трансплантации только МСК ЖТ отмечено снижение площади отпечатка ипсилатеральной конечности с 21-х суток исследования ($p<0,05$).

Трансплантация преинкубированных с АМ1241 МСК ЖТ приводила к повышению ФСИ к 14-м суткам (с -23,0±0,6 ед. до -8,61±0,47 ед., $p>0,05$ к 0-м суткам, $p<0,001$ к группе крыс с НП без лечения). По сравнению с 0-ми сутки отсутствовали наруше-

ISBN 978-985-21-1397-7
УДК 61:615.1(06)
ББК 52.82
И 66

ния статических параметров походки на всем протяжении исследования. По сравнению с группой животных после трансплантации только МСК ЖТ не отмечено достоверных различий анализируемых параметров походки.

Введение преинкубированных с AM630 МСК ЖТ приводило к восстановлению ФСИ лишь к 21-м суткам исследования (до -9,16±1,12, $p>0,05$ к 0-м суткам, $p<0,001$ к крысам с НП без лечения). По сравнению с группой животных после трансплантации только МСК ЖТ ФСИ снизился на 14-е сутки исследования на 76,4% ($p<0,005$), в дальнейшем статистически значимых различий между данными группами не обнаружено. Вместе с тем, в данной группе не отмечено статистически значимых изменений площади и максимальной интенсивности отпечатка травмированной лапы относительно группы крыс, получивших только МСК ЖТ.

Выводы:

1. Фармакологическая модуляция периферических CB_1-рецепторов в области повреждения нерва не оказывает значимого влияния на способность МСК ЖТ устранять нарушения походки, обусловленные повреждением седалищного нерва у крыс.

2. Активация периферических CB_2-рецепторов в области повреждения седалищного нерва не влияет на способность МСК ЖТ устранять нарушения походки, однако блокада данных рецепторов приводит к торможению восстановления функциональной активности седалищного нерва крыс и связанных с нейропатией нарушений походки.

3.Стимуляция CB_1-рецепторов на мембранах МСК ЖТ при предварительном инкубировании не усиливает и не ослабляет эффект МСК ЖТ, выраженный в отмене нарушений походки экспериментальных животных. Инактивация CB_1-рецепторов на мембранах МСК ЖТ негативно влияет на способность МСК ЖТ устранять долгосрочные нарушения походки, связанные с хронической нейропатией.

4. Активация CB_2-рецепторов на мембранах МСК ЖТ не оказывает существенного влияния на эффективность МСК ЖТ в отношении восстановления нарушений походки крыс. В свою очередь, блокада CB_2-рецепторов на мембранах МСК ЖТ приводит к постепенному ослаблению эффектов МСК и тормозит восстановление функциональной активности седалищного нерва.

Литература

1. Корячкин, В.А. Нейропатическая боль / В. А. Корячкин, А. П. Спасова, В. В. Хиновкер // Инновационная медицина Кубани. – 2021. – № 2. – С. 58-64.

2. Bouhassira, D. Neuropathic pain: Definition, assessment, and epidemiology / D. Bouhassira // Revue Neurologique (Paris). – 2019. – Vol. 175. – № 1–2. – P. 16–25.

3. Jaggi, A.S. Animal models of neuropathic pain / A.S. Jaggi, V. Jain, N. Singh // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2011. – Vol. 25, № 1. – P. 1–28.

4. Joshi, H.P. Stem cell therapy for modulating neuroinflammation in neuropathic pain / H.P. Joshi [et al.] // International Journal of Molecular Science – 2021. – Vol. 22. – № 4853. – P. 1–19.

5. Ruhl, T. The endocannabinoid receptors CB1 and CB2 affect the regenerative potential of adipose tissue MSCs / T. Ruhl [et al.] // Experimental Cell Research. – 2020. – Vol. 389. – № 111881. – P. 1–9.

6. Xie, J. 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.