

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.3.45>

Изменения параметров походки крыс с периферической нейропатической болью при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток и фармакологической блокаде каннабиноидных рецепторов II типа

А.-М.В. Ерофеева

Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2023. – Том 22, №3. – С. 45-54.

Changes in gait parameters of rats with peripheral neuropathic pain in mesenchymal stem cell transplantation and pharmacological blockade of cannabinoid receptors of type 2

A.-M.V. Yerofeyeva

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

Vestnik VGMU. 2023;22(3):45-54.

Резюме.

Цель – оценить эффект фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов CB₂ на параметры походки экспериментальных животных при моделировании периферической нейропатической боли и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ).

Материал и методы. У 40 крыс-самцов Wistar осуществили моделирование периферической нейропатии (НП) путем иссечения участка седалищного нерва левой задней лапы. На 7-е сутки исследования проведена трансплантация МСК ЖТ (1×10^6 клеток/кг массы тела крысы) в область повреждения седалищного нерва без дополнительных воздействий и после введения антагониста CB₂ рецептора AM630 (100 мкг/кг массы тела крысы), а также трансплантация преинкубированных с AM630 МСК ЖТ. В течение 90 суток исследовали параметры походки экспериментальных животных с помощью системы детального анализа походки CatWalk XT (Noldus, Нидерланды). Результаты. Трансплантация МСК ЖТ в область перерезки седалищного нерва крыс ускоряла восстановление динамических параметров походки и отменяла развитие нарушений статических параметров походки. Введение AM630 в область перерезки седалищного нерва перед трансплантацией МСК ЖТ способствовало развитию нарушений параметров походки (длительности фазы опоры травмированной лапы, рабочего цикла лапы, площади отпечатка лапы, максимальной и средней интенсивности отпечатка лапы, функционального седалищного индекса). Трансплантация МСК, инкубированных с AM630, не оказывала существенного влияния на скорость восстановления статических и динамических параметров походки, но приводила к более позднему восстановлению функционального седалищного индекса.

Заключение. Сохранение нарушений походки экспериментальных животных после блокады CB₂-рецепторов как на мембранах МСК, так и в зоне повреждения периферического нерва, указывает на подавление антиноцицептивного и репаративного действия МСК. CB₂-рецепторы в мягких тканях области повреждения нерва в большей степени участвуют и влияют на реализацию данных эффектов стволовых клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, нейропатическая боль, седалищный нерв, каннабиноидные рецепторы, анализ походки, catwalk.

Abstract.

Objectives. To evaluate the effect of pharmacological blockade of cannabinoid CB₂ receptors on the gait parameters of experimental animals with peripheral neuropathic pain and transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs).

Material and methods. In 40 male Wistar rats, modelling of peripheral neuropathy (NP) was performed by excising a section of the sciatic nerve of the left hind paw. On the 7th day of the study, the transplantation of ADMSCs (1×10^6 cells/kg of rat body weight) into the area of sciatic nerve injury was done without any additional interventions and after administration of the CB₂ receptor antagonist AM630 (100 µg/kg of rat body weight), as well as the transplantation of ADMSCs pretreated with AM630. For 90 days, the gait parameters of experimental animals were being studied using the CatWalk XT detailed gait analysis system (Noldus, Netherlands).

Results. Transplantation of ADMSCs into the area of rat's sciatic nerve transection accelerated the recovery of the dynamic gait parameters and abolished the development of disturbances in the static gait parameters. The administration of AM630 into the area of sciatic nerve transection before the transplantation of ADMSCs contributed to the development of gait disturbances (stand duration of the injured hind paw, duty cycle of the injured hind paw, paw print area, maximum and mean paw print intensity, functional sciatic index) and was accompanied by a pronounced lesion of distal segment of the sciatic nerve with an increase in the level of proliferation of Schwann cells. Transplantation of ADMSCs pretreated with AM630 had no significant effect on the rate of recovery of static and dynamic gait parameters, but led to a later recovery of the functional sciatic index.

Conclusions. Persistence of gait disturbances in experimental animals after CB₂ receptors blockade both on MSC's membranes and in the area of peripheral nerve damage indicates suppression of the antinociceptive and reparative action of MSCs. CB₂ receptors in the soft tissues of the area of nerve damage are more involved and influence the implementation of these effects of stem cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, neuropathic pain, sciatic nerve, cannabinoid receptors, gait analysis, catwalk.

Введение

Хроническая периферическая нейропатическая боль представляет собой группу болевых синдромов, связанных с повреждением или дисфункцией периферических звеньев соматосенсорной нервной системы [1]. По разным оценкам, нейропатическая боль охватывает 7-20% жителей Европы [2] и 30-50% населения планеты [3]. Применяемые в настоящее время фармакологические методы лечения нейропатической боли эффективны [4], но действуют лишь временно, ввиду чего необходима разработка новых способов и подходов к улучшению качества жизни данной категории пациентов. Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для терапии повреждений периферических нервов представляется перспективным, их антиноцицептивный эффект при локальной трансплантации показан в различных экспериментальных моделях [5-8]. Способность МСК устранять вызванные повреждением седалищного нерва нарушения двигательной активности также продемонстрирована в недавних исследованиях [7-8]. Вместе с тем, механизмы данных эффектов не до конца ясны. Каннабиноидные рецепторы II типа (CB₂) участвуют в опосредовании терапевтических эффектов МСК, что было показано в исследованиях *in vitro* [9-11]. Исследование влияния блокады

данных рецепторов на эффективность МСК в отношении восстановления параметров походки экспериментальных животных с периферической нейропатией позволит углубить понимание роли CB₂-рецепторов в реализации эффектов, вызываемых МСК при локальном введении в область повреждения нерва.

Цель данной работы – оценить эффект фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов CB₂ на параметры походки экспериментальных животных при моделировании периферической нейропатической боли и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ).

Материал и методы

Исследование проведено на 40 половозрелых крысах-самцах Wistar с исходной массой 180-200 г. Животных содержали в виварии Института физиологии НАН Беларуси со свободным доступом к воде и пище и циклом день/ночь 12/12 ч. Методом рандомизации животных разделили на следующие группы:

1) крысы с моделью периферической нейропатии без лечения – группа НП без лечения (n=10);

2) крысы с моделью НП и трансплантацией аллогенных МСК ЖТ в область повреждения се-

далищного нерва – группа НП+МСК ЖТ (n=10);

3) крысы с моделью НП и трансплантацией МСК ЖТ при фармакологической блокаде SV_2 рецепторов в мягких тканях области повреждения седалищного нерва – группа НП+АМ630+МСК ЖТ (n=10);

4) крысы с моделью НП и трансплантацией МСК ЖТ, которым осуществили фармакологическую блокаду SV_2 рецепторов при предварительном инкубировании с селективным антагонистом – группа НП+пре-АМ630 МСК ЖТ (n=10).

Все манипуляции с животными проведены с соблюдением принципов биоэтики, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 02.02.2023 г.).

Периферическую нейропатическую боль (НП) моделировали методом иссечения участка седалищного нерва размером 5 мм на уровне верхней трети бедра левой задней конечности [7]. На 7-е сутки экспериментов экспериментальным группам проводили трансплантацию аллогенных МСК ЖТ в количестве 1×10^6 клеток/кг массы тела крысы. До начала исследования МСК ЖТ выделили из жировой ткани интактных здоровых крыс. Культивирование МСК ЖТ проводили на базе Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси по ранее описанной методике [12]. Методом проточной цитофлуориметрии проведена проверка фенотипа МСК ЖТ на наличие мезенхимальных маркеров CD29, CD44 и CD90, а также отсутствие гемопоэтического маркера CD45. Доля жизнеспособных клеток составляла не менее 90%. Перед трансплантацией готовили суспензию МСК ЖТ в фосфатно-солевом (PBS) буфере (pH=7,2; Sigma-Aldrich, Германия). Суспензию клеток вводили в область повреждения нерва за 4 инъекции по периметру места хирургического вмешательства.

При фармакологической блокаде SV_2 рецепторов на МСК ЖТ за 24 ч до трансплантации клетки инкубировали с селективным антагонистом SV_2 рецепторов АМ630 (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 2 μ M. В мягких тканях области повреждения седалищного нерва фармакологическую блокаду SV_2 рецепторов осуществляли путем локального внутримышечного введения АМ630 в дозе 100 мкг/кг массы тела крысы за 15 мин до трансплантации МСК

ЖТ. Антагонист АМ630 разводили в растворе, состоящем из PBS-буфера (pH=7,4) и 0,2% ДМСО. На 0, 7, 14, 21, 28, 60 и 90-е сутки исследования у экспериментальных животных проводили детальный анализ походки с использованием аппаратно-программного комплекса CatWalk XT версии 10.6 (Noldus, Голландия). Установка позволяет проводить качественную и количественную оценку параметров походки во время непринужденного передвижения животного по специальному коридору (рис. 1). Коридор состоит из тоннеля со стеклянным полом с зеленой LED-подсветкой мест контакта лап с поверхностью и красной LED-подсветкой, расположенной в верхней части коридора, для контура животного. Интенсивность зеленого света в месте контакта лап с поверхностью стекла фиксировали высокоскоростной видеокамерой, расположенной под коридором.

С помощью программного обеспечения установки осуществляли классификацию отпечатков лап и подсчет значений параметров походки. Предварительно животных адаптировали к прибору без записи пробежек для исключения артефактов. Видеорегистрацию пробежек на данном приборе осуществляли в темном вентилируемом помещении при низком уровне шума. Пробежки



Рисунок 1 – Система анализа походки CatWalk XT: 1 – коридор; 2 – стеклянный пол с зеленой LED подсветкой; 3 – потолок с красной LED подсветкой; 4 – видеокамера. Белыми стрелками показано направление движения экспериментального животного

Таблица 1 – Характеристика исследуемых параметров походки с помощью системы анализа походки CatWalk XT

Динамические параметры	
<i>Stand time</i>	Длительность фазы опоры лапы на поверхность
<i>Swing time</i>	Длительность фазы переноса лапы в воздухе
<i>Duty cycle</i>	Рабочий цикл лапы, отношение длительности фазы опоры лапы к длительности полного цикла шага
Статические параметры	
<i>Print length</i>	Длина отпечатка
<i>Print width</i>	Ширина отпечатка
<i>Print area</i>	Площадь отпечатка
<i>Max contact area</i>	Площадь отпечатка при максимальном контакте лапы с поверхностью
<i>Max intensity</i>	Максимальная интенсивность отпечатка лапы
<i>Mean intensity</i>	Средняя интенсивность отпечатка лапы
<i>Sciatic functional index (SFI)</i>	Функциональный седалищный индекс (ФСИ)

каждого животного регистрировали по 3 раза с максимальным уровнем вариабельности шага 60% и временем пробежки не более 5,00 с. Среди параметров походки были отобраны ключевые динамические параметры, отражающие степень тонических болевых ощущений, в частности аллодинии, а также косвенно демонстрируют функциональное состояние седалищного нерва [13, 14]. Характеристика исследуемых параметров походки представлена в таблице 1.

Исследуемые параметры, кроме функционального седалищного индекса (ФСИ), рассчитывали для травмированной ипсилатеральной конечности в процентах от контралатеральной задней конечности. Пересчёт использовали для исключения влияния скорости пробежек и массы тела животных на показатели параметров походки.

Статистическую обработку данных выполняли в программе STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Данные параметров походки проверяли на нормальность распределения критерием Шапиро-Уилка. Отличия в данных показателях оценивали с помощью дисперсионного анализа повторных измерений с последующими апостериорными сравнениями методом наименьшей значимой разницы. Вывод о статистической значимости отличий делали при $p < 0,05$.

Результаты

Динамические параметры походки. В случае группы НП без лечения нарушения динамических параметров походки отмечены с 7-х суток эксперимента. Наблюдали сокращение длительности фазы опоры ипсилатеральной конечности

до 91,0% ($p < 0,001$); рабочего цикла – до 95,4% ($p < 0,001$), при этом статистически значимых отличий в длительности фазы переноса не наблюдалось ($p > 0,05$). К 21-м суткам исследования наступало адаптационное восстановление вышеописанных параметров (рис. 2а, б).

В группе НП+МСК ЖТ на 7-е сутки исследования, как и в случае с группой НП без лечения, отмечено снижение длительности фазы опоры ипсилатеральной конечности до 91,4% ($p < 0,005$ к 0-м суткам), рабочего цикла – до 95,2% ($p < 0,05$ к 0-м суткам) (рис. 2а, б), длительность фазы переноса статистически значимо не изменялась на протяжении исследования (рис. 2в). После введения МК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг в область перерезки седалищного нерва к 14-м суткам наблюдали восстановление длительности фазы опоры (до 98,4%) и рабочего цикла (до 101,9%) (рис. 2а, б), далее не отмечено изменений данных параметров на протяжении исследования.

В группе НП+АМ630+МСК ЖТ на 7-е сутки исследования отмечено сокращение длительности фазы опоры ипсилатеральной конечности (до 91,1%, $p < 0,005$ к 0-м суткам) и ее рабочего цикла (до 96,1%, $p < 0,05$ к 0-м суткам). Аналогично вышеописанным группам, статистически значимых изменений длительности фазы переноса ипсилатеральной конечности не отмечено (рис. 2в). После введения МСК ЖТ на фоне фармакологической блокады SV_2 -рецепторов в области перерезки седалищного нерва к 14-м суткам исследования длительность фазы опоры составляла 93,1% от контралатеральной конечности ($p < 0,005$ к 0-м суткам), на 21-е сутки – 94,6%, на 28-е сутки – 92,9% ($p < 0,01$ к 0-м суткам) (рис. 2а). Восстановление

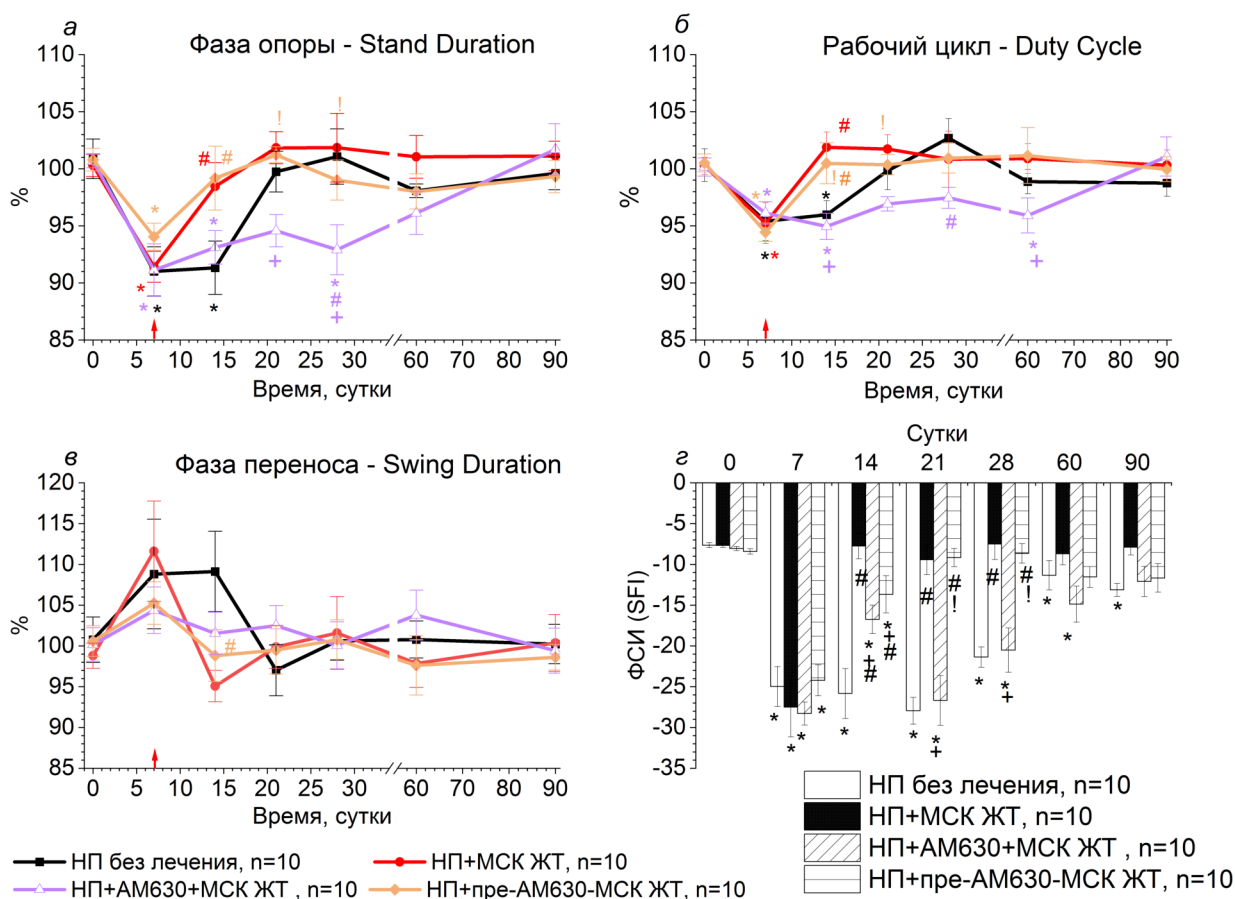


Рисунок 2 – Изменения динамических параметров походки (а, б, в), а также функционального седалищного индекса (г) у крыс после моделирования нейропатии, аллогенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани и фармакологической блокады СВ2 рецепторов антагонистом АМ630.

Стрелкой обозначено время трансплантации; * – $p < 0,05$ к значениям до моделирования НП; # – $p < 0,05$ к группе НП без лечения; + – $p < 0,05$ к группе НП+МСК ЖТ; ! – $p < 0,05$ к группе НП+АМ630+МСК ЖТ

данного показателя фиксировали с 60-х суток исследования. Рабочий цикл травмированной лапы к 14-м суткам исследования был снижен относительно контралатеральной конечности до 94,9% ($p < 0,05$ к 0-м суткам), к 28-м суткам – до 97,5%, к 60-м суткам – до 95,9% ($p < 0,05$ к 0-м суткам) (рис. 2б). Данный показатель вернулся к исходному уровню на 90-е сутки исследования. По сравнению с группой НП без лечения, на 28-е сутки эксперимента отмечено снижение длительности фазы опоры (на 8,1%, $p < 0,005$), а также рабочего цикла ипсилатеральной конечности (на 5,1%, $p < 0,01$). По сравнению с группой НП+МСК, длительность фазы опоры ипсилатеральной лапы была ниже на 21-е сутки (на 7,1%, $p < 0,05$) и на 28-е сутки исследования (на 8,8%, $p < 0,002$), рабочий цикл – на 14-е сутки (на 6,8%, $p < 0,005$) и 60-е сутки исследования (на 4,9%, $p < 0,02$).

В случае введения пре-АМ630-МСК ЖТ на 7-е сутки исследования наблюдали снижение длительности фазы опоры до 94,0% ($p < 0,02$ к 0-м суткам), рабочего цикла – до 94,4% ($p < 0,02$ к 0-м суткам), без статистически значимых изменений длительности фазы переноса (рис. 2а-в). Введение преинкубированных с АМ630 МСК ЖТ приводило к восстановлению данных показателей к 14-м суткам до 99,2% ($p > 0,05$ к 0-м суткам, $p < 0,05$ к группе НП без лечения) и 100,5% ($p > 0,05$ к 0-м суткам, $p < 0,05$ к группе НП без лечения) соответственно. В дальнейшем динамические параметры не отличались статистически значимо от группы НП+МСК ЖТ.

Функциональный седалищный индекс. Наиболее выраженные снижение ФСИ наблюдали в группе НП без лечения на 7-е сутки исследования: данный показатель снизился в 2,3 (на 229,9%)

раза (с $-7,65 \pm 0,30$ до $-24,99 \pm 2,45$, $p < 0,001$ к 0-м суткам, рис. 2г). Тенденция к восстановлению данного показателя наблюдалась лишь с 60-х суток исследования, однако к 90-м суткам ФСИ в данной группе составил $-13,13 \pm 0,79$, восстановления до исходного уровня не отмечено ($p < 0,01$) (рис. 2г).

В группе НП+МСК ЖТ на 7-е сутки исследования ФСИ снизился с $-7,67 \pm 0,25$ до $-27,51 \pm 3,66$ ($p < 0,001$ по сравнению с 0-ми сутками). После трансплантации МСК ЖТ к 14-м суткам исследования наблюдали восстановление ФСИ до $-7,75 \pm 1,57$. Далее на протяжении исследования не наблюдали статистически значимых изменений ФСИ от значений на 0-е сутки.

При введении АМ630 за 15 мин до трансплантации МСК ЖТ на 7-е сутки исследования наблюдали снижение ФСИ до $-28,29 \pm 1,42$ ($p < 0,001$ по сравнению с 0-ми сутками). К 14-м

суткам исследования отмечено частичное восстановление ФСИ (до $-16,75 \pm 1,74$, $p < 0,002$ к 0-м суткам, $p < 0,05$ к НП без лечения). С 21-х суток исследования показатель снова снизился до уровня группы НП без лечения (до $-26,69 \pm 3,05$, $p < 0,001$ к 0-м суткам, $p > 0,05$ к НП без лечения). ФСИ в данной группе вернулся к исходному уровню лишь к 90-м суткам исследования (до $12,10 \pm 1,85$), но при этом не отличался статистически значимо от НП без лечения. По сравнению с группой НП+МСК, ФСИ в данной группе был статистически значимо снижен на 14-е сутки ($p < 0,001$), 21-е сутки ($p < 0,001$) и 28-е сутки эксперимента ($p < 0,001$).

В группе НП+пре-АМ630 МСК ЖТ снижение ФСИ к 7-м суткам исследования составило $-24,21 \pm 1,90$ ($p < 0,001$ к 0-м суткам). После трансплантации преинкубированных с АМ630 МСК ЖТ к 14-м суткам исследования ФСИ достиг $-13,67 \pm 2,28$ ($p < 0,02$ к 0-м суткам, $p < 0,001$

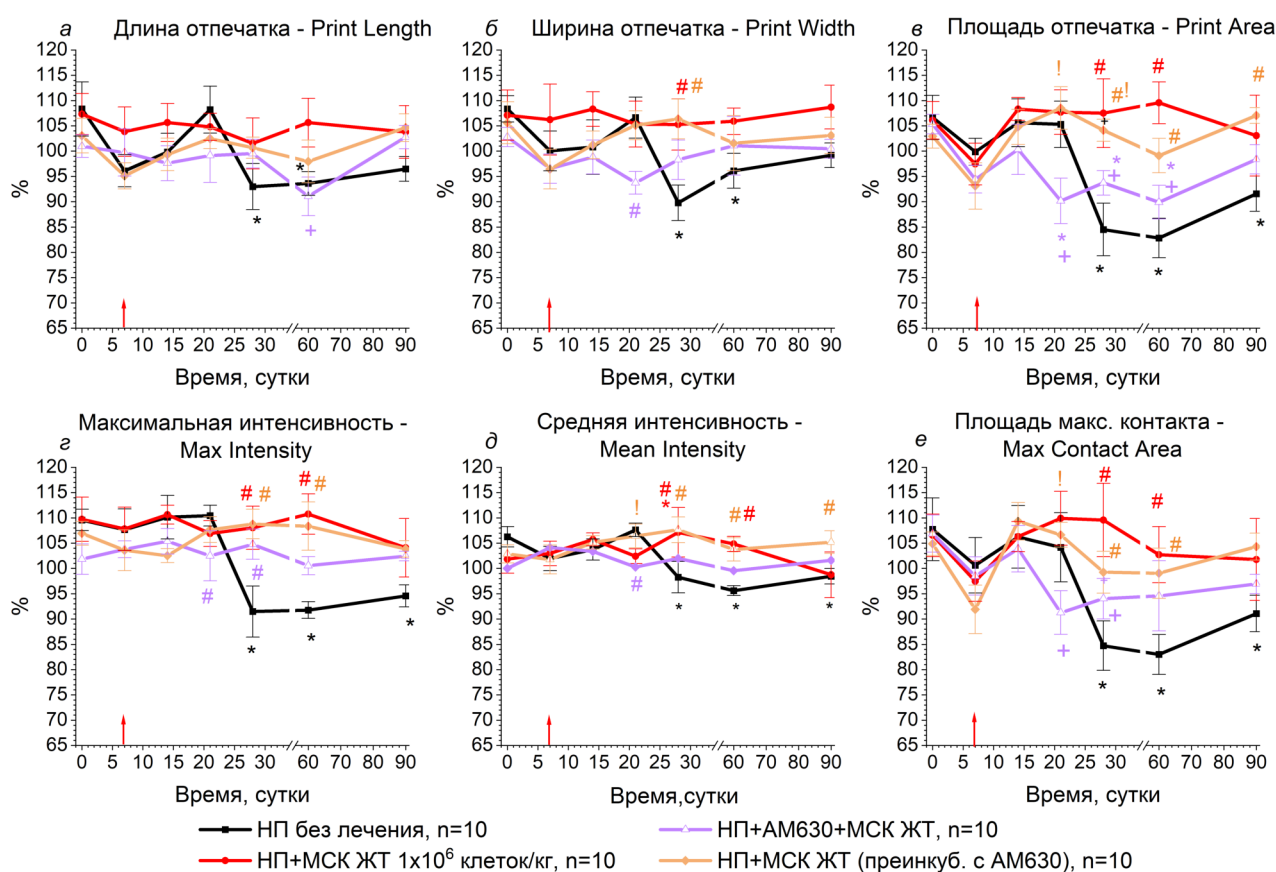


Рисунок 3 – Изменения статических параметров походки: длины и ширины отпечатка (а, б), площади отпечатка (в, е), а также параметров интенсивности (г, д) у крыс после моделирования нейропатии, трансплантации мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани на фоне фармакологической блокады СВ2 рецепторов антагонистом АМ630. Стрелкой обозначено время трансплантации; * – $p < 0,05$ к значениям до моделирования НП; # – $p < 0,05$ к группе НП без лечения; + – $p < 0,05$ к НП+МСК ЖТ; ! – $p < 0,05$ к группе НП+АМ630+МСК ЖТ

к НП без лечения), к 21-м суткам данный показатель полностью восстановился (до $-9,16 \pm 1,12$, $p > 0,05$ к 0-м суткам, $p < 0,001$ к группе НП без лечения). По сравнению с группой НП+МСК ФСИ был ниже на 14-е сутки исследования (на 76,4%, $p < 0,005$).

Статические параметры походки. С 28-х суток и далее в группе НП без лечения отмечены нарушения статических параметров походки (рис. 3а-е).

По сравнению с данными на 0-е сутки, длина отпечатка травмированной конечности сократилась к 28-м суткам исследования до 93,6% ($p < 0,02$) (рис. 3а), а ширина отпечатка – до 96,1% от контралатеральной конечности ($p < 0,001$ к 0-м суткам) (рис. 3б). Площадь отпечатка ипсилатеральной конечности снизилась на 20,9% (до 84,5% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$ к 0-м суткам) (рис. 3в), площадь максимального контакта – на 21,4% (до 84,7% от контралатеральной конечности, $p < 0,005$ к 0-м суткам) (рис. 3е), максимальная интенсивность отпечатка – на 16,5% (до 91,5% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$, рис. 3г) и средняя интенсивность – на 7,8% (до 98,3% от контралатеральной конечности, $p < 0,01$, рис. 3д). Далее по 90-е сутки эксперимента не отмечено тенденции к восстановлению статических параметров походки. К 90-м суткам площадь отпечатка была снижена до 91,6% от контралатеральной конечности ($p < 0,02$ к 0-м суткам), площадь максимального контакта – до 91,1% от контралатеральной конечности ($p < 0,05$ к 0-м суткам), максимальной интенсивности отпечатка – до 94,6% от контралатеральной конечности ($p < 0,002$ к 0-м суткам), средней интенсивности отпечатка – до 98,5% от контралатеральной конечности ($p < 0,01$ к 0-м суткам).

После однократного введения исследуемой дозы МСК ЖТ в область перерезки седалищного нерва на протяжении исследования не наблюдали статистически значимых изменений длины, ширины и площади отпечатка (рис. 3а-в), площади максимального контакта (рис. 3е), а также максимальной и средней интенсивности отпечатка (рис. 3г, д). Относительно группы НП без лечения наблюдали увеличение площади отпечатка ипсилатеральной лапы и площади максимального контакта отпечатка, а также параметров интенсивности на 28-е сутки ($p < 0,005$ к группе НП без лечения) и 60-е сутки эксперимента ($p < 0,02$ к группе НП без лечения).

При инъекции АМ630 за 15 мин до транс-

плантации МСК ЖТ нарушения статических параметров походки наблюдали уже с 21-х суток после аксотомии. В частности, площадь отпечатка снизилась до 90,2% от контралатеральной конечности ($p < 0,002$ к 0-м суткам) (рис. 3в). По сравнению с группой НП без лечения на 21-е сутки исследования отмечено сокращение ширины отпечатка (до 93,8% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$), максимальной интенсивности отпечатка (до 102,5% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$) и средней интенсивности (до 100,3% от контралатеральной конечности, $p < 0,005$) (рис. 3б, г, д). Относительно группы НП+МСК площадь отпечатка лапы была ниже на 21-е сутки ($p < 0,05$), 28-е сутки ($p < 0,05$) и 60-е сутки эксперимента ($p < 0,005$); площадь максимального контакта – на 28 и 60-е сутки эксперимента ($p < 0,05$). В отношении других параметров походки не отмечено статистически значимых различий относительно группы НП+МСК ЖТ.

После трансплантации МСК ЖТ, преинкубированных с АМ630, не отмечено достоверных изменений статических параметров походки относительно значений до моделирования НП. Относительно группы НП без лечения ширина отпечатка была увеличена на 28-е сутки исследования (до 106,4% от контралатеральной конечности, $p < 0,05$), площадь отпечатка на 28-е сутки – до 108,5% от контралатеральной конечности ($p < 0,002$), на 60-е сутки – до 104,1% ($p < 0,001$) от контралатеральной конечности, на 90-е сутки – до 107,9% от контралатеральной конечности ($p < 0,05$). Площадь максимального контакта увеличилась на 28-е сутки (до 99,3% от контралатеральной конечности, $p < 0,002$) и 60-е сутки исследования (до 99,1% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$). Максимальная интенсивность по сравнению с группой НП без лечения была увеличена на 28-е сутки исследования (до 108,8% от контралатеральной конечности, $p < 0,005$) и 60-е сутки исследования (до 108,4% от контралатеральной конечности, $p < 0,001$). Относительно группы НП+МСК ЖТ не отмечено статистически значимых различий статических параметров походки.

Через 15 мин после введения АМ630 в область повреждения седалищного нерва не отмечено статистически значимых изменений параметров походки по сравнению со значениями до введения антагониста, что указывает на отсутствие влияния антагониста СВ₂-рецепторов на исследуемые параметры походки (табл. 2).

Таблица 2 – Параметры походки крыс с периферической нейропатией после введения антагониста АМ630 (n=6), Ме (25%;75%)

Параметр / Время	0-е сутки	7-е сутки	Через 15 мин после введения АМ630
Динамические параметры походки			
Фаза опоры	102,9 (97,6;109,3)	93,2 (90,3;94,9)*	91,8 (86,2;97,1)*
Фаза переноса	99,7 (95,4;106,7)	100,3 (95,6;109,0)	103,5 (98,2;106,5)
Рабочий цикл	100,9 (99,4;103,2)	92,9 (90,2;97,3)*	94,3 (91,9;96,5)*
ФСИ - SFI	-8,3 (-7,6;-8,7)	-28,7(-20,5;-37,7)*	-34,8 (-27,1;-43,5)*
Статические параметры походки			
Длина отпечатка	101,4 (97,5;104,0)	86,5 (77,7;118,6)	94,4 (86,5;114,3)
Ширина отпечатка	103,4 (97,9;108,3)	97,0 (87,5;106,6)	95,2 (87,8;106,9)
Площадь отпечатка	103,0 (97,8;108,2)	82,8 (73,8;93,2)	94,8 (80,4;114,9)
Макс. интенсивность	105,8 (102,5;113,2)	97,8 (91,0;106,8)	102,0 (91,6;104,0)
Средняя интенсивность	104,5 (93,6;113,3)	103,7 (100,1;108,0)	105,1 (97,7;110,3)
Площадь макс. контакта	97,4 (94,5;111,4)	95,1 (72,8;111,7)	101,9 (82,9;109,6)

Примечание: * – $p < 0,05$ к 0-м суткам (критерий Уилкоксона).

Обсуждение

Нарушения походки при повреждении периферических нервов могут отражаться как в отклонении общих параметров (например, длина, ширина, площадь отпечатка лапы, площадь максимального контакта лапы), так и в параметрах походки, связанных с болью (параметры интенсивности отпечатка, длительность фазы опоры и переноса лапы, рабочий цикл) и параметрах координации (регулярность походки, паттерны нормальной последовательности шагов и дисперсии фаз шагов) [14]. В данном исследовании повреждение седалищного нерва приводило к развитию нарушений динамических параметров, связанных с болью, которые восстанавливались в группе НП без лечения к 21-м суткам эксперимента (рис. 2а, б). При этом с 28-х суток исследования и далее наблюдали нарушения параметров интенсивности отпечатка травмированной лапы, а также общих параметров походки, что указывало на прогрессирование тонических болевых ощущений, а также дегенеративных изменений мышц, иннервируемых поврежденным седалищным нервом. Вместе с тем, в данной модели повреждения седалищного нерва не изменялись параметры координации [8], и в данном исследовании их не оценивали. Наиболее чувствительным параметром походки можно считать ФСИ, который косвенно отражает функциональную активность седалищного нерва и коррелирует с механической и термической гиперлагией [8]. Данный показатель выраженно снижался у животных группы НП без

лечения на 7-е сутки эксперимента, а тенденция к восстановлению отмечена лишь к 90-м суткам исследования.

Эффективность МСК в подавлении нарушений параметров походки, вызванных повреждением звеньев центральной и периферической нервной системы, показана в экспериментальных моделях ишемии-реперфузии головного мозга [15], перерезки медианного нерва [16] а также в модели аксотомии седалищного нерва крыс [7, 8]. Вместе с тем, механизмы реализуемых МСК эффектов не до конца ясны. Каннабиноидные рецепторы CB_2 являются посредниками в реализации иммуномодулирующих и антиноцицептивных эффектов МСК и в настоящее время являются предметом изучения терапевтических свойств МСК. Это связано с тем, что, во-первых, экспрессия данных рецепторов обнаружена в периферических нервных волокнах и служит одной из мишеней купирования болевого синдрома при периферической нейропатической боли [17]. Во-вторых, МСК ЖТ экспрессируют CB_2 -рецепторы, при активации которых увеличивается секреция ими факторов роста и противовоспалительных цитокинов [11]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что фармакологическая блокада CB_2 -рецепторов на МСК не оказывала влияния на скорость восстановления динамических параметров походки (длительность фазы опоры, рабочий цикл) после их трансплантации (рис. 2а, б), но тормозила длительность восстановления ФСИ (рис. 3г). Вместе с тем, блокада CB_2 -рецепторов в мягких тканях области перерезки

седалищного нерва перед трансплантацией МСК ЖТ способствовала персистенции нарушений динамических параметров походки (рис. 3а, б) и полностью отменяла эффект МСК на восстановление ФСИ (рис. 3г), что, вероятно, говорит о подавлении эффектов МСК ЖТ на устранение тонических болевых ощущений. В отношении нарушений статических параметров походки, блокада СВ₂-рецепторов как на МСК, так и в мягких тканях не усугубляла их и вместе с тем не тормозила их развитие по сравнению с группой, получившей только МСК.

Заключение

Таким образом, фармакологическая блокада СВ₂-рецепторов как на мембранах мезенхимальных стволовых клеток, так и в зоне повреждения периферического нерва в эксперименте, оказывает негативное влияние на развитие антиноцицептивного и репаративного действия МСК ЖТ при их локальной трансплантации, что указывает на непосредственное участие данных рецепторов в эффектах реализуемых МСК.

Литература

1. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain / J. Scholz [et al.] // *Pain*. 2019 Jan. Vol. 160, N 1. P. 53–59.
2. Bouhassira, D. Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology / D. Bouhassira // *Rev. Neurol. (Paris)*. 2019 Jan-Feb. Vol. 175, N 1/2. P. 16–25.
3. Neuropathic pain / L. Colloca [et al.] // *Nat. Rev. Dis. Primer*. 2017 Feb. Vol. 3. Art. 17002.
4. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches / E. Cavalli [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2019 Jan-Dec. Vol. 33. Art. 2058738419838383.
5. Влияние аллогенной 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.
6. Оценка антиноцицептивного действия мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной периферической нейропатической боли / А.-М. В. Ерофеева [и др.] // *Новости хирургии*. 2021. Т. 29, № 5. С. 527–534.
7. Ерофеева, А.-М. В. Влияние фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов 1 типа на эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной периферической нейропатии / А.-М. В. Ерофеева // *Вестн. ВГМУ*. 2022. Т. 21, № 6. С. 46–57.
8. 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 // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук*. 2022. Т. 19, № 4. С. 404–412.
9. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes / R. Roche [et al.] // *Histochem. Cell Biol.* 2006 Aug. Vol. 126, N 2. P. 177–187.
10. 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 Feb. Vol. 7, N 6. P. 6436–6447.
11. The endocannabinoid receptors CB1 and CB2 affect the regenerative potential of adipose tissue MSCs / T. Ruhl [et al.] // *Exp. Cell Res.* 2020 Apr. Vol. 389, N 1. Art. 111881.
12. Морфофункциональное состояние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс в условиях подавления окислительного стресса / И. Б. Василевич [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. 2014. № 2. С. 82–88.
13. Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models / E. A. Kappos [et al.] // *Brain Behav.* 2017 May. Vol. 7, N 7. e00723.
14. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review / J. C. Heinzel [et al.] // *J. Neurosci. Met.* 2020 Nov. Vol. 345. Art. 108889.
15. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes / X. Liu [et al.] // *Exp. Neurol.* 2021 Jul. Vol. 341, Art. 113700.
16. Evaluation of Functional Recovery in Rats After Median Nerve Resection and Autograft Repair Using Computerized Gait Analysis / J. C. Heinzel [et al.] // *Front Neurosci.* 2021 Jan. Vol. 14. Art. 93545.
17. Peripheral sensory neuron CB2 cannabinoid receptors are necessary for both CB2-mediated antinociceptive efficacy and sparing of morphine tolerance in a mouse model of anti-retroviral toxic neuropathy / L. M. Carey [et al.] // *Pharmacol. Res.* 2023 Jan. Vol. 187. Art. 106560.

Поступила 16.05.2023 г.

Принята в печать 12.06.2023 г.

References

- Scholz J, Finnerup N, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain*. 2019 Jan;160(1):53-9. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001365.
- Bouhassira D. Neuropathic pain: definition, assessment and epidemiology / D. Bouhassira. *Rev Neurol (Paris)*. 2019 Jan-Feb;175(1-2):16-25. doi: 10.1016/j.neurol.2018.09.016.
- Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Feb;3:17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
- Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzon E. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2019 Jan-Dec;33:2058738419838383. doi: 10.1177/2058738419838383.
- Erofeeva A-MV, Zhavoronok IP, Antipova OA, Ryzhkovskaya EL, Kuznetsova TE, Vasilevich IB, i dr. Effect of allogeneic adipose tissue mesenchymal stem cell transplantation on nociceptive sensitivity and reparative processes in experimental Achilles tendon injury in rats. *Dokl Nats Akad Nauk Belarusi*. 2020;64(5):574-82. doi : 10.29235/1561-8323-2020-64-5-574-582. (In Russ.)
- Erofeeva A-MV, Zhavoronok IP, Antipova OA, Schastnaya NI, Semenik IA, Ryabtseva SN, i dr. Evaluation of antinociceptive action of adipose tissue mesenchymal stem cells in experimental peripheral neuropathic pain. *Novosti Khirurgii*. 2021;29(5):527-34. doi: 10.18484/2305-0047.2021.5.527. (In Russ.)
- Erofeeva A-MV. Effect of pharmacological blockade of cannabinoid receptor type 1 on the efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in experimental peripheral neuropathy. *Vestn VGMU*. 2022;21(6):46-57. doi: 10.22263/2312-4156.2022.6.47. (In Russ.)
- Erofeeva A-MV, Molchanova AY. Effect of allogeneic adipose tissue mesenchymal stem cell transplantation on nociceptive responses and gait parameters in rats with experimental peripheral neuropathy. *Ves Nats Akad Navuk Belarusi. Ser Med Navuk*. 2022;19(4):404-12. doi: 10.29235/1814-6023-2022-19-4-404-412. (In Russ.)
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier M-P, Laborde C, Baron J-F, et al. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol*. 2006 Aug;126(2):177-87. doi: 10.1007/s00418-005-0127-4.
- Xie J, Xiao D, Xu Y, Zhao J, Jiang L, Hu X, et al. Up-regulation of immunomodulatory effects of mouse bone-marrow derived mesenchymal stem cells by tetrahydrocannabinol pretreatment involving cannabinoid receptor CB2. *Oncotarget*. 2016 Feb;7(6):6436-47. doi: 10.18632/oncotarget.7042.
- Ruhl T, Karthaus N, Kim B-S, Beier JP. The endocannabinoid receptors CB1 and CB2 affect the regenerative potential of adipose tissue MSCs. *Exp Cell Res*. 2020 Apr;389(1):111881. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111881.
- Vasilevich IB, Pinchuk SV, Lobanok ES, Volotovskiy ID. Morphofunctional state of adipose tissue mesenchymal stem cells in rats under oxidative stress suppression. *Ves Nats Akad Navuk Belarusi Ser Biyol Navuk*. 2014;(2):82-8. (In Russ.)
- Kappos EA, Sieber PK, Engels PE, Mariolo AV, D'Arpa S, Schaefer DJ, et al. Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain Behav*. 2017 May;7(7):e00723. doi: 10.1002/brb3.723.
- Heinzel J, Längle G, Oberhauser V, Hausner T, Kolbenschlager J, Prahm C, et al. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. *J Neurosci Methods*. 2020 Nov;345:108889. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108889.
- Liu X, Zhang M, Liu H, Zhu R, He H, Zhou Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes. *Exp Neurol*. 2021 Jul;341:113700. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113700.
- Heinzel JC, Oberhauser V, Keibl C, Swiadek N, Längle G, Frick H, et al. Evaluation of Functional Recovery in Rats After Median Nerve Resection and Autograft Repair Using Computerized Gait Analysis. *Front Neurosci*. 2021 Jan;14:593545. doi: 10.3389/fnins.2020.593545.
- Carey LM, Xu Z, Rajic G, Makriyannis A, Romero J, Hillard C, et al. Peripheral sensory neuron CB2 cannabinoid receptors are necessary for both CB2-mediated antinociceptive efficacy and sparing of morphine tolerance in a mouse model of anti-retroviral toxic neuropathy. *Pharmacol Res*. 2023 Jan;187:106560. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106560.

Submitted 16.05.2023

Accepted 12.06.2023

Сведения об авторах:

А.-М.В. Ерофеева – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биологического моделирования, Институт физиологии НАН Беларуси, <https://orcid.org/0000-0002-9407-9295>, e-mail: amyerofeyeva@zoho.eu – Ерофеева Анна-Мария Вадимовна.

Information about authors:

A.-M.V. Yerofeyeva – postgraduate, associate research officer of the biological simulation laboratory, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, <https://orcid.org/0000-0002-9407-9295>, e-mail: amyerofeyeva@zoho.eu – Anna-Maria V. Yerofeyeva.