

Ультраструктурні зміни сідничого нерва мишей з периферичною нейропатією після трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини

І. Говбах¹, К. Сможаник², М. Пацева², В. Рубцов³, А. Устименко^{4,5},
В. Кирик^{4,5}, О. Цупиков^{2,4}

¹Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: tsupikov@gmail.com

³ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

⁴ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ;

⁵ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова Національної академії медичних наук України», Київ

У роботі досліджували демієлінізацію у трансгенних мишей з периферичною нейропатією та вплив трансплантації мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової тканини на ультраструктурні особливості сідничого нерва цих мишей. 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. Для ультраструктурного аналізу фіксацію тканини в тварин виконували методом транскардіальної перфузії-фіксації 4%-м розчином формальдегіду і 2,5%-м розчином глютаральдегіду через 16 тиж після трансплантації. Електронно-мікроскопічні дослідження сідничого нерва у трансгенних мишей з периферичною нейропатією виявили дис- та демієлінізацію аксонів, формування специфічних структур, так званих цибулин, а також в окремих випадках спостерігалася гіпертрофія мієлінових оболонок. У сукупності ультраструктурні зміни в сідничому нерві трансгенних мишей подібні до патоморфологічної картини, яка спостерігається в пацієнтів з периферичною нейропатією. На 16-й тиждень після трансплантації ММСК мишам із спадковою нейропатією спостерігали потовщення мієлінової оболонки аксонів і збільшення кількості ламел у сідничому нерві. Трансплантація ММСК мишам із спадковою периферичною нейропатією має протекторний вплив на ультраструктуру сідничого нерва і гальмує процеси демієлінізації аксонів.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини; демієлінізація; периферична нейропатія; електронна мікроскопія; сідничий нерв.

ВСТУП

Серед спадкових рухових й сенсорних нейропатій найбільш поширеною є хвороба Шарко–Марі–Тута (ШМТ) типу 1А, яка характеризується демієлінізацією сенсорних і моторних нервових волокон, що призводить до значної редукції швидкості проведення нервового імпульсу (<38 м/с) [1, 2]. При

класичній картині захворювання в нервовій тканині виявляються ознаки де- і ремієлінізації з утворенням так званих цибулеподібних структур (onion bulb) [3]. При ШМТ типу 1А вони спричинені надмірною експресією гена *PMP22* – периферичного мієлінового білка 22 кДа [1, 4]. Зазначена хвороба характеризується демієлінізацією периферичних нервів, порушенням чутливості та, інколи,

© І. Говбах, К. Сможаник, М. Пацева, В. Рубцов, А. Устименко, В. Кирик, О. Цупиков

болям, слабкістю і атрофією в гомілках у підлітковому віці, які пізніше розвиваються й у руках. Захворювання прогресує із характерною деформацією нижніх та верхніх кінцівок, яка змінює стереотип ходьби і знижує рівень якості життя [1]. Оскільки існуючі методи не призводять до зупинки чи сповільнення її прогресування, основним лишається фізична реабілітація та симптоматичне лікування [5].

Клітинна терапія із використанням стовбурових клітин розглядається як перспективний метод лікування периферичних нейропатій [6, 7]. Зокрема, відомо про нейропротекторні ефекти мультипотентних стовбурових клітин ектодермального походження при пошкодженні периферичних нервів [8]. Поширеним типом стовбурових клітин, які використовуються в клітинній терапії, є мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), котрі здатні диференціюватись у різні тканиноспецифічні типи клітин [9]. Також було продемонстровано, що вони секретують безліч молекул, таких як хемокіни, цитокіни, фактори росту та антиапоптотичні фактори з нейропротекторною активністю [10]. Крім того, мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з жирової тканини, становлять цінне джерело стовбурових клітин завдяки тому, що їх можна достатньо легко виділити у достатній кількості та швидко розмножити в культурі до потрібної терапевтичної дози [11].

Метою нашої роботи було дослідження впливу ММСК жирової тканини мишей на ультроструктурні особливості сідничого нерва трансгенних мишей з периферичною нейропатією.

МЕТОДИКА

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. До I контрольної групи ввійшли здорові тварини лінії C57Bl (n = 6), II – миші (n = 6) лінії B6. Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, яка була отримана на основі C57Bl/6J, зі спадковою периферичною нейропатією, придбані в The Jackson Laboratory (США), III – миші (n = 10) лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J після трансплантації ММСК з жирової тканини.

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

Отримання ММСК з жирової клітковини. Миші лінії FVB-C-Tg(GFPU)5Nagy/J підлягали евтаназії за допомогою цервікальної дислокації під наркозом 2,5%-го розчину 2,2,2-триброметанолу (авертин). У стерильних умовах виділяли підшкірну жирову тканину, подрібнювали ножицями на фрагменти розмірами 1×1 мм у середовищі DMEM/F12 («Sigma», США) та інкубували в 0,1%-му 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 живильному середовищі DMEM («Sigma», США) центрифугуванням при 300g, видаляли надосадову рідину зі зрілими адипоцитами і дебрисом та пропускали 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 +37°C у повному живильному 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 замінних амінокислот («Sigma-Aldrich», США). Заміну живильного середовища проводили через 3 доби. Клітини субкультивували при досягненні 80%-ї конфлуентності моношару з використанням 0,25%-го розчину трипсину («Sigma», США) та 0,02% версену («Біо-Тест-Лабораторія», Україна). На 2-му пасажі отримані культури імунофенотипували методом мультипараметричної проточної цитометрії, а також проводили направлене диференціювання в остеогенному і адипогенному напрямках за стандартними методиками, як описано раніше [12].

Для імунофенотипування використовували rat anti-mouse моноклональні антитіла: CD90 APC-Cy7 (BD Biosciences, кат. № 561401), CD105 APC (Invitrogen, кат. № 17-1051-82), CD73 PE (BD Biosciences, кат. № 550741), CD44 PE (BD Biosciences, кат. № 553134), CD45 PE (Thermo Fisher Scientific, кат. № MA1-10233), CD34 Alexa Fluor 647 (BD Biosciences, кат. № 560230). Клітини без додавання антигіб слугували негативним контролем. Зразки аналізували на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria («Becton Dickinson», США) за допомогою програмного забезпечення BD FACSDiva 6.2.1 («Becton Dickinson», США). Підраховували не менше 20 тис. клітин для кожного зразка. Встановлено, що понад 90% клітин у досліджуваних культурах експресували мезенхімальні маркери CD44, CD75, CD90 та CD105, тоді як відносний вміст клітин з гемопоетичними маркерами CD34 і CD45 становив менше ніж 5% (рис. 1, а).

Через 21 добу культивування за наявності факторів індукції спрямованого остеогенного диференціювання за допомогою цитохімічного забарвлення було виявлено інтенсивне відкладання солей кальцію в позаклітинному матриксі, а у зразках із індукторами адипогенного диференціювання – ліпідні гранули

в цитоплазмі клітин (див. рис. 1, б).

Отже, за морфологічними характеристиками та адгезією до культурального пластику, імунофенотипічними характеристиками та потенціалом спрямованого диференціювання отримані культури відповідали мінімальним критеріям ММСК, визначеним Міжнародним товариством з клітинної терапії [13].

Клітини після 2-го пасажу заморожували в концентрації $1 \cdot 10^6$ /мл у кріосередовищі, що складалось з 90% ФСК і 10% диметилсульфоксиду («Sigma», США), з використанням кріоконтейнерів CoolCell («Corning», США) та зберігали в рідкому азоті при -196°C .

Трансплантація ММСК жирової тканини. Перед трансплантацією клітини відморожували на водяній бані при 37°C , відмивали від кріопротектора в 10 мл живильного середовища DMEM/F12, що містило 10% ФСК, та ресуспендували в фосфатно-солевому буфері (PBS); («HyClone», США). Мишам лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J зі спадковою периферичною нейропатією трансплантували $0,5 \cdot 10^6$ ММСК у 50 мкл PBS внутрішньом'язово в *m. gastrocnemius* з обох боків під внутрішньоочеревинною анестезією (каліпсол і ксилазин, 75 та 2 мг/кг маси тіла відповідно). Тваринам II групи вводили 50 мкл PBS без клітин внутрішньом'язово в *m. gastrocnemius* з обох боків.

Ультроструктурний аналіз сідничого нерва. Перед проведенням ультроструктурного аналізу сідничого нерва дослідних мишей наркотизували внутрішньоочеревинно (каліпсол і ксилазин, 75 та 2 мг/кг маси тіла відповідно). Транскардіальну перфузією виконували за допомогою 0,1 М фосфатного буфера (ФБ) кімнатної температури (pH 7,4) з подальшою фіксацією холодним (4°C) розчином 4%-го формальдегіду та 2%-го глютаральдегіду («Sigma-Aldrich», США) в 0,1 М ФБ (pH 7,4). Сідничий нерв препарували і дофіксували в тому самому фіксаторі протягом ночі

при 4°C. Потім його промивали 0,1 М ФБ, дофіксували в 1% OsO₄, зневоднювали в етиловому спирті у висхідних концентраціях і переносили в суміш епоксидних смол Епон-

812/Araldite для полімеризації при 60°C. Ультратонкі зрізи (50–70 нм) з полімеризованих блоків нарізали за допомогою діамантового ножа і контрастували цитратом свинцю і

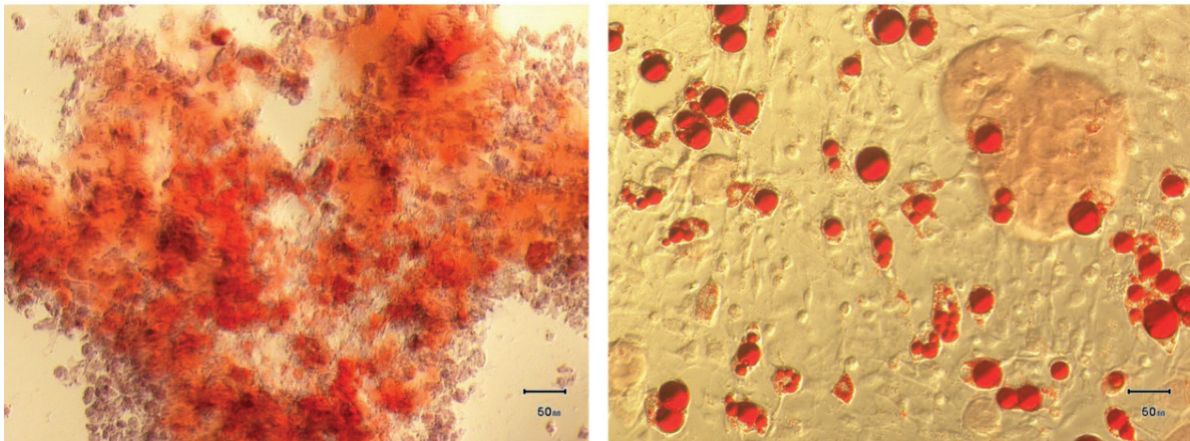
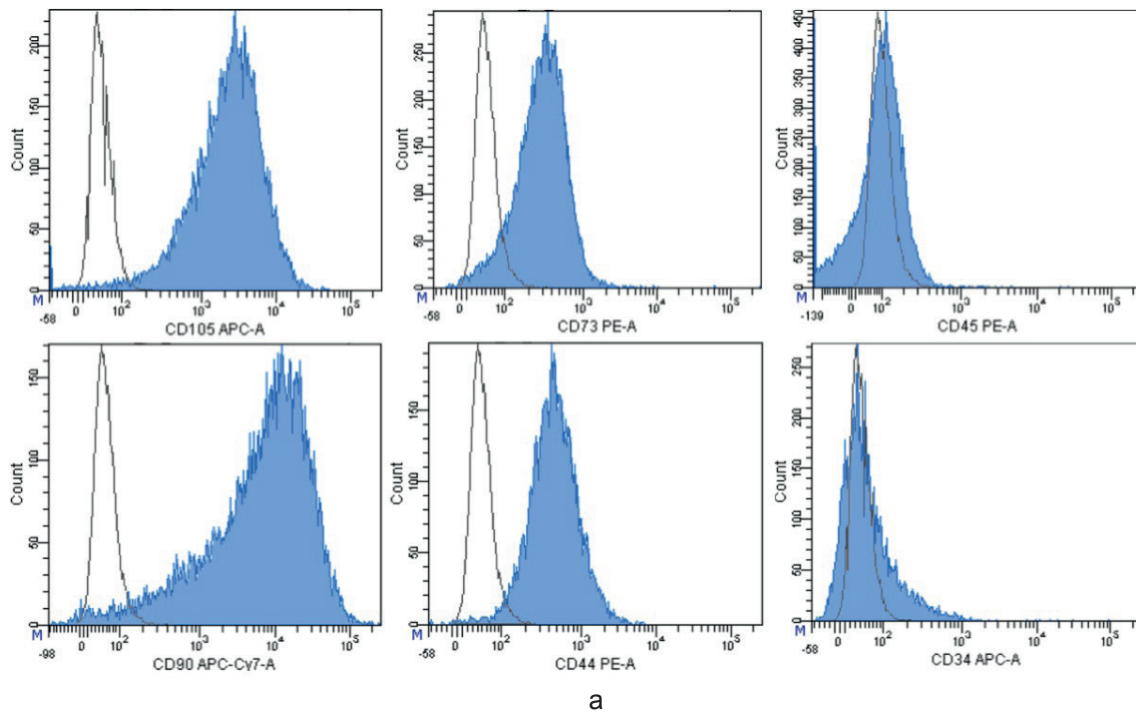


Рис. 1. На а – гістограми експресії маркерів CD105, CD90, CD73, CD44, CD45 та CD34 у культурі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) жирової тканини мишей (пасаж 2) за результатами проточної цитометрії. Блакитний колір – рівень флуоресценції на каналі при інкубації клітин з відповідними антитілами, сірий контур – рівень флуоресценції в негативному контролі без додавання антитіл. На б – мікрофотографії цитопрепаратів культур ММСК жирової тканини мишей після спрямованого диференціювання в остеогенному (ліворуч) та адипогенному (праворуч) напрямках. Мінералізований позаклітинний матрикс забарвлений Alizarin Red S на солі кальцію (рожевий колір), ліпідні вclusions в клітинах забарвлені Oil Red (червоний колір); світлова мікроскопія. Масштаб 50 мкм

ураніл ацетатом. Зрізи досліджували на трансмісійному електронному мікроскопі 100-CX («JEOL», Японія) при 80 кВ.

Статистичний аналіз. Для порівняння результатів досліджень дослідних груп був застосований метод дисперсійного аналізу ANOVA з використанням програмного забезпечення Origin Pro 8.5 («Origin Lab. Corp.», США). Різницю вважали достовірною при $P < 0,05$. Кількісні результати ультраструктурного аналізу представлені у вигляді середнє \pm стандартна похибка середнього значення (SEM).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що сідничі нерви контрольних мишей лінії C57Bl (І група) мали ультраструктурні характеристики нервів нормальних тварин, а саме: аксоплазма була електронно-світлою з помірно осмофільним матриксом, містила чітко візуалізовані нейрофіламенти, мікротрубочки і мітохондрії з щільно упакованими кристами (рис. 2, а, а'). Аксоплазма була вкрита мієліновою оболонкою, сформованою зі щільно нашарованих навколо осевого циліндра концентричних завитків мезаксона шваннівських клітин (див. рис. 2, а').

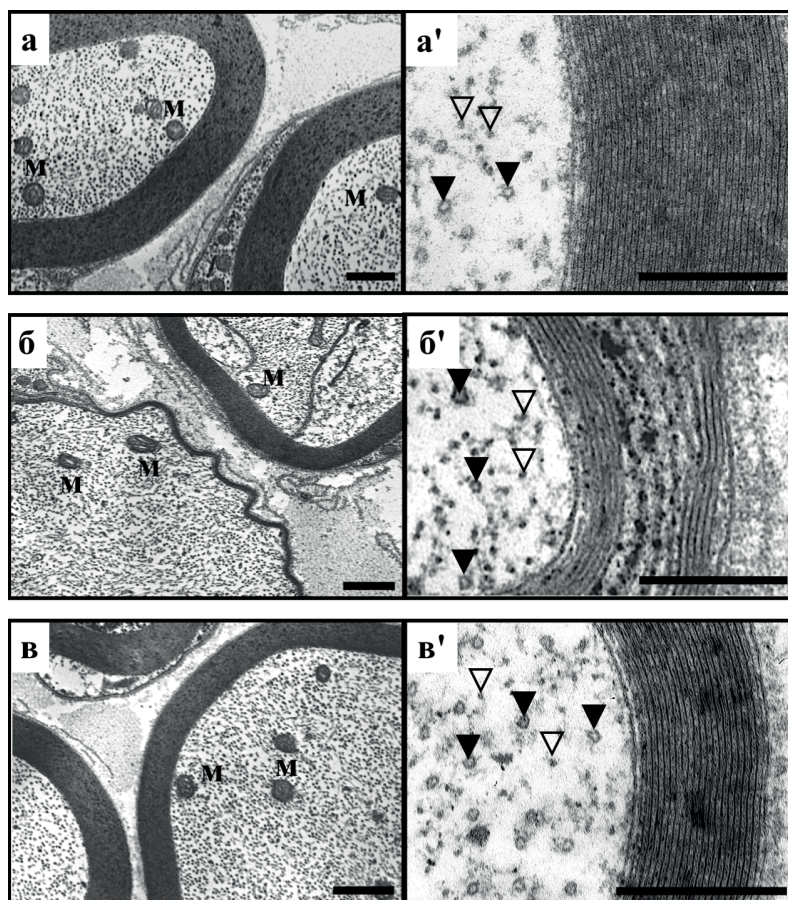


Рис. 2. Електронні мікрофотографії: поперечний зріз сідничого нерва контрольної миші лінії C57Bl (а), миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з периферичною нейропатією (б) та миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, якій трансплантували мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (в). На а'–в' продемонстровані мієлінові оболонки сідничого нерва тварин відповідної експериментальної групи, зображеної на а–в, але із суттєвим збільшенням. Нейрофіламенти позначені незафарбованими трикутниками, мікротрубочки – чорними трикутниками. м – мітохондрія. Масштаб: а–в – 0,5 мкм; а'–в' – 0,2 мкм

Ультраструктурний аналіз сідничого нерва трансгенних мишей лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J зі спадковою периферичною нейропатією (II група) виявив дисмієлінізацію великих аксонів, які були оточені надто тонкою мієліновою оболонкою (див. рис. 2, б, б'). Середнє значення товщини мієлінової оболонки аксонів трансгенних мишей становило лише $0,12 \pm 0,5$ мкм, у той час як у аксонів тварин контрольної групи – $0,47 \pm 0,8$ мкм (таблиця). Відповідно і кількість ламел у мієліновій оболонці аксонів трансгенних мишей зі спадковою периферичною нейропатією була значно меншою ($14,6 \pm 2,8$) порівняно із аксонами тварин контрольної групи ($41,6 \pm 5,4$; див. таблицю). Мієлінові оболонки аксонів тварин дослідної II групи мали неоднорідну структуру, часто нещільно прилягали до аксона та набували неправильної форми з інвагінаціями (див. рис. 1, б). У

деяких випадках мієлінові оболонки аксонів трансгенних мишей зі спадковою периферичною нейропатією мали ознаки гіпертрофії, яка супроводжувалася збільшенням кількості мієлінових ламел та порушенням їх взаємодії, що призводило до розшарування мієліну (рис. 3).

У таких випадках адаксональна і абаксональна мембрани були сильно потовщені й ущільнені порівняно з контролем, а щілини між такими мембранами були заповнені нещільно розташованими ламелами мієліну. Окрім зон розшарування також спостерігали електронно-щільні ділянки, які можуть бути результатом агрегації білка PMP22 з білками теплового шоку HSP (рис. 3).

Також у трансгенних мишей B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J було виявлено так звані цибулеподібні структури, утворені з концентричних скупчень шваннівських клітин

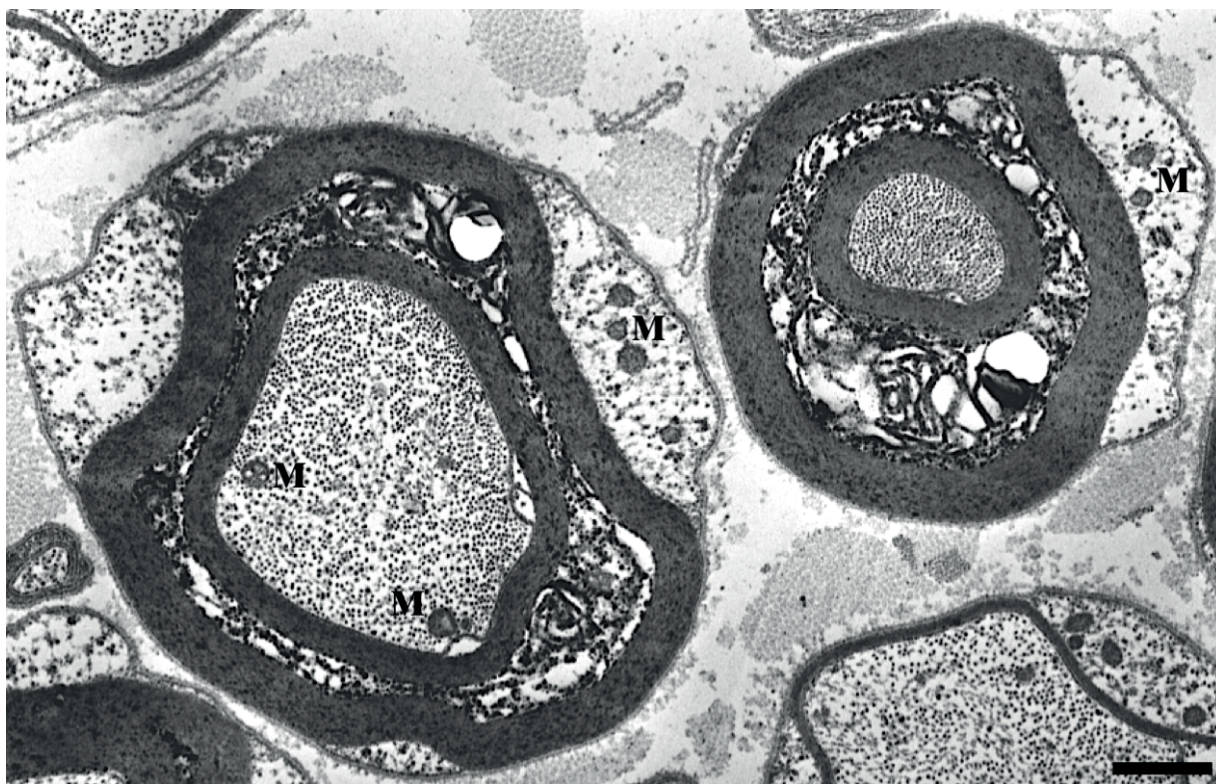


Рис. 3. Електронна мікрофотографія поперечного зрізу сідничого нерва мишей лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з периферичною нейропатією. Продемонстровані мієлінові оболонки з ознаками гіпертрофії, яка супроводжувалася збільшенням кількості мієлінових ламел та порушенням їх взаємодії. м – мітохондрія. Масштаб 0,5 мкм

Ультраструктурні характеристики сідничого нерва дослідних тварин

Група тварин	Кількість ламел у мієліновій оболонці	Товщина мієлінової оболонки, мкм
Контроль – здорові тварини лінії C57Bl (n = 6)	41,6 ± 5,4	0,47 ± 0,08
Миші з периферичною нейропатією (n = 6)	14,6 ± 2,8*, **	0,12 ± 0,02*, **
Миші з периферичною нейропатією, яким трансплантували мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (n = 10)	26,9 ± 3,4*, **	0,21 ± 0,04*, **

*P < 0,05 щодо контролю, **P < 0,05 щодо значень у тварин з периферичною нейропатією.

і колагену, що є свідченням абнормальної мієлінізації (рис. 4).

Описані вище особливості будови мієлінових оболонок та аксонів у сідничому нерві трансгенних мишей B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J свідчать про різкі порушення взаємодії аксонів та мієліну. Це призводить до погіршення аксональної трофіки, посилення атрофії аксонів та домінування процесів демієлінізації над ремієлінізацією. У сукупності ультراструктурні зміни в сідничому нерві трансгенних мишей лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J подібні до патоморфологічної картини, яка спостерігається в пацієнтів з периферичною нейропатією.

Таким чином, ультраструктурний аналіз показав, що лінія трансгенних мишей B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J може бути використана як модель для дослідження процесів демієлінізації при спадкових моторно-сенсорних нейропатіях типу 1A у людини.

На 16-й тиждень після трансплантації ММСК мишам із периферичною нейропатією (ІІІ група) у сідничому нерві цих тварин спостерігали потовщення мієлінової оболонки аксонів і збільшення кількості ламел порівняно із мишами ІІ групи (див. рис. 1, в, в').

Механізм дії трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин на репарацію периферичних нервів ще не до кінця зро-

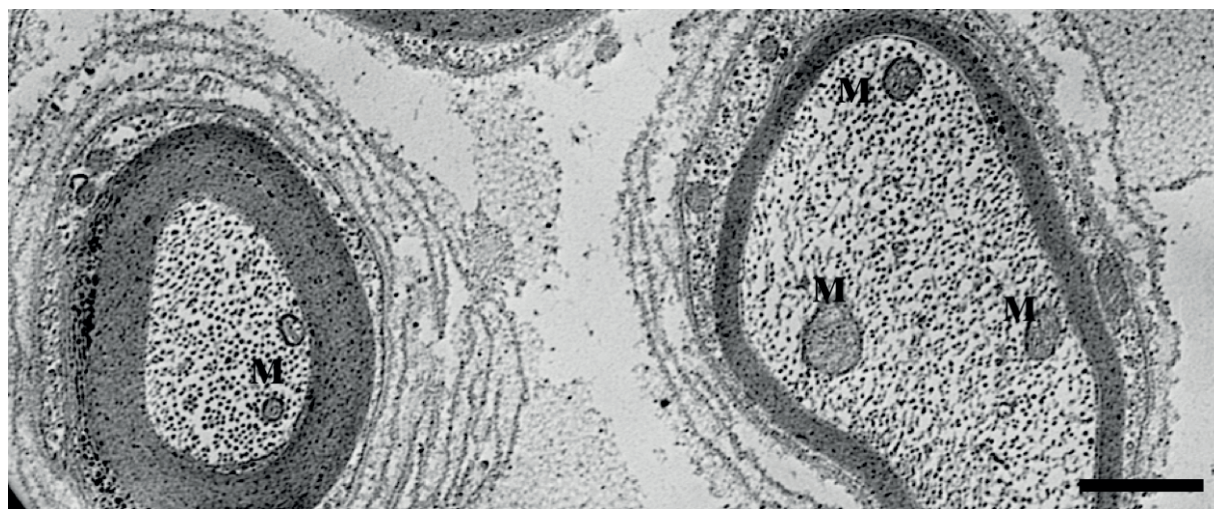


Рис. 4. Електронна мікрофотографія поперечного зрізу сідничого нерва миші лінії B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J з периферичною нейропатією. Продемонстрована абнормальна мієлінізація аксонів з утворенням так званих цибулеподібних структур. м – мітохондрія. Масштаб 0,5 мкм

зумілий, а їх клінічне застосування перебуває на стадії розробки. Mathot та співавт. [14] висунули дві основні гіпотези щодо механізму дії ММСК на відновлення пошкодженої нервової тканини. Перша оснований на секретії мезенхімальними стовбуровими клітинами трофічних факторів, важливих для ремоделювання позаклітинного матриксу і регенерації тканин. Ці фактори покращують ангиогенез, гальмують утворення рубцевої тканини та стимулюють регенерацію тканини [15]. Друга гіпотеза пов'язана з тим, що ММСК можуть трансдиференціюватися в місці пошкодження завдяки факторам росту та паракринним молекулам, які продукуються тканиною реципієнта. Ці фактори стимулюють диференціацію ММСК у потрібний тип клітин (зокрема шваннівські клітини) [14]. Мезенхімальні стромальні клітини жирової клітковини становлять особливий інтерес у регенеративній медицині, оскільки їх можна достатньо легко отримати під час ліпосакції з підшкірної жирової тканини [16].

Дослідження *in vitro* показали, що ММСК жирової клітковини здатні продукувати специфічні мРНК, які сприяють вивільненню паракринних факторів, зокрема нейротрофічного фактора мозку (BDNF), нейрегуліну-1 (NRG-1), ендотеліального фактора росту судин (VEGF), фактора росту гепатоцитів (HGF) та інсуліноподібного фактора росту (IGF), які можуть допомагати регенерації нейронів, модулюючи мікрооточення в місці пошкодження [16, 17].

Крім того, було продемонстровано, що секретом ММСК може також чинити імуномодулюючу, протизапальну, нейротрофічну нейропротекторну та ангиогенну дію на мікрооточення реципієнта завдяки експресії основного комплексу гістосумісності-I, фактора некрозу пухлини $\beta 1$, ІЛ-13, ІЛ-18-зв'язуючого білка та циліарного нейротрофічного фактора [17]. ММСК імовірно посилюють регенерацію периферичних нервів, створюючи нейропротекторне мікрооточення, яке запобігає дегенерації та апоптозу нервів, підтримує

нейрогенез, ріст аксонів, ремієлінізацію та метаболізм клітин [18].

Трансплантовані мезенхімальні стовбурові клітини покращують нейроваскуляризацію, секретуючи VEGF, ангиопоетин-1, тромбоцитарний фактор росту, ІЛ-6, ІЛ-8, трансформуючий фактор росту β [18, 19]. Було продемонстровано, що VEGF має нейротрофічний та мітогенний вплив на периферичні нерви, сприяє росту аксонів та проліферації шваннівських клітин після травми [20].

Отже, трансплантація ММСК з жирової клітковини тваринам із периферичною нейропатією позитивно впливає на мієлінізацію та регенерацію аксонів і може стати перспективним методом лікування спадкових рухових й сенсорних нейропатій.

ВИСНОВОК

Трансплантація ММСК мишам із спадковою периферичною нейропатією має протекторний вплив на ультраструктуру сідничного нерва і гальмує процеси демієлінізації аксонів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

И. Говбах, Е. Сможаник, М. Пацева, В. Рубцов, А. Устименко, В. Кирик, О. Цупиков

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА МЫШЕЙ С ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

В работе исследовали демиелинизацию у трансгенных мышей с периферической нейропатией и влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) жировой ткани на ультраструктурные особенности седалищного нерва этих мышей. Мышам линии B6.Cg-Tg(PMP22)^{C3Fbas/J} с периферической нейропатией

внутримышечно вводили ММСК, которые выделяли из жировой ткани мышей линии FVB-Cg-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенных по GFP. Для ультраструктурного анализа фиксации ткани у животных выполняли методом транскрипционной перфузии-фиксацией 4%-м раствором формальдегида и 2,5%-м раствором глутаральдегида через 16 недель после трансплантации. Электронно-микроскопические исследования седалищного нерва трансгенных мышей с периферической нейропатией показали дис- и демиелинизацию аксонов, формирование специфических структур, так называемых лукович, а также в отдельных случаях наблюдалась гипертрофия миелиновых оболочек. В совокупности ультраструктурные изменения в седалищном нерве трансгенных мышей подобны патоморфологической картине, которая наблюдается у пациентов с периферической нейропатией. На 16-й неделе после трансплантации ММСК мышам с наследственной нейропатией этих животных наблюдали утолщение миелиновой оболочки аксонов и увеличение количества ламелл в седалищном нерве. Трансплантация ММСК мышам с наследственной периферической нейропатией имеет протекторный эффект на ультраструктуру седалищного нерва и тормозит процессы демиелинизации аксонов.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; демиелинизация; периферическая нейропатия; электронная микроскопия; седалищный нерв.

**I. Govbakh¹, K. Smozhanik², M. Patseva²,
V. Rubtsov³, A. Ustymenko^{4,5}, V. Kyryk^{4,5},
O. Tsypkov^{2,4}**

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF SCIATIC NERVE IN MICE WITH PERIPHERAL NEUROPATHY AFTER TRANSPLANTATION OF ADIPOSE-DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

¹ Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine;

² O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: tsypkov@gmail.com

³ Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv;

⁴ State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;

⁵ D. F. Chebotarev Institute of Gerontology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

We investigated the peripheral demyelination in transgenic mice with peripheral neuropathy and the effect of adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells (ADSCs) transplantation on the ultrastructural features of the sciatic nerve in these mice. The B6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J transgenic mice with peripheral neuropathy were injected intramuscularly with ADSCs, which were isolated from the

adipose tissue of FVB-Cg-Tg(GFPU) mice transgenic by GFP. For ultrastructural analysis, tissue fixation in animals was performed by transcardiac perfusion-fixation with 4% formaldehyde solution and 2.5% glutaraldehyde solution 16 weeks after transplantation. Electron microscopic examination of fibers of the sciatic nerve in the transgenic mice with peripheral neuropathy showed that many axons in this nerve were subjected to dys- and demyelination; the so-called onion bulb-like structures were observed. In some fibers, hypertrophy of myelin sheaths was found. In general, ultrastructural modifications in the sciatic nerve of the transgenic mice were rather similar to the pathomorphological pattern observed in patients with peripheral neuropathy. At 16 weeks after ADSC transplantation, in the sciatic nerve in mice with peripheral neuropathy thickening of the myelin sheath and increasing of the number of lamellae were observed. Thus, ADSC transplantation in mice with hereditary peripheral neuropathy has a protective effect on the ultrastructural features of the sciatic nerve and inhibits the process of axon demyelination.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells; demyelination; peripheral neuropathy; electron microscopy; sciatic nerve.

REFERENCES

1. Boutary S, Echaniz-Laguna A, Adams D, Loisel-Duwattez J, Schumacher M, Massaad C, Massaad-Massade L. Treating PMP22 gene duplication-related Charcot-Marie-Tooth disease: the past, the present and the future. *Transl Res.* 2021;227:100-11.
2. Saporta MA, Dang V, Volfson D, Zou B, Xie XS, Adebola A, Liem RK, Shy M, Dimos JT. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp Neurol.* 2015;263:190-9.
3. Wu R, Lv H, Zhang W, Wang Z, Zuo Y, Liu J, Yuan Y. Clinical and pathological variation of Charcot-Marie-Tooth 1A in a large Chinese cohort. *BioMed Res Inter.* 2017;2017:6481367.
4. Mittendorf KF, Marinko JT, Hampton CM, Ke Z, Hadziselimovic A, Schleich JP, Law CL, Li J, Wright ER, Sanders CR, Ohi MD. Peripheral myelin protein 22 alters membrane architecture. *Sci Adv.* 2017;3:e1700220.
5. Corrado B, Ciardi G, Bargigli C. Rehabilitation management of the Charcot-Marie-Tooth syndrome: a systematic review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3278.
6. Won SY, Kwon S, Jeong HS, Chung KW, Choi BO, Chang JW, Lee JE. Fibulin 5, a human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells-secreted paracrine factor, attenuates peripheral nervous system myelination defects through the Integrin-RAC1 signaling axis. *Stem Cells.* 2020;38:1578-93.
7. Saller MM, Huettl RE, Mayer JM, Feuchtinger A, Krug C, Holzbach T, Volkmer E. Validation of a novel animal

- model for sciatic nerve repair with an adipose-derived stem cell loaded fibrin conduit. *Neural Regen Res.* 2018;13:854-61.
8. Vasyliiev RG, Rodnichenko AE, Shamalo SN, Demidchouk AS, Labunets IF, Chaikovskii YuB, Butenko GM. Effects of neural crest-derived multipotent stem cells on regeneration of an injured peripheral nerve in mice. *Neurophysiology.* 2015;47:80-3.
9. Yousaf Q, Tirmzi A, Ahsan S, Afroz A. Multipotent potential of human adult mesenchymal stem cells. *Biochem Mol Biol J.* 2018;4:16.
10. Baez-Jurado E, Hidalgo-Lanussa O, Barrera-Bailón B, Sahebkar A, Ashraf GM, Echeverria V, Barreto GE. Secretome of mesenchymal stem cells and its potential protective effects on brain pathologies. *Mol Neurobiol.* 2019;56:6902-27.
11. Wankhade UD, Shen M, Kolhe R, Fulzele S. Advances in adipose-derived stem cells isolation, characterization, and application in regenerative tissue engineering. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3206807.
12. Ustymenko 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;7:158-67.
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;8:315-17.
14. Mathot F, Shin, AY, Van Wijnen AJ. Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair. *Gene.* 2019;710:17-23.
15. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells: when, where, and how. *Stem Cells Int.* 2015;2015.:628767.
16. Kubiak CA, Grochmal J, Kung TA, Cederna PS, Midha R, Kemp SW. Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2020;61:449-59.
17. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem cell transplantation for peripheral nerve regeneration: current options and opportunities. *Int J Mol Sci.* 2017;18:94.
18. Cofano F, Boido M, Monticelli M, Zenga F, Ducati A, Vercelli A, Garbossa D. Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: current options, limitations, and future of cell therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2698.
19. Yousefi F, Arab FL, Nikkhah K, Amiri H, Mahmoudi M. Novel approaches using mesenchymal stem cells for curing peripheral nerve injuries. *Life Sci.* 2019;221:99-108.
20. Reichenberger M, Gazyakan E, Kohler S, Germann G, Engel H. A new, custom-made device for flap protection in experimental rats. *Microsurgery.* 2009;29:504-6.

Матеріал надійшов до редакції 29.04.2021