

Ім'я користувача:
Бех Станіслав Вікторович

ID перевірки:
1007851180

Дата перевірки:
13.05.2021 12:20:00 EEST

Тип перевірки:
Doc vs Internet + Library

Дата звіту:
13.05.2021 13:03:17 EEST

ID користувача:
77194

Назва документа: МД_Тимчишін М.Ю._2021-4check

Кількість сторінок: 82 Кількість слів: 19102 Кількість символів: 136959 Розмір файлу: 2.03 MB ID файлу: 1007946374

24.4% Схожість

Найбільша схожість: 23.7% з джерелом з Бібліотеки (ID файлу: 1000083204)

1.98% Джерела з Інтернету

79

Сторінка 84

24.1% Джерела з Бібліотеки

102

Сторінка 85

0.38% Цитат

Цитати

4

Сторінка 86

Не знайдено жодних посилань

0% Вилучень

Немає вилучених джерел

Модифікації

Виявлено модифікації тексту. Детальна інформація доступна в онлайн-звіті.

Замінені символи

83

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація складається зі вступу, трьох розділів та висновків. Загальний об'єм дисертації становить N сторінки, з них N сторінок основного тексту, 15 рисунків, 15 таблиць, 80 літературних джерел.

Темою роботи є дослідження процесу демієлінізації у трансгенних мишей C57BL/6 зі спадковою нейропатією ШМТ1А.

Актуальність теми. Спадкова нейропатія Шарко-Марі-Тута (ШМТ) є найпоширенішим моторно-сенсорним захворюванням з групи полінейропатій, що виводить її на високий рівень глобальної медико-соціальної значимості. Розповсюдженість цієї хвороби складає 1 хворий на 2500 осіб. Дана хвороба характеризується тим, що поряд із демієлінізацією периферичних нервів, порушенням чутливості та, інколи, болем, захворювання прогресує із характерною деформацією нижніх та верхніх кінцівок. Це призводить до порушення рухових функцій кінцівок, погіршення стереотипу ходьби, зниження рівня якості життя, повної втрати працездатності та набуття інвалідності. Ліків від ШМТ на сьогоднішній день не існує. Тому розуміння патогенезу фізіологічних змін нервово-м'язового апарату, які в подальшому призводять до деформації та грубого порушення біомеханіки кінцівок є необхідним для підбору найбільш адекватних та ефективних засобів симптоматичного (консервативного) лікування.

Об'єктом дослідження є рухова функція та стан сідничного нерва трансгенних мишей лінії C57BL/6 з надекспресією PMP22.

Предметом дослідження є зовнішні/поведінкові прояви хвороби (кількість зісковзувань задніх кінцівок, час проходження дистанції та індекс функціонального стану сідничного нерва); морфологічна структура демієлінізованих волокон (товщина мієлінових оболонок та кількість ламелей в цих оболонках); патологічні зміни функціональних характеристик сідничного нерва (амплітуди і швидкості проведення CNAP та параметрів часової затримки та амплітуди М-хвилі).

Мета дослідження – виявити всі особливості процесів демієлінізації у мишей з периферичною нейропатією ШМТ та на основі цього запропонувати і впровадити експериментальне симптоматичне лікування.

Завданнями роботи є: отримати приплід від трансгенних мишей; вибрати тварин з порушенням рухової активності та перевірити їх на гомозиготність по RMP22; розробити експериментальну частину роботи; провести дослідження стану всіх експериментальних груп мишей; проаналізувати результати дослідів; оцінити вплив демієлінізації нервових волокон піддослідних мишей в залежності від їх віку і статі на зовнішні прояви хвороби, морфологічні характеристики нервових волокон, та швидкість проведення нервового імпульсу. На основі отриманих результатів зробити висновки та запропонувати експериментальне медикаментозне лікування. Впровадити лікування та оцінити його вплив на піддослідних.

Методи дослідження. В роботі були використані такі методи: поведінковий тест на балансування, чорнильний метод паперової візуалізації відбитків стоп тварин, морфологічне дослідження ультратонких зрізів нерву, електрофізіологічне дослідження сідничного нерву.

Наукова новизна отриманих результатів:

1. Встановлено, що ступінь зниження рухової активності, посилення слабкості і тремору в задніх кінцівках залежить від статі та віку піддослідних тварин. Виявлено, що самки у 100% випадків мали ранню маніфестацію симптомів та більш агресивний перебіг хвороби в порівнянні з самцями того ж віку.
2. Виявлено, що демієлінізація була ярко вираженою у волокнах більшого діаметру (рухових), на відміну від волокон меншого діаметру, в яких мієлінові оболонки мали нормальну або навіть збільшену товщину.
3. Показано, що в умовах надмірної експресії RMP22 утворюється велика кількість електрон-щільних тіл (агрегати білка RMP22 з білками теплового удару HSP), які сприяють додатковому порушенню внутрішньоклітинного

транспорту та дисфункції протеасом у Шваннівських клітинах та стимулюють подальший розвиток процесів демієлінізації.

4. Показано, що внаслідок демієлінізації рухових нервових волокон CNAP та М-хвилі характеризуються набагато меншими амплітудами та більшими затримками порівняно зі здоровими мишами. Такі результати повністю відповідають отриманим патоморфологічним картинам.

5. Введення мезенхімальних стовбурових клітин позитивно вплинуло на рухову активність хворих мишей, дозволивши їм пройти дистанцію значно швидше та з меншою кількістю рухових помилок. Зокрема, виявлено, що вже через 4 тижні після введення стовбурових клітин у піддослідних відбувається помітне зниження тремору задніх кінцівок, зростання сили, а також частково відновлюється контроль над литковими м'язами.

6. Показано, що станом на 10-й тиждень після введення ММСК піддослідні демонструють поведінкові результати, що є дуже близькими до показників здорових тварин ($P > 0.05$). Цей факт підтверджує ефективність та результативність обраного симптоматичного лікування.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження роблять внесок у формування уявлень щодо функціональних втрат сідничного нерва, спричинених хворобою ШМТ, а також розширюють відомості про особливості патоморфологічних змін демієлінізованих нервових волокон. Дослідження механізму дії ММСК на рухову активність мишей за умов значної демієлінізації сідничних нервів становить значний інтерес, тому що обґрунтовує нові можливості ефективного використання даних клітин у якості стимулятора процесу проліферації «ураженого» нерва з метою покращення контролю над м'язовими скороченнями ослаблених кінцівок. Дана робота є комплексним аналітичним і практичним дослідженням хвороби Шарко-Маті-Тута типу 1A на моделі трансгенних мишей C57BL/6. Результати роботи можуть бути використані при проведенні схожих досліджень в інших наукових установах з метою оцінки стану демієлінізації периферичних

нервових волокон, впровадження симптоматичного (медикаментозного) лікування.

Ключові слова: *мієлін, демієлінізація, сідничний нерв, хвороба Шарко-Марі-Тута, миші C57BL/6, периферична нейропатія, рухова активність, патоморфологічний стан, складний нервовий потенціал дії, швидкість провідності, стовбурові клітини.*

ABSTRACT

The master's dissertation consists of an introduction, three chapters and conclusions, set out on N pages, including N pages of the main text, 15 figures, 15 tables, 80 bibliography titles.

Thesis research topic is “study of demyelination process in C57BL/6 transgenic mice with hereditary CMT1A neuropathy”

Relevance of the research topic. Hereditary motor-sensory Charcot–Marie–Tooth neuropathy (CMT) is the most common polyneuropathy group disease, which brings it to a global level of medical and social significance. Disease outspread comes about 1 case per 2,500 people. Besides guaranteed peripheral nerves demyelination and impaired sensitivity, CMT frequently proceeds with upper and lower extremities deformation and pain. This leads to impaired extremities motor function, worsening of the walking stereotype, reduced life quality, or even complete disability. There is currently no cure for CMT disease. Therefore, understanding of pathogenic physiological changes in the neuromuscular system, which leads to deformation and gross violation of the extremities biomechanics is necessary to select the most adequate and effective means of symptomatic (conservative) treatment.

Object of the thesis research is the motor function and sciatic nerve condition of transgenic mice line C57BL/6 with overexpression of PMP22.

Subject of the thesis research are external/behavioral disease manifestations (the number of slips of the hind limbs, the amount of time subjects needed to complete the distance and the sciatic nerve functional state index value); morphological structure of demyelinated fibers (thickness of myelin sheath and number of lamellae in these sheath); pathological changes in sciatic nerve functional characteristics (amplitude and speed of CNAP, M-wave latency and amplitude).

Goal of thesis research is to identify all the features of demyelination processes in mice with peripheral CMT neuropathy and based on this to propose and implement experimental symptomatic treatment.

To achieve this goal, there were determined **the following tasks**: obtain offspring from transgenic mice; select animals with impaired motor activity and check them for homozygosity for PMP22; develop the experimental part of the work; study the condition of all experimental mice groups; analyze the results of experiments; evaluate the demyelination effect on nerve fibers of experimental mice depending on their age and sex as follows: external manifestations of the disease, morphological characteristics of nerve fibers, and nerve conduction velocity. Based on the results obtained, draw conclusions and propose experimental drug treatment. Implement treatment and evaluate its impact on subjects.

Research methods. Behavioral balancing test, ink method of animal footprints paper visualization, morphological study of ultrathin nerve sections, electrophysiological study of the sciatic nerve.

Scientific novelty of the thesis research is presented in the following points:

1. It was found that decreased motor activity, increased weakness and tremor in the hind limbs depends on the sex and age of the experimental animals. It was found that females in 100% of cases had an early manifestation of symptoms and more aggressive disease course compared to males of the same age.
2. It was found demyelination was highly pronounced in fibers of larger diameter (motor ones), comparing to smaller diameter fibers having the myelin sheaths of normal or increased thickness.
3. It was also shown PMP22 overexpression consequently formed many electron-dense bodies (PMP22 and HSP aggregates) which contributes to additional intracellular transport disruption and protease dysfunction in Schwann cells, it also stimulates further development of demineralization processes.
4. It was shown demyelination of motor nerve fibers caused CNAP and M-waves to be characterized by much smaller amplitudes and greater delays compared to healthy mice. Such results completely correspond to the received pathomorphological pictures.
5. Mesenchymal stem cells injection had a positive effect on the motor activity of CMT mice, allowing them to overcome the distance much faster with fewer motor

errors. In particular, it was found that as early as 4 weeks after initial stem cells injection in the subjects showed remarkable decrease tremor of hind limbs, increased strength, and partially restored calf muscles control.

6. On the 10th week after stem cells injection, subjects already show behavioral results that are very close to those of healthy animals ($P > 0.05$). This fact confirms the effectiveness of the selected symptomatic treatment.

Research and the practical relevance of the study. The results of the study contributes to the formation of ideas about the functional loss of the sciatic nerve caused by CMT disease, as well as expand the understanding about the features of pathomorphological changes in demyelinated nerve fibers. The study of the MSCs action mechanisms on the motor activity of mice with significant demyelination of the sciatic nerves has a great interest. It justifies new opportunities for effective use of these cells as a stimulator of the "affected" nerve the proliferation to improve control of muscle contractions of weakened limbs. This work is a comprehensive analytical and practical study of Charcot–Marie–Tooth type 1A in the transgenic mice C57BL/6 mode. The results of the work can be used in similar studies in other scientific institutions to assess the state of demyelination of peripheral nerve fibers, the introduction of physical rehabilitation and/or similar symptomatic treatment.

Key words: *myelin, demyelination, sciatic nerve, Charcot–Marie–Tooth disease, C57BL/6 mice, peripheral neuropathy, motor activity, pathomorphological pattern, combined action potential, conduction velocity, stem cells.*

ВСТУП

Нейропатія Шарко-Марі-Тута (ШМТ) є найпоширенішою спадковою моторно-сенсорною нейропатією із загальносвітовою поширеністю 1 випадок на 2500 осіб. ШМТ - клінічно та генетично неоднорідне захворювання, що вражає як дітей, так і дорослих. У пацієнтів, як правило, спостерігається повільно прогресуюча дегенерація периферичних нервів, що призводить до м'язової слабкості, атрофії ніг і ступень, які пізніше поширюються на руки, викликаючи зниження сухожильних рефлексів та виникнення дистальних порушень чутливості. Деформації стопи типу *pes cavus* є одним із найчастіших проявів ШМТ, у пацієнтів іноді також спостерігається втрата слуху та дисплазія кульшового суглоба. Ці та інші симптоми, що відзначаються в різних підтипах СМТ, можуть спричинити значне зниження якості життя людей уражених цією хворобою.

ШМТ1А, спричинений дублюванням ділянки РМР22 розміром 1,4 Мб, становить 70% – 80% від усіх ШМТ1, і тому він є найбільш ретельно вивченим типом ШМТ. Різні моделі трансгенних гризунів *in vivo* показали, що надмірна експресія цього гена призводить до гіпомієлінізації/дем'єлінізації в клітинах Швана і ступінь її тяжкості залежить від інтенсивності експресії гена. На перших етапах дослідження цієї хвороби були зроблені зусилля щодо зменшення експресії РМР22 за допомогою простої аскорбінової кислоти (вітамін С) та антагоністів прогестерону. Було показано, що таке лікування покращує фенотип периферичної нейропатії шляхом зменшення експресії РМР22 і, як наслідок, ремієлінізації аксонів в сідничному нерві миші С22, яка надмірно експресувала людський ген РМР22. Однак ця методика не виявилась результативною під час клінічних випробувань. Пізніше було виявлено, що рівні РМР22 в інтактному мієліні були дуже мінливими серед пацієнтів з ШМТ1А і не було ніякої кореляції між тяжкістю захворювання та рівнем експресії РМР22. Одночасно експресія периферичного білка залишалась незмінною при лікуванні аскорбіновою кислотою та антагоністами

прогестерону. Ці спостереження свідчать про те, що експресія цього білка коливаються з часом, і ставить під сумнів дію механізму, що дозує RMP22.

Однією з можливих причин невдач у таргетуванні механізму експресії RMP22 може бути «недосконале» моделювання захворювання ШМТ1А на гризунах. Ці моделі зазвичай створені шляхом випадкової вставки кількох копій RMP22 з кДНК людини, оскільки вставка одного дубльованого сегмента ДНК розміром 1,4 Мб довгий час була неможливою. Таким чином, ці моделі можуть не точно відображати змінений геном або коливання експресії RMP22 у клітинах Швана. Це спонукає дослідників шукати істоковий патомеханізм, що призводить до зміни гомеостазу RMP22.

Великий практичний інтерес являє собою вивчення нових терапевтичних рішень, котрі б не поступалися в ефективності подолання симптомів хвороби більш дослідженим варіантам лікування. До таких перспективних рішень, яким приділяється значна увага належать: клінічні дослідження препарату РХТ3003 (на людях), терапія онапристоном антагоністом прогестерону (на щурах), ін'єкції мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини та багатьох інших препаратів (на мишах). Незважаючи на багатообіцяючі дані, що отримані з різних моделей тварин ШМТ, досі не було розроблено жодного клінічно успішного лікування.

Метою даної роботи є практичне дослідження фенотипічних особливостей демієлінізації у трансгенних мишей C57BL/6 з надекспресією RMP22. Не зважаючи на те, що вже існують тваринні моделі з доведеною фенотипічною схожістю до ШМТ1А (моделі трансгенних щурів, мишей C61, C58, C22, C3 та ін.), ми використовували саме C57BL/6, і для виведеного нами гомозиготного по RMP22 приплоду ми також показали вираженість фенотипу ШМТ1А. Провели поведінкові, морфологічні, електрофізіологічні дослідження на виведених мишах. Та в результаті, на основі отриманих даних було запропоноване експериментальне лікування, яке згодом свою ефективність.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ТЕОРЕТИЧНИХ ОСНОВ

1.1. Клінічна картина і основи класифікації спадкових моторно-сенсорних нейропатій

У структурі неврологічних захворювань істотне місце займають спадково-дегенеративні патології, переважна більшість яких проявляється в дитячому віці [4]. Це група важких генетично гетерогенних хвороб периферичної нервової системи, що характеризуються вираженим клінічним поліморфізмом: як між-, так і внутрішньородинним, а також різними нейрографічними показниками, які необхідно враховувати при діагностиці [21]. Різні форми передаються як по аутосомно-домінантним, так і по аутосомно-рецесивним та Х-зчепленому шляхам успадкування. Класифікація групи рухово-сенсорних нейропатій до сих пір не встановилася остаточно: з появою більш детальної генетичної інформації виділяють все нові форми цієї патології.

У клінічній практиці часто використовується стара медична термінологія, заснована на синдромальному описі. Виділяють 3 близьких за клінічними характеристиками форми: невральна аміотрофія Шарко-Мари-Тута (перонеальна м'язова атрофія), інтерстиціальний гіпертрофічний неврит Дежерина-Сотта (сімейна полінейропатія), спадковий синдром атаксії-арефлексії (Руссі-Леві) [1, 6].

Спадкова мото-сенсорна нейропатія, таким чином, являє собою повільно прогресуюче захворювання, основною ознакою якого є атрофія м'язів в дистальних відділах нижніх кінцівок. Перші симптоми - слабкість в ногах, швидка стомлюваність, парестезії, нерідко м'язові болі - "кramпи", відсутність або значне зниження сухожильних рефлексів. Іноді присутній позитивний симптом Бабинського. Нерідко спостерігаються розлади чутливості. З'являються характерна хода - степпаж (англ. Steppere - працюючий кінь); виявляється фрідрейхова стопа, кіфосколіоз. При дослідженні електростимуляції виявляється часткова або повна реакція переродження; на

електроміограмі видно ритм «частого колу» (окремі піки). Як правило, визначають виражене зниження швидкості проведення імпульсу (ШП) по моторним і сенсорним волокнам. Разом з електроміографією велике діагностичне значення має гістологічне дослідження біопсійного матеріалу м'язів. При патоморфологічному дослідженні виявляють дегенеративні зміни задніх корінців, периферичних нервів (може виявлятися гіпертрофічна нейропатія), задніх і бічних стовпів спинного мозку. Зміни в м'язах носять вторинний характер.

Процес поступово поширюється на проксимальні відділи кінцівок [1,6]. Для лікування таких хворих пропонуються подібні комплексні симптоматичні підходи: вітамінотерапія (переважно групи В), загальнозміцнююча терапія (амінокислоти, АТФ), антихолінестеразні препарати, фізіопроцедури, масаж, лікувальна фізкультура та ортопедичне лікування (у важких випадках - тенотомія). Підкреслюється, що при синдромі Дежерина-Сотта слід уникати охолодження, важкого фізичного навантаження [6]. Чоловіки хворіють дещо частіше, ніж жінки. При цьому в клінічних посібниках зустрічаються різні думки щодо початку маніфестації різних нозологій і типу успадкування [1, 6].

Існуючий поліморфізм клінічних проявів захворювання як в межах однієї сім'ї, так і міжсімейні в межах однієї форми, і в той же час, подібні фенотипічні прояви різних форм ускладнюють діагностику. Крім іншого, описані і відмінності в середньому віці маніфестації при сімейних і спорадичних випадках одних і тих же форм, однак, ще С.Н. Давиденков висловлював думку, що такі відмінності штучні, оскільки, в разі сімейного захворювання ознаки патології привертають до себе увагу в більш ранньому віці [12]. Фактично, класична форма ШМТ зустрічається рідше, ніж атипові [15]. Тому вивчення цих патологій приділяється багато уваги: постійно поповнюються відомості при клінічних формах, генетичної компоненти, ведеться пошук підходів до більш ефективної диференціальної діагностики. Так, наприклад, показано, що зміст міоглобіну в крові різко підвищено у хворих з прогресуючою м'язовою дистрофією і аміотрофією в порівнянні з нормою. Відомо, що кількість

міоглобіну в крові прямо корелює зі ступенем деструкції м'язової тканини, і, відповідно, його рівень у хворих з м'язовою дистрофією вище, ніж у хворих з невральною і спінальною аміотрофією, цей показник можна використовувати для диференціальної діагностики даних захворювань [9]. Іншим біохімічним тестом може бути вимір рівня глікозаміногліканів в сечі: при нейропатії ШМТ їх сумарна екскреція збільшена в 2-3 рази [8], причому головним чином за рахунок збільшення виведення хондроїтин -1 сульфатів з одночасним зниженням виділення гіалуронової кислоти [3].

Однак найбільш важливим в діагностиці периферичних нейропатій залишається електрофізіологічне дослідження. На основі цього патологію можна розділити на 2 великі класи, пов'язані відповідно з первинністю ураження мієлінової оболонки нервів (дем'єлінізуюча форма), або аксонів (аксональна нейропатія). У випадку сегментарної дем'єлінізації досліджуваного нерва спостерігається різке уповільнення швидкості проведення імпульсу (як правило, більш ніж на 40%). При аксональній нейропатії швидкість проведення нормальна або дещо знижена. Первинне ураження аксонів і мієлінової оболонки не завжди легко розділити, оскільки деякі аксональні невротії можуть бути пов'язані з вторинною дем'єлінізацією [18]. Проте, саме цей аналіз прийнятий за основу сучасної класифікації, і на його основі виділяють 2 домінуючі форми нейропатії Шарко-Марі-Тута - дем'єлінізуюча (СМТ1) і аксональна (СМТ2) [31]. В якості умовної межі для поділу форм використовують показник швидкості проведення імпульсу по сідничному нерву: дем'єлінізуюча форма характеризується зниженням ШПН по периферичних нервах (<38 м / с) [5], при аксональній формі швидкість проведення залишається інтактною або знижується незначно. Крім того, описана проміжна форма, при якій у хворих з'являються ознаки і СМТ1 і СМТ2, і спінальна форма СМТ, з залученням до патологічного процесу спинного мозку.

Дем'єлінізована форма СМТ1 починається на 1-2 десятилітті життя і характеризується дем'єлінізацією сенсорних і моторних нервових волокон, що

20

веде до значної редукції швидкості проведення нервового імпульсу (<38 м / с) [22]. Крім цього, характерні деформація стоп, дистальна м'язова слабкість і атрофія, порушення чутливості і ослаблення сухожильних рефлексів. Можуть спостерігатися атаксія і тремор верхніх кінцівок [11]. При класичній картині захворювання в біопсії нервової тканини присутні ознаки демієлінізації і ремієлінізації, з формуванням, при надлишку шваннівських клітин, так званих «цибулинних головок» [22]. ШМТ1 частіше успадковується по аутосомно-домінантному типу, але є і рецесивні і Х-зчеплені (домінантні і рецесивні) форми. При Х-зчепленому спадкуванні чоловіки уражені сильніше, а жінки можуть показувати деякі ознаки СМТ2 [37]. Клінічні симптоми СМТ1 подібні при мутаціях різних генів, експресуються в шваннівських клітинах - клітинах периферичної нервової системи (ПНС), які продукують мієлін - мультиламеллярну структуру, які охоплюють аксони в центральній і в периферичній нервових системах і забезпечує нормальну нервову провідність [20]. До них відносяться гени PMP22, P0, EGR2 і деякі інші гени. Аналогічну клінічну картину дають і мутації в гені Sx32, який також експресується в шваннівських клітинах [29, 38, 41].

Аутосомно-домінантні форми демієлінізуючих рухово-сенсорних нейропатій наведені в таблиці 1.1.

Складність прояву захворювання, навіть при одних і тих же мутаціях, варіює в широких межах [28, 43]. С. Tan і Р. Ainsworth (1994) вважають це явище доказом існування модифікованих генів [42], але наявний опис близнюків з різним ступенем тяжкості захворювання [28] робить цю гіпотезу неспроможною.

Разом з тим, різні мутації в одному і тому ж гені можуть давати нейропатії різного ступеня тяжкості. Наприклад, мутації в P0 можуть призводити до СМТ1В, DSS (синдром Дежерина-Сотта, так званий СМТ3) або СН (вроджена нейропатія: congenital neuropathy, СН; congenital hypomyelination neuropathy, СНН) [36]. Синдром Дежерина-Сотта (DSS, SDS, DSN, HMSN III) є важкою гіпертрофічною демієлінізованою мото-сенсорною нейропатією [37].

21

Спостерігається значна гіпомієлінізація нервових волокон з великими «цибулинними головками» [44].

Швидкість проведення нервового імпульсу значно уповільнена, може виявлятися підвищена кількість білків в спинномозковій рідині [24, 26]. CMT і DSS складають спектр пов'язаних захворювань, фактично, DSS є варіантом CMT1 і викликається мутаціями в генах P0, PMP22 [11, 31], але успадковується переважно по аутосомно-рецесивному типу [24, 37].

Таблиця 1.1.

Домінантні форми демієлінізуючої нейропатії Шарко-Марі-Тута (CMT1)

Захворювання	Ген	Локалізація гену	Вік маніфестації
CMT1A	PMP22	17p11;	1-ше десятиліття
CMT1B	P0	1q22	1-ше десятиліття
CMT1C	LITAF	16p13	2 десятиліття
CMT1D	EGR2	10q21	2 десятиліття
CMT1F	NF-L	8p21	2 десятиліття
CMT X	Cx32	Xq13	2 десятиліття
HNPP	PMP22	17p11;	3 десятиліття
HMSN 3	PMP22, EGR2	17p11; 8q23	2 роки

Клінічно ще більш важче захворювання носить назву вродженої нейропатії (CHN). Для цієї патології характерна вроджена гіпомієлінізація нервових волокон, важка м'язова слабкість, відсутність сухожильних рефлексів, сильне зниження швидкості проведення нервового імпульсу. Виявляється CHN вже у новонароджених [27], успадковується за аутосомно-рецесивним типом. До захворювання призводять мутації в генах MTMR2, PMP22, P0, EGR2 [23]. Аутосомно-рецесивні демієлінізуючі форми об'єднані загальною назвою CMT4. Класифікація цієї групи CMT, а також гени, мутації в яких відповідальні за дані субтипу, наведені в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2.

Рецесивні форми демієлінізуючої нейропатії Шарко-Мари-Тута (СМТ4)

Захворювання	Ген	Локалізація гену	Вік маніфестації
СМТ4А	GDAP1	8q13	ДИТИНСТВО
СМТ4В	MTMR2	11q22	2-4 роки
СМТ4В2	SBF2	11p15	1-2 десятиліття
СМТ4С	?	?	5-15 років
СМТ4D	NDRG1	8q24	1 -10 років
СМТ4Е	EGR2	10q21	3 народження
СМТ4F	Periaxin	19q13	1-3 роки
Вроджена гіпомієлінізуюча нейропатія	P0 BGR2 PMP-22	17p11; 1q22 10q21	3 народження

1.2. Молекулярний патогенез хвороби ШМТ

Регуляція мієлінізації. Існує два різних механізми формування компактного мієліну у хребетних - це формування мієліну центральної нервової системи (ЦНС) і периферичної (ПНС). Незважаючи на схожість функцій, ці два типи мієліну мають різну ультраструктуру, білкову композицію, ембріональне походження і генетичну основу [30]. Під час мієліногенезу одночасно активується транскрипція багатьох генів, що кодують мієлін-специфічні протеїни, що вимагає координації синтезу цих білків. Ретельно регулюється і переміщення як мРНК, так і білків в клітинних структурах [44]. На регуляцію транскрипції мієлінових генів впливають три різних сигнальних системи. Перший шлях - активізація взаємодій між аксонами і шванівськими клітинами, перехід до мієлінізуючого фенотипу і функціонування мієлін-утворюючих клітин. Зміни в експресії мієлінових генів можуть також змінювати здатність шванівських клітин відповідати на аксональний сигнал, керуючи, таким чином, першим процесом в розвитку або ремієлінізації. Другий шлях пов'язаний вже безпосередньо з білками, що знаходяться в ЕПР, чутливими до холестерину. Ці білки необхідні для регуляції біосинтезу білків і ліпідів. Третій шлях, опосередкований, зокрема, P0, так само бере участь в координації регуляції експресії мієлінових генів,

змінюючи структуру ансамблю білків в мієліну і їх компактизації. Ця сигнальна система, ймовірно, локалізована безпосередньо в мієліновій оболонці або паранодальних регіонах.

Порушення будь-якого з цих трьох шляхів може дати початок розвитку патологічного процесу, що веде до СМТ1. Наприклад, недостатність експресії гена EGR2 блокує перехід шванівських клітин з промієлінізованої в мієлінізовану стадію. Точкові мутації в гені RMP22 при СМТ1 порушують збірку мієліну в ЕПР, де поступово накопичується мутантний білок. Це збільшує кількість RMP22, доступного для формування комплексу з білків мієліну і, ймовірно, змінює каскад передачі сигналу між ядром і ЕПР в результаті зворотної регуляції транскрипції мієлінових генів. Зменшення кількості P0 викликає СМТ1, заважаючи процесу компактизації мієліну, і так само веде до порушень в каскаді сигналів, пов'язаних з адгезією, тим самим далі ускладнюючи регуляцію експресії мієлінових генів.

СМТ1 являється результатом руйнування одного або декількох різних, але взаємопов'язаних, клітинних шляхів, кожен з яких необхідний для нормальної мієлінізації [29]. В теперішній час існує тільки симптоматичне лікування даної групи захворювань, яке в силах уповільнити прогресію хвороби, але не вилікувати її. Одна з основних цілей вивчення нейропатії СМТ1 - це розвиток молекулярних підходів до раціональної генотерапії даного захворювання. Саме подальше розуміння СМТ1, як результату руйнування шляхів передачі сигналу (поза- і внутрішньоклітинних), залучених в регуляцію мієлінізації, зможе забезпечити основу для розробки генотерапії [29].

1.3. Роль аксональної дегенерації в формуванні демієлінізуючих нейропатій.

У спадкових демієлінізуючих нейропатіях патологічні зміни впливають на мієлінову оболонку, хоча в аксолемі перехватів Ранв'є теж спостерігаються деякі зміни – так звана вторинна аксональна дегенерація. На мишачих моделях

показано, що початкові дефекти в шванівських клітинах можуть вести до вторинних змін властивостей аксонів, включаючи схильність аксонів до дегенерації [44].

Відомо, що демієлінізація є патологічним фізіологічним маркером СМТ1, клінічні ознаки хвороби - м'язова слабкість і сенсорна недостатність - є результатом не демієлінізації, а дегенерації аксонів. Наприклад, швидкість проведення нервового імпульсу у дітей з СМТ1 знижена ще до прояву перших симптомів хвороби, і з прогресуванням хвороби істотно не змінюється [35]. Це говорить про те, що демієлінізація, як така, не є достатньою причиною появи ознак хвороби. До того ж, у хворих з СМТ1А показана чітка кореляція м'язової слабкості з амплітудою моторного потенціалу дії, а не зі швидкістю проведення нервового імпульсу. Даний факт також підтверджує провідну роль аксональної недостатності [29]. Ще одним підтвердженням провідної ролі аксональної дегенерації в розвитку захворювання є анатомічний доказ прогресії недостатності по довжині аксона у пацієнтів з СМТ1, а також у мишей з надекспресією гена PMP22 [29]. Таким чином, саме дистальна аксональна недостатність, а не демієлінізація, є основною причиною інвалідності при СМТ1.

Який молекулярний патогенез цього феномена? Численні дослідження показують, що при СМТ1 руйнуються взаємодії між аксонами і шванівськими клітинами, що є причиною значних змін у фізіології аксона. Наприклад, контакт аномальних шванівських клітин з аксонів призводить до збільшення щільності нейрофіламентів, порушення їх фосфорилювання, і зниження інтенсивності аксонального транспорту [29].

Зміни природи взаємодій між аксонами і шванівськими клітинами, такі як при СМТ1 або інших демієлінізуючих нейропатія, так само ведуть до модифікації фосфорилювання, аксонального транспорту, щільності упаковки нейрофіламентів, і власне аксональної дегенерації. Всі ці порушення є лише маркером, результатом прояву інших молекулярних аномалій структури і функціонування аксона, невідомих в теперішні час.

1.4. Генетичні основи нейропатії ШМТ. Роль гена PMP22 в патогенезі ШМТ1А

Біологічна роль PMP22. Ген PMP22 (peripheral myelin protein-22) кодує 160 амінокислотний інтегральний мембранний глікопротеїн, представлений чотирма доменами з загальною молекулярною масою 22 кДа. PMP22 (інша назва - gas3) локалізований в компактному мієліні нервової системи, який складається, в основному, з ліпідів з невеликим, але функціонально значущим змістом білків [29], і становить 2-5% від усіх мієлінових білків. PMP22 не є основним структурним білком мієліну, він експресується в багатьох інших клітинах тіла, але найбільше - в шванівських клітинах [44, 31].

Біологічна роль PMP22 в мієліні досі остаточно не ясна [28]. Крім специфічної структурної функції в мієліні, білок PMP22 є негативним регулятором клітинного росту фібробластів [22]. PMP22 в литкових нервах хворих з CMT1A експресується тільки на ранніх стадіях захворювання, а значить, не змінює зростання шванівських клітин, що передую початку фенотипічного прояву патології. У будь-якому випадку, ген PMP22 цікавий тим, що, з одного боку, різні мутаційні зміни (дозові і структурні) цього гена призводять до прояву різних захворювань (CMT1A, HNPP, DSS, CN), але, з іншого боку, два різних генетичних механізми (дуплікація і точкові мутації) формують один і той же фенотип (CMT1A) [26].

Миші, що несуть мутації Trembler (Tr) і Trembler-J (TrJ) (точкові мутації в гені PMP22) є модельним об'єктом для вивчення точкових мутацій в гені PMP22 людини [28], тим більше що мутація TrJ описана і у людини. Для вивчення надекспресії гена створюють модельні лінії трансгенних мишей, використовуючи кілька YAC (Yeast Artificial Chromosome) з різною кількістю вбудованих в них копій гена. Цим методом було показано, що від рівня надекспресії залежить тяжкість захворювання, тобто вона корелює з числом копій гена, а також, що зниження експресії цього гена призводить до HNPP [24]. Крім того, відомо, що рівень мРНК для PMP22 у пацієнтів з CMT1A значно вище, ніж у хворих з іншими демієлінізуючими нейропатіями. Отже,

26

HNPP і CMT1A є результатом різної кількості копій гена PMP22, і, тому, представляють модель фенотипічного прояву дії різних доз гена у людини [11].

1.5. Роль мієлінової оболонки у проведенні потенціалу дії в нервових волокнах

Нервові волокна - аксони нервових клітин, оточені оболонкою мієліну, утвореного олігодендроцитами в ЦНС і шванівськими клітинами в периферичних нервах. Нервові волокна поділяють на 2 типи - безмієлінові і мієлінові. Основна функція нервових волокон - проведення потенціалу дії. Швидкість проведення в мієлінових і безмієлінових волокнах різна і істотно залежить від діаметра нервових волокон [2]. (Рис.1.1)

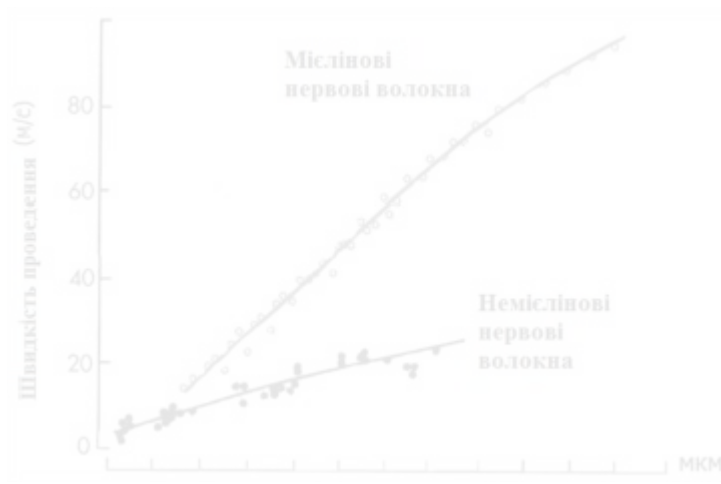


Рис. 1.1. Швидкість проведення збудження в мієлінових і не мієлінових нервових волокнах.

Поширення потенціалу дії по мієлінізованим нервовим волокнам завдяки особливостям механізму є переривчастим або стрибкоподібним (сальтаторним). Вимірювання показали, що в мієлінізованій ділянці волокна електричний опір мембрани приблизно в 5000 разів більше, ніж в перев'язці Ранв'є. Наявність настільки різномірних по електричній провідності ділянок

27

мембрани мієлінізованого волокна створює особливі умови для розповсюдження по ньому потенціалу дії (ПД). Генерація ПД в одному з перехваток Ранв'є призводить до того, що мембрана на цій ділянці перезаряджається, стаючи зарядженою з «плюсом» всередині і «мінусом» зовні [7]. (Рис.1.2)

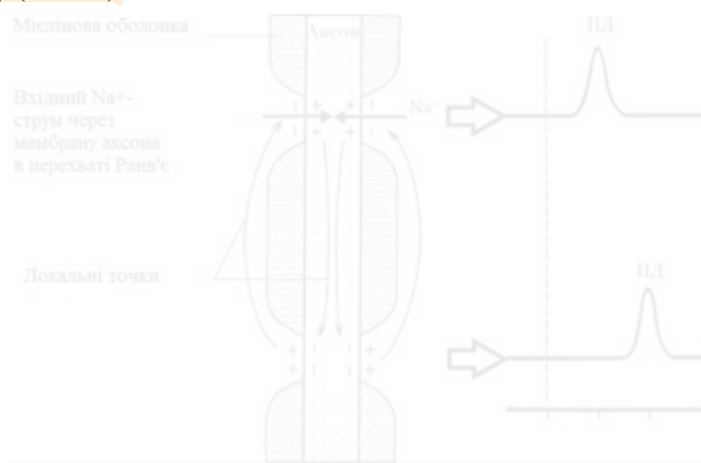


Рис. 1.2. Схема поширення потенціалу дії по мієлінізованим нервовим волокнам.

ПД, що виник в одному збудженому перехваті Ранв'є, викликає розвиток локальних струмів, що замикаються лише в наступному перехваті, де відбуваються деполяризація мембрани і генерація наступного ПД.

Між збудженим і сусідніми незбудженими мієлінізованими ділянками мембрани виникає різниця потенціалів. Ця різниця породжує місцеві електричні струми, але вони не можуть виходити назовні через мієлінову оболонку з огляду на її високий опір. Тому нерозтрачені витоком в зовнішнє середовище локальні струми течуть далі всередині аксона по аксоплазмі до сусіднього збудженого перехвату Ранв'є (див. Рис. 1.2.). Тільки там вони можуть проходити через мембрану, гасити її електронегативний заряд і замикатися [7].

Виникаюча такими локальними струмами деполяризація сусіднього перехвату активує вхідний трансмембранний натрієвий струм, приводячи до генерації ПД вже в сусідньому перехваті Ранв'є (див. Рис. 1.2.). Отже, ПД як би «перестрибує» через міжперехватні ділянки нервового волокна, покриті мієліновою оболонкою, і виникає тільки в перехватах Ранв'є. Такий механізм поширення збудження називається сальтаторним, або стрибкоподібним. Він дозволяє ще швидше і економічніше передавати інформацію в порівнянні з безперервним проведенням, оскільки в процес збудження залучається не вся мембрана, а тільки її невеликі ділянки.

Для поширення збудження важливо, щоб амплітуда ПД в 5-6 разів перевищувала величину деполяризації, необхідну для збудження сусіднього перехвату Ранв'є. В результаті такої значної різниці потенціалів між збудженим і не збудженим перехватом виникають іонні струми, поточні всередині аксона. Амплітуди струмів зберігаються досить великими, щоб деполяризувати не тільки найближчий перехват Ранв'є, а й один-два наступних. В результаті ПД може «перестрибувати» не тільки через один, але навіть через кілька перехватів. Таким чином, для мієлінізованих волокон характерний високий фактор надійності поширення ПД. Це має особливе значення при локальному зниженні збудливості сусіднього перехвату через механічний або фармакологічний вплив. Завдяки високому фактору надійності збудження буде поширюватися по волокну, незважаючи на пошкодження одного-двох перехватів Ранв'є [7].

Поряд з високим фактором надійності сальтаторне проведення ПД має ще ряд переваг в порівнянні з безперервним. Стрибкоподібна генерація ПД підвищує швидкість проведення збудження в мієлінізованих волокнах в 5-50 разів. Крім того, даний тип проведення збудження економить енергію для аксона. У мієлінізованих волокнах деполяризується тільки перехват, що дозволяє приблизно в 100 разів знизити втрату іонів. У зв'язку з цим знижуються витрати енергії, необхідні для відновлення трансмембранної різниці концентрацій іонів натрію і калію після проведення серії нервових

імпульсів. Нарешті, у великих мієлінізованих волокнах є ще одна особливість сальтаторного проведення: висока ізоляція мієлінової оболонкою в поєднанні з 50-кратно зниженою електричною ємністю мембрани дозволяє здійснювати реполяризацію ПД шляхом переміщення дуже незначного числа іонів [7].

Найважливіші закономірності процесу поширення збудження по нервових волокнах наступні:

1) потенціал дії поширюється по нервових волокнах без загасання, амплітуда потенціалу дії однакова на будь-якій відстані від місця його виникнення;

2) генерація ПД нервовими волокнами практично не викликає їх стомлення;

3) нервові волокна мають високу лабільність, тобто можуть відтворювати потенціал дії з дуже високою частотою;

4) відстань, на яку поширюється потенціал дії, обмежена тільки довжиною нервового волокна;

5) поширення потенціалу дії - активний процес, в ході якого змінюється стан іонних каналів мембрани волокна, а також витрачається енергія гідролізу АТФ для відновлення трансмембранних іонних градієнтів;

6) ПД поширюється по кожному нервовому волокну ізольовано - не переходить з одного волокна на інше. Це обумовлено значно меншим опором міжклітинної рідини в порівнянні з опором мембрани волокон. Через це між збудженими і не збудженими ділянками зовнішні місцеві струми проходять в основному по міжклітинній рідині, не затікаючи і не діючи на інші волокна;

7) проведення збудження по нервовому волокну можливо лише в тому випадку, якщо збережена його анатомічна і фізіологічна цілісність. Фактор надійності проведення сигналу у мієлінізованих нервових волокнах вище, ніж у немієлінізованих.

1.6. Структура мієлінової оболонки

Мієлінові клітини Шванна є радіально і поздовжньо поляризованими клітинами. При мієлінізації клітини Шванна організовуються в окремі мембранні домени, кожен з яких має унікальний набір білків і зв'язує набір цитоплазматичних компартментів. Мієлінова оболонка складається в основному з двох доменів - компактного і некомпактного мієліну, кожен з яких містить унікальний набір білків. Компактний мієлін утворює основну частину мієлінової оболонки і складається з щільно упакованих мембран. Поздовжня полярильність проявляється в загальній організації мієлінової клітини Шванна і аксона в вузлових, паранодальних і міжвузлових компартментах. Радіальна полярильність відмежована від навколишніх тканин та аксона чіткими внутрішньою (адаксональною) і зовнішньою (абаксональною) мембранними поверхнями. Адаксональна мембрана відокремлена від аксолеми щільною шириною якої 15 нм вона збагачена молекулами адгезії і рецепторами, які забезпечують взаємодію з родинними лігандами на аксоні. Вони підтримують периаксональний простір і перетворюють сигнали від факторів росту аксонів відповідно (Рис 1.3.). [25]

Абаксональна мембрана організована в паранодальний, юктапаранодальний і міжвузельний домени. Найбільшим таким доменом є міжвузля, що становить близько 99% довжини мієлінової клітини. Молекули гліальної адгезії, присутні уздовж міжвузля, включають мієлін-асоційований глікопротеїн (MAG) і нектиноподібні білки, Necl-2 (CADM1) і Necl-4 (CADM4). Зовнішня абаксональна мембрана прилягає до ламініну в базальній пластинці і опосередковує взаємодію з ним, особливо з інтегринами, включаючи $\alpha\beta 1$, який експресується спочатку, і β -дистроглікан, рівень експресії якого зростає при мієлінізації. На відміну від внутрішнього цитоплазматичного компартмента, який рівномірно розташований, зовнішній цитоплазматичний компартмент переривається періодичними аппозиціями між абаксональною мембраною і зовнішньою оболонкою компактної мієлінової оболонки. Ці аппозиції збагачені комплексом дистрогліканів,

31

пов'язаним через білок дистрофін-зв'язаний білок (Dp2), з периаксином, каркасним білком мієлінуючих клітин Шванна (рис.3). Ці аппозиції визначають мережу зв'язаних анастомозами цитоплазматичних каналів, які називаються смугами Кахаля. Ці цитоплазматичні канали які лежать на зовнішній стороні клітин Шванна і забезпечують шлях для відцентрового транспорту РНК і білків, які транспортуються з клітинної соми, до паранодального коміра.[32]

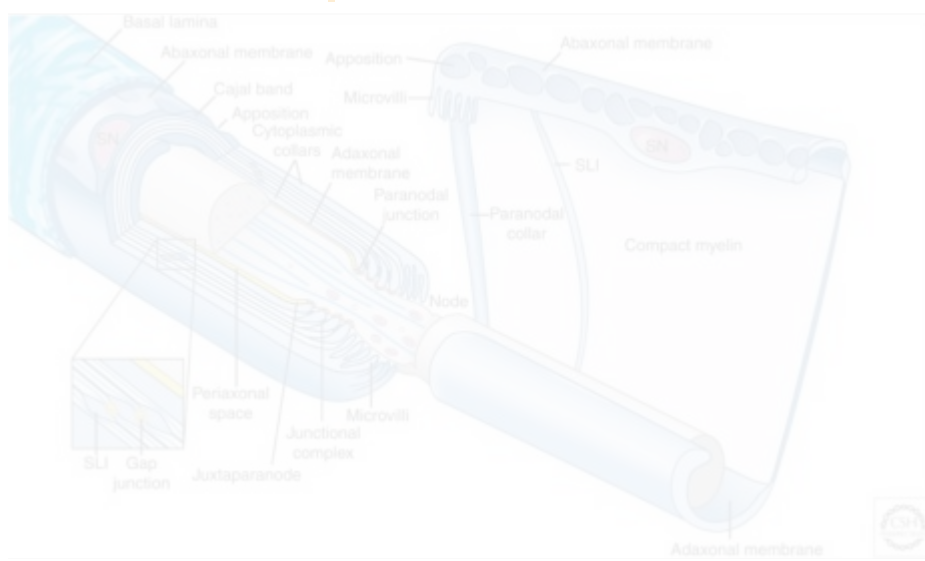


Рис. 1.3. Організація мієлінізуючих клітин Шванна.

Схематична організація мієлінізуючих шваннівських клітин (синій), що оточують аксон (сірий). Мієлінізуючі шваннівські клітини оточені базальною пластинкою (проілюстрована тільки зліва), яка знаходиться в безпосередньому контакті з абаксональною мембраною. Адаксональна мембрана шваннівської клітини відокремлена від аксональної мембрани периаксональним простором (показано жовтим кольором). Компактний мієлін переривається Шмідт – Лантерманівськими розрізами. Також зображені паранодальні петлі і переходи (червоні). [35]

Зовнішня мембрана смуг Кахаля взаємодіє з ламініном базальної пластинки через інтегрин $\beta 1$ і другий, окремий дістроглікановий комплекс. Відповідно до їх ролі в транспорті, смуги Кахаля збагачені великою кількістю білків цитоскелету, включаючи мікротрубочки, проміжні філаменти і актино-спектриновий комплекс. Вони також представляють сайти локалізованого синтезу білка і внутрішньоклітинної передачі сигналів через рецептори ламініну. Між цими двома мембранами знаходиться багат шарова, компактна мієлінова оболонка, яка утворюється в результаті окружного обгортання аксона плазматичною мембраною клітин Шванна.

Мієлін забезпечує оболонку з низьким опором і низькою ємністю, необхідну для поширення імпульсів за допомогою сальтаторної провідності. Сама мієлінова оболонка складається з 40 або більше пластин мієліну. Електронна мікрофотографія компактного мієліну виявляє міжперіодичні лінії, які являють собою аппозиції позаклітинних пластин, що чергуються з великими щільними лініями (MDL), що являють щільну аппозицію

цитоплазматичних пластин. Мієлін має унікально високу (~70%) кількість ліпідів у плазматичній мембрані збагаченій галактосфінголіпідами, насиченими жирними кислотами з довгим ланцюгом і, зокрема, холестеринном; останній грає важливу роль для збірки мієлінової оболонки. У компактній мієліновій оболонці відносно низький вміст білків вони, ймовірно, будуть досить стабільними в зрілій оболонці з обмеженим обігом, подібним за стабільністю до мієлінових білків ЦНС. [25]

Інші компактні мієлінові білки включають кілька тетраспанінів, зокрема PMP22, який часто мутує при спадкових невропатіях. Компактний мієлін переривається насічками Шмідта-Лантермана, які перемежуються уздовж міжвузля і найбільш поширені в високо мієлізованих волокнах великого діаметру. Дивно, але насічки Шмідта-Лантермана часто розвиваються після того, як мієлінова оболонка в значній мірі сформувалася, вони утворюються за рахунок подовження від внутрішнього або зовнішнього комірця цитоплазми шляхом окружного розширення в компактну мієлінову оболонку, що вказує на

активний процес розпаду мієлінових пластин. Пізнє утворення передбачає, що вони не відіграють істотної ролі при утворенні мієліну PNS, а виконують трофічну функцію. Це припущення узгоджується з мутантними шванноцитами які утворюють періаксини, та не мають насічок Шмідта-Лантермана і утворюють нестабільні мієлінові оболонки.

1.7. Аксональна регуляція мієлінізації

Як правило, мієлінізація розпочинається навколо аксонів діаметром ≥ 1 мкм, що узгоджується з теоретичними моделями, які припускають, що мієлінізація збільшує швидкість провідності в аксонах PNS з діаметрами ≥ 1 мкм. При збільшенні діаметра аксона товщина мієлінової оболонки та довжина міжвузля, спільний простір мієлінової мембрани тісно пов'язані з діаметром аксона. Таким чином, аксони не тільки запускають процес мієлінізації, але визначають кількість мієліну, який утворюють Шваннівські клітини. Відомо що аксони, призначені для мієлінізації, є як більшими, так і біохімічно різноманітнішими, оскільки вони виділяють більш високі рівні, фактору росту NRG1, який є ключовим тригером для мієлінізації. Передача сигналів NRG1 регулює практично всі аспекти роботи шваннівських клітин. NRG1 також необхідний для мієлінізації, оскільки в моделях в яких рецептори NRG1 були інактивовані під час пізнього розвитку клітин Шванна розвивається гіпомієлінізація периферичних нервів.

Згодом було показано, що високі рівні експресії NRG1 типу III, на аксонах, корелюють з долею аксонів; таким чином, аксони, які будуть мієлінізовані, експресують набагато більш високі рівні NRG1 типу III, ніж аксони в волокнах Ремака. Важливо відзначити, що примусова експресія NRG1 типу III в симпатичних волокнах, які зазвичай немієлізовані, приводила до їх мієлінізації in vitro. Гаплонедостатність або повна генетична інактивація NRG1 ізоформи типу III, призводить до значної гіпомієлінізації PNS, зниження відсотка мієлінових аксонів і аберрантним сортування в волокнах Ремака.

Нарешті, надекспресія ізоформи NRG1 типу III в нейронах призводить до значної гіпермієлінізації.[40]

Разом ці результати показують, що NRG1 типу III є інструктивним сигналом; порогові рівні запускають мієлінізацію клітин Шванна, при перевищенні цього порога, кількість утвореного компактного мієліну ґрадується до рівнів NRG1. Оскільки NRG типу III також контролює проліферацію і виживання клітин Шванна, підвищені рівні NRG1 типу III стимулюють генерацію додаткових клітин Шванна, необхідних для мієлінізації, тим самим координуючи кількість клітин з їх мієлінізацією. Як тільки мієлінізація завершена, поточна передача сигналів від аксональних рецепторів NRG1 або erbB не потрібно для підтримки мієлінової оболонки. Це уявлення узгоджується з рідкісними «подвійними» мієліновими оболонками, в яких зовнішня мієлінова оболонка зміщена від контакту з аксонів, але продовжує підтримуватися. Всі ізоформи NRG1, в тому числі тип III, розщеплюються металопротеїназами тільки позаклітинно на плазматичній мембрані. [40]

1.8. Мезенхімальні стовбурові клітини та їх механізми впливу на ремієлінізацію

Мезенхімальні стовбурові клітини представляють собою клітинну популяцію, яка знаходиться в своїй ніші в межах повністю спеціалізованих тканин [45]. В даний час існує велика кількість даних, що вказують на те, що ММСК представляють незалежну популяцію стовбурових клітин із властивостями самооновлення та встановленим мультипотентним профілем диференціації in vitro [45, 46]. Їх здатність до самовідновлення і диференціації викликає великий інтерес до клітинної терапії [45].

В якості джерела цих стовбурових клітин були охарактеризовані такі тканини як: кров, печінка, пульпа зуба, шкіра та жирова тканина, відповідно до міркувань, що стосуються процедури збору, кількості клітин, ступеня зрілості і профілю диференціації клітин [45, 47].

Згідно з визначенням комітету з мезенхімальних і тканинних стовбурових клітин міжнародного товариства клітинної терапії, мезенхімальні стовбурові клітини мають демонструвати виражену експресію стромальних маркерів CD73 і CD105 і бути негативними до гемопоетичних маркерів CD14, CD34 та CD45 [46]. Окрім того, ці клітини мають бути пластичними, мати фібробластоподібну морфологію і зберігатися в культурі протягом тривалих періодів часу та мати потенціал для остеогенної, адипогенної і хондрогенної диференціації. Однак популяції клітин, які відповідають всім цим критеріям, ймовірно, все ще будуть гетерогенними [45, 47, 48].

Таким чином, термін МСК в даний час охоплює доволі гетерогенну за проліфераційним потенціалом та здатністю до диференціації групу клітин і використовується для позначення як мезенхімальних стовбурових клітин, так і мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин [45,48].

Найбільш корисною характеристикою мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин є їх неіммуногенний профіль [45, 46]. Встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини мають головний комплекс гістосумісності (МНС) I, але не мають МНС II, що призводить до інактивації Т-клітин та імуносупресивних властивостей ММСК [45, 49].

Також повідомляють про те, що ММСК мають імуномодулюючі ефекти за рахунок їх впливу на дозрівання дендритних клітин, а також проліферації і диференціювання В-клітин людини [45].

Цікаво, що ММСК секретують різні хемокіни, цитокіни і білки позаклітинного матриксу, які приймають участь в різних біологічних процесах, включаючи гематопоез, ангіогенез, перенесення лейкоцитів, імунні та запальні реакції [45, 48]. Ці дані відкривають великі перспективи для терапії на основі ММСК, що дозволяє проводити аlogenну трансплантацію без необхідності імуносупресії [48,49].

Присутні в жировій тканині мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини (ММСК) були виділені відтвореним чином, і вони змінили уявлення наукових та медичних кіл про жирову тканину. Ці клітини були виділені з

стромальної судинної фракції, і аналогічно клітинам з кісткового мозку демонстрували пластичність та високий проліферативний потенціал і представляли собою типові стовбурові клітини [45].

У літературі для цих клітин були запропоновані різні терміни: процесовані ліпоаспірати, дорослі стовбурові клітини отримані з жирової тканини, або мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини.

Ця група клітин має адипогенний, остеогенний, хондрогенний, міогенний, кардіогенний та нейрогенний потенціал *in vitro* [45]. Порівняльний аналіз цих мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин показав, що, хоча вони мають загальні властивості стовбурових клітин для ММСК, вони помітно відрізняються за чисельністю популяції, швидкістю проліферації та здатністю до диференціації [45, 47]. Завдяки чому мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини вважаються гарними інструментами для заміни, відновлення і регенерації мертвих, або пошкоджених клітин [45, 46, 49]. Більш того, жирова тканина та ММСК містяться в ній проявляють властивості, що роблять їх більш ефективними в регенеративній медицині [45, 49].

Ці клітини в даний час ізольовані від підшкірної жирової клітковини, що дозволяє швидко отримувати їх у великих кількостях і з високою клітинною активністю [46, 47]. Частка цих клітин складає від 2%, але іноді їх кількість може наблизитися до 30% від загальної кількості клітин стромальної судинної фракції жирової тканини, і вона вважається найвищою у всіх тканинах [47].

Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини мають більш низький рівень експресії асоційованих зі строною маркерів CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 і CD106 [45]. Ці патерни експресії особливо чітко проявляються при пізніх пасажах культур ММСК жирової тканини. Специфічні маркери експресії CD10, CD36 та CD106 дозволяють відрізнити їх ММСК кісткового мозку.

Окрім того Melkiades et al. продемонстрував, що популяції стовбурових клітин жирової клітковини людини, мали високий рівень експресії CD34, на відміну від ММСК кісткового мозку. Однак про експресії цього антигену

повідомлялося тільки в ранньому пасажі культури [48]. Також відомо про взаємозв'язок між маркером CD34 і гіпоксією. CD34 є ніш-специфічним маркером клітин попередників, тоді як гіпоксія пов'язана з підтриманням недеференційованого стану дорослих стовбурових клітин [45, 48].

Мультипотентні стовбурові клітини жирової клітковини від молодих донорів демонстрували більш високу швидкість проліферації в порівнянні з літніми донорами, але здатність до диференціації зберігалася з віком, таким чином маючи переваги в порівнянні з стовбуровими клітинами кісткового мозку [45, 48].

Також ММСК жирової тканини зберегли свій потенціал диференціюватися в клітини мезодермального походження, і вони широко відомі своєю низькою імуногенністю і модулюючими ефектами [46]. Менше 1% з них експресували білок HLADR на своїй поверхні, що призводило до імуносупресивних ефектів і робило їх придатними для клінічного застосування при алогенних трансплантаціях і в терапії резистентних імунних розладів [45, 48, 50].

Ці особливості ММСК жирової тканини в цілому, сприяють відновленню тканин, де очікується, що проліферація клітин, ангіогенез та протизапальні процеси будуть відбуватися швидко в пошкоджених місцях [45].

Потенціал регенерації і терапевтична цінність ММСК також полягає в їх секретомі, який багатий позаклітинними білками і факторами росту. Цей секретом має позитивний вплив за рахунок паракринної активності мезенхімальних стовбурових клітин [50, 51].

До складу секретому ММСК належать ряд сигнальних білків зокрема нейротрофіни, цитокіни та проангіогенні фактори в основному включають PDGF, FGF, VEGF, HGF, ангіопоедини (Ang-1 і Ang-2), серед яких PDGF присутній в найбільш високих концентраціях [45, 50, 52].

Цитокіни секретому ММСК жирової тканини людини в основному включають ангіогенні, гемопоетичні і прозапальні цитокіни, такі як HGF, VEGF, ліганд flt-3, G-CSF, GM-CSF, IL-7, M-CSF, IL-6, IL-8, IL-11, LIF і **TNF α**

[52]. Окрім того ММСК також секретують адіпокіни, такі як FGF, IL та IGF-зв'язуючий білок, PDGF, TGF- β , TNF- α і VEGF [50, 52]. Білки секретомів в основному пов'язані з цитоплазмою, ядром та ендоплазматичним ретикуломом. Ці білки виконують функцію регуляції клітинної метаболічної активності, передачі сигналів клітин, відновлення ДНК, активації цитоскелету, а також проліферації клітин [45, 51, 53].

На моделях травми сідничного нерву секретом ММСК, відновлював баланс цитокинів, зменшував запалення, а також підсилював синтез колагену і міграцію дермальних фібробластів та клітин Швана, що сприяло відновленню функції нерву [45, 52, 54]. Також відомо, що гіпоксичний стан впливає на характеристики стовбурових клітин, включаючи їх секреторну ефективність [50]. Wang et al. документально підтвердили, що гіпоксичний стан збільшує швидкість проліферації ММСК і посилює їх функцію загоєння ран за рахунок активації VEGF і FGF [50, 52]. Також гіпоксія здатна збільшувати міграційний потенціал мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин за рахунок збільшення експресії SDF 1. Крім того, до складу секретому ММСК, входять такі сигнальні молекули як: фактор росту кератиноцитів (KGF), TGF- β 1, HGF і VEGF які також відіграють роль в загоєнні ран [45, 50, 55].

В процесі дослідження (Ribeiro et al.) виявив підвищену метаболічну активність нейрональних клітин при введенні секретому ММСК з додаванням фактора росту bFGF [56]. Також відомо, що сфингозин-1-фосфат та цитокини секретому ММСК здатні впливати на процеси запалення в нервовій системі [50].

Окрім того є свідчення про те, що секреція VEGF, TGF- β і фактора росту гепатоцитів сприяє регенерації аксонів на моделях аксонопатії. А вивільнений тканинний інгібітор металлопротеїнази та програнулін опосередковують нейрозахисний потенціал ММСК [45, 51, 57]. У цьому контексті IGF-1 і BDNF, як було показано, покращують функціональне відновлення при навчанні та поведінці на моделі щурів [54]. Дослідження in vitro також вказують на те, що ММСК відіграють вирішальну роль в регенерації тканин за рахунок

індукованої NGF активації 5'-AMP-активованої протеїнкінази (AMPK) [52, 58].

Крім того, мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини пом'якшують окисний стрес в стресованих нейроноподібних клітинах та відновлює морфологію, життєздатність і електрофізіологічну активність клітин.

Інше дослідження показало, що VEGF-A і VEGF, отримані з секретому ММСК, були ефективні в зниженні рівня болю у щурів з невропатією, які отримували оксаліплатин [52, 54].

Також відомо, що механічне пошкодження ММСК підсилює секрецію VEGF, G-CSF, HGF, лептину, IL-8, PDGF-BB та екзосом, які здатні посилювати проліферативну активність та рухливість клітин Шванна *in vitro* [59]. Крім того, окисний стрес і гіпоксія також підвищували рівень VEGF, IL-8, PDGF, лептину і ангіопоетину-2 в середовищі для культивування клітин [52, 55].

Тому саме через наведені вище властивості цьому дослідженні нами були обрані мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини як засіб для клітинної терапії для регенерації сідничного нерву, оскільки підшкірна жирова клітковина є багатим джерелом мультипотентних стовбурових клітин, а секретом ММСК до складу якого входять фактори росту сімейства нейротрофінів сприяє аксональному росту та виживанню мієлінізуючих клітин [45, 51, 60].

1.9. Висновки до розділу 1

Хвороба Шарко-Мари-Тута – генетично різнорідна група спадкових нефропатій, які характеризуються хронічною моторною і сенсорною полінейропатією. Захворювання класифікують згідно типам успадкування, неврологічним змінам і клінічним симптомам.

40

Хвороба Шарко-Мари-Тута спричинена мутаціями, які викликають дефекти у білках нейронів. Більшість мутацій при ШМТ уражають мієлінову оболонку периферичних нервів.

Найбільш поширеним типом ШМТ є ШМТ1А, який зустрічається у 80% осіб з ШМТ. При ШМТ1А відбувається розлад периферичної мієлінізації в результаті дублювання в білка (PMP22) гену периферичного мієліну. Незалежно від особливостей мутації гену білків мієлінової оболонки, які дещо відрізняються в залежності від типу ШМТ1, мутації призводять до змін в якості та структурі мієліну, який є нестійким і мимовільно розпадається. Цей процес призводить до демієлінізації сенсорних та моторних нервів, що призводить до рівномірного уповільнення швидкості провідності у них. Уповільнення провідності рухових і чутливих нервів викликає зниження сили м'язів та порушення чутливості.

Спираючись на літературний огляд щодо мезенхімальних стовбурових клітини жирової тканини, вони були обрані нами як засіб для клітинної терапії для регенерації сідничного нерву, оскільки підшкірна жирова клітковина є багатим джерелом мультипотентних стовбурових клітин, а секретом ММСК до складу якого входять фактори росту сімейства нейротрофінів сприяє аксональному росту та виживанню мієлінізуючих клітин

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали дослідження

Матеріалом нашого дослідження були трансгенні миші лінії C57Bl. Це найбільш широко поширений вид генетично модифікованих мишей, які використовуються для дослідження різних захворювань людини. Серед яких і периферична нейропатія Шарко-Марі-Тута, перебіг якої у мишей даної лінії схожий на протікання хвороби у людей. Миші цієї лінії є другим видом ссавців, геном якого був повністю записаний та опублікований. Також трансгенні миші лінії C57Bl широко використовуються через свої сприятливі селекційні характеристики.

Отримання трансгенних мишей здійснюється за допомогою перенесення клонованих генів (ДНК) в ядра запліднених яйцеклітин (зигот) або ембріональних стовбурових клітин. Потім у репродуктивні органи самки-реципієнта пересаджують модифіковані зиготи або яйцеклітини, у яких власне ядро замінено на модифіковане ядро ембріональних стовбурових клітин, або бластоцисти (ембріони), що містять чужорідну ДНК ембріональних стовбурових клітин.

Дослідження проводили на особинах чотирьох поколінь F1, F2, F3, F4 по двох паралельних лініях. Тобто, були виведені покоління від двох сімей. Для проведення дослідження були отримані трансгенні батьківські особини 4 самки і 4 самці, які були розділені на дві окремі сім'ї, по 2 самці і 2 самки. Пізніше із F1 отримали друге покоління F2. Від першої сім'ї отримали 8 особин, від другої – 6 особин (рис. 2.1.).

Після перевірки мишей на гомозиготність по гену PMP22 шляхом виділення ДНК і секвенування, із усього покоління F2 було відібрано батьківські особини для репродукції третього покоління F3. Також було створено 2 сім'ї. Для першої сім'ї відібрано 2 самці і 3 самки, для іншої 1 самець і 2 самки. В результаті приплід F3 нарахував 25 особин: 15 особин від

першої сім'ї і 10 особин від другої. Для наступних поколінь проводили аналогічні дії.

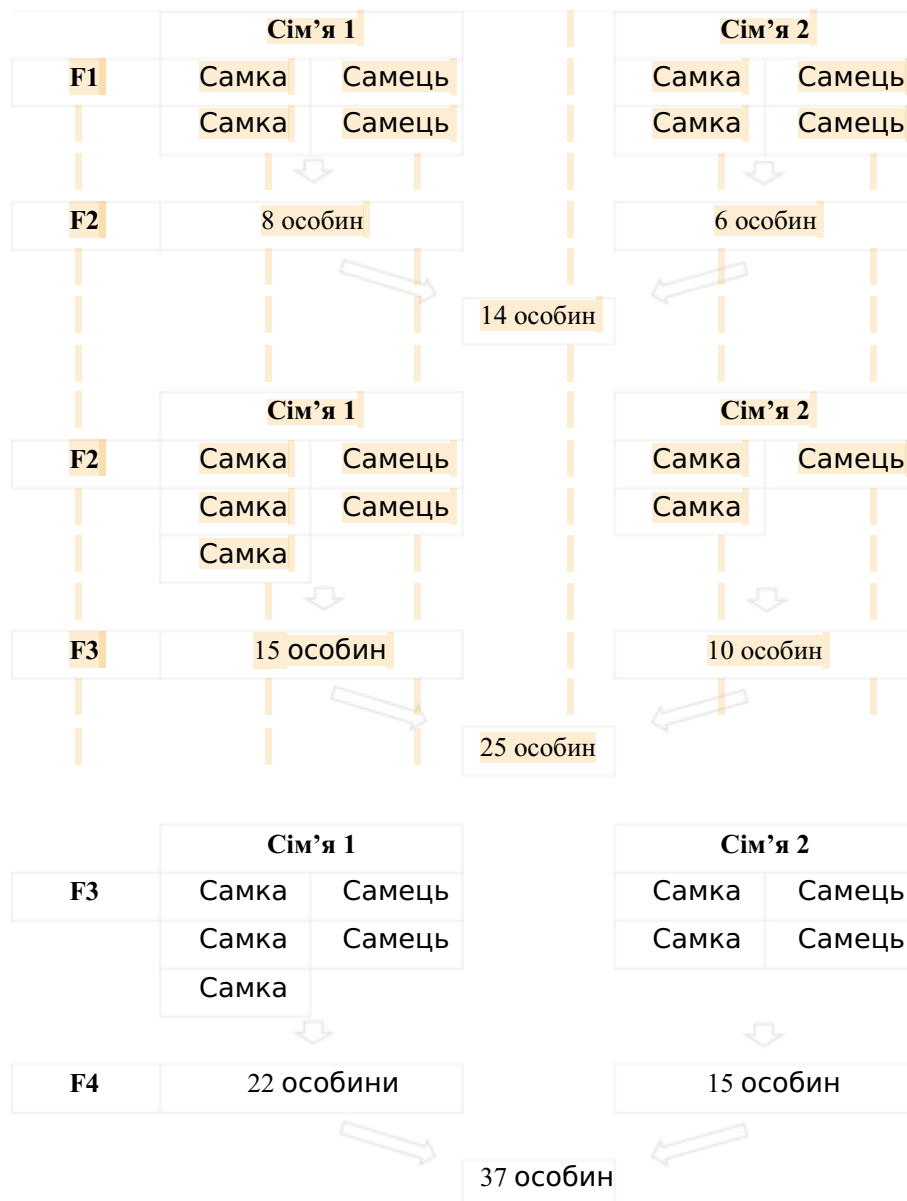


Рис. 2.1. Родовід трансгенних мишей для поведінкового тесту

2.2. Підґрунтя для впровадження обраних досліджень

При захворюванні ШМТ відбуваються порушення мієлінізації в периферичних нервових волокнах пов'язані з надекспресією білка PMP22 [61]. Точкові мутації гена PMP22 в ШМТ1А порушують збір мієліну в ендоплазматичному ретикулумі, і мутантний білок поступово накопичується [62, 63]. Ця ситуація призводить до збільшення кількості PMP22, доступного для утворення комплексу білків мієліну, та модифікує сигнальний каскад між ядром та ендоплазматичним ретикулумом в результаті зворотної регуляції транскрипції мієлінових генів [63].

Як було встановлено, штам мишей C57Bl/6 є найбільш адекватною твариною моделлю для досліджень ШМТ1А [64]. Перебіг такої патології у мишей максимально схожий на перебіг вищезазначеного захворювання у людей. Оскільки ефективного медикаментозного лікування цієї хвороби не існує (лікування може бути лише симптоматичним), сучасні дослідження здебільшого вказують на фізичну реабілітацію як на головний та необхідний інструмент у лікуванні людей, які страждають на ШМТ. Очевидно, що розуміння патогенезу змін опорно-рухового апарату під час цього захворювання є необхідною умовою пошуку найбільш адекватних та ефективних фармакологічних засобів та методів фізичної реабілітації [65–68].

Враховуючи, що інформація про особливості рухової активності у мишей C57Bl/6 є досить обмеженою, ми, в експериментах, описаних нижче, оцінили характер рухової координації у цих тварин за допомогою тесту на баланс. Цей тест дозволяє оцінити залежність рухової активності нормальних і трансгенних мишей в залежності від ступеня порушень в процесі мієлінізації нервових волокон.

Біопсія тканини периферичних нервів за класичної картини цього захворювання продемонструвала прояви демієлінізації та ремієлінізації [69].

При спадкових демієлінізуючих нейропатіях патологічні зміни охоплюють здебільшого мієлінові оболонки, тоді як деякі зміни спостерігаються також в аксолах вузлів Ранв'є та в оточуючих структурах (так

звана вторинна дегенерація аксонів) [70]. Моделі ШМТ in vivo показали, що початкові дефекти клітин Шванна можуть призвести до вторинних змін аксонів, включаючи їх виражену дегенерацію [62, 71].

Численні дослідження дозволили дослідникам зробити висновок про те, що взаємодія між аксонами та клітинами Шванна руйнується при ШМТ1, що призводить до значних змін у фізіологічних характеристиках аксонів [71, 72]. Зокрема, контакт аномальних шваннівських клітин з аксоном призводить до збільшення щільності нейрофіламентів, порушення їх фосфорилування та зменшення інтенсивності аксонального транспорту [73]. Усі ці патологічні явища, що безпосередньо пошкоджують аксони, є лише маркером, результатом проявів інших молекулярних відхилень у структурі та функціях аксонів, які ще недостатньо вивчені.

Саме тому, в морфологічному дослідженні, ми вивчали ультраструктурні характеристики волокон сідничного нерва трансгенних мишей C57BL/6 та контрольних нормальних мишей.

У хворих на ШМТ1А розвивається виражена демієлінізація сенсорних та рухових нервових волокон, що призводить до значного зменшення швидкостей провідності через ці волокна [74]. Останнє явище спостерігалось також у мишей штаму C57BL/6, генетичної моделі тварини ШМТ1 [75].

У людини електрофізіологічні методи широко використовуються для діагностики нервово-м'язових розладів та нейропатій. У цьому випадку вимірювання швидкості провідності через периферичні нерви є звичайною процедурою. Зміни цього параметра можуть забезпечити об'єктивну інформацію про інтенсивність патологічних змін у цих нервах, зокрема про ступінь демієлінізуючих процесів [76]. Реєстрація складних нервових потенціалів дії (CNAP), амплітуда яких корелює з кількістю функціональних збуджених нервових волокон, і так званої М-хвилі, що відображає кількість збуджених моторних волокон і стан нервово-м'язової передачі, є досить цінною діагностикою різних нейропатій.

У той же час об'єктивні дані про функціональні зміни ПНС мишей штаму C57BL/6 досить обмежені. Таким чином, ми спробували оцінити різницю між швидкостями провідності через великий периферичний нерв та характеристиками нервово-м'язової передачі у мишей штаму C57Bl/6 із спадковою периферичною нейропатією та здорового штаму C57Bl.

2.3. Методика проведення поведінкових тестів

2.3.1. Експериментальні групи для першої серії тестів

У дослідженні використовували 8 груп мишей вагою 22–29 г. До груп 1 - 4 увійшли здорові контрольні (С) тварини обох статей (самці, М та самки, F), віком 15 та 20 тижнів (СМ15, СМ20, CF15 та CF20; n = 6, у кожній групі). Групи 5 – 8 склалися з генетично модифікованих тварин лінії C57Bl/6 з периферичною нейропатією (Np), також обох статей та різного віку (в межах кожної окремої групи вік однаковий), тобто NpM15, NpM20, NpF15 та NpF20 відповідно. Всі вищезазначені групи також включали по 6 мишей. Батьківські тварини (до піддослідних) були отримані з лабораторії Джексона (США). Мишей утримували у стандартних умовах віварію, з вільним доступом до їжі та води. За двадцять хвилин до початку тестування клітини з мишами розміщувались у затемненому приміщенні, що дозволяло тваринам швидше адаптуватися до умов тестування та знижувати рівень стресу.

2.3.2. Перша серія поведінкових тестів на балансному промені

Для проведення поведінкового тесту ми використовували спеціальну установку, що складається з циліндричної дерев'яної балки (діаметром 2 см, довжиною 110 см), встановленої під невеликим кутом (близько 10 град) відносно горизонтальної площини і ведучої до входу в затемнену коробку, яка представляла собою комфортне приміщення (притулок) для випробовуваної миші (рис. 2.2.).



Рис. 2.1. Схема установки для поведінкового тесту. А) Циліндрична дерев'яна балка, довжина 110 см, діаметр 2 см, В) затемнене приміщення (укриття), і С) база з пінопластовою подушкою.

Рухову поведінку тварини на балці фіксувала відеокамера. Використовуючи ці записи, можна оцінити повний час проходження твариною тестової дистанції та кількість рухових помилок (зісковзувань задніх кінцівок з балки). Перед кожним тестуванням кожен мишу тренували, розміщуючи її на промені на невеликій відстані від входу в коробку, дозволяючи їй подолати задану відстань. У подальших випробуваннях відстань поступово збільшувалася. Тренування проводились до тих пір, поки миша не змогла стабільно подолати всю відстань без сторонньої допомоги. Під балкою була пінопластова подушка, що запобігала травмуванню тварини у разі падіння. Після успішного тренування мишу саджали на початок маршруту для проходження повної дистанції; її рухову активність фіксували на відеокамеру до самого моменту входження в коробку. Після цього вхід закривали і давали тварині відпочити протягом 1 хв. Потім тестування повторювали (10 успішних випробувань для кожної тварини). Перед тестуванням наступної миші балку очищали 70% етанолом.

2.3.3. Статистичні методи обробки

Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel та Statistica 7.0. Дані представляли у вигляді середнього арифметичного значення \pm стандартна похибка середнього. Достовірність отриманих результатів при міжгруповому порівнянні, враховуючи перевірку на нормальність розподілення отриманих значень (за критеріями Колмогорова-Смірнова), оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Для множинного порівняння в межах групи на різних етапах експерименту використовували двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) із подальшим застосуванням критерію Бонферроні. Рівень достовірності прийнято при $p < 0,05$.

2.4. Методика проведення морфологічного дослідження

2.4.1. Експериментальні групи

Для морфологічного дослідження використовували дорослих мишей з масою тіла 23–28 г. Здорові тварини штаму C57BL ($n = 6$) сформували контрольну групу, тоді як експериментальна група включала мишей штаму C57BL/6 зі спадковою периферичною нейропатією ($n = 6$). Батьківських тварин для обох сформованих груп отримували в лабораторії Джексона (США). Миші другої групи (C57BL/6) характеризувались помітним тремтінням задніх кінцівок та певними порушеннями руху.

2.4.2. ПЛР аналіз ДНК C57BL/6 мишей

Для визначення специфіки геному трансгенних мишей проводили генотипування шляхом ампліфікації певної послідовності гена RMP22 із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ДНК виділяли з хвостів мишей C57BL/6 згідно зі стандартною процедурою. Реакційна суміш (об'єм 25 мкл) містила трис-НСІ 10 мМ, КСІ 50 мМ, $MgCl_2$ 1,5 мМ, dNTP 0,2 мМ, желатин 0,01%, зразок ДНК 0,05–0,10 мкг, термостабільну ДНК-полімеразу, 0,5–1,0 U та 15 пМ кожного з олігонуклеотидних праймерів. Нуклеотидна

48

послідовність праймерів була такою: при визначенні клонованої послідовності гена RMP22, 31928F 5'-CCCCTTTCCTTCACTCCTC та 31929R 5'- CCAATAAGCGTTTCCAGCTC, а для внутрішнього позитивного контролю - oIMR7338F 5'- CTAGGCCACAGATATAGA. Ампліфікацію *in vitro* специфічних послідовностей ДНК досліджуваних локусів проводили за таких температурних режимів: початкова денатурація 3 хв при 95°C, потім 30 циклів денатурації 30 с при 94°C, відпал праймерів, 30 с при 59°C та подовження, 1 хв при 72°C. Продукти ПЛР аналізували електрофорезом в 1,6% агарозному гелі; візуалізацію проводили в ультрафіолетовому просвічувачі. Наявність фрагмента 244 bp в електрофореграмі свідчило про наявність послідовності гена RMP22 у зразку. Фрагмент 324 bp відповідав нуклеотидній послідовності внутрішнього позитивного контролю (ампліфікований фрагмент ДНК миші). Електрофореграма, отримана в процесі аналізу досліджуваних локусів, показана на рис. 2.2.

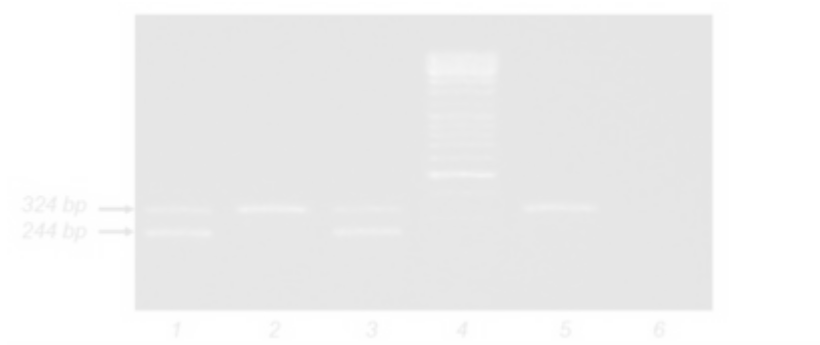


Рис. 2.2. Електрофореграми продуктів ПЛР для локусів гена RMP22 (фрагмент 244 bp) та внутрішнього позитивного контролю (фрагмент 324 bp). 1) і 3) для ДНК мишей з нуклеотидною послідовністю гена RMP22; 2) для ДНК мишей з відсутністю зазначеної вище послідовності нуклеотидів; 4) маркер молекулярної маси 100 bp; 5) для ДНК нетрансгенних мишей і 6) негативний контроль (H₂O).

У дослідженні використовувались лише тварини з фрагментом 244 bp присутнім в електрофореграмах їх зразків ДНК, що свідчило про наявність гена RMP22 у послідовності зразків.

2.4.3. Електронна мікроскопія

Для електронно-мікроскопічного аналізу зразків сідничного нерва мишей використовували стандартні методики. Тварин глибоко знеболювали каліпсолом (75 мг/кг) і піддавали перикардіальній перфузії 0,1 М фосфатного буферу (PB; pH 7,4) при кімнатній температурі. Ця стадія перфузії супроводжувалась холодним розчином (4°C) 4% формальдегіду і 2% глутаральдегіду в 0,1 М (PB; pH 7,4). Сідничний нерв розсікали, і проводили ПОСТ-фіксацію зразків тому ж фіксаторі протягом ночі при 4°C. Потім ці зразки промивали в 0,1 М PB, фіксували в 1,0% OsO₄, зневоднювали в серії етанолу та ацетону і вносили в смолу Epon-Araldite. Ультратонкі зрізи фарбували уранілацетатом та цитратом свинцю та досліджували в електронному мікроскопі (Jeol, Японія) при 80 кВ.

2.4.4. Обробка числових даних

Чисельні дані, отримані в ході аналізу електронно-мікроскопічних зображень, аналізували за допомогою програмного забезпечення Origin Pro 8.5 (OriginLab Corp., США). Оскільки дані характеризувались нормальним розподілом, міжгрупові відмінності досліджували за допомогою парного t-критерію Стьюдента. Дані представлені нижче як середнє значення \pm стандартна похибка середнього. Міжгрупові відмінності вважалися значними при $P < 0,05$.

2.5. Методика електрофізіологічного дослідження

2.5.1. Експериментальні групи

В електрофізіологічному дослідженні використовували дорослих мишей з масою тіла 23–28 г. Здорові тварини штаму C57B1 (n = 6) утворювали першу контрольну групу, тоді як до другої групи входили миші штаму C57B1/6 зі

спадковою периферичною нейропатією ($n = 6$). Батьківські тварини для цих двох груп були надані лабораторією Джексона (США). Тварини другої групи (C57B1/6) характеризувалися помітним тремтінням задніх кінцівок.

2.5.2. Хірургія та електростимуляція

Мишей знеболювали пентобарбіталом натрію (Sigma, США, 75 мг/кг, внутрішньовенно) і фіксували у спеціалізованому стереотаксичному каркасі із системою фіксації голови, тазу та кінцівок. Сідничні нерви на обох задніх кінцівках були розкриті, відокремлені від навколишніх тканин і пересічені проксимально. На розрізах формувались басейни, наповнені парафіновою олією. Біполярні дрітні електроди Ag – AgCl з міжелектродною відстанню близько 2,5 мм використовувались для електростимуляції нерва (прямокутні імпульси довжиною 0,2 мсек) та реєстрації поширеної хвилі. Інтенсивність стимуляції, що забезпечувала мінімальне скорочення м'язів задніх кінцівок, вважалася пороговою. Подальша стимуляція проводилася з інтенсивністю 1,3 порога з частотою 3 с^{-1} ; стимулюючі рейни тривали 30 сек. Виконували по три серії стимулювання, які розділені інтервалами довжиною 60 секунд.

Під час стимуляції нерва ми також записали М-хвилю з *m. gastrocnemius-soleus* (GS) за допомогою двох електродів Ag – AgCl (діаметр 0,15 мм), введених за допомогою ін'єкційних голок на глибину 2–3 мм. Міжелектродна відстань під час запису М-хвилі становила 4–4,5 мм. Протягом усього експерименту контролювали частоту серцевих скорочень, амплітуду ЕКГ, температуру тіла та температуру в масляному басейні. Для запису сигналів використовувався 12-розрядний перетворювач AD/DA, CED Power 1401 (Cambridge Electronic Design, Великобританія). Для стимуляції нерва використовували стимулятор DS2A з ізольованими виходами (Digitimer, Великобританія). Записані сигнали підсилювались підсилювачем Model 440 (Brownlee Precision, США) та оцифровувались з частотою 10^{-4} сек. Відстань провідності між активним стимулюючим електродом і проксимальним реєструючим електродом вимірювали за допомогою штангенциркулів.

2.5.3. Обробка даних

Аналіз даних проводили за допомогою Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Великобританія) та Origin 7.0 (OriginLab Corporation, США). Середні значення швидкості провідності через нерв, амплітуду CNAP та амплітуду М-хвилі при стимуляції проксимальних відділів правого та лівого сідничного нервів у тварин двох досліджуваних груп порівнювали за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). У разі значних міжгрупових відмінностей ($P < 0,05$) застосовували апостеріорний критерій Бонферроні. Числові дані наведені нижче як середнє значення \pm стандартна похибка середнього.

2.6. Методика проведення поведінкових тестів після введення ММСК - ЖТ

2.6.1. Введення мезенхімальних стовбурових клітин мишам з периферичною нейропатією

В якості джерела мезенхімальних стовбурових клітин нами були використані миші лінії FVB-C-Tg(GFPU)5Nagy/J, трансгенні за зеленим флуоресцентним білком (GFP). Миші були надані Європейською лабораторією молекулярної біології (Monterotondo, Італія).

Мультіпотентні мезенхімальні стовбурові клітини одержані з жирової клітковини GFP-позитивних мишей трансплантували дорослим мишам лінії C57BL/6-CgTg(PMP22)C3Fbas/J із спадковою периферичною нейропатією в концентрації $0,5 \times 10^6$ GFP-позитивних ММСК у 50 мкл PBS. Ін'єкції мезенхімальних стовбурових клітин проводилися внутрішньом'язово в область m. gastrocnemius з обох сторін під внутрішньочеревною анестезією (каліпсол-ксилазин).

2.6.2. Експериментальні групи для другої серії тестів

У цьому дослідженні використовували 3 групи мишей вагою 23–29 г. I група: здорові тварини лінії C57BL/6 ($n = 6$) (контроль). II група: миші лінії

B6.CgTg(PMP22)C3Fbas/J (n = 6) зі спадковою периферичною нейропатією (ПН). III група тварин: миші лінії B6.CgTg(PMP22)C3Fbas/J (n = 10) після проведення трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини (ПН+МСК).

2.6.3. Поведінкові тести після введення ММСК – ЖТ

Поведінкові тести в контрольних та експериментальних групах тварин проводили з інтервалом в два тижні, таким чином встановлювався вплив мезенхімальних стовбурових клітин на процеси ремієлінізації аксональних волокон сідничного нерва. Друга серія поведінкових тестів включала в себе дослідження двох видів рухової активності: тест на балансування та аналіз відбитків пальців/стопи при ходьбі. Методологія проведення тесту на баланс аналогічна описаній в пункті 2.3.2.

Для аналізу функціонального стану задніх кінцівок мишей з ШМТ був використаний чорнильний метод паперової візуалізації відбитків стоп тварин. Для цього задні лапи мишей фарбувалися у чорний колір. Далі підготовлених мишей саджали на лабораторний папір на початок дистанції і вони бігли до затемненої області де знаходився кінець тестової дистанції. Після цього з лабораторного паперу знімали потрібні показники для аналізу функціонального стану сідничного нерва, що зазначені в наступному пункті.

2.6.4. Обробка даних і розрахунок ІФСН

Для визначення ІФСН нами була застосована формула запропонована R. Baine з модифікацією Inserra et al.

$$\text{ФСН} = 118.9 \left(\frac{\text{ШРПп}-\text{ШРПк}}{\text{ШРПк}} \right) - 51.2 \left(\frac{\text{ДВСП}-\text{ДВСК}}{\text{ДВСК}} \right) - 7.5$$

Де значення ШРПп представляє ширину розведення пальців ніг в тварин з патологією, ШРПк - ширину розведення пальців ніг в здорових тварин та відповідно ДВСП - довжина відбитку стопи тварини з патологією, ДВСК - довжина відбитку стопи здорової тварини.

Значення індексу функціонального стану сідничного нерву оцінюється за балами від 0 до 100 одиниць. Числове значення ІФСН 0 та ≥ 0 позначає

нормальну функцію, а показник -100 дорівнює повністю не функціональному стану сідничного нерву.

2.7. Висновки до розділу 2

Основними матеріалами для вибору відповідних методик дослідження були літературні дані та досвід зарубіжних авторів. Було обґрунтовано доцільність їх використання, спираючись на фенотипічні особливості хвороби ШМТ. Дані методики були зібрані та адаптовані під наші умови, з урахуванням усіх особливостей дослідження. Основні складнощі в роботі були викликані довготривалим процесом підготовки: розведення мишей та виведення гомозиготних по RMP22 поколінь, готових до тестів. Незважаючи на це, отриманої кількості мишей вистачило для опису досліджуваної хвороби.

1. Для виявлення серед усіх отриманих поколінь гомозиготних по RMP22 особин було використано генотипування шляхом ампліфікації певної послідовності гена RMP22 із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції.

2. Для дослідження зовнішніх проявів хвороби та визначення ступеня демієлінізації сідничного нерва був обраний поведінковий тест на балансування.

3. Для визначення особливостей структури демієлінізованих волокон було обрано морфологічне дослідження сідничного нерву, з використанням електронної мікроскопії.

4. Для визначення ступеня патологічних змін функціональних характеристик сідничного нерва було обрано електрофізіологічне дослідження сідничного нерву.

5. Наведена методологія трансплантації ММСК-ЖТ мишам з периферичною нейропатією та методу чорнильної візуалізації ходи, для виявлення ефекту введених стовбурових клітин.

Для кожного дослідження описана методологія, експериментальні групи та обробка результатів.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Координація рухової активності піддослідних мишей

Поведінковий тест був проведений для оцінки недоліків у координації рухової активності у мишей самців та самок різного віку; групи мишей, які страждали на HMSN, порівнювали з групами контрольних тварин беручи до уваги їх стать та вік. Як було встановлено, усі тварини після відповідного тренування змогли успішно пройти тест на баланс; мишам штаму C57Bl/6 потрібен був значно довший час на навчання. Як видно з рис. 3.1. середній час проходження тестової відстані різними контрольними тваринами коливався від $5,4 \pm 0,7$ до $6,5 \pm 0,4$ с. Ці відмінності в межах контрольної групи тварин C57Bl, не досягли рівня значущості ($P > 0,05$ у всіх порівняннях); тим не менш, можна звернути увагу на те, що самки контрольних мишей витрачали трохи (несуттєво) довший час на проходження дистанції, ніж контрольні самці.

У той же час миші з HMSN продемонстрували значно більшу тривалість проходження дистанції (у середньому в 3–5 разів). У цих тварин середні значення цього індексу коливались від $15,7 \pm 0,7$ до $27,7 \pm 1,6$ с, як у самців, так і у самок. Відмінності у часі проходження між порівнюваними за статтю та віком групами мишей C57Bl та C57Bl/6 були дуже значними ($P < 0,01$). Слід також зазначити, що самки мишей з ПН подолали досліджувану відстань помітно повільніше (в середньому на 5–8 с), ніж самці цього ж віку з такою ж патологією ($P < 0,05$). Крім того, труднощі в контролі руху, типові для мишей C57Bl/6, продемонстрували певну вікову залежність цього показника. Як у самців, так і у самок мишей з HMSN, 20-тижневі тварини продемонстрували досить невелике, але суттєве збільшення показників часу, в порівнянні з 15-тижневими мишами.

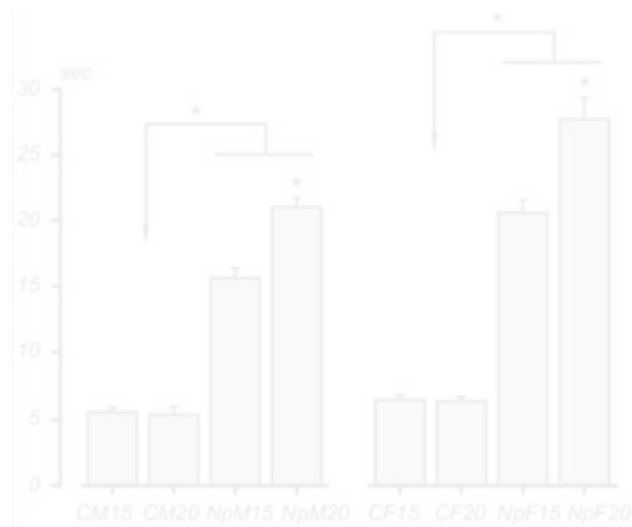


Рис. 3.1. Середні значення ($M \pm m$) часу, витраченого піддослідними на проходження дистанції. Групи тварин наведені нижче: CM15, CM20, NpM15 та NpM20 - це самці контрольної групи (C) та з нейропатією (Np) у віці 15 та 20 тижнів відповідно; CF15, CF20, NpF15 та NpF20 є самками відповідних груп. Зірочки показують значимість міжгрупових відмінностей ($P < 0,05$).

Порівняння середніх показників часу кожної групи піддослідних за певною характеристикою (вік, стать, стан) наведені в таблицях 3.1. 3.2. та 3.3. **ВІДПОВІДНО.**

Пояснення щодо показників значимості P:

$P < 0.001$ – відмінності показників двох груп тварин статистично значущі і дуже суттєві, вони відрізняються на порядок і більше.

$P < 0.01$ – відмінності статистично значущі, наявна очевидна залежність від порівнюваних характеристик, але менш суттєва.

$P < 0.05$ – відмінності статистично значущі, існує певна залежність від порівнюваних характеристик

$P > 0.05$ – відмінності статистично не значущі

56

Таблиця 3.1.

Порівняння середніх показників часу проходження дистанції кожної групи
піддослідних в залежності від їх віку

Стан, стать	t ₁₅ , с	t ₂₀ , с	Зміна, %	P
CM	5,6 ± 0,3	5,4 ± 0,7	-4	> 0,05
CF	6,5 ± 0,4	6,4 ± 0,3	-2	> 0,05
NpM	15,7 ± 0,7	20,5 ± 1,1	+31	< 0,01
NpF	21,9 ± 1,1	27,7 ± 1,6	+26	< 0,05

Таблиця 3.2.

Порівняння середніх показників часу проходження дистанції кожної групи
піддослідних в залежності від їх статі

Стан, вік	t _M , с	t _F , с	Зміна, %	P
C15	5,6 ± 0,3	6,5 ± 0,4	+16	> 0,05
C20	5,4 ± 0,7	6,4 ± 0,3	+19	> 0,05
Np15	15,7 ± 0,7	21,9 ± 1,1	+39	< 0,01
Np20	20,5 ± 1,1	27,7 ± 1,6	+35	< 0,01

Таблиця 3.3.

Порівняння середніх показників часу проходження дистанції кожної групи
піддослідних в залежності від їх стану

Стать, вік	t _C , с	t _{Np} , с	Зміна, %	P
M15	5,6 ± 0,3	15,7 ± 0,7	+180	< 0,001
M20	5,4 ± 0,7	20,5 ± 1,1	+280	< 0,001
F15	6,5 ± 0,4	21,9 ± 1,1	+237	< 0,001
F20	6,4 ± 0,3	27,7 ± 1,6	+333	< 0,001

Під час проведення поведінкового тесту на баланс ми також порахували кількість рухових помилок (зісковзування задніх кінцівок з балки). Тварини всіх контрольних (здорових) груп зазвичай проходили тестову відстань або без ковзання задніх кінцівок, або з їх невеликою кількістю. Зазвичай середня кількість зісковзувань за одне дослідження була менше 1,0 як для самців, так і для самок мишей штаму C57Bl (у самок цей показник був трохи більшим; рис. 3.1.).

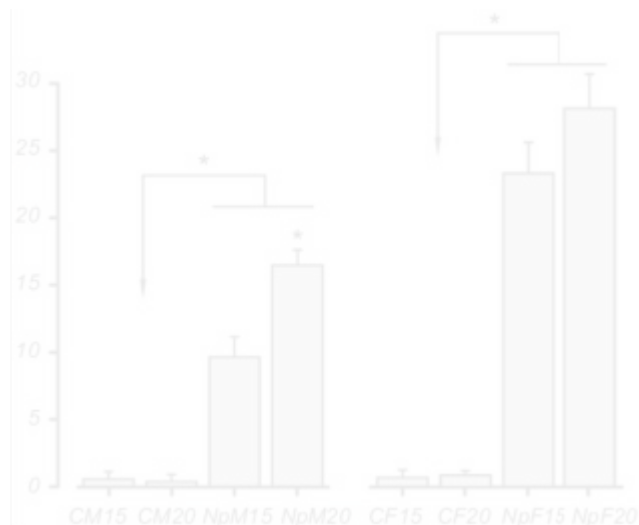


Рис. 3.2. Середня кількість рухових помилок (Зісковзування задніх кінцівок з балки) під час подолання тестової дистанції піддослідними тваринами. Позначення аналогічні до рис. 2.

Суттєвих відмінностей між контрольними групами самців та самок різного віку, стосовно рухових помилок, не було. У той же час кількість таких подій, зафіксованих у мишей з HMSN (штам C57Bl/6), була значно більшою (більш ніж на порядок). Зокрема, самці віком 15 та 20 тижнів (групи NrM15 та NrM20) демонстрували в середньому $9,9 \pm 1,5$ та $16,4 \pm 1,1$ ковзання задніх кінцівок за одне дослідження, тоді як самки того ж віку (групи NrF15 та NrF20) мали $23,2 \pm 2,3$ та $28,0 \pm 2,6$ ковзання відповідно (рис. 3.2.). Як бачимо, існувала певна залежність цих показників від статі та віку тварин. Відмінності середньої кількості зісковзувань між групами чоловіків NrM15 vs NrM20, а також між групами NrM15 vs NrF15 та NrM20 vs NrF20 були значними.

Порівняння середніх показників кількості зісковзувань кожної групи піддослідних за певною характеристикою (вік, стать, стан) наведені в таблицях 3.4. 3.5. та 3.6. відповідно.

58

Таблиця 3.4.

Порівняння середніх показників кількості зісковзувань кожної групи
піддослідних в залежності від їх віку

Стан, стать	t ₁₅ , с	t ₂₀ , с	Зміна, %	P
CM	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,3	-33	> 0,05
CF	0,8 ± 0,5	1,1 ± 0,2	+38	> 0,05
NpM	9,9 ± 1,5	16,4 ± 1,1	+66	< 0,05
NpF	23,2 ± 2,3	28,0 ± 2,6	+21	> 0,05

Таблиця 3.5.

Порівняння середніх показників кількості зісковзувань кожної групи
піддослідних в залежності від їх статі

Стан, вік	t _M , с	t _F , с	Зміна, %	P
C15	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,5	+33	> 0,05
C20	0,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2	+175	> 0,05
Np15	9,9 ± 1,5	23,2 ± 2,3	+134	< 0,001
Np20	16,4 ± 1,1	28,0 ± 2,6	+71	< 0,05

Таблиця 3.6.

Порівняння середніх показників кількості зісковзувань кожної групи
піддослідних в залежності від їх стану

Стать, вік	t _C , с	t _{Np} , с	Зміна, %	P
M15	0,6 ± 0,5	9,9 ± 1,5	+1550	< 0,001
M20	0,4 ± 0,3	16,4 ± 1,1	+4000	< 0,001
F15	0,8 ± 0,5	23,2 ± 2,3	+2800	< 0,001
F20	1,1 ± 0,2	28,0 ± 2,6	+2445	< 0,001

Обговорення результатів

Розвиток спадкової нейропатії супроводжується руховими та сенсорними розладами, що проявляються як надмірна або недостатня рухова активність, порушення рухової координації та соматосенсорної чутливості (переважно в дистальних сегментах кінцівок). Як відомо і згадано вище, причиною мієлінопатії периферичних нервів у випадку **ШМТ1А** є мутація гена RMR22, який кодує відповідний білок. Така мутація може призвести до збільшення

кількості шваннівських клітин та надмірної мітотичної активності, периферичної демієлінізації та прогресуючої атрофії м'язів.

Результати поведінкового тесту, використані в нашому дослідженні, показують, що дорослі миші штаму C57Bl/6 стикаються зі значними труднощами в русі по похилій балці (до укриття). Ці тварини витрачають набагато більше часу на проходження дистанції і їх хода супроводжується численними руховими помилками (зісковзування задніх кінцівок з балки). У той же час після тренування контрольні миші C57Bl пройшли цей тест без значних труднощів. Слід зазначити, що самці старшого віку (20 тижнів) та **самки** з нейропатією долали тест-відстань відповідно на 31% та 26% повільніше, ніж молодші тварини (віком 15 тижнів), а кількість зісковзувань задніх кінцівок була більше на 66% та 21% у самців та самок старшого віку, відповідно, порівнюючи з відповідним індексом у 15-тижневих тварин. Ці факти можуть свідчити про те, що інтенсивність патологічних зрушень в руховій поведінці з часом зростає. Уолш та ін. [77] повідомляв, що амплітуда складних потенціалів дії м'язів та потенціалів дії, що генеруються сенсорними нейронами, зменшується у старіючих мишах C57Bl/6 обох статей. У нашому дослідженні ми також спостерігали, що самки з HMSN проходили тест на **баланс** повільніше (в середньому на 37%), ніж самці тієї ж вікової категорії. Ці дані можуть свідчити про те, що досліджувана патологія помітно більш виражена у піддослідних жіночої статі, ніж у самців. У дослідженні на людях Падуа та ін. [78] зазначили, що жінки з ШМТ зазвичай демонструють вищий ступінь рухової інвалідності, ніж чоловіки того ж віку. Ця різниця може бути пов'язана з наявністю у жінок стероїдного гормону, прогестерону, який сприяє надмірній експресії PMP22 і, отже, сприяє більш сильному підвищенню рівня демієлінізації нервових волокон [79]. Карузо та ін. [80] вивчав вплив модуляторів рецепторів GABA_A на експериментальних моделях **ШМТ1A** для чоловіків та жінок. Ці автори продемонстрували, що рецептори GABA_A експресуються як у сідничних нервових волокнах, так і в клітинах Шванна, і активація цих рецепторів нейроактивними стероїдами, такими як 3α5α-

тетрагідропрогестерон та 3 α -діол, підвищує рівень експресії RMP22. Таким чином, останній ефект залежить від статі. У первинній культурі шваннових клітин щурів експресія RMP22 стимулюється 3 α 5 α -тетрагідропрогестероном лише в культурах, отриманих із сідничних нервів самок щурів.

Вищеописане поведінкове дослідження на трансгенних мишах з периферичною нейропатією показало, що така досить проста методика тестування дозволяє отримати демонстративні кількісні результати щодо змін рухової активності під час розвитку патології та об'єктивно оцінити рівень патологічних змін, спричинених HMSN, включаючи гендерні та вікові особливості. Така методика (та/або подібні) може допомогти експериментаторам оцінити ефективність терапевтичних підходів у лікуванні даної патології на різних стадіях розвитку останньої. Таким чином, поряд з електрофізіологічними методами діагностики цієї патології, аналіз ходи є одним з основних поведінкових підходів до визначення ступеня ураження периферичних нервів у експериментальних тварин.

3.2. Патоморфологічна картина сідничного нерву піддослідних мишей

Електронно-мікроскопічний аналіз поперечних надтонких зрізів нервових волокон в сідничних нервах, отриманих від контрольних мишей, показав, що аксоплазма аксонів, покритих багат шаровими мієліновими оболонками, містить чітко візуалізовані нейрофіламенти, нейротрубочки та мітохондрії з щільно упакованими кристами та помірно осмофільною матрицею (рис. 3.3. А, В).

Оболонки мієліну утворювались концентричними завитками мезаксона клітини Шванна, щільно нашарованими навколо осевого циліндра (рис. 3.3. В). У цитоплазмі клітин Шванна спостерігали ендоплазматичні каналці ретикулуму, цистерни комплексу Гольджі, мітохондрії та вільні рибосоми. Ядра клітин Шванна були переважно овальними та помірно осмофільними.

У сідничних нервах трансгенних мишей C57BL/6 були очевидні кількісні ознаки демієлінізації багатьох аксонів великого діаметру. Серед поперечних

зрізів таких аксонів 55 та 60 прикладів були випадковим чином відібрані на зрізах нервів, отриманих від мишей C57BL та C57BL/6, відповідно. У зрізах аксонів мишей C57BL (контрольних) оболонки мієліну були в середньому товщиною 0,47 μm , тоді як у тварин C57BL/6 (трансгенні) відповідне значення становило лише 0,12 μm (тобто близько 25% від першого значення; рис. 3.4. А). Середня кількість ламелей у оболонках мієліну у контрольних мишей становила 41,6 порівняно з 14,6 у трансгенних тварин (тобто близько 35% від контролю; рис. 3.4. В).

Таким чином, явні ознаки демієлінізації багатьох аксонів великого діаметру були очевидні в сідничних нервах трансгенних мишей C57BL/6. Такі аксони були оточені аномально тонкими мієліновими оболонками, тоді як багато мієлінізованих волокон меншого діаметру були покриті оболонками, які виглядали добре збереженими (рис. 3.3. С).

Структури, типові для поперечних зрізів аксонів тих пацієнтів, які страждають на хворобу ШМТ1А, так звані цибулеподібні структури, були виявлені у зразках, отриманих від трансгенних мишей C57BL/6. Це були утворення, включаючи концентричні скупчення шарів відростків клітин Шванна та колагену (рис. 3.3. D).

У деяких випадках була виявлена гіпертрофія мієлінових оболонок, що супроводжувалась збільшенням кількості мієлінових ламелей та порушенням їх взаємодії між собою (що призвело до розшарування мієліну) (рис. 3.3. E). У таких випадках адаксональні та абаксональні мембрани сильно потовщувались та ущільнювались у порівнянні з контролем, а щілини між цими мембранами заповнювались нещільно розташованими ламелями мієліну (рис. 3.3. E, F). Аксони з вищезазначеною гіпертрофією мієлінових оболонок характеризувались меншими діаметрами порівняно з типовими для контрольних тварин. Такі особливості будови мієлінових оболонок та аксонів можуть свідчити про розвиток процесів ремієлінізації, які є реакцією на первинну дисмієлінізацію та демієлінізацію аксонів, характерну для ШМТ1А.

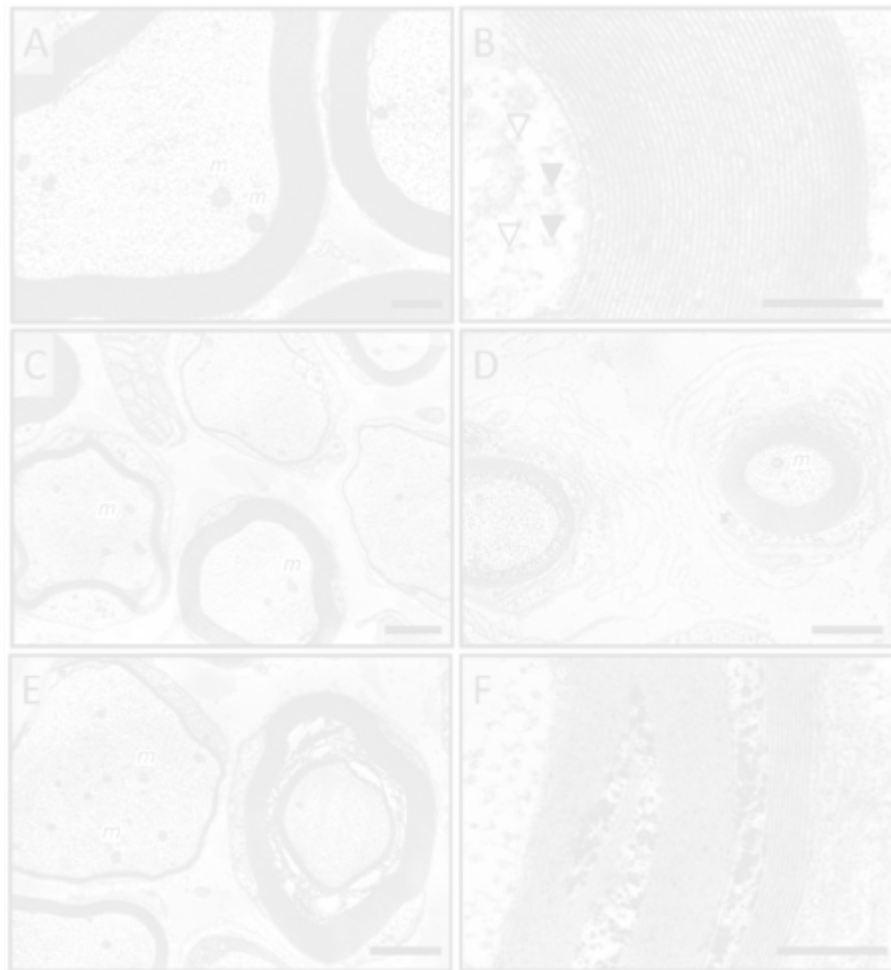


Рис. 3.3. Електронні мікрофотографії поперечних надтонких зрізів сідничного нерва контрольних мишей (А, В) та трансгенних мишей C57BL/6 (С – F).

А) Розріз нормальних мієлінових оболонок; Б) вони ж, при більшому збільшенні. Нейрофіламенти та мікротрубочки показані відкритими та заповненими стрілочками відповідно; м - мітохондрії. В) Аномальне витончення мієлінових оболонок деяких аксонів; в той же час присутні аксони з нормальними оболонками. Г) Два цибулеподібні утворення, що демонструють концентричні шари відростків клітини Шванна та надлишкові

63

базальні пластинки навколо аксонів; кількість ендоневрального колагену помітно збільшено. Е) ділянки двох волокон, одне з яких має значно тоншу мієлінову оболонку, тоді як інший аксон меншого діаметру характеризується непропорційно збільшеною товщиною мієлінової оболонки з проявами розщеплення мієлінових шарів; м - мітохондрії. F) Фрагмент останньої мієлінової оболонки при більшому збільшенні.

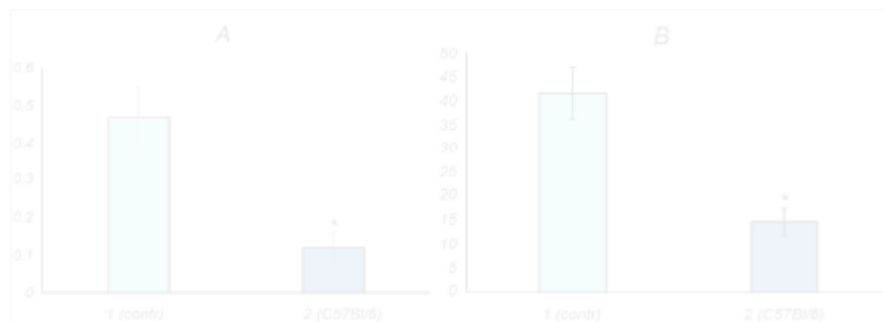


Рис. 3.4. Середні значення товщини мієлінових оболонок (μm) (A), і кількості ламелей у цих оболонках (B) у поперечних зрізах волокон великого діаметра сідничного нерва у контрольних мишей групи C57BL (1, n = 55) і трансгенних мишей групи C57BL/6 (2, n = 60). *P < 0,05 у порівнянні з контролем.

Крім того, у багатьох мієлінових оболонках трансгенних мишей C57BL/6 спостерігалось збільшення кількості електрон-щільних тіл (які можуть бути агрегатами білка PMP22 з білками теплового удару, HSP). (рис. 3.3. F). HSP утворюються в умовах надмірної експресії PMP22, що спричиняє порушення внутрішньоклітинного транспорту та дисфункцію протеасом у Шваннівських клітинах та стимулює подальший розвиток процесів демієлінізації.

Таким чином, описані вище особливості будови мієлінових оболонок та аксонів в сідничному нерві трансгенних мишей C57BL/6 свідчать про різкі порушення аксон-мієлінової взаємодії. Це призводить до погіршення аксональної трофіки, посилення атрофії аксонів та домінування процесів демієлінізації над процесами ремієлінізації.

Обговорення результатів

Електронно-мікроскопічний аналіз поперечних зрізів волокон у зразках сідничного нерва, отриманих від трансгенних мишей лінії C57BL/6, продемонстрував, що відповідний патоморфологічний малюнок досить подібний до типового для ШМТ1. Він характеризувався втратою ряду аксонів та різким витонченням мієлінових оболонок багатьох нервових волокон, що свідчило про диз- та демієлінізацію значної частини аксонів. Характерним було також утворення так званих цибулеподібних структур. Однак у деяких випадках спостерігались гіпертрофовані мієлінові оболонки зі стратифікацією мієліну. У значній частині волокон витончення оболонок мієліну було настільки інтенсивним, що останні фактично зникли. Загалом демієлінізація була помітно більш вираженою у волокнах більшого діаметру (ймовірно, рухових), тоді як у багатьох менших волокнах мієлінові оболонки мали нормальну або навіть збільшену товщину (рис. 3.3. С). Очевидно, що такі зміни неминуче повинні призвести до значного зменшення швидкості провідності потенціалу дії, що викликається в сідничному нерві трансгенних мишей C57BL/6.

У нашому дослідженні ми використовували трансгенних мишей C57BL/6 з дуплікацією (надмірною експресією) гена RMP22 для вивчення процесів демієлінізації, характерних для хвороби Шарко – Марі – Тута (ШМТ) у людей. У ШМТ існують точкові мутації, які змінюють первинну структуру трьох різних мембранних білків, RMP22, P0 та коннексин-32, і характеризуються надмірною експресією першого із згаданих білків. Однак слід визнати, що клітинні та молекулярні механізми хвороби ШМТ залишаються далекими від остаточного розуміння. Невідомо, чому саме клітини Шванна особливо вразливі до надмірної експресії гена RMP22. Слід взяти до уваги, що цей ген (RMP22) не є специфічним для цих клітин; він виражається в мотонейронах і в ряді тканин поза нервовою системою. У той же час первинні патологічні зміни у пацієнтів, які страждають на ШМТ1А, так само як і в моделях цієї патології in vivo, проявляються саме в периферичному мієліні.

Посилена експресія РМР22 може впливати на клітини Шванна за допомогою різних молекулярних механізмів. Показано, що надмірна експресія цього білка може модифікувати (блокувати) систему деградації білка, що, нарешті, призводить до утворення білкових агрегатів. У нашому дослідженні ми також виявили помітне збільшення кількості електрон-щільних тіл у мієлінових оболонках. Ці тіла можуть бути агрегатами РМР22 з білками теплового шоку HSP (рис. 3.3. F). Накопичення аномально упакованих молекул РМР22 активує ергастоплазму та/або аутолізосомну систему. Протеасомна система недостатньо ефективна в мутантних клітинах Шванна, в яких активовані протеостатичні механізми. Крім того, кількість цитозольних шаперонів поступово збільшується в тканинах периферичних нервів; зокрема, рівень HSP70 зростає найбільш помітно. Слід зазначити, що повідомлялося про позитивні ефекти шаперонів щодо запобігання агрегації та покращення трафіку РМР22. Як було показано, підвищена експресія HSP70 забезпечує послаблення дисфункції протеасом. Клітини Шванна чутливі як до збільшення, так і до зниження експресії РМР22. Втрата однієї копії гена РМР22 пов'язана зі спадковою нейропатією, і такий стан мієлінової нестабільності можна змодельовати у мишей. Повна відсутність експресії РМР22 (яка не була описана у людей) спричиняє фокальну гіпермієлінізацію та подальшу дегенерацію мієлінових оболонок, що призводить до серйозного пошкодження мієліну у відповідних нокаутуваних мишей.

Моделі *in vivo* у гризунів дозволяють дослідити механізми пошкодження клітин за допомогою підходів, які не можуть застосовуватися щодо клінічних випадків патологій демієлінізації (зокрема, до біопсійного матеріалу пацієнтів).

Зокрема, коли біопсійний матеріал людини використовується для генетичних тестів щодо ШМТ, кількість матеріалів для інших аналізів у багатьох випадках недостатня. Звичайно, відповідні моделі тварин можуть бути альтернативою у таких дослідженнях.

66

Загалом, слід повторити, що структура ультраструктурних змін сідничного нерва трансгенних мишей C57BL/6 досить схожа на патоморфологічну картину в периферичних нервах, що спостерігається у пацієнтів з ШМТ. Таким чином, трансгенна гомозиготна лінія мишей C57BL/6 в даний час може вважатися найбільш адекватною твариною моделлю для виявлення механізмів розвитку ШМТ у людей і, отже, може бути використана для розробки методів лікування цієї хвороби.

3.3. Нервова провідність і нейром'язова передача у піддослідних мишей

Електрична стимуляція проксимальних відділів сідничного нерва мишей, що належать до обох експериментальних груп, викликала чіткі CNAP у більш дистальних відділах цих нервів та М-хвилі в м'язах GS обох задніх кінцівок (рис. 3.5. А). Це дозволило нам виміряти швидкість провідності за допомогою вищезазначених нервів та амплітудно-часові характеристики викликаних М-хвиль. CNAP, зафіксовані у всіх мишей групи C57BL/6, чітко відрізнялися від відповідних потенціалів, що спостерігаються у мишей групи C57Bl, меншими амплітудами, більшою тривалістю та більшими затримками (таблиця 3.7., рис. 3.5. В).

Таблиця 3.7.

Результати електростимуляції сідничного нерва контрольних тварин та мишей зі спадковою нейропатією

Parameter	GS side	Control (C)	Pathology (P)	P
CNAP amplitude (mV)	right	0,21 ± 0,02	0,04 ± 0,02	< 0,05
	left	0,19 ± 0,02	0,03 ± 0,01	
NCV (m/sec)	right	41,5 ± 6,9	12,3 ± 5,1	< 0,05
	left	38,2 ± 7,1	9,9 ± 4,8	
M-wave latency (msec)	right	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,2	< 0,05
	left	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2	
M-wave amplitude (mV)	right	1,9 ± 0,1	0,45 ± 0,01	< 0,05
	left	1,7 ± 0,2	0,40 ± 0,1	

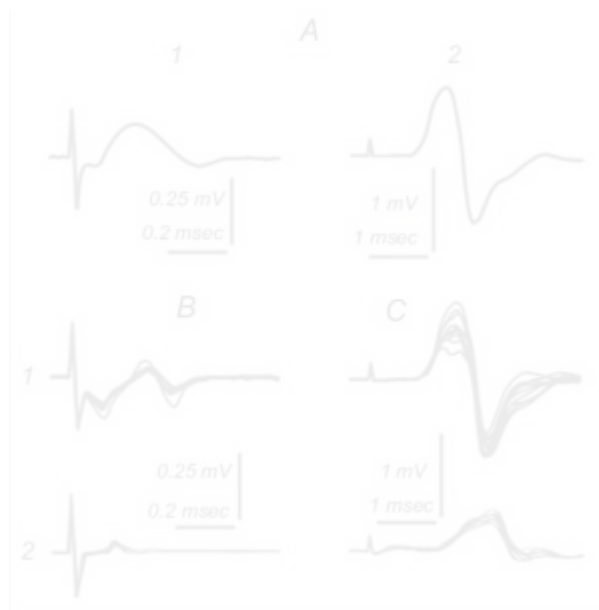


Рис. 3.5. Потенціали, викликані електричною стимуляцією сідничного нерва у експериментальних мишей.

А) Приклади складного нервового потенціалу дії CNAP (1), записаного з дистальної області вищевказаного нерва, та М-хвилі (2), записаної з *m. gastrocnemius-soleus* (GS) у миші контрольної групи (C57Bl). В) Приклади накладених CNAP, записаних від контрольної миші штаму C57Bl (1) та від миші штаму C57Bl/6 (2). С) Приклади накладених М-хвиль, записаних у мишей двох вищевказаних груп (1 та 2 відповідно).

Середня амплітуда CNAP у мишей контрольної групи без патології нервових волокон становила $0,21 \pm 0,02$ та $0,19 \pm 0,02$ мВ у правому та лівому сідничному нервах відповідно. Середня швидкість провідності у вищевказаних нервах мишей C57Bl дорівнювала відповідно $41,5 \pm 6,9$ та $38,2 \pm 7,1$ м / с. В обох випадках між зазначеними значеннями не було суттєвих відмінностей ($P > 0,05$). Середня затримка М-хвилі правого і лівого м'язу GS контрольних мишей C57Bl становила $0,9 \pm 0,2$ та $1,0 \pm 0,1$ мс; середня

68

амплітуда цієї хвилі дорівнювала $1,9 \pm 0,1$ та $1,7 \pm 0,2$ мВ для правої та лівої кінцівок відповідно. Всі ці значення не демонстрували статистично значущих відмінностей (рис. 3.6. А, В).

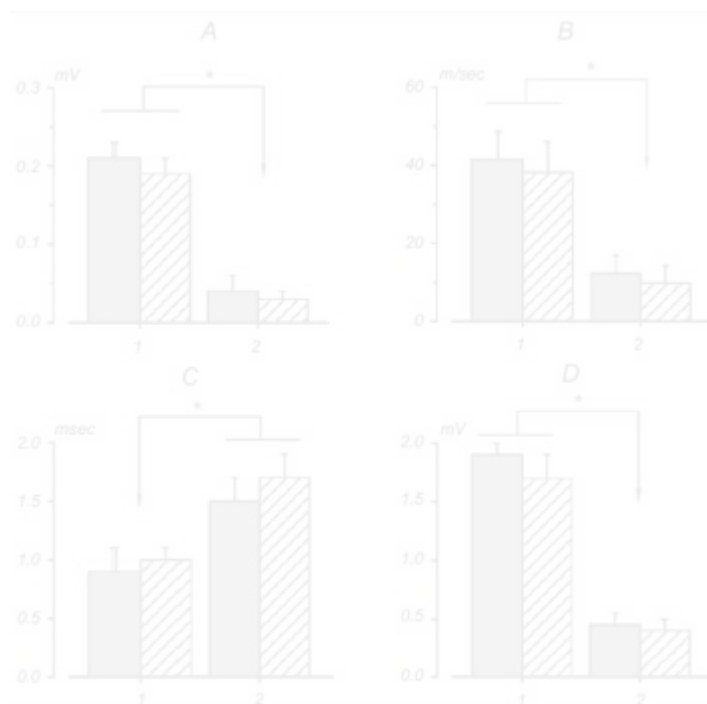


Рис. 3.6. Середні значення ($M \pm \sigma$) параметрів потенціалів, викликаних електричними стимуляціями сідничного нерва у мишей двох експериментальних груп.

А) Амплітуда потенціалів дії складного нерва (CNAP) у дистальній частині сідничного нерва; В) швидкість провідності по цьому нерву; С) час затримки М-хвилі в м'язі GS, і D) амплітуда вищевказаної хвилі. 1 і 2 - групи мишей C57Bl та C57Bl/6 відповідно; сірі та пунктирні колонки відповідають даним, отриманим при стимуляції лівого та правого сідничного нервів відповідно. Зірочками наведені випадки значущих відмінностей між показниками для тварин 1 та 2 груп ($P < 0,05$).

Відповідні вимірювання у мишей групи C57Bl/6 показали, що всі ці параметри характеризувались суттєвими відмінностями від аналогічних значень у мишей контрольної групи C57Bl. Середні значення амплітуди CNAP для правого та лівого сідничного нервів у тварин цієї групи становили лише $0,04 \pm 0,02$ та $0,03 \pm 0,01$ мВ, тобто ці показники були майже у п'ять разів менші, ніж у контрольній групі ($P < 0,05$). Середні швидкості провідності через вищевказані нерви у мишей із спадковою нейропатією становили $12,3 \pm 5,1$ та $9,9 \pm 4,8$ м/с, тобто різниця в порівнянні з контролем становила приблизно 3,5 рази ($P < 0,05$).

Відмінності між параметрами М-хвиль у мишей контрольної та «нейропатичної» груп були досить подібними до описаних вище. Середня затримка М-хвилі у мишей C57Bl/6 становила $1,5 \pm 0,2$ та $1,7 \pm 0,2$ мсек, відповідно ($P > 0,05$ у порівнянні з контролем). У той же час середня амплітуда вищевказаної хвилі у мишей C57Bl/6 становила $0,45 \pm 0,01$ та $0,40 \pm 0,1$ мВ у правій та лівій кінцівках відповідно. Іншими словами, середня амплітуда цієї ХВИЛІ була приблизно в чотири рази нижче, ніж у контролі.

Обговорення результатів

Таким чином, електростимуляція сідничного нерва контрольних тварин (штам C57Bl) та мишей зі спадковою нейропатією (C57Bl/6) показала, що виміряні електрофізіологічні показники, характерні для цих груп, демонструють суттєві відмінності. Перш за все, CNAP, викликані стимуляцією вищевказаних нервів у тварин з нейропатією, характеризувалися набагато (у кілька разів) меншими амплітудами та більшими затримками (тобто набагато меншими швидкостями провідності) порівняно з відповідними показниками у контрольних мишей. Записані в експериментальних умовах CNAP формуються за рахунок підсумовування потенціалів дії, викликаних електричною стимуляцією в еферентних та аферентних волокнах сідничного нерва (ортодромічні імпульси в першому випадку та антидромічні в другому випадку). Слід врахувати, що в наших експериментальних умовах отримані

дані пов'язані здебільшого з відносно товстими (швидкопровідними) нервовими волокнами. Одним з вирішальних факторів, що впливають на швидкість поширення сигналів через нервові волокна, можуть бути структурні зміни в цих аксонах, що призводять до зменшення діаметра цих аксонів порівняно з контролем. Такі зміни можуть бути пов'язані з порушеннями в процесі формування цитоскелетних структур та уповільненням транспорту нейрофіламентів. Ці ефекти, швидше за все, визначаються метаболічними порушеннями та порушеннями фосфорилування структурних білків. Порушення у транспорті нейрофіламентів можуть в значній мірі призвести до зниження рівня фактора росту нервів у нервових тканинах. Стан мієлінопатії в периферичних нервах також може бути важливою причиною патологічного поширення спайкових сигналів через нервові волокна. Як було показано, ген, що кодує білок RMP22, належить до сімейства генів, що володіють певною специфікою для затримок процесів росту. Коли такі гени зазнають мутацій, це може призвести до порушень росту аксонів та подальших порушень процесу поширення сигналів. В умовах мутації RMP22 кількість шваннівських клітин збільшується через надмірну мітотичну активність. Робертсон та ін. описав триразове збільшення кількості цих клітин в сідничних нервах мишей Trembler-J. Такі модифікації можуть бути пов'язані з травмами зв'язків Каяля в клітинах Шванна, і це може призвести до зміни відстані між вузлами Ранв'є та значного уповільнення провідності через нерв. Ми також спостерігали, що амплітуда М-хвилі в м'язі GS хворої миші штаму C57Bl/6 у кілька разів нижчі, ніж у контрольних тварин. М-хвиля – це сигнал, що визначається кількістю потенціалів дії, що надходять через рухові нервові волокна до нервово-м'язових з'єднань, та шляхом синхронізації цих потенціалів. Цей викликаний м'язом потенціал часто використовується при дослідженнях м'язової втоми та потоку іонів, а також активності Na^+ - K^+ насоса у відповідних синапсах. Останні фактори визначають параметри нервово-м'язової передачі в скелетних м'язах. М-хвилю можна інтерпретувати як провісник сили м'язів. Вимірювання М-хвилі в м'язах ссавців показали, що високочастотні

добровільні або індуковані стимуляцією скорочення м'язів призводять до зменшення амплітуди цієї хвилі і, нарешті, до зменшення сили скорочення. Запис М-хвилі широко використовується для аналізу впливу фармакологічних засобів на м'язову активність. Запис М-хвилі та вимірювання її параметрів є необхідним діагностичним компонентом у пошуку засобів запобігання явищам нейродегенерації.

Таким чином, ми виявили, що швидкість провідності через сідничний нерв мишей C57Bl/6 значно нижча, ніж у контролі, і такі зміни є двосторонніми. Процес нервово-м'язової синаптичної передачі у цього штаму мишей також демонструє значні негативні порушення. Такі зміни нервово-м'язових процесів у мишей C57B/6 підтверджують твердження, що таких мишей можна вважати досить адекватною тваринною моделлю хвороби Шарко – Марі – Тута.

3.4. Координації рухової активності піддослідних мишей після введення ММСК – ЖТ

Для оцінки стану сідничного нерву у тварин нами були використані поведінкові тести. В них на протязі 10 тижнів порівнювали моторну активність та індекс функціонального стану сідничного нерву самців та самок мишей 7-місячного віку, хворих на ШМТ1А, яким було проведено внутрішньом'язове введення мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини (ММСК) з контрольними групами аналогічної статі та віку.

Поведінкові тести в контрольних та експериментальній групах тварин проводили з інтервалом в два тижні таким чином встановлювався вплив мезенхімальних стовбурових клітин на процеси ремієлінізації аксональних волокон сідничного нерва.

Результати середніх показників часу проходження дистанції всіма експериментальними групами показані на рис. 3.7. та наведені в таблиці 3.8. Динаміка покращення/погіршення результатів груп ПН та ПН+ММСК в

порівнянні з їх результатами на момент введення стовбурових клітин наведена у вигляді відсоткового приросту в таблиці 3.9.

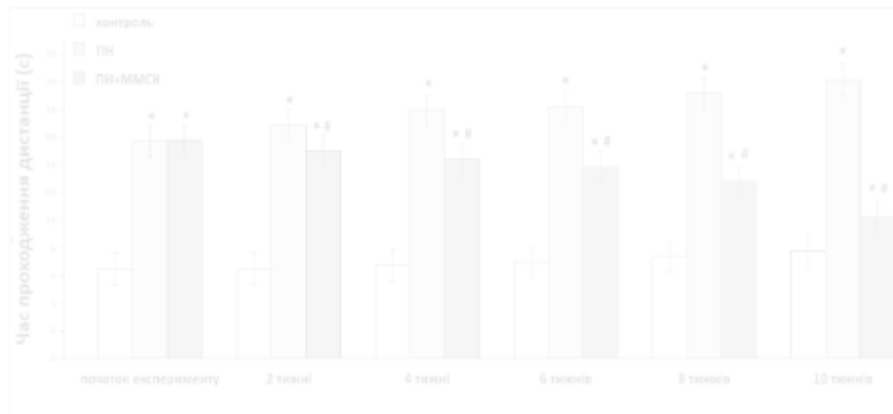


Рис. 3.7. Середній час проходження дистанції експериментальними групами. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші лінії C57Bl/6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, яким була проведена трансплантація ММСК. * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин "ПН".

Таблиця 3.8.

Середній час проходження тестової дистанції всіма експериментальними групами та показники значущості міжгрупових відмінностей (P)

Тижні після операції	Контроль (I)	ПН (II)	ПН+ММСК (III)	P (I,II)	P (I,III)	P (II,III)
Час проходження дистанції t, с						
0	6,5 ± 0,8	15,6 ± 1,6	15,8 ± 1,7	< 0,001	< 0,001	> 0,05
2	6,5 ± 0,7	16,9 ± 0,9	15,0 ± 0,9	< 0,001	< 0,001	> 0,05
4	6,8 ± 0,8	17,9 ± 1,1	14,4 ± 1,0	< 0,001	< 0,001	= 0,03
6	7,0 ± 0,8	18,5 ± 1,1	13,8 ± 0,9	< 0,001	< 0,001	< 0,01
8	7,2 ± 0,8	19,3 ± 0,9	12,8 ± 1,0	< 0,001	< 0,001	< 0,001
10	7,8 ± 0,9	20,1 ± 1,0	10,2 ± 1,0	< 0,001	> 0,05	< 0,001

Було встановлено, що на момент введення ММСК тварини контрольної групи I проходили тест на балансування за час який становив $6,5 \pm 0,8$ с., тварини контрольної групи II (ПН) проходили задану відстань за $15,6 \pm 1,6$ сек.

73

В той же час як тварини групи III (ПН+ММСК) витрачали на проходження заданої дистанції $15,8 \pm 1,7$ сек. Час який тварини першої контрольної групи витрачали на проходження тестової дистанції зазнавав незначного зростання на протязі часу дослідження.

Таблиця 3.9.

Динаміка покращення/погіршення результатів часу груп ПН та ПН+ММСК в порівнянні з їх результатами на момент введення ММСК

Тижні після операції	ПН	ПН+ММСК
	Динаміка показників часу (%)	
2	+8	-5
4	+ 15	-9
6	+ 19	-13
8	+ 24	-19
10	+ 29	-35

Через два тижні після введення ММСК час за який тварини контрольної групи I проходили тест на балансування не зазнав змін та становив $6,5 \pm 0,7$ сек. Тоді як тварини контрольної групи II (ПН) витратили в середньому $16,9 \pm 0,9$ сек. на проходження тесту в той же час тварини групи III пройшли задану відстань за $15,0 \pm 0,9$ сек.

На четвертий тиждень після введення мезенхімальних стовбурових клітин тварини групи III (ПН+ММСК) витрачали в середньому $14,4 \pm 1,0$ сек. на проходження тестової дистанції, тоді як тваринам контрольної групи II (ПН) для проходження аналогічної відстані було необхідно в середньому $17,9 \pm 1,1$ сек., тоді як швидкість проходження тесту тваринами першої групи не зазнала суттєвих змін і становила $6,8 \pm 0,8$ сек. Різниця в часі, який був необхідний тваринами контрольної групи II (ПН) та групи III (ПН+ММСК) для проходження дослідної відстані була значущою ($P < 0,05$) і складала $3,5 \pm 1,1$ сек.

Через шість тижнів після введення ММСК тваринам групи III для подолання заданої дистанції було необхідно в середньому $13,8 \pm 0,9$ сек., в той

же час тварини контрольної групи I долали вказану відстань за $7,0 \pm 0,8$ сек. В той же час тваринам групи II з нейропатичним фенотипом було необхідно в середньому $18,5 \pm 1,1$ сек. для проходження тестової дистанції. Різниця в часі, який був витрачений тваринами контрольної групи II (ПН) та групи III (ПН+ММСК) для проходження дослідної відстані виявилася значущою ($P < 0,05$) та складала $4,7 \pm 1,1$ сек.

На восьмий тиждень після введення мезенхімальних стовбурових клітин тварини групи III витрачали в середньому $12,8 \pm 1,0$ сек. на проходження тестової дистанції, тоді як тваринам контрольної групи II (ПН) для проходження аналогічної відстані було необхідно в середньому $19,3 \pm 0,9$ сек. Тоді як швидкість проходження тесту тваринами групи I складала $7,2 \pm 0,8$ сек. Різниця в часі, за який тварини контрольної групи II (ПН) та групи III (ПН+ММСК) витратили для проходження дослідної відстані була значущою та складала $6,5 \pm 1,3$ сек.

Через 10 тижнів після введення мезенхімальних стовбурових клітин значення часу за який тварини групи III проходили тестову дистанцію становило $10,2 \pm 1,0$ сек. Для тварин контрольної групи II (ПН) середнє значення часу проходження тесту балансування становило $20,1 \pm 1,0$ сек., тоді як мишам групи I для проходження заданої дистанції в тесті балансування було необхідно в середньому $7,8 \pm 0,9$ сек. А різниця в часі проходження тестової дистанції між тваринами контрольної групи II (ПН) та групи III (ПН+ММСК) складала $9,9 \pm 1,0$ сек.

При проведенні тесту на балансування окрім визначення часу за який тварини проходили задану дистанцію ми розраховували середні значення кількості ковзань задніх кінцівок у тварин контрольної та дослідних груп. Ці результати показані на рис. 3.8. та наведені в табл. 3.10. Динаміка покращення/погіршення результатів кількості зісковзувань груп ПН та ПН+ММСК в порівнянні з їх результатами на момент введення стовбурових клітин наведена у вигляді відсоткового приросту в таблиці 3.11.



Рис. 3.8. Середня кількість зісковзувань лап тварин експериментальних груп. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші, яким була проведена трансплантація ММСК. * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин "ПН".

Таблиця 3.10.

Середня кількість зісковзувань лап тварин експериментальних груп та показники значущості міжгрупових відмінностей (P)

Тижні після операції	Контроль (I)	ПН (II)	ПН+ММСК (III)	P (I,II)	P (I,III)	P (II,III)
	Кількість зісковзувань ($n \pm \sigma$)					
0	$1,5 \pm 0,6$	$8,7 \pm 1,0$	$8,5 \pm 0,8$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$
2	$1,5 \pm 0,7$	$9,8 \pm 1,0$	$8,0 \pm 0,9$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$
4	$1,7 \pm 0,6$	$10,8 \pm 0,7$	$7,5 \pm 0,6$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,01$
6	$2,2 \pm 0,7$	$11,5 \pm 0,7$	$7,0 \pm 0,4$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
8	$2,5 \pm 0,7$	$12,5 \pm 0,6$	$6,3 \pm 0,6$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
10	$2,9 \pm 0,8$	$13,6 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,7$	$< 0,001$	$= 0,04$	$< 0,001$

На момент початку експерименту тварини контрольних груп I (здорові) та II (ПН) при проходженні тестової відстані здійснили в середньому $1,5 \pm 0,6$ та $8,5 \pm 0,8$ ковзань відповідно. Кількість помилок при проходженні тесту у тварин групи III (ПН+ММСК) становило $8,7 \pm 1,0$ підсковзувань.

76

Таблиця 3.11.

Динаміка покращення/погіршення показників зісковзування груп ПН та ПН+ММСК в порівнянні з їх результатами на момент введення ММСК

Тижні після операції	ПН	ПН+ММСК
	Динаміка зісковзування (%)	
2	+ 13	-6
4	+ 24	-12
6	+ 32	-18
8	+ 44	-26
10	+ 56	-38

Через два тижні після введення мезенхімальних стовбурових клітин значення кількості помилок здійснених тваринами контрольної групи I при проходженні тесту не зазнало суттєвих змін та становило в середньому $1,5 \pm 0,7$ ковзань. В той же час як тварини контрольної групи II (ПН) здійснили в середньому $9,8 \pm 1,0$ підсковзувань при проходженні тесту тоді як тварини групи III пройшли задану відстань здійснивши $8,0 \pm 0,9$ ковзань. Різниця в значенні кількості ковзань між контрольною групою був II (ПН) та групою III (ПН+ММСК) при проходженні дослідної відстані була незначною ($P < 0,05$), але статистично достовірною та складала $3,3 \pm 0,6$ ковзань.

Через чотири тижні після введення мезенхімальних стовбурових клітин кількість помилок які здійснили тварини контрольної групи I (здорові) при проходженні тестової дистанції не зазнала значних змін та становила $1,7 \pm 0,6$ ковзань. Тоді як тварини контрольної групи II (ПН) при проходженні аналогічної дистанції здійснили в середньому $10,8 \pm 0,7$ підсковзувань. Значення кількості підсковзувань при проходженні тесту балансування тваринами групи III становило в середньому $7,5 \pm 0,6$ ковзань. Різниця в значенні кількості ковзань між контрольною групою був II (ПН) та групою III (ПН+ММСК) при проходженні дослідної відстані була незначною, але достовірною та складала $2,0 \pm 0,6$ ковзань.

Через шість тижнів після початку експерименту значення кількості помилок які були здійснені тваринами контрольної групи I (здорові) під час проходження тесту балансування становило $2,2 \pm 0,7$ ковзань. В той же час тварини контрольної групи II (ПН) при проходженні аналогічної дослідної відстані здійснили в середньому $11,5 \pm 0,7$ ковзань. Значення кількості моторних помилок здійснених тваринами групи III при проходженні тесту балансування становило в середньому $7,0 \pm 0,4$ ковзань. Різниця в значенні кількості ковзань між контрольною групою був II (ПН) та групою III (ПН+ММСК) при проходженні дослідної відстані була значущою ($P < 0,05$) та складала в середньому $4,5 \pm 0,4$ підсковзувань.

Через вісім тижнів після введення мезенхімальних стовбурових клітин число помилок, які були здійснені при проходженні тесту на балансування тваринами контрольної групи I (здорові) не зазнало значних змін відносно шостого тижня та становило $2,5 \pm 0,7$ ковзань. Тоді як тварини контрольної групи II (ПН) при проходженні тестової дистанції здійснили в середньому $12,5 \pm 0,6$ ковзань. Показник кількості ковзань при проходженні тесту на балансування тваринами групи III знизився та становив в середньому $6,3 \pm 0,6$ ковзань. Різниця в значенні кількості ковзань між контрольною групою був II (ПН) та групою III (ПН+ММСК) при проходженні дослідної відстані була значущою ($P < 0,05$) та складала $6,2 \pm 0,8$ ковзань.

Через десять тижнів після початку експерименту число моторних помилок які здійснювали тварини контрольної групи I (здорові) при проходженні тесту на балансування не зазнало значних змін та становило $2,9 \pm 0,8$ ковзань. В той же час тварини контрольної групи II (ПН) при проходженні аналогічної дослідної дистанції здійснили в середньому $13,6 \pm 0,7$ підсковзувань. Значення кількості ковзань при проходженні тесту балансування тваринами групи III складало в середньому $5,3 \pm 0,7$ ковзань. Різниця в значенні кількості ковзань між контрольною групою був II (ПН) та групою III (ПН+ММСК) при проходженні дослідної відстані була значущою ($P < 0,05$) та складала в середньому $8,2 \pm 0,7$ ковзань.

Такі показники як час за який тварини проходили відстань від лінії старту до лінії фінішу та кількість ковзань задніх лап тварин нерівномірно зростали в групах I (здорові) та II (ПН) на протязі дослідження.

У мишей контрольної групи I нами було відмічене поступове збільшення часу проходження дослідної дистанції з $6,5 \pm 0,8$ сек. на початку дослідження до $7,8 \pm 0,9$ сек. на момент десятого тижня після введення мезенхімальних стовбурових клітин. Кількість моторних помилок в даній групі тварин на протязі експерименту збільшилася з $1,5 \pm 0,6$ до $2,9 \pm 0,7$ ковзань. Значення часу витраченого на проходження дослідної дистанції у тварин контрольної групи II (ПН) збільшилося з $15,6 \pm 1,6$ сек на початку дослідження до $20,1 \pm 1,0$ сек. на десятому тижні експерименту.

Відповідно до зростання часу необхідного для проходження тестової дистанції кількість помилок здійснених тваринами контрольної групи II (ПН) при проходженні тесту балансиру за період експерименту збільшилася з $8,5 \pm 0,8$ до $13,5 \pm 0,7$ ковзань.

В III групі тварин (ПН+ММСК) розпочинаючи з другого тижня після трансплантації ММСК спостерігалось прогресуюче зниження значення часу проходження тестової дистанції в порівнянні з тваринами контрольної групи II (ПН), але на будь-якому тижні експерименту це значення не досягало результатів здорових тварин.

Відмінності в часі та кількості ковзань при проходженні тесту балансиру між групами II та III розпочали проявлятися на другому тижні експерименту (тварини групи III здійснили на 20% менше ковзань, та витратили на 11% менше часу в порівнянні групою II (ПН) та чітко проявилися на четвертому тижні експерименту. В той же час тварини групи I на момент виявлення відмінностей в результатах тесту балансування зробили на 86% менше ковзань та пройшли дослідну дистанцію на 62% швидше в порівнянні з тваринами II групи. Тоді як значення кількості ковзань та швидкості проходження тестової дистанції у тварин групи III (ПН+ММСК) при порівнянні з тваринами групи II були меншими на 81% та 57,5% відповідно.

З метою визначення змін функціонального стану сідничного нерву у тварин контрольних груп та групи з трансплантованими ММСК нами був застосований тест відбитку стопи. Його результати були обчислені за допомогою формули індексу функціональності сідничного нерву (ІФСН). Показник індексу функціонального стану сідничного нерву визначали за допомогою обрахування таких параметрів відбитка стопи як довжина відбитку стопи та ширина розведення пальців. Репрезентативні зображення слідів отриманих під час проведення цього тесту можна побачити на рис. 3.9.

Результати середніх показників ІФСН всіх експериментальних груп показані на рис. 3.10. та наведені в таблиці 3.12.

Динаміка покращення/погіршення ІФСН груп ПН та ПН+ММСК в порівнянні з їх результатами на момент введення стовбурових клітин наведена у вигляді відсоткового приросту в таблиці 3.13.

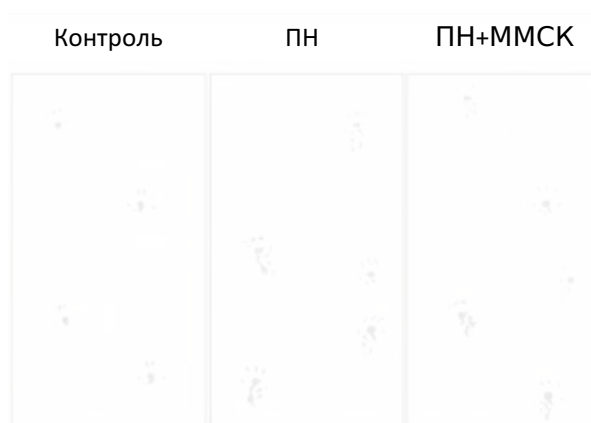


Рис. 3.9. Репрезентативне зображення слідів отриманих під час випробування ходи здорових мишей (Контроль), мишей з периферичною нейропатією (ПН) та групи мишей з нейропатією після введення ММСК (ПН+ММСК)

У тварин семимісячного віку контрольної групи I на початку дослідження середнє значення показника ІФСН становило $2,5 \pm 0,9$ одиниць. Тоді як у тварин контрольної групи II (ПН) на момент початку експерименту показник

80

ІФСН складав в середньому $-30,6 \pm 2$ одиниці. В цей момент часу показник індексу функціональності сідничного нерву у тварин групи ІІІ (ММСК+ПН) становив в середньому $-31,2 \pm 4$ одиниць.

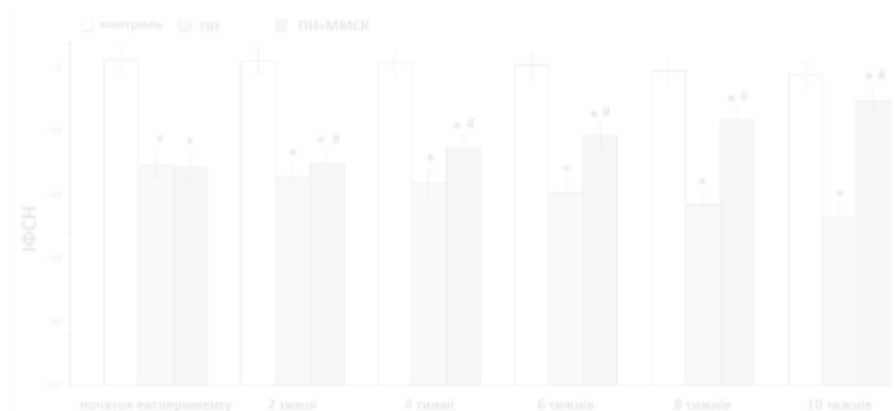


Рис. 3.10. Середнє значення індексу функціональності сідничного нерву у тварин експериментальних груп. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші, яким була проведена трансплантація ММСК. * – $p < 0,05$ щодо контролю, # – $p < 0,05$ щодо групи тварин "ПН".

Таблиця 3.12.

Середні показники ІФСН всіх експериментальних груп та показники значущості міжгрупових відмінностей (P)

Тижні після операції	Контроль (І)	ПН (ІІ)	ПН+ММСК (ІІІ)	P (І,ІІ)	P (І,ІІІ)	P (ІІ,ІІІ)
	Показники ІФСН					
0	$2,5 \pm 0,9$	$-30,6 \pm 2,0$	$-31,2 \pm 4,0$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$
2	$2,0 \pm 1,1$	$-34,6 \pm 1,5$	$-30,1 \pm 1,4$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,05$
4	$1,4 \pm 1,0$	$-36,4 \pm 1,3$	$-25,3 \pm 1,4$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
6	$0,6 \pm 1,0$	$-39,5 \pm 1,4$	$-21,5 \pm 1,4$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
8	$-1,2 \pm 1,0$	$-43,2 \pm 1,7$	$-16,4 \pm 1,4$	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
10	$-2,2 \pm 1,3$	$-47,0 \pm 2,1$	$-10,1 \pm 1,8$	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$

81

Таблиця 3.13.

Динаміка покращення/погіршення показників ІФСН груп ПН та ПН+ММСК в порівнянні з їх результатами на момент введення ММСК

Тижні після операції	ПН	ПН+ММСК
	Динаміка ІФСН (%)	
2	+ 13	-4
4	+ 19	-19
6	+ 29	-31
8	+ 41	-47
10	+ 54	-68

Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольної групи I (здорові) та груп II (ПН) і III (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). Статистично достовірної відмінності значення ІФСН між тваринами контрольної групи II (ПН) та групи III (ММСК+ПН) на момент початку дослідження не було виявлено.

На момент другого тижня після введення мезенхімальних стовбурових клітин середнє значення показника ІФСН у мишей контрольної групи I становило $2,0 \pm 1,1$ одиниць. У тварин контрольної групи II (ПН) середнє значення ІФСН складало $-34,6 \pm 1,5$ одиниць. Тоді як середнє значення показника ІФСН у мишей групи III (ММСК+ПН) становило $-30,1 \pm 1,4$ одиниць. Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольних груп I (здорові) і II (ПН) та тварин групи III (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). Варто відмітити, що у мишей групи III (ММСК+ПН) в даний період показник ІФСН не зазнав достовірних змін відносно початку експерименту та становив $-30,1 \pm 1,4$ одиниць. В той же час у тварин контрольної групи II (ПН) спостерігалось прогресуюче зниження значення ІФСН в порівнянні з тваринами контрольної групи I (здорові) та групи III (ММСК+ПН).

На четвертий тиждень після початку експерименту середнє значення показника ІФСН у тварин контрольної групи I складало $1,4 \pm 1,0$ одиниць. Середнє значення ІФСН у контрольній групі II (ПН) складало $-36,4 \pm 1,3$ одиниці. Тоді як середнє значення показника ІФСН у мишей групи III

(ММСК+ПН) становило $-25,3 \pm 1,4$ одиниць. Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольних груп I (здорові) і II (ПН) та тварин групи III (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). На даному етапі експерименту спостерігалось зростання показника ІФСН у мишей групи III (ММСК+ПН) відносно початку експерименту на $4,8 \pm 1,2$ одиниці. В той же час у тварин контрольної групи II (ПН) спостерігалось поступове зниження значення ІФСН в порівнянні з тваринами контрольної групи I та групи III (ММСК+ПН).

На момент шостого тижня після початку експерименту середнє значення показника ІФСН у тварин контрольної групи I складало $0,6 \pm 1,0$ одиниць. Значення показника ІФСН у тварин контрольної групи II (ПН) складало $-39,5 \pm 1,4$ одиниці. В той же час як у мишей групи III (ММСК+ПН) середнє значення показника ІФСН становило $-21,5 \pm 1,4$ одиниць. Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольних груп I (здорові) і II (ПН) та тварин групи III (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). На даному етапі експерименту нами спостерігалось зростання середнього значення показника ІФСН у мишей групи III (ММСК+ПН) відносно початку експерименту на $8,6 \pm 1,3$ одиниці. В той же час у тварин контрольної групи II (ПН) спостерігалось зниження значення ІФСН на $18 \pm 1,6$ одиниць в порівнянні з тваринами групи III (ММСК+ПН).

На восьмий тиждень після початку експерименту середнє значення показника ІФСН у тварин контрольної групи I знизилось в порівнянні з початком експерименту та складало $-1,2 \pm 1,0$ одиниць. У контрольній групі II (ПН) значення ІФСН на даному етапі дослідження складало в середньому $-43,2 \pm 1,7$ одиниці. Тоді як середнє значення показника ІФСН у тварин групи III (ММСК+ПН) складало $-16,4 \pm 1,4$ одиниць. Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольних груп I (здорові) і II (ПН) та тварин групи III (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). Значення показника ІФСН у мишей групи III (ММСК+ПН) збільшилось відносно початку експерименту на $13,7 \pm 1,4$ одиниці. Тоді як у тварин контрольної групи II (ПН)

спостерігалось зниження значення ІФСН на $26,8 \pm 1,7$ одиниць в порівнянні з тваринами групи ІІІ (ММСК+ПН).

На десятий тиждень після початку експерименту у тварин контрольної групи І середнє значення показника ІФСН складало $-2,2 \pm 1,3$ одиниці. Середнє значення ІФСН у контрольній групі ІІ (ПН) складало $-47,0 \pm 2,1$ одиниці. В той же час середнє значення показника ІФСН у мишей групи ІІІ (ММСК+ПН) становило $-10,1 \pm 1,8$ одиниць. Відмінності між значенням показника ІФСН у тварин контрольних груп І (здорові) і ІІ (ПН) та тварин групи ІІІ (ММСК+ПН) були значущими ($P < 0,05$). На даному етапі експерименту значення показника ІФСН у мишей групи ІІІ (ММСК+ПН) збільшилось відносно початку експерименту на $20 \pm 1,7$ одиниць. В той же час у тварин контрольної групи ІІ (ПН) спостерігалось поступове прогресуюче зниження значення ІФСН на $36,9 \pm 1,8$ одиниць в порівнянні з тваринами групи ІІІ (ММСК+ПН).

За допомогою аналізу функціонального стану сідничного нерву проведеного за результатами тесту відбитків слідів нами було відмічено поліпшення показників рухової активності тварин ІІІ групи (ММСК+ПН) на 2, 4, 6, 8 та 10 тижні після введення мезенхімальних стовбурових клітин.

На протязі 2-10 тижнів експерименту у тварин І групи нами було відмічено незначне зниження рухової функції, що виражалось в поступовому зниженні показника індексу функціональності сідничного нерву (ІФСН) від $2,5 \pm 0,9$ одиниць на початку дослідження до $-2,2 \pm 1,5$ одиниць на 10 тижні та незначному підвищенні кількості ковзань і як наслідок зростанні необхідного для проходження тесту балансування.

В ІІ групі тварин нами спостерігалось подальше прогресування захворювання. Це виражалось в наростаючому збільшенні кількості моторних помилок, що виражалось у зростанні кількості ковзань задніх кінцівок та часу необхідного на подолання тестової дистанції при проходженні тесту балансування.

Індекс функціонального стану сідничного нерву у тварин II групи продовжував знижуватися на протязі всього часу дослідження та на 10 тижні дослідження становив $-47,0 \pm 2$ одиниці. В тварин цієї групи відмічалися значні порушення соматосенсорної чутливості дистальних ділянок кінцівок та рухової координації.

У тварин III групи зростання показника індексу функціональності Сідничного нерву (ІФСН) відносно тварин II групи було зафіксоване на 2 тижні після трансплантації та становило $-30,2 \pm 2$ проти $-34,6 \pm 0,9$ одиниць у II групі.

На 10 тижень після введення ММСК середнє значення коефіцієнту ІФСН у тварин групи III становило $-10,1 \pm 2,3$ одиниць, тоді як в контрольній групі II середнє значення показника ІФСН складало $-47,0 \pm 2$ одиниць. Підвищення числового значення індексу функціонального стану сідничного нерву корелює зі зменшенням кількості ковзань та часу витраченого на проходження тесту на балансування у тварин III групи.

Обговорення результатів

Таким чином, показано, що через 4 тижні після введення стовбурових клітин у мишей з периферичною нейропатією відбувається значне зниження тремору задніх кінцівок, зростання сили, а також частково відновлюється контроль над литковими м'язами. Станом на 10-й тиждень після введення ММСК піддослідні демонструють поведінкові результати, що є дуже близькими до показників здорових тварин ($P > 0.05$). Цей факт, на даному етапі, є найкращим підтвердженням позитивного ефекту від трансплантованих ММСК на піддослідних зі значною демієлінізацією. Введення мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин в м'яз піддослідних мишей здійснило потенційно терапевтичну дію, спрямовану на ремієлінізацію та регенерацію сідничного нерва. Ми припускаємо, що терапевтична дія на периферичну нейропатію у мишей C57BL/6, продемонстрована результатами поведінкових тестів, полягає в паракринних

та проліфераційних ефектах трансплантованих ММСК-ЖТ. В інших дослідженнях ММСК повідомлялося, що нейротрофічні фактори мають паракринну дію, але основними факторами є регенерація периферичних нервів, включаючи сприяння росту аксонів та ремієлінізацію. Збільшення нейротрофічних факторів, як виявилось, опосередковує не тільки процес диференціювання до клітин Шванна, але також регенерацію тканини після трансплантації стовбурових клітин.

Можна припустити, що екзосома, отримана від ММСК, має потенційно терапевтичні ефектори та включає ЦИТОКІНИ, фактори росту, сигнальні ліпіди, мРНК та регуляторні мікро РНК. Тому все частіше повідомляється про лікування різних захворювань екзосомами. На основі цих звітів можна припустити, що нейротрофічні фактори та подібний епідермальному фактору росту білок нейрегулін-1, фізіологічний активатор передачі сигналів PI3K – Akt, які є компонентами екзосоми, можуть бути посередниками регенерації сидничного нерва та скелетних м'язів і у нашому дослідженні. Потрібні подальші дослідження, такі як аналіз компонентів екзосоми, отриманої з ММСК, та застосування екзосом для лікування мишей C57BL/6.

Можна стверджувати, що зареєстровані позитивні зміни, щодо поведінкових та нервово м'язових процесів у мишей C57BL/6 підтверджують факт адекватності обраної тваринної моделі хвороби ШМТ1А для використання її в якості дослідження механізмів терапевтичної дії ММСК-ЖТ та пошуку інших варіантів симптоматичного лікування.

3.5. Висновки до розділу 3

Нормальне функціонування периферичної нервової системи відбувається тільки за наявності мієлінової оболонки, що вкриває аксони та утворюється клітинами Шванна. Ці вузькоспеціалізовані гліальні клітини огортають нервові тканини багатьма шарами мієліну, що сприяє швидкому поширенню імпульсів уздовж аксона.

1. Результати тесту на баланс демонструють, що дорослі миші лінії C57Bl/6 стикаються зі значними труднощами в русі похилою балкою. Вони витрачають значно більше часу на подолання заданої відстані та їх хода супроводжується великою кількістю зісковзувань. На відміну від здорових мишей C57Bl, що пройшли тест без помітних труднощів. Слід зазначити, що самці та самки з нейропатією віком 20 тижнів проходили тест відповідно на 31% та 26% повільніше, ніж особини віком 15 тижнів, а кількість рухових помилок була більшою на 66% та 21% у більш дорослих самців та самок, ніж у 15-тижневих мишей. Ці факти можуть свідчити про те, що інтенсивність патологічних втрат в руховій поведінці зростає з часом. Також ми спостерігали, що самки з нейропатією проходили поведінковий тест повільніше на 37%, ніж самці того ж віку.

2. Електронно-мікроскопічний аналіз поперечних зрізів волокон у зразках сідничного нерва мишей лінії C57BL/6, показав подібну до типової для ШМТ1А патоморфологічну картину. Вона характеризувалась аксональною втратою та витонченням мієлінового шару більшості аксонів, що вказувало на демієлінізацію великої кількості нервових волокон. Також були зафіксовані цибулеподібні структури. Інколи спостерігалась стратифікація мієліну гіпертрофованих оболонок. Аномальне витончення деяких мієлінових оболонок фактично призводило до їх зникнення. Показано, що вираженість демієлінізації залежала від діаметра аксонів, великі рухові волокна мали мінімальні оболонки мієліну, на відміну від менших волокон де оболонки мали нормальну товщину. Як показано в наступному дослідженні, такі зміни призводять до зменшення швидкості провідності нервових імпульсів ураженого сідничного нерва.

3. Показано, що складні нервові потенціали діх тварин з нейропатією, мали у кілька разів менші амплітуди та набагато менші швидкості провідності порівнянюючи зі здоровими мишами. Встановлено, що одним з основних факторів впливу на швидкість поширення імпульсу нервими волокнами є структурні зміни цих аксонів, а саме, зменшення товщини їх мієлінового

шару. Їх появу можна зв'язати з патологією процесу генерації структур цитоскелету, погіршеним транспортом нейрофіламентів та порушеним фосфорилуванням структурних білків. Відомо, що це призводить зниження рівня фактора росту у аксонах. Стан мієлінопатії в периферичних нервах також може бути важливою причиною патологічного поширення спайкових сигналів через нервові волокна. Також було зафіксовано дворазове зниження амплітуди М-хвилі литкового м'язу хворої миші в порівнянні зі здоровими.

4. Введення ММСК-ЖТ в м'яз мишей з нейропатією здійснило потенційно терапевтичну дію, спрямовану на ремієлінізацію регенерацію та проліферацію сідничного нерва.

ВИСНОВКИ

В роботі виконано дослідження процесів демієлінізації безпосередньо на піддослідних трансгенних мишах з периферичною нейропатією ШМТ1А.

1. Проведено літературний огляд робіт в таких областях: демієлінізація нервових волокон при ШМТ в тваринних моделях та у людей; структура та роль мієлінової оболонки в передачі нервового імпульсу; роль RMP22 в патогенезі ШМТ1А; роль аксональної дегенерації в формуванні демієлінізуючих нейропатій; роль аксональної регуляції в мієлінізації; механізми впливу мезенхімальних стовбурових клітин на ремієлінізацію.

2. Сформульована основна мета роботи, поставлені та виконані задачі для досягнення цієї мети. Розроблена та проведена експериментальна частина роботи. Після отримання трансгенних мишей лінії C57BL/6 з лабораторії Джексона (США) їх було використано в якості батьківських особин для виведення поколінь гомозиготних по RMP22 мишей. Для дослідження процесів демієлінізації, на цих мишах були проведені поведінкові, морфологічні та електрофізіологічні дослідження.

3. За результатами поведінкового тесу було встановлено, що ступінь зниження рухової активності, посилення слабкості і тремору в задніх кінцівках залежить від статі та віку піддослідних тварин. Виявлено, що самки у 100% випадків мали ранню маніфестацію симптомів та більш агресивний перебіг хвороби в порівнянні з самцями того ж віку.

4. Виявлено, що демієлінізація була ярко вираженою у волокнах більшого діаметру (рухових), на відміну від волокон меншого діаметру, в яких мієлінові оболонки мали нормальну або навіть збільшену товщину.

5. Показано, що в умовах надмірної експресії RMP22 утворюється велика кількість електрон-щільних тіл (агрегати білка RMP22 з білками теплового удару HSP), які сприяють додатковому порушенню внутрішньоклітинного транспорту та дисфункції протеасом у Шваннівських клітинах та стимулюють подальший розвиток процесів демієлінізації.

6. Показано, що внаслідок демієлінізації рухових нервових волокон CNAP та М-хвилі характеризуються набагато меншими амплітудами та більшими затримками порівняно зі здоровими мишами. Такі результати повністю відповідають отриманим патоморфологічним картинам.

7. Одночасно із результатів трьох досліджень можна зробити спільний висновок, що лінія трансгенних гомозиготних мишей C57BL/6 в даний час може вважатися адекватною твариною моделлю для виявлення механізмів розвитку ШМТ у людей і, отже, може бути використана для розробки методів лікування цієї хвороби. Таким чином, спираючись на цей факт, та на виявлені фенотипічні особливості піддослідних мишей, було запропоновано експериментальне лікування на основі мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини.

8. Введення мезенхімальних стовбурових клітин позитивно вплинуло на рухову активність хворих мишей, дозволивши їм пройти дистанцію значно швидше та з меншою кількістю рухових помилок. Зокрема, виявлено, що вже через 4 тижні після трансплантації стовбурових клітин у піддослідних відбувається помітне зниження тремору задніх кінцівок, зростання сили, а також частково відновлюється контроль над литковими м'язами.

9. Показано, що станом на 10-й тиждень після введення ММСК піддослідні демонструють поведінкові результати, що є дуже близькими до показників здорових тварин ($P > 0.05$). Цей факт підтверджує ефективність та результативність обраного симптоматичного лікування.

Схожість

Джерела з Інтернету

79

2	https://dspace.vspu.edu.ua/bitstream/handle/123456789/527/54.pdf?sequence=1&isAllowed=y	4 джерела	0.6%
3	http://ni.biz.ua/2/2_9/2_95766_nikolay-ivanovich-vavilov.html	3 джерела	0.21%
4	http://ni.biz.ua/10/10_20/10_203417_potentsial-deystviya-rasprostranyayushcheesya-vozbuzhdenie.html		0.2%
5	http://um.co.ua/10/10-7/10-72892.html	6 джерел	0.17%
6	http://4-i-5.ru/text-3/page-16-ref-43746.php	2 джерела	0.15%
7	https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/25779/1/Sovpenko_magistr.pdf	5 джерел	0.09%
9	https://ukrshealth.ru/hvorobi-simptomi-likuvannya/psihologija/7875-potencial-dii-i-jogo-poshirennja-v-nervovih.html		0.08%
12	https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/23079/1/Safronova_magistr.docx		0.08%
13	https://studopedia.su/16_191038_hvoroba-parkinsona.html		0.07%
14	https://cyberleninka.ru/article/n/stvolovye-kletki-iz-zhirovoy-tkani		0.06%
15	https://bioweb.lnu.edu.ua/wp-content/uploads/2020/04/pimb-tezi-2020-A4-v1.pdf		0.06%
16	https://ukrbukva.net/page,9,73621-Zakony-razdrazheniya-vozbudimyh-tkaneiy.html	2 джерела	0.06%
17	https://en.medicine-guidebook.com/akmeologiya_770_teoreticheskaya-znachimost-issledovaniya.html	32 джерела	0.06%
18	http://medmat.pp.ua/43/859.html		0.05%
19	https://studfile.net/preview/2266852/page:24		0.05%
20	https://dspace.lboro.ac.uk/2134/12358	5 джерел	0.05%
23	https://www.scientificarchives.com/article/neuromotor-impairment--hearing-loss-and-blindness-in-a-preclinical-mou	2 джерела	0.05%
24	https://refs.co.ua/75203-Rezhim_pitaniya_sportsmena.html		0.04%
25	https://istina.msu.ru/download/58989393/1dNrY0:EzFZ0Vh-E4XDxwU3FzGQ77GpwHM	2 джерела	0.04%
26	https://www.udau.edu.ua/assets/files/zbirniki-naukovi-praci/-Zbirnik-UNUS-79.Ch.1.pdf	2 джерела	0.04%

[illegible]

Цитати

Цитати

4

- 1 Ainsworth (1994) вважають це явище доказом існування модифікованих генів [42], але наявний опис близнюків з різним ступенем тяжкості захворювання [28] робить цю гіпотезу неспроможною.
- 2 3.9. Репрезентативне зображення слідів отриманих під час випробування ходи здорових мишей (Контроль), мишей з периферичною нейропатією (ПН) та групи мишей з нейропатією після введення ММСК (ПН+ММСК) у тварин семимісячного віку контрольної групи I на початку дослідження середнє значення показника ІФСН становило $2,5 \pm 0,9$ одиниць.
- 3 «цибулинних головок»
- 4 «цибулинними головками»