

АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЕ И РЕПАРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ

А.-М. В. Ерофеева¹, О. А. Антипова¹, И. А. Семёник¹, И. П. Жаворонок¹,
Е. В. Фёдорова¹, С. В. Пинчук², С. Н. Чур³, А. Ю. Молчанова¹



¹Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь

³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Введение. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) представляется перспективным методом купирования болевого синдрома при заболеваниях периферических артерий и реваскуляризации ишемизированной конечности.

Цель. Изучить влияние разных режимов локального введения МСК ЖТ на ноцицептивные реакции, параметры походки и гистоструктуру мягких тканей ишемизированной конечности у крыс.

Материал и методы. Экспериментальную ишемию конечности моделировали у крыс Wistar методом перерезки общей бедренной артерии с предварительным двусторонним лигированием. На седьмые сутки эксперимента соответствующим группам животных выполнили трансплантацию аллогенных МСК ЖТ в количестве 1×10^6 клеток/кг (однократное и двукратное введение). Проведена оценка ноцицептивных реакций к механическому стимулу, параметров походки, а также гистоструктуры мягких тканей зоны ишемии задней конечности у крыс.

Результаты. Трансплантация МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг в зону ишемии задней конечности независимо от кратности ослабляла механическую гипералгезию, оказывала протекторное действие на миелиновые оболочки нервных волокон и способствовала восстановлению параметров походки. Однократная трансплантация МСК ЖТ оказалась более эффективной в противовоспалительном и антиишемическом действии на ткани ипсилатеральной конечности.

Выводы. Локальная аллогенная трансплантация МСК ЖТ эффективно ослабляла вызванные перерезкой артерии механическую гипералгезию и нарушения походки, а также предотвращала истончение миелиновой оболочки нервов в зоне повреждения сосуда.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, ишемия конечности, параметры походки, ноцицептивные реакции.

Для цитирования: Антиноцицептивное и репаративное действие мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной ишемии конечности / А.-М. В. Ерофеева, О. А. Антипова, И. А. Семёник, И. П. Жаворонок, Е. В. Фёдорова, С. В. Пинчук, С. Н. Чур, А. Ю. Молчанова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2024. Т. 22, № 1. С. 19-26. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-1-19-26>

Введение

Заболевания периферических артерий (ЗПА) – факторы риска ампутаций нижних конечностей и летальности от сопутствующих сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний [1, 2]. Один из характерных симптомов, связанных с нарушением кровотока по артериям нижних конечностей, – боль, которая связана с нарушением притока крови к тканям конечности и ухудшением их трофики, с исходом в ишемию мышц и развитие нейропатий [3, 4].

Применение клеточной терапии для лечения и улучшения качества жизни пациентов с нарушениями артериального кровотока в конечностях представляется перспективным и относительно безопасным [5-7]. Эффективность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в купировании нейропатической и воспалительной боли показана в разных экспериментальных исследованиях [8, 9]. В то же время сведения об антиноцицептивном действии МСК при моделировании хронического нарушения кровотока (и как следствие, ухудшения трофики нервов и ишемии

мышц) в конечности отсутствуют. Учитывая три фактора, лежащие в основе потенциального терапевтического действия МСК – 1) способность дифференцироваться в эндотелиоподобные клетки, 2) высокую паракринную активность, включая выделение факторов ангиогенеза и интерлейкинов, 3) стимуляцию образования кровеносных сосудов в месте введения [10, 11] – можно предположить, что они будут стимулировать неоангиогенез и репаративные процессы в тканях ишемизированной конечности и улучшать качество жизни пациентов, включая ослабление или даже купирование болевых ощущений. Вместе с тем, несмотря на достигнутые в этом направлении успехи, одной из ключевых проблем практического внедрения клеточной терапии в комплексное лечение ишемии конечностей остается выбор оптимального типа и режима трансплантации МСК, а также их антиноцицептивное действие при данной патологии.

Цель исследования – изучить влияние разных режимов локального введения МСК жировой ткани (ЖТ) на ноцицептивные реакции, па-

раметры походки и гистоструктуру мягких тканей ишемизированной конечности у крыс.

Материал и методы

Экспериментальные исследования выполнены на 48 крысах-самцах Wistar массой 200-220 г, содержащихся в условиях конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларуси. Животных содержали при температуре $22,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ и 12/12 ч цикле освещения день/ночь с доступом к воде и пище *ad libitum*. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали положениям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных исследований (Страсбург, 1986). Протоколы экспериментов одобрены комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол № 1 от 19.01.2021).

Все животные были разделены на следующие группы: I – ишемия правой задней конечности без лечения (ишемия) ($n=12$); II – ложнооперированные ($n=12$); III – ишемия + однократное внутримышечное введение МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг (ишемия+МСК ЖТ $\times 1$) ($n=12$); IV – ишемия + двукратное внутримышечное введение МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг (ишемия+МСК ЖТ $\times 2$), $n=12$.

Моделирование ишемии задней конечности осуществляли путем перерезки общей бедренной артерии на правой задней лапе с предварительным двусторонним лигированием согласно ранее описанному методу [12]. Хирургические манипуляции выполняли под общей анестезией (тиопентал натрия, ОАО «Синтез», РФ) с местным обезболиванием 1% раствором лидокаина гидрохлорида (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь). Для ушивания раны на бедре использовали рассасывающийся полидиоксаноновый шовный материал «Сургикрол» 3/0 (Футберг, Беларусь). Швы обрабатывали бриллиантовым зеленым (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь).

Трансплантацию МСК ЖТ осуществляли в дозах 1×10^6 клеток/кг однократно (седьмые сутки после иссечения участка бедренной артерии) либо двукратно (7 и 14-е сутки после указанной ранее операции). Предварительно выделение и культивирование МСК ЖТ проводили на базе Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно ранее описанной методике [13]. Суспензию клеток вводили внутримышечно в два участка: 60 мкл по периметру зоны иссечения артерии за 4 инъекции по воображаемому циферблату и еще 40 мкл ниже в икроножную мышцу передне-латеральной поверхности средней трети голени.

Порог ноцицептивной реакции на механический стимул (ПНР) определяли до операции по моделированию ишемии конечности, а также на 7, 14, 21, 28, 60, 75 и 90-е сутки после нее с помощью алгезиметра для теста «Рэндалла-Селитто» (Panlab, Испания). Измерения ПНР осуществляли трехкратно с интервалом 5-7 минут. Анализ параметров походки проводили с использованием

аппаратно-программного комплекса CatWalk (Noldus Inc., Голландия), представляющего собой коридор со стеклянным полом (дорожкой), подсвечиваемым одновременно зелеными светодиодами и красным светом. На расстоянии 56 см ниже стеклянной дорожки располагали высокоскоростную камеру с широкоугольным объективом (Gevicam GP-3360, GEViCAM Inc., США). Это позволяет автоматически регистрировать отпечатки лап с помощью программного обеспечения CatWalk XT 10.6, когда животное пересекает участок дорожки с откалиброванной длиной [14]. Для анализа были выбраны следующие показательные параметры:

- *stand duration* (продолжительность «опоры» конечности) – время в секундах, когда конечность находится в контакте с поверхностью стеклянной дорожки;
- *swing duration* (продолжительность «переноса» конечности) – время в секундах, когда конечность не контактирует с поверхностью стеклянной дорожки;
- *max contact area* (максимальная площадь контакта) – максимальная площадь контакта конечности с поверхностью дорожки во время фазы «опоры»;
- *stride length* (длина шага конечности) – расстояние между контактом одной и той же конечности с поверхностью дорожки.

Для каждого из указанных параметров были рассчитаны процентные соотношения значений показателей ипсилатеральной (правой) конечности к таковым для контралатеральной (левой) конечности.

На 21 и 90-е сутки после иссечения участка бедренной артерии часть животных подвергали эвтаназии (тиопентал натрия, 100 мг/кг, внутривенно) и забору биопсийного материала для проведения гистологического анализа седалищного нерва и перинеуральной ткани при окраске гематоксилином и эозином, а также по Хеквисту, по стандартным методикам.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием пакета Statistica 10 (Statsoft Inc., США). Проверку на нормальность распределения количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро-Уилка. Значимость наблюдаемых различий определяли с помощью дисперсионного анализа повторных измерений (repeated measures ANOVA), с применением апостериорных сравнений критерием Тьюки. Вывод о статистической значимости различий делали при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Перерезка правой общей бедренной артерии крыс приводила к развитию у них механической гипералгезии уже к седьмым суткам после операции (рис. 1), что выражалось в снижении ПНР ипсилатеральной конечности на 39,4% (со $134,1 \pm 1,6$ г до $81,3 \pm 2,6$ г, $p < 0,005$). Механическая гипералгезия в этой группе экспериментальных животных сохранялась по 90-е сутки

включительно, хотя и ослабевала в относительно более поздние сроки эксперимента (60-90-е сутки после операции). Вместе с тем ПНР контралатеральной (левой задней) конечности, как и данный показатель для ипсилатеральной конечности ложно оперированных животных, не изменялись на всем протяжении исследования ($p>0,05$) (рис. 1).

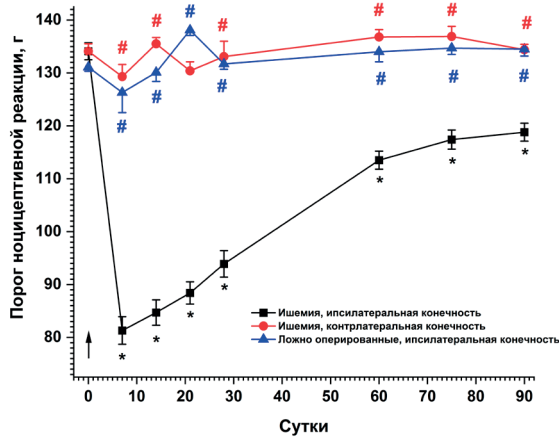


Рисунок 1. – Порог ноцицептивной реакции конечностей крыс до и после перерезки общей бедренной артерии при предъявлении механического стимула.

* – $p\leq 0,05$ по сравнению с исходными (до перерезки артерии) значениями, # – $p\leq 0,05$ по сравнению с ипсилатеральной конечностью крыс группы I (ишемия)

Figure 1. – Mechanical withdrawal threshold of hind limbs in rats before and after transection of the common femoral artery.

* – $p\leq 0,05$ compared with the initial (before artery transection) values, # – $p\leq 0,05$ compared with the ipsilateral limb of group I rats (ischemia)

Однократная аллогенная трансплантация МСК ЖТ 1×10^6 клеток/кг в указанном выше режиме существенно ослабляла вызванную перерезкой артерии механическую гипералгезию (рис. 2). Уже на седьмые сутки после внутримышечного введения МСК ЖТ (14-е сутки после операции) ПНР ипсилатеральной конечности повышался на 26,5% по сравнению со значениями до трансплантации (с $85,6\pm 2,1$ г до $108,3\pm 1,2$ г, $p<0,01$). На 14-е сутки после трансплантации повышение ПНР составило уже 30,8% (до $112,0\pm 1,5$ г, $p<0,001$). Данная динамика сохранялась до конца эксперимента, при этом, начиная с 75-х суток после перерезки артерии, усредненные значения ПНР ипсилатеральной конечности статистически значимо не отличались от исходных (до операции) (рис. 2). Двукратное введение исследуемой дозы МСК ЖТ на седьмые и 14-е сутки после перерезки артерии также приводило к заметному ослаблению ПНР, начиная с 28-х суток после операции. Данный эффект сохранялся на протяжении исследования. Восстановление исходного уровня ПНР отмечено на 75-е сутки после перерезки артерии (рис. 2). Вместе с тем усиления анальгетического эффекта при увеличении кратности трансплантаций не выявлено (рис. 2).

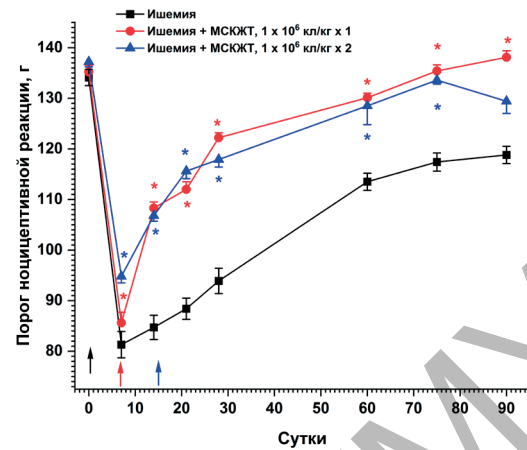


Рисунок 2. – Порог ноцицептивной реакции ипсилатеральной конечности крыс с ишемией конечности до и после аллогенной трансплантации МСК ЖТ. * – $p\leq 0,05$ по сравнению с группой I (ишемия)

Figure 2. – Mechanical withdrawal threshold of ipsilateral hind limb in rats with limb ischemia before and after allogeneic transplantation of ADMSCs

* – $p\leq 0,05$ compared with the ipsilateral limb of group I rats (ischemia)

При анализе параметров походки на седьмые сутки после операции установлено статистически значимое снижение максимальной площади и продолжительности контакта ипсилатеральной конечности с поверхностью и наряду с повышением продолжительности фазы ее переноса отмечено во всех группах животных, кроме ложнооперированных (рис. 3).

У животных с перерезкой правой бедренной артерии без введения МСК ЖТ, начиная с 14-х суток после повреждения сосуда, найдено постепенное восстановление исследуемых показателей. У крыс, которым однократно вводили МСК ЖТ, на 21-е сутки после операции (14-е сутки после введения стволовых клеток) по сравнению с крысами группы «ишемия» отмечено статистически значимое повышение продолжительности (на 43,3%, $p<0,001$) и максимальной площади контакта поврежденной конечности (на 20,3%, $p<0,05$) с поверхностью дорожки и статистически значимое сокращение продолжительности фазы ее переноса (на 18,1%, $p<0,05$) (рис. 3). Двукратное введение МСК ЖТ не характеризовалось подобными эффектами в указанной временной точке. Вместе с тем на более поздних сроках эксперимента в этой группе найдено наиболее эффективное восстановление изучаемых параметров походки. Начиная с 28-х суток после операции и до конца эксперимента (90 суток), значимых различий по трем перечисленным выше показателям между группами животных не выявлено ($p>0,05$). На протяжении исследования статистически значимых изменений длины шага не зафиксировано ни в одной из групп животных, как и не обнаружено межгрупповых различий по данному показателю ($p>0,05$) (рис. 3).

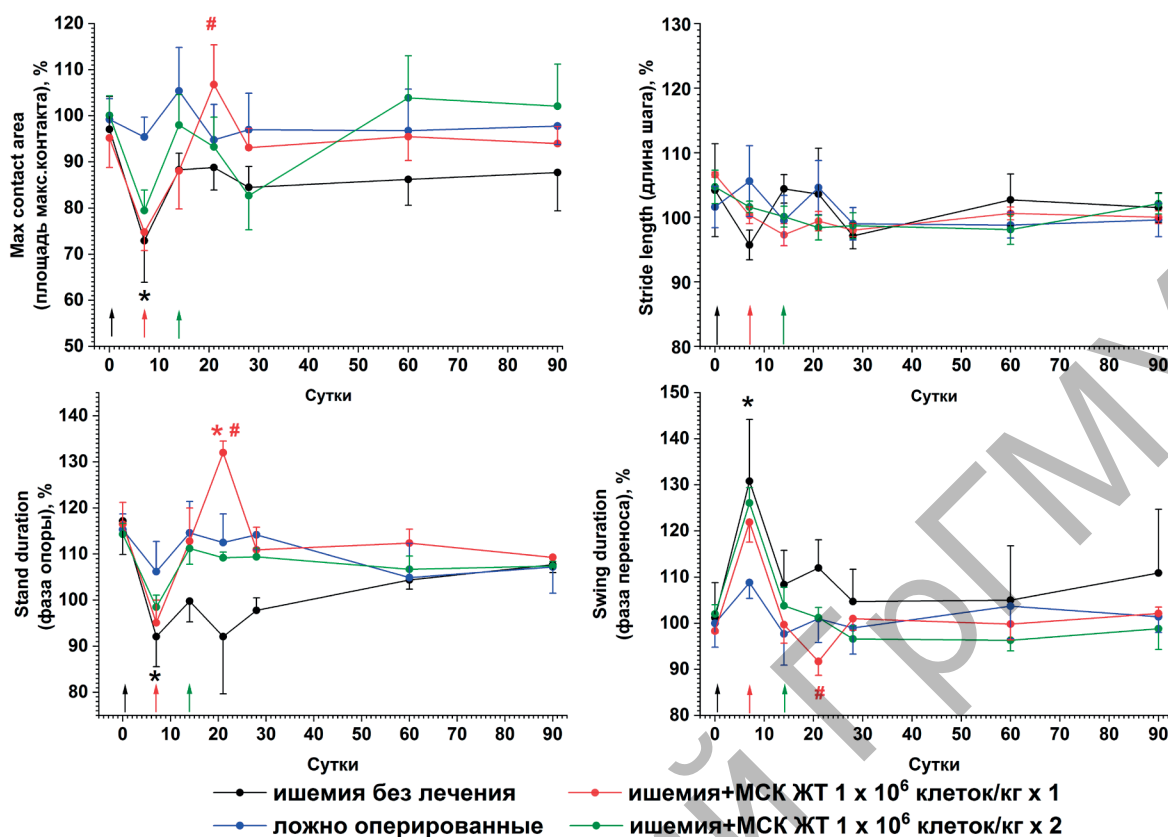


Рисунок 3. – Параметры походки крыс до и после перерезки общей бедренной артерии правой задней конечности и введения МСК ЖТ

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с исходными (до перерезки артерии) значениями; # – $p \leq 0,05$ по сравнению с ипсилатеральной конечностью крыс группы I (ишемия)

Figure 3. – Gait parameters in rats before and after common femoral artery transection and injection of ADMSCs

* – $p \leq 0.05$ compared with the initial (before artery transection) values; # – $p \leq 0.05$ compared with the ipsilateral limb of group I rats (ischemia)

Перерезка правой бедренной артерии крыс приводила к нарушению гистологической картины как в зоне непосредственного иссечения сосуда, так и дистальнее. Ткани бедра в области перерезки артерии к 21-м суткам после операции характеризовались наличием фиброза с умеренной круглоклеточной воспалительной реакцией с примесью нейтрофилов и пролиферацией сосудов (рис. 4б). Отмечали очаги неравномерной атрофии и дистрофии поверхностных и глубоких мышц. В нервно-сосудистых пучках выявляли фиброз эпи- и периневрия и пролиферацию шванновских клеток, выраженную периваскулярную лимфоцитарную инфильтрацию (рис. 4б).

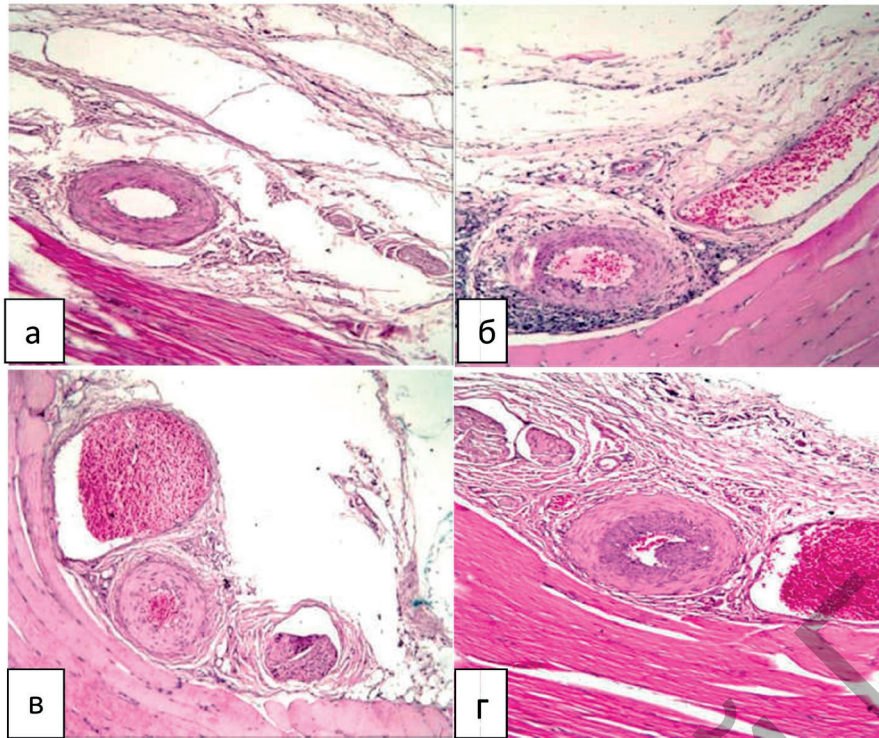
Истончение миелиновой оболочки с потерей характерной картины мелкопестрого узора отмечено в 26,2% нервных волокон, в 2,5% обнаружены локальные участки демиелинизации, а в 3,8% – «выпадение» осевого цилиндра (рис. 5б).

На 90-е сутки после перерезки сосуда выявлялись атрофия, ишемические и некротические изменения поверхностных и глубоких мышц бедра, а также обширные очаги липоматоза (рис. 4е). Отмечалось выраженное фиброзирование элементов нервно-сосудистого пучка как под кожей,

так и в более глубоких отделах мягких тканей задней конечности крысы. Истончение миелиновой оболочки, ее уплотнение и потеря характерного мелкоячеистого узора зафиксированы в 72,4% нервных волокон, в 3,4% – «выпадение» осевого цилиндра, а в 1,7% – полная демиелинизация нервного волокна с нарушением целостности миелиновой оболочки и обнажением осевого цилиндра (рис. 5е).

Однократное введение МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг к 21-м суткам исследования приводило к ослаблению признаков воспалительной инфильтрации в зоне перерезки бедренной артерии и сопровождалось умеренным фиброзом сосуdivо-нервного пучка (рис. 4в). Дистальнее места повреждения артерии наблюдалась гиперплазия эндотелиоцитов артерии, еще дистальнее – артериальная сосудистая стенка с хорошо различимыми слоями и открытым просветом, в нервных стволах отмечалась неоваскуляризация. Мышечная ткань была гипертрофирована. На 90-е сутки установлено отсутствие воспалительной инфильтрации наряду с утолщением стенок сосудов артериального типа за счет пролиферации гладкомышечных клеток

21-е сутки



90-е сутки

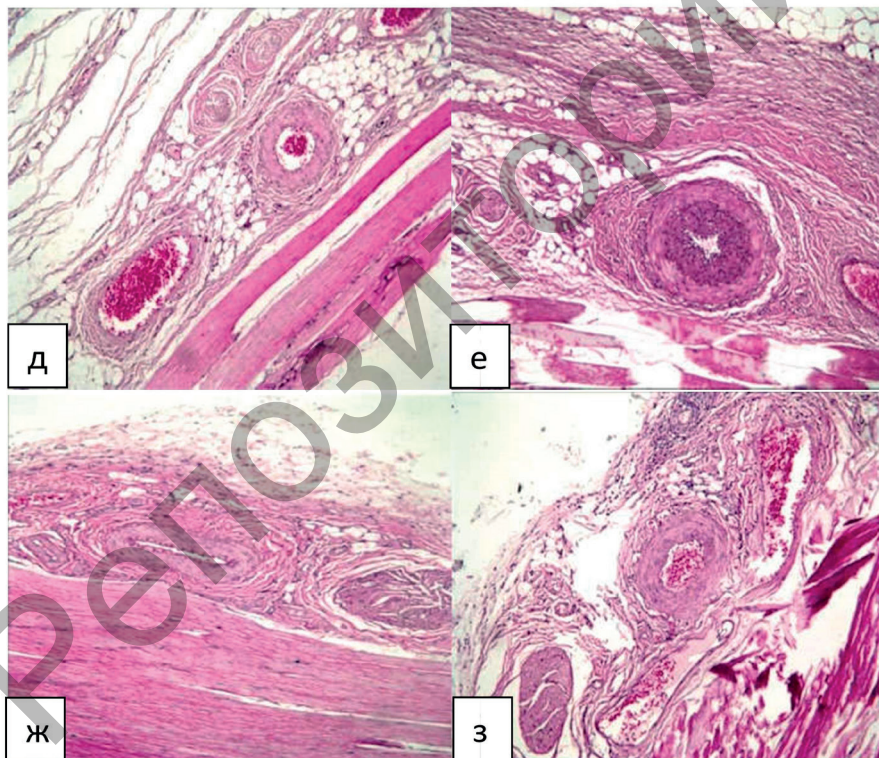


Рисунок 4. – Гистоструктура мягких тканей задней лапы крыс после моделирования ишемии конечности на 21-е сутки (а-г) и 90-е сутки (д-з) исследования:

а, д – ложно оперированные; б, е – ишемия без лечения; в, ж – ишемия с однократной трансплантацией МСК ЖТ; з, з – ишемия с двукратной трансплантацией МСК ЖТ. Окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 100$

Figure 4. – Histostructure of soft tissues of the hind paw after induced limb ischemia after 21st day (a-d) and 90th day (e-h) of experiment: a, e – sham; b, f – ischemia without treatment; c, g – ischemia with single injection of ADMSCs; d, h – ischemia with double injection of ADMSCs. Haematoxylin and eosin staining, magn. $\times 100$

(рис. 4е). При окраске срезов по Хеквисту в нервных пучках определялись нервные волокна разного размера с преобладанием волокон правильной округлой/овальной формы, осевые цилиндры которых были плотно окружены хорошо визуализируемой миелиновой оболочкой с характерной мелкоячеистой структурой (рис. 5в, 5ж). На 21-е сутки истончение миелиновой оболочки выявлено в 23% нервных волокон, а на 90-е – только в 11,5%.

Репаративный эффект двукратного введения исследуемой дозы МСК ЖТ по сравнению с однократной трансплантацией характеризовался более выраженными признаками воспаления и ишемии даже на более поздних сроках исследования (рис. 4г, 4з). Так, в изучаемых тканях на 90-е сутки после операции наблюдали умеренно выраженный фиброз с диффузной умеренной лимфоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, а также очаги межмышечного липоматоза (рис. 4з). Мышечная ткань в зоне перерезки артерии характеризовалась выраженными ишемическими изменениями. Элементы нервно-сосудистого пучка были фиброзированы, с умеренной воспалительной инфильтрацией. Вместе с тем при окраске срезов по Хеквисту на 90-е сутки после перерезки артерии истончение миелиновой оболочки выявлено лишь в 8,7% нервных волокон, в 1,1% – выпадение осевого цилиндра, в 1,1% – очаговая демиелинизация нервного волокна (рис. 5г, 5з).

Гистологическая картина тканей как в зоне иссечения сосуда, так и дистальнее, в наших экспериментах была ха-

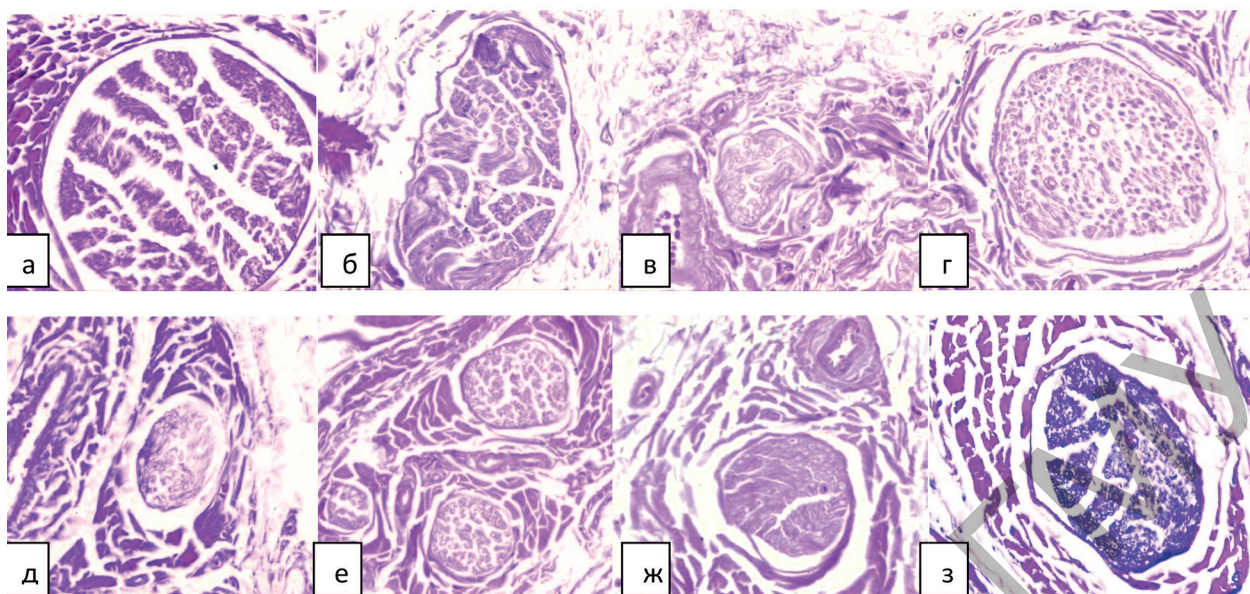


Рисунок 5. – Гистоструктура миелиновых нервных волокон после моделирования ишемии конечности на 21-е сутки (а-г) и 90-е сутки (д-з) исследования: а, д – ложно оперированные; б, е – ишемия без лечения; в, ж – ишемия с однократной трансплантацией МСК ЖТ; з, з – ишемия с двукратной трансплантацией МСК ЖТ. Окраска по Хеквисту, ув. $\times 400$

Figure 5. – Histostructure of myelinated nerve fibers after limb ischemia modeling on 21st day (a-d) and day 90 (e-h) of the study: a, e – sham operated patients; b, f – ischemia without treatment; c, g – ischemia with a single transplantation of ADMSCs; d, h – ischemia with a double transplantation of ADMSCs. Hecquist staining, magn. $\times 400$

рактерной для хронической ишемии. Это выразилось в проявлении признаков воспаления (инфильтрации и фиброзирования) в более раннем периоде (21-е сутки после перерезки), а также развитии атрофических и ишемических (вплоть до некротических) изменений в мышцах и истончении миелиновой оболочки либо полной демиелинизации нервных волокон в более поздние сроки (к 90-м суткам после операции).

Нарушение артериального кровотока, смоделированное в нашем исследовании, сопровождалось также повышением ноцицептивной чувствительности поврежденной конечности и развитием в ней болевых ощущений. На седьмые сутки после повреждения сосуда происходило значимое снижение ПНР ипсилатеральной конечности и изменения параметров походки, свидетельствующее о развитии механической гипералгезии. Походка животных, не получавших какого-либо лечения, постепенно восстанавливалась, начиная с 14-х суток после перерезки сосуда, тогда как указанные изменения ПНР сохранялись по 90-е сутки включительно. Аллогенная трансплантация МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг в зону повреждения артерии независимо от кратности существенно ослабляла вызванную перерезкой сосуда механическую гипералгезию и способствовала сохранению толщины миелиновой оболочки. По сравнению с однократным введением двукратная трансплантация МСК ЖТ не была более эффективной в восстановлении значений ПНР, тогда как ее протекторное действие на изучаемые параметры походки было более выраженным. Хотя точный механизм, ле-

жащий в основе антиноцицептивного действия МСК при моделировании нейропатии, остается неясным, считается, что он реализуется именно за счет секреции нейротрофических молекул и иммуномодулирующих свойств МСК, а не их дифференцировки в элементы нервной ткани [9, 11]. Возможно, отсутствие усиления антигипералгического действия при двукратной трансплантации МСК ЖТ в область повреждения сосуда опосредовано более долгим присутствием признаков воспаления и ишемии в тканях зоны повреждения, тогда как более эффективное восстановление параметров походки животных обусловлено более низким числом нервных волокон с истонченной миелиновой оболочкой. Зафиксированное в нашем исследовании снижение потенциала противовоспалительного действия МСК ЖТ при их двукратной трансплантации требует дальнейшего изучения.

Заклучение

Полученные в представленном исследовании данные свидетельствуют о том, что локальная аллогенная трансплантация МСК ЖТ эффективно ослабляла вызванные перерезкой артерии механическую гипералгезию и нарушения походки, а также предотвращала истончение миелиновой оболочки нервов в зоне повреждения сосуда и дистальнее таковой. Увеличение кратности трансплантаций не приводило к существенному улучшению антиноцицептивного действия и характеризовалось более выраженными признаками воспаления и ишемии даже на более поздних сроках исследования.

Литература

References

1. Токмакова, А. Ю. Поражения нижних конечностей при сахарном диабете / А. Ю. Токмакова, Д. Н. Егорова, Л. П. Доронина // Ожирение и метаболизм. – 2017. – Т. 14, № 1. – С. 41-47. – doi: 10.14341/omet2017141-47. – edn: YRUSLT.
2. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future / U. Campia [et al.] // *Am J Med.* – 2019. – Vol. 132, iss. 10. – P. 1133-1141. – doi: 10.1016/j.amjmed.2019.04.043.
3. Levin, S. R. Lower extremity critical limb ischemia: A review of clinical features and management / S. R. Levin, N. Arinze, J. J. Siracuse // *Trends Cardiovasc Med.* – 2020. – Vol. 30, iss. 3. – P. 125-130. – doi: 10.1016/j.tcm.2019.04.002.
4. Pain Management in People with Diabetes-Related Chronic Limb-Threatening Ischemia / X. Jiang [et al.] // *J Diabetes Research.* – 2021. – Vol. 2021. – Art. 6699292. – doi:10.1155/2021/6699292.
5. Стволовые клетки костного мозга в лечении критической ишемии нижних конечностей: биологические аспекты и клиническое применение / П. Ю. Орехов [и др.] // *Гены и Клетки.* – 2018. – Т. 13, № 1. – С. 20-34. – doi: 10.23868/201805002. – edn: YNQDVZ.
6. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies / M. Qadura [et al.] // *Stem Cells.* – 2018. – Vol. 36, № 2. – P. 161-171. – doi: 10.1002/stem.2751.
7. Autologous peripheral blood-derived stem cells transplantation for treatment of no-option angitis-induced critical limb ischemia: 10-year management experience / G. Fang [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2020. – Vol. 11, iss. 1. – Art. 458. – doi: 10.1186/s13287-020-01981-4.
8. Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats / K. Miyano [et al.] // *PLoS One.* – 2022. – Vol. 17, № 2. – Art. e0262892. – doi: 10.1371/journal.pone.0262892.
9. Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Neuropathic Pain Induced By Peripheral Nerve Injury in Animal Models: A Systematic Review / Q. Wang [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2020. – Vol. 29, iss. 22. – P. 1420-1428. – doi: 10.1089/scd.2020.0131.
10. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) / С. В. Лебедев [и др.] // *Вестник Российской академии медицинских наук.* – 2013. – Т. 68, № 3. – С. 33-44. – doi: 10.15690/vramn.v68i3.598. – edn: PZTZGJ.
11. Huh, Y. Neuroinflammation, Bone Marrow Stem Cells, and Chronic Pain / Y. Huh, R. R. Ji, G. Chen // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – Art. 1014. – doi: 10.3389/fimmu.2017.01014.
12. Novel Method to Assess Arterial Insufficiency in Rodent Hindlimb / M. A. Ziegler [et al.] // *J Surg Res.* – 2016. – Vol. 2021, iss. 1. – P. 170-180. – doi: 10.1016/j.jss.2015.10.033.
13. Морфофункциональное состояние мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крыс в условиях подавления окислительного стресса / И. Б. Василевич [и др.] // *Вестні Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук.* – 2014. – № 2. – С. 82-88. – edn: UGUVBL.
14. Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk / J. M. Garrick [et al.] // *Curr Protoc.* – 2021. – Vol. 1, iss. 8. – Art. e220. – doi: 10.1002/cpz1.220.
1. Tokmakova AY, Egorova DN, Doronina LP. Foot disorders in diabetes mellitus. *Obesity and metabolism.* 2017;14(1):41-47. doi: 10.14341/omet2017141-47. edn: YRUSLT. (Russian).
2. Campia U, Gerhard-Herman M, Piazza G, Goldhaber SZ. Peripheral Artery Disease: Past, Present, and Future. *Am J Med.* 2019;132(10):1133-1141. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.04.043.
3. Levin SR, Arinze N, Siracuse JJ. Lower extremity critical limb ischemia: A review of clinical features and management. *Trends Cardiovasc Med.* 2020;30(3):125-130. doi: 10.1016/j.tcm.2019.04.002.
4. Jiang X, Yuan Y, Ma Y, Zhong M, Du C, Boey J, Armstrong DG, Deng W, Duan X. Pain Management in People with Diabetes-Related Chronic Limb-Threatening Ischemia. *J Diabetes Res.* 2021;2021:6699292. doi: 10.1155/2021/6699292.
5. Orekhov PY, Konoplyannikov M, Baklaushchev VP, Kalsin VA, Averyanov AV, Konopliannikov AG, Habazov RI, Troitskiy AV. Bone marrow stem cells for the critical limb ischemia treatment: biological aspects and clinical application. *Genes and Cells.* 2018;13(1):20-34. doi: 10.23868/201805002. edn: YNQDVZ. (Russian).
6. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells.* 2018;36(2):161-171. doi: 10.1002/stem.2751.
7. Fang G, Jiang X, Fang Y, Pan T, Liu H, Ren B, Wei Z, Gu S, Chen B, Jiang J, Shi Y, Guo D, Liu P, Fu W, Dong Z. Autologous peripheral blood-derived stem cells transplantation for treatment of no-option angitis-induced critical limb ischemia: 10-year management experience. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):458. doi: 10.1186/s13287-020-01981-4.
8. Miyano K, Ikehata M, Ohshima K, Yoshida Y, Nose Y, Yoshihara SI, Oki K, Shiraishi S, Uzu M, Nonaka M, Higami Y, Uezono Y. Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats. *PLoS One.* 2022;17(2):e0262892. doi: 10.1371/journal.pone.0262892.
9. Wang Q, He H, Xie S, Wei Q, He C. Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Neuropathic Pain Induced By Peripheral Nerve Injury in Animal Models: A Systematic Review. *Stem Cells Dev.* 2020;29(22):1420-1428. doi: 10.1089/scd.2020.0131.
10. Lebedev SV, Karasev AV, Kungurtsev VV, Lokhonina AV, Kleymenova EB. Cell therapy of critical limb ischemia (problems and prospects). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2013;68(3):33-44. doi: 10.15690/vramn.v68i3.598. edn: PZTZGJ. (Russian).
11. Huh Y, Ji RR, Chen G. Neuroinflammation, Bone Marrow Stem Cells, and Chronic Pain. *Front Immunol.* 2017;21:1014. doi: 10.3389/fimmu.2017.01014.
12. Ziegler MA, DiStasi MR, Miller SJ, Dalsing MC, Unthank JL. Novel method to assess arterial insufficiency in rodent hind limb. *J Surg Res.* 2016;201(1):170-80. doi: 10.1016/j.jss.2015.10.033.
13. Vasilevich IB, Pinchuk SV, Lobanok ES, Volotovskii ID. Morphology-function state of rat adipose-derived mesenchymal stem cells under the suppression of oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological series.* 2014;2:82-88. edn: UGUVBL. (Russian).
14. Garrick JM, Costa LG, Cole TB, Marsillach J. Evaluating Gait and Locomotion in Rodents with the CatWalk. *Curr Protoc.* 2021;1(8):e220. doi: 10.1002/cpz1.220.

ANTINOCICEPTIVE AND REPARATIVE ACTION OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS IN EXPERIMENTAL LIMB ISCHEMIA

A.-M. V. Yerofeyeva¹, O. A. Antipova¹, I. A. Siamionik¹, I. P. Zhavaranak¹, E. V. Fedorova¹,
S. V. Pinchuk², S. N. Chur³, A. Yu. Molchanova¹

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

³Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Background. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) appears to be a promising method for relieving pain in peripheral arterial diseases and revascularization of an ischemic limb.

Objective. To study the effect of various modes of local administration of ADMSCs on nociceptive reactions, gait parameters, and soft tissue histostucture of the ischemic limb in rats.

Material and methods. Experimental limb ischemia was induced in Wistar rats by transection of the common femoral artery with preliminary bilateral ligation. On the 7th day of the experiment, allogeneic ADMSCs were transplanted to the corresponding groups of animals in the amount of 1×10^6 cells/kg (single and double administration). An assessment of nociceptive reactions to a mechanical stimulus, gait parameters, as well as the histostucture of the soft tissues in the rat hind limb with ischemia was carried out.

Results. Transplantation of ADMSCs at a dose of 1×10^6 cells/kg into the area of the hind limb ischemia, regardless of the multiplicity, weakened mechanical hyperalgesia, produced a protective effect on the myelin sheaths of nerve fibers, and contributed to the restoration of gait parameters. A single transplantation of ADMSCs proved to be more effective in terms of anti-inflammatory and anti-ischemic effects on the tissues of the ipsilateral limb.

Conclusions. Local allogeneic transplantation of ADMSCs effectively attenuated mechanical hyperalgesia and gait disturbances caused by arterial transection, and prevented thinning of the myelin sheath of nerves in the area of vessel damage.

Keywords: mesenchymal stem cells, limb ischemia, gait parameters, nociceptive responses.

For citation: Yerofeyeva A-MV, Antipova OA, Siamionik IA, Zhavaranak IP, Fedorova EV, Pinchuk SV, Chur SN, Molchanova Ayu. Antinociceptive and reparative actions of adipose-derived mesenchymal stem cells in experimental limb ischemia. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2024;22(1):19-26. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-1-19-26>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках задания «Оценка влияния обогащенной тромбоцитами плазмы, суспензии митохондрий и мезенхимальных стволовых клеток на ноцицептивную чувствительность, стимуляцию ангиогенеза и репаративные процессы в ишемизированной ткани при экспериментальной диабетической ангиопатии» Государственной программы научных исследований «Трансляционная медицина», подпрограммы «Экспериментальная медицина» (№ госрегистрации 20210931).

Financing. The study was performed within the project “Assessment of the influence of platelet-rich plasma, suspension of mitochondria and mesenchymal stem cells on nociceptive sensitivity, stimulation of angiogenesis and reparative processes in ischemic tissue in experimental diabetic angiopathy” of the State research program “Translational Medicine”, subprogram “Experimental Medicine” (registration number 20210931).

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах/About the authors

*Ерофеева Анна-Мария Вадимовна / Yerofeyeva Anna-Maria, e-mail: amyerofeyeva@zoho.eu, ORCID: 0000-0002-9407-9295

Антипова Ольга Александровна / Antipova Olga, ORCID: 0000-0002-5418-0874

Семёник Ирина Александровна / Siamionik Iryna, ORCID: 0000-0002-7520-1945

Жаворонок Ирина Петровна / Zhavaranak Iryna, ORCID: 0000-0001-9982-0719

Фёдорова Екатерина Викторовна / Fedorova Ekaterina, ORCID: 0000-0003-3592-6252

Пинчук Сергей Владимирович / Pinchuk Sergei, ORCID: 0000-0002-5499-5950

Чур Сергей Николаевич / Chur Sergej, ORCID: 0009-0001-5274-113X

Молчанова Алла Юрьевна / Molchanova Alla, ORCID: 0000-0001-5053-6602

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 02.11.2023

Принята к публикации / Accepted for publication: 23.01.2024