

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**  
**«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ**  
**імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**  
**ФІЗИКО-ТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ**  
**КАФЕДРА ПРИКЛАДНОЇ ФІЗИКИ**

«На правах рукопису»  
УДК 616-092.9, 616.832-009.55, 612.816.5

«До захисту допущено»

В.о. завідувача кафедри  
С. О. Воронов  
\_\_\_\_\_  
(підпис) (ініціали, прізвище)

“ ” \_\_\_\_\_ 2021 р.

## Магістерська дисертація

зі спеціальності 105 Прикладна фізика та наноматеріали

на тему: **Дослідження процесу демієлінізації у трансгенних мишей C57BL/6 зі спадковою нейропатією СМТ1А**

Виконав: студент VI курсу, групи 91мн

Тимчишін Микита Юрійович

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Науковий керівник член-кореспондент НАНУ, проф.,  
доктор медичних наук Скибо Галина Григорівна

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Консультант:

Рецензент

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_  
(підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації  
немає запозичень з праць інших авторів без  
відповідних посилань.

Студент \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ, 2021 року

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Фізико-технічний інститут  
Кафедра прикладної фізики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність 105 Прикладна фізика та наноматеріали

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. завідувача кафедри

\_\_\_\_\_ С.О.Воронов  
(підпис) (ініціали, прізвище)

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на магістерську дисертацію студенту**

\_\_\_\_\_ Тимчишину Микиті Юрійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації **Дослідження процесу демієлінізації у трансгенних мишей C57BL/6 зі спадковою нейропатією SMT1A**

науковий керівник дисертації член кореспондент НАНУ, проф.,  
доктор медичних наук Скибо Галина Григорівна \_\_\_\_\_

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвержені наказом по університету від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р. №

2. Термін подання студентом дисертації \_\_\_\_\_ 01.05.2021 р.

3. Об'єкт дослідження - рухова функція та стан сідничного нерва трансгенних мишей лінії C57BL/6 з надекспресією PMP22.

4. Предмет дослідження - 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

ламель в цих оболонках); патологічні зміни функціональних характеристик сідничного нерва (амплітуди і швидкості проведення CNAP та параметрів часової затримки та амплітуди М-хвилі).

5. Перелік завдань, які потрібно зробити: опрацювати літературні джерела стосовно демієлінізації нервових волокон при хворобі ШМТ; отримати приплід від трансгенних мишей C57BL/6; вибрати тварин з порушенням рухової активності та перевірити їх на гомозиготність по RMP22; розробити експериментальну частину роботи; провести поведінкове, морфологічне, електрофізіологічне дослідження 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.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу презентація на 24 слайди.

7. Орієнтовний перелік публікацій

– Electron Microscopy Analysis of Sciatic Nerve Fibers in C57BL/6 Transgenic Mice

8. Консультанти розділів дисертації

9. Дата видачі завдання 10.09.2019 р.

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Опрацювання літератури за темою МД	09.19 – 11.19	
2	Написання 1 розділу МД "Огляд літератури"	11.19 – 01.20	
3	Постановка мети та завдання дослідження	02.20 – 03.20	
4	Вибір методики дослідження	02.20 – 03.20	
5	Проведення поведінкових тестів	04.20 – 06.20	
6	Проведення морфологічного дослідження	06.20 – 08.20	
7	Проведення електрофізіологічного дослідження	08.20 – 10.20	
8	Трансплантація ММСК-ЖТ	10.20 – 11.20	
9	Аналіз отриманих результатів	12.20 – 01.21	
10	Написання 2 розділу МД	01.21 – 02.21	
11	Написання 3 розділу МД	02.21 – 03.21	
12	Написання висновків	03.21 – 04.21	
13	Оформлення МД	03.21 – 04.21	
14	Подання МД на допуск до захисту	01.05.21	

15	Підготовка презентації та доповіді МД	02.05.21	
16	Попередній захист МД	13.05.21	
17	Захист МД	20.05.21	

Студент

\_\_\_\_\_

(підпис)

Тимчишін М. Ю.

(ініціали, прізвище)

Керівник роботи

\_\_\_\_\_

(підпис)

Скибо Г. Г.

(ініціали, прізвище)

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація складається зі вступу, трьох розділів та висновків. Загальний об'єм дисертації становить N сторінки, з них N сторінок основного тексту, 18 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 SNAP та параметрів часової затримки та амплітуди M-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 PMP22; 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 ядро 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 PMP22 утворюється велика кількість електрон-щільних тіл (агрегати білка PMP22 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 1А 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.

### **Публікації.**

- 1) Тимчишін М.Ю. Electron Microscopy Analysis of Sciatic Nerve Fibers in C57BL/6 Transgenic Mice / I. O. Govbakh, O. M. Tsupukov, E. G. Smozhanik, V. V. Rubtsov, M. Y. Tymchyshin, S. A. Kravchenko, and D. A. Vasylenko// Neurophysiology, Vol. 52, No. 2, March, 2020.

*Ключові слова: мієлін, демієлінізація, сідничний нерв, хвороба Шарко-Мари-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 demyelination 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.*

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	14
ВСТУП.....	15
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ТЕОРЕТИЧНИХ ОСНОВ.....	17
1.1. Клінічна картина і основи класифікації спадкових моторно-сенсорних нейропатій.....	17
1.2. Молекулярний патогенез хвороби ШМТ .....	23
1.3. Роль аксональної дегенерації в формуванні демієлінізуючих нейропатій.....	25
1.4. Генетичні основи нейропатії ШМТ. Роль гена PMP22 в патогенезі ШМТ1А.....	26
1.5. Роль мієлінової оболонки у проведенні потенціалу дії в нервових волокнах.....	27
1.6. Структура мієлінової оболонки .....	31
1.7. Аксональна регуляція мієлінізації .....	34
1.8. Мезенхімальні стовбурові клітини та їх механізми впливу на ремієлінізацію .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.9. Висновки до розділу 1 .....	35
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	37
2.1. Матеріали дослідження .....	37
2.2. Підґрунтя для впровадження обраних досліджень .....	38
2.3. Методика проведення поведінкових тестів .....	41
2.3.1. Експериментальні групи для першої серії тестів.....	41
2.3.2. Перша серія поведінкових тестів на балансовому промені .....	41
2.3.3. Статистичні методи обробки .....	43
2.4. Методика проведення морфологічного дослідження .....	43
2.4.1. Експериментальні групи .....	43
2.4.2. ПЛР аналіз ДНК C57BL/6 мишей.....	43
2.4.3. Електронна мікроскопія .....	45

	13
2.4.4. Обробка числових даних.....	45
2.5. Методика електрофізіологічного дослідження .....	45
2.5.1. Експериментальні групи .....	45
2.5.2. Хірургія та електростимуляція .....	46
2.5.3. Обробка даних .....	47
2.6. Методика проведення поведінкових тестів після введення ММСК - ЖТ .....	47
2.6.1. Введення мезенхімальних стовбурових клітин мишам з периферичною нейропатією .....	47
2.6.2. Експериментальні групи для другої серії тестів.....	48
2.6.3. Поведінкові тести після введення ММСК – ЖТ.....	48
2.6.4. Обробка даних і розрахунок ІФСН.....	49
2.7. Висновки до розділу 2 .....	49
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	51
3.1. Координація рухової активності піддослідних мишей .....	51
3.2. Патоморфологічна картина сідничного нерву піддослідних мишей ..	57
3.3. Нервова провідність і нейром’язова передача у піддослідних мишей	63
3.4. Координації рухової активності піддослідних мишей після введення ММСК – ЖТ.....	68
3.5. Висновки до розділу 3 .....	75
ВИСНОВКИ .....	77
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	79

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ПН – периферична нейропатія
- ШМТ (СМТ) – хвороба Шарко – Марі – Тута
- ММСК – мультипотентні мезенхімальні стовбурові клітини
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- ІФСН – індекс функціональності сідничного нерву
- HMSN – спадкова моторно сенсорна нейропатія
- PMP22 – периферичний білок мієліну 22
- GFP – зелений флуоресцентний білок
- HSP – білки теплового удару
- CNAP – складний нервовий потенціал дії
- NCV – швидкість нервової провідності
- PBS (PB) – натрій-фосфатний буфер
- GS – литковий м'яз (*m. gastrocnemius-soleus*)
- ANOVA – метод дисперсійного аналізу
- bp – пара нуклеотидів (base pair)

## ВСТУП

Нейропатія Шарко-Мари-Туа (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 ШМТ, 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 антагостами

прогестерону. Ці спостереження свідчать про те, що експресія цього білка коливаються з часом, і ставить під сумнів дію механізму, що дозує RMR22.

Однією з можливих причин невдач у таргетуванні механізму експресії RMR22 може бути «недосконале» моделювання захворювання ШМТ1А на гризунах. Ці моделі зазвичай створені шляхом випадкової вставки кількох копій RMR22 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 RMR22 у клітинах Швана. Це спонукає дослідників шукати істотний патомеханізм, що призводить до зміни гомеостазу RMR22.

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 RMR22. 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 RMR22 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 показало свою ефективність.

## РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ТЕОРЕТИЧНИХ ОСНОВ

### 1.1. Клінічна картина та основи класифікації спадкових моторно-сенсорних нейропатій

Спадкові дегенеративні захворювання займають істотне місце у структурі неврологічних патологій, більшість з них проявляється саме в дитячому віці [4]. Це зазвичай важкі генетично гетерогенні периферичні нейропатії, що характеризуються вираженим між- та внутрішньородинним клінічним поліморфізмом. Різні типи хвороби передаються аутосомно-рецесивними, аутосомно-домінантними (рис. 1.1.) та Х-зчепленими шляхами успадкування. Постійно виділяють нові форми цього захворювання з появою більш розширеної генетичної інформації, тож класифікація цієї групи моторно-сенсорних нейропатій не встановилася остаточно до сих пір. При діагностиці необхідно враховувати різні нейрографічні показники [21].

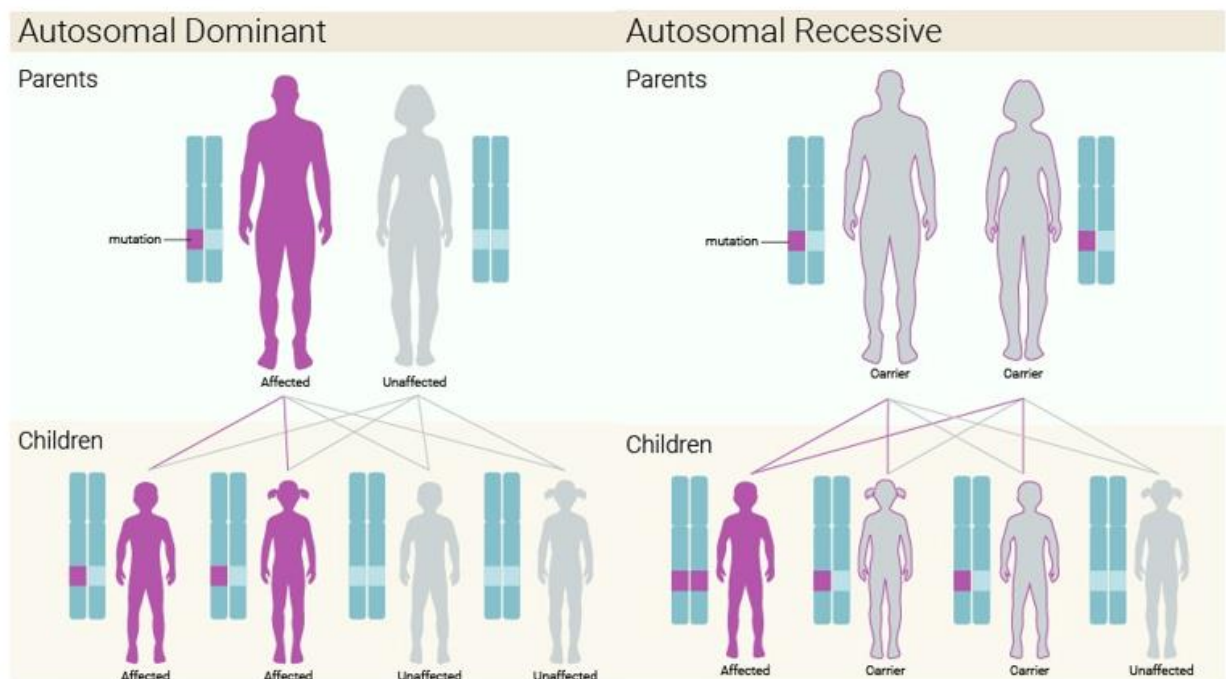


Рис. 1.1. Аутосомно-домінантні та аутосомно рецесивні типи успадкування

В медичній практиці здебільшого використовується термінологія, що заснована на синдромальному описі. За клінічними характеристиками виділяють три схожих форми: невральна аміотрофія Шарко-Марі-Тута,

гіпертрофічний інтерстиціальний неврит Дежерина-Сотта, спадковий синдром арефлексії-атаксії Руссі-Леві [1, 6].

Таким чином спадкова моторно-сенсорна нейропатія СМТ, являє собою поволі прогресуюче захворювання, в основі якого лежить атрофія м'язів дистальних відділів нижніх кінцівок. Першими симптомами є дуже швидка стомлюваність, виражена слабкість в ногах, сильні парестезії, нерідко м'язові болі "крампи", значне зниження або повна відсутність сухожильних рефлексів. Інколи наявний позитивний симптом Бабинського. Дуже часто мають місце розлади чутливості. З'являються характерна хода під назвою степпаж, фрідрейхова стопа та кіфосколіоз. При дослідженні нервової провідності виявляється повна або часткова реакція переродження; на електроміограмі видно окремі піки ритму «частоколу». Як правило, відзначається виражене зниження швидкості проведення нервового імпульсу, як по моторним, так і по сенсорним волокнам. На ряду з електроміографічним дослідженням особливе діагностичне значення мають гістологічні дослідження біопсійного матеріалу м'язів. З легкістю виявляють дегенеративні зміни задніх корінців, периферичних нервів (а саме гіпертрофічна нейропатія) або бічних і задніх спинномозкових стовпів, саме при патоморфологічному дослідженні. Патоморфологічні зміни м'язів мають вторинний характер.

Цей дегенеративний процес поступово прогресує до проксимальних відділів кінцівок [1,6]. Зазвичай для лікування таких хворих пропонують типові комплексні консервативні підходи, такі як: терапія з допомогою вітамінів групи В, антихолінестеразні препарати та загальнозміцнююча терапія, а також лікувальна фізкультура, масаж, фізіопроцедури, та лікування з допомогою ортопедичних засобів (тенотомія коли випадок важкий). Часто наголошується, що при хворобі Дежерина-Сотта треба уникати важкого фізичного навантаження та охолодження, [6]. Відомо, що жінки хворіють дещо рідше, ніж чоловіки. Щодо початку маніфестації різних типів нейропатії та типів успадкування все ще існують різні думки [1, 6].

Діагностику хвороби ускладнює те, що клінічні прояви хвороби мають широкий поліморфізм як в межах однієї форми, так і в межах однієї сім'ї прояви дуже відрізняються, і водночас, різні форми хвороби мають подібні фенотипічні прояви. Також є відмінності і в середньому віці прояву симптомів при сімейних та випадках однакових форм хвороби, але деякі науковці висловлюють думку, що ці відмінності є штучними, бо у випадку сімейного захворювання симптоми починають привертати більше уваги у ранньому віці [12]. Найрозповсюдженіша форма СМТ1А, фактично, зустрічається не рідше, ніж сумарно всі атипові [15]. Внаслідок цього щодо вивчення цих патологій приділено дуже багато уваги, невпинно збагачується інформація щодо клінічних форм та їх генетичної компоненти, та шукаються підходи до їх ефективнішої діагностики. До прикладу, у хворих із розвитком дистрофії м'язів та аміотрофії показано, що вміст у крові міоглобіну сильно вищий у порівнянні з нормальним. Відомий факт, що рівень міоглобіну в крові прямопропорційно корелює із кількістю зруйнованих м'язових тканин, а його наявність у людей із дистрофією м'язів вище, ніж у пацієнтів із спінальною та невральною аміотрофією, отже цей критерій можна приймати до уваги для диференціального дослідження цих нейропатій [9]. Ще одним біохімічним дослідженням може бути виявлення рівня глікозаміногліканів, бо їх результуюча екскреція підвищена у 1.5-3 рази у випадку нейропатії ШМТ1А [8], здебільшого через посилення виведення сульфатів хондроїтину та паралельним пригніченням екскреції гіалуронової кислоти [3].

Електрофізіологічне дослідження є найбільш показовим у діагностуванні нейропатій периферичної системи. За показниками цього дослідження хворобу можна поділити на дві великі групи, що мають за'язок з ураженням мієлінових оболонок нервових волокон або аксонів. При частковій демієлінізації цілового нервового волокна наявне стрімке зниження швидкості проведення потенціалу дії (це зазвичай, більше за 40%). А у випадку аксональної нейропатії ШПІ дещо знижений або повністю нормальний. Першопричину ураження мієлінової оболонки аксонів або самих аксонів дуже

часто складно відокремити, бо частина аксональних невропатій зазвичай мають зв'язок із демієлінізацією вторинного генезу [18]. Тож виявлення цих відмінностей є базовим для класифікації наявних невропатій. Беручи його за основу, основі виділяють дві головні форми хвороби ШМТ: СМТ1 демієлінізуюча і СМТ2 аксональна [31]. Значення ШПІ сідничного нерву зазвичай приймають за умовно межу для поділу форм хвороби на демієлінізуючу, яка має знижену швидкість проведення нервового імпульсу по периферичних нервах (близько 38 м/с) [5] та аксональну форму де якість проведення нервового потенціалу лишається не змінною або відбувається незначне зниження. Окрім цього, є клінічно класифікована спільна форма хвороби за якої пацієнти демонструють характеристики СМТ1 та СМТ2.

На першій-другій декаді життя починається демієлінізуюча СМТ1, яка проявляється демієлінізацією моторних і сенсорних волокон нейронів, що призводить до помітної редукції ШПІ у нервах (<38 м/с) [22]. Окрім того, наявна м'язова слабкість дистальних відділів, деформація стоп, атрофія, зниження чутливості та послаблення сухожильних рефлексів. Часто спостерігаються тремор верхніх кінцівок та атаксія [11]. За класичної картини хвороби відмічаються ознаки демієлінізації і ремієлінізації (у біопсії нервових тканин), із формуванням «цибулинних структур», що виникають за надлишку шваннівських клітин [22]. Частіше за все ШМТ типу 1 успадковується за аутосомно-домінантним шляхом, але існують також рецесивні та домінантні форми хвороби. Чоловіки уражені сильніше за Х-зчепленого успадкування, на відміну від жінок які показують здебільшого ознаки СМТ2 [37]. При різноманітних генних мутаціях симптоми СМТ1 – клінічно подібні. Ці мутації впливають на Шваннівські клітини, які в свою чергу продукують мультиламеллярну структуру під назвою мієлін. Він огортає аксони в периферичній нервовій системі та забезпечує хорошу провідність по нерву [20]. До таких генів відносять: P0, PMP22, EGR2 та багато інших. Таку ж саму картину спричиняють мутації у гені Sx32, що теж експресуються в клітинах Шванна [29, 38, 41].

У таблиці 1.1. наведені форми демієлінізуючих нейропатій аутосомно-домінантного типу успадкування.

Слід зазначити, що хвороба проявляється по різному навіть при однакових мутаціях та має високу варіабельність [28, 43]. Кілька груп вчених стверджують, що данна особливість доводить існування модифікованих генів [42], але наявні випадки коли близнюки мають різний ступінь тяжкості симптомів [28] вказує на неспроможність цієї гіпотези.

Паралельно із цим, нейропатії з різним ступенем тяжкості інколи дають не однакові мутації в однакових генах. Як приклад, DSS (або по іншому CMT3) CMT1B, або CHN (вроджена нейропатія) можуть давати мутації у P0 [36]. Важкою рухово-сенсорною демієлінізованою нейропатією (з гіпертрофічними проявами) є і синдром Дежерина-Сотта [37] при якій часто спостерігається сильна гіпомієлінізація волокон периферичних нервів із «цибулинними структурами» [44]. Схематичне зображення розповсюдженності кожного з типів хвороби показане на рис. 1.2.

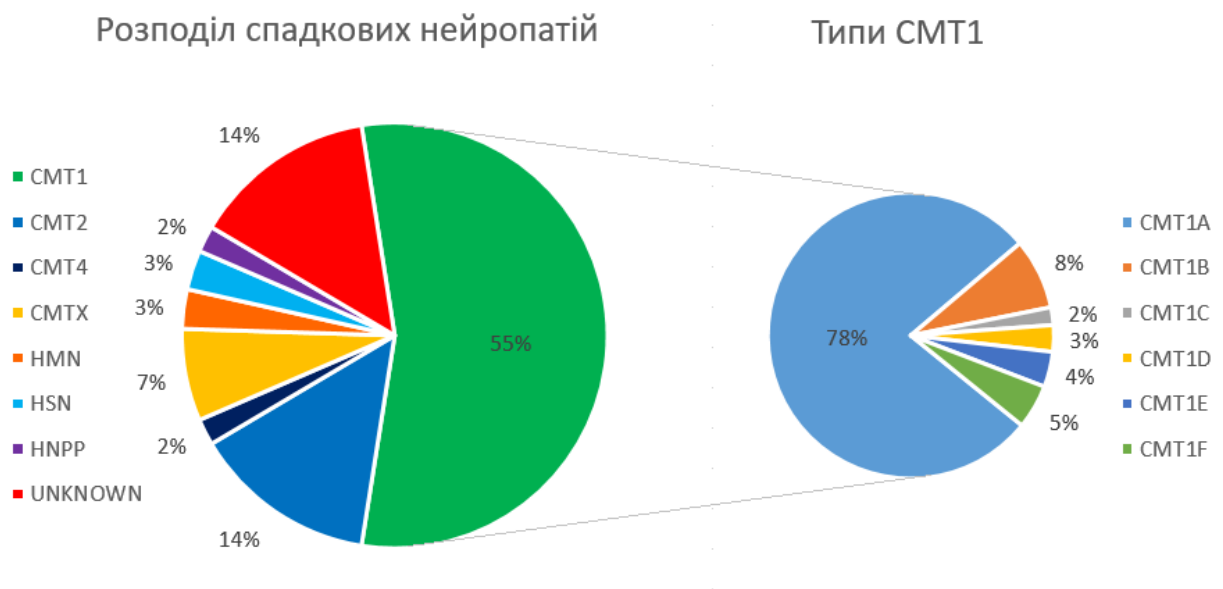


Рис. 1.2. Доля на яку припадає загальна кількість зареєстрованих випадків, щодо кожно типу хвороби Шарко-Марі-Тута та нейропатій

Швидкість нервової передачі колосально уповільнена, а також іноді у спинномозковій рідині характеризується наявністю великої кількості білків

[24, 26]. Хвороба Шарко-Марі-Тута та споріднені типи формують ряд взаємопов'язаних захворювань. Синдром «Дежерина-Сотта» є, фактично, підтипом СМТ1, що ініціюється мутаціями генів P0 та PMP22 [11, 31], успадковується зазвичай аутосомно-рецесивним шляхом [24, 37].

*Таблиця 1.1.*

Домінантні форми демієлінуючої нейропатії Шарко-Марі-Тута (СМТ1)

Захворювання	Ген	Локалізація гену	Вік маніфестації
СМТ1А	PMP22	17p11;	1-ше десятиліття
СМТ1В	P0	1q22	1-ше десятиліття
СМТ1С	LITAF	16p13	2 десятиліття
СМТ1D	EGR2	10q21	2 десятиліття
СМТ1F	NF-L	8p21	2 десятиліття
СМТ X	Cx32	Xq13	2 десятиліття
HNPP	PMP22	17p11;	3 десятиліття
HMSN 3	PMP22, EGR2	17p11; 8q23	2 роки

Вроджена нейропатія СНН є клінічно набагато важчим захворюванням. В даному випадку характерна гіпомієлінізація нервових волокон, тотальна м'язова слабкість, значне зниження ШПІ та абсолютна пригніченість сухожильних рефлексів з самого народження. Відповідно і виявляється ця хвороба при народженні [27], має аутосомно-рецесивний тип успадкування. Причиною захворювання є мутації у генах P0, MTMR2, EGR2, та рідко PMP22 [23]. Ці демієлінуючі форми хвороби поєднані спільною назвою та класифікуються як СМТ4. Ця класифікація даної групи СМТ та відповідні гени де відбувається мутація наведені у таблиці 1.2.

## Рецесивні форми демієлінізуючої нейропатії Шарко-Марі-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 EGR2 PMP-22	17p11; 1q22 10q21	3 народження

## 1.2. Молекулярний патогенез хвороби ШМТ

Регуляція мієлінізації. Існує кілька різних механізмів, що відповідають за формування компактизованого мієліну у хребетних: формування мієліну за рахунок центральної нервової та периферичної системи. Не беручи до уваги певну схожість функцій, обидва типи мієліну характеризуються різною ультраструктурою, походженням, композицією білків та генетичною основою [30]. Одночасно з утворенням мієліну активується транскрипція великої кількості генів, які мають властивість кодувати специфічні мієлінові протеїни, відповідно для цього потрібна координація синтезу таких білків. Якісно регулюється переміщення білків та мРНК в структурах клітин [44]. Існує три паралельних системи які регулюють відповідну транскрипцію генів мієліну. До першого шляху можна віднести: активація взаємодії шванівських клітин та аксонів, робота клітин, що утворюють мієлін, а також перехід до фенотипу мієлінізації. Здатність клітин Шванна відповідати на сигнал аксону може регулюватись експресією відповідних генів, що відповідають за міжлін. Таким чином керуючи, процесом де- або ремієлінізації. Другий шлях взаємопов'язаний з до холестерин-чутливими білками, що знаходяться в ендоплазматичному ретикулумі. Вони є необхідною ланкою у біосинтезі та регуляції ліпідів та білків. А третій шлях, теж бере участь у роботі та регуляції

експресії генів мієліну. При цьому відбувається зміна структури білкового ансамблю в просторі мієліну, а також його компактизація. Ймовірно, локалізація цієї системи сигналіngu, знаходиться безпосередньо в паранодальних регіонах або в мієліновій оболонці.

Розвиток СМТ1 може ініціюватись при порушенні одного або кількох наведених шляхів. Наприклад, блокада переходу клітин Шванна із мієлінізованої стадії у промієлінізовану може бути спричинена низьким рівнем експресії EGR2. При точкових мутаціях у гені RMP22 (у випадку СМТ1) порушується асемблінг мієліну в ендоплазматичному ретикулумі, в якому буде повільно нагромаджуватись зайвий мутантний білок. Внаслідок цього відбувається збільшення кількості периферичного білка, що доступний для утворення комплексу білків. Це, ймовірно, може вплинути на каскад сигналіngu між ендоплазматичним ретикулумом та ядром, що відбувається внаслідок оберненої транскрипційної регуляції генів мієліну. На заваді процесу мієлінової компактизації з легкістю може стати зниження рівня P0 та викликати СМТ1, так само порушуючи роботу сигнальних каскадів, які мають вплив на адгезію. Через це відбувається ускладнення експресійної регуляції генів мієліну.

Як вже було зазначено, що розвиток СМТ1 напряду ініціюється руйнацією будь-якого з трьох описаних вище клітинних шляхів, що у повному комплекті необхідні для здорової, не порушеної мієлінізації [29].

Наразі не повноцінного лікування яке б повністю вилікувало хворих на цю хворобу. В даний час наявні тільки симптоматичні та консервативні методи лікування захворювань цих груп. Вони в силах тільки сповільнити наростаючі патологічні прояви хвороби. Зараз розвиваються раціональні молекулярні підходи щодо генотерапії для лікування цих захворювань і це є основним напрямом до вивчення СМТ1. А основу для розробки генотерапії зможе забезпечити подальше розширення розуміння патогенезу СМТ1 [29].

### 1.3. Роль аксональної дегенерації в формуванні демієлінізуючих нейропатій.

Зазвичай на мієлінову оболонку впливають паталогічні зміни, що обумовлюються демієлінізуючими нейропатіями, але і в аксолемі перехватів Ранв'є також, додатково відзначаються деякі зміни, що класифікуються як вторинна дегенерація аксонів. На моделях мишей було показано, що причиною для виникнення вторинних аксональних змін можуть бути початкові дефекти в клітинах Шванна [44].

Наразі відомо, що фізіологічним маркером до патології СМТ1 є демієлінізація, а такі клінічні прояви хвороби, як слабкість м'язів та сенсорна недостатність є наслідком дегенерації аксонів, а не демієлінізації. Це з легкістю підтверджується тим, що швидкість нейром'язової передачі дітей хворих на СМТ1 досить знижена ще до маніфестації перших симптомів нейропатії, та додатково, з плином часу кординально не змінюється [35]. Це вказує на те, що сам процес демієлінізації, не є ініціює прогрес названих раніше симптомів хвороби. Існує чітка кореляція амплітуди потенціалу дії рухових нервових волокон (не ШПІ) з м'язовою слабкістю. Це додатково підтверджує значимість аксональної дегенерації [29]. Аксональна недостатність має провідну роль у розвитку хвороби, і цьому є анатомічний доказ дегенерації по всій довжині нервового волокна у пацієнтів хворих на СМТ1 і піддослідних трансгенних мишей з надекспресією гена PMP22 [29]. Отже, саме аксональна дегенерація дистальних відділів, а не демієлінізація, являється причиною патології та інвалідності при СМТ1.

Який молекулярний патогенез даного процесу? Велика кількість досліджень вказують на те, що при СМТ1 взаємозв'язок клітин Шванна та аксонів руйнуються, і це призводить до паталогічних змін фізіології аксонів. Наприклад, до ущільнення нейрофіламентів і порушень у їх фосфорилуванні, та деінтенсифікації аксонального транспорту призводить безпосередній контакт аномальних клітин Шванна з аксонами [29].

При демієлінізуючих нейропатіях або зокрема СМТ1 відбуваються вже вказані взвемодійні зміни між клітинами Шванна та аксонами, які призводять до змін у фосфорилюванні, упаковці нейрофіламентів, аксональному транспорті, і призводять до дегенерації аксонів. Ці усі патоморфологічні порушення являються маркером, а також є результатом дії інших аномалій молекулярних структур, що досі невідомі.

#### 1.4. Генетичні основи нейропатії ШМТ. Біологічна роль гена у патогенезі ШМТ1А

Ген *peripheral myelin protein-22*, скорочено PMP22 кодує інтегральний мембранний глікопротеїн, (що є амінокислотним), Він представлений 4-ма доменами загальної ММ у 22 кілодальтони. Цей ген (PMP22, або менш полярна назва *gas3*) має локалізацію у компактному мієліні периферичної нервової системи. В основному він складається з ліпідів (70%) та флюктууючою кількістю білків (30%) [29]. Він складає 3-6% від усіх білків мієліну. Периферичний білок є не тільки структурним білком мієліну, паралельно він експресується у великій кількості інших клітинах тіла, та все ж в клітинах Шванна - найбільше[44, 31].

Досі біологічна роль периферичного білка у мієліні не цілком ясна [28]. Цей білок регулює клітинний ріст фібробластів, а також він має специфічну структурну функцію в мієліні [22]. Експресія PMP22 у сідничних нервах хворих на СМТ1А відбувається значною мірою на ранніх стадіях хвороби, та випереджає фенотипічні та патологічні прояви нейропатії. Ген периферичного білка мієліну, цікавий у будь-якому разі, бо з однієї сторони різноманітні структурні і дозові зміни в мутаціях даного гена ведуть утворення різноманітних нейропатій (CN, СМТ1А, DSS, HNPP), а з іншої сторони такі генетичні механізми як точкові мутації ті дуплікація лежать в основі одного і того ж фенотипу СМТ1А [26].

Модельними тваринами для дослідження точкових мутацій гену PMP22 у людей є мутантні миші під назвою Trembler-J та Trembler [28]. Тим паче у

людей також описана така мутація. Зазвичай для дослідження надекспресії цього гену використовують спеціальні лінії трансгенних тварин, які мають декілька YAC (штучних хромосом), які мають не однакову кількість копій гена, що в них інтегровані. Використовуючи цей метод показали, що тяжкість захворювання залежить від ступеню надекспресії, яка пропорційна числу копій цього гена. Зниження транскрипційної експресії відповідного гена спричиняє HNPP [24]. А також у пацієнтів хворих на СМТ1А, рівень мРНК для PMP22 набагато вищий, в порівнянні з хворими на інші демієлінізуючі нейропатії. Значить, СМТ1А та HNPP виникають внаслідок різного рівня надекспресії а отже і кількості копій PMP22. Саме тому, вони репрезентують різні фенотипічні моделі та є проявом впливу різних доз цього гена [11].

#### 1.5. Роль оболонки мієліну в проведенні ПД у нервових волокнах

Нервові волокна складаються з аксонів, які огортаються сієліновою оболонкою, яка продукується в центральній нервовій системі олігодендроцитами, а в периферичних нервах – шванівськими клітинами. Такі волокна поділяються на два типи: мієлінізовані та не мієлінізовані. Проведення потенціалу дії є основною функцією будь-яких нервів. Швидкість розповсюдження ПД великою мірою залежить від діаметра волокон та в не- та мієлінізованих нервових волокнах різна [2]. (Рис.1.3)

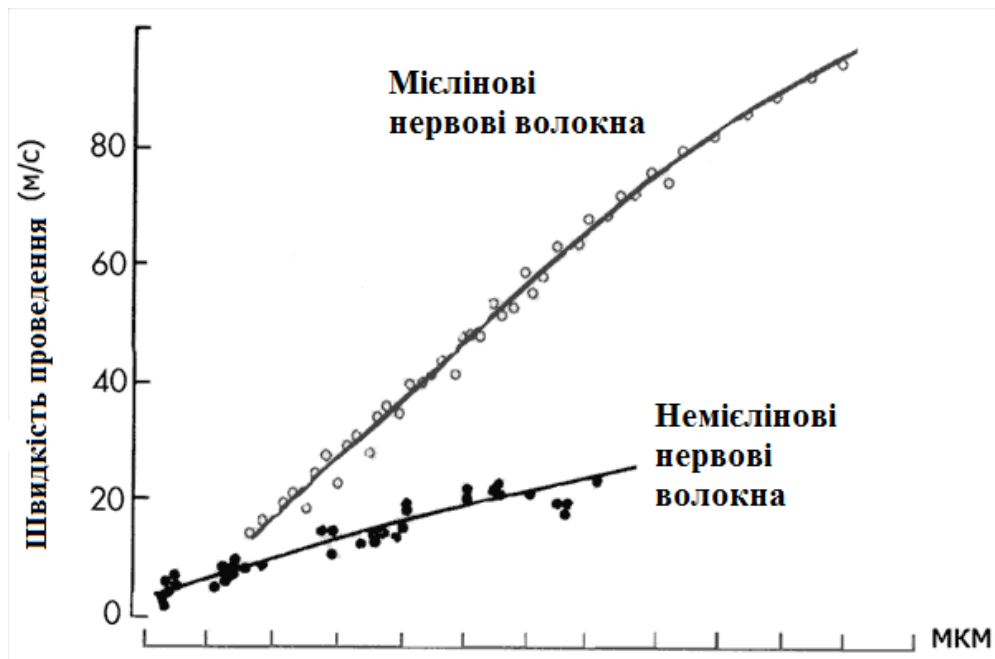


Рис. 1.3. Швидкість розповсюдження ПД в мієлінізованих та не мієлінових нервових волокнах.

Завдяки певним особливостям механізму розповсюдження потенціалу дії по мієлінізованим аксонам є сальтаторним або стрибкоподібним (переривчастим). Вимірювання електричного опору мембрани показують, що мієлінізовані ділянки нерву мають показники більші в 5000 разів, у порівнянні з перехватами Ранв'є. Внаслідок такої нерівномірної провідності електричного струму різних ділянок нервового волокна створюються нетривіальні умови для розповсюдження потенціалу дії по такому волокну. Потенціал дії генерується в перехватах Ранв'є і ця генерація призводить до перезарядки цієї області мінусом зовні та плюсом всередині [7]. (Рис.1.2)

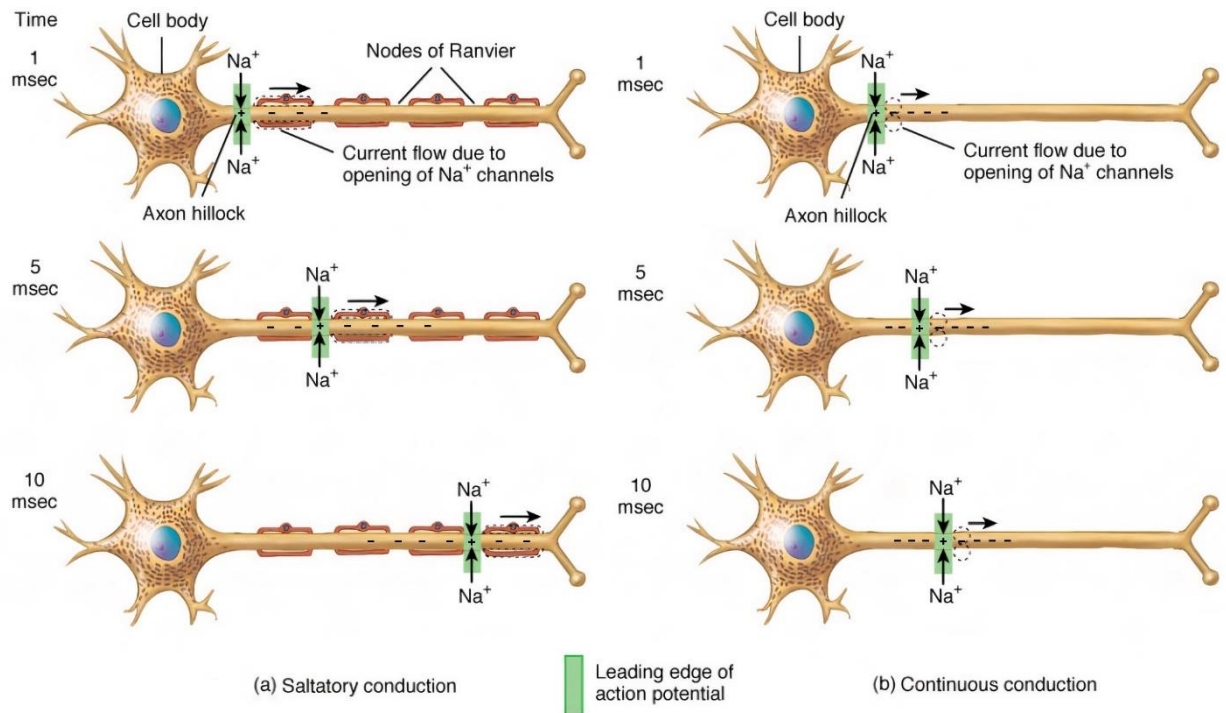


Рис. 1.4. Схема поширення ПД мієлінізованими та не мієлінізованими нервовим волокнам.

Потенціал дії, який генерується в одному перехваті Ранв'є, призводить до розвитку локальних струмів, які в наступному перехваті Ранв'є замикаються і там знов ініціюється деполяризація мембрани та здійснюється генерація наступного потенціалу дії.

Між сусідніми ділянками мієлінізованої мембрани (збудженою та незбудженою) з'являється певна різниця потенціалів. Вона стає причиною для появи локальних електричних струмів, які через мієлінову оболонку не виходять назовні через її колосальний опір. Тому збережені локальні струми які не вийшли у зовнішнє середовище розповсюджуються далі по аксоплазмі до найближчої не збудженої ділянки перехвату Ранв'є (див. Рис. 1.2.). Там вже струми можуть проходити через мембрану, замикатися та нівелювати її електронегативний заряд [7].

Відбувається активація вхідного натрієвого (трансмембранного) струму через дію спричинену достатньою кількістю локального струмом і внаслідок відбувається деполяризація в наступному перехваті Ранв'є (див. Рис. 1.2.).

Виходить, потенціал «стрибає» через мієлінізовані ділянки нерву, що знаходяться між двома сусідніми перехватами. Цей механізм розповсюдження імпульсу називається стрибкоподібним, чи інакше - сальтаторним. Це сприяє швидкому та економічному передаванні інформації, порівняючи з послідовним, безперервним розповсюдженням, бо в цей процес залучаються тільки короткі ділянки а не ціла мембрана.

Для генерації ПД в сусідньому перехваті Ранв'є, важливо, щоб його амплітуда перевищувала величину деполяризації в 4-6 разів. Внаслідок такої великої різниці потенціалів між не збудженою та збудженою ділянкою створюються струми іонів, що протікають в об'ємі аксона. Їх амплітуди залишаються достатньо великими, для того щоб відбулася деполяризація не тільки в сусідньому перехваті, а і навіть через одну-дві ділянки. Це значить, що потенціал дії здатний «перескакувати» через кілька перехватів Ранв'є. Для мієлінізованих волокон, таким чином, притаманний дуже високий фактор надійності щодо розповсюдження потенціалу дії. Це особливо важливо коли знижується показники збудливості в локалізації наступного перехвату Ранв'є внаслідок якогось фармакологічного впливу або механічного фактору, але завдячуючи високій надійності такої передачі поширення ПД таким волокном буде відбуватись незважаючи навіть на пошкодження в кількох перехватах [7].

Окрім високої надійності сальтаторне розповсюдження потенціалу дії буде мати ще кілька переваг порівнюючи з розповсюдженням по не мієлінізованому волокну. Сальтаторна генерація потенціалу дії значною мірою збільшує швидкість проведення імпульсу мієлінізованими волокнами, а саме в 10-50 раз. Також і енергія аксона дуже сильно економиться з допомогою сальтаторної провідності. Це дозволяє знизити небажаний витік іонів у 100 разів бо у волокон вкритих мієліном відбувається деполяризація тільки в області перехвату. Це призводить до зниження енергетичних втрат, що відводяться на відновлення концентрації йонів калію і натрію (їх трансмембранної різниці) після серії пройдених імпульсів. Зрештою, існує ще одна сальтаторна особливість мієлінізованих нервових волокнах, це те, що

знижена електрична ємність мембрани та сильна ізоляція оболонкою мієліну дозволяють ініціювати реполяризацію потенціалу дії навіть при переміщенні дуже малої кількості йонів натрію [7].

Основні закони розповсюдження ПД нервовими волокнами:

- 1) ПД проходить нервовими волокнами не загасаючи та має однакову амплітуду не залежно від місця де він виник;
- 2) генерація потенціалу дії не викликає стомлення нервових волокон;
- 3) нервові волокна здатні відтворювати ПД з дуже високою частотою, а значить вони високо-лабільні;
- 4) розповсюдження ПД обмежується тільки довжиною аксона;
- 5) в ході поширення ПД змінюється конформація іонних каналів з витратою (на оновлення йонних градієнтів між мембранами) енергії гідролізу АТФ;
- 6) ПД не перестрибує з одного волокна на інший, тобто розповсюджується по всім нервовим повністю ізольовано. Це відбувається внаслідок того, що опір міжклітинної рідини набагато менший порівнюючи з опором мембрани у нервових волокон. Внаслідок цього зовнішні локальні струми ідуть тільки вздовж міжклітинної рідини між ділянками різної збудженості;
- 7) мієлінізовані волокна мають більший фактор надійності сигналу в порівнянні з немієлінізованими, а проходження ПД нервовим волокном забезпечується тільки тоді, коли його фізіологічна та анатомічна цілісність збережена.

## 1.6. Структура мієлінових оболонок

Мієлінові Шваннівські клітини за своєю структурою повздовжньо та радіально поляризовані. Під час процесу мієлінізації відбувається організація клітин Шванна у відокремлені домени мембран, які мають унікальний комплект білків, що зв'язуються із компартментами цитоплазми. Оболонка мієліну складається із компактного та не компактного мієліну і кожен з них

має свій комплект білків. Основна частина оболонки складається з компактного мієліну та щільно укомплектованих мембран. Організація аксона та мієлінової Шваннівської клітини у паранодальних, міжвузлових та вузлових компартментах характеризується повздовжньою полярністю. Зовнішня та внутрішня мембрана (абаксональна та адаксональна відповідно) чітко розмежовує аксон від навколишньої тканини та надає їй радіальної полярності. Внутрішня мембрана відмежована від аксону щілиною із шириною близько 15 нм яка насичена рецепторами і адгезійними молекулами, це забезпечує взаємодію з певними лігандами. Відповідно вони можуть модулювати сигнали факторів росту та, звісно, периаксонально підтримувати простір (Рис 1.5.) [25].

Зовнішня мембрана має міжвузельні, юкстапаранодальні, і паранодальні області. Міжвузля є найбільшим доменом і складає приблизно 99% розміру клітини. Також у міжвузлі присутні гліальні молекули адгезії. З абаксональним шаром межує ламін та опосередковує взаємодію базальній пластинці з певними інтегринами ( $\alpha\beta 1$  та  $\beta$ -дистроглікан). Зовнішній цитоплазматичний компартмент, в порівнянні із внутрішнім, який рівномірно розташований, чередується аппозиціями які мають періодичний характер. Вони насичені дистрогліканами, що пов'язані Dgp2 (дистрофін-зв'язаним білком), з каркасним білком Шваннівських клітин, периаксином (рис. 1.5.). Смуги Кахаля це цитоплазматичні канали, що визначають зв'язану анастомозами мережу аппозицій певних цитоплазматичних каналів. Дані канали знаходяться на зовні Шваннівської клітини та забезпечують відцентровий транспорту білків та РНК, що транспортуються з соми клітини.[32]

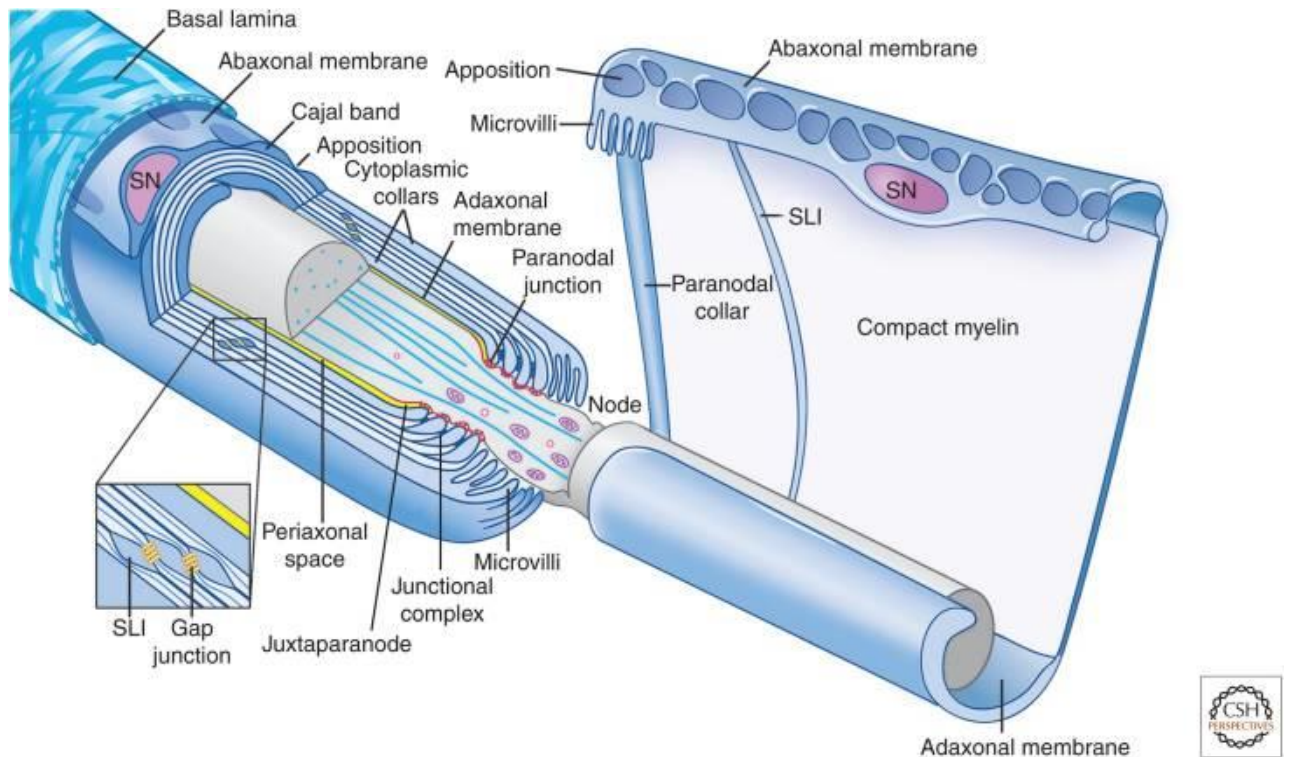


Рис. 1.5. Організація мієлінізуючих клітин Шванна.

Аксон (позначено сірим) оточують клітини Шванна (позначено синім) зображені на рис. 1.5. Базальна пластина оточує клітини Шванна, вона безпосередньо контактує із зовнішньою мембраною. Внутрішня мембрана клітини Шванна периаksonально відокремлена від мембрани аксону (жовтий колір на рисунку). Мієлін чередується певними розрізами. Окрім цього показані переходи (червоні) та паранодальні петлі [34].

Смуги Кахалія мають зовнішню мембрану яка може взаємодіяти з базальною пластиною (ламеліну), за допомогою  $\beta 1$  інтегрину та іншими комплексами. Ці смуги відіграють значну роль в транспорті та мають велику кількість цитоскелетних білків, зокрема актино-спектриновий комплекс, проміжні філаменти та мікротрубочки. Також вони представляють локалізовані сайти білкового синтезу, а через ламінові рецептори відбувається передача внутрішньоклітинних сигналів.

Роль мієлінової оболонки полягає у забезпеченні аксона високим опором і низькою ємністю, для розповсюдження нервових імпульсів шляхом сальтаторної провідності. Зазвичай оболонка мієліну має близько сорока

мієлінових шарів. На електронних мікрофотографіях завжди виявляються періодичні лінії мієліну, що є аппозиціями пластинок, по чергово з'являються з ущільненими MDL лініями. Мієлін збагачений холестерином, жирними насиченими кислотами та має високий вміст ліпідів у самій мембрані. Холестерин має вирішальну роль у зборці оболонки мієліну. А вміст білків у оболонці мієліну досить низький та не стабільний. Можливо його вміст стабілізується у більш зрілій мієліновій оболонці [25]. При спадкових нейропатіях дуже часто мутує ген PMP22. Насічки Лантермана-Шмідта перериваєть компактний мієлін. Вони чергуються впродовж всієї мієлінізованої ділянки у волокнах з великим діаметром. Досить дивним є той факт що, ці насічки Лантермана-Шмідта не рідко починають руйнуватись після формування оболонки мієліну. За рахунок видовження від цитоплазми (її зовнішнього або внутрішнього комірця) відбувається їх утворення в оболонку мієліну методом кругового розширення. Це означає відбувається процес активного розпаду пластин мієліну. Оскільки вони утворюються пізно це означає, що вони мають трофічне функцію та вирішальної ролі в генерації мієліну не відіграють. Шваноцити мутантного типу створюють периаксини, і в них відсутні насічки Лантермана- Шмідта, а значить утворені оболонки мієліну будуть нестабільні.

### 1.7. Аксональна регуляція мієлінізації

Мієлінізація, зазвичай, бере свій початок на аксонах, що мають діаметр близько 1 мкм. Це відповідає відомостям, що отримані з теоретичних моделей, в основі яких лежить припущення, щодо збільшення швидкості проведення ПД в аксонах діаметру близько 1 мкм за допомогою мієлінізації. Коли товщина аксона збільшується то діаметр мієлінової оболонки та розмір міжвузля, мають спільний простір, величина якого досить сильно пов'язана із аксональним діаметром. Значить, аксони не тільки регулюють рівень утвореного клітинами Шванна мієліну, а ще й активують мієлінізаційний процес. Загальновідомо, що саме більші та біохімічно різноманітні аксони сприяють мієлінізації, бо вони

забезпечують вищі рівні фактору росту NRG1, а він в свою чергу є основним ініціатором мієлінізації аксонів. Майже всі аспекти механізмів клітин Шванна регулює сигналінг фактору NRG1. Зокрема, він є невід'ємним для мієлінізації. Це підтверджується модельними дослідженнями в яких були інактивовані NRG1 рецептори, де показується що при пізньому розвитку Шваннівських клітин в периферичних нервах виникає гіпомієлінізація.

Потім показали, що підвищена експресія цього фактору третього типу пропорційна долі аксонів, а це значить що мієлінізовані аксони експресують значно більше NRG1, ніж ті аксони, що знаходяться у волокнах Ремака. Важливо буде зазначити, мієлінізації симпатичних волокон *in vitro* сприяла примусова експресія NRG1. Генетична інактивація або гаплонедостатність ізоформи NRG1 третього типу викликає помітну гіпомієлінізацію периферичної нервової системи та зменшення кількості аксонів, що є мієлінізованими. А якщо відбувається навпаки надекспресія то це призводить до гіпермієлінізації [40].

У результаті це показує, що клітинну мієлінізацію запускають порогові рівні сигналу від NRG1, за умови якщо перевищується певний порог, а рівень синтезованого мієліну пропорційний кількості фактору NRG1. Також він контролює виживання Шваннівських клітин та проліферацію, та додатково відбувається стимуляція генерації Шваннівських клітин що необхідні, щоб відбувалась мієлінізація. Одразу після завершення мієлінізації перестають поступати сигналів від erbB або NRG1 рецепторів аксонів. Також існує рідкісне явище подвійної мієлінізації оболонки, в яких мієлінова оболонка зовні не перестає підтримуватись. В плазматичній мембрані та позаклітинній NRG1 може розщеплюються металопротеїназами. [40]

## 1.8. Висновки до розділу 1

Захворювання ШМТ є різномірною групою спадкових нейропатій. Вони частіше за все характеризуються постійною сенсорною і рухоаю

недостатністю. Класифікація захворювання відбувається зазвичай за шляхами успадкування, клінічними симптомами та патологічними змінами.

Це захворювання супроводжуються мутаціями, що є причинами дефектів нейронних периферичних білках. Більшість мутацій при ШМТ уражають мієлінову оболонку периферичних нервів.

Найпоширенішим серед нейропатій ШМТ це тип ШМТ1А, що діагностується у восьмидесяти відсотках хворих на ШМТ. При цьому відбувається порушення мієлінізації периферичних нервових волокон через дуплікацію периферичного білка PMP22 що є геном периферичного мієліну. Оболонки мієліну у білків в залежності від типу ШМТ1 дещо відрізняються, а, зокрема, мутації спричиняють зміни у структурі та якості мієліну, що стає нестійким та поступово розрушається. Це призводить до процесу демієлінізації рухових та сенсорних нервових волокон, а це в свою чергу веде до пригнічення швидкості передачі ПД. Це призводить до порушеної чутливості та зниженої сили м'язів.

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 для дослідження

У якості матеріалу для досліджень використовувались трансгенні миші лінії C57Bl. Ця лінія мишей є досить поширеною. Вона використовується у якості модельної лінії різноманітних захворювань людини. Серед яких і периферичні нейропатії. Тварини даної лінії можна назвати другим видом ссавців у якого був повністю записаний його геном (та опублікований). Зокрема ці трансгенні тварини часто використовуються бо мають досить високі показники селекційних характеристик.

Трансгенних мишей отримують при перенесенні скопійованих генів до ядер запліднених зигот або стовбурових клітин ембріонів. Після цього модифіковані яйцеклітини або зиготи пересаджують до репродуктивних органів реципієнта, в яких ядро замінено на модифіковане ембріональними стовбуровми клітинами.

Дослідження проводились на особинах чотирьох поколінь F1, F2, F3, F4 за двома окремими лініями. Інакше кажучи, нові покоління були репродуковані у двох окремих сім'ях. Трансгенні миші були отримані з лабораторії Джексона США у кількості восьми штук, далі їх розділили на дві паралельні сім'ї, по дві самки та два самці. Потім з F1 отримали наступне покоління F2. Приплід від першої сім'ї склав вісім особин, а від другої шість особин (рис. 2.1.).

Далі мишей перевірили на гомозиготність по RMP22 методом плр тестування, та в результаті із другого покоління були обрані батьківські тварини для розведення їх до третього покоління. Для наступних поколінь проводили аналогічні дії.

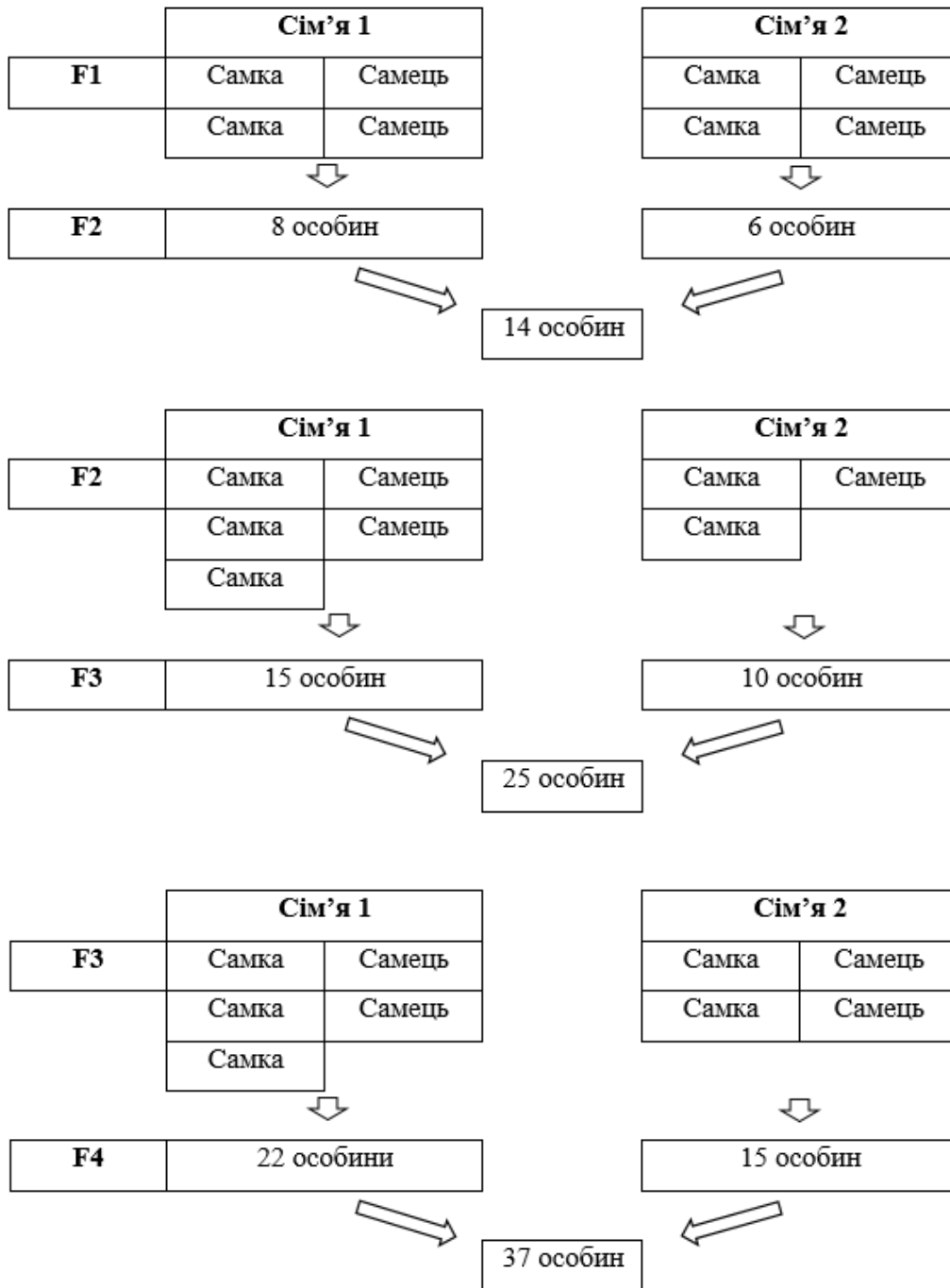


Рис. 2.1. Родовід трансгенних мишей для поведінкового тесту

## 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 ретикуломом 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 аксолемі 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 (CNAР), 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 C57B1/6 із спадковою периферичною нейропатією та здорового штаму C57B1.

### 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 балансовому 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.).

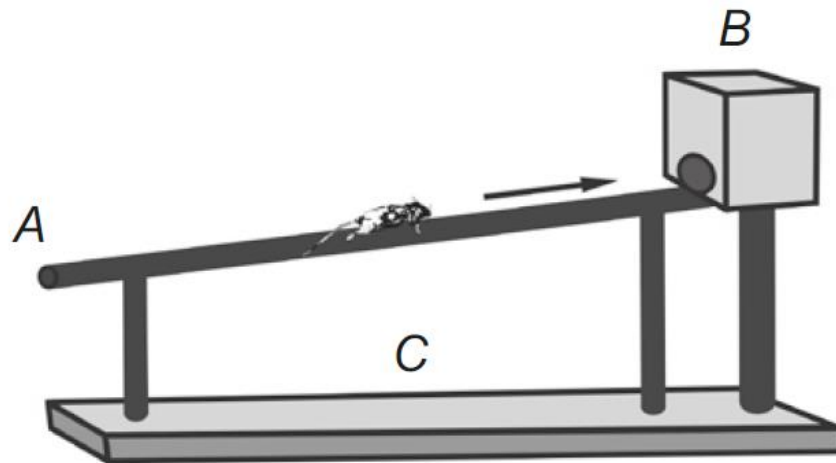


Рис. 2.1. Схема установки для поведінкового тесту. А) Циліндрична дерев'яна балка, довжина 110 см, діаметр 2 см, В) затемнене приміщення (укриття), і С) база з пінопластовою подушкою.

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 кожну 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 Стьюдента. 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 PMP22 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<sub>2</sub> 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

послідовність праймерів була такою: при визначенні клонованої послідовності гена RMP22, 31928F 5'-CCCSTTTTCSTTCACTCCTC 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.

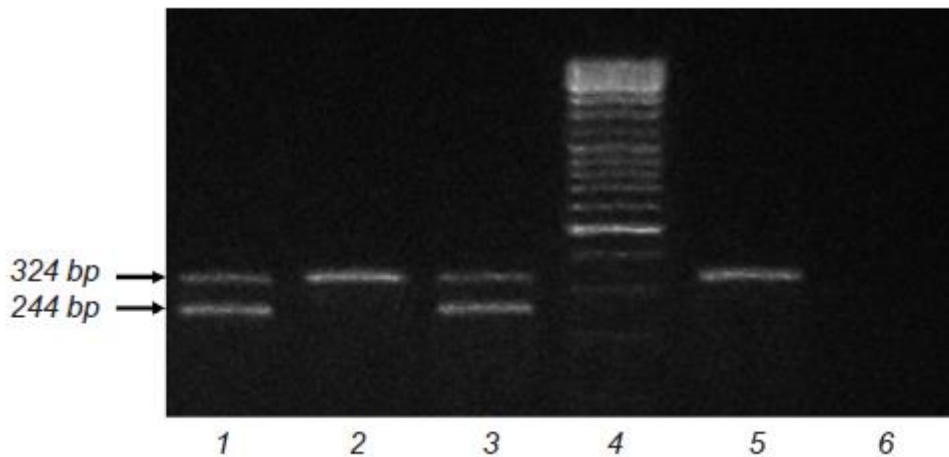


Рис. 2.2. Електрофореграми продуктів ПЛР для локусів гена RMP22 (фрагмент 244 bp) та внутрішнього позитивного контролю (фрагмент 324 bp). 1) і 3) для ДНК мишей з нуклеотидною послідовністю гена RMP22; 2) для ДНК мишей з відсутністю зазначеної вище послідовності нуклеотидів; 4) маркер молекулярної маси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

У дослідженні використовувались лише тварини з фрагментом 244 bp присутнім в електрофореграмах їх зразків ДНК, що свідчило про наявність гена PMP22 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 перкардіальній перфузії 0,1 М фосфатного буферу (РВ; рН 7,4) при кімнатній температурі. Ця стадія перфузії супроводжувалась холодним розчином (4°C) 4% формальдегіду і 2% глутаральдегіду в 0,1 М (РВ; рН 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 РВ, фіксували в 1,0% OsO<sub>4</sub>, 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 дротяні електроди Ag – AgCl з міжелектродною відстанню близько 2,5 мм (рис. 2.3.) 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  $3 \text{ c}^{-1}$ ; стимулюючі рейни тривали 30 сек. Виконували по три серії стимулювання, які розділені інтервалами довжиною 60 секунд.

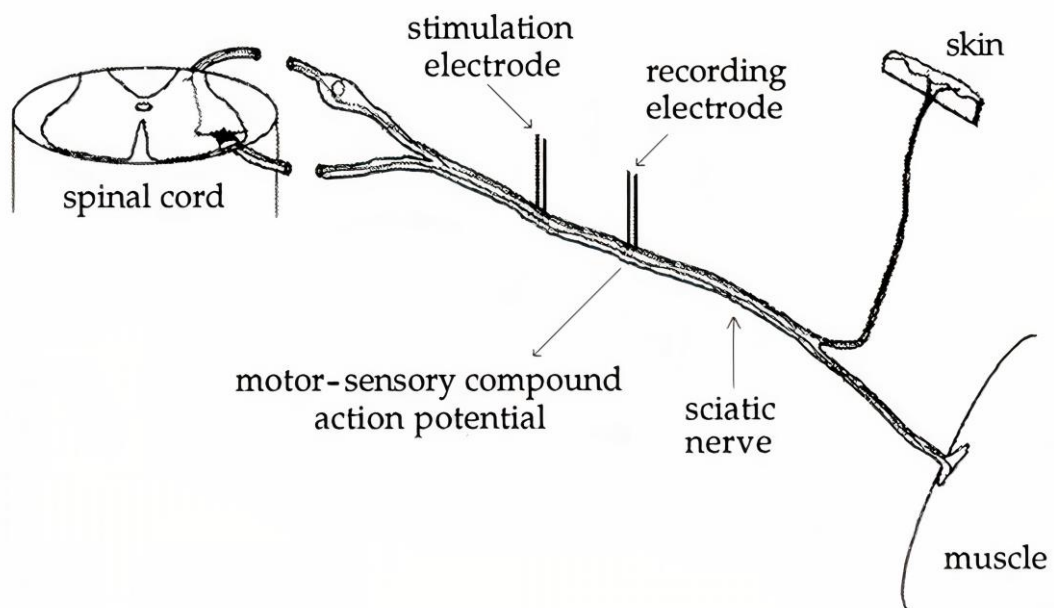


Рис. 2.3. Схематичне зображення сідничного нерву та під'єднаних до нього (для стимуляції та реєстрації поширюваної хвилі) біполярних електродів.

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).

Мультипотентні 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. Vaine з модифікацією In Serra 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  $0 \leq$  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.

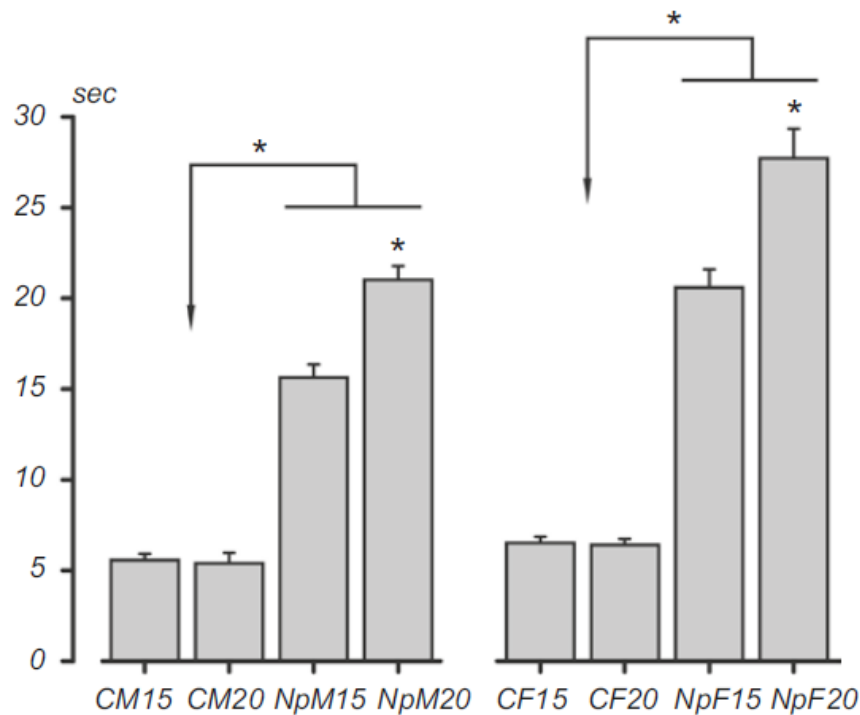


Рис. 3.1. Середні значення ( $M \pm m$ ) часу, витраченого піддослідними на проходження дистанції. Групи тварин наведені нижче: CM15, CM20, NrM15 та NrM20 - це самці контрольної групи (C) та з нейропатією (Nr) у віці 15 та 20 тижнів відповідно; CF15, CF20, NrF15 та NrF20 є самками відповідних груп. Зірочки 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

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	$5,6 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,7$	-4	$> 0,05$
CF	$6,5 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,3$	-2	$> 0,05$
NpM	$15,7 \pm 0,7$	$20,5 \pm 1,1$	+31	$< 0,01$
NpF	$21,9 \pm 1,1$	$27,7 \pm 1,6$	+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	$5,6 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,4$	+16	$> 0,05$
C20	$5,4 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,3$	+19	$> 0,05$
Np15	$15,7 \pm 0,7$	$21,9 \pm 1,1$	+39	$< 0,01$
Np20	$20,5 \pm 1,1$	$27,7 \pm 1,6$	+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	$5,6 \pm 0,3$	$15,7 \pm 0,7$	+180	$< 0,001$
M20	$5,4 \pm 0,7$	$20,5 \pm 1,1$	+280	$< 0,001$
F15	$6,5 \pm 0,4$	$21,9 \pm 1,1$	+237	$< 0,001$
F20	$6,4 \pm 0,3$	$27,7 \pm 1,6$	+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.).

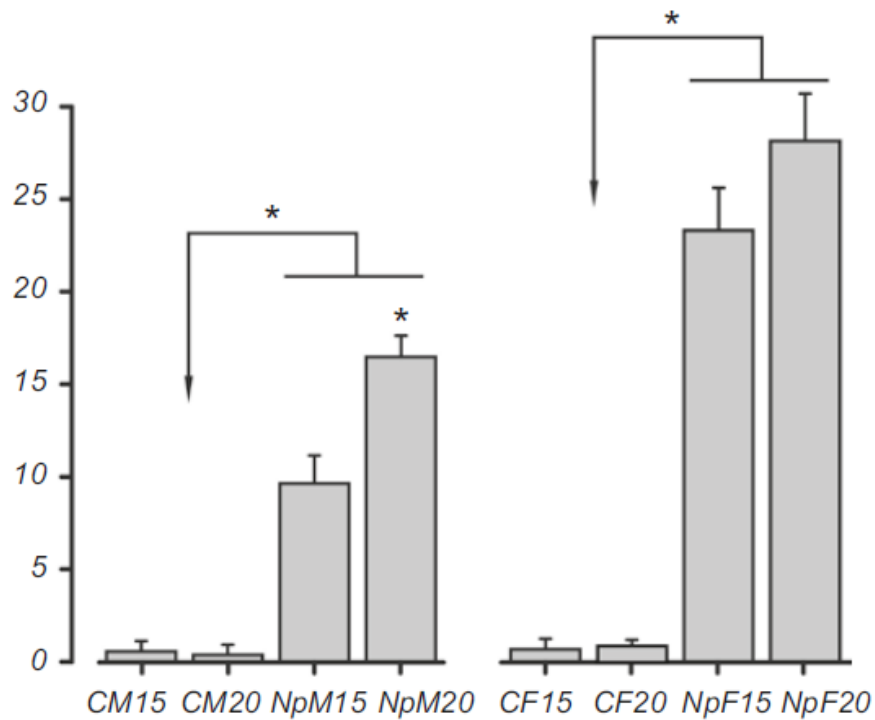


Рис. 3.2. Середня кількість рухових помилок (зісковзування задніх кінцівок з балки) під час подолання тестової дистанції піддослідними тваринами. Позначення аналогічні до рис. 2.

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 NpM15 та NpM20) 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 NpF15 та NpF20) 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 NpM15 vs NpM20, а також між групами NpM15 vs NpF15 та NpM20 vs NpF20 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.

Таблиця 3.4.

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

Стан, стать	n <sub>15</sub> , с	n <sub>20</sub> , с	Зміна, %	P
СМ	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	n <sub>М</sub> , с	n <sub>Ф</sub> , с	Зміна, %	P
С15	0,6 ± 0,5	0,8 ± 0,5	+33	> 0,05
С20	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	n <sub>С</sub> , с	n <sub>NP</sub> , 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 PMP22, 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 Падуя 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 RMR22 і, отже, сприяє більш сильному підвищенню рівня демієлінізації нервових волокон [79]. Карузо та ін. [80] вивчав вплив модуляторів рецепторів GABA на експериментальних моделях ШМТ1А для чоловіків та жінок. Ці автори продемонстрували, що рецептори GABA експресуються як у сідничних нервових волокнах, так і в клітинах Шванна, і активація цих рецепторів нейроактивними стероїдами, такими як 3 $\alpha$ -

тетрагідропрогестерон та  $3\alpha$ -діол, підвищує рівень експресії PMP22. Таким чином, останній ефект залежить від статі. У первинній культурі шваннових клітин щурів експресія PMP22 стимулюється  $3\alpha5\alpha$ -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 осьового 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  $\mu\text{m}$ , тоді як у тварин C57BL/6 (трансгенні) відповідне значення становило лише 0,12  $\mu\text{m}$  (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. Е). 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. Е, 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.

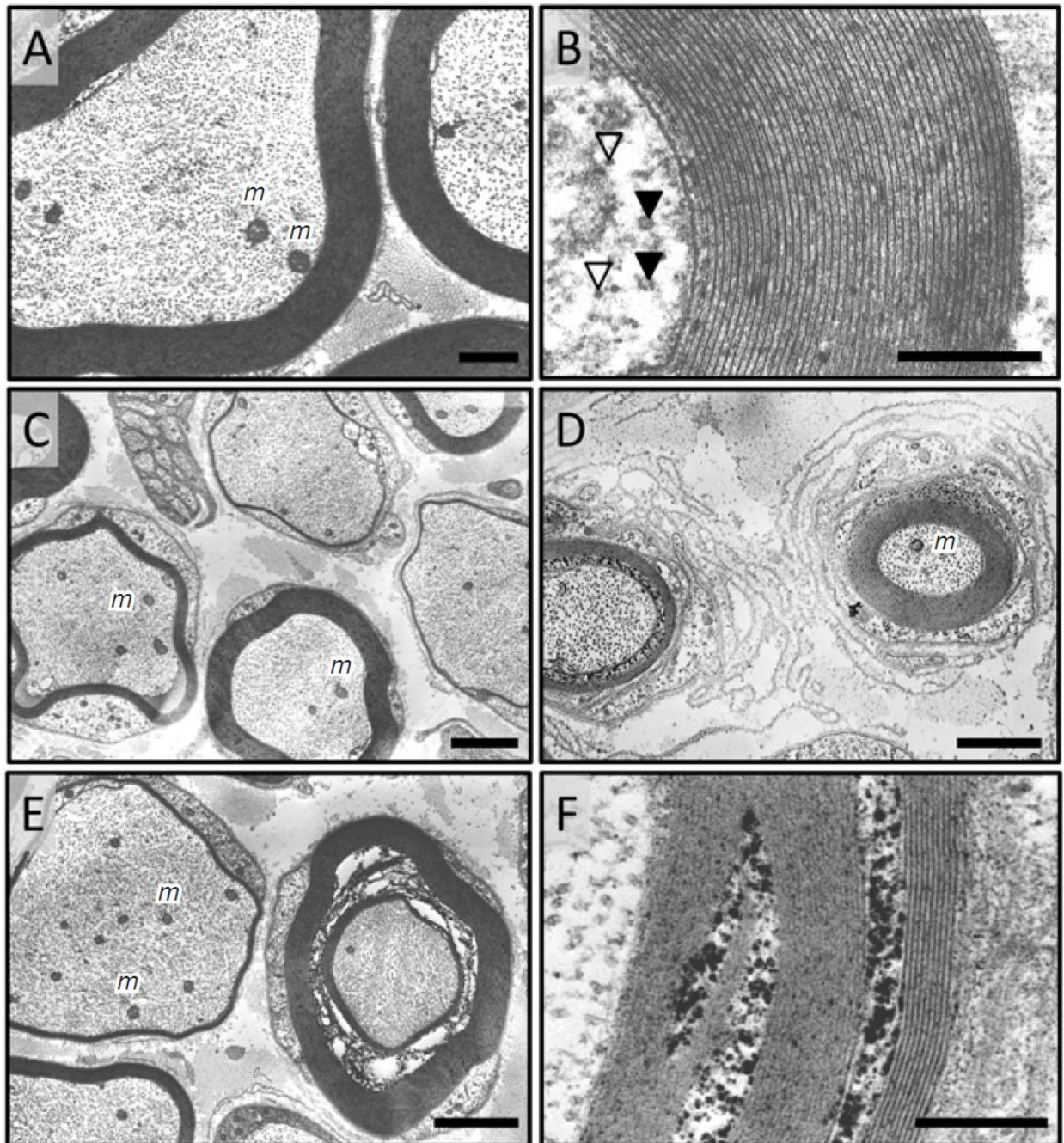


Рис. 3.3. Електронні мікрофотографії поперечних надтонких зрізів сідничного нерва контрольних мишей (А, В) та трансгенних мишей С57BL/6 (С – F).

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

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.

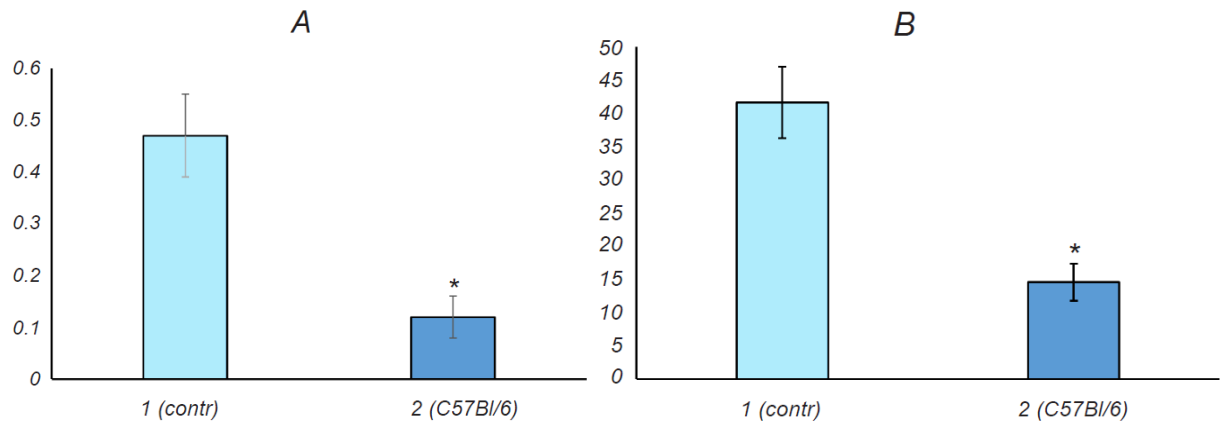


Рис. 3.4. Середні значення товщини мієлінових оболонок (μм) (A), і кількості ламелей у цих оболонках (B) у поперечних зрізах волокон великого діаметра сідничного нерва у контрольних мишей групи C57BL (1, n = 55) і трансгенних мишей групи C57BL/6 (2, n = 60). \*P < 0,05 у порівнянні з контролем.

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 PMP22 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, PMP22, 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 PMP22. Слід взяти до уваги, що цей ген (PMP22) 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 PMP22 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 PMP22 з білками теплового шоку HSP (рис. 3.3. F). Накопичення аномально упакованих молекул PMP22 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 PMP22. Як було показано, підвищена експресія HSP70 забезпечує послаблення дисфункції протеасом. Клітини Шванна чутливі як до збільшення, так і до зниження експресії PMP22. Втрата однієї копії гена PMP22 пов'язана зі спадковою нейропатією, і такий стан мієлінової нестабільності можна змодельовувати у мишей. Повна відсутність експресії PMP22 (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.

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 підслідних 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	

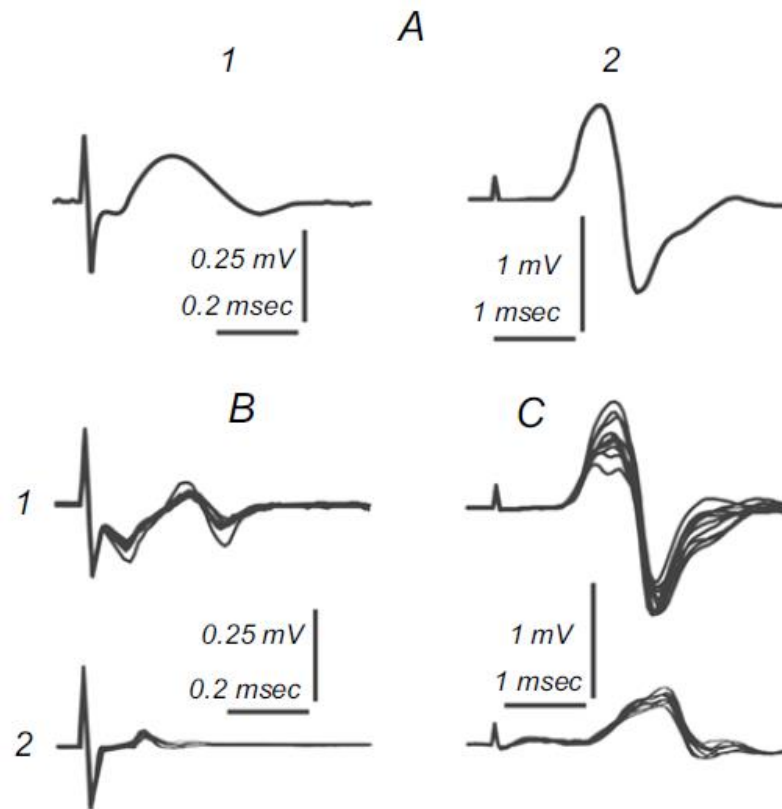


Рис. 3.5. Потенціали, викликані електричною стимуляцією сідничного нерва у експериментальних мишей.

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

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).

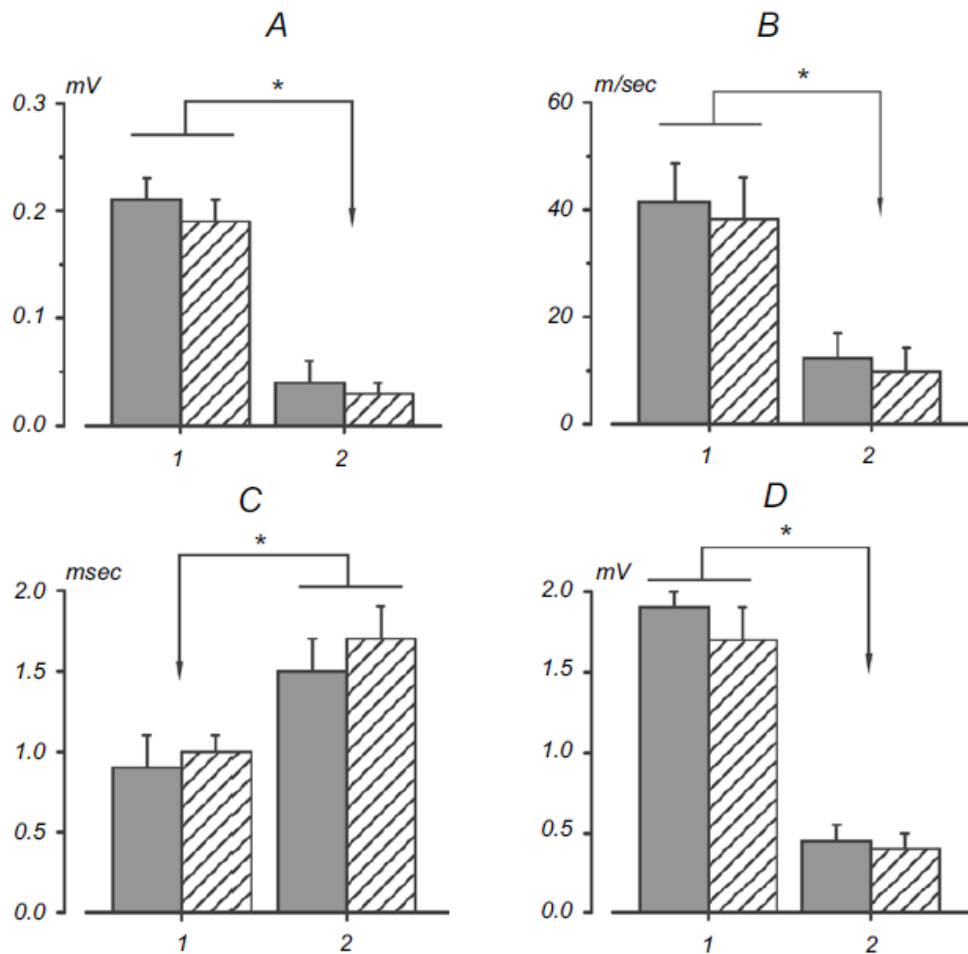


Рис. 3.6. Середні значення ( $M \pm \sigma$ ) параметрів потенціалів, викликаних електричними стимуляціями сідничного нерва у мишей двох експериментальних груп.

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 PMP22, 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 PMP22 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  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$  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 C57Bl/6 підтверджують твердження, що таких мишей можна вважати досить адекватною тваринною моделлю хвороби Шарко – Марі – Туга.

#### 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 ММСК-ЖТ з контрольними групами аналогічної статі та віку.

Поведінкові тести у всіх групах піддослідних повторювали з інтервалом в два тижні встановлюючи таким чином вплив ММСК на регенераційні процеси аксонів 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.

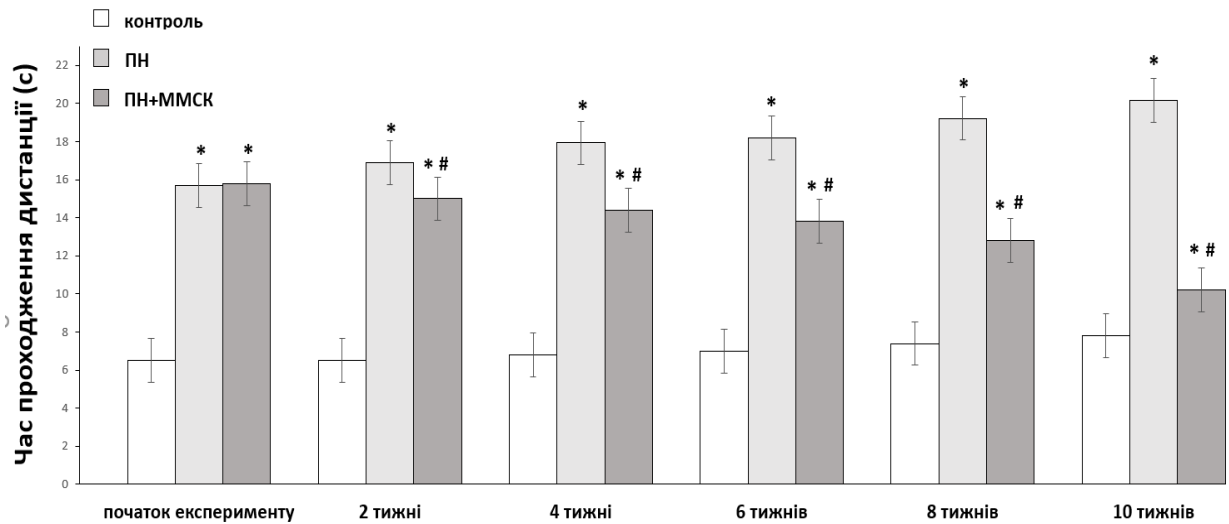


Рис. 3.7. Середній час проходження дистанції експериментальними групами. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші лінії C57Bl/6.Cg-Tg(PMP22)C3Fbas/J, яким була проведена трансплантація ММСК. \* –  $p < 0,05$  щодо контролю, # –  $p < 0,05$  щодо групи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

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

При проведенні тесту на балансування окрім визначення часу за який тварини проходили задану дистанцію ми розраховали 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.

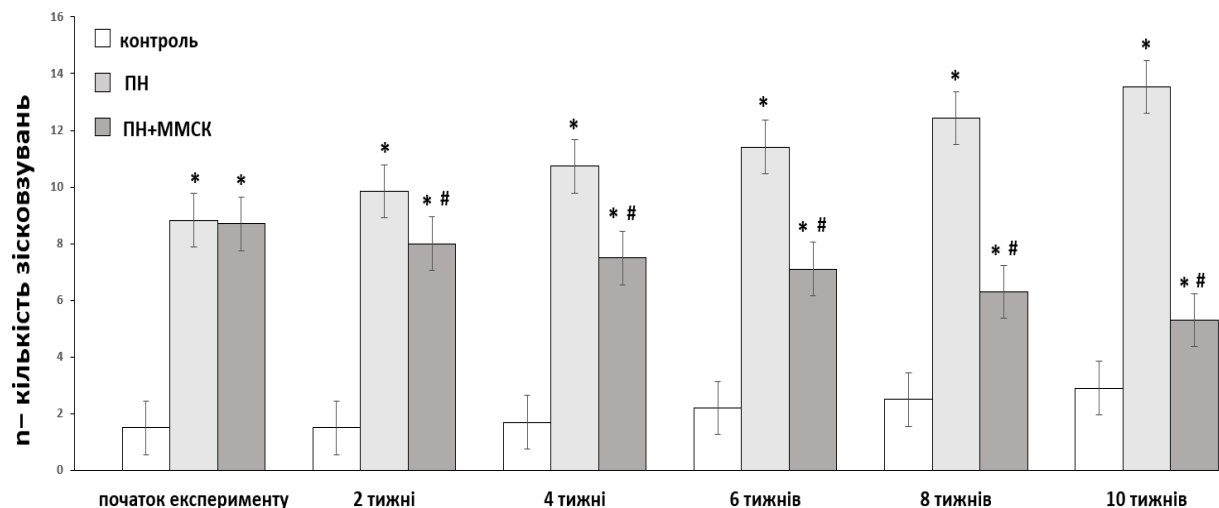


Рис. 3.8. Середня кількість зісковзувань лап тварин експериментальних груп. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші, яким була проведена трансплантація ММСК. \* –  $p < 0,05$  щодо контролю, # –  $p < 0,05$  щодо групи тварин "ПН".

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 ± 0,6	8,7 ± 1,0	8,5 ± 0,8	< 0,001	< 0,001	> 0,05
2	1,5 ± 0,7	9,8 ± 1,0	8,0 ± 0,9	< 0,001	< 0,001	> 0,05
4	1,7 ± 0,6	10,8 ± 0,7	7,5 ± 0,6	< 0,001	< 0,001	< 0,01
6	2,2 ± 0,7	11,5 ± 0,7	7,0 ± 0,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
8	2,5 ± 0,7	12,5 ± 0,6	6,3 ± 0,6	< 0,001	< 0,001	< 0,001
10	2,9 ± 0,8	13,6 ± 0,7	5,3 ± 0,7	< 0,001	= 0,04	< 0,001

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

Для виявлення рівня ІФСН у у піддослідних трьох груп, був використаний тест відбитку стопи, а його результати обраховані використовуючи формули індексу функціональності сідничного нерву (ІФСН). Цей показник визначали обрахувавши довжини відбитків стоп та ширину 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.

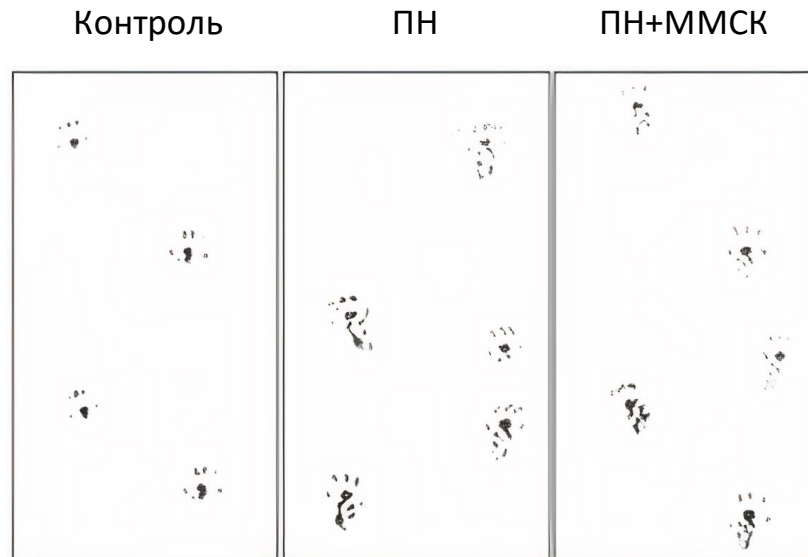


Рис. 3.9. Репрезентативне зображення слідів отриманих під час випробування ходи здорових мишей (Контроль), мишей з периферичною нейропатією (ПН) та групи мишей з нейропатією після введення ММСК (ПН+ММСК)

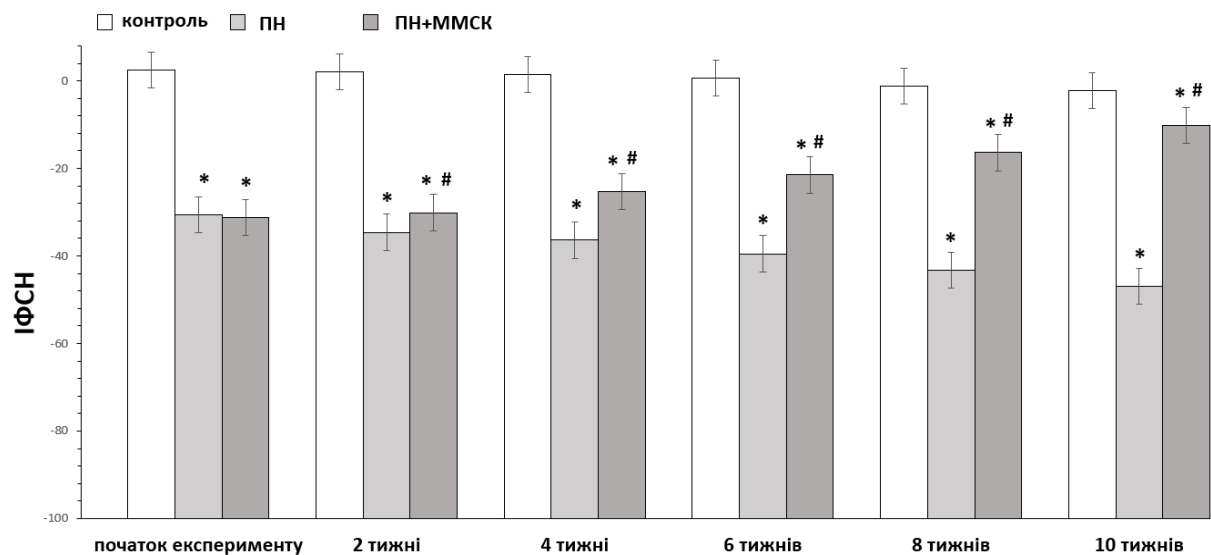


Рис. 3.10. Середнє значення індексу функціональності сідничного нерву у тварин експериментальних груп. Контроль – здорові тварини лінії C57Bl; ПН – миші з периферичною нейропатією; ПН+ММСК – миші, яким була

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 (I)	ПН (II)	ПН+ММСК (III)	P (I,II)	P (I,III)	P (II,III)
	Показники ІФСН					
0	2,5 ± 0,9	-30,6 ± 2,0	-31,2 ± 4,0	< 0,001	< 0,001	> 0,05
2	2,0 ± 1,1	-34,6 ± 1,5	-30,1 ± 1,4	< 0,001	< 0,001	< 0,05
4	1,4 ± 1,0	-36,4 ± 1,3	-25,3 ± 1,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
6	0,6 ± 1,0	-39,5 ± 1,4	-21,5 ± 1,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
8	-1,2 ± 1,0	-43,2 ± 1,7	-16,4 ± 1,4	< 0,001	< 0,001	< 0,001
10	-2,2 ± 1,3	-47,0 ± 2,1	-10,1 ± 1,8	< 0,001	< 0,01	< 0,001

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

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

#### 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 РІЗК – Akt, які є компонентами екзосоми, можуть бути посередниками регенерації сідничного 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

оболонки фактично призводило до їх зникнення. Показано, що вираженість демієлінізації залежала від діаметра аксонів, великі рухові волокна мали мінімальні оболонки мієліну, на відміну від менших волокоок 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 дих тварин з нейропатією, мали у кілька разів менші амплітуди та набагато менші швидкості провідності порівнюючи 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. За результатами поведінкового тесту було встановлено, що ступінь зниження рухової активності, залежить від статі та віку піддослідних тварин. Виявлено, що внаслідок високого рівня прогестерону, який сприяє додатковій експресії PMP22, 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 ядро вираженою у волокнах більшого діаметру, на відміну від волокон меншого діаметру, в яких мієлінові оболонки мали нормальну або навіть збільшену товщину. Це означає, що хвороба, в більшій мірі, уражає рухові волокна.

3. Показано, що в умовах надмірної експресії PMP22 утворюється велика кількість агрегатів білка PMP22 з білками теплового удару HSP. Було зроблено висновок, що це сприяє додатковому порушенню внутрішньоклітинного транспорту та дисфункції протеасом у Шваннівських клітинах і, як наслідок, стимулюється подальший розвиток процесів демієлінізації.

4. Показано, що внаслідок демієлінізації рухових нервових волокон SNAP та M-хвилі характеризуються набагато меншими амплітудами та більшими затримками порівняно зі здоровими мишами.

5. За результатами 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 беручи до уваги фенотипічні особливості піддослідних мишей, було впроваджено експериментальне лікування на основі мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, яке вже на 4-му тижні після введення значно покращило поведінкові результати піддослідних, а на 10-му тижні

майже наблизило\* показники хворих мишей до показників здорових (значення міжгрупових відмінностей досягло рівня  $*P > 0.05$ ).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев И., Вапцаров И., Михов Х, Ангелов А. Дифференциальная диагностика важнейших симптомов детских болезней. - София: Медицина и физкультура. - 1981. -.781 с.
2. Антонюк В.С. Біофізика і біомеханіка [Текст]: підруч./ В.С. Антонюк, М.О. Бондаренко, В.А. Ващенко та ін.. – К.: НТУУ «КПІ», 2012. – 344с.
3. Ахмадеева Л.Р., Магжанов Р.В., Башкатов С.А., Шарина А.В. Гликозаминогликаны и их фракции у пациентов с наследственными нервно-мышечными заболеваниями // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2003. - Т. 103. - С. 60-65.
4. Бадалян Л.О., Таболин В.А., Вельтищев Ю.С. Наследственные болезни у детей. - М.: Медицина - 1971. - С. 339-360.
5. Бадалян Л.О., Скворцов И.А. Клиническая электронейромиография. - М.: Медицина. - 1986. - 245 с.
6. Бадалян Л.О. Детская неврология. - М.: Медицина. - 1984. - 571 с.
7. Балезина О.П. Физиология: биопотенциалы и электрическая активность клеток: учебное пособие для академического бакалавриата / О.П. Балезина, А.Е.Гайдуков, И.Ю. Сергеев. – 2-е изд., перероб. и доп. – Москва: Издательство Юрайт, 2018. – 165с.
8. Бондаренко Е.С., Шамхалова В.Г., Швабрина Т.В. Почечная экскреция гликозаминогликанов в норме и при некоторых заболеваниях нервной системы у детей // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1976. - Т. 76. - С. 1509- 1513.
9. Герасимова М.М., Дудкина Н.А., Соколов А.А. Роль миоглобина в диагностике нервно-мышечных заболеваний // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1999, - Т. 99. - С. 43- 44.
10. Al-Thihli K, Rudkin T, Carson N, Poulin C, Melancon S, Der Kaloustian VM. Compound heterozygous deletions of PMP22 causing severe Charcot-Marie-

Tooth disease of the Dejerine-Sottas disease phenotype. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2412–2416.

11. Горбунова В.Н., Савельева В.В., Васильева В.В., Красильников В.В. Молекулярная неврология. Заболевания нервно-мышечной системы. Часть 1. - С.-П.: Интермедика. - 2000. - 319 с.

12. Давиденков С. Н. Проблема полиморфизма наследственных болезней нервной системы. - Л.: ВИЭМ. - 1934. - 139 с.

13. Nicholson G, Myers S. Intermediate forms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy: a review. *Neuromolecular Med*. 2006;8:123–130.

14. Nicolaou P, Zamba-Papanicolaou E, Koutsou P, Kleopa KA, Georghiou A, Hadjigeorgiou G, Papadimitriou A, Kyriakides T, Christodoulou K. Charcot-Marie-Tooth disease in Cyprus: epidemiological, clinical and genetic characteristics. *Neuroepidemiology*. 2010;35:171–177

15. Лобзин В.С., Сайкова Л.А., Полякова Л.А., Косачев В.Д. Ранняя диагностика и дифференциация невралной амиотрофии Шарко-Мари // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1984. - Т. 84.-С. 1601-1605.

16. Маркова Е.Д., Магжанов Р.В. Распространенность наследственных заболеваний нервной системы в различных популяциях (обзор) // Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 1990. - Т. 90.-С. 113-119.

17. Lupski JR, Chance PF. In: *Peripheral Neuropathy*. Fourth. Dyck PJ, Thomas PK, editor. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. Hereditary Motor and Sensory Neuropathies Involving Altered Dosage or Mutation of PMP22: The CMT1A Duplication and HNPP Deletion; pp. 1659–1680.

18. Перкин Г.Д. Диагностические тесты в неврологии. Пер. с англ. - М.: Медицина. - 1994. - 298 с.

19. Matsunami N, Smith B, Ballard L, Lensch MW, Robertson M, Albertsen H, Hanemann CO, Muller HW, Bird TD, White R, Chance PF. Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat Genet*. 1992;1:176–179.

20. Хохлов А.П., Савченко Ю.Н. Миелинопатии и демиелинизирующие заболевания. - М.: Медицина. - 1990. - 208 с.
21. Lewis RA, Krajewski K, Tate B, Shy ME. Motor Unit Number Estimation (MUNE) of Proximal and Distal Extremity Muscles in CMT1A, CMTX, and CMT2. *Neurology*. 2000;54(Suppl 3):A70.
22. Adlkofer K., Martini R., Aguzzi A. et al. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice // *Nature Genetics*. - 1995. - V. 11. - P. 274-280.
23. Aiyesimoju A.B., Osuntokun B.O., Bademosi O., Adeuja A.O. Hereditary neurodegenerative disorders in Nigerian Africans // *Neurology*. - V. 34. - P. 361-362.
24. Chance Ph.F., Fischbeck K.H. Molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies// *Hum. Mol. Genet*. - 1994. - V. 3. - P. 1503- 1507.
25. Fabbretti E., Edomi P., Brancolini C, Schneider C. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22\ its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A // *Genes & Development*. - 1995.-V. 9.-P. 1846-1856.
26. Fabrizi G.M., Simonati A., Taioli F. et al. PMP22 related congenitalhypomyelination neuropathy // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. - 2001. - V.70.-P. 123-126.
27. Huxley C, Passage E., Robertson A'M. et al. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction innerve conduction velocity in transgenic mice // *Hum. Mol. Genet*. - 1998. - V. 7. - p. 449-458.
28. Kamholz J., Menichella D., Jani A. et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1. Molecular pathogenesis to gene therapy // *Brain*. 2000. V. 123. P. 222-233.
29. Kirkpatrick L.L., Witt A.S., Payne H.R. et al. Changes in microtubule stability and density in myelin-deficient shiverer mouse CNS axons // *J. Neuroscience*. -2001.-V. 21.-P. 2288-2297.

30. Kovach M.J., Lin J.-P., Boyadjiev S'.A et al. Unique point mutation in the PMP22 gene is associated with Charcot-Marie-Tooth disease and deafness // *Am J. Hum. Genet.* - 1999. - V. 64. - P. 1580-1593.
31. MacMillan J.C., Harper P.S. The Charcot-Marie-Tooth syndrome: clinical aspects from a population study in South Wales, UK // *Clin. Genet.* - 1994. - V.45.- P. 128-134.
32. Martin J.B. *Molecular Genetics of Neurological Disease*// *Science.* - 1993. - V. 262. - P. 674-676.
33. Previtali S.C, Quattrini A., Fasolini M. et al. Epitope-tagged PO Glycoprotein Causes Charcot-Marie-Tooth-like Neuropathy in Transgenic Mice // *J. Cell Biol.* - 2000. - V. 151. - P. 1035-1045.
34. Reilly M.M. Genetically determined neuropathies // *J. Neurol.* - 1998. - V. 245.-P. 6-13.
35. Rizzuto N., Cavallaro T., Edomi P. et al. Pathological characterization of nerve biopsies from duplicated and non-duplicated CMT1 patients // *Eur. J. Hum. Genet.* - 1996. - V. 4. - SI. 9.143.
36. Robaglia-Schlupp A., Pizant I., Norreel J-G. PMP22 overexpression causes dysmyelination in mice // *Brain.* - 2002. – V. 125. – P.2213-2221.
37. Rudnik-Schoneborn S., Friedl W., Rohrig D., Zerres K. Inherited duplication of the 17p11.2 region in a patient with Dejerine-Sottas syndrome // *Eur. J. Hum. Genet.* - 1996. - V. 4. - SI. 9.142.
38. Schulz A., Walther C., Morrison H., Bauer R. In vivo electrophysiological measurements on mouse sciatic nerves // *J Vis Exp.* – 2014. – V. 13.
39. Sereda M., Griffiths I., Pühlhofer A., Stewart H., A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease // *Neuron.* – 1996. – V.16. – P. 1049-1060.
40. Snipes G.J., Suter U., Welcher A.A., Shooter E.M. Characterisation of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP22/SR13) // *J. Cell. Biol.* - 1992.-V. 117.-P. 225-238.
41. Sorour E., Upadhyaya M. Identification of seven novel mutations in peripheral myelin genes // *Am. J. Hum. Genet.* - 1995. - V. 57. - P. 1322.

42. Tan C.C, Ainsworth P.J., Hahn A.F., MacLeod P.M. Novel mutations in the Connexin32 gene associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease // *Hum Mutat.* - 1996. - V. 7. - P. 167-171.
43. Wilson M. Jr., Davis M.B., Sweeney M.G. et al. Clinical variability of the 17p11.2 duplication in CMT1A // *J. Med. Genet.* - 1996. - V. 33. - S 1.
44. Wrabetz L., Feltri M.L., Quattrini A. et al. PO glycoprotein overexpression causes congenital hypomyelination of peripheral nerves // *J. Cell. Biol.* - 2000.-V. 148.-P. 1021-1033.
45. Mazini, L., Rochette, L., Amine, M., & Malka, G. (2019). Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 1–30.
46. Zomer H.D., Varela G.K.D.S., Delben P.B., Heck D., Jeremias T., Trentin A.G. In vitro comparative study of human mesenchymal stromal cells from dermis and adipose tissue for application in skin wound healing. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2019;13
47. Vishnubalaji R., Al-Nbaheen M., Kadalmani B. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2012;347:419–427.
48. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–317.
49. Charles-de-Sá L., Gontijo-de-Amorim N.F., Maeda Takiya C., Borojevic R., Benati D., Bernardi P., Sbarbati A., Rigotti G. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2015;135:999–1009.
50. Dubey, N. K., Mishra, V. K., Dubey, R., Deng, Y. H., Tsai, F. C., & Deng, W. P. (2018). Revisiting the advances in isolation, characterization and secretome of adipose-derived stromal/stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–23.

51. Zeppieri M., Salvetat M., Beltrami A., Cesselli D., Russo R., Alcalde I., Merayo-Llodes J., Brusini P., Parodi P. Adipose Derived Stem Cells for Corneal Wound Healing after Laser Induced Corneal Lesions in Mice. *J. Clin. Med.* 2017;6:115.

52. Kilroy G.E., Foster S.J., Wu X., Ruiz J., Sherwood S., Heifetz A., Ludlow J.W., Stricker D.M., Potiny S., Green P., et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J. Cell. Physiol.* 2007;212:702–709.

53. Di Cesare Mannelli L., Tenci B., Micheli L., Vona A., Corti F., Zanardelli M., Lapucci A., Clemente A.M., Failli P., Ghelardini C. Adipose-derived stem cells decrease pain in a rat model of oxaliplatin-induced neuropathy: Role of VEGF-A modulation. *Neuropharmacology.* 2018;131:166–175.

54. Bravo B., de Durango C.G., González Á., Gortázar A.R., Santos X., Forteza-Vila J., Vidal-Vanaclocha F. Opposite Effects of Mechanical Action of Fluid Flow on Proangiogenic Factor Secretion From Human Adipose-Derived Stem Cells with and without Oxidative Stress. *J. Cell. Physiol.* 2017;232:2158–2167.

55. Ryu H., Oh J.-E., Rhee K.-J., Baik S.K., Kim J., Kang S.J., Sohn J.H., Choi E., Shin H.C., Kim Y.M. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- $\beta$  and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2014;352:220–227.

56. Wang T., Guo S., Liu X., Xv N., Zhang S. Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8:15739–15748.

57. Cho J.W., Kang M.C., Lee K.S. TGF-beta1-treated ADSCs-CM promotes expression of type I collagen and MMP-1, migration of human skin fibroblasts, and wound healing in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Med.* 2010;26:901–906.

58. Park B.S., Jang K.A., Sung J.H., Park J.S., Kwon Y.H., Kim K.J., Kim W.S. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatol. Surg.* 2008;34:1323–1326.

59. Choi E.W., Seo M.K., Woo E.Y., Kim S.H., Park E.J., Kim S. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2017
60. Xia X., Chiu P.W.Y., Lam P.K., Chin W.C., Ng E.K.W., Lau J.Y.W. Secretome from hypoxia-conditioned adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the healing of gastric mucosal injury in a rodent model. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 2018;1864:178–188.
61. M. M. Reilly, S. M. Murphy, and M. Laurá, “Charcot–Marie–Tooth disease,” *J. Periph. Nerv. Syst.*, 16, No. 1, 1–14 (2011).
62. C. Verhamme, R. H. M. King, A. L. ten Asbroek, et al., “Myelin and axon pathology in a long-term study of PMP22-overexpressing mice,” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, No. 5, 386–398 (2011).
63. K. F. Mittendorf, J. T. Marinko, C. M. Hampton, et al., “Peripheral myelin protein 22 alters membrane architecture,” *Sci. Adv.*, 3, No. 7, e1700220, doi: 10.1126/sciadv.1700220. (2017).
64. M. Sereda, I. Griffiths, A. Pühlhofer, et al., “A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease,” *Neuron*, 16, No. 5, 1049–1060 (1996).
65. A. Wallace, A. Pietrusz, E. Dewar, et al., “Community exercise is feasible for neuromuscular diseases and can improve aerobic capacity,” *Neurology*, 92, No. 15, e1773–e1785 (2019).
66. V. Prada, S. Schizzi, I. Poggi, et al., “Hand rehabilitation treatment for Charcot-Marie-Tooth disease: An open label pilot study,” *J. Neurol. Neurophysiol.*, 9, No. 4, 465 (2018).
67. R. Chetlin, L. Gutmann, M. Tarnopolsky, et al. “Resistance training effectiveness in patients with Charcot-Marie-Tooth disease: recommendations for exercise prescription,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 85, No. 8, 1217–1223 (2004).
68. J. Morena, A. Gupta, and J. C. Hoyle, “Charcot-Marie-Tooth: from molecules to therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, 20, No. 14, E3419 (2019).
69. B. W. van Paassen, A. J. van der Kooi, K. Y. van Spaen-donck-Zwarts, et al., “PMP22 related neuropathies: Charcot–Marie–Tooth disease type 1A and

hereditary neuropathy with liability to pressure palsies,” *Orphanet. J. Rare Dis.*, 9, No. 1, 38, doi: 10.1186/1750-1172-9-38 (2014).

70. U. Suter and S. S. Scherer, “Disease mechanisms in inherited neuropathies,” *Nat. Rev. Neurosci.*, 4, No. 9, 714–726 (2003).

71. G. J. Kidd, N. Ohno, and B. D. Trap, “Biology of Schwann cells,” *Handb. Clin. Neurol.*, 115, 55–79 (2013).

72. L. J. Neukomm and M. R. Freeman, “Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration,” *Trends Cell Biol.*, 24, No. 9, 515–523 (2014).

73. C. Bucci, O. Bakke, and C. Progidia, “Charcot–Marie–Tooth disease and intracellular traffic,” *Prog. Neurobiol.*, 99, No. 3, 191–225 (2012).

74. E. M. Raynor, M. H. Ross, J. M. Shefner, and D. C. Preston, “Differentiation between axonal and demyelinating neuropathies: identical segments re-corded from proximal and distal muscles,” *MuscleNerve*, 18, No. 4, 402–408 (1995).

75. K. Szigeti, and J. R. Lupski, “Charcot–Marie–Tooth disease,” *Eur. J. Hum. Genet.*, 17, No. 6, 703–710 (2009).

76. A. Schulz, C. Walther, H. Morrison, and R. Bauer, “In vivo electrophysiological measurements on mouse sciatic nerves,” *J. Vis. Exp.*, 13, No. 86, doi: 10.3791/51181 (2014).

77. M. E. Walsh, L. B. Sloane, K. E. Fischer, et al., “Use of nerve conduction velocity to assess peripheral nerve health in aging mice,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 70, No. 11, 1312–1319 (2015).

78. L. Padua, I. Aprile, T. Cavallaro, et al., “Variables influencing quality of life and disability in Charcot Marie Tooth (CMT) patients: Italian multicentre study,” *Neurol. Sci.*, 27, No. 6, 417–423 (2006).

79. M. W. Sereda, G. Meyer zu Hörste, U. Suter, et al., “Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A),” *Nat. Med.*, 9, No. 12, 1533–1537 (2003).

80. D. Caruso, S. Scurati, I. Roglio, et al., “Neuroactive steroid levels in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy,” *J. Mol. Neurosci.*, 34, No. 3, 249–253.