

УДК 615.015.44

## МЕТОДИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ НАРУШЕННЫХ ФУНКЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПРОСТРАНСТВО МЕККЕЛЯ

Ю.Г. ШАНЬКО, Ю.П. СТУКАЧ\*, В.А. КУЛЬЧИЦКИЙ\*,  
А.Л. ТАНИН, В.В. КУЛЕВАС, Е.Ю. ЧЕРНЫШ

*РНПЦ неврологии и нейрохирургии  
Ф. Скорины, 24, Минск, 220114, Беларусь*

*\*Институт физиологии НАН Беларуси  
Академическая, 28, Минск, 220072, Беларусь*

*Поступила в редакцию 16.11.2016*

В серии опытов на 26 крысах линии Вистар после имплантации 40 тысяч мезенхимальных столовых клеток в 50 мкл буферного раствора в пространство Меккеля после моделирования одно или двухстороннего повреждения коры мозжечка установлено более эффективное восстановление двигательной-ориентировочной активности крыс при введении мезенхимальных столовых клеток животным с односторонней травмой, что совпадало с более интенсивным перемещением мезенхимальных столовых клеток в область травмы мозга при их введении в область узла Гассера на стороне травмы.

*Ключевые слова:* стволовые клетки, нейродеструкция, периневральная миграция, пластичность мозга.

### Введение

В результате получения травм головного мозга у людей наблюдается снижение работоспособности, нарушения двигательных функций, парезы различной степени тяжести, нередко случаи смертельного исхода. При этом существующие методы традиционной терапии и хирургические приемы недостаточно эффективны в отношении устранения последствий нейродеструкций. Среди новых подходов к разрешению создавшейся ситуации одним из наиболее перспективных вариантов является клеточная терапия [1].

Чаще всего имплантацию суспензии стволовых клеток выполняют в сосудистое русло (венозное или артериальное) [2]. Однако данная процедура имеет ряд недостатков, к которым относится диффузное распределение введенных стволовых клеток по всем отделам кровеносной системы, низкая эффективность преодоления гематоэнцефалического барьера. Все это сопровождается резким снижением числа стволовых клеток, проникающих в область нейродеструкции. Для увеличения концентрации имплантированного клеточного материала в область повреждения мозга применяют методику внутрицентрального (непосредственно в мозг) введения стволовых клеток [3]. Очевидным недостатком данного способа введения является дополнительная операционная процедура и, как следствие, увеличение реабилитационного периода. Учитывая вышесказанное, для эффективного применения клеточной терапии необходимо разработать новый способ имплантации стволовых клеток, который сочетал бы минимизацию дополнительных оперативных вмешательств с высокой эффективностью миграции стволовых клеток в область повреждения.

Имплантация клеток в область расположения ганглия тройничного нерва (полость Меккеля), позволяет целенаправленно ориентировать миграцию введенных в рецептивные поля этого нерва стволовых клеток в каудальные отделы головного мозга задней черепной ямки. Направленность миграции определяется трейсингом стволовых клеток вдоль центральных

проекций тройничного нерва, для которого проекционными зонами являются участки головного мозга, расположенные в задней черепной ямке.

Учитывая вышесказанное, в работе поставлена цель оценить эффективность методики восстановления центрального контроля функций у экспериментальных животных после моделирования локальной одно- или двухсторонней травмы в области коры мозжечка с последующим введением мезенхимальных столовых клеток (МСК) в пространство Меккеля.

### Методика эксперимента

Первичную культуру МСК выделяли по стандартной методике [3] из жировой ткани взрослых самок крыс ( $m=270\pm 20$  г). Полученную клеточную массу культивировали на протяжении 5 дней в полной питательной среде (45 мл Dulbecco's Modified Eagle's Medium с низким содержанием глюкозы (Sigma, Германия), 5 мл фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Sigma, Германия), 100 мкл гентамицина (Sigma, Германия).

Для имплантации суспензию МСК готовили в день проведения операции. Для этого монослой мезенхимальных клеток отделяли от поверхности флакона с помощью 1 мл раствора трипсина (Sigma, Германия). Флаконы помещали на 3 мин в  $CO_2$ -инкубатор при температуре  $37^\circ C$ , после чего клетки отмывали в 5 мл фосфатном буферном растворе (ФБР) с содержанием 10 % ФТС в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин. Удаляли супернатант, осадок ресуспензировали в 5 мл ФБР и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин. После удаления образовавшегося супернатанта клетки окрашивали флуоресцентным красителем PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma, Германия). Окрашенные клетки разводили в ФБР с содержанием 10 % ФТС. Концентрация полученной суспензии составила 800 тыс. клеток в 1 мл.

Всех экспериментальных животных случайным образом разделили на четыре группы. Группа 1 ( $n=7$ ) – наркотизированные животные, которым не проводили операцию по разрушению участков коры мозжечка и не имплантировали мезенхимальные клетки. Группа 2 ( $n=7$ ) – животные, которым проводили одностороннее разрушение участка коры мозжечка и ипсилатерально вводили МСК в пространство Меккеля. Группа 3 ( $n=7$ ) – животные, которым проводили одностороннее разрушение участка коры мозжечка и контралатерально вводили МСК в пространство Меккеля. Группа 4 ( $n=5$ ) – животные, которым проводили двухстороннее разрушение участков коры мозжечка и имплантировали МСК в пространство Меккеля с одной стороны.

Операции по разрушению участков коры мозжечка проводили на крысах ( $m=230\pm 10$  г) под кетамин-ксилазин-ацепромазиновым наркозом. Животных фиксировали в стереотаксисе. После разреза мягких тканей теменной области справа с помощью бор-машины и трепана создавали одно или два трепанационных отверстия (2,5 мм латеральнее средней линии, 10,5 мм каудальнее брегмы и на 5,0 мм в глубину от поверхности мозга). С помощью микропипетки удаляли  $2,5\text{ мм}^3$  ткани мозга. Крысам из групп 2–4 через 10 мин после моделирования локальной деструкции мозжечка в пространство Меккеля с правой стороны вводили 40 тыс. клеток в 50 мкл клеточной суспензии.

Тестирование крыс в приподнятом крестообразном лабиринте проводили на пятый день после оперативных вмешательств. Длительность тестирования каждого животного составляла 5 мин. При этом с помощью видеокамеры Logitech Webcam 905 (Logitech, Китай), расположенной на высоте 2,4 м над установкой постоянно регистрировали поведение крыс в лабиринте и следующие параметры: пройденная дистанция, средняя скорость передвижения животных, количество посещений и время пребывания в открытых, закрытых и центральном секторах, время вертикализаций (стоек) в закрытых отделах, груминга и ряд иных показателей. Полученные данные из аналоговой формы в цифровую переводили с помощью пакета программ ANY-Maze для визуализации поведения животных (Stoelting Inc., США). Пакет программ ANY-Maze позволяет автоматически обрабатывать полученные данные с применением сертифицированных программ статистики.

Для микроскопического исследования горизонтальные срезы мозга получали на

криостате Microm HM525 (Microm International GmbH, Germany) через 9 дней после имплантации МСК. Толщина образцов 8 мкм. Участки мозга выделяли через каждые 200 мкм, начиная от основания мозга. Препараты исследовали на флуоресцентном микроскопе (Zeiss AxioVert 200M inverted research) при длине волны возбуждения  $\lambda = 490$  нм и длине волны испускания  $\lambda = 502$  нм.

### Результаты и их обсуждение

Для того чтобы оценить эффективность восстановительной терапии мезенхимальными клетками у крыс после разрушения участков коры мозжечка животных тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте, а также проводили микроскопическое исследование участков мозга в области травмы на 9 сутки после операции.

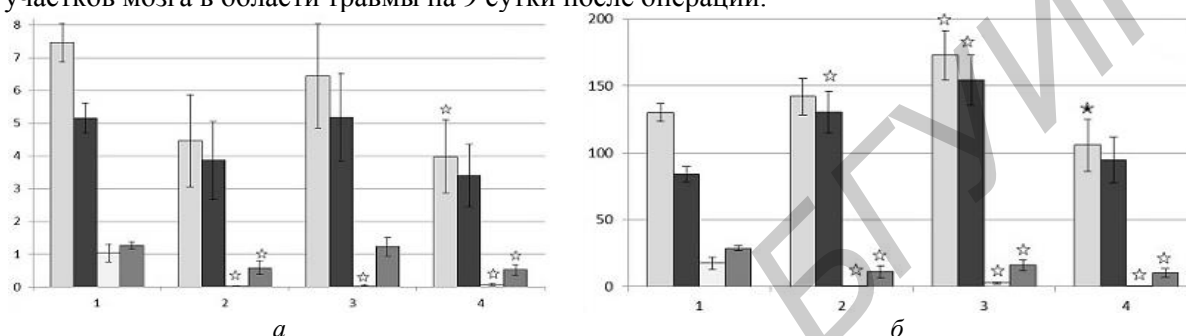


Рис. 1. Дистанция (а) в метрах (ось ординат), пройденная крысами, и время активности (б) в секундах (ось ординат) по всему лабиринту и в отдельных секторах. По оси абсцисс – номера групп (1–4). ■ – по всему лабиринту, ■ – в закрытых секторах, □ – в открытых секторах, ■ – в центральном секторе. ☆ – значительно отличается от соответствующего контроля,  $p \leq 0,05$ , ★ – значительно отличается от соответствующего параметра в группе 3,  $p \leq 0,05$

На рис. 1, а представлена дистанция, пройденная экспериментальными животными как по всему лабиринту, так в отдельных его секторах. У крыс, которым не моделировали повреждение коры мозжечка, значение общей пройденной дистанции составило  $7,46 \pm 0,59$  м. В закрытых секторах животные этой группы прошли  $5,16 \pm 0,45$  м, а в открытых –  $1,03 \pm 0,28$  м. В центральном участке лабиринта пройденная дистанция достигла значения  $1,27 \pm 0,11$  м. Из групп травмированных животных наибольшим значением общей дистанции характеризуются крысы, которым ипсилатерально имплантировали МСК в пространство Меккеля после односторонней локальной травмы коры мозжечка ( $6,44 \pm 1,60$  м). Также в этой группе животных значения пройденной дистанции в закрытых и центральном секторах составили  $5,17 \pm 1,34$  м и  $1,23 \pm 0,28$  м, соответственно. В группе 2 общая пройденная дистанция составила  $4,46 \pm 1,40$  м. В секторах зафиксированные значения пройденного пути были ниже (в закрытых –  $3,86 \pm 1,18$  м, в открытых –  $0,01 \pm 0,01$  м,  $p = 0,01$ , в центральном –  $0,59 \pm 0,21$  м,  $p = 0,05$ ), чем в группе не травмированных крыс. Самыми низкими значениями пройденной дистанции как по всему лабиринту ( $3,98 \pm 1,11$  м,  $p = 0,02$ ), так и в отдельных секторах (в закрытых –  $3,40 \pm 0,95$  м, в центральном –  $0,52 \pm 0,16$  м,  $p = 0,01$ ) характеризовались крысы из группы 4. Кроме того, общая пройденная дистанция у животных из группы 4 было ниже, чем расстояние, пройденное животными из группы 3.

При анализе общего времени активности (рис. 1, б) у животных четырех экспериментальных групп выявили, что у крыс с односторонним локальным повреждением коры мозжечка и ипсилатеральным введением МСК значение времени активности ( $172,9 \pm 18,3$  с,  $p = 0,05$ ) превышало значение данного параметра у не травмированных крыс ( $130,1 \pm 6,7$  с). У животных, которым моделировали одностороннюю локальную травму коры мозжечка и контралатерально имплантировали МСК в пространство Меккеля, также отмечено увеличение общего времени активности ( $141,9 \pm 13,7$  с) по сравнению с временем активности у животных из группы 1. Для животных с двухсторонним повреждением коры мозжечка и односторонним введением МСК характерно снижение общего времени активности

(105,6±19,6 с) относительно рассматриваемого параметра у животных, которым не разрушали участок коры мозжечка. При оценке распределения времени, которое экспериментальные животные провели в активном состоянии, рассчитали процентное соотношение для каждой группы. У не травмированных крыс на закрытые сектора лабиринта приходилось 64,5 % от общего времени активности (83,9±6,0 с), на открытые – 13,5 % (17,5±4,3 с), на центральный – 22,0 % (28,7±1,9 с). В закрытых участках крестообразного лабиринта для животных с односторонним локальным повреждением коры мозжечка отмечено увеличение времени активности (130,5±15,3 с ( $p = 0,02$ ) и 154,3±18,5 с ( $p = 0,004$ ), соответственно) в сравнении с таковым у не травмированных животных. У животных с двухсторонней травмой в области мозжечка наблюдали тенденцию к росту времени активности в рассматриваемой закрытых секторах (94,7±17,0 с). В открытых и центральной частях крестообразного лабиринта отмечено снижение времени активности у животных всех групп по сравнению со значением данного параметра у не травмированными животными.

Для подтверждения полученных выводов флуоресцентное микроскопическое исследование проведено на девятый день после моделирования нейродеструкции участка коры мозжечка и имплантации МСК.

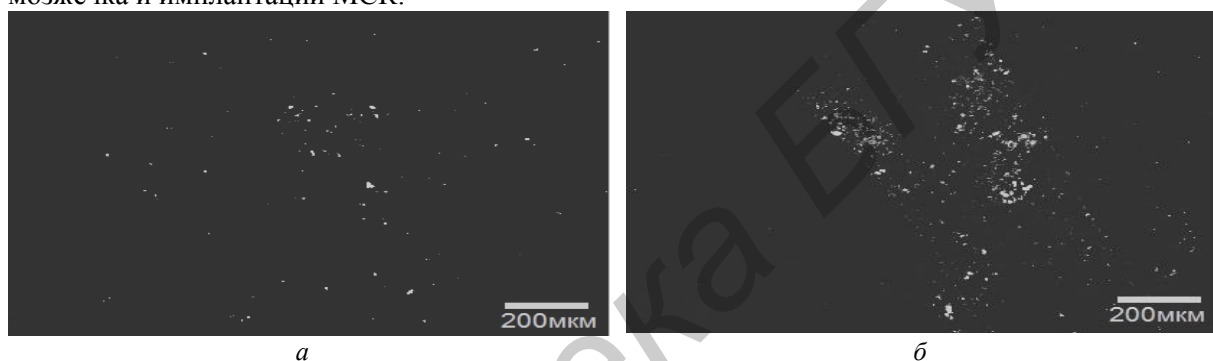


Рис. 2. Диффузная флуоресценция (РКН67) в поле зрения (0,3 мм<sup>2</sup>) через 9 дней после одностороннего локального разрушения коры мозжечка и контралатеральной (а) или ипсилатеральной (б) имплантации МСК в пространство Меккеля

На рис. 2 показано распределение флуоресцирующих клеток в области локального одностороннего повреждения коры мозжечка у крыс, которым вводили МСК в пространство Меккеля ипсилатерально (233±20 клеток на 0,3 мм<sup>2</sup> – рис. 2, б) или контралатерально (84±17 клеток на 0,3 мм<sup>2</sup> – рис. 2, а). Через девять дней после введения МСК отмечена большая эффективность ипсилатеральной миграции имплантированных клеток по сравнению с контралатеральной.

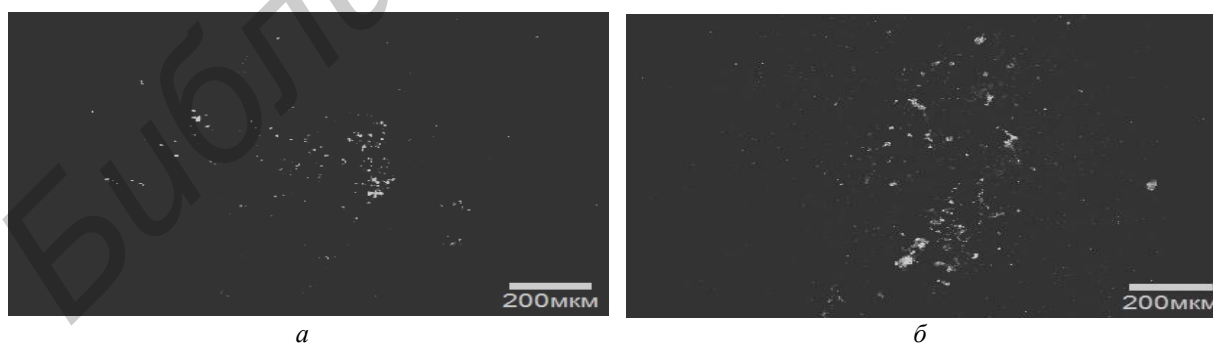


Рис. 3. Диффузная флуоресценция (РКН67) в поле зрения (0,3 мм<sup>2</sup>) в области локального разрушения коры мозжечка слева (а) и справа (б) через 9 дней после имплантации МСК в пространство Меккеля справа

При анализе распределения флуоресцирующих клеток у животных с двухсторонней травмой коры мозжечка также показана большая эффективность ипсилатерального трејсинга (154±20 клеток на 0,3 мм<sup>2</sup> – рис. 3, б) по сравнению с контралатеральным (103±14 клеток на 0,3 мм<sup>2</sup> – рис. 3, а). При сопоставлении числа флуоресцирующих клеток в поле зрения отмечено увеличение количества клеток с течением времени. Таким образом, показана

приоритетность ипсилатеральной миграции МСК, введенных в пространство Меккеля, по сравнению с контралатеральной миграцией. Также выявлено накопление имплантированных клеток в очаге нейродеструкции с течением времени.

### Заключение

Показано, что имплантация МСК в пространство Меккеля после моделирования одно или двухстороннего повреждения коры мозжечка сопровождается более эффективным восстановлением двигательной-ориентировочной активности при введении МСК крысам с односторонней травмой, что совпадает с более интенсивным перемещением МСК в область травмы мозга при их введении в область узла Гассера на стороне травмы.

## METHODS OF RESTORATION OF IMPAIRED FUNCTIONS OF BRAIN AFTER THE INTRODUCTION OF STEM CELLS IN THE MECKEL'S SPACE

Y.G. SHANKO, Y.P. STUKACH, V.A. KULCHITSKY,  
A.L. TANIN, V.V. KULEVAS, E.Y. CHERNYSH

### Abstract

In the series of experiments on Wistar rats ( $n=26$ ) after implantation of 40 thousand mesenchymal stem cells in 50  $\mu$ l of buffer solution into the Meckel's space after modeling unilateral or bilateral lesions of the cerebellar cortex it was found better recovery of motor-estimated activity after administered mesenchymal stem cells in animals with unilateral injury which coincided with a more intense movement of mesenchymal stem cells in a region of the brain trauma if MSC was administered to Gasser's node on the side of the injury.

*Keywords:* stem cells, neurodestruction, perineural migration, brain plasticity.

### Список литературы

1. Flanagan S.R. // Arch. Phys. Med. Rehabil. 2015. Vol. 96. P. 1753–1755.
2. Huang S., Xu L., Sun Y. et. al. // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 10. P. e0163131.
3. Feng N., Hao G., Yang F. et. al. // Exp. Ther. Med. 2016. Vol 11, № 5. P. 1595–1600.

**УДК 533.9.01**

## ДИНАМИЧЕСКОЕ УСТРОЙСТВО СОГЛАСОВАНИЯ ПЛАЗМЕННОЙ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ СИСТЕМЫ ТЛЕЮЩЕГО РАЗРЯДА И ВЫХОДНОГО ТРАКТА ГЕНЕРАТОРА ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИМПУЛЬСОВ

Д.В. ГОДУН, С.В. БОРДУСОВ, А.П. ДОСТАНКО, А.И. БОЖКО

Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники  
П. Бровки, 6, Минск, 220013, Беларусь

Поступила в редакцию 15 ноября 2016

Для снижения реактивности тлеющего импульсного разряда разработано и опробовано устройство ступенчатого согласования канала связи силового каскада генератора возбуждающих плазму электрических импульсов и плазменного разряда, представляющего собой динамическую нагрузку. Особенностью данного устройства является применение программно-управляемого в широком диапазоне индуктивного элемента. Использование смешанных узлов аналоговой и цифровой схемотехники обеспечивает устойчивое регулирование индуктивности от 600 мкГн до 20 мГн. Экспериментальное опробование