

## ТЕХНОЛОГИЯ ДОСТАВКИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК К РАЗЛИЧНЫМ ОТДЕЛАМ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ПЕРЕДНЕЙ ИЛИ ЗАДНЕЙ ЧЕРЕПНЫХ ЯМКАХ

*Ю.П. Стукач<sup>1</sup>, Ю.Г. Шанько<sup>2</sup>, Л.П. Пархач<sup>2</sup>, С.Г. Пашкевич<sup>1</sup>, В.А. Кульчицкий<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Академическая, 28, Минск, 220072, Беларусь

<sup>2</sup>РНПЦ неврологии и нейрохирургии, Ф. Скорины, 24, Минск, 220114, Беларусь

В серии опытов на 9 крысах линии Вистар после интраназальной имплантации 40 тысяч мезенхимальных ствольных клеток в 50 мкл буферного раствора и моделирования повреждения сенсомоторной области или ретроспленальной гранулярной и агранулярной зон коры головного мозга, а также коры мозжечка показана более эффективная миграция ствольных клеток в область травмы в сенсомоторной зоне в сравнении с перемещением клеток в участки деструкции в ретроспленальной зоне или мозжечке, что отражает соматотопическую направленность интраназально имплантированных МСК в структуры передней черепной ямки.

### Введение.

Инсульты и травмы головного мозга трудно поддаются терапии и сопровождаются высокой смертностью. Существующие методы лечения слабо отражаются на улучшении статистических сведений [1]. Одной из задач диагностики и терапии при данных заболеваниях является минимизация диагностических и терапевтических процедур с целью сохранения у пациентов контроля витальных функций. В связи с этим в экспериментах на лабораторных животных предпринята попытка отработать методику интраназальной аппликации мезенхимальных ствольных клеток (МСК) крысам [2] с целью реализации естественной способности МСК перемещаться вдоль нервных стволов и кровеносных сосудов в целостном организме. В работе поставлена цель в экспериментах разработать малотравматичную методику перинеуральной миграции МСК для доставки ствольных клеток вдоль волокон черепно-мозговых нервов к различным отделам головного мозга в передней или задней черепных ямках.

### Методика эксперимента.

МСК получали по стандартной методике [3] из жировой ткани взрослых самок крыс ( $m=270\pm 20$  г). Выделенную первичную культуру МСК культивировали в течение 7 дней в питательной среде Dulbecco's Modified Eagle's Medium с низким содержанием глюкозы (Sigma, Германия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Sigma, Германия) и 100 мкг/мл гентамицина (Sigma, Германия). Непосредственно перед имплантацией МСК окрашивали на моноклональные антитела к CD90, конъюгированных с FITC (Sigma, Германия). Из полученного клеточного материала готовили суспензию МСК с концентрацией 800 тыс. клеток в 1 мл ФБР с содержанием 10% ФТС.

Всех экспериментальных животных случайным образом разделили на три группы в зависимости от локализации области нейродеструкции ( $n=9$ ). Группа 1 ( $n=3$ ) – животные, которым моделировали травму сенсомоторной зоны головного мозга (2,5 мм латеральнее средней линии, 2,5 мм каудальнее брегмы и на 2,5 мм в глубину от поверхности мозга). Группа 2 ( $n=3$ ) – животные, которым проводили разрушение участка коры мозжечка (2,5 мм латеральнее средней линии, 10,5 мм каудальнее брегмы и на 5,0 мм в глубину от поверхности мозга). Группа 3 ( $n=3$ ) – животные, которым создавали очаг нейродеструкции в ретроспленальной гранулярной и агранулярной (RSA/RSG) области (1,5 мм латеральнее средней линии, 7,0 мм каудальнее брегмы и на 2,5 мм в глубину от поверхности мозга).

Операции по разрушению участков головного мозга 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 создавали отверстие, через которое с помощью микропипетки осуществляли экспирацию  $2,5\text{ мм}^3$  ткани мозга. Всем крысам через 10 мин после моделирования

локальной деструкции в подслизистое пространство носа вводили 40 тыс. клеток в 50 мкл фосфатного буфера [3].

Для микроскопического исследования горизонтальные срезы мозга получали на криостате Microm HM525 (Microm International GmbH, Germany) через 24 часа 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 495 нм и длине волны испускания 519 нм.

Результаты и их обсуждение.

При микроскопическом исследовании препаратов ткани мозга крыс из группы 1 через 24 часа после интраназальной имплантации суспензии МСК (рис. 1) наблюдали распределение флуоресцирующих клеток как в области обонятельных луковиц ( $35 \pm 1$  клетки на  $0,1 \text{ мм}^2$ ), так и в области разрушенного участка сенсомоторной зоны ( $21 \pm 7$  клеток на  $0,1 \text{ мм}^2$ ). Высокое значение ошибки среднего количества флуоресцирующих клеток в области нейродеструкции обусловлено неравномерным распределением МСК в процессе перемещения в головном мозге от вентральных его отделов до дорсальной поверхности, в области которой расположена зона нейродеструкции, что сопровождается снижением плотности клеток в участках, расположенных вблизи поверхности головного мозга (8 клеток на глубине 1,8 мм от поверхности мозга, 32 клетки на глубине 2,5 мм от поверхности мозга). Важным фактом является то что после интраназального введения МСК группируются в основном вдоль релейных структур обонятельного анализатора. При этом как в задней, так и в передней черепной ямке вне этих структур зарегистрированы лишь единичные флуоресцирующие клетки, не более 2 клеток на  $0,1 \text{ мм}^2$ .

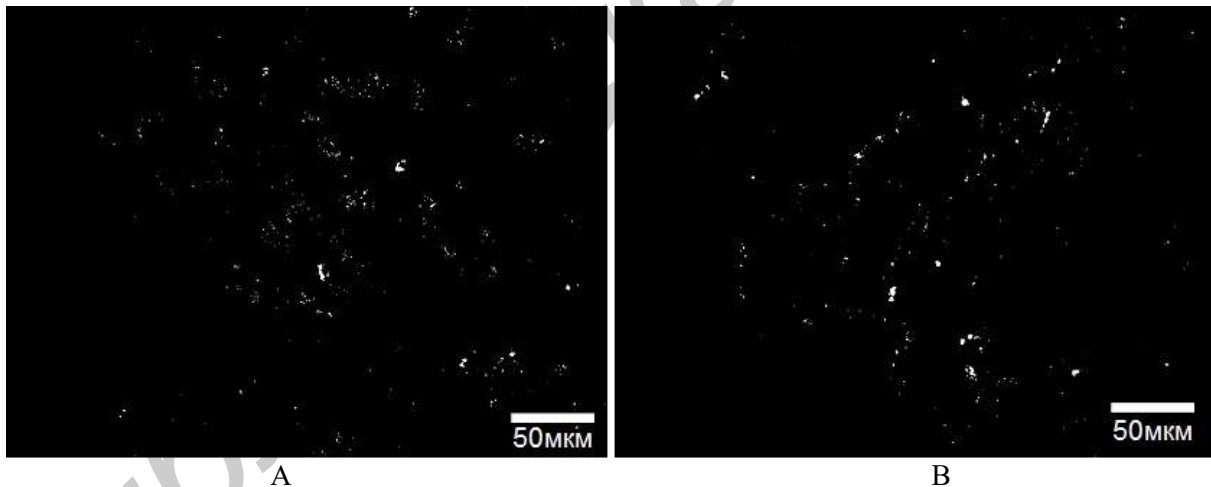


Рисунок 1 – Флуоресценция (CD90) в области обонятельных луковиц (А) и в области травмы сенсомоторной зоны (В) через 24 часа после интраназальной имплантации.

Для выявления возможности периневральной миграции стволовых клеток из подслизистой области полости носа в структуры задней черепной ямки провели микроскопическое исследование срезов мозга крыс из группы 2. Через 24 часа после имплантации флуоресцирующие клетки ( $26 \pm 4$  на  $0,1 \text{ мм}^2$ ) наблюдаются в области обонятельных луковиц (рисунок 2А). Светящиеся клетки ( $16 \pm 1$  на  $0,1 \text{ мм}^2$ ) зафиксированы в области каудальных ядер ствола головного мозга (рисунок 2В), где расположены ядра тройничных нервов. В области локального повреждения коры мозжечка через 24 часа после интраназальной имплантации МСК наблюдали не более 6 клеток в поле зрения площадью  $0,1 \text{ мм}^2$ . В других отделах мозга крыс наличие флуоресцирующих клеток не выявлено.

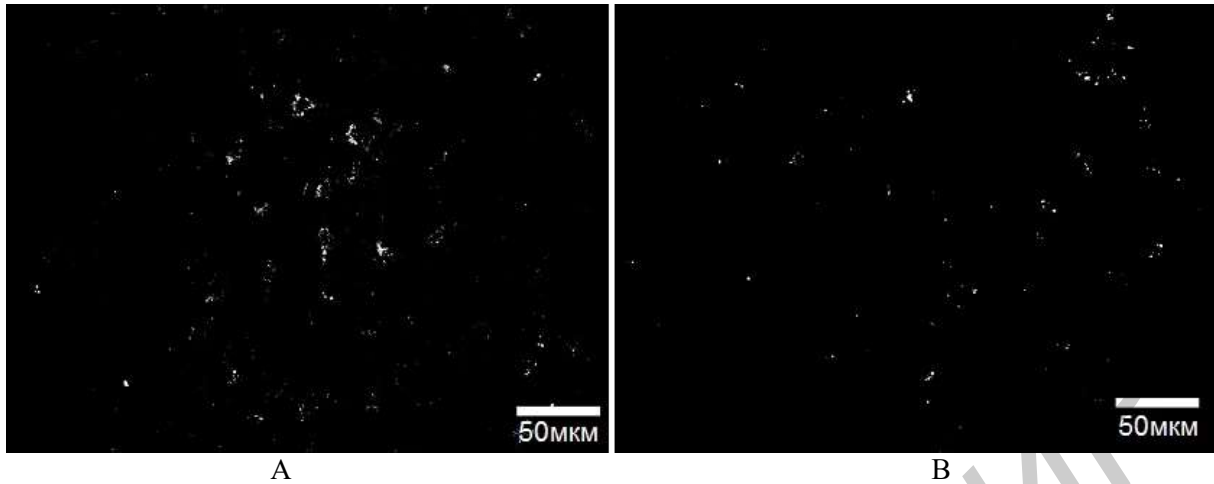


Рисунок 2 – Флуоресценция (CD90) в области обонятельных луковиц (А) и каудальных ядер ствола головного мозга (В) через 24 часа после имплантации.

Наличие флуоресцирующих МСК в области каудальных ядер ствола головного мозга говорит о реальности периневральной миграции клеток имплантированных в подслизистое пространство носа вдоль тройничного нерва, терминалы которого расположены в полости носа. Однако, при сравнении количества флуоресцирующих клеток в области обонятельных луковиц и в области каудальных ядер ствола головного мозга через 24 часа после интраназальной имплантации МСК можно заключить, что основная масса введенных клеток перемещается вдоль нервных стволов обонятельных нервов. Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что эффективность применения интраназальной имплантации МСК в случае повреждений, локализованных в задней черепной ямке, значительно ниже, чем в случае травмы в области передней черепной ямки.

На следующем этапе работы планировали изучение эффективности периневрального перемещения МСК из подслизистого пространства носа крыс в область нейродеструкции, локализованной на границе между областями передней и задней черепных ямок. Для этого моделировали локальное повреждение RSA/RSG зоны (экспирация 2,5 мм<sup>3</sup> ткани мозга), которая относится к структурам обонятельного мозга и расположена в каудальной области передней черепной ямки. На рисунке 3 представлено распределение флуоресцирующих МСК через 24 часа после интраназальной имплантации животным из группы 3.

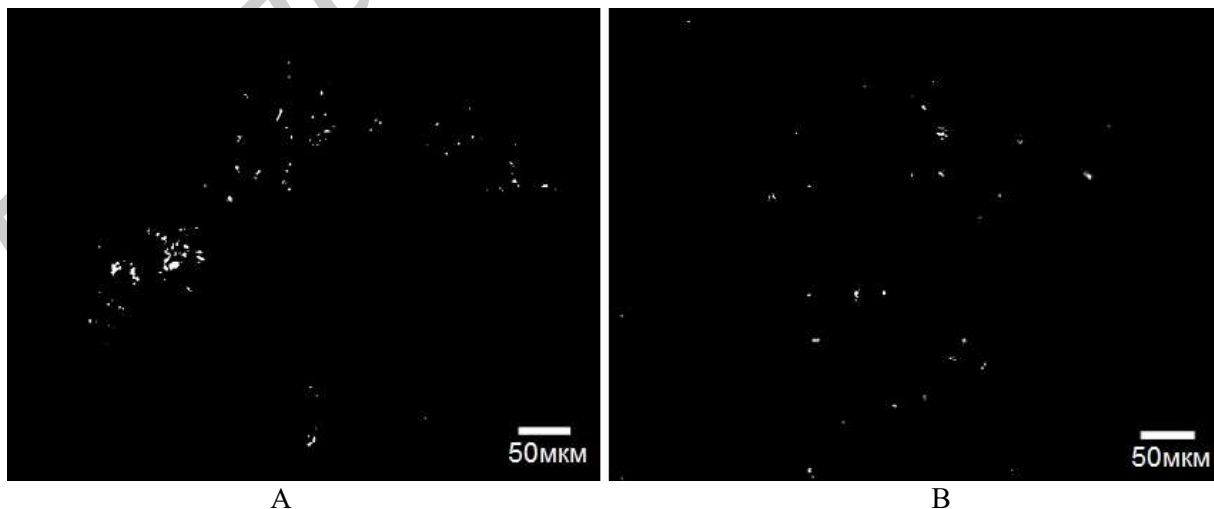


Рисунок 3 – Флуоресценция (CD90) в области обонятельных луковиц (А) и в области травмы RSA/RSG зоны (В) через 24 часа после имплантации.

Через 24 часа после интраназального введения МСК наблюдали распределение имплантированных стволовых клеток в структурах обонятельных луковиц ( $31 \pm 3$  клеток на  $0,1 \text{ мм}^2$ ) и участках деструкции RSA/RSG зоны ( $15 \pm 2$  клеток на  $0,1 \text{ мм}^2$ ). При этом количество МСК в области травмы RSA/RSG зоны было ниже, чем в случае локализации повреждения в сенсомоторной зоне головного мозга, но выше по сравнению с числом флуоресцирующих клеток в очаге деструкции коры мозжечка.

**Заключение.**

Мезенхимальные стволовые клетки после имплантации в подслизистую область полости носа крыс перемещаются вдоль волокон *n. olfactorius* в центральные структуры обонятельного анализатора и распределяются в области разрушения сенсомоторной зоны или RSA/RSG зоны головного мозга. При этом в деструктивном участке прецентральной извилины наблюдали большую плотность флуоресцирующих клеток, чем в области повреждения ретроспленальной гранулярной или агранулярной зон коры головного мозга и тем более в зоне травмы коры мозжечка. Следовательно, полученные данные отражают закономерность распределения МСК после имплантации в периферические отделы обонятельного анализатора в тех участках головного мозга, которые расположены вблизи центральных отделов этого анализатора (соматотопический принцип).

### *Литература*

1. Flanagan S.R. Invited Commentary on “Centers for Disease Control and Prevention Report to Congress: Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation” // Arch. Phys. Med. Rehabil. 2015. Vol. 96. P. 1753–1755.
2. Huang S., Xu L., Sun Y., Lin S., Gu W., Liu Y., Zhang J., Chen L., Li G. Systemic Administration of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Does Not Halt Osteoporotic Bone Loss in Ovariectomized Rats. // PLoS One. 2016. Vol. 11, No 10. P. e0163131. doi: 10.1371/journal.pone.0163131.
3. Donega V., Nijboer C.H., van Velthoven C.T., Youssef S.A., de Bruin A., van Bel F., Kavelaars A., Heijnen C.J. Assessment of long-term safety and efficacy of intranasal mesenchymal stem cell treatment for neonatal brain injury in the mouse. // *Pediatr. Res.* 2015. Vol. 78, No 5. P. 520-526. doi: 10.1038/pr.2015.145.

## **МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ДИАПАЗОНЕ СПЕКТРА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**

***В.А. Дзугунович<sup>1</sup>, Е.В. Луценко<sup>1</sup>, С.В. Никоненко<sup>1</sup>, О.Б. Тарасова<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>*Государственное научное учреждение «Институт физики имени Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси» 220072 г. Минск, пр. Независимости, 68.*

<sup>2</sup>*Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии», 220053, Беларусь, Минск, Старовиленский тр., 93*

В работе рассматриваются проблемы обеспечения единства измерений радиационных характеристик излучения в ультрафиолетовом диапазоне спектра. Описано современное состояние метрологического обеспечения измерений в Республике Беларусь в ультрафиолетовом диапазоне спектра и перспективы его развития.

**Введение.**

Ультрафиолетовое (УФ) излучение является высоко биологически активным. Инактивация, денатурация и коагуляция белков; фотолиз, фотооксидация, фотосинтез; фотоизомеризация, эритема, терморегуляция и другие механизмы воздействия на живые организмы, обусловленные УФ излучением, оказывает существенное влияние на процессы, протекающие в живом организме, и, соответственно, на функциональное состояние конкретного живого организма как в целом, так и на состояние его отдельных органов и систем. В медицинской практике широко используются лечебные свойства УФ излучения: