

МЕДИЦИНА

УДК 576.3:577.352:61

Ю. П. СТУКАЧ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПУТЕЙ ДОСТАВКИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОЗГ*(Представлено членом-корреспондентом И. В. Залуцким)**Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
stukachyulya@gmail.com*

В экспериментах на крысах отработана методика аппликации мезенхимальных клеток в область рецептивных или проводниковых путей черепно-мозговых нервов (I и V пары) с целью естественного их перемещения в центральные ядра нервов и затем в поврежденные участки мозга. Установлено, что после моделирования локальной травмы прецентральной извилины мезенхимальные клетки, имплантированные в подслизистую оболочку полости носа, через один час визуализируются в обонятельных луковицах и в области повреждения. В условиях предварительного разрушения участка коры мозжечка мезенхимальные клетки, введенные в пространство Меккеля, через один час обнаруживаются в центральных ядрах тройничного нерва и в области повреждения.

Ключевые слова: травма мозга, клеточные технологии, черепно-мозговые нервы, репарация.

Y. P. STYKACH

EXPERIMENTAL STUDY OF ALTERNATIVE WAYS OF STEM CELL DELIVERY INTO THE BRAIN*Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
stukachyulya@gmail.com*

In experiments on rats, the technique of application of mesenchymal cells into the region of the receptive or conductor paths of cranial nerves (I and V pair) was perfected for the natural movement of these cells to the central nucleus of the nerve, and then into the damaged areas of the brain. It is found that after the modeling of a local injury of the precentral gyrus, the mesenchymal cells implanted into the submucosa of the nasal cavity have been visualized in the olfactory bulb and in the damage area in 1 hour. After the pre-damaged areas of the cerebellar cortex, the mesenchymal cells introduced into the Meckel area are found in 1 hour in the central nuclei of the trigeminal nerve in the damage area.

Keywords: brain injury, cell technologies, cranial nerves, reparation.

Введение. Проблема коррекции тяжелых состояний, вызванных повреждением тканей головного мозга (травма, послеоперационное состояние) в современной медицине до сих пор не решена, поэтому актуальной является разработка технологий, направленных на активацию репаративных процессов в центральной нервной системе. В современной медицинской практике используется ряд протоколно утвержденных методик: хирургические, терапевтические и смешанные, объединяющие воздействия как фармацевтических средств, так и различных физических факторов. Тем не менее, проблема восстановления контроля функций нарушенных участков головного мозга до сих пор остается актуальной, поэтому ученые и медики объединяют усилия для повышения эффективности проводимой терапии. В настоящий момент надежды возлагаются на клеточные технологии и, в частности, на развитие технологии имплантации стволовых клеток [1–5]. К наиболее изученным методикам относится введение стволовых клеток внутривенно [3; 5] или в поврежденный участок головного мозга [1; 2]. Однако у них есть ряд недостатков: в первом случае – диффузное распределение стволовых клеток в кровотоке и слабая

проницаемость для них гематоэнцефалического барьера, а во втором – дополнительное оперативное вмешательство.

Для нивелирования недостатков этих методик нами выдвинута гипотеза о реальности миграции стволовых клеток в мозг через рецептивные участки черепно-мозговых нервов. Это предположение основано на известных сведениях о способности мезенхимальных стволовых клеток перемещаться вдоль отростков и тел нейронов (периневрально) от рецептивных полей в головной мозг [6; 7]. В процессе дискуссий с клиницистами в качестве объекта исследования выбраны две экспериментальные модели: система обонятельного нерва (I пара черепно-мозговых нервов) и система тройничного нерва (V пара черепно-мозговых нервов) у крысы. Ганглий V пары черепно-мозговых нервов расположен в полости Меккеля, которая доступна через инфраорбитальный канал, ведущий в эту полость. Выход обонятельного нерва локализован в области обонятельного анализатора и доступен для воздействия при имплантации мезенхимальных клеток под слизистую оболочку носа.

В связи с этим в работе поставлена цель – проверить в экспериментах на крысах способность мезенхимальных клеток мигрировать в полость черепа после их введения под слизистую оболочку носа или в пространство Меккеля в зависимости от локализации поврежденного участка в передней или задней черепной ямке.

Материалы и методы исследования. Опыты проведены на половозрелых белых крысах (масса тела 220–300 г) из вивария Института физиологии НАН Беларуси. Животные содержались в типовых условиях вивария в соответствии с нормами содержания лабораторных животных, 12/12-часовом ритме освещения и темноты.

В стерильных условиях операционной жировую ткань выделяли из брюшной полости взрослых самок крыс под кетамин-ксилазин-ацепромазиновым наркозом (55,6 мг/кг, 5,5 мг/кг и 1,1 мг/кг соответственно, внутривенно). Полученную тканевую массу (около 1 мл) погружали в предварительно подготовленную 50 мл пробирку, заполненную на 2/3 стерильным стандартным физиологическим раствором или фосфатным буфером (ФБР). Очищенную в ФБР ткань измельчали ножницами в чашке Петри до образования однородной массы, содержащей фрагменты размером 50–100 мкм. Процесс ферментизации проводили в течение 40 мин 0,075 %-ным раствором коллагеназы I типа (Sigma, Германия) в ФБР. Весовое соотношение жира и энзима 1 : 1. Активность энзима нейтрализовали добавлением эквивалентного объема питательной среды Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) с низким содержанием глюкозы в присутствии 10 %-ной фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Sigma, Германия). Полученную суспензию клеток центрифугировали 10 мин со скоростью 1500 об/мин. Сформировавшуюся пленку из адипоцитов и супернатант удаляли, а клеточный осадок дважды отмывали от коллагеназы в чистом ФБР и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. После этого клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде DMEM, включающей 10 % ФТС, 2 мМ L-глутамин и 100 мкг/мл гентамицина, и вносили в культуральные флаконы. Спустя 48 ч после посева проводили замену питательной среды для удаления не прикрепившихся клеток. Субкультивирование мезенхимальных клеток проводили в течение 10 дней для наращивания достаточного количества клеточной массы.

В день проведения операции готовили клеточную суспензию. Для этого монослой мезенхимальных клеток снимали с помощью 1 мл раствора трипсина (Sigma, Германия). Флаконы помещали на 3 мин в CO₂-инкубатор при температуре 37 °С, после чего клетки отмывали в 5 мл ФБР с содержанием 10 % ФТС в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин. Удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в 5 мл ФБР и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 1500 об/мин. После удаления образовавшегося супернатанта клетки окрашивали флуоресцентным красителем RKN67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma, Германия) по методике, рекомендованной производителем. Окрашенные клетки разводили в 0,5 мл ФБР с содержанием 10 % ФТС. Концентрация полученной суспензии составила 700 тыс. клеток в 1 мл (подсчет проводили по стандартной методике в камере Горяева).

Операции по разрушению участков головного мозга проводили на крысах под кетамин-ксилазин-ацепромазиновым наркозом. Животных фиксировали в стереотаксисе (СЭЖ-2, Украина). После разреза мягких тканей с помощью бор-машины формировали трепанационное отверстие

и с помощью микропипетки удаляли ткань мозга 2×2 мм. Для первой группы животных ($n = 4$) травму моделировали в передней черепной ямке в области прецентральной извилины (2,5 мм латеральнее средней линии, на 2,5 мм каудальнее брегмы и на 2,0 мм от поверхности мозга). У второй группы крыс ($n = 4$) травматическое воздействие оказывали в задней черепной ямке на уровне коры мозжечка (2,0 мм латеральнее средней линии, 1,5 мм каудальнее лямбды и на 2,0 мм от поверхности мозга). Через 10 мин после локального разрушения участков головного мозга вводили 50 мкл клеточной суспензии (35 тыс. клеток) [8] под слизистую оболочку носа животным из первой группы и в пространство Меккеля крысам из второй группы. Имплантация мезенхимальных клеток проводилась наркотизированным животным.

Продольные срезы мозга для микроскопического исследования получали на криостате через 1 и 24 ч [9] после введения клеток в рецептивные поля черепно-мозговых нервов. Толщина среза 8 мкм. Участки мозга выделяли через каждые 100 мкм, начиная от основания мозга. Полученные срезы помещали на предметное стекло с физиологическим раствором и фиксировали покровным стеклом. Препараты исследовали на конфокальном микроскопе (Zeiss AxioVert 200M inverted research, камера: Zeiss AxioCam HRm, объектив: Plan-Neofluar 40x/0.75, Plan-Neofluar 10x/0.3) в Институте физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, длина волны возбуждения $\lambda = 490$ нм, длина волны испускания $\lambda = 502$ нм.

Результаты и их обсуждение. Для обоснования выбора путей введения мезенхимальных клеток в зависимости от участка деструкции в мозге целесообразно обратиться к топографии черепно-мозговых нервов. Как известно, центральные проекции обонятельного нерва распространяются в передней черепной ямке, а тройничного нерва – в задней черепной ямке.

Чтобы оценить пути миграции в полости черепа введенных под слизистую оболочку носа крыс мезенхимальных клеток, проведено микроскопическое исследование. Выявлено наличие флуоресцирующих элементов в обонятельных луковицах уже через один час после введения клеточной суспензии (рис. 1, *а*). Спустя 24 ч количество светящихся клеток в обонятельных луковицах увеличилось (рис. 2, *а*).

На рис. 1, *б* проиллюстрировано расположение флуоресцирующих клеток в области травмы прецентральной извилины спустя один час после имплантации мезенхимальных клеток в подслизистую оболочку носа.

Через 24 ч количество флуоресцирующих клеток увеличилось как в области обонятельных луковиц (рис. 2, *а*), так и в участке повреждения прецентральной извилины (рис. 2, *б*). Таким образом, можно заключить, что мезенхимальные клетки из пространства подслизистой оболочки носа мигрировали в основном в переднюю черепную ямку, а вектор их перемещения направлен в поврежденный участок мозга.

Для оценки путей миграции мезенхимальных клеток из пространства Меккеля в головной мозг крысы с травмой в области мозжечка проведено микроскопическое исследование, в ходе

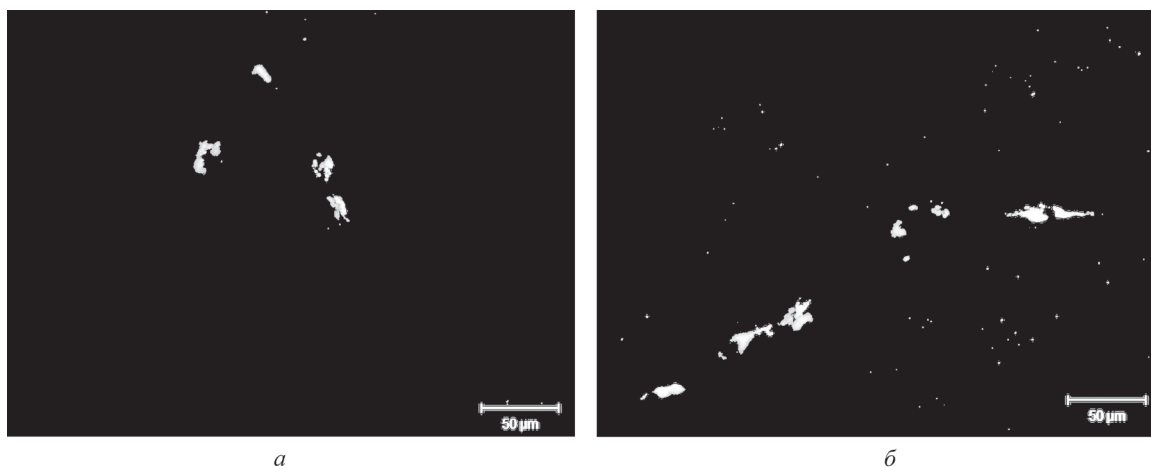


Рис. 1. Флуоресцирующие клетки в области обонятельных луковиц (*а*) и в области травмы прецентральной извилины (*б*) через час после имплантации мезенхимальных клеток под слизистую оболочку носа

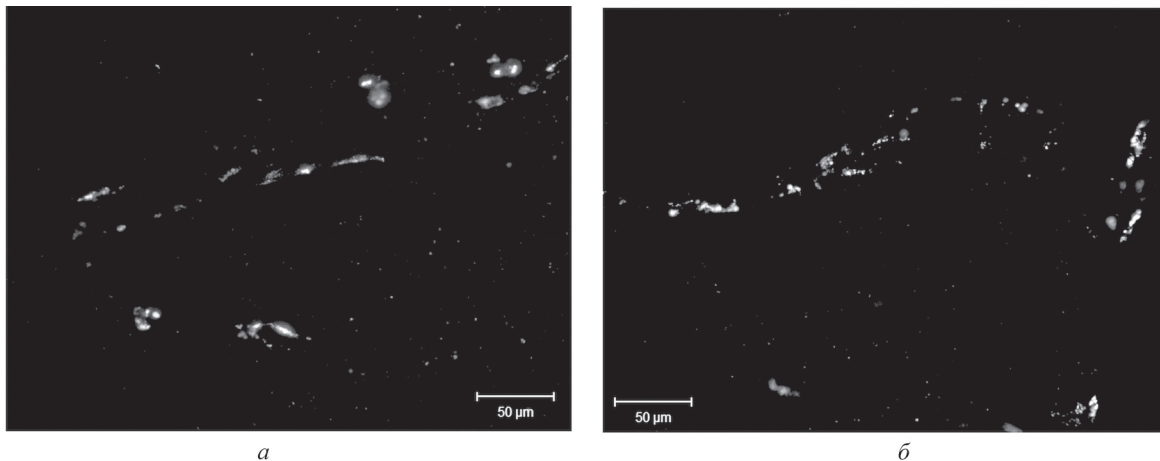


Рис. 2. Флуоресцирующие клетки в области обонятельных луковиц (*a*) и в области травмы прецентральной извилины (*б*) через 24 ч после имплантации мезенхимальных клеток под слизистую оболочку носа

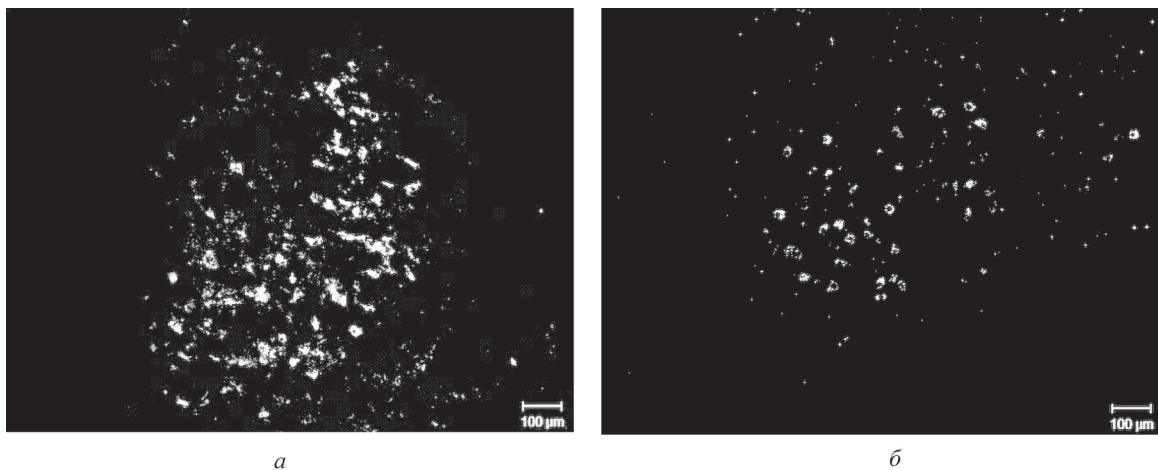


Рис. 3. Флуоресцирующие клетки в области каудальных отделов ствола (*a*) и в области травмы мозжечка (*б*) через час после имплантации мезенхимальных клеток в полость Меккеля

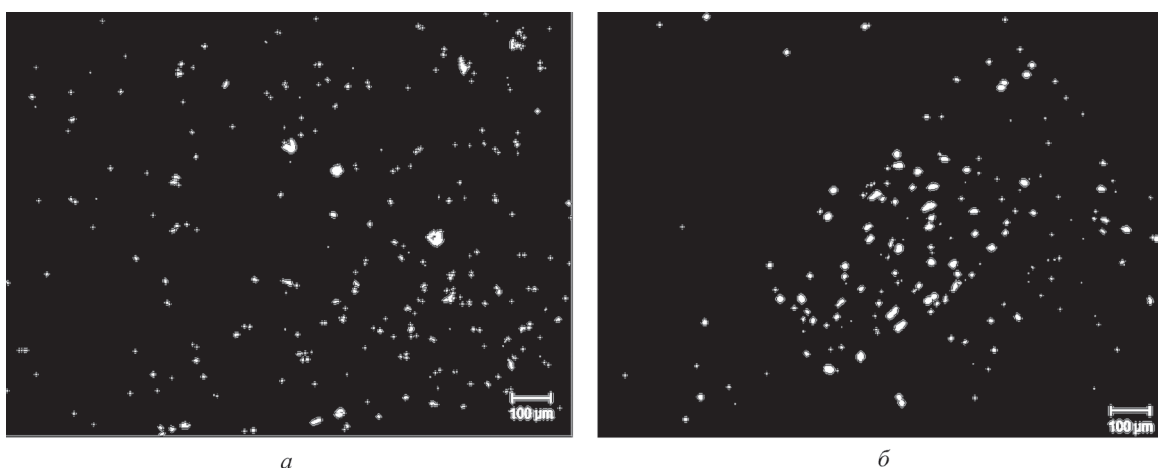


Рис. 4. Флуоресцирующие клетки в области каудальных отделов ствола (*a*) и в области травмы мозжечка (*б*) через 24 ч после имплантации мезенхимальных клеток в полость Меккеля

которого обнаружено наличие флуоресцирующих клеток в каудальных участках ствола головного мозга через один (рис. 3, *а*) и 24 (рис. 4, *а*) часа после введения клеточной суспензии в полость Меккеля.

Единичные флуоресцирующие клетки локализовались в области ядер тройничного нерва продолговатого мозга и моста. На рис. 3, *а* показано расположение таких клеток в ретикулярном ядре моста. Кроме того, через один час после введения мезенхимальных клеток (35000 ед. в 50 мкл) в полость Меккеля свечение обнаружено и в области травмы (рис. 3, *б*).

Через 24 ч флуоресцирующие клетки обнаружены не только в каудальных отделах ствола головного мозга (рис. 4, *а*), но и в мозжечке, преимущественно в зоне травмы (рис. 4, *б*). Таким образом, можно заключить, что мезенхимальные клетки из пространства Меккеля распределились в основном в задней черепной ямке, а вектор их перемещения направлен в поврежденные участки мозжечка.

Заключение. Факт появления флуоресцирующих клеток в задней черепной ямке при введении мезенхимальных клеток в пространство Меккеля (система тройничного нерва) и в передней черепной ямке при введении клеток под слизистую оболочку носа (система обонятельного нерва), а не диффузное их распределение в различных отделах головного мозга является основанием для заключения о путях миграции мезенхимальных клеток в мозг, не связанных с системой гемодинамики. Литературные источники свидетельствуют о том, что интенсивность перемещения мезенхимальных клеток в ткани мозга сравнительно небольшая [2; 4]. Это объясняется особенностями хемотаксиса и структурой различных областей головного мозга. Обычно в поврежденных участках мозга стволовые клетки начинают интенсивно накапливаться через 1–2 недели [2; 4]. Обнаружение через час мезенхимальных клеток в проекционных ядрах тройничного и обонятельного нерва соответственно подтверждает гипотезу о реальности перемещения этих клеток из периферических отделов систем этих черепно-мозговых нервов в центральные образования.

Таким образом, представленные данные являются основанием для принятия во внимание путей миграции мезенхимальных клеток в головной мозг в зависимости от методики их аппликации в область рецептивных или проводниковых путей черепно-мозговых нервов с целью естественного их перемещения в центральные ядра этих нервов и затем в поврежденные участки мозга.

Гипотеза, цель, дизайн работы сформулированы совместно с научным руководителем, профессором В. А. Кульчицким. Выражаю благодарность профессору Ю. Г. Шанько и академику А. Ф. Смеяновичу (РНПЦ неврологии и нейрохирургии Министерства здравоохранения Республики Беларусь).

Список использованной литературы

1. Лосева, Е. В. Стволовые клетки для коррекции нейродегенеративных расстройств / Е. В. Лосева // Нейрокомпьютеры: разработка, применение. – 2013. – № 7. – С. 32–41.
2. Therapeutics with SPION-labeled stem cells for the main diseases related to brain aging: a systematic review / L. T. Alvarim [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2014. – N 9. – P. 3749–3770.
3. From Blood to the Brain: Can Systemically Transplanted Mesenchymal Stem Cells Cross the Blood-Brain Barrier? / L. Liu [et al.] // Stem. Cells Int. – 2013. – N 2013. – P. 435093.
4. Safety of human neural stem cell transplantation in chronic spinal cord injury / K. M. Piltti [et al.] // Stem. Cells Transl. Med. – 2013. – Vol. 2, N 12. – P. 961–974.
5. SDF-1 α /CXCR4 Axis Mediates The Migration of Mesenchymal Stem Cells to The Hypoxic-Ischemic Brain Lesion in A Rat Model / Q. Yu [et al.] // Cell J. – 2015. – Vol. 16, N 4. – P. 440–447.
6. Detection of mouse endogenous type B astrocytes migrating towards brain lesions / G. Elvira [et al.] // Stem Cell Research. – 2015. – Vol. 14, N 1. – P. 114–129.
7. Ccnj/CPAP regulates progenitor divisions and neuronal migration in the cerebral cortex downstream of Ascl1 / P. P. Garcez [et al.] // Nat. Commun. – 2015. – Vol. 6. – P. 6474.
8. Intranasal Delivery of Neural Stem Cells: A CNS-specific, Non-invasive Cell-based Therapy for Experimental Auto-immune Encephalomyelitis / S. Wu [et al.] // J. Clin. Cell Immunol. – 2013. – Vol. 4, N 3. – P. 10.4172/2155-9899.1000142.
9. Intranasal delivery of neural stem/progenitor cells: a noninvasive passage to target intracerebral glioma / M. Sreitz [et al.] // Stem Cells Transl. Med. – 2012. – Vol. 1. – P. 866–873.

Поступило в редакцию 24.06.2015