

*Ю.В. МІНІН, А.Ф. КАРАСЬ, Е.Г. ДЕРЯБІНА, Т.І. КУЧЕРЕНКО,
Г.А. КАРАСЬ, Н.С. ШУВАЛОВА, Г.Ю. МІНІНА*

КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АТРОФІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ

Повідомлення 1

*ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)
і ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»
(дир. – акад. НАМН України, проф. Г.М. Бутенко)*

Хронічні захворювання верхніх дихальних шляхів (ВДШ), що супроводжуються атрофічними змінами їх слизової оболонки (СО), є дуже розповсюдженими і потребують постійної уваги та запровадження відповідних профілактичних і лікувальних заходів. Однак лікувальна тактика при таких станах та зумовлених ними клінічних проявах залишається виключно консервативною, симптоматично орієнтованою і потребує подальших науково-практичних удосконалень [11].

Зазвичай причинами розвитку хронічних атрофічних захворювань ВДШ є тривалий зв'язок СО з фізичними, механічними, хімічними і бактеріологічними подразниками, навіть незначної інтенсивності, які викликають функціональні та морфологічні зміни в тканинах ВДШ, стійке порушення місцевого імунітету [2, 17].

Розвиток атрофічних процесів у СО верхніх дихальних шляхів може індукувати порушення функцій інших органів і систем організму [1].

На сьогоднішній день визначальний напрямок лікування при атрофічних змінах ВДШ орієнтований здебільшого на її місцеву симптоматичну складову і пов'язаний зі стимулюванням місцевого кровообігу, зволоженням слизової оболонки та елімінацією місцевої патогенної мікрофлори [14].

Слід зауважити, що існуючий загальноприйнятий системний вплив на метаболізм слизової оболонки ВДШ за клінічними результатами є малоефективним і потребує подальших напрацювань.

Одним із сучасних методів впливу на функціональний і морфологічний стан тканин при атрофічних процесах може бути застосування досягнень регенеративної медицини, зокрема, клітинної терапії. Відкриття стовбурових клітин і вивчення їх властивостей дозволило отримати нові перспективи для глибокого дослідження біологічних процесів і лікування спадкових і дегенеративних захворювань.

Найбільш перспективними для використання у клітинній терапії є мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини (ММСК), які, як доведено, можуть диференціюватися не лише в тканини мезенхімального походження, а мають також потенціал плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин, які диференціюються в клітини і тканини усіх трьох зародкових листків [23].

Вперше ММСК були виділені із кісткового мозку, де вони були ідентифіковані [12]. Однак сама процедура забору достатньої кількості клітинного матеріалу досить болюча і травматична.

Крім цього, з віком кількість, диференціальний потенціал і життєздатність кіст-

ковомозкових мезенхімальних клітин різко знижується [22], тому актуальним є пошук і опрацювання методик отримання ММСК з альтернативних джерел, наприклад, з плаценти [13, 16] та жирової тканини [25].

Відомо, що на поверхні ММСК відсутня експресія білків 2-го класу комплексу гістосумісності і присутня експресія цілого ряду імуносупресорних білків [18, 20]. Ці унікальні властивості МСК можуть дозволити використовувати їх в розробці схем лікування з приводу багатьох дегенеративних захворювань, в регуляції імунної системи, а також в створенні біоматеріалів для потреб імплантаційної хірургії.

В даний час накопичено певний досвід клінічного використання ММСК в клітинній терапії при кістозному фіброзі легень [24], ішемічних інсультах та травматичному пошкодженні спинного мозку [5, 6, 9], хворобі Паркінсона та цукровому діабеті [21], онкологічних захворюваннях крові [7].

Зважаючи на зазначене, метою даної роботи було вивчення клінічних ознак захворювання та морфологічних змін СО порожнини носа у мишей при експериментальній атрофії після застосування клітинної терапії з використанням ММСК.

Матеріали і методи дослідження

Всі експериментальні роботи проводились з дотриманням заходів по забезпеченню ощадливого та гуманного поводження з тваринами у відповідності з установами Конвенції Ради Європи про положення біомедицини та відповідних Законів України, а також за узгодженням з комітетом медичної етики ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України».

Дослідження були проведені на 50 здорових мишах віком 1,5-2 тижні з масою тіла 10-12 г. Роботи по зараженню та утриманню піддослідних мишей були проведені на базі Інституту ветеринарної медицини НААН України в м. Києві. Тварин утримувались по групах в окремому приміщенні та в окремих клітках.

Для намічених досліджень було сформовано три групи мишей: дві дослідні, по 20 тварин в кожній, та контрольна, яку складала 10 інтактних тварин. На всіх під-

дослідних тваринах були індуковані атрофічні зміни слизової оболонки порожнини носа шляхом інтраназальної інокуляції 10 мкл бульйонної культури трьох патогенних штамів *Pasteurella multocida* з вмістом 1 млрд колонієутворюючих одиниць, розведених в 1 см³ фізіологічного розчину, на фоні дворазового (за 24 і 6 годин до інфікування) інтраназального введення 10 мкл 1 % розчину оцтової кислоти [4].

Після відтворення атрофічного процесу (через 1 міс після початку експерименту) усім мишам з 1-ї та 2-ї груп, незалежно від їх стану, 2 рази на день протягом 3 діб парентерально вводився антибіотик енрофлоксацин в дозі 20 мг на 0,12 мл розчину.

Тваринам 1-ї дослідної групи у хвостову вену ін'єкційно вводились попередньо підготовлені мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини (ММСК) з пуповини людини; 2-а дослідна група – тварини з експериментальним атрофічним процесом, які не отримували лікування ММСК.

Для отримання ММСК пуповина забиралась від здорових породіль з пологового будинку, у яких отримувалась згода на використання матеріалу. Кордовий матеріал був опрацьований протягом 4-6 годин після пологів. Транспортування кордового матеріалу здійснювалось у стерильному посуді з фізіологічним розчином. Після отримання матеріал вміщувався у поживне середовище з 10-кратним вмістом антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин) (до 15 хв), а потім відмивався стерильним забуференим фізіологічним розчином протягом 5-7 хв з метою запобігання контамінації. З пуповини видалялись судини, подрібнений пуповинний матеріал висаджувався у вигляді експлантів в пластиковий посуд і вирощувався до 2-го пасажу за методикою, розробленою О.О. Масловою та співавторами [3].

Усі маніпуляції проводились в стерильних умовах у боксі при кімнатній температурі.

Для введення тваринам використовувався 2-й пасаж поза організмом. Такий вибір базується, по-перше, на необхідності отримати достатню кількість клітин, по-друге, на потребі уникнення змін характеристик ММСК при тривалому культивуванні. Про які свідчать дані ряду авторів [8, 10].

При отриманні 2-го пасажу для введення модельним тваринам частина клітин забарвлювалась гематоксиліном та еозином для перевірки їх морфології, оскільки раніше було показано [19], що на цьому рівні пасажів клітини повинні мати однорідну веретеноподібну морфологію.

Для фенотипування ММСК використовувалось 10^6 клітин в об'ємі 100 мкл, з яких 50 мкл складала розведена до відповідної концентрації антитіла до CD людини. Вимірювання проводилось на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACS Diva 6.1 (Becton Dickinson, США). Клітини характеризувалися одразу після отримання суспензії з пуповини та на рівні кожного пасажу, в тому числі перед введенням тваринам. При цьому були визначені поверхневі маркери ММСК пуповини, які рекомендовані як мінімальні для мезенхімальних стовбурових клітин (за виключенням 1 негативного – CD₄₅): позитивні CD₇₃, CD₉₀, CD₁₀₅ та негативний CD₃₄. Показано, що негативний маркер CD₃₄ ніколи не експресувався ММСК пуповини ні в свіжовиділеному матеріалі, ні протягом необхідного культивування поза організмом. Щодо позитивних маркерів, то їх експресія залишалась незмінною на рівні 77,5-98,3% клітин для різних з них.

Перед введенням тваринам клітини відкріплювались від пластика, центрифугувались, промивались забуференим фізіологічним розчином та ресуспензувались в ньому для отримання концентрації $1,0 \times 10^6$ клітин в 100 мкл для мишей.

Методика, яка використовувалась для виділення та культивування клітин, давала можливість отримувати на другому пасажі необхідну кількість клітин (до 15×10^6 з одного зразка пуповини), які не відрізнялись за характеристиками від свіжовиділених клітин і відповідали критеріям належності до ММСК.

Для вивчення динаміки змін СО ВДШ тварини виводились з експерименту шляхом декапітації після ефірного наркозу через 14, 30 та 60 днів після введення ММСК пуповини. Для намічених морфологічних досліджень з кожної піддослідної підгрупи відбиралась для забою по 6 голів мишей, які

за загальноприйнятим методом вміщувались у 10% розчин нейтрального формаліну, проводилась декальцинація з наступною обробкою 10% розчином алюмо-калієвих галунів, промивкою водопровідною водою та виготовленням зрізів. Для порівняльного аналізу через 14, 30 і 60 днів також виведено мишей з контрольної групи.

З метою уніфікації взяття експериментального матеріалу прицільно вирізали шматочки СО блоком разом з декальцинованими ділянками кісток на рівні носової раковини за методом Harkema та співавторів [15].

Результати досліджень та їх обговорення

Під час візуального клінічного спостереження за тваринами на момент початку експерименту зі введенням МСК пуповини протягом 1 міс. після зараження звертало на себе увагу зниження активності, млявість та уповільнення рухів усіх наявних тварин, поганий апетит та накопичення слизово-гнійних виділень біля вестибулярного відділку носа, блідий колір, матовість та помітна сухість слизової оболонки ротоглотки під час огляду. Даний стан тварин та виявлений характер змін слизової оболонки носа з появою виділень наочно засвідчив про розвиток явищ атрофії. Це стало початком експерименту із введенням МСК у хвостову вену для оцінки їх дії при атрофії. Крім того, дані факти стали обґрунтуванням парентерального введення всім тваринам в цей період два рази на день протягом трьох днів антибіотик енрофлоксацин в дозі 20 мг на 0,12 мл розчину.

Подальше спостереження за тваринами дозволило виявити, що вже через 2 тижні тварини 1-ї групи виглядали більш активними, рухливими, з покращеним апетитом та адекватним носовим диханням. Одночасно у 5 (33,0 %) мишей спостерігалась незначна кількість прозорого слизу біля вестибулярного відділу носа, що можна пояснити покращенням стану слизової оболонки та фізичного стану тварин після проведеного лікування.

В той же час миші 2-ї групи справляли дещо інше враження, що відповідало наявним ознакам слабкості та утрудненню носо-

вого дихання внаслідок накопичення густого гнійного слизу на рівні верхніх дихальних шляхів. Даний факт свідчить про збереження атрофічного стану слизової оболонки у тварин даної групи.

Через 1 міс. після ін'єкційного введення МСК пуповини людини середня маса 10 мишей 1-ї групи складала $14,5 \pm 0,6$ г. Тварини зберігали звичайну активність, добре їли, їх дихальні шляхи були вільними. Слизова оболонка глотки виглядала рожевою та вологою, що явно відображає позитивну динаміку у відновленні її стану.

В той же строк піддослідні миші другої групи виглядали більш млявими, малорухливими, погано харчувалися, тобто помітно відрізнялися від тварин першої та контрольної груп. Середня маса мишей 2-ї групи відповідала $12,6 \pm 0,5$ г. Біля вестибулярного відділу носа у всіх тварин констатовалося накопичення густого слизу та кірок, що помітно заважали вільному диханню. Слизова оболонка ротової частини глотки виглядала блідою та матовою, погано зволоженою. Маса тіла інтактних тварин контрольної групи відповідного віку відповідала $16,6 \pm 0,7$ г. Будь-яких особливостей у тварин даної групи не було виявлено.

Через 2 місяці після введення МСК поведінка тварин та їх зовнішній вигляд

були без будь-яких відхилень, слизова оболонка ротової частини глотки виглядала рожевою, помірно зволоженою, присінки носу були вільні. Середня маса тіла зросла до $16,2 \pm 0,5$ г по групі. Даний факт явно свідчить на користь лікувальної дії застосованої клітинної терапії.

В той же час у піддослідних заражених тварин 2-ї групи все ще констатовувався поганий апетит, наслідком чого був малий приріст у масі, а саме – до $13,2 \pm 0,5$ г, в середньому. Зберігалися сухість слизової оболонки глотки та носової порожнини. Вільному диханню тварин у 100 % випадків спостережень також заважала наявність незначної кількості густих виділень та кірок у вестибулярному відділі носа, що підтверджує виражений вплив експериментального атрофічного процесу на стан слизової оболонки та тварин в цілому, а також складність його відновлення.

Таким чином, клінічне спостереження свідчить про розвиток атрофічного процесу у слизовій оболонці ВДШ піддослідних тварин 1-ї та 2-ї груп. Введення МСК мишам при експериментальній атрофії слизової оболонки ВДШ на відміну від групи тварин порівняння без введення клітин, покращує стан тварин, їх дихання та стан слизової оболонки.

1. Абизов Р.А., Лакіза С.О., Ромась О.Ю., Самойленко С.С., Навальківська Н.Я. Іригаційна терапія атрофічного фарингіту в осіб голосомовних професій // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2011. – №3-с. – С. 6-7.
2. Журавлев А.С., Шушляпина Н.О. Состояние клеточного иммунитета у облученных больных хроническим фарингитом // X з'їзд оториноларингологів України. – Судак, 2005. – С. 27.
3. Маслова О.О., Шувалова Н.С., Сухорада О.М., Дерябина О.Г., Макаренко М.В. Зміни морфофункціональних характеристик мезенхімальних клітин матриксу пуповини під час пасажування // Проблемы криобиологии. – 2012. – Т. 22, №2.
4. Мінін Ю.В., Карась А.Ф., Кучеренко Т.І., Карась Г.А., Тарасов О.А. Експериментальна модель атрофічного риніту інфекційного генезу // Ринологія. – 2012. – № 4. – С. 40-45.
5. Черных Е.Р., Кривошапкин А.Л., Нетесов Е.В. и др. Аутологичные костно-мозговые клетки в лечении церебрального инсульта // Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты: Сборник трудов / Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова, Е.Р. Черных, А.А. Останина. – Новосибирск: Наука, 2009. – С. 202-213.
6. Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Петровский Я.Л., Ступак В.В., Сизиков М.Ю., Останин А.А. Трансплантация аутологичных костномозговых клеток в лечении пациентов с травматической болезнью спинного мозга // “Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты”: Сборник трудов / Под ред. В.А. Козлова, С.В. Сенникова, Е.Р. Черных, А.А. Оста-

- нина. – Новосибирск: Наука, 2009. – С. 188-202.
7. Черных Е.Р., Сергеевичева В.В., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Петровский Я.Л., Останин А.А., Крючкова И.В., Лисуков И.А. Влияние стволовых мезенхимальных клеток на восстановление кроветворения у больных гемобластомами // *Материалы XIII Всероссийского научного форума “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге”*: Мед. иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4-5. – С. 439-440.
 8. Choi M.R. et al. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral Sclerosis // *Neuroscience Letters* 472. – 2010. – P. 94–98.
 9. Deb A., Wang S., Skelding K.A., Miller D., Simper D., & Caplice N.M. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients // *Circulation*, 2003; 107, 1247-1249.
 10. Deryabina O., Maslova O., Sukhorada O., Kyryk V. Kordium V. Diversity of umbilical cord MSC and their variability during passaging ex vivo // *Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine 2-4 November*. – 2011, Leipzig, Germany.
 11. Dutta S.N., Kameshwaran M. The aetiology and management of atrophic rhinitis // *J. Laryngol. Otol.* – 2005. 119:843-852.
 12. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue // *Transplantation*. 1976. – P. 230-247.
 13. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose I., Kitamura T., Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential // *Stem Cells*. – 2004; 22(5):649-58.
 14. Hildenbrand T., Weber R.K., Brehmer D. Rhinitis sicca, dry nose and atrophic rhinitis: a review of the literature // *Eur Arch. Otorhinolaryngol.* – 2011;268:17-26.
 15. Harkema J.R., S Carey S.A., James G. Wagner J.G. The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium // *Toxicol. Pathol.* April 2006. – Vol. 34, № 3. – P. 252-269.
 16. Igura K., Zhang X., Takahashi K., Mitsuru A., Yamaguchi S., Takashi T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta // *Cytotherapy*. – 2004;6(6):543-53.
 17. Keck T., Lindermann J. Stromungssimulation und Klimatisierung in der Nase // *Laryngo-Rhino-Otol Suppl.* – 2010. 1:S1-S14.
 18. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells // *Cytotherapy*. – 2003;5(6):485-9. Review.
 19. Vayssade M., Nagel M-D. Stromal cells // *Frontiers in Bioscience, Landmark*, 14. – January 1, 2009. – P. 210-224.
 20. Maslova, O. Deryabina, V. Kordium. The evaluation of the morphological and physiological characteristics of the umbilical cord matrix mesenchymal stem cells as criteria of the suitability for the clinical usage // *IV International Life Sciences Students' Conference Book of Abstracts*. – 2010. – P. 57.
 21. Rasmuson I., Ringden O., Sundberg B. Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells // *Transplantation*. – 2003. Oct.27;76(8):1208-13.
 22. Shibichakravarthy Kannan and Min Wu. Respiratory Stem Cells and Progenitors: Overview, Derivation, Differentiation, Carcinogenesis, Regeneration and Therapeutic Application // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2006; 1, 37-46.
 23. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells // *Bone*. – 2003; 33, 919–926.
 24. Wang G., Bannell BA., Painter RG., et. al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005; 102: 186-191.
 25. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell*. – 2002 Dec;13(12):4279-95.

Надійшла до редакції 02.07.13.

© Ю.В. Мінін, А.Ф. Карась, Е.Г. Дерябіна, Т.І. Кучеренко, Г.А. Карась, Н.С. Шувалова, Г.Ю. Мініна, 2013

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ
ОБОСНОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АТРОФИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ
ПУТЕЙ. СООБЩЕНИЕ 1**

*Минин Ю.В., Карась А.Ф., Дерябина Э.Г.,
Кучеренко Т.И., Карась Г.А., Шувалова Н.С.,
Минина А.Ю. (Киев)*

Резюме

Показано, что интраназальная инокуляция 10 мкл культуры трех патогенных штаммов *Pasteurella multocida* через 1 мес от начала эксперимента вызывает у подопытных мышей развитие атрофии слизистой оболочки верхних дыхательных путей, отставание в весе, снижение уровня функциональной активности животных. Мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки в процессе культивирования идентифицировались с учетом характерных маркеров и внутривенно вводились экспериментальным животным. Отмечено прогрессирующее улучшение состояния слизистой оболочки верхних дыхательных путей мышей, увеличение их массы и общей активности начиная с 2-й недели до 2 мес клинического наблюдения за животными.

Ключевые слова: верхние дыхательные пути, атрофические заболевания, клеточная терапия.

**CLINICAL AND MORPHOLOGICAL
SUBSTANTIATION OF STEM CELL THERAPY
FOR THE TREATMENT OF ATROPHIC
DISEASES OF THE UPPER RESPIRATORY
TRACT. MESSAGE 1**

*Minin Y.V, Karas A.F., Deryabina E.G.,
Kucherenko T.I., Karas G.A., Shuvalov N.S.,
Minina A.Yu. (Kiev)*

Summary

It is shown that intranasal inoculation with 10 ul culture three pathogenic strains of *Pasteurella multocida* after 1 month of the experiment, the experimental mice causes atrophy of mucous membranes of the upper respiratory tract, underweight, reducing the level of functional activity of the animals. Multipotent mesenchymal stromal cells in the culture with the identified characteristic markers and intravenously administered to experimental animals. Marked progressive improvement in the mucosa of the upper respiratory tract of mice, increasing their mass and the total activity from 2 weeks to 2 months of the clinical observation of the animals.

Keywords: upper respiratory tract, atrophic disease, cell therapy.