

*Ю.Б. ЧАЙКОВСЬКИЙ, О.І. ДЄЛЬЦОВА, С.Б. ГЕРАЩЕНКО*

## СТОВБУРОВІ КЛІТИНИ СПІРАЛЬНОГО ОРГАНА ВНУТРІШНЬОГО ВУХА

*Каф. гістології та ембріології (зав. – чл.-кор. НАМН України,  
проф. Ю.Б. Чайковський) Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця;  
каф. гістології, цитології та ембріології (зав. – проф. С.Б. Геращенко)  
ДВНЗ «Івано-Франківський нац. мед. ун-т»*

Втрата однієї з головних сенсорних систем – слухової може мати руйнівні наслідки у взаємодії людини з навколишнім світом. Вважається, що основна проблема полягає в тому, що критична маса клітин завитки і нейронів спірального ганглію формується тільки в процесі ембріогенезу, а після пошкодження вони не можуть бути замінені. У даний час варіанти для лікування з приводу цього стану дуже обмежені і в основному представлені протезами – слуховими апаратами та кохлеарними імплантатами. Існує необхідність у терапевтичному прориві при лікуванні глухих, який допоможе мільйонам людей, що постраждали від втрати слуху. Досягнення в галузі стовбурово-клітинної технології дають надію для вирішення цієї проблеми. У зростаючому обсягу літератури проводиться спроба прокласти шлях для терапії глухих стовбуровими клітинами. Багато факторів слід мати на увазі при розробці цього підходу, два з яких мають першорядне значення. По-перше, різні осередки типу потенційно будуть використані, усі з яких мають свої переваги і недоліки. По-друге, з метою виявлення такого маленького і відокремленого органа, як завитка, технічно важкі хірургічні методи повинні бути розроблені [11, 16, 24].

Орган слуху належить до органів чуття другого типу (вторинно-чутлив). Сприймаючими елементами є спеціалізовані епітеліальні клітини (сенсорно-

епітеліальні), збудження від яких передається до нервових клітин спірального ганглію [1]. Сенсорно-епітеліальні клітини слухової частини лабіринту внутрішнього вуха називаються волосковими (внутрішні і зовнішні кохлеоцити).

Сенсорно-епітеліальні клітини і нейрони спірального ганглію розвиваються зі слухової плакоти (ділянка ектодерми по боках зачатка довгастого мозку). Нейрогенез регулюється мережею зовнішніх і внутрішніх факторів, які включають трофічні фактори (фактор росту фібробластів, нейротрофіни, родина інсуліно-подібних пептидів) та транскрипційні шляхи [52]. Розуміння і визначення ключових факторів і генних мереж у розвитку і функції внутрішнього вуха являє собою важливий крок у напрямку перемоги над глухотою, яка зумовлена ураженням сенсорно-епітеліальних і нервових структур внутрішнього вуха.

Певну роль у розвитку внутрішнього вуха, як і в ембріональному розвитку інших клітин, відіграють транскрипційні фактори родини SoxE [10]. Sox10 спочатку експресується у слухових пухирцях, а пізніше – в підтримуючих клітинах під час диференціації клітин спірального органа. Наводяться генетичні докази того, що Sox10 в залежності від концентрації може відігравати певну роль у регуляції Jagged1 – гена, як відомо, важливого для proensory розвитку внутрішнього вуха. Представлені результати показують, що Sox10 регулює біологію раннього

розвитку кохлеарних попередників у внутрішньому вусі, але на відміну від клітин, отриманих з нервового гребеня, цей транскрипційний фактор є необов'язковим для їхньої диференціації, а його ефект реалізується за рахунок активації гена *Jagged1*.

Основу вивчення відтворення клітин спірального органа було закладено в 1975 р., коли Sobkowicz і співавтори [57] описали довгострокову органотипову культуру клітин органа Корті у новонародженої миші з детальним описом методів дисекції та вирощування спірального органа разом із спіральним ганглієм.

Була висловлена гіпотеза, що у внутрішньому вусі, незважаючи на обмежені можливості, існують стовбурові слухові і вестибулярні клітини [5, 42]. Ці клітини здатні до утворення нейросфер і в подальшому з використанням маркерів клітин-попередників їх можна диференціювати на волоскові і нервові клітини вестибулярного і завиткового лабіринту [18, 35, 36, 54]. Проліферація стовбурових клітин у культурі надає їм здатності самооновлення і формування нейросфер, які утворилися з клонально відтворених клітин. Однак їх пошкодження *in vivo* не легко відновити, оскільки слухові стовбурові клітини для регенерації отримати важко. Стовбурові клітини спірального ганглію є плюрипотентними з потенціалом диференціювання на волоскові клітини і нейрони кохлеарного осередку, втрата яких викликає глухоту [29].

Диференціація клітин-попередників у культурі повторює шляхи розвитку ембріональних сенсорних нейронів. Ретиноєва кислота збільшує можливості утворення нейронів і частки отриманих сенсорних клітин, що викликано різким збільшенням *Rax2*, який є ключовим фактором транскрипції черепних плакод. Маркери ембріональних слухових та інших сенсорних нейронів (*GATA3*, *Vmn3a* і *islet1*) можуть бути виявлені через 3 доби диференціації клітин, а маркери фенотипу сенсорних клітин (*peripherin*, кальретинін, *TrkC*, і *TrkB*) – через 10 діб [37]. Для диференційованих клітин з рецепторами функціонального типу АМРА-глутамату додатково вказано, що вони далі розвиваються як клітини з нейронними рисами. Одночасно нейрони, які

диференціювалися від цих стовбурових клітин, можна спрямувати на ріст у культурі волоскових клітин. Розвиток функціональної активності клітин з маркерами сенсорних нейронів припускає потенціал стовбурових клітин внутрішнього вуха в заміні уражених в результаті нейрональної дегенерації клітин [36].

Про мультипотентні кохлеарні клітини-попередники нейронів та умови їхньої диференціації є не так багато відомостей. Lin та співавтори [30] повідомили, що відразу після народження у мишей в спіральному органі виявлено клітини, здатні до самовідновлення і до диференціації у нейроно- і волосковоподібні клітини (експресія факторів *Sonic hedgehog*, епідермального фактора росту, ретиноєвої кислоти і нейротрофічного фактора головного мозку) з можливістю симетричного і асиметричного поділу клонованих нащадків. Диференціація цих клітин у волоскові клітини залежала від сигнального шляху ERK. Але автори не виявили їхніх можливостей до подальшої диференціації в нейрони.

Останні дослідження показали, що мультипотентні стовбурові клітини і клітини-попередники, які здатні до проліферації і регенерації, присутні в завитці ссавців. Досліджено проліферативний потенціал клітин, отриманих із завитки у новонароджених щурів різного віку. Визначення розходжень між проліферативними клітинами у щурів різного віку може дати ключ до розгадки механізмів, контролюючих долю цих клітин. Проліферативні клітини були ізольовані від завитки щурят віком 1, 7 і 14 днів та ідентифіковані на підставі даних ультраструктури клітин з кожної вікової групи методами проточної цитометрії та трансмісійної електронної мікроскопії. Протягом перших двох тижнів після народження кількість проліферативних клітин поступово зменшилася до нуля. Це зниження відбулося паралельно з погіршенням стану проліферативного потенціалу клітин і накопиченням клітин у G0/G1 фазах циклу. Крім того, деякі з клітин вийшли з клітинного циклу шляхом апоптозу [67]. Під час диференціювання у них кохлеарних стовбурових клітин від немовлят до дорослих зменшується рівень цикліну A2, який відіграє вели-

ку роль у модуляції клітинного циклу [12].

Декілька груп дослідників у даний час вивчають можливості для ембріональних та дорослих стовбурових клітин щодо заміни пошкоджених сенсорних елементів у завітці глухих людей. Останніми досягненнями в галузі наших знань про стовбурові клітини і розвиток індукованих плюрипотентних клітин є те, що Такахасі і Яманака в 2006 р. відкрили нову галузь науки, орієнтовану на використання індукованих плюрипотентних стовбурових (плюрипотентних) клітин у терапевтичних цілях. Існують потенційні вигоди використання плюрипотентних клітин у поєднанні з кохлеарними імплантатами для лікування хворих з втратою слуху, у тому числі й диференціації плюрипотентних клітин у слухові нейронного походження та клінічно значущі підходи до їхньої трансплантації [19].

При вивченні потенціалу індукованих плюрипотентних стовбурових клітин в якості джерела трансплантатів для відновлення слухових нейронів спірального ганглію було простежено *ex vivo* за зростанням аксонів від індукованих клітин-попередників – нейронних похідних до і в результаті їхньої трансплантації мишам *in vivo*. Нейрони, отримані з плюрипотентних клітин, спрямовували нейрити до кохлеарних волоскових клітин. Урегулювання стану нейронів, отриманих з індукованих клітин, відбувалося через один тиждень після трансплантації в завітку. У деяких трансплантатах виявлено везикулярно–глутаматний транспортер 1, який є маркером глутаматергічних нейронів. Ці результати показують, що плюрипотентні клітини можуть бути використані в якості джерела трансплантатів для регенерації нейронів спірального ганглію [40].

Можливості і швидкість росту аксонів у дисоційованому спіральному ганглії та його культурі можна проаналізувати в скануючому електронному мікроскопі і за допомогою відеомікроскопії. Рух аксона був оцінений за появою конусів росту на їхніх ламелоподіях і аксонах, а також мікрошипиків, які перемежовувалися з круговими спайками. Нейрони та їхні конуси росту експресували DCC-рецептор задля дії на молекулу Netrin-1, і було висловлено при-

пущення, що цей аттрактант у дорослих впливає на процес регенерації нейритів нейронів спірального ганглію [2, 49]. Імуноцитохімічний і сповільнений аналіз проліферації клітин спірального ганглію виявив пересування слухових нейронів та їхніх конусів росту групами, подібними до гангліонарних утворень. Аксони, що локалізувалися жмутками, інколи були "склесні" S-100 / гліальним кислим фібрилярним білком, який експресується клітинами. Деякі нейрони були нестин–позитивні, а іноді виявляли маркери проліферації клітин Ki67 і 5'-бром–2–дезоксидуридин. Нейрони під час цього процесу експресували маркери і транскрипційні фактори, характерні для нейрального розвитку – neurogenin 1, нейрогенний фактор диференціації 1, Brn3a і GATA-зв'язуючий білок 3, а також нейронні маркери – бета–III тубулін, NeuN і нейрофіламентів 160 [8].

Rak та співавтори [48] вивчали потенційні нейронні стовбурові клітини з нейросфер кохлеарного ядра і проаналізували гістологічні зрізи, щоб довести здатність до самооновлення і диференціювання в клітини–попередники нейронної лінії. Для цього клітини з кохлеарного ядра шурів (віком 1 день після народження) виділялись і культивувались для утворення первинних нейросфер. Стовбурові клітини визначались методами підрахунку та аналізу після BrdU визначення. Нейронні клітини-попередники виявили різні маркування для Nestin і Atoh1. Позитивне фарбування в них β-III тубуліну, гліального кислого фібрилярного білка і основного білка мієліну показало їх диференціацію в нейрони, астроцити і олігодендроцити. Крім того, Nestin і BrdU-мічені клітини також були визначені в гістологічних зрізах. Автори зробили висновок, що ізольовані зі спірального ганглію клітини мають усі ознаки нейронних стовбурових клітин.

До цього часу мало відомо про сигнальні шляхи, крім нейротрофічних факторів, які діють у нейронах спірального ганглію. У хворих з нейросенсорною приглухуватістю такі шляхи в кінцевому підсумку можуть бути спрямовані на стимулювання росту аксонів від залишків спірального ганглію до кохлеарного імпланту, тим самим підвищу-

ючи точність передачі звуку. Виявлено наявність трансмембранних рецепторів нейронів, які представляють шляхи – ephrin, Netrin, semaphorin, Wnt у зрілій завитці. Wnt сигналізація, зокрема, виступає як кандидат для спрямування росту аксонів до кохлеарного імплантата після нейросенсорної втрати слуху [55].

У спіральному ганглії глухих морських свинок (з ураженням завитки гентаміцином) нервові клітини експресують NOB1 – транскрипційно-асоційований білок, що складається з одного домену стрічки цинку. Тобто NOB1 може відігравати роль у слуховій трансдукції [20].

Нейронні, ембріональні або стовбурові клітини червоного кісткового мозку виживають у внутрішньому вусі ссавців після трансплантації. Пересажені нейронні стовбурові клітини можуть набути морфологічних фенотипів волоскових клітин, що було досягнуто у відповідних дослідженнях. Ембріональні стовбурово-похідні нейрони мають потенціал для формування синапсу зі слуховими волосковими клітинами і реіннервації слухового епітелію. При цьому коливання обсягу виживаності і відновлення функцій нейронів спірального ганглію, інтеграції в тканини господаря і потенційні імунні бар'єри мають першорядне значення [28, 58].

З різних ділянок сенсорного слухового епітелію в новонароджених мишей виявлено маркери для клітин-попередників нервових і слухових клітин [14].

Глухота зазвичай виникає в результаті ураження не тільки нейронів, але й сенсорних клітин слухової частини внутрішнього вуха. В даний час немає схем лікування для призупинення втрати слуху або його повернення. Основною метою при розробці терапії з приводу нейросенсорної приглухуватості є визначення стратегії для заміни втрачених волоскових клітин (кохлеоцитів). Раніше вважалось, що в завитці ссавців кохлеоцити утворюються тільки під час ембріогенезу. У хребетних внутрішнє вухо походить із слухової плакоти і проходить складну серію морфо-генетичних процесів при диференціюванні механосенсорного епітелію за участю волоскових клітин – механорецепторів слуху і рівноваги. Багато

досліджень було проведено для того, щоб продемонструвати наявність ендогенних клітин-попередників у дорослих. Розуміння механізмів, що лежать в основі утворення волоскових клітин, є важливою передумовою визначення терапевтичної стратегії для відновлення цих клітин у внутрішньому вусі дорослих [9, 44, 45, 59].

Показано, що попередники волоскових клітин існують у спіральному органі і вони могли би стати найліпшими для заміни втрачених сенсорних клітин за відповідних умов їх проліферації та диференціації у дорослих і відновлення слуху [7, 25]. Потенційні клітини, які могли би застосовуватись в регенеративній терапії органа слуху, виявлені у спіральному органі тварин. У людини такі зусилля на отримання терапевтичних кандидатів обмежені через етичні та технічні труднощі. Нещодавно ізольовано популяції слухових стовбурових клітин від людського плоду, які могли б стати ідеальною моделлю для вирішення деяких проблем майбутнього – очищення, розширення і технічного обслуговування кохлеарних стовбурових клітин [51].

Стовбурова терапія швидко розвивається і має потенціал застосування при ураженні внутрішнього вуха. Перші спроби вивчення можливості такої терапії при порушеннях внутрішнього вуха були проведені з використанням нейронних стовбурових клітин. Трансплантовані нейронні стовбурові клітини можуть вижити у внутрішньому вусі і диференціюватися у фенотипи клітин нейронних, гліальних та/або волоскових, що робить їх трансплантацію для відновлення клітин внутрішнього вуха потенційно ефективним методом лікування. Подальші дослідження показали, що ембріональні стовбурові клітини, клітини спинномозкового ганглію і клітинні лінії, отримані з внутрішнього вуха плоду, можуть бути використані для відновлення ураженого внутрішнього вуха. Стовбурові трансплантації також було запропоновано в якості стратегії для доставки ліків до внутрішнього вуха [39].

За останні кілька років було досягнуто значного прогресу в розумінні основних механізмів, що беруть участь у ураженні внутрішнього вуха, і були розроблені різні

потенційні терапевтичні підходи. Було показано, що волоскові клітини втрачаються через вплив шуму або токсичних препаратів. Цьому можна запобігти шляхом застосування антиоксидантів, інгібіторів внутрішньоклітинних шляхів стресу і нейротрофічних факторів / блокаторів нейротрансмісії. Крім того, є надія, що стовбурові клітини можуть бути використані для створення нових волоскових клітин. Однак, незважаючи на величезний прогрес, більшість концепцій, що обговорюються, все ще знаходяться в експериментальній стадії, і важко передбачити, який підхід буде, нарешті, введений у клінічну практику [6, 23].

У втраті сенсорних і нейрональних клітин з наступним погіршенням слуху, що відбувається під впливом різних генетичних мутацій та чинників навколишнього середовища, велику роль відіграють інгібітори клітинного циклу, які зумовлюють вступ клітин у мітоз і їхнє диференціювання [32].

Недавні дослідження показали, що після народження у мишей в завитці зберігаються клітини-попередники, які можуть утворювати сфери (отосфери) у культурі. Клітини отосфер здатні до самооновлення і диференціювання клітинних ліній внутрішнього вуха, тому їх можна пропонувати як перспективне джерело для регенерації волоскових клітин [43]. Клітини отосфер виявляють маркери стовбурових кохлеарних клітин. Ці сфери містять ABCG2-, Jagged1- і Notch1-позитивні клітини-попередники, які можуть проліферувати і створити нове покоління волоскових клітин – імунопозитивних для конкретних маркерів популяції волоскових клітин, у тому числі міозину VI, міозин VIIa, Math1 і здатних до поглинання FM1-43 [53].

У волоскових клітинах-попередниках, взятих із завитки у новонароджених щурів, раніше були виявлені маркери, як у клітинах зовнішньої спіральної борозни завитки в живому організмі, у тому числі ZO1, Islet1, Hes1, і Hes5. Коли ці клітини починають індукувати експресію Math1, вони виявляють потенціал до диференціювання у волоскові клітини. Волоскові клітини-попередники в сферах проявляють свою проліферативну активність і експресують тільки епітеліальні маркери. Якщо ці сфери

доповнити дисоційованими мезенхімальними клітинами, то можна отримати епітеліальні попередники клітин, здатні диференціюватися в клітини з експресією маркерів волоскових і підтримуючих клітин, які характерні для сенсорного епітелію внутрішнього вуха в природних умовах [65]. Виявлено, що потенціал самооновлення клітин отосфер зменшується з кожним новим поколінням у пробірці [34].

При культивуванні ізольованих із спірального органа мишей і морських свинок (віком 3 доби постнатального періоду) клітин у середовищі, доповненому епідермальним фактором росту, основним фактором росту фібробластів або трансформуючим фактором росту-альфа, визначено, що при додаванні трансформуючого фактора росту-альфа утворюється більше отосфер, ніж при введенні основного фактора росту фібробластів. В отосферах спостерігався рівномірний розподіл Sox2 і нести-позитивних клітин. При ідентифікації цих клітин виявилось, що вони належать до волоскових і підтримуючих клітин [41].

Відмічено, що Notch шлях має велике значення для підтримання градієнту підтримуючі / сенсорні клітини і запобігає надмірній регенерації останніх [13]. Цей комплекс мозаїки стовбурових клітин і клітин-попередників спірального органа потребує латерального гальмування опосередкованого шляху Notch сигналізації. Кілька досліджень було виконано по вивченню Notch сигналізації в попередній індукції prosensory домену, який локалізується по довжині каналу завитки і відповідає за диференціацію волоскових і підтримуючих клітин [38, 63]. Щоб дослідити роль Notch сигналізації в prosensory формування домену, був умовно інактивованій транскрипційний посередник канонічного шляху Notch сигналізації – RBPjk –у внутрішньому вусі і отримано результати, які доводять, що канонічна Notch сигналізація не є необхідною для prosensory специфікації завитки миші, якщо припустити, що інші сигнальні шляхи можуть бути більш специфічними для цього високоорганізованого органа чуття [3].

В той же час Yamamoto та співавтори [62] вважають, що порушення Jagged1-

опосередкованої Notch сигналізації призводить до втрати і ураження окремих сенсорних ділянок, що вказує на її роль у деяких моментах *prosenory* розвитку. Тим не менш, збереження окремих сенсорних ділянок дозволяє припустити, що невеликий рівень Notch діяльності зберігається у відсутності *Jagged1*. Ці результати вказують на важливу роль *Rbpj* і Notch сигналізації в розвитку, диференціації і виживанні клітин внутрішнього вуха.

Якщо блокувати Notch сигналізацію  $\gamma$ -секретазним інгібітором, збільшується перетворення стовбурових клітин внутрішнього вуха у волоскові клітини за механізмом, в якому бере участь bHLH транскрипційний фактор *Math1* (мишачий *Atoh1*), диференціація клітин нейронної лінії була збільшена завдяки експресії Notch внутрішньоклітинного домену. Перехід до нейронної лінії можна частково пояснити проліферацією клітин, які не пройшли сенсорно-клітинної диференціації у зв'язку з високим рівнем Notch сигналізації, із залученням регуляторного впливу *Ngn1*. Notch внутрішньоклітинний домен через вплив *Ngn1* опосередковано регулює *Sox2*, який експресується багатьма нейронними попередниками клітин [22].

Білки родини *Sonic hedgehog* мають важливе значення для розвитку каналу завитки. Визначено, що *Sonic hedgehog*-сигнальний шлях сприяє диференціації кохлеарних нейронних попередників. При додаванні *Sonic hedgehog* до кохлеарних нейронних попередників збільшується формування епітеліально-клітинних острівців з одночасною активацією експресії *Math1*, який є чинником транскрипції для початкової диференціації слухових волоскових клітин. Підвищена експресія *Math1* пізніше регулюється промотором діяльності *Vrn3.1* – іншим транскрипційним фактором, який керує подальшою диференціацією і виживанням слухових волоскових клітин. Тобто сигнальний шлях *Sonic hedgehog* відіграє важливу роль у диференціації слухових волоскових клітин через вплив на *Math1*–*Vrn3.1* сигнальні шляхи [21]. У процесі регуляції диференціювання волоскових клітин на *Math1* негативно впливає *Hes1*. Це показує, що баланс між *Math1* і такими негатив-

ними регуляторами, як *Hes1*, має вирішальне значення для утворення відповідної кількості волоскових клітин внутрішнього вуха [64, 66].

Є докази того, що при втраті волоскових клітин механізмом їх поновлення може стати трансдиференціація підтримуючих клітин на сенсорні. Цього можна досягти з місцевим використанням генної терапії *Math1*, і найбільш перспективними вважаються такі вірусні вектори, як аденовектор [47]. Стабільність таких процесів підтримують інгібітори клітинного циклу *Cip / Kip* і Notch сигналізація [27]. Тобто трансдиференціація ендогенних клітин, що залишилися неушкодженими у внутрішньому вусі, і стимуляція проліферативної діяльності можуть стати одним із шляхів боротьби з втратою слуху [15, 56, 60].

У внутрішньому вусі мишей віком 60 днів спостерігалася помірна експресія клітинами нестин-зеленого флуоресцентного білка, який ідентифікує стовбурові і клітини-попередники, у стромі ампульних крист і в мішечку, але не в рамках сенсорного епітелію. В спіральному органі була знайдена помірна експресія цього білка в декількох клітинах Дейтерса. Експресія нестин-зеленого білка у внутрішньому вусі мишей пов'язана з розвитком і регулюється, проте в дорослому внутрішньому вусі є окремі нестин-позитивні клітини, що підкреслює можливість потенціалу внутрішньої регенерації, хоча і меншою мірою, ніж у ранньому постнатальному періоді від 4-ї до 15-ї доби [33].

На 3-ю добу після народження у спіральному органі мишенят виявлено GFAP-GFP сигнал у всіх підтримуючих клітинах, в той час як нести-GFP був обмежений внутрішніми підтримуючими клітинами. На даному етапі GFAP і окремі стовбурові/прогеніторні маркери відображають перекриття експресії в підтримуючих клітинах. У дорослих експресія GFAP переміщується до зовнішніх волоскових клітин. Експресія *Sox2* і *Jagged1* зберігається в зрілих підтримуючих клітинах, в той час як *ABCG2* була знижена в них. На противагу експресія GFAP і *ABCG2* виросла у лімбальних клітинах внутрішньої борозни [56].

Визначено, що від 3-ї до 15-ї доби після народження у внутрішньому вусі мишей виявляються клітини, які експресують GFAP (гліальний фібрилярний кислий білок, що ідентифікує проміжні філаменти астроцитів і шваннівських клітин). Ці клітини локалізуються в спіральному органі відразу після народження в ділянці розташування фалангових і волоскових клітин, їхній градієнт знижується від основи до верхівки завитки, а після 15-ї доби цей маркер спостерігається лише у внутрішніх волоскових, фалангових і клітинах-стовпах. Як видно, ці клітини подібні до астроцитів або шваннівських клітин і необхідні для підтримки нормального розвитку та життєздатності не тільки нейронів, але й сенсорних клітин внутрішнього вуха [50].

Проведені також експерименти з отримання незрілих нейронних попередників з фетальної нервової системи мишей вирощенням їх культури до 14,5-ї доби і проаналізовані зміни в імуногістохімічних особливостях клітин культури після дифе-

ренціювання. Виявлено, що у волоскових клітинах імунофенотипово ідентифікуються епітопи з маркерними білками міозину VIIa і Vm-3c, а в підтримуючих клітинах – маркер пан-цитокератин. Таким чином, у нейронних попередників є потенціал, щоб диференціюватися у волоскові і підтримуючі клітини внутрішнього вуха [31].

Перспективними джерелами для ауто-трансплантації з метою відновлення слуху вважаються також епендимні, індуковані плюрипотентні стовбурові і нюхові нейроепітеліальні клітини, які не зазнають імуноного відторгнення [61].

Щоб використати весь потенціал стовбурових клітин для регенерації волоскових клітин, фундаментальна наука та клінічна медицина повинні працювати разом, що також сприятиме прискоренню переходу від експерименту до ліжка хворого по з'ясуванню механізмів розвитку волоскових клітин внутрішнього вуха з акцентом на ролі мікроРНК і адаптації цих знань безпечно і ефективно для стовбуровоклітинної технології [4, 26, 46].

1. Луцик О.Д. Гістологія людини / [підр. для студ. вищих мед. навч. закл. III-IV рівнів акредитації] / Луцик О.Д., Ф.Й. Іванова, К.С. Кабак, Ю.Б. Чайковський. – Київ: Книга плюс. – 2010. – 584 с.
2. Anderson M. Structure and locomotion of adult in vitro regenerated spiral ganglion growth cones – a study using video microscopy and SEM / M. Anderson, M. Boström, K. Pfaller [et al.] // *Hear Res.* – 2006. – Vol. 215(1–2). – P. 97–107.
3. Basch M.L. Canonical Notch signaling is not necessary for prosensory induction in the mouse cochlea: insights from a conditional mutant of RBPjkappa / M.L. Basch, T. Ohya, N. Segil [et al.] // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31(22). – P. 8046–8058.
4. Beisel K. Regenerating cochlear hair cells: quo vadis stem cell / K. Beisel, L. Hansen, G. Soukup [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2008. – Vol. 333(3). – P. 373–379.
5. Bermingham-McDonogh O. Regulated reprogramming in the regeneration of sensory receptor cells / O. Bermingham-McDonogh, T.A. Reh // *Neuron.* – 2011. – Vol. 71(3). – P.389–405.
6. Bodmer D. Protection, regeneration and replacement of hair cells in the cochlea: implications for the future treatment of sensorineural hearing loss / D. Bodmer // *Swiss. Med. Wkly.* – 2008. – Vol. 138(47–48). – P. 708–712.
7. Bodson M. Hair cell progenitors: identification and regulatory genes / M. Bodson, I. Breuskin, P. Lefebvre [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2010. – Vol. 130(3). – P. 312–317.
8. Boström M. Neural network and "ganglion" formations in vitro: a video microscopy and scanning electron microscopy study on adult cultured spiral ganglion cells // M. Boström, M. Anderson, D. Lindholm [et al.] // *J. Otol. Neurotol.* – 2007. – Vol. 28 (8). – P. 1109–1119.
9. Breuskin I. Sox10 promotes the survival of cochlear progenitors during the establishment of the organ of Corti / I. Breuskin, M. Bodson, N. Thelen [et al.] // *Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 335(2). – P. 327–339.
10. Breuskin I. Strategies to regenerate hair cells: identification of progenitors and critical genes / I. Breuskin, M. Bodson, N. Thelen [et al.] // *Hear Res.* – 2008. – Vol. 236(1–2). – P. 1–10.

11. Brigande J.V. Quo vadis, hair cell regeneration? / J.V. Brigande, S. Heller // *Nat. Neurosci.* – 2009. – Vol. 12(6). – P. 679–685.
12. Chen J. Decreased level of cyclin A2 in rat cochlea development and cochlear stem cell differentiation / J. Chen, F. Wang, X. Gao [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2009. – Vol. 453(3). – P. 166–169.
13. Daudet N. Notch regulation of progenitor cell behavior in quiescent and regenerating auditory epithelium of mature birds / N. Daudet, R. Gibson, J. Shang [et al.] // *Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 326(1). – P. 86–100.
14. Diensthuber M. Characterization of stem cells derived from the neonatal auditory sensory epithelium // M. Diensthuber, S. Heller // *HNO.* – 2010. – Vol. 58(11). – P. 1056 – 1066.
15. Edge A.S. Hair cell regeneration / A.S. Edge, Z.Y. Chen // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 18(4). – P. 377–382.
16. El-Amraoui A. Stem cell therapy in the inner ear: recent achievements and prospects / A. El-Amraoui, C. Petit // *Med. Sci. (Paris).* – 2010. – Vol. 26(11). – P. 981–985.
17. de Felipe M.M. Cell- and gene-therapy approaches to inner ear repair / M.M. de Felipe, A.F. Feijoo Redondo, J. García-Sancho [et al.] // *Histol Histopathol.* – 2011. – Vol. 26(7). – P. 923–940.
18. Groves A.K. The challenge of hair cell regeneration / A.K. Groves // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* – 2010. – Vol. 235(4). – P. 434–446.
19. Gunewardene N. The convergence of cochlear implantation with induced pluripotent stem cell therapy / N. Gunewardene, M. Dottori, B.A. Nayagam // *Stem Cell Rev.* – 2012. – Vol. 8(3). – P. 741–754.
20. Han Y. The expression of NOB1 in spiral ganglion cells of guinea pig / Y. Han, L. Hong, C. Zhong [et al.] // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* – 2009. – Vol. 73(2). – P.315-319.
21. Hu X. Sonic hedgehog (SHH) promotes the differentiation of mouse cochlear neural progenitors via the Math1–Brn3.1 signaling pathway in vitro / X. Hu, J. Huang, L. Feng [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2010. – Vol. 88(5). – P. 927–935.
22. Jeon S.J. Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells / S.J. Jeon, M. Fujioka, S.C. Kim [et al.] // *J. Neurosci.* – 2011. – Vol. 31(23). – P. 8351–8358.
23. Jero J. Future therapeutic options for inner ear diseases / J. Jero, A. Aarnisalo // *Duodecim.* – 2011. – Vol. 127(8). – P. 848–853.
24. Jongkamonwiwat N. Stem cell based therapy in the inner ear: appropriate donor cell types and routes for transplantation / N. Jongkamonwiwat, A. Zine, M.N. Rivolta // *Curr. Drug Targets.* – 2010. – Vol. 11(7). – P. 888–897.
25. Kelley M.W. Cellular commitment and differentiation in the organ of Corti / M.W. Kelley // *Int. J. Dev. Biol.* – 2007. – Vol. 51(6-7). – P. 571–583.
26. Kopecky B. Regeneration of Hair Cells: Making Sense of All the Noise / B. Kopecky, B. Fritzsche // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2011. – Vol. 4(6). – P. 848–879.
27. Kwan T. Development and regeneration of the inner ear / T. Kwan, P.M. White, N. Segil // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – Vol. 1170. – P. 28–33.
28. Lefèbvre P. Regeneration of hair cells and auditory neurons in the ear / P. Lefèbvre, M.B. Malgrange, M.G. Moonen // *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* – 2008. – Vol. 163(7-9). – P. 391–397.
29. Li H. Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear / H. Li, H. Liu, S. Heller // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9(10). – P. 1293–1299.
30. Lin J. Directed differentiation of mouse cochlear neural progenitors in vitro / J. Lin, L. Feng, Y. Hamajima [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 296(3). – P. 441–452.
31. Liu X.W. Primary culture of neurospheres obtained from fetal mouse central nervous system and generation of inner ear hair cell immunophenotypes in vitro / X.W. Liu, J.W. Sun // *J. Laryngol. Otol.* – 2011. – Vol. 125(7). – P. 686–691.
32. Liu Z. Cell cycle regulation in hair cell development and regeneration in the mouse cochlea / Z. Liu, J. Zuo // *Cell Cycle.* – 2008. – Vol. 7(14). – P. 2129–2133.
33. Lopez I.A. Stem/progenitor cells in the postnatal inner ear of the GFP-nestin transgenic mouse / I.A. Lopez, P.M. Zhao, M. Yamaguchi [et al.] // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2004. – Vol. 22(4). – P. 205–213.
34. Lou X.X. Otospheres derived from neonatal mouse cochleae retain the progenitor cell phenotype after ex vivo expansions / X.X. Lou, T. Nakagawa, H. Ohnishi [et al.] // *Доступ до електронного ресурсу: Neurosci. Lett.* – 2012. – Dec 10. pii: S0304–3940(12)01518–2.
35. Malgrange B. Differentiation, protection and regeneration of hair cells and auditory neurons in mammals / B. Malgrange // *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* – 2005. – Vol. 160(5-6). – P. 276–286.
36. Martinez-Monedero R. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons / R. Martinez-Monedero, E. Yi, K. Oshima [et al.] // *Dev. Neurobiol.* – 2008. – Vol. 68(5). – P. 669–684.
37. Martinez-Monedero R. Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells / R. Martinez-Monedero, A.S. Edge // *Int. J. Dev. Biol.* – 2007. – Vol. 51(6–7). – P. 655–661.
38. Murata J. Notch–Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27Kip1 / J. Murata, T. Ohtsuka, A. Tokunaga [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2009. – Vol. 87(16). – P. 3521–3534.



39. Nakagawa T. Cell therapy for inner ear diseases / T. Nakagawa, J. Ito // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11(9). – P. 1203–1207.
40. Nishimura K. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea / K. Nishimura, T. Nakagawa, K. Ono [et al.] // *Neuroreport.* – 2009. – Vol. 20(14). – P. 1250–1254.
41. Oiticica J. Retention of progenitor cell phenotype in otospheres from guinea pig and mouse cochlea / J. Oiticica, L.C. Barboza-Junior, A.C. Batissoco [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2010. – Vol. 8. – P. 119.
42. Oshima K. Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear / K. Oshima, C.M. Grimm, C.E. Corrales [et al.] // *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* – 2007. – Vol. 8(1). – P. 18–31.
43. Oshima K. Isolation of sphere-forming stem cells from the mouse inner ear. K. Oshima, P. Senn, S. Heller // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 493. – P. 141–162.
44. Oshima K. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells / K. Oshima, K. Shin K, M. Diensthuber [et al.] // *Cell.* – 2010. – Vol. 141(4). – P. 704–716.
45. Ozeki H. Development and regeneration of hair cells / H. Ozeki, K. Oshima, P. Senn [et al.] // *Acta Otolaryngol. Suppl.* – 2007. – Vol. (559). P. 38–44.
46. Pauley S. Stem cells and molecular strategies to restore hearing / S. Pauley, B. Kopecky, K. Beisel [et al.] // *Panminerva Med.* – 2008. – Vol. 50(1). – P. 41–53.
47. Pfannenstiel S. Protection and regeneration of sensory epithelia of the inner ear / S. Pfannenstiel, M.Praetorius // *HNO.* – 2008. – Vol. 56(1). P. 13–20.
48. Rak K. Isolation and characterization of neural stem cells from the neonatal rat cochlear nucleus / K. Rak, N.V. Wasielewski, A.Radeloff [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2011. – Vol. 343(3). – P. 499–508.
49. Rask-Andersen H. Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion / H. Rask-Andersen, M. Boström, B. Gerdin [et al.] // *Hear Res.* – 2005. – Vol. 203(1–2). – P. 180–191.
50. Rio C. Glial fibrillary acidic protein expression and promoter activity in the inner ear of developing and adult mice / C. Rio, P. Dikkes, M.C. Liberman [et al.] // *J. Comp. Neurol.* – 2002. – Vol. 442(2). – P. 156–162.
51. Rivolta M.N. Stem cells and cell lines from the human auditory organ: applications, hurdles and bottlenecks in the development of regenerative therapies for deafness / M.N. Rivolta // *Drug Discov. Today.* – 2010. – Vol. 15(7-8). – P. 283–286.
52. Sanchez-Calderon H. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear / H. Sanchez-Calderon H., M. Milo, Y.Leon [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2007. – Vol. 51(6–7). – P. 557–570.
53. Savary E. Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential / E. Savary, J.C. Sabourin, J.Santo [et al.] // *Mech. Dev.* – 2008. – Vol. 125(8). – P. 674–686.
54. Senn P. Stem-cell-based approaches for treating inner ear diseases / P. Senn, S. Heller // *HNO.* – 2008. – Vol. 56(1). – P. 21–26.
55. Shah S.M. Expression of Wnt receptors in adult spiral ganglion neurons: frizzled 9 localization at growth cones of regenerating neurites / S.M. Shah, Y.J. Kang, B.L. Christensen [et al.] // *Neuroscience.* – 2009. – Vol. 164(2). – P. 478–487.
56. Smeti I. Expression of candidate markers for stem/progenitor cells in the inner ears of developing and adult GFAP and nestin promoter-GFP transgenic mice / I. Smeti, E. Savary, V.Capelle [et al.] // *Gene Expr. Patterns.* – 2011. – Vol. 11(1–2). – P. 22–32.
57. Sobkowicz H.M. Tissue culture of the organ of Corti / H.M. Sobkowicz, J.M. Loftus, S.M. Slapnick // *Acta Otolaryngol. Suppl.* – 1993. – Vol. 502. – P. 3–36.
58. Vlastarakos P.V. Sensory cell regeneration and stem cells: what we have already achieved in the management of deafness / P.V. Vlastarakos, T.P. Nikolopoulos, E. Tavoulari [et al.] // *Otol. Neurotol.* – 2008. – Vol. 29(6). – P. 758–768.
59. Warchol M.E. Sensory regeneration in the vertebrate inner ear: differences at the levels of cells and species / M.E. Warchol // *Hear Res.* – 2011. – Vol. 273(1–2). – P. 72–79.
60. Watanabe R. Nestin-expressing cells in the developing, mature and noise-exposed cochlear epithelium / R. Watanabe, M.H. Morell, J.M. Miller [et al.] // *Mol. Cell Neurosci.* – 2012. – Vol. 49(2). – P. 104–109.
61. Wei D. Regeneration of the mammalian inner ear sensory epithelium / D. Wei, E.N. Yamoah // *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2009. – Vol. 17(5). – P. 373–380.
62. Yamamoto N. Rbpj regulates development of prosensory cells in the mammalian inner ear / N. Yamamoto, W. Chang, M.W. Kelley // *Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 353(2). – P. 367–379.
63. Zine A. Molecular mechanisms that regulate auditory hair-cell differentiation in the mammalian cochlea / A. Zine // *Mol. Neurobiol.* – 2003. – Vol. 27(2). – P. 223–238.
64. Zine A. Notch/Notch ligands and Math1 expression patterns in the organ of Corti of wild-type

- and Hes1 and Hes5 mutant mice / A. Zine, F. de Ribaupierre // *Hear Res.* – 2002. – Vol. 170(1–2). – P. 22–31.
65. Zhai S. Isolation and culture of hair cell progenitors from postnatal rat cochleae / S. Zhai, L. Shi, B.E. Wang [et al.] // *J. Neurobiol.* – 2005. – Vol. 65(3). – P. 282–293.
66. Zheng J.L. Hes1 is a negative regulator of inner ear hair cell differentiation / J.L. Zheng, J. Shou, F. Guillemot [et al.] // *Development.* – 2000. – Vol. 127(21). – P. 4551–4560.
67. Zhong C. A comparison of the proliferative capacity and ultrastructure of proliferative cells from the cochleae of newborn rats of different ages / C. Zhong, Y. Han, J. Qiu [et al.] // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* – 2010. – Vol. 74(2). – P. 192–197.

Надійшла до редакції 08.02.13.

© Ю.Б. Чайковський, О.І. Дельцова, С.Б. Геращенко, 2013