

Оригінальна стаття = Original article = Оригінальная статьяDOI: <https://doi.org/10.25305/unj.115236>**Вплив ембріональних нейрональних клітин на структури внутрішнього вуха тварин при експериментальному ототоксикозі (морфологічна оцінка)**Сапіжак І.І.¹, Тімен Г.Е.¹, Семенова В.М.², Стайно Л.П.²¹ Відділ ЛОР-патології дитячого віку, Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України, Київ, Україна² Лабораторія культивування тканин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, УкраїнаНадійшла до редакції 31.10.2017.
Прийнята до публікації 15.11.17.**Адреса для листування:**

Сапіжак Ірина Ігорівна, Відділ ЛОР-патології дитячого віку, Інститут отоларингології, вул. Зоологічна, 3, Київ, Україна, 03680, e-mail: irina.sapizhak8888@ukr.net

Мета. Оцінити ефективність суспензії ембріональних нейроклітин (ЕН) при експериментальному ототоксикозі у гвінейських свинків.**Матеріали і методи.** Дослідження виконане на 40 статевозрілих гвінейських свинків. Сенсоневральну приглухуватість моделювали шляхом введення аміноглікозидного антибіотика гентаміцину сульфату в дозі 100 мг/кг протягом 14 діб.

Суспензію нейральних стовбурових клітин вводили в об'ємі 2 млн. клітин в 0,5 мл – інтратимпанально та в об'ємі 2 млн. клітин в 0,5 мл – субоципально у 1-шу та на 15-ту добу експерименту.

Результати. Застосування методики відбору та приготування суспензії ЕН дозволило забезпечити їх потрібну кількість для подальшої трансплантації *in vivo* з незмінними для цих клітин характеристиками.

Ототоксикоз, модельований шляхом 14-денного внутрішньом'язового введення розчину гентаміцину в дозі 100мг/кг маси тіла, супроводжувалася вираженою загальною інтоксикацією: погіршенням апетиту, схудненням, частим сечовипусканням, випадінням шерсті. Ін'єкція ЕН в першу добу, до і після введення аміноглікозиду, повністю, на 15-ту добу – частково нівелювала діагностовані симптоми.

При 14-добовому введенні гентаміцину виникали зміни гістоархітектоніки внутрішнього вуха, порушення мікроциркуляції в судинній смужці, що підтверджено даними морфологічного дослідження.

Введення ЕН в першу добу після моделювання ототоксикозу попереджало його прогресування при 14-денних ін'єкціях гентаміцину, що підтверджено даними функціональних та морфологічних досліджень.

Висновки. Отримані дані свідчать про доцільність обраного напрямку вивчення можливості використання ЕН для попередження та лікування ототоксичного впливу аміноглікозидів на внутрішнє вухо експериментальних тварин.**Ключові слова:** сенсоневральна приглухуватість; аміноглікозидний антибіотик; гентаміцин; нейральні клітини; морфологічні зміни; експеримент.

Український нейрохірургічний журнал. 2017;(4):55-9.

The neuronal stem cells effect on inner ear structure in experimental gentamicin ototoxicityIrina I. Sapizhak¹, Hryhoriy E. Timen¹, Vira M. Semenova², Lyudmyla P. Stayno²¹ Department of ENT-childhood diseases, Kolomyichenko Otolaryngology Institute, Kyiv, Ukraine² Tissue Culture Lab, Romodanov Neurosurgery Institute of NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Received, October 31, 2017.

Accepted, November 15, 2017.

Address for correspondence:

Irina I. Sapizhak, Department of ENT-childhood diseases, Kolomyichenko Otolaryngology Institute, 3 Zoologichna st., Kyiv, Ukraine, 03680, e-mail: irina.sapizhak8888@ukr.net

Objective. To examine the effectiveness of suspensions of embryonic stem cells in experimentally induced aminoglycoside ototoxicity in *Guinea pigs*.**Materials and methods.** The study involved 35 adult *Guinea pigs*. The hearing loss was caused by administration of gentamicin 100 mg per KBW. Intratympanal suspension of 2 million neuronal stem cells in 0.5 mg and sub occipital suspension of 2 million cells in 0.5 mg were administered on the 1st and 15th day.**Results.** The methodology of using and preparation of the suspension from neuronal stem cells enables to provide their necessary number for transplantation *in vivo*, remaining the cell characteristics.Aminoglycoside ototoxicity caused by a 14-day administration of gentamicin to *Guinea pigs* in a dose of 100 mg/KBW was accompanied by general intoxication: reduced appetite, weight loss, frequent urination, hair falling out. The administration of neuronal stem cells on the first day, before and after aminoglycoside administration, completely, and on 15 partially neutralizes the symptoms.Fourteen-day administration of gentamicin to *Guinea pigs* causes a violation of the architectonics and morphology of inner ear microcirculation in psalterial cords.

NSC administration on the first day of simulated aminoglycoside ototoxicity prevented its development if 14-day injections of gentamycin, that is confirmed by ABR and morphologically.

Conclusions. The conducted experiments show the feasibility of the chosen direction to explore the potential use of neuronal stem cells for the prevention of aminoglycoside ototoxic effects in *Guinea pigs*.

Keywords: *sensorineural hearing loss; aminoglycoside antibiotic; Guinea pigs; neuronal stem cells; morphological changes.*

Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(4):55-9.

Влияние эмбриональных нейрональных клеток на структуры внутреннего уха животных при экспериментальном ототоксикозе (морфологическая оценка)

Сапижак И.И.¹, Тимен Г.Е.¹, Семенова В.М.², Стайно Л.П.²

¹ Отдел ЛОР-патологии детского возраста, Институт отоларингологии им. проф. А.С. Коломийченко НАМН Украины, Киев, Украина

² Лаборатория культивирования тканей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 31.10.2017.
Принята к публикации 15.11.2017.

Адрес для переписки:

Сапижак Ирина Игоревна, Отдел ЛОР-патологии детского возраста, Институт отоларингологии, ул. Зоологическая, 3, Киев, Украина, 03680, e-mail: irina.sapizhak8888@ukr.net

Цель. Изучить эффективность суспензии эмбриональных нейроклеток (ЭН) при экспериментальном ототоксикозе у гвинейских свинок.

Материалы и методы. Исследования проведено на 40 половозрелых гвинейских свинок. Сенсоневральную тугоухость моделировали путем введения аминогликозидного антибиотика гентамицина сульфата в дозе 100 мг /кг на протяжении 14 сут. Суспензию ЭН вводили в объеме 2 млн. клеток в 0,5 мл – интратимпанально и 2 млн. клеток в 0,5 мл – внутримышечно в 1-е и на 15-е сутки эксперимента.

Результаты. Исползованная методика отбора и приготовления суспензии ЭН позволило обеспечить их нужное количество для дальнейшей трансплантации *in vivo*, с неизменными для этих клеток характеристиками.

Ототоксикоз, моделированный путем 14-дневного введения гентамицина в дозе 100 мг/кг массы тела, сопровождался выраженной общей интоксикацией: ухудшением аппетита, похудением, частым мочеиспусканием, выпадением шерсти. Инъекция суспензии НЭ в первые сутки, до и после введения аминогликозида, полностью, а на 15-е сутки – частично нивелировала клинические симптомы.

При 14-дневном введении гентамицина возникало нарушение архитектоники и морфологии внутреннего уха, микроциркуляции в сосудистой полоске, что подтверждено данными морфологического исследования.

Введение ЭН в первые сутки после моделирования ототоксикоза предупреждало его прогрессирование при 14-дневных инъекциях гентамицина, что подтверждено данными функциональных и морфологических исследований.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности выбранного направления изучения возможности использования ЭН для предупреждения и лечения ототоксического воздействия аминогликозидов на внутреннее ухо в эксперименте.

Ключевые слова: *сенсоневральная тугоухость; аминогликозидный антибиотик; гентамицин; нейральные клетки; морфологические изменения; эксперимент.*

Украинский нейрохирургический журнал. 2017;(4):55-9.

Вступ. За даними ВОЗ, у 5-8 % населення Землі виявляють зниження гостроти слуху, у 65-93% з них – діагностують сенсоневральну приглухуватість. В Україні більш ніж у 270 000 пацієнтів діагностують різні форми сенсоневральної приглухуватості (0,6 % від загальної кількості населення), з них майже у 100 000 – глухоту. Поширеними ушкоджуючими чинниками, що часто зумовлюють загибель волоскових клітин (ВК) внутрішнього вуха, вважають, генетичні в тому числі, спадкові, аутоімунні процеси, бактеріальну та вірусну інфекцію, ототоксичні лікарські засоби тощо.

Недостатня ефективність медикаментозного лікування захворювання змушує шукати нові шляхи вирішення проблеми [1]. Застосування поліпотентних стовбурових клітин (СК) має суттєвий потенціал в лікуванні сенсоневрального ураження з формуванням приглухуватості та глухоти [1-5].

Перші спроби вивчення можливості застосування СК в терапії функціональних порушень внутрішнього вуха здійснені Т. Nakagawa (2005). Доведено, що трансплантовані СК персистують і зберігають життєздатність у внутрішньому вусі і здатні диферен-

ціюватися у фенотипи нейрональних, гліальних та волоскових клітин.

Магомедов М.М. (1997), одним з перших застосував при порушенні слуху у людей ембріональну нервову тканину у вигляді гомогенату ембріональних клітин. Спостереження проведені у 14 хворих з нейросенсорною приглухуватістю II-III-ступеня за тривалості захворювання від 6 міс до 3 років. Після одноразового застосування відзначали покращення слуху за даними тональної порогової аудіометрії в середньому на 10 дБ та аудіометрії – в розширеному діапазоні частот – на 5 дБ (Магомедов ММ. *Применение фетальных тканей в терапии хронической нейросенсорной тугоухости. В книзі: Матеріали міжнародної науково-практичної конференції, присвяченій 75-річчю кафедри та клініки отоларингології Дніпропетровської медичної академії; Дніпропетровськ, Україна; 1997. С. 140-41).*

Мета дослідження. Оцінити ефективність суспензії ЕН при ототоксикозі в експерименті.

Матеріали і методи дослідження. Для вивчення ефективності застосування ЕН при ототоксикозі проведені експериментальні дослідження на 35 гвінейських свинках масою тіла 500-900 г без соматичних захворювань та ознак запального процесу у зовнішньому та середньому вусі (за даними мікроскопії), а також за збереженого рефлексу Preyer. Залежно від способу та строків введення ЕН тварини розподілені на 6 груп (*див. таблицю*).

В усіх тварин на початку експерименту, перед введенням ЕН та по закінченні дослідження проводили обстеження слуху шляхом реєстрації коротколатентних слухових викликаних потенціалів (КСВП) (Тімен Г.Е., Цимбалюк В.І., Белоусова А.О., Вінничук П.В., Сапіжак І.І. *Вивчення впливу нейрональних стовбурових клітин на морфо-функціональний стан внутрішнього вуха морських свинок після експериментально викликаного аміноглікозидного ототоксикозу. В Книзі: Матеріали щорічної традиційної осінньої конференції Українського наукового медичного товариства лікарів-оториноларингологів «Сучасні методи діагностики та лікування хронічних запальних захворювань верхніх дихальних шляхів та вуха»; 12-13 жовтня 2015; Дніпропетровськ, Україна. 2015. С. 137).* Під час першого дослідження КСВП (інтактні тварини, а також група II) слух відповідав нормі (5-25 dB HL). Після 14-денного введення розчину гентаміцину сульфату 100 мг/кг маси тіла рівень звукового тиску підвищився до 65- 85 dB HL, що свідчило про ототоксичний вплив гентаміцину. Проте, після введення суспензії ЕН, як інтратимпанально, так і субокципітально, спостерігали зниження рівня звукового тиску до 25 - 40 dB HL, що свідчило про її лікувальну дію (*рис. 1-3*).

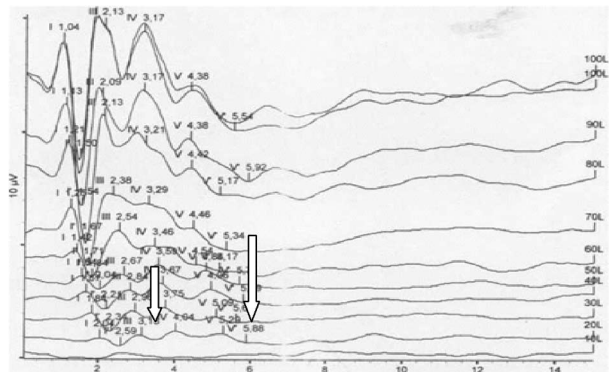


Рис. 1. Графічне зображення кривої КСВП у тварин на початку експерименту. III та V піки достовірно реєструються 15 dB HL, що відповідає нормі.

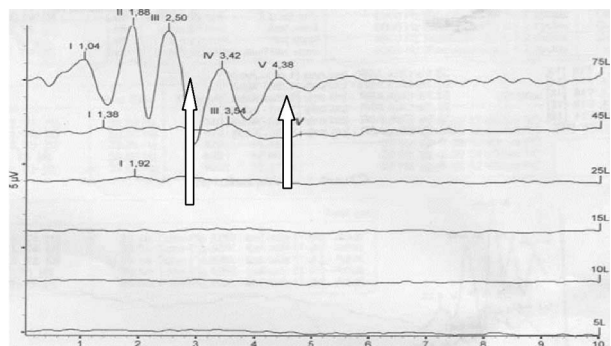


Рис. 2. Криві реєстрації КСВП у тварин I групи на 14-ту добу експерименту після введення гентаміцину (пояснення в тексті).

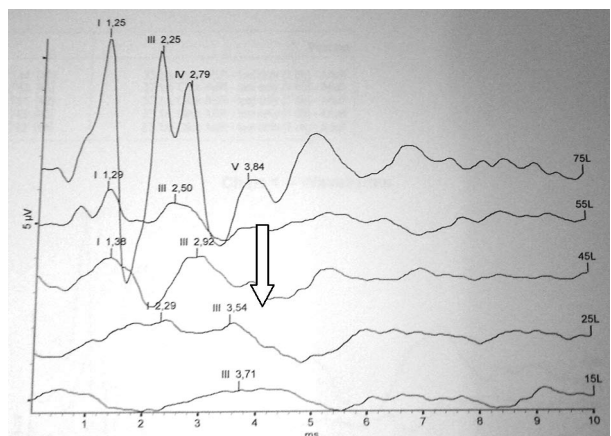


Рис. 3. Криві реєстрації КСВП у тварин III – VI групи. Введення ЕН на 15-ту добу експерименту (пояснення в тексті).

Розподіл експериментальних тварин на групи залежно від способу та строків введення ЕН

Група	Умови експерименту	Кількість тварин
I	14-разове введення гентаміцину (100 мг/кг)	5
II	14-разове введення ізотонічного розчину NaCl внутрішньом'язово	5
III	14-разове введення гентаміцину+ ЕН інтратимпанально у 1-шу добу	5
IV	14-разове введення гентаміцину + ЕН інтратимпанально на 15-ту добу	5
V	14-разове введення гентаміцину + ЕН субокципітально у 1-шу добу	5
VI	14-разове введення гентаміцину + ЕН субокципітально на 15-ту добу	5

Суспензію НЕ готували в лабораторії культивування клітин Інституту нейрохірургії.

Перед вилученням ембріонів (14 діб гестації) вагітну самку вводили в наркоз ефіром, обробляли шкіру живота 5% спиртовим розчином йоду та 70% розчином спирту. Тварину фіксували на пробковій дошці, робили хірургічними ножицями круговий розріз шкіри під передніми лапками і на бічних відділах живота, шкіру відтягували донизу, оголюючи передню черевну стінку. За допомогою ножиць та пінцета широко розкривали черевну порожнину, відсікали роги матки і переносили їх в стерильний ізотонічний розчин в чашку Петрі. В стерильному боксі вилучали ембріони з рогів матки і переносили їх в свіжу порцію ізотонічного розчину в чашку Петрі. Структури мозку препарували під біокулярною лупою з використанням мікроінструментів в сольовому розчині PBS (без іонів Ca та Mg, Sigma). Мозок вилучали з черепа ембріона, за допомогою тонких пінцетів і скальпелів ретельно видаляли мозкові оболонки, потім видаляли кору великого мозку. Фрагменти кори інкубували в розчині PBS протягом 5-7 при кімнатній температурі, подрібнювали мікроножицями та дисоціювали шляхом багаторазового піпетування скляними піпетками Пастера з оплавленими кінчиками для запобігання пошкодження клітин. Отриману суспензію клітин центрифугували при 1000 об.хв, надосад зливали, а осад клітин ресуспендували в поживному середовищі Ігла (Sigma) [6].

Ступінь дисоціації і стан клітин контролювали під мікроскопом (рис.4-6).

Для визначення концентрації клітин та обчислення кількості живих клітин використовували камеру Горяєва і забарвлення 0,2% розчином трипанового синього (Sigma). Суспензію ретельно перемішували, 0,5 мл розводили в 5 раз 0,2% розчином трипанового синього, інкубували при температурі 37° С протягом 3-5 хв. Суспензію знов ретельно перемішували та вводили в камеру Горяєва. Визначення життєздатності дисоційованих клітин ґрунтується на здатності трипанового синього забарвлювати тільки загиблі клітини. В подальшому клітини підраховували проводили за формулою:

$$X=N \times S \times 10000,$$

де X – кількість клітин в 1 см³ суспензії;

N – кількість клітин в 25 квадратах;

S – кратність розведення суспензії фарбою;

10 000 – постійна величина.

Вміст живих клітин (незабарвлених) підраховували за формулою:

$$\frac{\text{загальна кількість клітин} - \text{кількість мертвих клітин}}{\text{загальна кількість клітин}} \times 100$$

Вміст живих клітин в суспензії становив 60 - 73%.

Отриману суспензію клітин тримали в CO₂-інкубаторі (Nuve, Туреччина), при постійній температурі 37°C, 5% CO₂ та 95% вологості до моменту трансплантації.

Тварин виводили з експерименту під наркозом тіопентал-натрієм у дозі 20 мг/кг. Після декапітації гільйотиною виділяли блоки скроневих кісток, фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну для подальшого морфологічного дослідження.

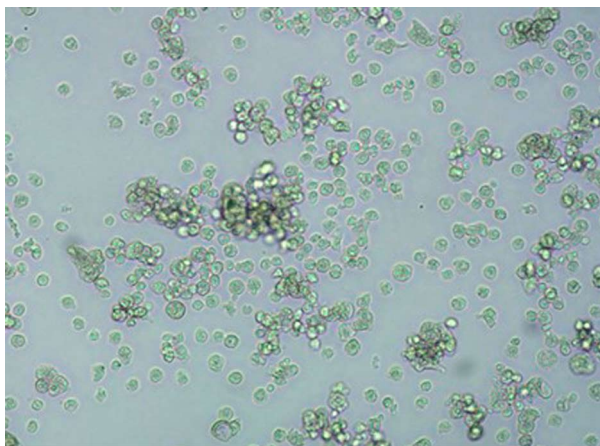


Рис. 4. Дисоційовані клітини кори великого мозку ембріонів 14 діб гестації. (пояснення в тексті). Жива культура. 36.X200.

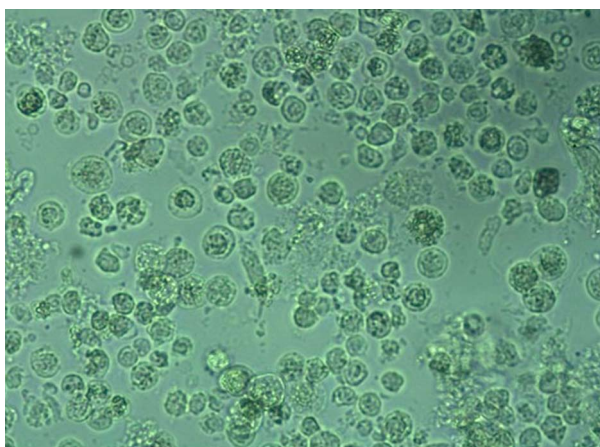


Рис. 5. Дисоційовані клітини кори великого мозку ембріонів. (пояснення в тексті). Жива культура. 36.X400.

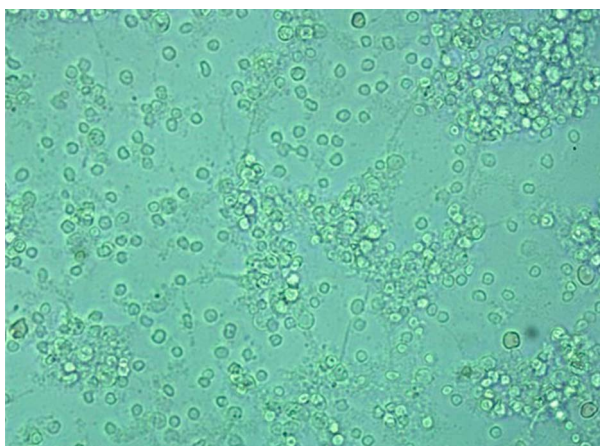


Рис. 6. Жива культура клітин кори великого мозку ембріонів. 24 год культивування. 36.X200.

Досліди проводили відповідно з «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими III Національним конгресом з біоетики і узгодженими з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей».

Результати та їх обговорення. Патологічний процес приглухуватості моделювали з використанням ототоксичного антибіотика аміноглікозидної групи гентаміцину сульфату, який вводили з розрахунку 100 мг/кг внутрішньом'язово щоденно протягом 14 діб.

На початку експерименту всі тварини були рухливі, активні, мали блискучу, гладку шерсть. Ознак соматичних та отомікроскопічних порушень не було. Рефлекс Преуег позитивний.

У тварин I групи, починаючи з 8-9-ї доби дослідження, з'являлися незначні прояви інтоксикації, що проявлялося в'ялістю, зниженням рухливості, частим діурезом, рефлексом Преуег слабопозитивний.

У тварин II групи на 14-ту добу змін поведінки та патологічних розладів не було. Тварин виводили з експерименту через 14 діб від початку введення розчину натрію хлориду та гентаміцину.

У тварин III групи в 1-шу добу експерименту в стерильних умовах під бінокулярною лупою при 4-кратному збільшенні інтратимпанально шляхом пункції барабанної перетинки за допомогою вушної воронки та інсулінового шприца вводили суспензію ЕН 2 млн.клітин (0,5 мл) в праву та ліву барабанні порожнини. У подальшому вводили розчин гентаміцину сульфату внутрішньом'язово з розрахунку 100 мг/кг протягом 14 діб. Змін загального стану тварин протягом експерименту не було, вони були активні, рефлекс Преуег позитивний.

Після введення ЕН на 15-ту добу (IV група) спостерігали поступове покращення загального стану тварин протягом 14 діб до моменту їх виведення з експерименту. Відзначали зменшення тяжкості ототоксикозу, тварини ставали рухливіші, зменшилось випадіння шерсті, покращився апетит, рефлекс Преуег залишався слабопозитивним.

Тваринам V групи в 1-шу добу введення розчину гентаміцину сульфату з субокципітально вводили суспензію ЕН 2млн. клітин (0,5 мл) під наркозом ксилазином в дозі 0,02 мг/кг маси тіла. Попередньо у тварин ретельно голили шийно-потиличну ділянку, місце пункції обробляли 96% розчином спирту тричі. В місці пункції (середина лінії, проведеної між великим потиличним горбом та остистим відростком II шийного хребця) проводили місцеву анестезію шкіри 0,2% розчином лідокаїну. Встановлювали голку перпендикулярно шкірі та проколювали м'які тканини до потиличної кістки. Виймали голку на 1-2 мм, під гострим кутом проколювали мембрану та тверду оболонку головного мозку, виймали мандрен, отримували спинномозкову рідину, після чого вводили ЕН. У подальшому протягом 14 діб щоденно внутрішньом'язово вводили розчин гентаміцину сульфату з розрахунку 100 мг/кг маси тіла. Протягом періоду експерименту померла одна тварина, решта були в задовільному стані, активні.

Тваринам VI групи вводили розчин гентаміцину сульфату 100 мг/кг внутрішньом'язово протягом 14 діб. У 4 тварин на 12-ту добу з'явилися ознаки загаль-

ної інтоксикації: в'ялість, випадіння шерсті, схуднення. 5 тварин померли. На 15-ту добу тваринам вводили суспензію ЕН 2 млн. клітин 0,5 мл субокципітально. Протягом 14 діб вони перебували під спостереженням. З 18-ї доби відзначали покращення загального стану, тварини стали рухливіші, зменшилось випадіння шерсті.

Висновки. Отримані результати свідчать про доцільність обраного напрямку вивчення можливості застосування ЕН для попередження ототоксичного впливу аміноглікозидів на внутрішнє вухо в експерименті.

Методологія і критерії оцінки ефектів ЕН удосконалюються і потребують подальшого вивчення та мультидисциплінарного комплексного підходу.

References

1. Kersigo J, Fritzsich B. Inner ear hair cells deteriorate in mice engineered to have no or diminished innervation. *Front Aging Neurosci.* 2015 Mar 18;7:33. doi:10.3389/fnagi.2015.00033. eCollection 2015. PubMed PMID: 25852547; PubMed Central PMCID: PMC4364252.
2. Huisman MA, Rivolta MN. Neural crest stem cells and their potential application in a therapy for deafness. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012 Jan 1;4:121-32. Review. doi: 10.2741/s255. PubMed PMID: 22202047.
3. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):66-71. Review. doi: 10.1126/science.276.5309.66. PubMed PMID: 9082987.
4. Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, Ogita H, Sakamoto T, Yamamoto N, Okita K, Yamanaka S, Ito J. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport.* 2009 Sep 23;20(14):1250-4. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832ff287. PubMed PMID: 19625987.
5. Rivolta MN. New strategies for the restoration of hearing loss: challenges and opportunities. *Br Med Bull.* 2013;105:69-84. doi: 10.1093/bmb/lds035. Epub 2012 Nov 21. PubMed PMID: 23175701.
6. Bozhkova,VP, Brezhestovsky LA, Buravlev VM. *Rukovodstvo po kul'tivirovaniyu tkani. Metody. Tekhnika. Problemy.* Moscow: Nauka; 1988. Russian.