

І.І. САПІЖАК

ЕМБРІОНАЛЬНІ НЕЙРОНАЛЬНІ КЛІТИНИ У РЕПАРАТИВНІЙ РЕГЕНЕРАЦІЇ КОХЛЕАРНИХ СТРУКТУР ТА СЛУХОВОГО НЕРВА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АМІНОГЛІКОЗИДНОГО ОТОТОКСИКОЗУ

Державна установа "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України", м. Київ, Україна

Виражені порушення слуху суттєво знижують якість життя, негативно впливають на психоемоційний стан людини, а в разі їх розвитку в ранньому дитинстві призводять до порушень психосоціального формування особистості.

На сьогодні ефективних методів відновлення слухової функції у пацієнтів із сенсоневральною приглухуватістю (СНП) не існує. Через це у світовій практиці перевагу віддають тактиці заміщення, зокрема слухопротезуванню за допомогою слухових апаратів або кохлеарній імплантації в разі глухоти.

Наші попередні дослідження продемонстрували можливість покращення звукосприйняття за інтратимпанального та субокципітального введення ембріональних нейрональних клітин морським свинкам в умовах аміноглікозидного ототоксикозу [6].

Сенсоневральна приглухуватість є поліетіологічною патологією, яка охоплює ушкодження структур внутрішнього вуха та провідних шляхів слухового аналізатора аж до його кіркового представництва. Серед ключових тригерів кохлеовестибулярних розладів виділяють генетичні мутації (зокрема спадкові), аутоімунні процеси, інфекційні агенти бактеріальної та вірусної природи, а також хіміоіндуковане ушкодження ототоксичними лікарськими засобами. Оскільки традиційна фармакотерапія не забезпечує стійкого регенеративного ефекту за цієї патології, виникає гостра потреба в

розробці принципово нових, патогенетично обґрунтованих біотехнологічних підходів. На сучасному етапі одним із найбільш перспективних напрямків є клітинна терапія, яка відкриває нові можливості для структурно-функціонального відновлення слухового аналізатора у пацієнтів із глибокою приглухуватістю та глухотою [7-11].

Пріоритет у дослідженні можливостей клітинної трансплантації для корекції структурно-функціональних розладів внутрішнього вуха належить групі японських дослідників під керівництвом Т. Накагави (Nakagawa T. et al., 2005). В експериментах *in vivo* на моделях хіміоіндукованого ототоксичного ушкодження лабіринту було доведено, що ксеногенні фетальні нейрональні стовбурові клітини мають високий інвазивний та адаптивний потенціал, інтегруючись у дегенеративно змінені сенсорні епітелії. Окрім виживання, ці клітини демонстрували фенотипову пластичність, диференціюючись у гліальні, нейрональні та рецепторні волоскові клітини, що заклало основу для розвитку кохлеарної регенеративної медицини [11].

У подальших фундаментальних працях було деталізовано механізми, завдяки яким ембріональні клітини здійснюють регенеративний вплив на лабіринт кохлеовестибулярного апарату. Зокрема, дослідженнями доведено, що трансплантовані нейрональні прогенітори здатні не лише замінювати ушкоджені елементи, а й виділяти ши-

рокий спектр нейротрофічних факторів, таких як BDNF (нейротрофічний фактор головного мозку) та GDNF (гліальний нейротрофічний фактор). Ця паракринна активність клітинного трансплантату забезпечує трофічну підтримку і запобігає апоптозу спірального ганглія та підтримувальних клітин органа Корті в умовах індукованого стресу [12, 13].

Особливу увагу в контексті моделювання патології привертають роботи, присвячені аміноглікозидному (зокрема гентаміциновому) ототоксикозу. Експериментально доведено, що введення ототоксичних антибіотиків запускає каскад вільнорадикального окиснення та програмованої клітинної смерті рецепторних клітин равлика. У цьому аспекті застосування саме ембріональних нейрональних клітин-попередників продемонструвало здатність стабілізувати цито- та міелоархітектоніку внутрішнього вуха, стимулюючи відновлення нервово-судинних зв'язків та неоваскуляризацію ушкоджених зон [14, 15].

Паралельно із лабораторними експериментами розвивався і клінічний напрямок. Одним із піонерів практичного застосування нейротрансплантації для корекції кохлеарних розладів у людини став М.М. Магомедов (1998 р.), який вперше використав ембріональну нервову тканину у формі клітинного гомогенату для лікування пацієнтів із розладами слуху. Клінічне спостереження охоплювало 14 пацієнтів із хронічною сенсоневральною приглухуватістю II–III ступенів тяжкості та тривалістю анамнезу від 6 місяців до 3 років. Після одноразового введення клітинного субстрату було зафіксовано об'єктивне покращення слухової функції: за даними тональної порогової аудіометрії середній поріг звукосприйняття знизився на 10 дБ, а в розширеному діапазоні частот приріст слухової чутливості становив 5 дБ [1, 2].

Таким чином, накопичений світовий досвід – від перших спроб трансплантації гомогенатів до високоточного інтратимпанального введення клітинних культур – підтверджує патогенетичну доцільність використання ембріональних клітин [16, 17]. Проте ультраструктурні зміни, які відбуваються на субклітинному рівні в мембранах

та органелах внутрішнього вуха під впливом такої терапії, досі залишаються недостатньо вивченими, що й зумовлює актуальність нашого електронномікроскопічного дослідження.

Мета дослідження

За допомогою електронної мікроскопії вивчити особливості ультраструктурних змін та оцінити регенеративний потенціал ембріональних нейрональних клітин за їх інтратимпанального та субокципітального введення тваринам із модельованим аміноглікозидним ототоксикозом.

Матеріали і методи дослідження

Для оцінки регенеративної ефективності ембріональних нейрональних клітин (ЕНК) за аміноглікозидного ототоксикозу проведено експериментальне дослідження на 30 морських свинках масою 500–900 г. Експериментальну сенсоневральну приглухуватість (СНП) моделювали шляхом щоденного внутрішньом'язового введення аміноглікозидного антибіотика гентаміцину сульфату в дозі 100 мг/кг маси тіла протягом 14 днів.

Клітинну терапію здійснювали шляхом введення суспензії ЕНК у дозі 2×10^6 клітин в об'ємі 0,5 мл інтратимпанально або субокципітально на 1-шу та 15-ту добу від початку експерименту. Відповідно до завдань дослідження, лабораторних тварин було розподілено на 6 рівних груп (по 5 особин у кожній):

1-ша група – моделювання ізольованого аміноглікозидного ототоксикозу (без подальшого лікування);

2-га група – інтратимпанальне введення суспензії ЕНК на 15-ту добу після завершення курсу гентаміцину;

3-тя група – субокципітальне введення суспензії ЕНК на 15-ту добу після завершення курсу гентаміцину;

4-та група – інтратимпанальне введення суспензії ЕНК на 1-шу добу експерименту (одночасно з початком введення гентаміцину);

5-та група – субокципітальне введення суспензії ЕНК на 1-шу добу експерименту (одночасно з початком введення гентаміцину);

6-та група (контроль патології) – внутрішньом'язове введення 0,9% розчину натрію хлориду щоденно 1 раз на добу протягом 14 діб.

Методи оцінки слухової функції та підготовки матеріалу. Функціональний стан слухового аналізатора у лабораторних тварин оцінювали на етапі ініціації експерименту, безпосередньо перед введенням ЕНК та після завершення терміну спостереження за допомогою методу реєстрації коротколатентних слухових викликаних потенціалів (КСВП).

Евтаназію морських свинок здійснювали шляхом гільйотинної декапітації під глибоким наркозом, індукованим внутрішньочеревним введенням тіопенталу натрію в дозі 20 мг/кг маси тіла, з дотриманням чинних норм біоетики. Після ексцизії скроневих кісток оперативно виділяли кісткові блоки, що містили структури внутрішнього вуха. Для подальшого ультраструктурного та світлооптичного аналізу отримані зразки піддавали первинній фіксації у розчинах забуференого формаліну з послідовним висхідним підвищенням концентрації (5%, 7% та 10%).

Експериментальні дослідження проводили з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007), та відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [18] і Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV.

Експериментальне моделювання кохлеовестибулярної патології здійснювали шляхом щоденного внутрішньом'язового введення ототоксичного антибіотика аміноглікозидного ряду – гентаміцину сульфату з розрахунку 100 мг/кг маси тіла протягом 14 діб.

Для одержання первинної культури алогенних нейрональних прогеніторних клітин використовували плоди морських свинок на 14-ту добу гестації. Збір біоматеріалу виконували шляхом тотальної гістеректомії у вагітних самок, які перебували під комбінованою загальною анестезією (із застосуванням кетамін-ксилазинової суміші

та ефірного наркозу) з суворим дотриманням асептичних умов.

Методика електронної мікроскопії.

Електронномікроскопічне дослідження структур внутрішнього вуха здійснювали за стандартними загальноприйнятими методами. Зразки тканин об'ємом приблизно 1 мм³ ексцизували безпосередньо після забору біоматеріалу та піддавали первинній фіксації у суміші 4% параформальдегіду, 2,5% глутарового альдегіду та 4% сахарози на 0,1 М фосфатному буфері (pH 7,4). Постфіксацію зразків проводили в 1% розчині тетраоксиду осмію.

Результати

Первинний ультраструктурний аналіз суспензії ЕНК, підготовленої для трансплантації, підтвердив високий ступінь проліферативної активності та недиференційований стан клітинної популяції. Клітини загалом характеризувалися високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням: виявлялися великі ядра округлої або овальної форми, що містили одне або кілька чітко контурованих ядерців (рис. 1). Хроматин у каріоплазмі був розподілений нерівномірно, з тенденцією до маргінації та формування невеликих скупчень гетерохроматину переважно поблизу внутрішньої ядерної мембрани. Перинуклеарна цитоплазма візуалізувалася у вигляді вузького обідка навколо ядра, що є характерною морфологічною ознакою малодиференційованих нейральних прогеніторів.

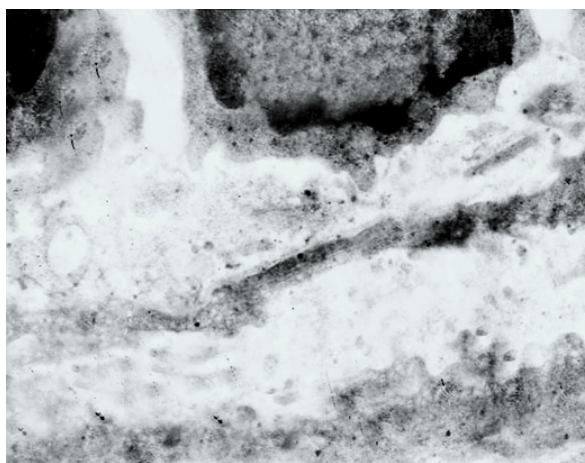


Рис. 1. Ембріональні нейрональні клітини-попередники на дотрансплантаційному етапі. Електроннограма. Збільшення $\times 8\,500$.

З метою оцінки безпеки, біосумісності та визначення міграційного потенціалу клітинного трансплантату (зокрема верифікації наявності ЕНК у структурах лабіринту) було детально досліджено ультраструктуру внутрішнього вуха здорових морських свинок, яким здійснювали ізольоване інтратимпанальне або субокципітальне введення суспензії клітин. Отримані дані дозволили повністю виключити ймовірність негативного чи цитотоксичного впливу клітинного субстрату на кохлеарні елементи тварин.

Проведене електронномікроскопічне дослідження на 4-ту добу після субокципітального введення ЕНК дозволило зафіксувати присутність інкорпорованих екзогенних клітин безпосередньо у рецепторному шарі органа Корті. Ці клітинні елементи чітко диференціювалися серед ендогенних волоскових клітин за характерними ультраструктурними ознаками малодиференційованих нейральних прогеніторів і залежно від стану каріоплазми поділялися на два морфотипи:

Перший морфотип (рис. 2) представляли поодинокі клітини з помірно щільним осміофільним ядром та вираженим вузьким обідком вакуолізованої цитоплазми. Наявність дрібних вакуолей свідчила про активні процеси внутрішньоклітинного транспорту та адаптацію клітини до нового мікрооточення.

Другий морфотип (рис. 3) характеризувався вираженою електронною щільністю. Ці клітини мали конденсоване електронно-щільне (хроматинізоване) ядро та мінімальний об'єм перинуклеарної цитоплазми, що відображало їх перебування на початковому етапі структурної інтеграції.

Важливо підкреслити, що інвазія та адгезія екзогенних клітинних елементів у сенсорний епітелій відбувалися атравматично — без ознак локальної деструкції навколишніх суміжних структур, пошкодження стереоцилій чи розвитку реактивного запалення. Це клініко-морфологічно доводить високу гістосумісність отриманої клітинної культури та підтверджує ефективність субокципітального шляху введення для доставки біоматеріалу до внутрішнього вуха.

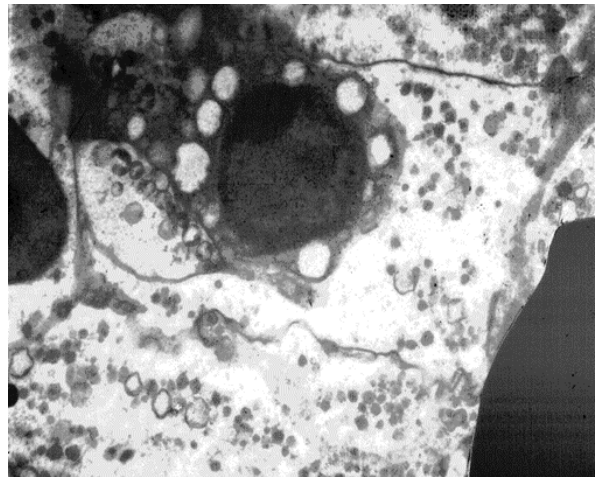


Рис. 2. Інтеграція поодиноких екзогенних ембріональних клітин у рецепторний шар органа Корті (виявляється клітина з осміофільним ядром та вузьким обідком вакуолізованої цитоплазми) на 4-ту добу після субокципітального введення. Електроннограма. Збільшення $\times 9\,500$.

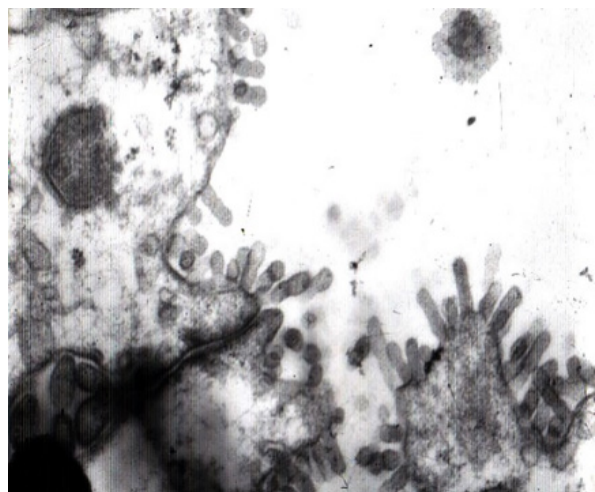


Рис. 3. Екзогенна ембріональна нейрональна клітина з вираженим електронно-щільним ядром та вузькою перинуклеарною цитоплазмою серед волоскових клітин органа Корті на 4-ту добу після субокципітального введення суспензії ЕНК. Електроннограма. Збільшення $\times 12\,500$.

Окрім інтеграції самих клітинних елементів, в ультраструктурі рецепторного шару реєструвалися чисельні синаптичні контакти, утворені переважно аферентними нервовими закінченнями, що прилягали до базальних ділянок волоскових клітин. Ці міжклітинні сполучення характеризувалися різним ступенем електронної щільності як пре-, так і постсинаптичних мембран та ци-

топлазматичних компонентів (рис. 4). Така гетерогенність та структурна збереженість аксосоматичних синапсів свідчить про високий рівень метаболічної й синаптичної активності у зоні контакту, а також підтверджує збереження або відновлення функціональних нейрональних зв'язків у структурах внутрішнього вуха під впливом проведеної терапії.

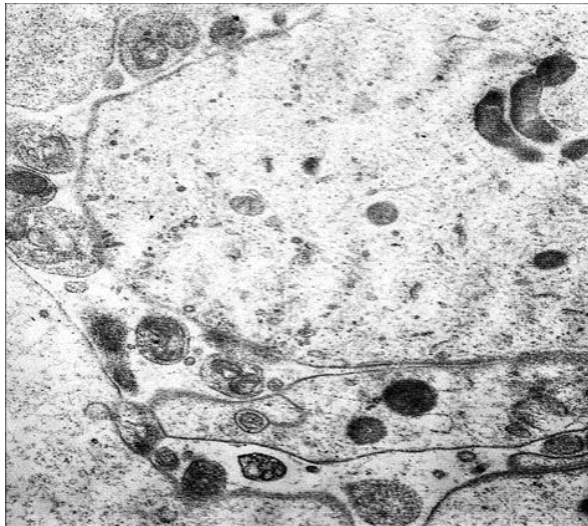


Рис. 4. Чисельні аксосоматичні синапси переважно аферентних нервових закінчень у базальній ділянці волоскових клітин із різним ступенем електронної щільності мембранных структур. Електроннограма. Збільшення $\times 8\,500$.

Під час ультраструктурного аналізу елементів слухового рецептора на тлі моделюваного гентаміцинового ототоксикозу за умов клітинної терапії (2-га група) було зафіксовано ознаки вираженої нейропротекції та збереження метаболічного потенціалу нервової тканини. Цитоплазма функціонально активних нейронів спірального ганглія була щільно заповнена численними каналцями та цистернами гранулярної ендоплазматичної сітки (ергастоплазми), що локалізувалися безпосередньо біля каріолеми. У перикаріоні візуалізувалися мітохондрії, які перебували у стані помірного набряку з частковою вакуолізацією матриксу, що відображало їхнє високе функціональне та енергетичне навантаження в процесі регенерації. Плазматична мембрана нейронів була чітко контурована та оточена тонковолокнистою базальною мембраною (рис. 5).

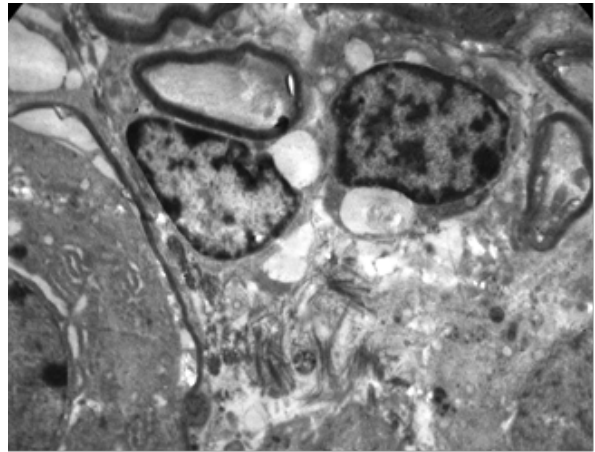


Рис. 5. Ультраструктура нейрона спірального ганглія на тлі гентаміцинового ототоксикозу за умов введення ЕНК (2-га група). Візуалізуються розвинена гранулярна ендоплазматична сітка та мітохондрії у стані помірного функціонального набряку. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 5\,000$.

Ультраструктурні зміни слухового нерва. При дослідженні мієлінізованих нервових волокон слухового нерва виявлено виражені різноспрямовані (мозаїчні) зміни мітохондріального апарату в осьових циліндрах (аксонах). В одних провідниках спостерігалися ознаки компенсаторної гіперплазії органел, тоді як в інших візуалізувалися глибокі деструктивні форми мітохондрій із руйнуванням та майже повною втратою крист (рис. 6).

Поряд із цим реєструвалися чіткі ознаки вакуольної дистрофії та початкових етапів дегенерації мієлінової оболонки окремих аксонів. На тлі ушкодження осьових циліндрів виявлялися клітини Шванна (лемоцити), які перебували у стані вираженої функціональної напруги та альтерації. Їхні ядра характеризувалися явищами маргінальної конденсації (крайового скупчення) гетерохроматину під каріолемою, а в перинуклеарній цитоплазмі визначалися зони вогнищевої вакуолізації та деструкції мембранных компонентів.

Окрім дистрофічних змін аксоплазми, у волокнах слухового нерва чітко реєструвалися процеси фокальної деструкції ізолювальних структур, що виявлялося у вигляді часткової демієлінізації мієлінізованих аксонів (рис. 7). Патологічні зміни архітекто-

ніки мієлінового комплексу мали мозаїчний характер і супроводжувалися локальною втратою компактності оболонки. На субклітинному рівні цей деструктивний процес супроводжувався деградацією ліпопротеїдних комплексів та порушенням міжламелярних зв'язків.

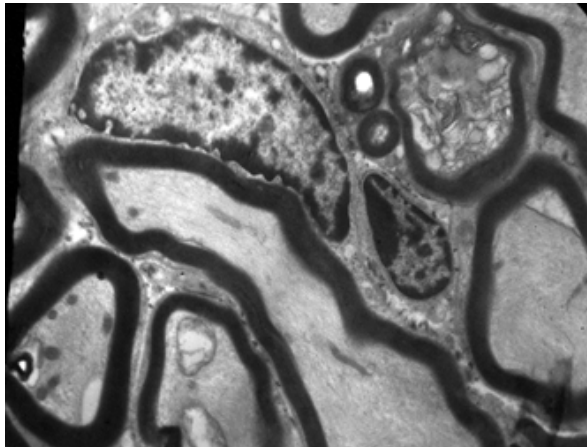


Рис. 6. Ультраструктурні зміни волокон слухового нерва на тлі експериментального ототоксикозу. У верхній частині – дегенеруючий мієлінізований аксон із деструкцією мітохондрій. Поруч – дві шваннівські клітини з маргінальною конденсацією гетерохроматину в ядрі та вогнищевою вакуолізацією цитоплазми. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 3\,000$.

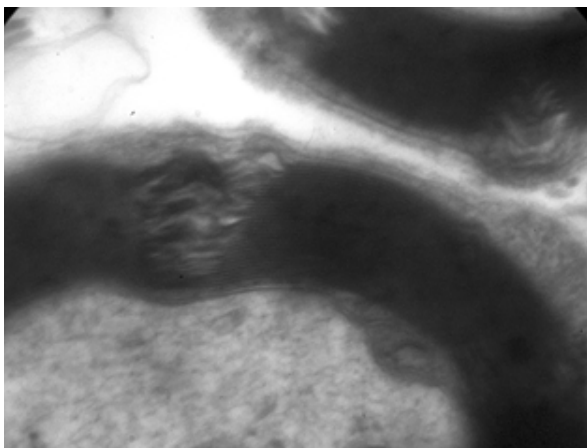


Рис. 7. Ультраструктура волокна слухового нерва на тлі експериментального ототоксикозу. Візуалізується фрагментарне розволокнення мієлінової оболонки з вираженим розщепленням (дисоціацією) та вираженим гофруванням (хвилястою деформацією) окремих ламел. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 25\,000$.

Міграція та інтеграція клітин у судинну смужку. Ультраструктурний аналіз тканин внутрішнього вуха тварин дослідних груп, яким здійснювали субокципітальну трансплантацію ЕНК (як на 1-шу, так і на 15-ту добу моделювання ототоксикозу), підтвердив здатність екзогенних прогеніторів мігрувати крізь гематолабірінтний бар'єр. Безпосередньо у структурі судинної смужки (*stria vascularis*) виявлялися верифіковані клітинні елементи округлої та овальної форми. Вони мали характерні електронно-мікроскопічні ознаки малодиференційованих клітин: щільне електронно-щільне (осміофільне) ядро та вузьку перинуклеарну цитоплазму, що містила дрібні транспортні й піноцитозні вакуолі (рис. 8).

Особливий інтерес викликає характер просторового розподілу трансплантованого матеріалу в мікроциркуляторному руслі лабіринту. Виявлені клітини локалізувалися у периваскулярних просторах, демонструючи тісний адгезивний контакт із базальною поверхнею ендотеліоцитів капілярів, що свідчить на користь активної трансендотеліальної міграції (діapedезу) ЕНК у зоні хіміоіндукованого альтеративного пошкодження.

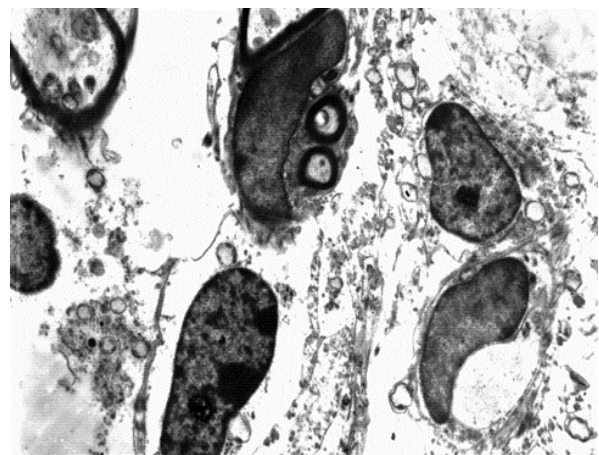


Рис. 8. Ультраструктурні ознаки інтеграції екзогенних прогеніторів у судинну смужку внутрішнього вуха за умов субокципітального введення ЕНК. Візуалізується адгезія овальної клітини з електронно-щільним ядром та вакуолізованою цитоплазмою до базальної ділянки ендотеліоцита капіляра. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 8\,500$.

Особливості регенерації за інтратимпанального введення. Варто зазначити, що у групах лабораторних тварин із локальним інтратимпанальним введенням суспензії ЕНК безпосередньої присутності трансплантованих клітин у досліджених ультратонких зрізах структур лабіринту та слухового нерва виявлено не було.

Попри відсутність прямої візуалізації екзогенних прогеніторів у тканинах, ультраректруктурний аналіз слухового нерва у тварин цих груп дозволив зафіксувати паралельний перебіг деструктивних та виражених репаративно-компенсаторних процесів у мієлінізованих аксонах. На тлі залишкових явищ альтерації аксоплазми спостерігалися чіткі ознаки відновлення ізолювальних структур нервового волокна (рис. 9). На початкову стадію ремієлінізації вказувало формування характерних фігур закручування внутрішніх витків мієлінової оболонки навколо осевого циліндра. Паралельно у цитоплазмі визначалися мітохондрії у стані помірного функціонального набряку з фокальною деструкцією, розширенням та локальною фрагментацією крист, що відображало високе енергетичне напруження клітини в процесі відновлення мієлінового комплексу.

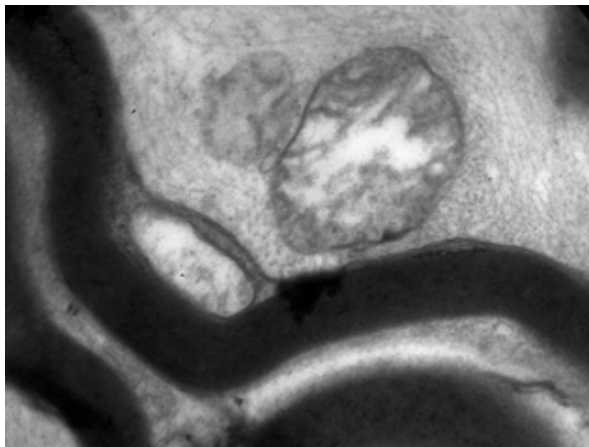


Рис. 9. Ультраректруктура волокна слухового нерва за умов інтратимпанального введення ЕНК. Візуалізується фігура ремієлінізації (формування внутрішнього витка мієлінової оболонки) на тлі деструктивно змінених мітохондрій із розширеними та локально фрагментованими кристами. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 25\,000$.

Ознакою вираженої активації внутрішньоклітинних репаративних процесів у

провідних шляхах слухового аналізатора за умов клітинної терапії було формування енергетичного депо у фокусах регенерації. Накопичення значної кількості мітохондріальних структур в аксоплазмі нервових волокон переконливо свідчило про високий рівень локальної метаболічної й біоенергетичної активності (рис. 10). Особливу патоморфологічну цінність становить присутність специфічних дрібних, високоінтенсивних органел, які відображають процеси активного мітохондріогенезу, необхідного для забезпечення енергоємної ремієлінізації ушкоджених осевих циліндрів.

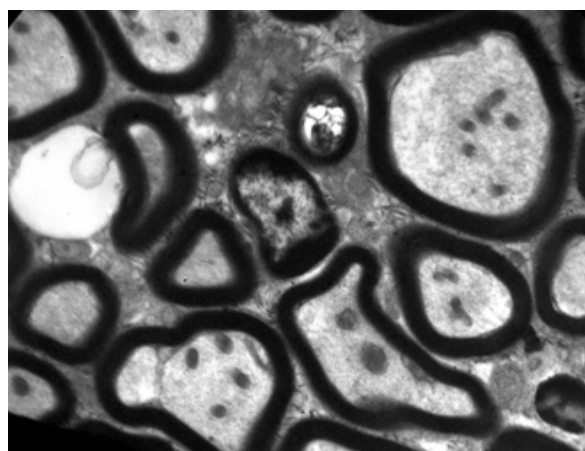


Рис. 10. Ультраректруктурна організація волокон слухового нерва в динаміці репаративного процесу. В аксоплазмі візуалізуються чисельні новоутворені осміофільні («юні») форми мітохондрій зі щільно упакованими кристами. У нижній частині мікрофотографії визначається фігура ремієлінізації. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 3\,000$.

Ключовим структурним підтвердженням повноцінної репаративної регенерації та активного відновлення мієлінового комплексу слухового нерва за умов клітинної терапії стала верифікація процесів клітинного проліферативного оновлення. Під час ультраректруктурного аналізу провідних шляхів лабіринту було виявлено диференційовані новоутворені клітини Шванна (лемоцити), які безпосередньо брали участь у формуванні нових мієлінових оболонок (рис. 11). Морфологічні ознаки цих клітин свідчили про високий рівень їхньої функціональної та синтетичної активності: великі ядра

містили переважно дрібнодисперсний еухроматин із мінімальною кількістю гетерохроматинових скупчень під каріолею, що вказувало на активні транскрипційні процеси, необхідні для синтезу структурних білків мієліну. Перинуклеарна цитоплазма візуалізувалася у вигляді тонкого, але чітко структурованого обідка, щільно прилеглого до мієлінізованого аксона.

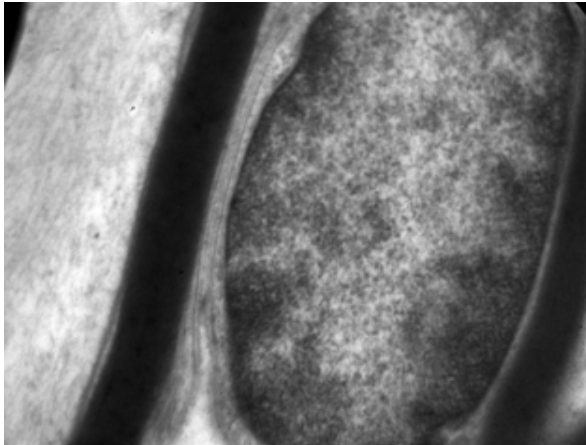


Рис. 11. Ультраструктурна організація слухового нерва в зоні регенерації. Візуалізується новоутворена шваннівська клітина (лемоцит), ядро якої містить дрібнодисперсний хроматин, оточене вузьким обідком цитоплазми. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 15\,000$.

Ультраструктурна нормалізація елементів слухового нерва. У 2-й та 4-й групах лабораторних тварин, яким здійснювали інтратимпанальну трансплантацію ЕНК (відповідно на 15-ту та 1-шу добу моделювання патології), під час електронномікроскопічного аналізу було зафіксовано повне відновлення та нормалізацію архітекτονіки мієлінізованих нервових волокон. Патоморфологічні ознаки попереднього деструктивного розволокнення були відсутні; натомість визначалася чітка концентрична впорядкованість та висока компактність ламел мієлінової оболонки. На завершення репаративного процесу вказувало точне включення в структуру мієлінового комплексу мезаксона — здвоєної мембрани відростка шваннівської клітини (лемоцита) із залишками перинуклеарної цитоплазми.

Поряд із ремієлінізацією відбувалася стабілізація та повна нормалізація компоне-

нтів цитоскелета осевого циліндра. В аксоплазмі візуалізувалися упорядковані чисельні мікротрубочки (нейротубули) та мікрофіламенти (нейрофіламенти), що свідчило про повне відновлення аксонального транспорту. Внутрішньоклітинний енергетичний апарат також демонстрував ознаки структурної норми: мітохондрії були представлені органами типової овально-видовженої форми з високою електронною щільністю матриксу та компактно орієнтованими не-деструктованими кристами (рис. 12).

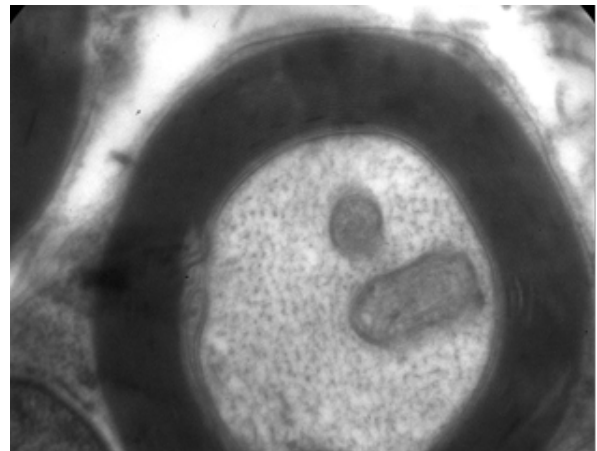


Рис. 12. Ультраструктурна нормалізація волокна слухового нерва за умов інтратимпанального введення ЕНК (2-га та 4-та групи). Визначається висока компактність ламел мієліну, відновлення нейротубул та нейрофіламентів аксоплазми, а також мітохондрії типової будови з компактно розташованими кристами. Електронна мікрофотографія. Збільшення $\times 25\,000$.

Обговорення результатів

Узагальнення та комплексний аналіз даних, отриманих під час ультраструктурного електронномікроскопічного дослідження, дозволили встановити чіткі якісні відмінності перебігу репаративного процесу у лабіринті залежно від способу доставки клітинного трансплантату. На основі отриманих морфологічних маркерів доведено, що найбільш виражена та комплексна регенерація елементів внутрішнього вуха та провідних шляхів слухового аналізатора відбувалася у тварин дослідних груп із субокципітальним введенням ембріональних нейрональних клітин (ЕНК).

Висока терапевтична ефективність субокципітального шляху введення біоматеріалу порівняно з інтратимпанальним доступом та групою контролю патології обумовлена кількома ключовими патогенетичними факторами:

- **оптимізація мікроциркуляції та ангиогенезу:** Субокципітальна доставка клітин забезпечувала їх активну трансендотеліальну міграцію крізь гематолабірінтний бар'єр з подальшою адгезією до базальних мембран капілярів судинної смужки (*stria vascularis*). Це стимулювало неоваскуляризацію та покращувало трофічне забезпечення ішемізованих зон лабіринту. Цей факт узгоджується з результатами фундаментальних праць Nakagawa T. et al. [11], які першими довели високий інвазивний потенціал та здатність екзогенних нейральних стовбурових клітин успішно інтегруватися в судинні та епітеліальні ніші внутрішнього вуха після медикаментозного індукованого стресу;

- **прискорення елімінації детриту:** У цих групах спостерігалася значна інтенсифікація процесів резорбції та утилізації ліпидних продуктів деградації мієліну, що утворювалися внаслідок хіміоіндукованого гентаміцинового розволокнення ламел слухового нерва. Швидке очищення періаксонального простору створювало сприятливе мікрооточення для регенерації. Згідно з даними Bas E. et al. [15], швидке видалення біохімічних продуктів клітинного розпаду є критичною умовою для припинення вільнорадикального каскаду апоптозу, активованого аміноглікозидами в структурах равлика;

- **активація лемоцитів та мітохондріогенезу:** Зафіксовано високу функціональну та проліферативну активність клітин Шванна (лемоцитів). Поява «юних» форм мітохондрій зі щільно упакованими кристами свідчила про активацію енергоємного мітохондріогенезу, необхідного для забезпечення процесів ремієлінізації осевих циліндрів та формування функціональних мезаксонів. Морфологічна верифікація зрілих фігур ремієлінізації підтверджує концепцію Rivolta M.N. et al. [13] про високу пластичність прогеніторних культур і їхню спроможність не лише до власної диференціації, а й до стимуляції ендogenous клі-

тинного оновлення провідних шляхів слухового аналізатора;

- **Мінімізація реактивного фіброзу:** На відміну від контрольної групи, у тварин після клітинної терапії відзначалася слабо виражена інфільтрація елементами сполучнотканинного оточення. Це запобігало формуванню грубих сполучнотканинних рубців у мембранних структурах равлика, які могли б механічно перешкоджати звукосприйняттю.

Особливий науковий інтерес становить той факт, що за інтратимпанального введення, попри відсутність прямої візуалізації самих ЕНК на ультратонких зрізах, ми все одно реєстрували виражені ознаки нормалізації мієлінових оболонок, стабілізацію цитоскелета (нейротубул та нейрофіламентів) та збереження високоактивних аферентних аксосоматичних синапсів. Це феноменологічно доводить паракринний характер дії трансплантованих клітин. Наші висновки повністю корелюють із положеннями робіт Matsui J.I. et al. [14], які експериментально підтвердили, що захист та ультраструктурна стабілізація кохлеарних елементів часто опосередковуються паракринною секрецією нейротрофічних факторів (таких як BDNF та GDNF) клітинним трансплантатом, навіть без його прямого фізичного заміщення ушкоджених рецепторів.

Таким чином, субокципітальна та інтратимпанальна трансплантація ЕНК запускає потужний репаративний каскад, що забезпечує відновлення біоенергетичного потенціалу, ремієлінізацію нервових волокон слухового нерва та збереження синаптичної архітекτονіки внутрішнього вуха, що створює морфологічний фундамент для відновлення звукосприйняття.

Висновки

1. Трансплантація ембріональних нейрональних клітин (ЕНК) лабораторним тваринам із неушкодженою слуховою функцією не викликає патоморфологічних чи деструктивних змін у лабіринті, що експериментально підтверджує високу біосумісність, безпеку та атравматичність розроблених методів клітинного введення.

2. Субокципітальне та інтратимпанальне введення суспензії ЕНК на 1-шу добу

експерименту виявляє виражений превентивний (нейропротекторний) ефект, запобігаючи розвитку глибокої кохлеовестибулярної патології за подальшого 14-денного токсичного навантаження гентаміцином сульфатом.

3. За умов терапевтичного введення ЕНК на 15-ту добу після завершення моделювання ототоксикозу зафіксовано чіткі якісні переваги репаративного процесу за субокципітального шляху доставки біоматеріалу. Останній забезпечує активну інтеграцію прогеніторів у судинну смужку, посилену васкуляризацію, прискорення резорбції ліпопротеїдних продуктів деградації мієліну, активацію лемоцитів (мітохондріогенезу) та мінімізацію реактивного фіброзу порівняно з інтратимпанальним доступом та контролем патології.

4. Доведено, що інтратимпанальне та субокципітальне застосування ЕНК ефективно стимулює репаративну регенерацію ушкоджених ультраструктур внутрішнього вуха та слухового нерва, забезпечуючи відновлення цитоскелета аксоплазми, ремієлінізацію нервових волокон та збереження архітекtonіки аферентних аксосоматичних синапсів органа Корті.

Перспективи подальших досліджень. Отримані експериментальні дані відкривають широкі перспективи для розробки та клініко-лабораторного обґрунтування принципово нових, патогенетично орієнтованих біотехнологічних підходів до терапії пацієнтів із сенсоневральною приглухуватістю та глухотою різного генезу.

Конфлікт інтересів

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

Дотримання етичних норм

Експериментальні дослідження проводили з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених III Національним конгресом з біое-

тики (Київ, 2007), та відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [5] і Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV.

Використання штучного інтелекту (Декларація про прозорість)

Автор рукопису засвідчує, що інструменти генеративного штучного інтелекту не застосовувалися на етапах концептуалізації дослідження, збору первинних даних, проведення експериментів чи формулювання наукових висновків. Проте під час підготовки фінального тексту рукопису було використано генеративні мовні моделі виключно з метою стилістичного редагування, виправлення граматичних помилок, покращення академічного стилю української мови та оптимізації структури огляду літератури відповідно до вимог наукових періодичних видань. Усі інтегровані фактичні дані, інтерпретація результатів та остаточний контроль тексту виконані безпосередньо автором, який несе повну відповідальність за зміст роботи.

Первинні дані та матеріали

Автор рукопису засвідчує, що у роботі використано результати власних оригінальних досліджень, які були систематизовані та проаналізовані автором. Первинні дані включають результати інструментального (КСВП) та електронномікроскопічного дослідження внутрішнього вуха й слухового нерва дослідних тварин. Усі матеріали збережені та можуть бути надані за обґрунтованим запитом автору-кореспонденту з урахуванням вимог конфіденційності та чинних етичних норм.

Інформація про фінансування

Це дослідження не отримувало зовнішнього фінансування (державного, грантового чи спонсорського).

References

1. Magomedov MM. [Use of fetal tissue in otolaryngology. Analysis of problem and future]. *Vestn Otorinolaringol.* 1998;(2):16-23. [Russian].
2. Magomedov MM. [The use of fetal tissues in the therapy of chronic sensorineural hearing loss]. In: *Proceedings of the International Scientific Conference dedicated to the 75th anniversary of the Department of Otolaryngology of Dnipropetrovsk and clinics of medical academies*; 1997; Dnipropetrovsk. p. 140-141. [Russian].
3. Semenova VV, Tsimbalyuk VI, Pichkur LD, Staino LP. [Cytostructural comparative evaluation of human embryonic neural tissue growth during cultivation using various storage methods]. *Ukr Neurosurg J.* 2008;(4):68-71. [Russian].
4. Sapizhak I, Timen G, Semenova V, Staino L. Influence of embryonic neuronal cells on the structures of the internal auricles in experimental ototoxicosis (morphological assessment). *Ukr Neurosurg J.* 2017;(4):32-37. doi: 10.25305/unj.115236.
5. Tsimbalyuk VI. [Neurotransplantation]. *Likuvannya ta Diagnostika.* 2000;(3):15-19. [Ukrainian].
6. Chaikovsky YuV, Deltsova OI, Gerashchenko SB. [Brain stem cells in the postnatal period]. *World Med Biol.* 2011;7(4):148-153. [Ukrainian].
7. Groves AK. The challenge of hair cell regeneration. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(4):434-446. doi: 10.1258/ebm.2010.009318.
8. Huisman MA, Rivolta MN. Neural crest stem cells and their potential application in a therapy for deafness. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012;4(1):121-132. doi: 10.2741/s254.
9. Kersigo J, Fritsch B. Inner ear hair cells deteriorate in mice engineered to have no or diminished innervation. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:33. doi: 10.3389/fnagi.2015.00033.
10. Nishimura K, Nakagawa T, Ono K, Ogita H, Sakamoto T, Yamamoto N, et al. Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport.* 2009;20(14):1250-1254. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832f3f4c.
11. Nakagawa T, Ito J. Cell therapy for inner ear diseases. *Curr Pharm Des.* 2005;11(9):1203-1207. doi: 10.2174/1381612053507530.
12. Oshikawa M, Ikeda R, Saito T, Nakagawa T, Ito J. Role of neurotrophic factors (BDNF and GDNF) on the survival of neural progenitor cells transplanted into the inner ear. *Hear Res.* 2004;195(1-2):74-82. doi: 10.1016/j.heares.2004.05.003.
13. Rivolta MN, Li H, Heller S. Generation of inner ear cell types from embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;330:71-92. doi: 10.1385/1-59745-028-1:71.
14. Matsui JI, Ogilvie JM, Warchol ME. Inhibition of caspases prevents ototoxic and ongoing hair cell death in the mature central auditory system. *J Neurosci.* 2003;23(21):7822-7831. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-21-07822.2003.
15. Bas E, Martinez-Monedero R, Corrales CE, Edge AS. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Mol Neurobiol.* 2012;46(3):564-577. doi: 10.1007/s12035-012-8302-3.
16. Steffen A, Takebayashi S, Nakagawa T, Iwai K, Ito J. Survival and differentiation of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Acta Otolaryngol.* 2003;123(5):590-595. doi: 10.1080/00016480310001297.
17. Martinez-Monedero R, Corrales CE, Edge AS. Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int J Dev Biol.* 2007;51(6-7):645-653. doi: 10.1387/ijdb.072346rm.
18. Council of Europe. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Raised for Experimental and Other Scientific Purposes.* Strasbourg: Council of Europe; 1986. Treaty Series No.: 123.

Надійшла до редакції 19.06.2026

© I.I. Сапіжак, 2026

ЕМБРИОНАЛЬНІ НЕЙРОНАЛЬНІ КЛІТИНИ У РЕПАРАТИВНІЙ РЕГЕНЕРАЦІЇ КОХЛЕАРНИХ СТРУКТУР ТА СЛУХОВОГО НЕРВА ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АМІНОГЛІКОЗИДНОГО ОТОТОКСИКОЗУ

Сапізхак ІІ

*Державна установа "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка
Національної академії медичних наук України", м. Київ, Україна*

Email: irina.sapizhak8888@ukr.net

А н о т а ц і я

Актуальність. Сенсоневральна приглухуватість є поліетіологічною патологією, ефективних методів лікування якої наразі не розроблено. Клітинна терапія відкриває нові можливості для регенерації кохлеовестибулярного апарату, проте ультраструктурні механізми цього процесу залишаються недостатньо вивченими.

Мета дослідження. За допомогою електронної мікроскопії вивчити особливості ультраструктурних змін та оцінити регенеративний потенціал ембріональних нейрональних клітин (ЕНК) за їх інтратимпанального та субокципітального введення тваринам із модельованим аміноглікозидним ототоксикозом.

Матеріали та методи. Експеримент проведено на 30 морських свинках масою 500–900 г, розподілених на 6 груп. Ототоксикоз моделювали внутрішньом'язовим введенням гентаміцину сульфату (100 мг/кг, 14 діб). Суспензію ЕНК (2×10^6 клітин в об'ємі 0,5 мл) вводили інтратимпанально або субокципітально на 1-шу чи 15-ту добу. Стан слуху оцінювали за допомогою реєстрації коротколатентних слухових викликаних потенціалів (КСВП). Тканини внутрішнього вуха та слухового нерва досліджували методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ).

Результати. Введення ЕНК здоровим тваринам підтвердило їх безпеку та біосумісність. Застосування ЕНК на 1-шу добу продемонструвало виражений превентивний нейропротекторний ефект. При введенні ЕНК на 15-ту добу після завершення курсу гентаміцину встановлено, що субокципітальний шлях забезпечує активну трансцелюлярну міграцію клітин у судинну смужку, посилену васкуляризацію, резорбцію ліпопротеїдних продуктів деградації мієліну та мітохондріогенез у лемоцитах. За інтратимпанального введення верифіковано паракринний ефект, що виявився у нормалізації ламел мієлінових оболонок, формуванні мезаксонів, стабілізації цитоскелета аксоплазми (нейротубул) та збереженні аферентних аксосоматичних синапсів.

Висновки. Трансплантація ЕНК ефективно стимулює репаративну регенерацію ушкоджених ультраструктур внутрішнього вуха та слухового нерва. Субокципітальний шлях введення є патоморфологічно більш ефективним для безпосередньої інтеграції клітин, тоді як інтратимпанальний запуск регенерації опосередковується переважно паракринними механізмами.

Ключові слова: ембріональні нейрональні клітини, гентаміциновий ототоксикоз, внутрішнє вухо, слуховий нерв, електронна мікроскопія, ремієлінізація, лемоцити.

EMBRYONIC NEURONAL CELLS IN REPARATIVE REGENERATION OF COCHLEAR STRUCTURES AND AUDITORY NERVE UNDER EXPERIMENTAL AMINOGLYCOSIDE OTOTOXICITY

Sapizhak II

*State Institution "O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"*

Email: irina.sapizhak8888@ukr.net

A b s t r a c t

Background. Sensorineural hearing loss is a polyetiological pathology with no effective treatment methods currently available. Cell therapy opens new frontiers for cochleovestibular regeneration; however, the ultrastructural mechanisms of this process remain insufficiently understood.

Objective. To investigate the characteristics of ultrastructural changes and evaluate the regenerative potential of embryonic neural cells (ENCs) via intratympanic and suboccipital administration in animals with modeled aminoglycoside ototoxicity using transmission electron microscopy (TEM).

Materials and Methods. The experiment was conducted on 30 guinea pigs weighing 500–900 g, divided into 6 groups. Ototoxicity was induced by intramuscular injection of gentamicin sulfate (100 mg/kg, 14 days). ENC suspension (2×10^6 cells in 0.5 mL) was administered either intratympanically or suboccipitally on day 1 or day 15. Hearing function was assessed via auditory brainstem response (ABR) recording. Inner ear and auditory nerve tissues were examined using TEM.

Results. ENC transplantation into healthy animals confirmed its safety and biocompatibility. The administration of ENCs on day 1 demonstrated a pronounced preventive neuroprotective effect. When ENCs were injected on day 15 post-gentamicin course, the suboccipital route was found to provide active transendothelial migration of cells into the stria vascularis, enhanced vascularization, rapid resorption of myelin lipoprotein degradation products, and active mitochondriogenesis in lemmocytes. The intratympanic route verified a paracrine effect, manifested by the normalization of myelin sheath lamellae, mesaxon formation, stabilization of the axoplasm cytoskeleton (neurotubules), and preservation of afferent axosomatic synapses.

Conclusions. ENC transplantation effectively stimulates the reparative regeneration of damaged inner ear and auditory nerve ultrastructures. The suboccipital route is pathomorphologically more effective for direct cell integration, whereas the intratympanic initiation of regeneration is primarily mediated by paracrine mechanisms.

Keywords: embryonic neuronal cells, gentamicin ototoxicity, inner ear, auditory nerve, electron microscopy, remyelination, lemmocytes.