УДК 57.088+616.7:616-018.1”712.4”

**ДЕРЯБІНА О.Г.[1, 3], ШУВАЛОВА Н.С.[1], КОВАЛЬЧУК М.В.[1, 2], МІНІН Ю.В.[3], ДЕРЯБІН О.М.[4], КОРДЮМ В.А.[1, 2]**

[1] *ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН»,*
*Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: oderyabina@gmail.com*
[2] *Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,*
*Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, email: kovmv@ukr.net*
[3] *ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломійченка НАМН»,*
*Україна, 03057, м. Київ, вул. Зоологічна, 3*
[4] *Державний науково-контрольний Інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,*
*Україна, 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30, e-mail: don.lmb@gmail.com*

# ВПЛИВ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ КСЕНОГЕННИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА ПРОТІКАННЯ АТРОФІЧНОГО РИНІТУ У МИШЕЙ

Дослідження та розробка технологій отримання та мультиплікації поза організмом МСК пуповини зі збереженням їх нативних характеристик, їх культивування у визначених умовах з додаванням специфічних факторів дозволяє отримувати необхідну кількість клітин для трансплантації без багаторазових перещеплень [1]. Це відкриває нові можливості лікування різних атрофічних станів, у тому числі і захворювань верхніх дихальних шляхів.

В останні двадцять років у світі все більшого розвитку набуває клітинна терапія з використанням різних типів клітин, що дозволило боротися із захворюваннями, які не піддаються лікуванню класичними методами. Особливе місце серед клітин, які застосовують в клітинній терапії, займають мезенхімальні мультипотентні стромальні клітини або мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що пояснюється їх властивостями. Це їх здатність до диференціації в кілька типів клітин, відсутність на їх поверхні білків II класу гістосумісності, що забезпечує низьку імуногенність, здатність до міграції в місце запалення. Механізм дії МСК повністю не ясний, хоча в останні роки дослідники схильні більшу увагу приділяти паракринним ефектам, що причиняють ці клітини. МСК секретують значну кількість ростових факторів та цитокінів, які забезпечують регенерацію уражених тканин та залучення власних стовбурових клітин організму. На сьогодні відомо декілька джерел, МСК з яких використовують в клінічних дослідженнях, у тому числі, клітини з Вартонового студня пуповини, що мають значні переваги перед МСК з інших джерел, оскільки за декількома показниками наближуються до ембріональних клітин. Авторами розроблена технологія виділення і характеристики таких МСК, які забезпечують збереження їх нативних властивостей для використання на модельних тваринах і в клінічній практиці.

Незважаючи на появу та застосування нових фармакологічних засобів та використання різноманітних фізичних методів терапії, лікування хронічних атрофічних захворювань слизової оболонки верхніх дихальних шляхів залишається актуальною проблемою [2, 3]. Системний вплив на трофіку слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, який використовують сьогодні, за клінічними результатами є малоефективним та потребує подальших досліджень. Останнім часом все більше уваги при виборі відновлювальних заходів при атрофічних змінах тканин організму людини приділяється використанню досягнень сучасної регенеративної медицини. Одним із напрямків розвитку наукових досліджень на сьогоднішній день є інтенсивний пошук нових біостимулюючих та відновлюючих методів на основі використання клітинних технологій [4–6], в тому числі, з використанням стовбурових та мультипотентних клітин.

Метою даної роботи було вивчення ефективності використання ксеногенних МСК людини при лікуванні атрофічного риніту інфекційного генезу у мишей, а також визначення введених клітин в різних органах реципієнтів.

## Матеріали і методи

*Отримання моделі атрофічного риніту у мишей.* Модель атрофічного риніту на мишах отримували за методикою, описаною Jordan [7] та модифікованою співробітниками ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка»

© ДЕРЯБІНА О.Г., ШУВАЛОВА Н.С., КОВАЛЬЧУК М.В., МІНІН Ю.В., ДЕРЯБІН О.М., КОРДЮМ В.А.

НАМН України [8]. Суть методики полягає в інфікуванні мишей віком 1–2 тижні інтраназальною інокуляцією трьома патогенними штамами *Pasteurella multocida*. Доза зараження складала $10^7$колонієутворюючих одиниць (КУО) в 10 мкл фізіологічного розчину. Попередньо, за 24 та 6 годин до зараження, піддослідним тваринам інтраназально вводили 10 мкл 1% розчину оцтової кислоти. Тварини протягом 1 місяця перебували під щоденним клінічним спостереженням, фіксувалися їх рухливість, характер дихання, харчування, вага, зовнішні зміни.

*Отримання та характеристика МСК з Вартонового желе пуповини людини для введення модельним тваринам.* Мезенхімальні стромальні мультипотентні клітини з Вартонового студня отримували за методикою, розробленою авторами на основі створеного протоколу [1]. В роботі використовували клітини другого пасажу в культурі [9], перевірені за морфологією та охарактеризовані за поверхневими маркерами, класичними для МСК — CD73, CD90, CD105 (позитивні) та CD34 (негативний) [10].

*Лікування мишей з атрофічним ринітом введенням МСК Вартонового студня.* Після відтворення атрофічного процесу (через місяць після початку експерименту) усім мишам незалежно від їх стану два рази на день протягом трьох днів парентерально вводили антибіотик енрофлоксацин у дозі 20 мг на 0,12 $см^3$ розчину. Після цього тваринам дослідної групи у хвостову вену ін'єкційно вводили попередньо підготовлені та охарактеризовані МСК з пуповини людини в кількості $10^6$ клітин в об'ємі 100 мкл ФБР та протягом 1 місяця спостерігали за їх клінічним станом в порівнянні з нелікованим контролем та інтактними тваринами.

*Виявлення ДНК людини в організмі мишей при введенні їм МСК Вартонового студня пуповини людини.* Для виявлення ДНК людини використовували полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами до альфа-сателітної ДНК: F 5′-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G-3′ та R 5′-TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C-3′. Реакційна суміш для ПЛР містила 10× буфер, 2,0 мМ хлорид магнія, 0,20 мМ нуклеотидтрифосфати, 0,25 мкМ праймери і Taq-полімеразу «Fermentas» (Литва). Реакцію проводили в ампліфікаторі «Терцик». Використовували наступні режими: 95° — 3 хв, 30 циклів: 94° — 1 хв, 60° — 1 хв, 72° — 30 сек, потім 5 хв при 72°. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,2% агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі. Тотальну ДНК із патматеріалів, взятих у мишей через 1 та 5 діб після введення МСК, отримували шляхом висолювання з 6 М NaCl після інкубації з проназою при 37 °С протягом ночі [11] Матеріалами, в яких проводили аналіз на виявлення ДНК людини, були легені, селезінка, слизова носової порожнини.

**Результати та обговорення**

*Характеристика клітин, які були використані для введення піддослідним тваринам.* У дослідах по введенню модельним тваринам МСК Вартонового студня використовували клітини другого пасажу поза організмом, які характеризувалися типовою веретеноподібною морфологією та експресували поверхневі маркери CD73, CD90, CD105 та не експресували CD34 (дані не представлені). Це відповідає характеристикам, притаманним МСК, що свідчить про адекватність використаних нами підходів для отримання клітин з Вартонового студня пуповини для введення модельним тваринам.

*Створення на мишах моделі атрофічного риніту та їх лікування за допомогою МСК Вартонового желе.* Нами була відтворена на мишах експериментальна модель атрофії слизової оболонки носа інфекційного генезу. У піддослідних тварин спостерігалася млявість, уповільнення рухів, поганий апетит, накопичення виділень в носі, утворення корок, сухість слизової оболонки. Відмічено зменшення середньої маси тіла (12,3±0,6 г в порівнянні з 16,7±0,7 г у контролі). Тобто клінічні спостереження свідчать про загальнотоксичну дію *Pasteurella multocida* на мишей та про розвиток патологічного процесу у слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів, симптоми якого через місяць можуть свідчити про розвиток атрофії.

Через 30 днів після зараження *Pasteurella multocida* та обробки інфікованих тварин антибіотиком, мишам у хвостову вену ін'єкційно вводили МСК з Вартонового студня пуповини людини. Отримані результати порівняння клінічного стану мишей, що отримали лікування клітинами, з мишами, які були інфіковані *Pasteurella multocida*, але котрим не вводили МСК, представлені в табл. 1.

Наведені результати клінічного спостереження після введення клітин однозначно свід-

*Таблиця 1*

**Стан мишей з моделлю атрофічного риніту після введення МСК та без нього**

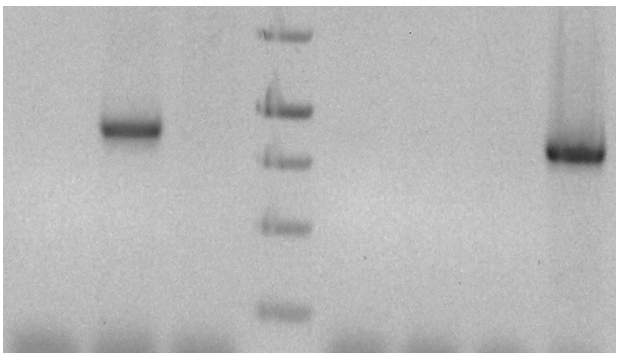
| Час після введення МСК | Стан тварин | |
|---|---|---|
| | після введення клітин | без введення клітин |
| 1 тиждень | Тварини виглядали активними, рухливими, зі звичайним апетитом та адекватним носовим диханням. Водночас, у 33,0 % мишей спостерігалася незначна кількість прозорого слизу біля присінку носа | Миші мали наявні ознаки слабкості та утрудненого носового дихання внаслідок накопичення густого гнійного слизу на рівні верхніх дихальних шляхів |
| 1 місяць | Середня вага мишей складала (14,5±0,6) г. Тварини зберігали звичайну активність, добре їли, їх дихальні шляхи були вільними. Слизова оболонка глотки виглядала рожевою та вологою | Тварини виглядали більш млявими, малорухливими, погано харчувалися. Середня вага мишей складала (12,6±0,5) г. Біля присінку носа — накопичення густого слизу та кірок. Слизова оболонка — блідо-рожева, погано зволожена |

*Таблиця 2*

**Детекція клітин людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до альфа-сателітної ДНК людини**

| | 1 доба n = 4 | 5 діб n = 4 |
|---|---|---|
| Селезінка | 0 | 0 |
| Легені | 4 | 0 |
| Епітелій носової оболонки | 0 | 0 |

*Примітка*. n — кількість тварин, проаналізованих на наявність альфа-сателітної ДНК людини в кожний проміжок часу після введення клітин.



1 2 3 4 5 6 7 8

**Рис. 1.** Результати ПЛР на наявність альфа-сателітної ДНК людини в тканинах мишей з атрофічним ринітом після введення їм МСК матриксу пуповини людини через добу (1–3) та 5 діб (5–7): 1 — селезінка; 2 — легені; 3 — епітелій носової порожнини; 4 — маркер молекулярної ваги 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 5 — селезінка; 6 — легені; 7 — епітелій носової порожнини; 8 — ДНК МСК людини (позитивний контроль)

чать про позитивний вплив внутрішньовенного введення МСК з Вартонового студня пуповини людини на загальний стан піддослідних тварин та стан їх слизової оболонки на рівні верхніх дихальних шляхів.

*Детекція ксеногенних МСК людини у мишей з індукованим атрофічним ринітом.* Виявлення ДНК людини проводили в селезінці, легенях та епітелії слизової оболонки мишей з використанням полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до альфа-сателітної ДНК людини. Аналіз проводили через 1 та 5 діб після трансплантації клітин, в кожний проміжок часу тестували по 4 тварини. Отримані результати представлені в табл. 2 та на рис. 1.

У результаті проведених досліджень показано, що через 1 добу ДНК людини детектується в легенях піддослідних тварин, що узгоджується з даними інших авторів [12]. На п'яту добу ні в одному з досліджених органів ДНК людини виявлена не була.

**Висновки**

1. Шляхом інтраназальної інокуляції мишей *Pasteurella multocida* отримана модель атрофічного риніту.

2. Клінічними спостереженнями підтверджений позитивний вплив внутрішньовенного введення МСК з Вартонового студня пуповини людини на загальний стан піддослідних тварин.

3. За допомогою ПЛР в матеріалах від усіх проаналізованих тварин показана наявність ДНК донорських клітин в легенях через 1 добу після ін'єкції.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Маслова О. О., Шувалова Н. С., Сухорада О. М., Дерябіна О. Г., Кордюм В. А. Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин з матриксу пуповини людини. Пат. 74171, Україна, МПК C12N 5/00. № u201201939; заявл. 21.02.2012; опубл. 25.10.2012, Бюл. № 13. http://base.ukrpatent.org.
2. Settipane R. A., Lieberman P. Update on non-allergic rhinitis // Ann Allergy Asthma Immunol.— 2001.— 86.— P. 494–507.
3. Middleton E. Jr. Chronic rhinitis in adults // J Allergy Clin Immunol.— 1988.— № 81.— P. 971.
4. Scheller E. L., Krebsbach P. H., Kohn D. H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation // J Oral Rehabil.— 2009.— 36, N 5.— P. 368–389.
5. Gillespie L. N., Shepherd R. K. Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron protection // Eur J Neurosci. Author manuscript; available in PMC 2007 March 25.
6. Lau A. N., Goodwin V., Kim C. F., Weiss D. J. Stem Cells and Regenerative Medicine in Lung Biology and Diseases // Mol Ther.— 2012.— 20, N 6.— P. 1116–1130.
7. Jordan R. W., Roe J. M. An experimental mouse model of progressive athrophic rhinitis of swine // Veterinary microbiology.— 2004.— 105.— P. 201–207.
8. Мінін Ю. В., Карась А. Ф., Кучеренко Т. І., Карась Г. А., Тарасов О. А. Експериментальна модель атрофічного риніту інфекційного генезу // Ринологія.— 2012.— № 4.— С. 40–45.
9. Deryabina O., Maslova O., Sukhorada O., Kyryk V., Kordium V. Diversity of umbilical cord MSC and their variability during passaging *ex vivo* // Abstracts of the World Conference on Regenerative Medicine, 2–4 November.— Leipzig, Germany, 2011.
10. Maslova O., Deryabina O., Kordium V. The evaluation of the morphological and phisiological characteristics of the umbilical cord matrix mesenchymal stem cells as criteria of the suitability for the clinical usage // IV International Life Sciences Students' Conference Book of Abstracts.— 2010.— P. 57.
11. Biase F. H., Maurнcio Machaim Franco, Luiz Ricardo Goulart, Robson Carlos Antunes Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues // Genet. Mol. Biol.— 2002.— 25, № 4.— P. 313–315.
12. Lee R. H. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells rembolized in lung are active top sectere the anti-inflammatory protein TSG-6 // Cell Stem Cell.— 2009.— 5.— P. 54–63.

**DERYABINA O. G.[1, 3], SHUVALOVA N. S.[1], KOVALCHUK M. V.[1, 2], MININ Y. V.[3], DERIABIN O. M.[4], KORDIUM V. A.[1, 2]**

[1] *State Institute «Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS», Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska str., 67, e-mail: oderyabina@gmail.com*

[2] *Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net*

[3] *State Institute «Institute of otolaryngology after prof. Kolomiychenko O. S. NAMS», Ukraine, 03057, Kiev, Zoologichna str., 3*

[4] *State Institute of Biotechnologiesand Strains of Microorganisms, Ukraine, 03151, Kiev, Donetskaya str., 30, email: don.lmb@gmail.com*

**INFLUENCE OF XENOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION ON ATROPHIC RHINITIS IN MICE**

***Aims.*** Studying of xenogeneic MSC efficacy in treatment of atrophic rhinitis in mice and detection of human DNA in recipient different organs. ***Methods.*** Molecular biology and cell biology methods, animal model obtaining. ***Results.*** Intravenous injection of human MSC into model mice showed positive effect on clinical state of experimental animals. Human DNA can be detected by PCR during one day in lungs of mice received treatment. ***Conclusions.*** Model of atrophic rhinitis was obtained by intranasal inoculation of mice with Pasteurella multocida. Clinical studies confirmed positive effect of human MSC on general state of experimental animals. Donor human DNA was detected in lungs of mice during 1 day.

*Keywords*: atrophic rhinitis, MSC, PCR.