

*На правах рукописи*

**Свистушкин Михаил Валерьевич**

**Экспериментальное обоснование применения мезенхимных стромальных  
клеток в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани**

14.01.03 – Болезни уха, горла и носа

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Старостина Светлана Викторовна**

**Научный консультант:**

доктор химических наук, доцент

**Тимашев Пётр Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Гарашенко Татьяна Ильинична** – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии Федерального медико-биологического агентства", учёный секретарь; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, факультет дополнительного профессионального образования, кафедра оториноларингологии, профессор кафедры

**Кирасирова Елена Анатольевна** – доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии имени Л.И. Свержевского» Департамента здравоохранения города Москвы, научно-исследовательский отдел реконструктивной хирургии полых органов шеи заведующий отделом

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»

Защита диссертации состоится «16» декабря 2021 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.07 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент

**Дикопова Наталья Жоржевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Рубцовые повреждения голосового отдела гортани приводят к стойкому нарушению голосовой и дыхательной функций (Нажмудинов И.И. и др., 2019; Ремакль М., 2014). Причины их формирования чрезвычайно многообразны: острое и хроническое воспаление, избыточные голосовые нагрузки, травма любой этиологии, в том числе при хирургических вмешательствах и эндотрахеальной интубации (Гаращенко Т.И. и др., 2015; Friedrich G. et.al., 2013; Hantzakos A. et.al., 2019; Hirano S. et.al., 2005).

Рубцы голосовых складок (ГС) характеризуются пространственной дезорганизацией, дисбалансом белков внеклеточного матрикса собственной пластинки ГС, замещающихся утолщенными и хаотично расположенными пучками коллагена (Hirano S. et.al., 2003; Allen J. 2010; Friedrich G. et.al., 2013). В фибротический процесс может вовлекаться щито-черпаловидная мышца, внутренняя надхрящница, хрящ и область передней комиссуры, результатом чего является несмыкание, отсутствие колебаний ГС, формирование стеноза голосового отдела гортани (Нажмудинов И.И. и др., 2019; Ремакль М., 2014).

В настоящее время лечебная тактика при рубцах ГС основывается на следующих принципах. В профилактике и на ранней стадии формирования рубцов определенную роль играют глюкокортикостероиды, антибиотики, муколитическая и антирефлюксная терапия (Крюков А.И. и др., 2019; Friedrich G. et.al., 2013; Benninger M.S. et.al., 1996). Фонопедия показывает хорошие результаты при небольших рубцах и применяется как изолированно, так и дополнительно в послеоперационном периоде (Remacle M. et.al., 2001). Хирургическое лечение рекомендуют проводить не ранее, чем через 6 месяцев после формирования рубца (Remacle M. et.al., 2001; Martínez Arias, À. et.al., 2010). Целью операций является увеличение объёма, медиализация ГС и улучшение её эластичности, для чего применяется обширный ряд хирургических методик, включающих эндоларингеальные инъекционные и имплантационные медиализации, медиализационную тиропластику, отсепаровку эпителия от рубца, внутрислизистые имплантации синтетических препаратов, например, на основе гиалуроновой кислоты и аутологичных тканей, таких как жир и фасции, а также различные комбинации этих техник и лазерное воздействие на рубцовую ткань (Ремакль М., 2014; Sataloff R.T. et.al., 1997; Neuenschwander M.C. et.al., 2001; Schneider B. et.al., 2003; Tsunoda K. et.al., 2005; Mortensen M.M. et.al., 2008; Finck C.L. et.al., 2010; Sulica L. et.al., 2010). В случаях рубцового стеноза голосового отдела гортани эффективным является восстановление просвета с помощью пластики лоскутами слизистой оболочки на ножке, установка эндоларингеальных стентов, расширяющих просвет гортани и предотвращающих контакт раневых поверхностей, использование CO<sub>2</sub> лазера (Цветков

Э.А., Павлов П.В., Попов А.В., 2000; Свистушкин В.М., Старостина С.В., Волкова К.Б., 2016; Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Кирасирова Е.А., 2017; Нажмудинов И.И., Гусейнов И.Г., Давудов Х.Ш., 2020; Вавин В.В. и соавт., 2019, 2020.; Нажмудинов И.И. и соавт., 2019).

Несмотря на разнообразие методик, их результат в реабилитации голосовой функции непредсказуем и существенно ограничен. Данная проблема связана с тем, что существующие методы уменьшают потерю воздуха и усталость при фонации, но не восстанавливают структуру собственной пластинки слизистой оболочки ГС, которая обеспечивает необходимые для её вибрации биомеханические свойства. (Friedrich, G. et.al., 2013; Graupp, M. et.al., 2015; Mattei, A. et.al., 2017).

Технологии, относящиеся к регенеративной медицине, открывают для клиницистов новые перспективы в разработке методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями ГС, и в последнее время интерес к её достижениям в мировой оториноларингологии значительно возрос (Hirano S. 2005; Bartlett R.S. 2011; King S.N. et.al., 2012). Идея, заложенная в такие медицинские стратегии, заключается в восстановлении нормальной структуры и функции тканей ГС на клеточном и молекулярном уровне за счёт целенаправленной, контролируемой активации пролиферации и дифференцировки прогениторных клеток, нормализации синтеза компонентов межклеточного матрикса и ограничения интенсивности воспалительного процесса (Ito J. 2015; Hiwatashi N. et.al., 2017; Vizoso F. et. al., 2017). Терапевтическими агентами, имплантируемыми в область повреждения, при этом являются клетки из различных источников, несущие их матрицы (скаффолды), сигнальные молекулы и тканеинженерные конструкции (Hirano S. et.al., 2003; Duflo S. et.al., 2006; Kutty J.K., 2009; Kishimoto, Y. et. al., 2010; Fishman J.M. et.al., 2016; Li L. et. al., 2016; Wingstrand V.L. et.al., 2016).

На сегодняшний день исследование регенерации ГС при рубцовых повреждениях проводится множеством международных команд, некоторые разработанные терапевтические методы апробированы в клинических испытаниях (Hirano, S. et.al., 2016; Mattei, A. et.al., 2018; Hertegård, S. et.al., 2020; Mattei, A. et.al., 2020). Однако остаются открытыми многие вопросы как в изучении механизмов регенерации ГС, выборе эффективного и безопасного источника клеток, подборе скаффолдов и тканеинженерных комплексов, так и в подходах к проведению доклинических исследований, которые позволят результативно транслировать разрабатываемые технологии в клиническую практику.

**Цель исследования:** Изучение потенциала мезенхимных стромальных клеток в восстановлении морфологических и биомеханических характеристик голосовых складок в эксперименте *in vivo* при рубцовых повреждениях.

**Задачи исследования:**

1. Усовершенствовать экспериментальную модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных для обеспечения её воспроизводимости при восстановлении структуры голосового отдела гортани методами регенеративной медицины.
2. Оценить возможность применения клеточных продуктов на основе мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга человека и клеточного носителя – полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибринового геля *in vivo* при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок на экспериментальной модели.
3. На экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок определить эффективность восстановления морфологических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных – в суспензии; человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ-фибриновом гелем.
4. Оценить возможности восстановления локальных биомеханических свойств голосового отдела гортани с использованием МСК костного мозга: аутологичных – в суспензии; человеческих – в суспензии и в комплексе с ПЭГ-фибриновом гелем – на экспериментальной модели рубцового процесса голосовых складок.

**Научная новизна исследования:**

1. Данная работа является первым отечественным исследованием, показывающим возможности МСК костного мозга в восстановлении структуры голосового отдела гортани при рубцовых повреждениях.
2. Впервые в рамках одного исследования проведено экспериментальное обоснование эффективности репарации рубцовых повреждений голосового отдела гортани с помощью имплантации аутологичных и человеческих МСК.
3. Впервые на экспериментальной модели *in vivo* показаны возможности использования ПЭГ-фибринового геля и его комплекса с МСК костного мозга человека при восстановлении рубцовых повреждений голосовых складок.
4. Впервые дана комплексная оценка влияния МСК костного мозга на восстановление коллагеновых структур голосовых складок при рубцовых повреждениях.
5. Впервые показана эффективность МСК костного мозга в восстановлении локальных биомеханических свойств голосовых складок при рубцовых повреждениях.

**Теоретическая и практическая значимость исследования:**

1. Усовершенствованная модель хронического рубцового процесса голосовых складок на лабораторных животных может быть использована в дальнейших экспериментальных

исследованиях по разработке способов восстановления структуры голосового отдела гортани с помощью методов регенеративной медицины и других новых технологий.

**2.** Полученные результаты достоверно и наглядно показывают механизмы восстановления голосовых складок при имплантации МСК костного мозга после иссечения рубца и являются основой для применения таких технологий в клинической практике, дальнейшей разработки новых методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани.

**Реализация результатов работы.** Экспериментальная модель, материалы и методы исследования, основные научные положения и выводы исследования используются в научно-исследовательских работах кафедры болезней уха, горла и носа и института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский Университет). Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре болезней уха, горла и носа при изучении дисциплины «инновации в оториноларингологии» для студентов, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский Университет).

**Соответствие диссертации паспорту специальности.** Научные положения, отраженные в данном диссертационном исследовании, соответствуют паспорту специальности 14.01.03 – болезни уха, горла и носа и области исследования специальности, конкретно – пунктам 1 (исследования по изучению этиологии, патогенеза и распространения ЛОР-заболеваний) и 3 (экспериментальная и клиническая разработка методов лечения ЛОР-заболеваний и внедрение их в клиническую практику).

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведения исследования, в том числе самостоятельно проводил эксперименты, связанные с хирургическими методами на лабораторных животных. Диссертант лично проводил сбор материала, его анализ и статистическую обработку данных. Основные результаты исследования оформлены диссертантом в виде публикаций и доложены на российских и международных конференциях.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность и обоснованность результатов работы основана на соответствии дизайна исследования поставленным задачам, адекватных размерах экспериментальных групп, тщательном соблюдении методик исследования, применении комплекса современных методов оценки результатов. Статистический анализ результатов проводился с использованием: языка программирования R (версия 3.6.1) в программе R medium studio версии 1.0.153; программы GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.); программы Statsoft Statistica 64. Достоверность первичной документации исследования подтверждена их экспертной оценкой.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Мезенхимные стромальные клетки костного мозга при имплантации в острую фазу раны голосовой складки кролика после иссечения рубца увеличивают степень регенерации голосовых складок, приближая её структуру и биомеханические свойства к нативным, по сравнению с дефектами, репарация которых проходит без введения клеток.
2. Использование полиэтиленгликоль-фибринового геля и его комплекса с МСК костного мозга человека уменьшает интенсивность кровотечения во время операции, не увеличивает риск дыхательных нарушений и делает возможным улучшить результаты клеточной терапии повреждений голосовых складок кролика в конечной точке наблюдения.
3. Способность мезенхимных стромальных клеток костного мозга уменьшать образование рубцов и улучшать механические свойства голосовых складок кролика после острой травмы может быть перенесена на потенциальную клиническую модель иссечения рубца голосовых складок с последующей имплантацией мезенхимных стромальных клеток костного мозга.

**Апробация результатов исследования.** Основные материалы диссертации доложены на форуме «Наука будущего – наука молодых» (Севастополь, 2015); научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО «Актуальное в оториноларингологии» (Москва, 2019); VIII Петербургском форуме оториноларингологов России. (Санкт-Петербург, 2019). Собрании Европейского отдела Международного общества тканевой инженерии и регенеративной медицины (TERMIS EU 2019); (Родос, Греция, 2019); VII Троицкой конференции с международным участием "Медицинская Физика" (ТКМФ-7); (Троицк 2020). IX Петербургском форуме оториноларингологов России (Санкт-Петербург, 2020); IV Сеченовском международном биомедицинском саммите 2020 (SIBS, 2020) (Москва, 2020). 13-м Конгрессе Европейского Ларингологического общества (ELS Meeting, 2021, on-line); IX Международном междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи (Москва, 2021); 47-м Конгрессе Европейского общества искусственных органов (47th ESAO Congress, 2021, Лондон, on-line); XX съезде оториноларингологов России (Москва, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 12 печатных работ: 3 статьи в отечественных рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и Перечня рецензируемых изданий Университета, из них - 1 статья индексируется в SCOPUS, (Q3); 2 статьи в зарубежных изданиях, индексируемых в SCOPUS, (Q1 и Q2); 7 тезисов в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 196 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, характеризующей материалы и методы

исследования, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст документирован 7 таблицами, 56 рисунками. Указатель литературы содержит 237 наименований, из них 28 отечественных источников и 209 зарубежных.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В исследовании использованы 48 лабораторных кроликов весом 3,0-3,5 кг. Применена экспериментальная модель рубцового процесса голосового отдела гортани – рубец, развившийся на месте резецированного участка ГС: такой дефект создавался всем животным, включённым в работу. Основной блок экспериментов работы разделялся на основании источника МСК на две части: 1) эксперименты, в которых использовались аутологичные МСК костного мозга (кроликов); 2) эксперименты, в которых применялись МСК костного мозга человека. Через 3 месяца после 1-й операции рубец ГС иссекался и во вторичную рану осуществлялась имплантация клеточного продукта. Экспериментальные группы формировались на основании типа вводимого продукта. В исследовании с аутологичными МСК животные были разделены на две группы по 6 кроликов. 1-я группа – контрольная, во вторичную рану вводился физиологический раствор. Животным 2-й экспериментальной группы вводилась суспензия предварительно полученных аутологичных МСК. В исследовании с МСК костного мозга человека помимо МСК в суспензии применялся комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК, соответственно были сформированы следующие 4 экспериментальные группы по 6 животных в каждой: группа 1 - МСК костного мозга человека в суспензии; группа 2 - комплекс МСК с ПЭГ-фибриновым гелем; группа 3 - ПЭГ-фибриновый гель без клеток; группа 4 - физиологический раствор. Через 3 месяца животные выводились из эксперимента, образцы ГС направлялись на оценку морфологических и биомеханических свойств. В качестве групп чистого контроля были использованы интактные ГС кролика из биобанка. В исследовании с МСК человека также проводилась оценка интраоперационного кровотечения, оценка дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде (для всех животных групп 1-4) и оценка распределения и сохранения МСК человека в ГС кролика на 3-й день после имплантации (дополнительно по 3 животных групп 1 и 2). До начала экспериментов с МСК человека для исследования биологических характеристик ПЭГ-фибринового геля *in vivo* на ранних сроках была выполнена его подкожная имплантация 8 лабораторным крысам.

### **Хирургические и клеточные методы, использованные в экспериментах**

Для обеспечения безболезненности манипуляций и миорелаксации использовалась медикаментозная аналго-седация путём внутримышечного введения двухкомпонентного



препарата, содержащего тилетамин и золазепам (Золетил 100) из расчета 10-15 мг/кг препарата и раствора ксилазина (Рометар) 1-2 мг/кг. Для визуализации гортани использовался ригидный эндоскоп KarlStorz-Hopkins 0° 4.0 мм и клинок для оротрахеальной интубации по Miller C № 1. Дефект ГС создавался с помощью чашеобразных щипцов с диаметром захватывающей поверхности 2 мм и длиной 18см.

**Усовершенствование и отработка воспроизводимости экспериментальной модели хронического рубцового процесса голосовых складок кролика.** Лабораторные кролики в количестве 12 особей были разделены на две равные группы, различающиеся размером формируемого дефекта: 1-й – однократное выкусывание участка правой ГС в области средней трети 2 мм чашеобразными щипцами; 2-й – удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки ГС до поверхностных слоёв щито-черпаловидной мышцы на протяжении 1/3 ГС с отступом 3 мм от передней комиссуры (Рисунок 1). Оценка результатов формирования рубца проводилась через 3 месяца. Критерием оценки служила возможность чётко визуально и тактильно определить границы рубцового дефекта. Для оценки статистической значимости различий использовался точный критерий Фишера, уровень статистической значимости принят при  $p < 0,05$ .

**Создание модельного дефекта рубцового повреждения голосовых складок у животных экспериментальных групп.** Всем животным создавался дефект ГС 2-го типа. В эксперименте, посвященном аутологичным МСК, создавался дефект правых ГС, а в эксперименте с ксеногенными МСК человека – левых, что было обусловлено доступностью используемого хирургического инструментария (Рисунок 1).

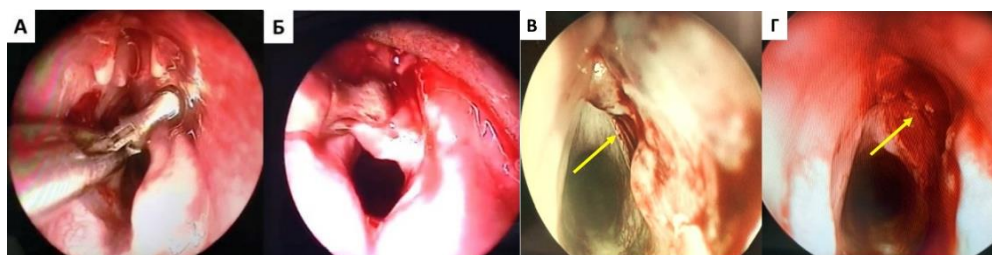


Рисунок – 1. Типичная эндоларингоскопическая картина кролика при создании дефекта голосовой складки: А – подведение щипцов на правую сторону к средней 1/3 правой ГС ; Б – захват и тракция тканей ГС; В – дефект 1-го типа - однократное выкусывание. Г - дефект 2-го типа - удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки на протяжении 1/3 голосовой складки (дефекты указаны стрелками); эндоскоп 0°

**Имплантация клеточных продуктов аутологичных МСК костного мозга и МСК костного мозга человека в голосовые складки кроликов.** Операции данного этапа проводились через 3 месяца после создания дефекта ГС. Рубец ГС иссекался с помощью чашеобразных щипцов, непосредственно после этого проводилась имплантация клеточных

продуктов путём инъекции в край вторичной раны ГС. В исследовании с аутологичными МСК объём имплантата составлял 100-150 мкл суспензии солевого раствора ( $1 \times 10^5$ ) МСК, с ксеногенными МСК человека – 500 мкл ( $5 \times 10^5$ ) МСК. В группах, где использовался ПЭГ-фибриновый гидрогель и комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК два компонента геля: фибриноген, содержащий МСК или без них, и тромбин смешивались в шприце 1,0 мл в пропорциях 1:1 (по 0,5 мл) и имплантировались через 60-90 сек. при визуальных признаках начала полимеразации. В экспериментальных группах рубцов без имплантации аналогичным образом вводился соответствующий объём физиологического раствора.



Рисунок – 2. Интраоперационные эндоскопы при имплантации клеточных продуктов в голосовые складки кролика: А – типичная эндоскопическая картина после имплантации суспензии МСК (стрелка); Б – типичная эндоскопическая картина после имплантации комплекс ПЭГ-фибринового геля с МСК костного мозга человека (стрелка); эндоскоп 0<sup>0</sup>

**Получение клеточного продукта МСК.** Для животных в исследовании с аутологичными МСК между хирургическими вмешательствами на гортани осуществлён забор костного мозга, который служил источником для культивирования аутологичных МСК. В условиях медикаментозной аналгоседации проводилась пункция проксимальных эпифизов обеих бедренных костей стерильной иглой (14G) на глубину 3-4 см. Аспират костного мозга в объёме 2-3 мл транспортировался в лабораторию. Культивирование МСК проводилось с использованием стандартных протоколов из первичной культуры мононуклеарных клеток костного мозга в CO<sub>2</sub>-инкубаторах (5% CO<sub>2</sub> и 95% атмосферного воздуха). По достижении субконфлюэнтного монослоя клетки пассировали, для этого флаконы промывали раствором Версена или Хэнкса, и далее добавляли 0,25% трипсин в растворе Версена для открепления клеток. Полученную суспензию клеток ресуспендировали в свежей культуральной среде и переносили в новый флакон в соотношении 1:3. Криоконсервацию клеток осуществляли в среде, содержащей 30% DMEM/F-12, 10% диметилсульфоксида (ДМСО), и 60% телячьей эмбриональной сыворотки.

**Выделение и культивирование МСК костного мозга человека.** Первичная культура МСК костного мозга человека была изолирована из биопсийного материала, предоставленного Биобанком Сеченовского Университета и забранного у здоровых добровольцев при подписании информированного согласия. Иммунофенотипирование проводилось в соответствии со стандартной панелью поверхностных маркеров (CD11b, CD14, CD19, CD29, CD34, CD45, CD90,

CD105) на микрофлюидном сортере SH800S (Sony biotechnology, США). Клетки культивировались в стандартных условиях при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в полной ростовой среде следующего состава: DMEM/F12 (1:1). Смена среды осуществлялась каждые 2-3 дня. В работе использовали клетки не старше 4 пассажа.

**Формирование полиэтиленгликоль (ПЭГ)-фибриновой гидрогелевой системы.** Для формирования гидрогелевой системы использовали модификацию фибриногена с помощью O,O'-бис[2-(N-сукцинимидил-сукциниламино)этил] поли(этиленгликоль) (PEG-NHS; Sigma Aldrich, Германия). PEG-NHS растворяли в стерильном фосфатном буфере в концентрации 1,5 мг/мл. К раствору фибриногена (25 мг/мл) добавляли полученный раствор PEG-NHS в молярном соотношении 5:1 (PEG-NHS : фибриноген). Реакция осуществлялась в течение 2 ч при температуре 37 °С. Гель формировался при добавлении к модифицированному фибриногену равного объема тромбина с концентрацией 5 U/мл.

**Трансдукция МСК костного мозга человека для экспрессии зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP).** Для визуализации введенных в ГС клеток МСК трансдуцировали с помощью рекомбинантного лентивируса LVT TagGFP2 (Евроген, Россия) для стабильной экспрессии флуоресцентного белка. При достижении 80-90% конфлюэнтности к клеткам добавляли 50 мкл суспензии вирусных частиц ( $0,5 \times 10^6$  трансдуцирующих единиц/мл) и 10 мкл Polybrene и инкубировали в течение 24 часов при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. При достижении 90% конфлюэнтности клетки снимали, промывали и сортировали с использованием клеточного микрофлюидного сортера Sony SH800. Трансдуцированные МСК добавлялись в гидрогелевую систему или солевой раствор и вводились согласно протоколу, описанному ранее.

### **Методы оценки результатов исследования**

**Метод оценки интенсивности интраоперационного кровотечения и дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде.** Исследование проводилось в работе с МСК человека. Интенсивность кровотечения оценивалась по 4-х балльной системе сразу после имплантации продукта, где 0 баллов соответствовали минимальной кровоточивости, 4 – максимальной. Выраженность дыхательных нарушений оценивалась по трём параметрам: 1) интенсивности стридора с помощью 3-х балльной системы: от 0 (свободное дыхание) до 3-х (выраженный стридор); 2) длительности стридора в часах до полного исчезновения; 3) ЧДД – количеству экскурсий грудной клетки за 1 мин через 10 минут после завершения операции. Для оценки межгрупповых различий в целом применялся критерий Краскела-Уоллиса, между группами по отдельности - критерий суммы рангов Уилкоксона. Уровень статистической значимости –  $p < 0,05$ , поправка на множественное сравнение – false discovery rate.

**Метод визуализации и оценка распределения МСК через 3 дня после имплантации в голосовые складки.** Замороженные срезы препаратов ГС толщиной до 20 мкм изучены при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 с модулем AiryScan и GaAsP детектором (Carl Zeiss, Германия).

**Морфологические и морфометрические методы исследования препаратов голосовых складок контрольных и экспериментальных групп через 3 месяца после имплантации клеточных продуктов.** ГС иссекались, фиксировались в 10% нейтральном формалине и заливались в парафин. Микротомные срезы толщиной 4-5 мкм после депарафинизации окрашивались гематоксилином/эозином, пикросириусом красным. Препараты изучались в универсальном микроскопе Leica DM 4000 B LED и фотографировались с помощью камеры DFC 7000 T. Кроме стандартной световой микроскопии проводилась фазово-контрастная, темнопольная и поляризационная микроскопии. Вместе с классическим гистологическим анализом была проведена морфометрия в виде балльной оценки 11 морфологических признаков рубцовой ткани, каждый признак оценивался по 4-х балльной системе: 0 – отсутствие морфологических изменений по сравнению с нормой; 4 – максимальные изменения признаков для данного исследования. В эксперименте с аутологичными МСК для поиска значимых различий использовался критерий суммы рангов Уилкоксона, уровень статистической значимости принят  $p < 0,1$ . В эксперименте с МСК человека для этой цели был использован критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна, уровень статистической значимости –  $p < 0,05$ . Поправка на множественное сравнение в обоих случаях проводилась методом false discovery rate. Морфометрическое исследование толщины рубцов в обеих частях исследования и толщины собственной пластинки в группах чистого контроля проведено с помощью программного обеспечения Leica application suite version 4.9.0. Толщина рубца и собственной пластинки в случае интактной ГС оценивалась от глубокого края эпителиального пласта до края мышечной ткани в 5-15 участках, расположенных на расстоянии 400 микрометров друг от друга. Межгрупповые различия оценивались при помощи дисперсионного анализа ANOVA и критерия Тьюки. Уровень статистической значимости был принят  $p < 0,05$ .

**Морфологический метод исследования ПЭГ-фибринового геля при подкожном введении малым лабораторным животным.** В зависимости от сроков проведения морфологического исследования животные были разделены на 2 равные группы по 4 крысы в каждой: в первой опытной группе исследование проводилось через 3 дня после имплантации геля, во второй – через 7 дней, протокол подготовки препаратов аналогичен использованному для ГС.

**Метод иммуногистохимического исследования коллагенов I и III типов в препаратах голосовых складок контрольных и экспериментальных групп через 3 месяца после имплантации клеточных продуктов.** Исследование проводилось в работе с аутологичными МСК. Парафиновые срезы препаратов ГС толщиной 4 мкм депарафинизировали и регидратировали. В качестве первичных антител использовались моноклональные мышинные антитела к коллагену типа I (GTX26308, GeneTex, США) и к коллагену типа III (cat 251736, Abbiotec, США). В качестве вторичного антитела применяли поликлональные козьи антитела, конъюгированное с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы окрашивались диаминобензидином (ДАБ); (Thermo Fisher Scientific, США) и гематоксилином. Гистоморфометрический анализ проводился в программе CellProfiler версии 3.0.0. на фотографиях оценивались интенсивность окрашивания коллагена типов I и III (функция MeasureImageIntensity) и общая площадь ткани (функция MeasureImageAreaOccupied), определяемая по окраске гематоксилином. Результаты были представлены как отношение интенсивности окрашивания ДАБ к площади окраски гематоксилином, умноженное на 100% (относительное содержание коллагена). Межгрупповые различия оценивались при помощи двухфакторного дисперсионного анализа с post-hoc тестом Сидака для межгрупповых различий. Уровень статистической значимости был принят при  $p < 0,05$ .

**Метод атомно-силовой микроскопии.** Атомно-силовая микроскопия (АСМ) проводилось в работе с аутологичными МСК параллельно с морфологическим и ИГХ исследованиями. Поперечные сечения толщиной 17-19 мкм были получены из парафиновых блоков. АСМ-изображения трёх фиксированных срезов тканей каждой из 3-х группы были получены в воздушной среде в режиме количественного наномеханического картирования PeakForce (PeakForce QNM®) с использованием атомно-силового микроскопа MultiMode 8 с контроллером Nanoscope V и E-сканером (Bruker, США). Получение изображений АСМ проводилось с помощью зондов RTESPA-300 (Bruker) с номинальной жесткостью 40 Н/м, номинальной резонансной частотой 300 кГц и номинальным радиусом острия 8 нм. В эксперименте изображения  $7 \times 7$  мкм получали при частоте сканирования 1 Гц и разрешении  $512 \times 512$  пикселей. Одновременно записывались каналы топографии, сигнала ошибки обратной связи (сигнала рассогласования) и модуля Юнга (вычисленного по модели Герца). Модули Юнга были усреднены по 5 изображениям для каждого из 9 образцов. Для сравнения статистической значимости их различий использовался критерий Стьюдента, уровень статистической значимости был принят при  $p < 0,05$ . Необработанные АСМ -изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Nanoscope Analysis v.1.10 (Bruker).

**Метод оценки механических характеристик голосовых складок методом наноиндентирования в жидкой среде.** Исследование проводилось в работе с МСК человека.

Применялся наноиндентор Chiaro (Optics11, Netherlands) и зонд с кантилевером прочностью 0,05 Н/м и радиусом скругления наконечника 9,5 мкм. Индентирование проводилось в среде натрий-фосфатного буферного раствора при комнатной температуре, непосредственно сразу после вывода животного из эксперимента. Были исследованы от 4 до 6 образцов ГС из групп 1-4 и 6 образцов интактных ГС. Площадь, на которой проводилось определение модуля Юнга составляла 1000x1000 мкм с шагом по осям X и Y – 100 мкм. По полученным кривым "сила-смещение" при помощи программного обеспечения Optics11 Dataviewer, с использованием модели Герца соприкосновения круглого тела с плоской поверхностью, рассчитывали значение модуля Юнга. Значимость различий между экспериментальными данными определялась с помощью критерия Манна-Уитни. Порог статистической значимости принят при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Усовершенствование экспериментальной модели хронического рубцового процесса голосовых складок кролика

Однократного выкусывания участка ГС в области средней трети (дефект 1-го типа) оказалось недостаточным, при контрольной ларингоскопии через 3 месяца – рубец практически не визуализировался. Дефект большего размера – удаление слизистой оболочки и II-III слоёв собственной пластинки на протяжении 1/3 ГС с отступом 3 мм от передней комиссуры (дефект 2-го типа) – во всех случаях приводил к формированию объёмного рубца, который легко идентифицировался как визуально, так и при дотрагивании за счёт большей плотности по сравнению с окружающими тканями (Рисунок 3). Это позволяло выполнить его резекцию и тем самым создать вторичную рану ГС для имплантации клеточного продукта. Имелись различия между группами различия были статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

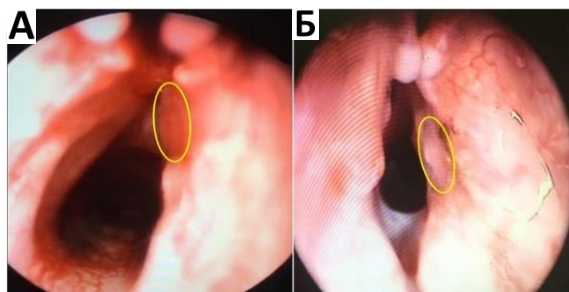


Рисунок – 3. Эндофотографии, демонстрирующие рубцовые изменения ГС, развившиеся через 3 месяца на месте модельного дефекта (желтые эллипсы): А – отсутствие четких границ рубца на месте однократного выкусывания ГС (дефект 1-го типа); Б – хорошо заметный рубец ГС после удаления слизистой оболочки и поверхностных слоёв щито-черпаловидной мышцы на протяжении 1/3 ГС (дефект 2-го типа)

### **Результаты морфологического исследования ПЭГ-фибринового геля при подкожном введении малым лабораторным животным на ранних сроках**

На 3-и сутки после операции имплантат сохранял целостную структуру, окружен жировой тканью и тонкой капсулой, ткань имплантата состояла из беспорядочных, но местами организованных тонких фибриновых волокон, не прослеживалось воспалительной реакции вокруг имплантата, за исключением немногочисленных макрофагов и лимфоцитов на его краях. Через 7 суток – сохранялась целостность имплантата, по-прежнему отсутствовала воспалительная реакция, определялось врастание в ткань имплантата тонкостенных сосудов, а также тяжелой грануляционной ткани, состоящей из фибробластов, макрофагов, лимфоцитов и многочисленных сосудов, заметного лизиса фибрина не было. Все это свидетельствует о том, что в первую неделю материал имплантата практически биоинертен.

### **Оценка интенсивности интраоперационного кровотечения и дыхательных нарушений**

При сравнении интенсивности кровотечения между группами в целом и между отдельными группами не были найдены статистически-значимые различия. Однако при сравнении значений объединенной группы 1 и 3 с объединенной группой 2 и 4 (разделение осуществлено исходя из того, что в группах 2 и 4 использовался ПЭГ-фибриновый гидрогель) выявлены статистически значимые различия:  $p=0,03945$  при меньшей интенсивности кровотечения в группах имплантации ПЭГ-фибринового геля. При сравнении интенсивности стридора, длительности стридора, ЧДД между группами в целом и по отдельности различия не были статистически значимыми: значение  $p$  от 0,9497 до 1.

### **Распределение мезенхимных стромальных клеток в голосовых складках**

При анализе микропрепаратов выявлено, что через 3 дня клетки присутствовали в месте имплантации. Клетки обнаружены только в тканях, непосредственно окружающих дефект ГС. Однако при использовании МСК в составе с ПЭГ-фибриновом гидрогелем отмечалась более высокая концентрация клеток (интенсивная зеленая флуоресценция) в месте введения (при изучении до 10 полей зрения) и их миграция в щито-черпаловидную мышцу (Рисунок 4).

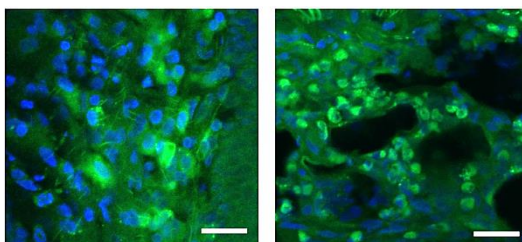


Рисунок – 4. МСК костного мозга человека, экспрессирующие green fluorescent protein, при введении в дефект голосовых складок кролика: слева – в виде суспензии, справа – в составе с ПЭГ-фибриновом гидрогелем. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, 3-й день (синяя флуоресценция – ядра клеток; зеленая – автофлуоресценция ткани; интенсивная зеленая флуоресценция – green fluorescent protein). Масштабный отрезок – 25 мкм

## Результаты морфологического, морфометрического и иммуногистохимического исследования препаратов голосовых складок после имплантации аутологических МСК

Через 3 месяца на месте операционного дефекта в центральной части ГС гистологическое изучение выявило рубцы слизистой оболочки. Развившиеся рубцы были выстланы неороговевающим многослойным плоским эпителием и состояли из плотной фиброзной соединительной ткани, представленной пучками коллагеновых волокон. В группе рубцов без имплантации (1-я группа) ткань рубца сформирована беспорядочно переплетающимися пучками коллагеновых волокон. Рубец в группе имплантации МСК (2-я группа), в отличие от первой, имел взаимно параллельную архитектуру коллагеновых волокон, то есть по структуре он приближается к нормальному строению слизистой оболочки (Рисунок 5). Кроме того, в опытной группе 2 рубцовая ткань содержит большее количество клеточных элементов.

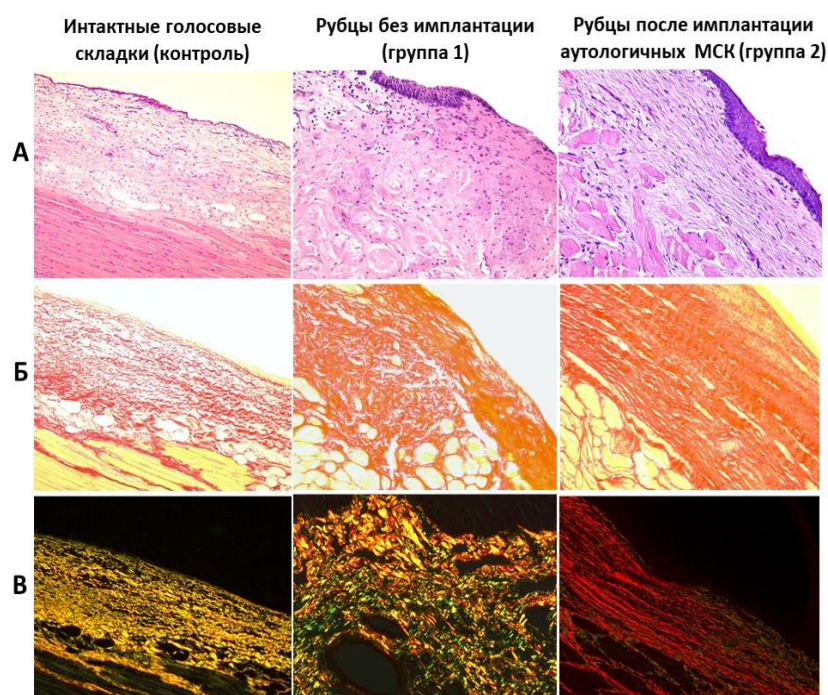


Рисунок – 5. Световая микроскопия гистологических препаратов голосовых складок: Контроль – интактные ГС; группа 1 – рубцы без имплантации; группа 2 – рубцы после имплантации МСК. А: окраска гематоксилин-эозин, увеличение x 100. Б: окраска пикросириусом красным, увеличение x 200. В: поляризационная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение x 200

Балльная оценка морфологических признаков выявила статистически значимые различия между рубцами после имплантации аутологических МСК и рубцами без имплантации по следующим показателям: уменьшение количества фибробластов, инфильтрация, дезорганизация коллагеновых волокон, плотность коллагеновых волокон с преобладанием альтерации в группе рубцов без имплантации ( $p < 0,1$ ). Морфометрическое исследование выявило заметную



тенденцию к уменьшению рубцово измененной собственной пластинки после имплантации МСК по сравнению с рубцами без имплантации ( $p=0,0613$ ); (Рисунок 6).

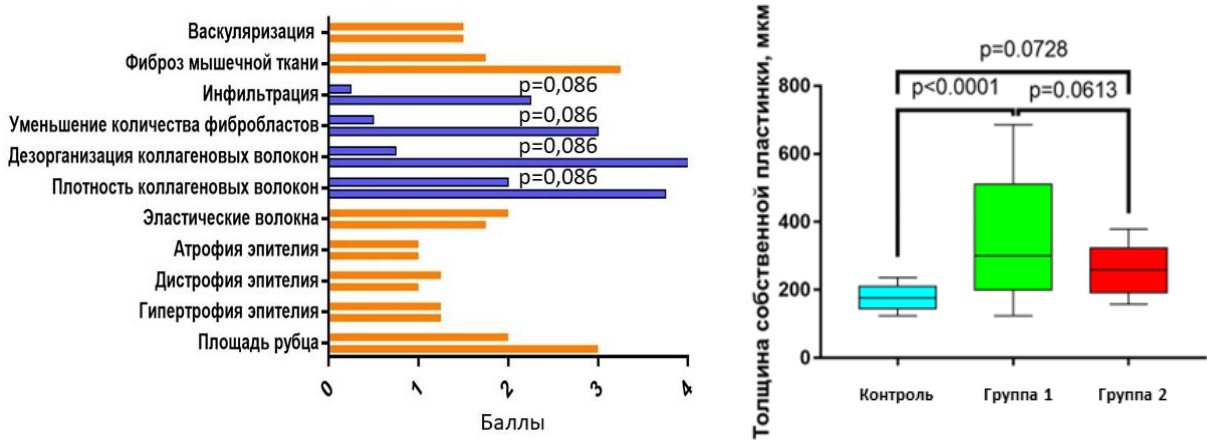


Рисунок – 6. Слева – медианные значения морфологических параметров в экспериментальных группах. Синим цветом выделены критерии, со статистически значимыми различиями между группами ( $p<0,1$ ). Полоски в каждом индексе соответствуют группе 1 (нижняя) и группе 2 (верхняя). Справа – результаты морфометрического исследования толщины рубцов в группах 1 и 2, толщины собственной пластинки в группе чистого контроля

По данным ИГХ исследования, в интактных ГС содержание коллагена I и III типов не имело значимых различий. В рубцах ГС без имплантации содержание коллагена III значительно уменьшилось - на 45,5% ниже, чем коллагена I типа ( $p<0,0001$ ). В группе имплантации аутологичных МСК процентное содержание коллагена III типа возвращалось к норме, между ними и интактными ГС не было выявлено значимых различий (Рисунок 7).

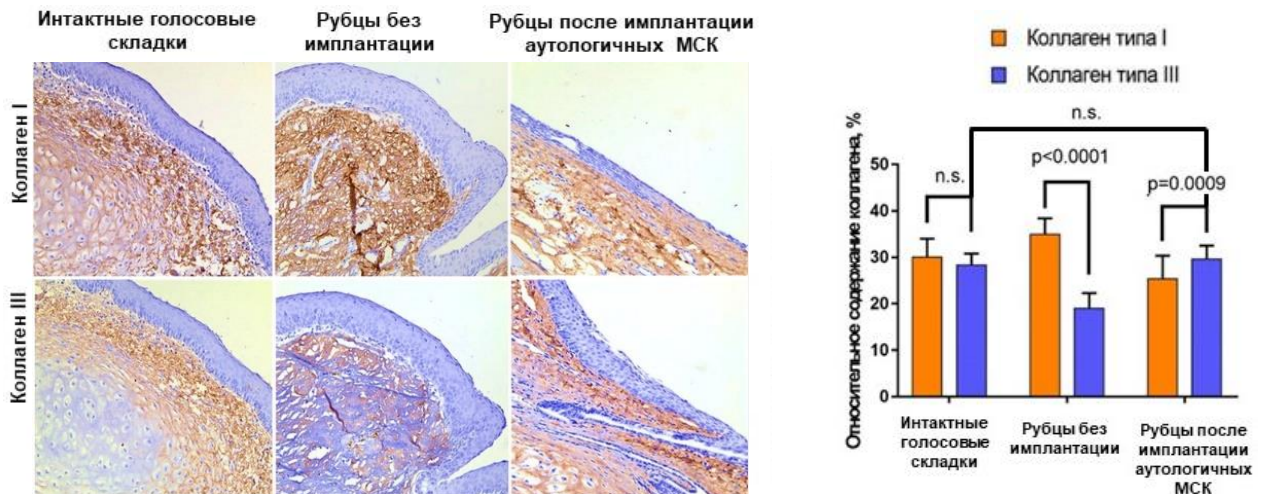


Рисунок – 7. Слева – иммуногистохимия, окрашивание (коричневый цвет) антителами к коллагену I типа (верхний ряд изображений) и III типа (нижний ряд изображений) препаратов ГС экспериментальных и контрольной групп, увеличение  $\times 200$ . Справа – Относительное содержание коллагена I типа и коллагена III типа по данным ИГХ исследования

## Результаты атомно-силовой микроскопии препаратов голосовых складок после имплантации аутологичных МСК

Исследование с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) интактных ГС показало, что в структуре внеклеточного матрикса (ВКМ) ГС кролика преобладают коллагеновые волокна диаметром 0.5-1.5 мкм, состоящие из плотно упакованных коллагеновых фибрилл. Пространство между волокнами заполнено отдельными коллагеновыми фибриллами и неволокнистым веществом матрикса (Рисунок 8). ВКМ оперированной ГС в группе 1 (рубцы без имплантации) характеризуется наличием толстых (несколько микрон) коллагеновых волокон с плотной укладкой фибрилл и даже целых областей, образованных параллельно уложенными фибриллами, при этом толстые коллагеновые волокна переплетаются между собой (Рисунок 8). Толстые коллагеновые волокна и широкие области с плотной укладкой коллагеновых фибрилл, наблюдаемые для ВКМ ГС группы 1, не характерны ГС после имплантации аутологичных МСК (группа 2). Морфология ВКМ для этой группы, визуализируемая АСМ, напоминает морфологию ВКМ интактной ГС. Следует отметить, что не только фибриллы внутри волокон, но и сами волокна имеют преимущественно продольное расположение (Рисунок 8). Усредненный модуль Юнга образцов интактных ГС составлял  $2,6 \pm 1,2$  ГПа, рубцов без имплантации  $7 \pm 3$  ГПа, рубцов после имплантации аутологичных МСК  $1,9 \pm 0,6$  ГПа. Значения статистически значимо повышались ( $p=0.013$ ) в группе рубцов без имплантации по сравнению с контрольной группой и возвращались к исходным значениям в группе рубцов после имплантации МСК ( $p=0,59$ ); (Рисунок 8).

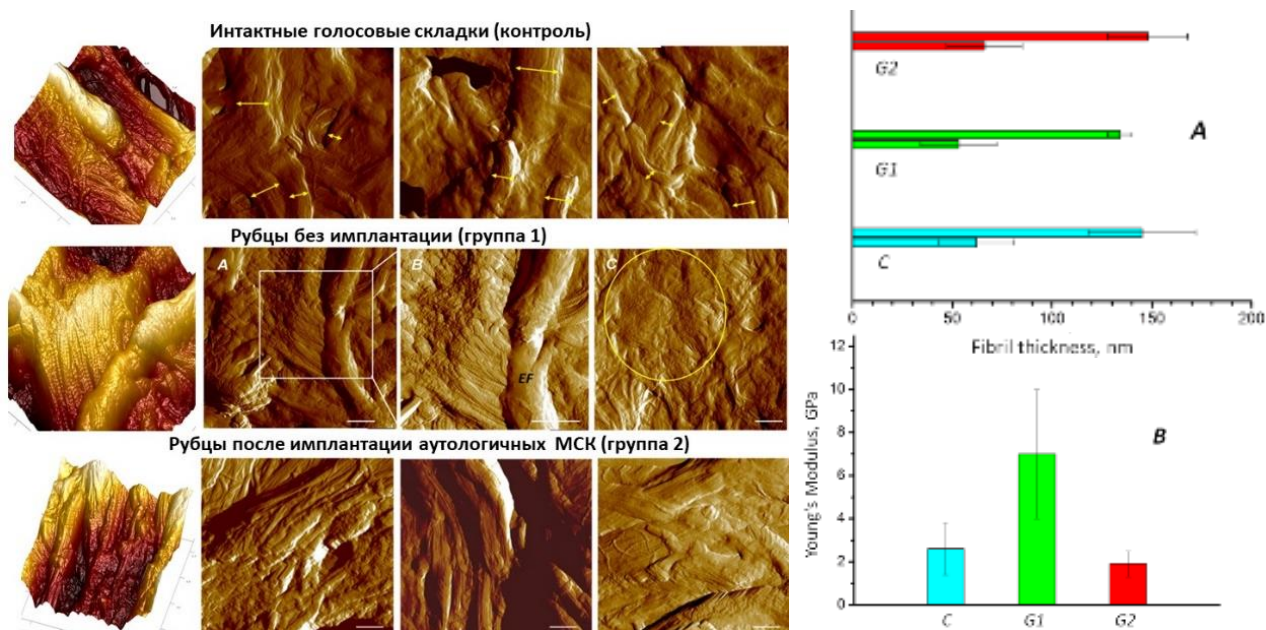


Рисунок – 8. Слева: **верхний ряд** – АСМ-визуализация внеклеточного матрикса интактной ГС (галерея изображений). Стрелками обозначены коллагеновые волокна разной толщины; **средний ряд** – типичные АСМ-изображения микроструктуры ВКМ рубца ГС опытной группы

1. А,С – 7x7 мкм, В – изображение с высоким разрешением выделенного участка изображения А. На изображении С - желтый эллипс указывает на область непрерывной плотной упаковки параллельных фибрилл. EF – эластическое волокно; **нижний ряд** – типичные АСМ-изображения микроструктуры ВКМ рубца ГС опытной группы 2. Указатель масштаба=1 мкм.  
*Справа:* Толщина фибрилл (А) и усредненный модуль Юнга (В) в коллагеновых структурах ВКМ слизистой оболочки интактных голосовых (С), рубцов ГС в группе 1 (G1) и группе 2 (G2).

Таким образом, аутологичные МСК костного мозга, введенные в рану ГС сразу после иссечения зрелого рубца, способствуют заживлению слизистой оболочки. Дефект слизистой оболочки не регенерирует полностью, однако в замещенной ткани рубцовые процессы выражены слабее: по морфологическим и биомеханическим характеристикам она приближена к нативной структуре ГС по сравнению с дефектами, репарация которых проходила без введения клеток.

### **Результаты морфологического и морфометрического исследования препаратов голосовых складок после имплантации МСК человека**

Морфологическое исследование в 4 группе (рубцы без имплантации), аналогично исследованию с аутологичными МСК выявило рубцы слизистой оболочки, развившиеся на месте операционного дефекта, площадь рубца достаточно обширна, в большинстве случаев выражено прорастание фиброзно-рубцовой ткани в мышечный слой. Рубцы опытной группы 1 (МСК человека в суспензии), замещающие дефект слизистой оболочки по размерам несколько меньше, чем в контрольной группе и составляющая их ткань более рыхлая. Рубцовая ткань делится на 2 слоя. Внутренний, сравнительно узкий, образован фибробластами, которые, как и коллагеновые волокна располагаются продольно. Наружный слой – широкий, образован фиброзной тканью, которая проросла в мышцы и изолировала отдельно оставшиеся мышечные волокна. В опытной группе 3 (ПЭГ-фибриновый гель) на месте бывшего дефекта формировалась рубцовая ткань, выстланная многослойным плоским эпителием. ПЭГ-фибриновый гель через 3 месяца не обнаруживался. По толщине и общей площади рубец практически не отличался от рубцов в группе 4. В опытной группе 2 (МСК человека + ПЭГ-фибриновый гель) на месте послеоперационного дефекта выявлена сравнительно рыхлая рубцовая ткань, не превышающая толщины интактной слизистой оболочки с продольной ориентацией коллагеновых волокон и фибробластов. При оценке морфологических критериев выявлены достоверные различия между опытной группой 2 (МСК человека + ПЭГ-фибриновый гель) и группой 4 (рубцы без имплантации) по следующим морфологическим признакам: площадь рубца, нерегулярность архитектоники коллагеновых волокон, плотность коллагеновых волокон, фиброз мышечной ткани, с преобладанием альтерации в группе 4 ( $p < 0,05$ ). По остальным парам сравнения после поправки на множественное сравнение различия не достигали значимого уровня (Рисунок 9).

При морфометрическом анализе рубцово изменённой собственной пластинки ГС наибольшая толщина выявлена в опытной группе рубцов без имплантации (4-я группа), среднее значение - 564.3мкм ( $\sigma = 191,6$  мкм). В экспериментальных группах 1, 2, 3 средние значения толщины рубцов были меньше - 290.5мкм ( $\sigma = 46,63$  мкм); 165.2мкм ( $\sigma = 46,19$  мкм); 311.1мкм ( $\sigma = 62,66$  мкм) соответственно. Средняя толщина собственной пластинки в интактных ГС в группе чистого контроля - 184.7мкм ( $\sigma = 55,25$ мкм). Статистический анализ показал значимые различия в толщине рубца между группами 1, 2, 3 при их попарном сравнении с рубцами без имплантации, при этом наибольшие различия наблюдались со 2-й опытной группы ( $p < 0,0001$ ). Значимые различия между толщиной собственной пластинки в группе чистого контроля и толщиной рубца во 2-й группе отсутствовали ( $p = 0.995$ ); (Рисунок 9).

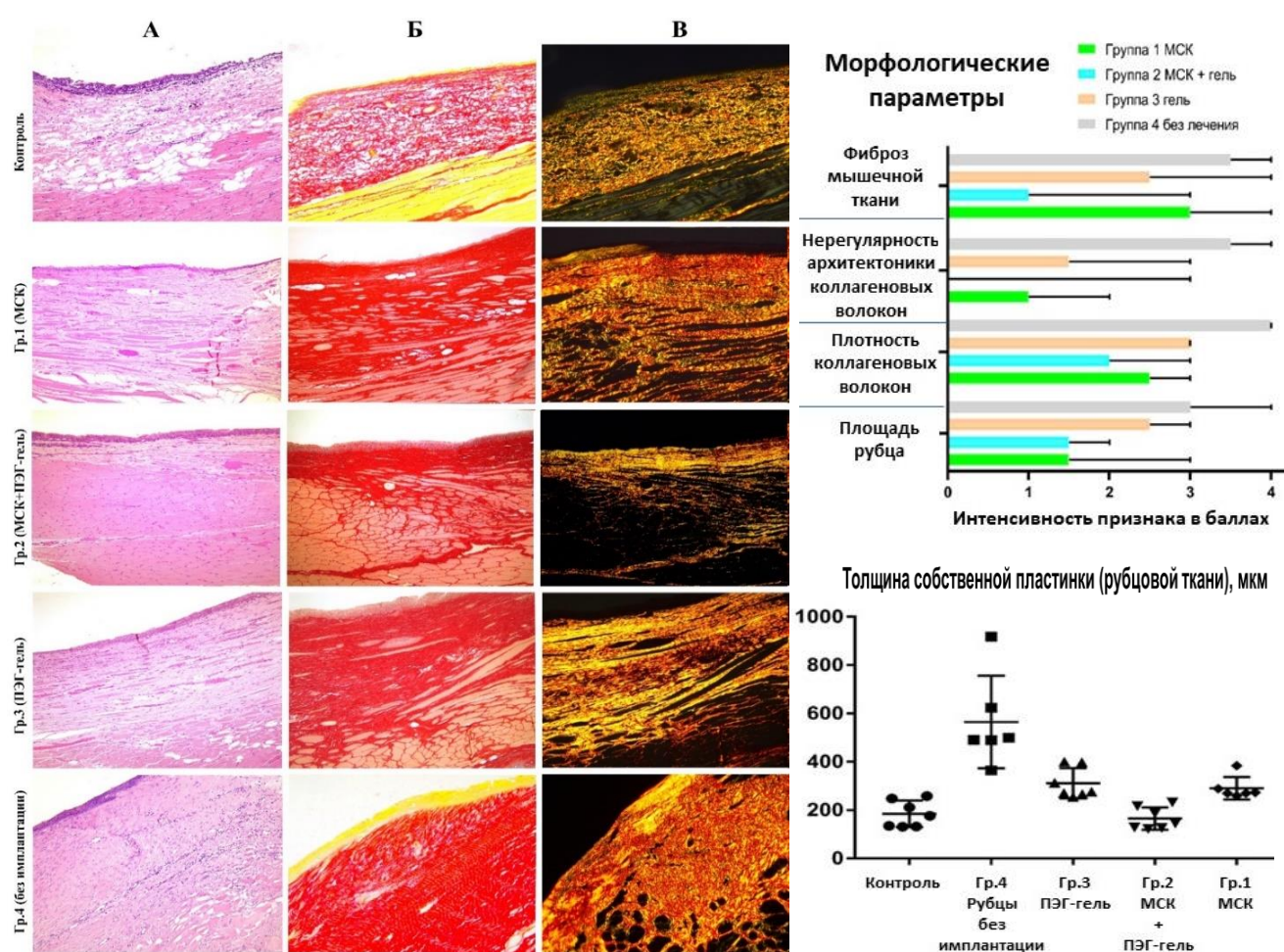


Рисунок – 9. Слева – световая микроскопия гистологических препаратов голосовых складок экспериментальных и контрольной групп. Строки – экспериментальные группы: контроль – интактная ГС; Гр.1 – 1-я группа (МСК костного мозга человека); Гр.2 – 2-я группа (МСК костного мозга человека + ПЭГ-фибриновый гидрогель); Гр.3 – 3-я группа (ПЭГ-фибриновый гидрогель); Гр.4 – 4-я группа (рубцы ГС без имплантации). Столбцы – различные окраски и режимы микроскопии: А – Окраска гематоксилин-эозин, увеличение  $\times 100$ ; Б – Окраска пикросириусом красным, увеличение  $\times 100$ ; В – Поляризационная микроскопия, окраска пикросириусом красным, увеличение  $\times 100$ . Справа сверху – Медианные значения морфологических параметров со статистически значимыми различиями в экспериментальных

группах 1-4 по данным балльной оценки. *Справа внизу* – Результаты морфометрического исследования толщины рубцовой ткани в экспериментальных группах 1-4, толщины собственной пластинки в группе чистого контроля. Чёрными фигурами обозначены средние значения измерений каждого образца ГС в группах

### Результаты исследования механических характеристик препаратов голосовых складок после имплантации МСК человека методом наноидентирования в жидкой среде

При наноиндентировании в жидкой среде модуль Юнга интактных ГС составил  $1.17 \pm 0.45$  кПа, что в 2,4-2,6 раз меньше, чем модуль Юнга рубцов ГС без имплантации ( $2.97 \pm 1.22$  кПа). В группе имплантации суспензии МСК человека (группа 1) средний модуль Юнга составил  $1.97 \pm 0.55$  кПа, что статистически значимо выше значений интактных ГС ( $p < 0,05$ ), но при этом значимо ниже по сравнению с рубцами без имплантации ( $p < 0,05$ ). Исследование ГС в группе, где применялся комплекс МСК человека и ПЭГ-фибринового геля не выявило статистически значимых различий модуля Юнга, среднее значение ( $1.15 \pm 0.25$  кПа) по сравнению с интактными ГС ( $p = 0,898$ ), в то же время по сравнению со всеми остальными экспериментальными группами: 1, 3, 4 - параметры были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ). Значения модуля Юнга в 3-й экспериментальной группе (имплантация ПЭГ-фибринового геля) находятся в диапазоне  $2.06 \pm 0.81$  кПа, что статистически значимо выше значений ГС интактных, группы 2 ( $p < 0,05$ ) и ниже значений ГС группы 4 ( $p < 0,05$ ); (Рисунок 10).

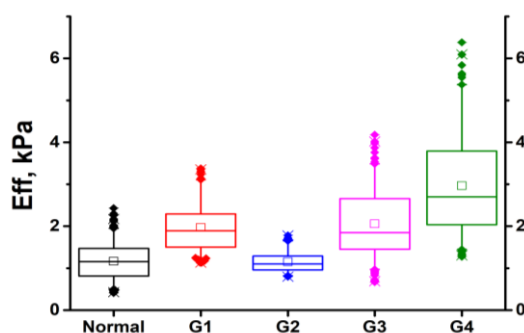


Рисунок – 10. Box-plot график на основе значений модуля Юнга голосовых складок, определенных методом наноиндентирования. Normal – интактные голосовые складки. G1 – группа 1 (суспензия МСК человека). G2 – группа 2 (комплекс МСК человека и ПЭГ-фибринового гидрогеля). G3 – группа 3 (ПЭГ-фибриновый гидрогель). G4 – группа 4 (рубцы голосовых складок без имплантации). Шкала – кПа.

Таким образом, в группе с используемым комплексом ПЭГ-фибринового геля с МСК отмечалась выраженное уменьшение как общей площади и толщины рубцовой ткани на месте послеоперационного дефекта по сравнению с группами, где были использованы МСК человека в суспензии, либо ПЭГ-фибриновый гидрогель, так и более близкие к параметрам нативных ГС биомеханические характеристики.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ**

В России клиническое применение клеточных технологий приобрело законодательную базу с 2017 года после вступления в силу Федерального закона № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» (БМКП). Для клиницистов ключевым моментом данного акта является понятие клеточной линии, являющейся неотъемлемой частью биомедицинского клеточного продукта: стандартизованная, воспроизводимая популяция клеток, культивируемая вне организма человека. Для любого варианта клеточной терапии требуется регистрация биомедицинского клеточного продукта с прохождением соответствующих доклинических и клинических испытаний и лицензированием его производства. На данный момент понятие «внутрибольничных исключений» (клеточные препараты, изготавливаемые для конкретной клинической ситуации под персональную ответственность лечащего врача) в отечественном законодательстве отсутствует, что с одной стороны защищает пациентов от теневого использования аутогенных препаратов, с другой – затрудняет накопление данных оценки эффективности в клинических исследованиях.

Перспективы внедрения в клиническую практику результатов проведённого исследования, основываются на следующих положениях. Первое – получение разрешения на клиническое исследование биомедицинского клеточного продукта, содержащего данный тип клеток; так, в России получено первое разрешение на клиническое исследование клеточного продукта для восстановления хряща коленного сустава в марте 2021г. (<https://minzdrav.gov.ru/news/2021/03/13/16256>). Второе – появление подзаконных актов, подобных «внутрибольничным исключениям» для аутологичных продуктов и введение понятия «минимально манипулированных клеточных продуктов». Третье – внедрение в клиническую оториноларингологию технологий регенеративной медицины, в которых используются продукты, содержащие МСК в составе выделенной фракции, но не производится культивирование клеток, что, соответственно, не требует процедур, регламентированных ФЗ № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах».

### **ВЫВОДЫ**

1. Экспериментальная модель рубцового процесса голосовых складок на лабораторных кроликах является воспроизводимой и позволяет визуально и тактильно идентифицировать рубец ( $p < 0,05$ ).

2. В первую неделю имплантат ПЭГ-фибринового геля не подвергается биодegradации и не вызывает воспалительной реакции со стороны окружающих тканей. Использование ПЭГ-фибринового геля в качестве клеточного носителя снижает интенсивность интраоперационного кровотечения ( $p=0,03945$ ), не увеличивает риск дыхательных нарушений в раннем послеоперационном периоде ( $p$  – от 0,9497 до 1) и уменьшает потерю клеток при имплантации.

3. Имплантация МСК костного мозга в рану после иссечения рубца ГС способствует её регенерации: замещённая ткань морфологически приближается к нативной структуре по сравнению с дефектами, репарация которых происходила без введения клеток. Рубцы после клеточной терапии отличаются меньшей толщиной собственной пластинки ГС ( $p=0,06$  для аутологичных МСК,  $p<0,05$  для человеческих МСК), восстановлением архитектоники коллагеновых структур ( $p=0,086$  – для аутологичных МСК,  $p<0,05$  – для человеческих МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем); восстановлением соотношения коллагена I и III типов ( $p<0,05$  для аутологичных МСК).

4. Рубцы голосовых складок после имплантации МСК костного мозга обладают лучшими локальными вязко-упругими характеристиками по сравнению с рубцами без имплантации и не имеют статистически значимых различий с интактными голосовыми складками ( $p=0,59$  – для аутологичных МСК,  $p=0,898$  – для человеческих МСК в комплексе с ПЭГ-фибриновым гелем).

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Усовершенствованная в эксперименте модель рубцового процесса голосовых складок, включающая создание дефекта 1/3 голосовой складки до голосовой мышцы с отступом 3 мм от передней комиссуры и последующей резекцией рубца через 3 месяца, рекомендуется к использованию в дальнейших экспериментальных исследованиях по разработке методов восстановления структуры голосового отдела гортани с помощью технологий регенеративной медицины.

2. Рекомендуется учитывать характеристики имплантируемого клеточного продукта в голосовые складки при рубцовых повреждениях в аспекте возможных прогнозируемых дыхательных нарушений и интраоперационного кровотечения.

3. Полученные результаты восстановления морфологических и механических характеристик голосовых складок с рубцовыми повреждениями с помощью клеточной терапии МСК являются основой для апробации таких технологий в клинической практике и дальнейшей разработки новых методов лечения пациентов с рубцовыми повреждениями голосового отдела гортани.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Свистушкин В.М., Старостина С.В., **Свистушкин М.В.**, Побиванцева А.А., Архипов М.В. / Возможности регенеративной медицины в оториноларингологии (обзор литературы) // **Consilium Medicum**. 2019; 21 (11): С. 15–19. DOI: 10.26442/20751753.2019.11.190641
2. Свистушкин В.М., Старостина С.В., **Свистушкин М.В.**, Тимашев С.Ф., Шехтер А.Б., Файзуллин А.Л., Побиванцева А.А., Луничева А.А., Лебедева Г.В. / Влияние мезенхимных стромальных клеток на восстановление структуры голосовых складок при рубцовых изменениях. Контролируемое экспериментальное исследование // **Фарматека**. 2020;27(5): С. 61–67. DOI: <https://dx.doi.org/10.18565/pharmateca>
3. Свистушкин В.М., Старостина С.В., Люндуп А.В., Дедова М.Г., Будейкина Л.С., **Свистушкин М.В.**, Крашенинников М.Е., Барановский Д.С. / Возможности клеточных технологий в лечении рубцовых поражений голосовых складок // **Вестник Российской академии медицинских наук**. 2016. Т. 71. № 3 – С. 190-199. [Scopus]
4. Collagen fibrillar structures in vocal fold scarring and repair using stem cell therapy: a detailed histological, immunohistochemical and atomic force microscopy study / **Svistushkin M.V.**, Svistushkin V.M., Starostina S.V., Kotova S.L., Shekhter A.B., Frolova A.A., Fayzullin A.L., Butnaru D.V., Timashev P.S., Timashev S.F., Akovantseva A.A., Bezrukov E.A., Sukhanov R.B. / **Journal of Microscopy** – 2019 – Т. 274. № 1 – С. 55-68. [Scopus]
5. Vibration activity of the vocal folds and a new instrumental technique for their study / Mikhail I. Belovolov, Vladimir M. Paramonov, Mikhail M. Belovolov, **Mikhail V. Svistushkin**, Valery M. Svistushkin, Maxim V. Arkhipov, Zhanna T. Mokoyan, Viktoriya A. Timofeeva, Svetlana L. Kotova, Peter S. Timashev, Sergey F. Timashev // **Optical Engineering**. 59(6), 061611 (2020), doi: 10.1117/1.OE.59.6.061611 [Scopus]
6. Frolova A., **Svistushkin M**, Kotova S., Svistushkin V., Shekhter A., Timashev P. / Vocal fold scarring and repair through the eyes of atomic force microscopy P. Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine // The 3rd International Symposium. Book of abstracts. 2018. P. 107-108.
7. Свистушкин В.М., Старостина С.В., Люндуп А.В., Дедова М.Г., Будейкина Л.С., **Свистушкин М.В.** / Разработка способа лечения рубцовых поражений голосовых складок с использованием мезенхимальных костномозговых стволовых клеток // В сборнике: 2-й Национальный Конгресс по регенеративной медицине. Материалы конгресса. 2015 - С. 176-177.
8. **Свистушкин М.В.**, Свистушкин В.М., Тимашев П.С., Старостина С.В., Шехтер А.Б., Котова С.Л., Фролова А.А., Беловолов М.И., Беловолов М.М., Тимофеева В.А., Тимашев С.Ф. / Возможности клеточной терапии в восстановлении биомеханических свойств голосовых складок при рубцовых повреждениях. Экспериментальное исследование // В книге: Медицинская физика (ТКМФ-7) – Сборник тезисов VII Троицкой конференции с международным участием. Москва. 2020. С. 215-217.
9. В.М. Свистушкин, С.В. Старостина, **М.В. Свистушкин**, П.С. Тимашев, С.Л. Котова, А.Б. Шехтер, А.А. Фролова, А.А. Акованцева, А.Л. Файзуллин / Экспериментальное исследование микроструктуры рубцов голосовых складок после терапии мезенхимными стромальными клетками // Материалы VIII Петербургского форума оториноларингологов России. 2019. С. 312-313.
10. **М.В. Свистушкин**, В.М. Свистушкин, П.С. Тимашев, С.В. Старостина, А.Б. Шехтер, С.Л. Котова, А.А. Фролова, М.И. Беловолов, М.М. Беловолов, В.А. Тимофеева, С.Ф. Тимашев / Экспериментальное обоснование возможностей клеточной терапии в лечении рубцовых повреждений голосового отдела гортани // Материалы IX Петербургского форума оториноларингологов России. 2020. С. 277-278.
11. **M. Svistushkin**, S. Kotova, A. Shekhter, V. Svistushkin, A. Akovantseva, A. Froloval, A. Fayzullin, S. Starostina, P. Timashev / Restoration of Extracellular Matrix Proteins in Vocal Fold Scars after Mesenchymal Stem Cell Implantation: an Experimental Study // TERMIS EU 2019 Meeting Abstract book. 2019. P.1201.
12. **Свистушкин Михаил Валерьевич** / Разработка способа лечения рубцовых поражений голосовых складок с применением аутологичных мезенхимальных костномозговых стволовых клеток // Сборник тезисов участников форума «Наука будущего – наука молодых» – Севастополь – 2015. Том 2, С. 447.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БМКП – биомедицинский клеточный продукт

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГС – голосовые складки

ДАБ – диаминобензидин

ИГХ – иммуногистохимия

МСК – мезенхимные стромальные клетки

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЧДД – частота дыхательных движений

GFP – green fluorescent protein (зелёный флюоресцирующий белок)

Автор искренне благодарен за практическую помощь и всестороннюю поддержку в реализации данной работы научному руководителю д.м.н., профессору Старостиной С.В., заведующему кафедрой болезней уха, горла и носа Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского Сеченовского Университета д.м.н., профессору Свистушкину В.М., сотрудникам Института регенеративной медицины Сеченовского Университета: научному консультанту д.х.н. Тимашеву П.С., д.м.н., профессору Шехтеру А.Б., к.х.н. Котовой С.Л., к.б.н. Шпичке А.И., Файзуллину А.Л., заведующему центральным виварием Сеченовского Университета Лузину А.В.