

УДК 576.54:619

МИКРОВЕЗИКУЛЫ ИЗ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОАРТРИТЕ ЛОШАДЕЙ

© 2024 г. А. М. Аймалетдинов^{1, *}, А. Г. Маланьева¹, М. А. Тамбовский¹, Е. Ю. Закирова¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия,

* E-mail: aimaletdinowam@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2024

После доработки 02.09.2024

Принята к публикации 04.09.2024

Современные стратегии лечения остеоартрита (ОА) в основном направлены на устранение симптомов. В настоящее время в медицине и ветеринарии практикуется использование клеточных методов терапии, включающих мезенхимные стволовые клетки (МСК). Также в настоящее время с целью регенерации применяют микровезикулы (МВ), полученные из МСК. Цель настоящего исследования — изучить возможность потенциального влияния искусственных МВ на хондроциты крысы. Проведенные *in vitro* эксперименты показали, что МВ, полученные из МСК, оказывали положительное действие на жизнеспособность и миграционную способность культуры клеток хондроцитов. МВ *in vitro* при 3D-моделировании ОА нивелировали действие провоспалительных факторов IL-1b и TNF-α. Эксперименты показали, что МВ взаимодействуют и сливаются непосредственно с мембранами хондроцитов. Таким образом, нами показано влияние МВ из МСК лошади на хондроциты *in vitro*.

Ключевые слова: остеоартрит, мезенхимные стволовые клетки, микровезикулы, лошадь, хондроциты, хрящевая ткань, крыса

Принятые сокращения: МВ — микровезикулы; МСК — мезенхимные стволовые клетки; ОА — остеоартрит.

DOI: 10.31857/S0041377124050044, **EDN:** DUTHUG

Остеоартрит (ОА) — хроническое дегенеративное заболевание многофакторной этиологии, характеризующееся утратой или повреждением суставного хряща, а также ремоделированием образующих сустав костей. ОА вызывает боль в суставах, обычно усиливающуюся при нагрузке и физической активности. Симптомом ОА также является тугоподвижность после бездействия (Thomas et al., 2017). ОА является одним из наиболее часто диагностируемых заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Это заболевание имеет сложный патогенез. Современные исследования указывают на многофакторный характер развития ОА. При развитии заболевания происходят значительные изменения на всех уровнях организации, в том числе изменения молекулярных процессов в хряще, сопровождающиеся нарушениями его структуры и функциональных свойств, а также регуляции синтеза компонентов хрящевого

матрикса хондроцитами. Этиопатогенез ОА может быть первичным (идиопатическим) или вторичным (с влиянием наследственных факторов) (Mahajan et al., 2005).

ОА обычно поражает животных старшего и среднего возраста. Поскольку это заболевание обычно развивается с возрастом, владельцы домашних животных часто путают изменения в поведении своих животных с нормальными возрастными изменениями (такими как снижение активности), тогда как на самом деле животное может страдать от довольно сильной артритной боли (Rychel, 2010).

ОА является наиболее распространенной причиной хромоты у лошадей, примерно 60% случаев приходится на это заболевание (Go-odrich 2006; Bertoni et al 2020). Развитие ОА связано с множеством предрасполагающих факторов, таких как возраст, острая травма и (или) нерегулярная или повторяющаяся

перегрузка суставных структур. Каждое из этих состояний может приводить к прогрессирующему износу хрящевых поверхностей, а также ремоделированию мягких тканей и субхондральной кости (Lories, Luyten, 2012).

Диагностика ОА в первую очередь основывается на тщательном анамнезе и результатах рентгенологического обследования. Сложность в постановке диагноза заключается в том, что у многих животных заболевание протекает бессимптомно (Taruc-Uy, Lynch, 2013).

Современные стратегии лечения ОА в основном направлены на устранение симптомов. Лечение ОА включает облегчение боли, уменьшение скованности, поддержание функциональных возможностей и улучшение качества жизни (Bhattacharjee et al., 2022). Для терапии чаще всего применяют нестероидные противовоспалительные препараты, анальгетики, а также внутрисуставные препараты, такие как гиалуроновая кислота и стероиды (Weinstein et al., 2013). Часто применяют и хирургические методы лечения (Revenaugh et al., 2005). Однако многие методы лечения имеют побочные эффекты (Li et al., 2019).

В настоящее время в медицине и ветеринарии практикуется использование клеточных методов терапии (Kriston-Pál et al., 2020). В случае такой терапии используются стволовые клетки, включая мезенхимные стволовые клетки (МСК), эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Atala, 2004). Однако клеточная терапия имеет ряд ограничений. Исследования показали, что трансплантированные стволовые клетки в пораженном суставе с наличием внутри провоспалительных цитокинов могут усиливать воспалительную реакцию и ускорять прогрессирование заболевания (Lee et al., 2010). Несмотря на то, что МСК из одной и той же ткани характеризуются способностью подавлять воспаление, необходимо учитывать влияния и изменения свойств, зависящие от партии и донора (Wang et al., 2013). Причиной такой вариативности является существование гетерогенности МСК, заключающейся в том, что разные субпопуляции могут демонстрировать разные профили генной экспрессии специфичных факторов и функциональные свойства (Phinney et al., 2005).

Кроме того, в настоящее время применяют микровезикулы (МВ), полученные из МСК. Их эффективность с точки зрения восстановления хряща, транспорта микроРНК и ряда других функций свидетельствует о их регенеративном потенциале и делает их перспективными бесклеточными терапевтическими агентами для лечения ОА (Wu et al., 2019).

Цель настоящей работы — изучить потенциальную терапевтическую эффективность МВ, полученных из МСК для лечения ОА у лошадей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение МСК лошади. МСК были получены из жировой ткани лошади. Забор жировой ткани осуществляли в стерильных условиях ветеринарной клиники Казанского ипподрома. Далее работу проводили в лабораторных условиях. Взятые образцы очищали от соединительной ткани, промывали фосфатным буферным физиологическим раствором (PBS, “Панэко”, Россия) и измельчали вручную. Измельченную ткань инкубировали 1 ч в шейкере-инкубаторе с 0.2%-ной коллагеназой краба (ООО “Биолот”, Россия). Далее клетки осаждали центрифугированием, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в физиологическом растворе. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 800 g. Отмытый осадок клеток повторно суспендировали в культуральной среде DMEM-Glutamax I (“Панэко”, Россия) с 10% сыворотки плодов коров (FBS; “Панэко”, Россия) и 1% смеси пенициллин–стрептомицин (“Панэко”, Россия), и высевали на культуральные флаконы. Через 24 ч прикрепившиеся клетки отмывали физиологическим раствором и полученную культуру клеток поддерживали в ростовой среде (DMEM/F12 с 10% FBS, L-глутамином и антибиотиками) в увлажненной атмосфере при 37 °C, 95% O₂ и 5% CO₂. Смену среды проводили через 3 сут.

Получение МВ из культуры МСК лошади. Использовали методику, опубликованную ранее (Zakirova et al., 2024). При достижении культурой клеток плотности монослоя 90%, отбирали питательную среду, дважды промывали культуру от остатков среды с помощью PBS. Клетки открепляли от культурального пластика при помощи 0.25%-ного раствора трипсина–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия), затем

отмывали клетки PBS. Полученную суспензию инкубировали в среде DMEM без сыворотки крови, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина В (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Далее осуществляли серию последовательных центрифугирований, отбирая супернатант: 10 мин при 100 g, 20 мин при 100 g и 25 мин при 1400 g. Осадок, содержащий МВ, отмывали большим количеством PBS, центрифугируя 25 мин при 1400 g и использовали далее в работе.

Выделение хондроцитов крысы. Использовали лабораторных белых беспородных крыс (*Rattus albus*). Животных содержали в виварии в клетках со свободным доступом к воде и корму. Для эксперимента отбирали самцов с массой не более 250–300 г и не старше 12 мес. Для выделения клеток хрящевую ткань брали из суставных поверхностей бедренной и большой берцовой кости. Их удаляли хирургическим путем в стерильных условиях. Сразу после удаления костные срезы переносили в стерильный контейнер, заполненный PBS. Далее хрящевую ткань (ее осторожно удаляли с поверхности костных разрезов с помощью лезвия) переносили в чашку Петри, наполненную PBS для предотвращения высыхания ткани. После этого PBS осторожно удаляли пипеткой и чашку Петри немедленно заполняли 10 мл раствора 0.25%-ного раствора трипсин–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия). Свежеприготовленные кусочки хряща инкубировали в течение 3 ч при 37 °C и 5% CO₂. После этого к суспензии клеток добавляли 20 мл модифицированной среды Игла (DMEM, “ПанЭко”, Россия). Суспензию переносили в центрифужную пробирку на 50 мл и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Супернатант осторожно сливали, а осадок клеток ресуспендировали в 20 мл DMEM и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Супернатант снова осторожно отбрасывали, а осадок клеток ресуспендировали в 10 мл DMEM, содержащей 100 МЕ/мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин и 5% FBS. Клеточную суспензию переносили в культуральный флакон Т-25 с оставшимися после обработки 0.25%-ным раствором трипсин–ЭДТА кусочками хрящевой ткани. Через 1 нед. культивирования наблюдали выплзание клеток из фрагментов ткани. Среду для культивирования

меняли каждые 3 сут. Клетки культивировали до образования монослоя при 37 °C и 5% CO₂.

Проточная цитометрия выделенных клеток. Принадлежность клеток к клеточному пулу стволовых клеток оценивали иммуноцитохимически, окрашивая их меченными антителами против мембранных маркеров клеток мезенхимного происхождения. Использовали антитела против CD44 (clone IM7; Biolegend, США) и CD90 (№ 1612630; Sony Biotechnology США). Для отрицательного контроля использовали антитела к CD34 (IC0115) (sc-7324; Santa Cruz, США) и CD45 (№ 202205; BioLegend, США). Окрашивание клеток проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Результаты анализировали с помощью проточного цитофлюориметра Guava EasyCyte 8HT (Millipore, США). Содержание клеток с маркером выражали в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

Для подтверждения биологической активности выделенных клеток проводили дифференцировку в трех направлениях (остеогенном, хондрогенном и адипогенном) по методике, описанной ранее (Закирова и др. 2021). Далее клетки фиксировали и результаты дифференцировки визуализировали с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Выделенные хондроциты окрашивали меченными антителами на наличие мембранных маркеров мезенхимных стволовых клеток. Для этого использовали антитела к: CD90 (clone 5E10; Biolegend, США), CD29 (№ 102218; BioLegend, США), CD44 (clone IM7; Biolegend, США), CD105 (№ 323218; BioLegend, США), STRO1 (№ 340104; BioLegend, США) и специфическим для хрящевой ткани – агггрекану (PAB908Ra01; “БелкиАнтитела”, Россия) и коллагену II (ab79013; Abcam, США). В качестве отрицательного контроля клетки окрашивали антителами к CD34 (IC0115) (Santa Cruz, sc-7324, USA), CD117 (MAA121Ra21; “БелкиАнтитела”, Россия) и CD45 (№ 202205; BioLegend, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Результат выражали в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

Оценка возможности слияния МВ из МСК лошади и хондроцитов крысы. Для этого использовали мембранные витальные флуоресцентные красители разных цветов.

Цитоплазматическую мембрану клеток лошади окрашивали DiO, а крысы — DiD (V22889 и V22889 соответственно; Life Technologies, США). Ядра хондроцитов окрашивали DAPI (Biotium, США).

Клеточную суспензию отмывали от питательной среды дважды PBS, ресуспендировали в среде без сыворотки из расчета 10^6 кл./мл, добавляли краситель до конечной концентрации 5 мкМ и окрашивали клетки в течение 15 мин в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После этого клетки промывали, добавляли краситель Dapi и окрашивали еще 15 мин. Далее клетки трижды промывали полной питательной средой. Хондроциты высевали на 96-луночный планшет в концентрации 50 000 кл./лунка. В экспериментальные лунки планшета добавляли МВ, полученные из такого же количества лошадиных МСК, что и хондроциты (соотношение МВ и хондроцитов 1:1). Перед и после добавления МВ окрашенные хондроциты культивировали 24 ч в стандартных условиях. После этого клетки трижды отмывали PBS с целью удаления не слившихся с клетками МВ и визуализировали с помощью лазерной конфокальной микроскопии (микроскоп Zeiss LSM780; Carl Zeiss, Германия). Кроме того, клетки анализировали, используя проточную цитофлуориметрию, для чего клетки трижды отмывали PBS, снимали с культурального планшета с помощью 0.25%-ной смеси трипсина–ЭДТА (“ПанЭко”, Россия), отмывали PBS дважды. Анализ проводили на приборе Guava EasyCyte 8HT (Millipore, США).

Оценка влияния полученных МВ на миграцию хондроцитов. Миграция клеток является событием, ограничивающим скорость заживления при повреждении суставов. Следовательно, изучение факторов, которые влияют на хондроциты может помочь целевым методам лечения для улучшения при ОА. Миграцию оценивали методом царапины. Для этого в 24-луночные культуральные планшеты высевали хондроциты до конечной плотности 100 000 на 1 лунку и культивировали в инкубаторе в течение 24 ч. Затем в 12 лунок добавляли МВ, полученные из МСК лошади (соотношение МВ и хондроцитов 1:1) и культивировали еще 24 ч. Далее клетки отмывали от остатков МВ. Через 48 ч стерильным наконечником

пипетки оставляли царапину шириной приблизительно 0.4–0.5 мм во всех лунках планшета. Проводили смену ростовой среды для удаления открепившихся клеток. С помощью инвертированного микроскопа AxioVision 4.8 (CarlZeiss, Германия) измеряли ширину царапин в лунке. Измерение повторяли каждые 24 ч до полного закрытия царапины монослоем.

Оценка влияния МВ на жизнеспособность хондроцитов крысы. Жизнеспособность определяли с помощью реагента CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-Tek Instruments Inc., США), основной фильтр — 490 нм, референс-фильтр — 630 нм. Перед проведением теста хондроциты культивировали с МВ в течение 24 ч, как описано выше. Эксперимент повторяли трижды.

Определение индекса пролиферации (ИП). В лунку 24-луночного планшета засевали клетки по 100 000 на 1 лунку. Далее хондроциты культивировали в течение 24 ч с МВ. Далее среду с МВ удаляли, клетки отмывали в PBS, добавляли свежую среду и культивировали в стандартных условиях 72 ч. Затем клетки снимали с пластика, считали и определяли ИП по отношению числа выросших клеток к посеянным.

3D-модель ОА и оценка влияния МВ. Для исследования влияния МВ на хрящевую ткань при ОА использовали метод трехмерного (3D) моделирования (Wu et al., 2011; Aimaletdinov et al., 2023). Для создания модели ОА с помощью технологии 3D-биопринтинга сначала готовили клеточный материал, который затем печатали с помощью биопринтера. В качестве клеточного материала использовали хондроциты. Для воспроизведения модели применяли провоспалительные цитокины интерлейкин-1β (IL-1β) и фактор некроза опухоли α (TNF-α). Для проведения эксперимента клеточный материал хондроцитов делили на три группы. Первая группа — позитивный контроль (ОА без МВ); к клеткам этой группы добавляли среду DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия), содержащую 10 нг/мл IL-1β и 20 нг/мл TNF-α (RPA563Ra01 и RPA133Ra01 соответственно; “БелекиАнтитела”, Россия). Вторая группа — негативный контроль, только хондроциты без добавления провоспалительных факторов. В третьей группе (ОА с МВ) клетки культи-

вировали в среде, содержащей 10 нг/мл IL-1 β , 20 нг/мл TNF- α , а также МВ (соотношение МВ и хондроцитов 1:1). Концентрация хондроцитов при биопечати составляла 10⁷ кл./мл. Биопечать проводили на экструзионном принтере Cel-link Inkredible (Швеция), для печати использовали гидрогель GelMa (Cellink, Швеция). Биопечать проводили при давлении 28 кПа. Размер напечатанного образца составлял 1.0 × 1.0 × 0.5 см. После печати образцы хрящевой ткани инкубировали 10 мин в физиологическом растворе (PBS; “Панэко”, Россия). Далее его помещали в среду DMEM/F12 и культивировали после биопечати 4 нед.

После окончания культивирования полученные образцы анализировали гистологически и для определения распределения клеток в трехмерных конструкциях образцы окрашивали гематоксилин–эозином. Для этого образцы в течение 1 ч фиксировали в 4%-ном формалине при комнатной температуре, затем окрашивали раствором гематоксилина–эозина (АО “Лен-реактив”, Россия) при комнатной температуре в течение 30 мин. Иммуногистохимически определяли присутствие коллагена II типа. Для этого образцы после фиксации помещали в 0.1%-ный раствор тритона на 1 ч, отмывали 3 раза физиологическим раствором (PBS, “Панэко”, Россия) и окрашивали антителами к коллагену 2 (ab79013; Abcam, США) в разведении, рекомендованном производителем. Присутствие протеогликана во внеклеточном матриксе определяли с помощью окрашивания альциановым синим. Для этого клетки после фиксации в 4%-ном формалине отмывали и окрашивали 30 мин в растворе альцианового синего (1 г сухого красителя в 100 мл 0.1 М соляной кислоты). После этого клетки отмывали в физиологическом растворе (PBS, Панэко, Россия). Для визуализации клеток использовали инвертированный микроскоп AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Статистический анализ. Обработку результатов проводили методами первичного статистического анализа, результаты которых представлены в виде среднего арифметического значения по выборке и его стандартного отклонения. Вторичную статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–

Уитни. Различия считали значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ данных проточной цитометрии показал, что клетки, полученные из хрящевой ткани крысы, экспрессировали маркеры МСК CD29 (87%), CD44 (93%), CD90 (100%), CD105 (96%), STRO-1 (60%), а также специфический маркер агрекан (54%), коллаген I (20%) и коллаген II (60%) (рис. 1). Таким образом, полученные клетки являются хондроцитами.

Клетки, полученные из жировой ткани лошади, были отрицательными по маркерам CD34 (маркер гемопоэтических клеток) и CD45 (лейкоцитарный антиген) и положительными по маркерам CD44 (91%) и CD90 (100%) (маркеры МСК) (рис. 2). Клетки, выделенные из жировой ткани лошади, дифференцировались в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях при культивировании в соответствующих дифференцировочных средах (рис. 3). Таким образом, полученные нами данные показывают, что клетки из жировой ткани лошади являются МСК.

Проведенные эксперименты показали, что МВ способны встраиваться в мембраны клеток. Нами выявлено наличие вкраплений МВ, окрашенных флуоресцентным красителем DiO (Life Technologies, США), на поверхности хондроцитов крысы (рис. 4). Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что количество хондроцитов с наличием обоих красителей составлял 38.5%.

Исследование миграционной способности при помощи метода царапин выявило незначительное влияние МВ на миграцию хондроцитов. Значимые изменения наблюдали только через 36 ч после совместного культивирования клеток с МВ. Ширина царапины была меньше, чем в контроле на 24%. А через 48 ч значимых различий между группой контрольной и экспериментальной группой не наблюдали. Через 72 ч после нанесения царапины в обеих группах формировался полный монослой. Результаты измерений представлены в табл. 1.

Тест, проведенный для оценки жизнеспособности клеток показал, что добавление МВ в культуру первичных хондроцитов не влияло на жизнеспособность последних. При

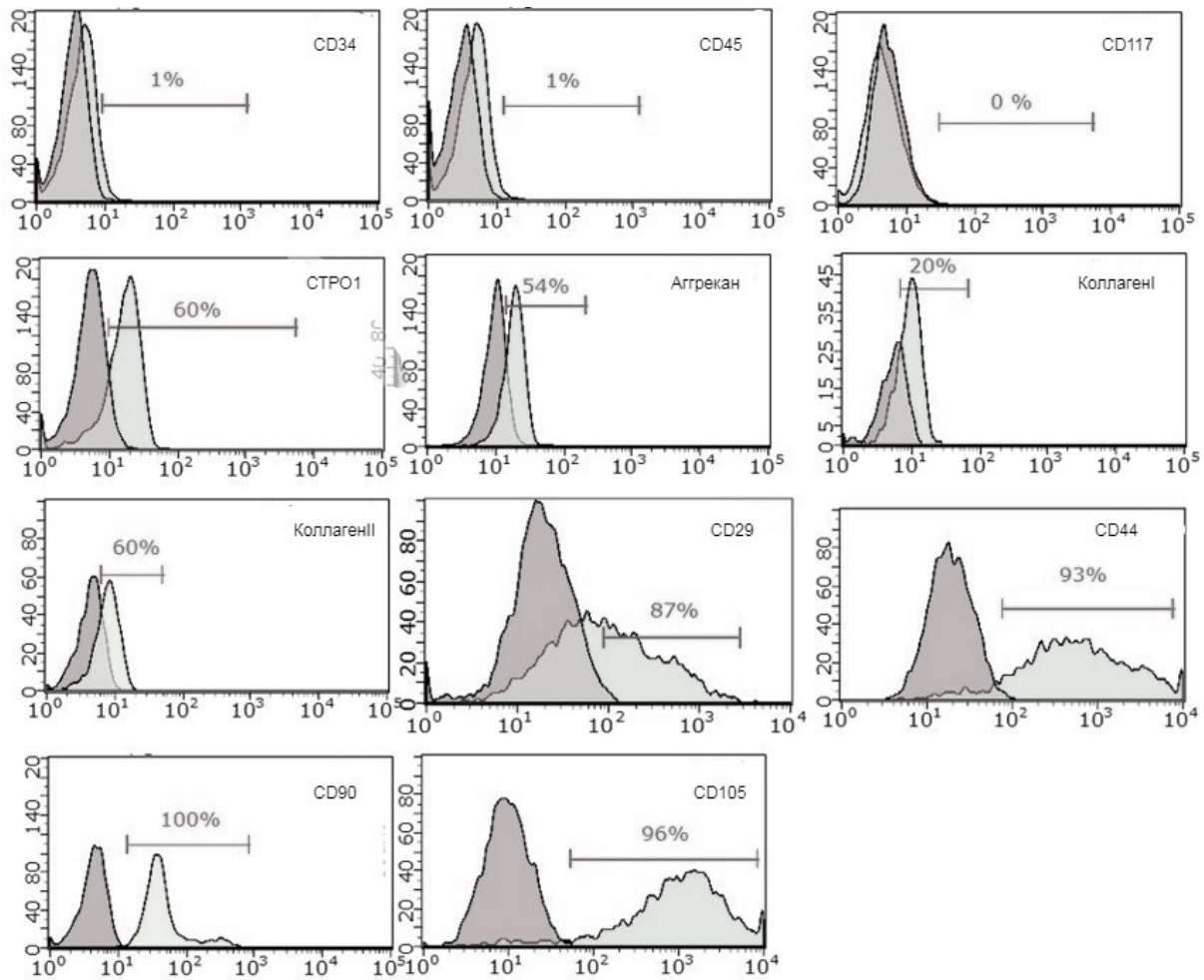


Рис. 1. Гистограммы проточной цитометрии клеток, выделенных из хрящевой ткани крысы с использованием специфических флуоресцентно-меченных антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD34, CD45, CD117, STRO1, агрекан, коллаген I, коллаген II, CD29, CD44, CD90. По горизонтали – интенсивность флуоресценции, по вертикали – число клеток.

Темным цветом выделены гистограммы, соответствующие неокрашенным контрольным клеткам; светлым – гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, меченными флуоресцентными метками.

Таблица 1. Изменение ширины царапины в течение 72 ч в культуре хондроцитов крысы в контроле и после взаимодействия с МВ

Монослой	Ширина царапины, мкм				
	Контроль	24 ч	36 ч	48 ч	72 ч
Интактный	686.2 ± 9.1	505.1 ± 16.4*	571.6 ± 3 7.0*	483.9 ± 4.3*	0
После добавления МВ	669.8 ± 15.8	461.2 ± 17.1*	434.6 ± 20.2*	407.9 ± 35.2*	0

(*) – Различия контролем достоверны при $P \leq 0.05$ (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

исследовании влияния МВ на пролиферацию хондроцитов было показано, что МВ оказывают незначительное действие на этот показатель. Изменения по отношению к контрольной группе (снижение индекса пролиферации на 18%) наблюдали только через 24 ч после начала эксперимента. Результаты показаны в табл. 2.

Для оценки эффективности МВ при помощи биопринтера была воспроизведена 3D-модель остеоартрита. Результаты 3D-печати представлены на рис. 5. На рисунке показано, что при световой микроскопии хондроциты после биопринтинга были равномерно распределены по всей поверхности и толще напечатанной

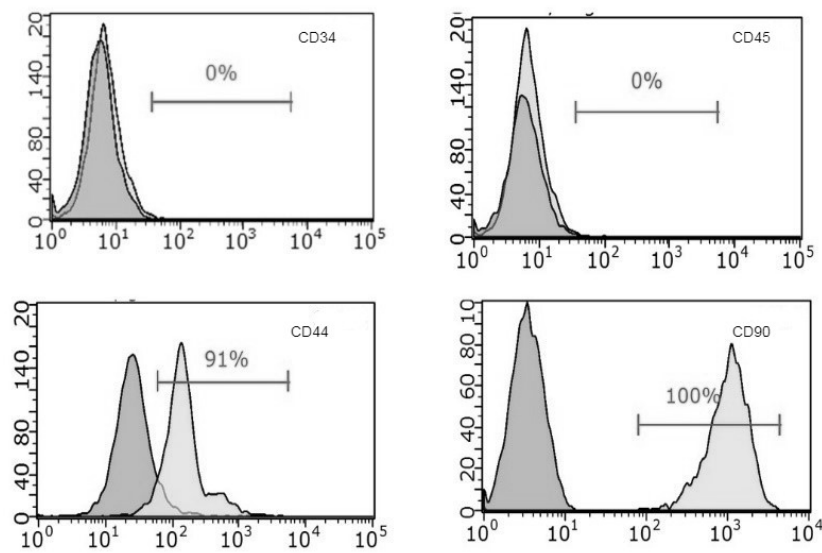


Рис. 2. Гистограммы проточной цитометрии клеток, выделенных из жировой ткани лошади с использованием специфических флуоресцентно-меченных антител, демонстрирующие количество клеток, несущих антигены CD34, CD45, CD44, CD90.

Темным цветом выделены гистограммы, соответствующие неокрашенным контрольным клеткам; светлым — гистограммы, соответствующие окрашиванию специфическими АТ, мечеными флуоресцентными метками.

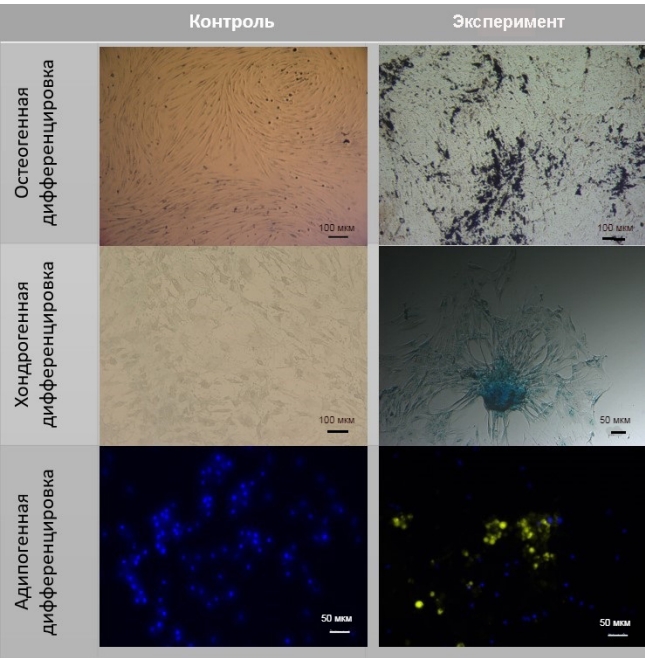


Рис. 3. Визуализация дифференцировки МСК лошади в остеогенном (окраска ализариновым красным), хондрогенном (окраска альциановым синим) и адипогенном (окраска Nile Red) направлении.

модели. То есть напечатанная модель напоминает хрящевую ткань.

Исследованиями установлено, что при 3D-моделировании ОА полученные из МСК лошади внеклеточные везикулы положительно

Таблица 2. Результаты исследования влияния МВ из МСК лошади на индекс пролиферации хондроцитов крысы

Условие	ИП после добавления МВ		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	1.65 ± 0.07	2.46 ± 0.03	3.38 ± 0.05
МВ	1.35 ± 0.04*	2.38 ± 0.03	3.4 ± 0.02

(*) — Различие с контролем достоверно при $P \leq 0.05$ (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

влияли на хондроциты. Результаты показаны на рис. 6. Окрашивание гематоксилин-эозином показало, что клеточность в образцах негативного контроля (без добавления МВ и провоспалительных факторов) и в опытных образцах (хондроциты + МВ + провоспалительные факторы) была высокой, хондроциты в гидрогеле располагались равномерно. В образцах позитивного контроля (хондроциты + провоспалительные факторы) количество клеток было заметно меньше. При окрашивании альциановым синим отмечали наиболее интенсивное окрашивание в образцах негативного контроля. В экспериментальных образцах отмечали менее интенсивное окрашивание альциановым синим, в образцах позитивного контроля окрашивание было

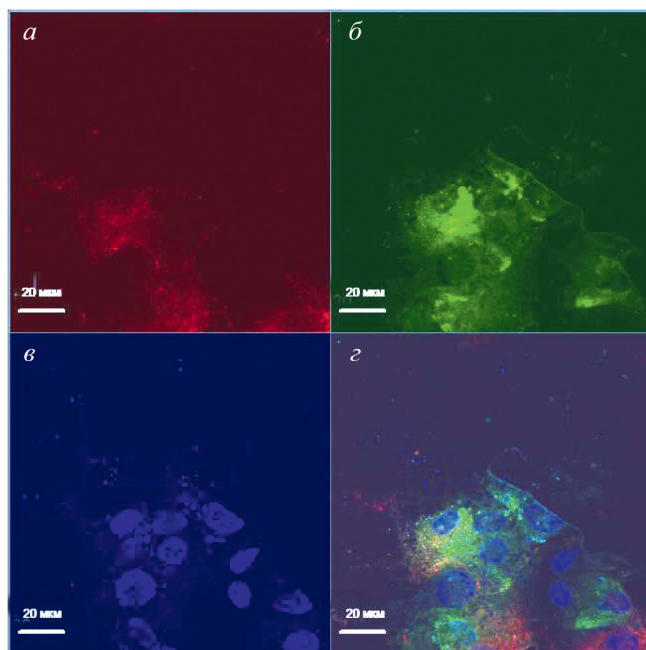


Рис. 4. Слияние МВ, полученных из МСК лошади, с хондроцитами крысы. Цитоплазматическая мембрана МСК окрашена флуоресцентным красителем DiD, а хондроциты крысы — флуоресцентным DiO (оба от Life Technologies, США). Конфокальная микроскопия.

a — МВ, окрашенные DiO; *б* — хондроциты, окрашенные DiD; *в* — ядра хондроцитов, окрашенные Dapi; *г* — совмещение.

очаговым и неравномерным, имелись значительные неокрашенные участки. При окрашивании на коллаген II типа наибольшую интенсивность отмечали в экспериментальных образцах; свечение отмечали и в образцах негативного контроля; в образцах позитивного контроля свечение было слабым и очаговым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно современным исследованиям, МСК могут нивелировать деградацию хряща при ОА (Chen et al., 2006). В настоящее время принята концепция влияния МСК на ткани организма посредством паракринных механизмов (Murray, Réault, 2015). В ряде исследований показано, что существенную роль в репарации ОА при применении МСК играют цитокины и молекулы, которые они выделяют. Внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками, содержат мРНК, микроРНК и другие биоактивные вещества (Zhuang et al., 2022; Тамбовский и др.,

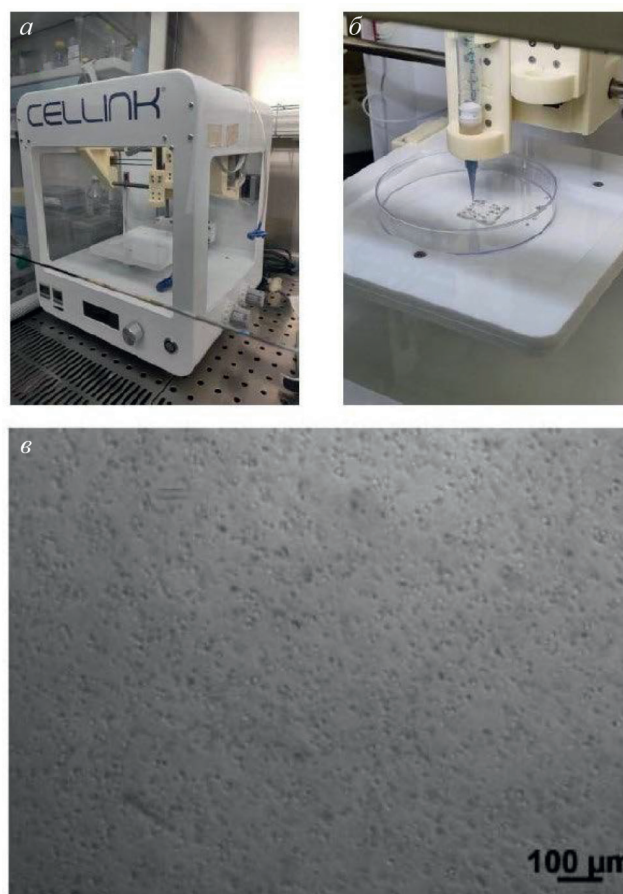


Рис. 5. Напечатанная на биопринтере Cellink 3D-модель хрящевой ткани.

a — Экструзионный принтер Cellink Inkredible (Швеция); *б* — процесс биопечати; *в* — образец хондроцитов, напечатанный на биопринтере, световая микроскопия.

2023). Однако многие исследователи отмечают, что МСК во время длительного культивирования теряют свой дифференцировочный потенциал и подвергаются различным морфологическим изменениям, в том числе и злокачественной трансформации (Bonab et al., 2006; Røslund et al., 2009).

Новым подходом в терапии стволовыми клетками является использование МВ, которыми можно заменить МСК. МВ, полученные из МСК, наследуют ценные характеристики МСК, из которых были получены. В отличие от клеток, МВ не вызывают острого иммунного отторжения, их можно производить в больших количествах (La Greca et al., 2018). В настоящее время МВ используют для терапии как в медицине, так и в ветеринарной практике (Zakirova et al., 2022).

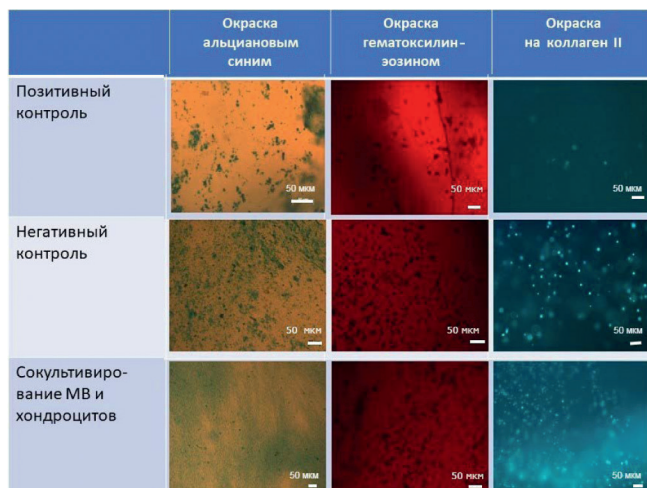


Рис. 6. Визуализация влияния МВ на 3D-модели ОА. Окрашивание показывает: альциановым синим — выработку гликозаминогликанов, гематоксилином и эозином — клеточность напечатанных образцов, на наличие коллагена II — функциональность хондроцитов.

В настоящей работе для моделирования ОА *in vitro* из хряща бедренной кости крысы были выделены хондроциты, экспрессирующие агрекан (54%), коллаген типов II (60%) и I (20%), которые являются специфичными маркерами этих клеток. Агрекан — высокомолекулярный протеогликан, который играет решающую роль в структуре хряща. Он наделяет суставной хрящ способностью выдерживать нагрузки (Wu et al., 2018). Коллаген — это наиболее распространенный белок внеклеточного матрикса, принадлежит к семейству волокнистых белков, которые переносят нагрузку в тканях и обеспечивают высоко биосовместимую среду для клеток (Meyer, 2019). Для хрящевой ткани наибольшее значение имеет коллаген II, на долю которого приходится 95% коллагенов в хрящевой ткани (Lumi et al., 2015). В суставном хряще иногда можно обнаружить и коллаген I типа. Его количество увеличивается, как правило, при длительной культивации хондроцитов (Wu et al., 2014). Выделенные нами из хрящевой ткани клетки имеют на своей поверхности маркеры МСК (рис. 1), по-видимому, по причине общего их предшественника (Kaufman, Tobias, 2003). Клетки, выделенные нами из жировой ткани лошади, являлись МСК, что подтверждают результаты цитометрии (рис. 2) и дифференцировки (рис. 3).

Совместное культивирование хондроцитов крысы с МВ из МСК лошади не влияло на жизнеспособность и на миграционные свойства хондроцитов. Ранее нами на примере МВ из МСК лошади и теноцитов крысы было показано их влияние на жизнеспособность и на миграционные свойства клеток. Также в этой же работе показаны слияние мембран клеток и МВ (Zakirova et al., 2024).

3D-моделирование ОА показало, что при индукции ОА везикулы, полученные из МСК, оказывают положительное влияние на напечатанные хондроциты. Эффективность МВ оценивали при помощи различных методов окрашивания. Для оценки клеточности, а также их морфологического строения были использованы гематоксилин и эозин. Для этих же целей этот метод применяли и другие исследователи, которые доказали, что хондроциты в напечатанном образце морфологически соответствовали клеткам хрящевой ткани (например, Galuzzi et al., 2018). В качестве доказательства того, что клетки в 3D-образце являются хондроцитами, их окрашивали на коллаген II типа. Этот маркер специфичен для хондроцитов и используется для оценки функциональности хондроцитов (Galuzzi et al., 2018). В образцах с моделированием ОА и добавлением МВ хондроциты интенсивнее синтезировали коллаген II по сравнению с группой позитивного контроля. Для оценки выработки гликозаминогликанов часто проводят окрашивание напечатанных хондроцитов альциановым синим (Kesti et al., 2015). При окрашивании отмечали наиболее интенсивное окрашивание в образцах негативного контроля. В экспериментальных образцах отмечали менее интенсивное окрашивание альциановым синим, в образцах позитивного контроля окрашивание было очаговым и неравномерным, что указывает на положительное действие МВ на хондроциты при моделировании ОА.

В совокупности проведенные эксперименты показали, что для лечения ОА и восстановления хряща можно использовать не только МСК, но и полученные на их основе МВ. Предлагаемый метод терапии является более безопасным аналогом клеточной терапии и позволяет преодолеть в значительной степени ограничения современных методов клеточной терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-26-00158).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с лабораторными животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>) и были одобрены экспертным комитетом по биомедицинской этике Казанского федерального университета (протокол № 3 от 5 мая 2015 г.; Казань, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закирова Е.Ю., Аймалетдинов А.М., Тамбовский М.А., Ризванов А.А. 2021. Сравнительная характеристика линий мезенхимных стволовых клеток различных видов животных. Цитология. Т. 63. № 2. С.139. (E.Yu. Zakirova, A.M. Aimaletdinov, M.A. Tambovsky, A.A. Rizvanov. 2021. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell lines from different animal species. Tsitologiya. V. 63. No. 2. P. 139).
- Тамбовский М. А., Аймалетдинов А.М., Закирова Е.Ю. 2023. Современные тенденции применения стволовых клеток и их производных при криоконсервации спермы животных. Биол. мембраны. Т. 40. № 5. С. 328. (M. A. Tambovsky, A. M. Aimaletdinov, E. Yu. Zakirova. 2023. Current trends in the application of stem cells and their derivatives in animal sperm cryopreservation. Biochem. Moscow Suppl. Ser. A. V. 17. P. 243.) <https://doi.org/10.31857/S0233475523050110>
- Aimaletdinov A.M. Iuferova A.K., Zakirova. E.Yu. 2023. Isolation and cultivation of sterlet myoblasts. Opera Medica Physiologica. V. 3. P. 167. <https://doi.org/10.24412/2500-2295-2023-3-167-173>
- Atala A. 2004. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. Rejuvenation Res. V. 7. №1. P.15. <https://doi.org/10.1089/154916804323105053>
- Bertoni L., Jacquet-Guibon S., Branly T., Legendre F., Desancé M., Mespoulhes C., Melin M., Hartmann D.J., Schmutz A., Denoix J.M., Galéra P., Demoor M., Audigé F. 2020. An experimentally induced osteoarthritis model in horses performed on both metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints: technical, clinical, imaging, biochemical, macroscopic and microscopic characterization. PLoS One. V. 15: e0235251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235251>
- Bhattacharjee M., Escobar Ivirico J.L., Kan H.M., Shah S., Otsuka T., Bordett R., Barajaa M., Nagiah N., Pandey R., Nair L.S., Laurencin C.T. 2022. Injectable amnion hydrogel-mediated delivery of adipose-derived stem cells for osteoarthritis treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 119: e2120968119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120968119>
- Bonab M.M., Alimoghaddam K., Talebian F., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Nikbin B. 2006. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell Biol. V. 7. P. 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
- Chen F.H., Rousche K.T., Tuan R.S. 2006. Technology insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. Nat. Clin. Pract. Rheumatol. V. 2. P. 373. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0216>
- Galuzzi M., Perteghella S., Antonioli B., Tosca M.C., Bari E., Tripodo G., Sorrenti M., Catenacci L., Mastracci L., Grillo F., Marazzi M., Torre M.L. 2018. Human engineered cartilage and decellularized matrix as an alternative to animal osteoarthritis model. Polymers (Basel). V. 10. Art. ID 738. <https://doi.org/10.3390/polym10070738>
- Goodrich L.R., Nixon A.J. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review. Vet. J. V. 171. P. 51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.07.008>
- Kaufman M.R., Tobias G.W. 2003. Engineering cartilage growth and development. Clin. Plast. Surg. V. 30. P. 539. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(03\)00071-3](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(03)00071-3)
- Kesti M., Eberhardt C., Pagliccia G., Kenkel D., Grande D., Boss A., Zenobi-Wond M. 2015. Bioprinting complex cartilaginous structures with clinically compliant biomaterials. Advanced Functional Materials. V. 25. P. 7406. <https://doi.org/10.1002/adfm.201503423>
- Kriston-Pál É., Haracska L., Cooper P., Kiss-Tóth E., Szukacsov V., Monostori É. 2020. A regenerative approach to canine osteoarthritis using allogeneic, adipose-derived mesenchymal stem cells. safety results of a long-term follow-up. Front. Vet. Sci. V. 7: P. 510. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00510>
- La Greca A., Solari C., Furmento V., Lombardi A., Biani M.C., Aban C., Moro L., García M., Guberman A.S., Sevelever G.E., Miriuka S.G., Luzzani C. 2018. Extracellular vesicles from pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells acquire a stromal modulatory proteomic pattern during differentiation. Exp. Mol. Med. V. 50. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0142-x>

- Lee M.J., Kim J., Kim M.Y., Bae Y.S., Ryu S.H., Lee T.G., Kim J.H. 2010. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Proteome Res.* V. 9. P. 1754.
<https://doi.org/10.1021/pr900898n>
- Li J.J., Hosseini-Beheshti E., Grau G.E., Zreiqat H., Little C.B. 2019. Stem cell-derived extracellular vesicles for treating joint injury and osteoarthritis. *nanomaterials (Basel)*. V. 9. Art. ID 261.
<https://doi.org/10.3390/nano9020261>
- Lories R.J., Luyten F.P. 2012. Osteoarthritis, a disease bridging development and regeneration. *Bonekey Rep.* V. 1. Art. ID 136.
<https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.136>
- Lumi X., Hawlina M., Glavač D., Facskó A., Moe M.C., Kaarniranta K., Petrovski G. 2015. Ageing of the vitreous: from acute onset floaters and flashes to retinal detachment. *Ageing Res. Rev.* V. P. 71.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.03.006>
- Mahajan A., Verma S., Tandon V. 2005. Osteoarthritis. *J. Assoc. Physicians India*. V. 53. P. 634.
- Meyer M. 2019. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed. Eng. Online*. V. 18. Art. ID 24.
<https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>
- Murray I.R., Péault B. 2015. Q&A: Mesenchymal stem cells – where do they come from and is it important? *BMC Biol.* V. 13. Art. ID 99.
<https://doi.org/10.1186/s12915-015-0212-7>
- Phinney D.G., Hill K., Michelson C., DuTreil M., Hughes C., Humphries S., Wilkinson R., Baddoo M., Bayly E. 2006. Biological activities encoded by the murine mesenchymal stem cell transcriptome provide a basis for their developmental potential and broad therapeutic efficacy. *Stem Cells*. V. 24. P. 186.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0236>
- Revenaugh M.S. 2005. Extracorporeal shock wave therapy for treatment of osteoarthritis in the horse: clinical applications. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* V. 21. P. 609.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2005.09.001>
- Rosland G.V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Mysliwicz J., Tonn J.C., Goldbrunner R., Lønning P.E., Bjerkvig R., Schichor C. 2009. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* V. 69. P. 5331.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>
- Rychel J.K. 2010. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Top Companion Anim. Med.* V.25. P.20.
<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.10.005>
- Taruc-Uy R.L., Lynch S.A. 2013. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. *Prim. Care*. V. 40. P. 821.
<https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.08.003>
- Thomas A.C., Hubbard-Turner T., Wikstrom E.A., Palmieri-Smith R.M. 2017. Epidemiology of posttraumatic osteoarthritis. *J. Athl. Train.* V.52. P. 491.
<https://doi.org/10.4085/1062-6050-51.5.08>
- Wang J., Liao L., Wang S., Tan J. 2013. Cell therapy with autologous mesenchymal stem cells-how the disease process impacts clinical considerations. *Cytotherapy*. V. 15. P. 893.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.218>
- Weinstein A.M., Rome B.N., Reichmann W.M., Collins J.E., Burbine S.A., Thornhill T.S., Wright J., Katz J.N., Losina E. 2013. Estimating the burden of total knee replacement in the United States. *J. Bone Joint Surg. Am.* V. 95. P. 385.
<https://doi.org/10.2106/JBJS.L.00206>
- Wu C.C., Chen W.H., Zao B., Lai P.L., Lin T.C., Lo H.Y., Shieh Y.H., Wu C.H., Deng W.P. 2011. Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*. V. 32. Art. ID 5847.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.002>
- Wu L., Petrigliano F.A., Ba K., Lee S., Bogdanov J., McAllister D.R., Adams J.S., Rosenthal A.K., Van Handel B., Crooks G.M., Lin Y., Evseenko D. 2014. Lysophosphatidic acid mediates fibrosis in injured joints by regulating collagen type I biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. V. 23. P. 308.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.012>
- Wu T.J., Fong Y.C., Lin C.Y., Huang Y.L., Tang C.H. 2018. Glucose enhances aggrecan expression in chondrocytes via the PKC α /p38-miR141-3p signaling pathway. *J. Cell Physiol.* V. 233. P. 6878.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26451>
- Wu X., Wang Y., Xiao Y., Crawford R., Mao X., Prasad I. 2019. Extracellular vesicles: potential role in osteoarthritis regenerative medicine. *J. Orthop. Translat.* V. 21. P. 73.
<https://doi.org/10.1016/j.jot.2019.10.012>
- Zakirova E., Aimaltdinov A., Mansurova M., Titova A., Kurilov I., Rutland C.S., Malanyeva A., Rizvanov A. 2024. Artificial microvesicles: new perspective on healing tendon wounds. *Cells Tiss. Organs*. V. 213. P. 24.
<https://doi.org/10.1159/000526845>
- Zakirova E., Valeeva A., Sofronova S., Tambovsky M., Rutland C., Rizvanov A., Gomzikova M. 2022. Application of mesenchymal stem cells derived artificial microvesicles for the treatment of canine skin wound. *BioNanoSci.* V. 12. P. 83.
<https://doi.org/10.1007/s12668-021-00928-0>
- Zhuang Y., Jiang S., Yuan C., Lin K. 2022. The potential therapeutic role of extracellular vesicles in osteoarthritis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10: 1022368.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1022368>

MICROVESICLES FROM MESENCHYMAL STEM CELLS FOR CARTILAGE TISSUE REGENERATION IN EQUINE OSTEOARTHRITIS

M. Aimaletdinov^{a, *}, A. G. Malanyeva^a, M. A. Tambovsky^a, E. Y. Zakirova^a

^a *Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, 420008, Russia*

** E-mail: aimaletdinowam@gmail.com*

Current treatment strategies for osteoarthritis primarily focus on symptom management. Currently, the use of cell therapy methods, including mesenchymal stem cells (MSCs), is practiced in medicine and veterinary medicine. Microvesicles (MVs) obtained from MSCs are also currently used for the purpose of regeneration. The purpose of this study was to investigate the potential effects of artificial MVs on rat chondrocytes. In vitro experiments showed that MVs obtained from MSCs had a positive effect on the viability and migration ability of the chondrocyte cell culture. In 3D modeling of OA in vitro, MVs neutralized the effect of pro-inflammatory factors IL-1b and TNF- α . Most likely, these effects were due to the direct penetration of MVs contents into chondrocytes, since The possibility of fusion of MVs membranes with chondrocyte membranes was experimentally demonstrated. Thus, we have shown the positive effect of MVs on an in vitro model of OA.

Keywords: mesenchymal stem cells, horse, chondrocytes, cartilage tissue, rat, microvesicles, osteoarthritis