

## ВЫДЕЛЕНИЕ, АНАЛИЗ И ПРИМЕНЕНИЕ АУТОГЕННЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СОБАКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛОЖНОГО СУСТАВА БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ

Е.Ю. Закирова<sup>1</sup>, М.Н. Журавлева<sup>1</sup>, Р.Ф. Масгутов<sup>1,2</sup>, Р.А. Усманов<sup>3</sup>,  
А.А. Ризванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

<sup>2</sup> Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

<sup>3</sup> Ветеринарный центр «Солнышко», Казань, Россия

### Isolation, analysis and application of authogenic adipose derived multipotential mesenchymal stromal cells from dog for therapy pseudoarthrosis of tibial bone

E.Y. Zakirova<sup>1</sup>, M.N. Zhuravleva<sup>1</sup>, R.F. Masgutov<sup>1,2</sup>, R.A. Usmanov<sup>3</sup>, A.A. Rizvanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

<sup>2</sup> Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Veterinary center «Solnyshko», Kazan, Russia

Проведенное исследование показывает возможность применения клеточной терапии для лечения длительно не срастающихся переломов и ложных суставов у собак. Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) были выделены из жировой ткани взрослой собаки. Мультипотентность клеток была подтверждена способностью к дифференцировке в трех основных направлениях (остеогенном, адипогенном и хондрогенном); показано, что клетки экспрессировали CD73, CD105, виментин. Клиническое (ветеринарное) применение полученных ММСК при лечении ложного сустава большеберцовой кости у собаки стимулировало процессы остеогенеза. Результатом манипуляций явилось образование костного регенерата и восстановление опорной функции поврежденной конечности.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, ложный сустав, собака.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) — это стромальные клетки, содержащиеся во многих тканях, имеющих мезенхимное происхождение. Они способны к мультипотентной дифференцировке, что, в случае их трансплантации, может приводить к индукции роста костной, хрящевой, жировой, гладкой мышечной тканей и сухожилий [1].

Способность ММСК к дифференцировке в различных направлениях открывает широкие перспективы для регенеративной ветеринарии. Процедура изъятия жировой ткани малотравматична и не ведет к образованию косметического или функционального дефекта. Именно поэтому в клинической практике более удобно использовать подкожную жировую клетчатку в качестве источника ММСК. Одновременно возможно взятие довольно большого объема образца, что позволяет в более короткие сроки получить необходимое для лечения количество ММСК.

Известно, что Комитет мезенхимных и тканевых стволовых клеток Международного общества клеточной терапии выделил критерии определения ММСК [2]:

- ММСК должны обладать адгезией к пластику;
- ММСК должны экспрессировать маркеры дифференцировки CD105, CD73, CD90;
- ММСК не должны экспрессировать CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 и HLA-DR;
- ММСК должны обладать способностью к дифференцировке *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондробласты.

e-mail: rizvanov@gmail.com

This study demonstrates the possibility of using cell-based therapies for the treatment of the long-term intergrow fractures and pseudoarthrosis in dogs. Multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) were isolated from adipose tissue of an adult dog. Multipotent cells was confirmed by the ability to differentiate into 3 main directions (osteogenic, adipogenic and chondrogenic), as well as the expression of the markers CD73, CD105, vimentin. Clinical application received MMSCs in the treatment of pseudoarthrosis of tibia in dogs stimulated bone formation processes. The result of cell therapy was callus formation and recovery of the support function of the injured extremity.

**Key words:** multipotential mesenchymal stromal cells, pseudoarthrosis, dog.

Практика применения данного вида клеток в ветеринарии, как ни странно, не так велика. Основной целью лечения переломов у собак и кошек является получение хороших анатомо-функциональных результатов. Переломы большеберцовой и малоберцовой костей являются распространёнными повреждениями у мелких домашних животных. В среднем они составляют 15% от общего числа переломов у собак и кошек. Они чаще всего возникают в результате дорожно-транспортных происшествий, драк животных или попадания конечности в преграду во время движения на большой скорости [3].

Одним из осложнений, появляющихся при лечении переломов, является несрастание отломков кости [4]. Частота возникновения приобретенных (посттравматических) ложных суставов составляет 2–3% среди всех переломов [4]. При высокоэнергетических травмах в области репаративного процесса, по мнению некоторых авторов, не исключены морфофункциональные изменения клеточных источников остеорепарации, которые характеризуются «дедифференцировкой» остеогенно детерминированных клеток периоста и эндоста, утратой их остеогенной детерминированности. Эти изменения периостальных и эндостальных источников регенерации приводят к тому, что в костной ране формируется соединительнотканый (фиброзный) регенерат [4]. Следовательно, трансплантация аутогенных ММСК при нарушениях репаративного остеогенеза и дефектах костной ткани может обладать значимой терапевтической эффективностью.

### Ветеринарное наблюдение

На приеме осмотрен половозрелый самец беспородной собаки, возраст — 3 года. Из анамнеза известно, что 6 мес. назад был получен травматический перелом диафиза большеберцовой кости задней правой лапы, по поводу которого животное было оперировано дважды. Первый раз костные отломки сопоставляли и иммобилизовали при помощи интрамедуллярного остеосинтеза с использованием стержня и серкляжного шва. Через 2 нед. произошло выпадение металлического стержня.

Было проведено его удаление, и произведен на- костный остеосинтез пластиной. Исходом прове- денного лечения стало формирование через 4 мес. после оперативного вмешательства ложного сустава (рис. 1А, Б).

Хозяевам предложено проведение остеосинтеза спицами с одновременным введением в место со- поставления костных отломков аутогенного клеточ- ного препарата ММСК. В состав препарата входили аутогенные ММСК, полученные из жировой ткани собаки и фибриновый клей Тиссукол (БАКСТЕР АГ, Австрия).

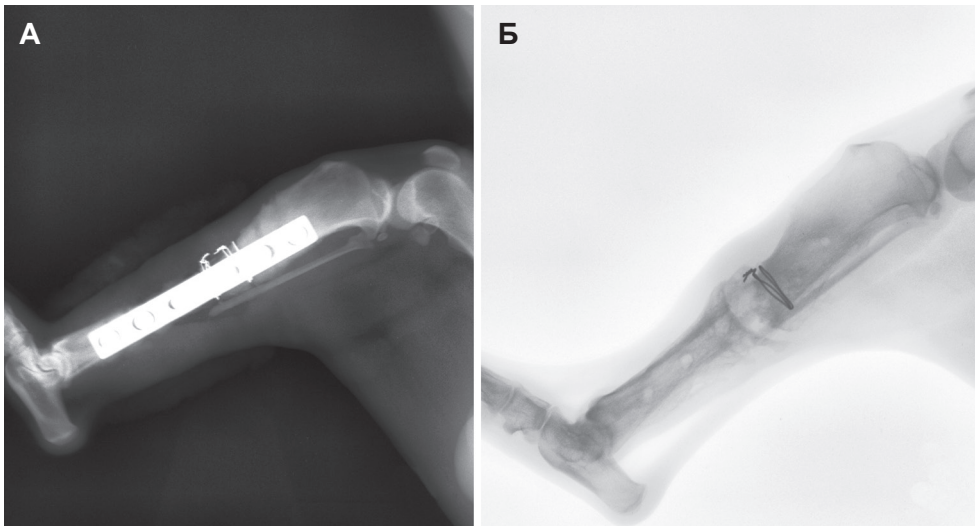


Рис. 1.  
Рентгенограммы:  
А — кости конечности  
после накостного  
osteosynthesis пластиной;  
Б — сформировавшийся  
ложный сустав  
большеберцовой кости

### Получение культуры ММСК жировой ткани

Под общей анестезией в условиях ветеринарной операционной выделили фрагмент большого сальника собаки, весом не менее 5 г. Полученный образец ткани доставили в лабораторию в стерильном растворе фосфатно-солевого буфера (PBS, Биолот, Россия) с пенициллином-стрептомицином (ПанЭко, Россия).

Из полученного фрагмента ткани выделяли стро- мально-васкулярную фракцию по стандартной мето- дике [7]. Коротко, жировую ткань механически из- мельчали на фрагменты около 1 мм<sup>3</sup> и инкубировали в растворе коллагеназы краба (Биолот, Россия) с ко- нечной концентрацией 0,2% в течение 1 ч при темпе- ратуре 37°C при покачивании 180 грт. Через 24 ч пи- тательную среду заменили на свежую, удалив таким образом остатки клеток крови и не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки. В последующем смену ростовой среды проводили раз в 3 дня. При до- стижении 80% плотности монослоя ММСК рассеивали. Пересев осуществляли методом трипсинизации 0,25% трипсина-EDTA. Для получения необходимого количества ММСК культивировали до 6 пассажа.

### Иммуноцитохимический анализ экспрессии маркеров ММСК собак

Клетки рассеивали на 24-луночный планшет и культивировали до достижения ими монослоя. Убирали старую среду, лунки промывали 200 мкл раствора TBS (Helicon, Россия). Для фиксации кле- ток в каждую лунку добавляли по стенке по 250 мкл метанола и инкубировали при -20°C в течение 20 мин. Клетки промывали в 200 мкл TBS три раза по 5 мин. Для окрашивания на внутриклеточные

антигены осуществляли пермобилизацию клеточных мембран 0,025% раствором Triton X-100 (Helicon, Россия) в количестве 200 мкл на лунку в течение 20 мин. при комнатной температуре. Для исследова- ния поверхностных антигенов этот шаг пропускали. Клетки промывали в 200 мкл TBS три раза по 5 мин. Добавляли по 100 мкл на лунку первичных антител (табл.).

### Антитела, использованные в работе

Антитело	Производитель	Рабочее разведение
Мышиное моноклональное антитело к CD34 (IC0115)	Santa Cruz sc-7324	ICC – 1:100
Кроличье поликлональное антитело к CD45 (H-230)	Santa Cruz sc-25590	ICC – 1:100
Кроличье поликлональное антитело к CD73 (H-300)	Santa Cruz sc-25603	ICC – 1:100
Кроличье поликлональное антитело к CD105 (H-300)	Santa Cruz sc-20632	ICC – 1:100
Кроличье моноклональное антитело к CD133	AbCam ab19898	ICC – 1:200

Окончание таблицы

Антитело	Производитель	Рабочее разведение
Мышиное моноклональное антитело к виментину (V9)	Santa Cruz sc-6260	ICC – 1:100
Антитела ослика к IgG мыши, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488	Invitrogen A21202	1:1000
Антитела ослика к IgG кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488	Invitrogen A21206	1:1000
Антитела ослика к IgG кролика, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 555	Invitrogen A31572	1:1000

Образцы инкубировались 1 час при комнатной температуре. Клетки промывали в 200 мкл TBS три раза по 5 мин. Добавляли по 100 мкл соответствующих вторичных антител, разведенных в соотношении 1:1000 в TBS. Образцы инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Клетки промывали в 200 мкл TBS три раза по 5 мин. Добавляли 100 мкл DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол) на лунку, разведенного в соотношении 1:50000, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Клетки промывали в 200 мкл TBS, и оценивали результаты с помощью флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (CarlZeiss, Германия).

#### Проточная цитофлуориметрия

Трипсинизировали и подсчитывали клетки. На 1 лунку 96-луночного круглодонного планшета для проточной цитометрии брали 200 мкл клеточной суспензии, содержащей 200 000 клеток. Протокол проточной цитометрии для внутриклеточных антигенов (виментин): отмывали клетки от трипсина и питательной среды в растворе PBS методом центрифугирования 2 раза по 3 мин при 500 g. Фиксировали клетки в коммерческом фиксативе CellFix (Becton Dickenson) на основе формальдегида 30 мин при 4°C. Отмывали клетки от формальдегида в растворе PBS методом центрифугирования 2 раза по 3 мин при 500 g. Пермобилизовали мембрану 0,1% раствором Tween-20 в PBS в течение 10 мин. Отмывали клетки от Tween-20 в растворе PBS методом центрифугирования 2 раза по 3 мин при 500 g. Инкубировали клетки с первичными антителами в растворе PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Отмывали клетки от первичных антител в растворе PBS методом центрифугирования 2 раза по 3 мин при 500 g. Инкубировали клетки со вторичными антителами в растворе PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Отмывали клетки от вторичных антител в растворе PBS методом

центрифугирования 2 раза по 3 мин при 500 g. Результаты анализировали на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT.

Для окрашивания мембранных (поверхностных) антигенов (CD34) пермобилизацию мембраны не проводили, а фиксация клеток осуществлялась после всей процедуры окраски (постфиксация).

#### Дифференцировка ММСК жировой ткани собаки

Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке, клетки шестого пассажа были высеяны на 12-луночные планшеты по 30 000 клеток на лунку и инкубировались в ростовой среде  $\alpha$ -MEM до получения монослойной культуры (48 ч). В дальнейшем для индукции дифференцировки клетки инкубировали со специальными средами [6]. Дифференцировку осуществляли в трех направлениях: в остеогенном, адипогенном и хондрогенном.

#### Анализ дифференцировки ММСК

Осуществляли ежедневное прижизненное наблюдение за культурами клеток с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия) методами фазово-контрастной и световой микроскопии. Питательные среды меняли 2 раза в неделю.

Для установления факта дифференцировки в определенных направлениях на 21 день инкубации с дифференцировочными средами культуры клеток фиксировали охлажденным метанолом в течение 20 мин при -20°C, проводили цитохимическое окрашивание.

Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали реакцию von Kossa с 2% нитратом серебра в течение часа при ярком освещении. Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали качественную реакцию на нейтральные жиры с красителем Oil Red O (Sigma, США), окрашивающим жировые включения в красный цвет. Ядра клеток окрашивали раствором гематоксилина (Sigma, США).

Для выявления хондрогенной дифференцировки проводили окрашивание на кислые мукополисахариды, являющиеся маркером хондрообразования. Для этого фиксированные клетки промывали 200 мкл PBS трехкратно по 5 мин., окрашивали в течение 1 ч раствором Alcian Blue (1 г Alcian Blue на 100 мл 0,1 M HCl) и снова тщательно промывали PBS.

#### Получение клеточного препарата

Клеточный препарат готовили непосредственно перед трансплантацией. В качестве матрикса для удержания клеток локально в месте перелома использовали фибриновый клей Тиссукол.

Клетки 6 пассажа трипсинизировали, подсчитали и тщательно отмывали от остатков трипсина и питательной среды методом центрифугирования.

Во время операции накостного остеосинтеза и установки спица непосредственно в область костного диастаза вводили 15 000 000 клеток в 1 мл Тиссукола.

Непосредственно перед введением клеточный осадок ММСК ресуспендировали в тромбине. Полученный препарат наносили с использованием

системы дуплоджет без аппликационной иглы чтобы не повредить клетки. Система дуплоджет позволяет смешивать 2 компонента в ходе нанесения (рис. 2). Это приводит к полимеризации раствора Тиссукол-тромбин, который быстро превращается в белую, эластичную массу, обладающую высокой степенью адгезии с окружающими тканями. После нанесения препарата дожидались его застывания и ушивали раны наглухо.

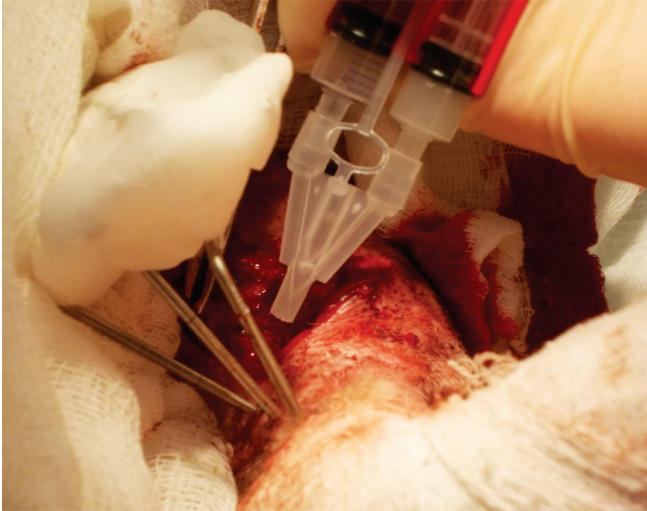


Рис. 2. Введение клеточного препарата область перелома с помощью системы дуплоджет

Впоследствии проводилось динамическое рентгенологическое обследование животного и внешний осмотр.

### Результаты

ММСК, выделенные из жировой ткани собаки, имели фибробластоподобную морфологию и сохраняли ее, по крайней мере, до 6 пассажа (рис. 3). Полученные клетки экспрессировали маркеры, характерные для ММСК (CD73, CD105, виментин) и не экспрессировали маркеры гематopoэтических клеток (CD34, CD45, CD133) (рис. 4).

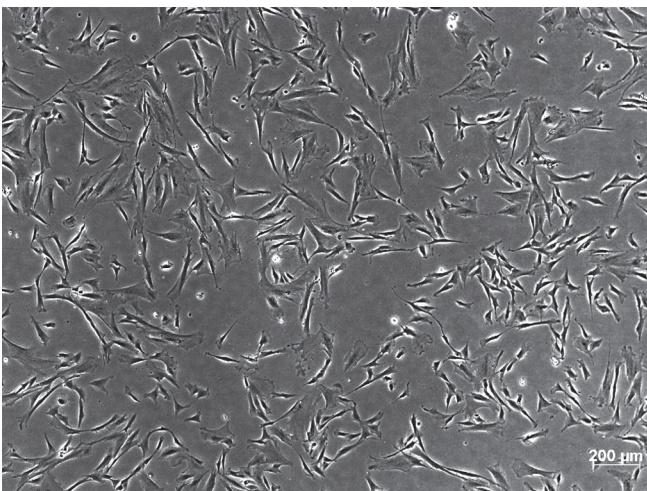


Рис. 3. ММСК собаки, 6 пассаж. Световая микроскопия

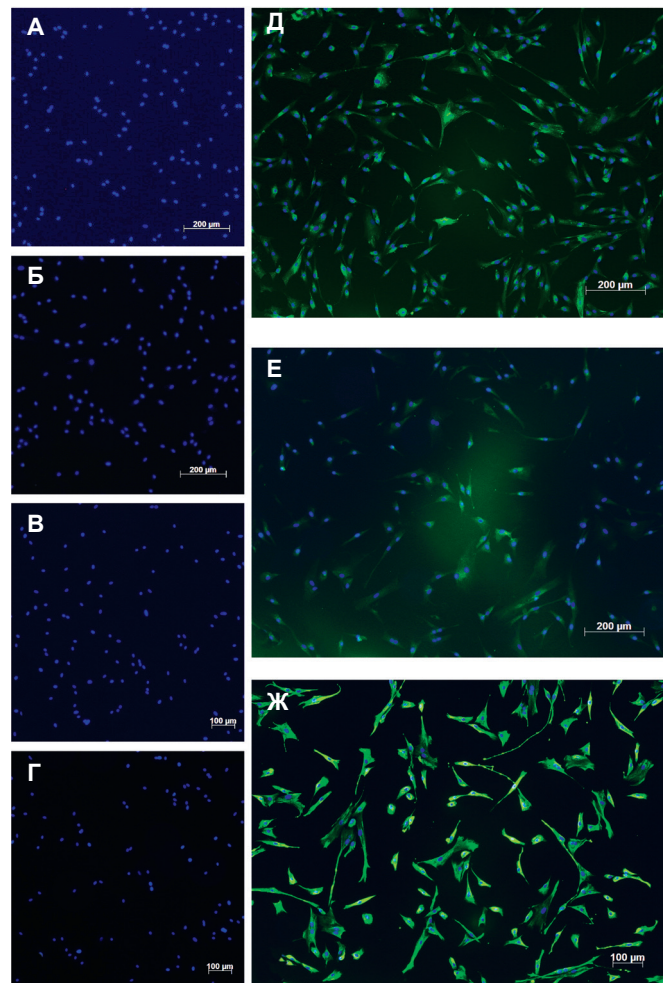


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание ММСК собаки, 6 пассаж:  
А – CD34, Б – CD45, В – CD133,  
Г – контроль, Д – CD73, Е – CD105,  
Ж – виментин.  
Вторичные антитела Alexa Fluor 488 (зеленый)  
(кроме CD133 – Alexa Fluor 555 (красный)),  
ядра окрашены DAPI (синий)

Методом проточной цитометрии была показана высокая экспрессия маркеров ММСК в полученных клетках и низкая экспрессия маркеров гемопоэтических клеток: CD34 – 1% положительных клеток, виментин – 95,8% (рис. 5).

При культивировании ММСК собаки в среде для остеогенной дифференцировки наблюдали изменение формы клеток с веретеновидной на кубовидальную, свойственную остеобластам. Реакция von Kossa выявила наличие значительных минеральных отложений в культурах ММСК, подвергнутых остеогенной дифференцировке (рис. 6А), в то время как в культурах, инкубированных в контрольной среде, таковых не наблюдалось (рис. 6Б).

При окрашивании ММСК, прошедших процедуру адипогенной дифференцировки, с помощью Oil Red O на 21 день инкубации наблюдали большое количество клеток с морфологией, типичной для адипоцитов: обилие жировых везикул различных размеров, окрашиваемых Oil Red O в красный цвет, и эксцентрически расположенное ядро (рис. 6Б). В культурах ММСК, инкубированных с контрольной средой, признаков адипогенной дифференцировки не выявили (рис. 6Д).

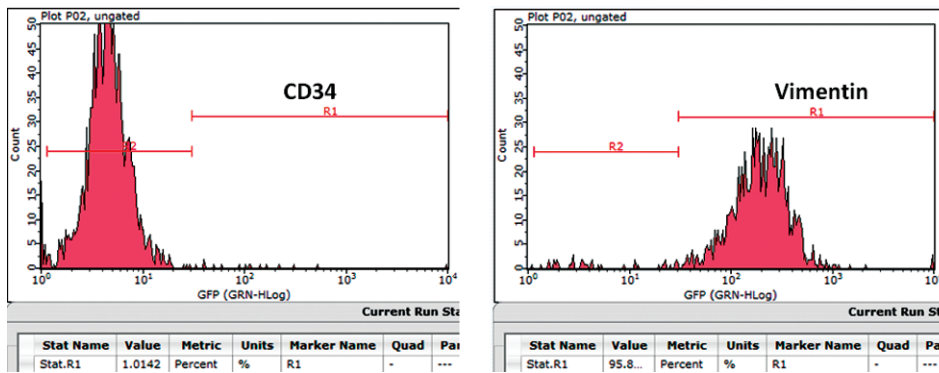


Рис. 5. Результат проточной цитофлуориметрии

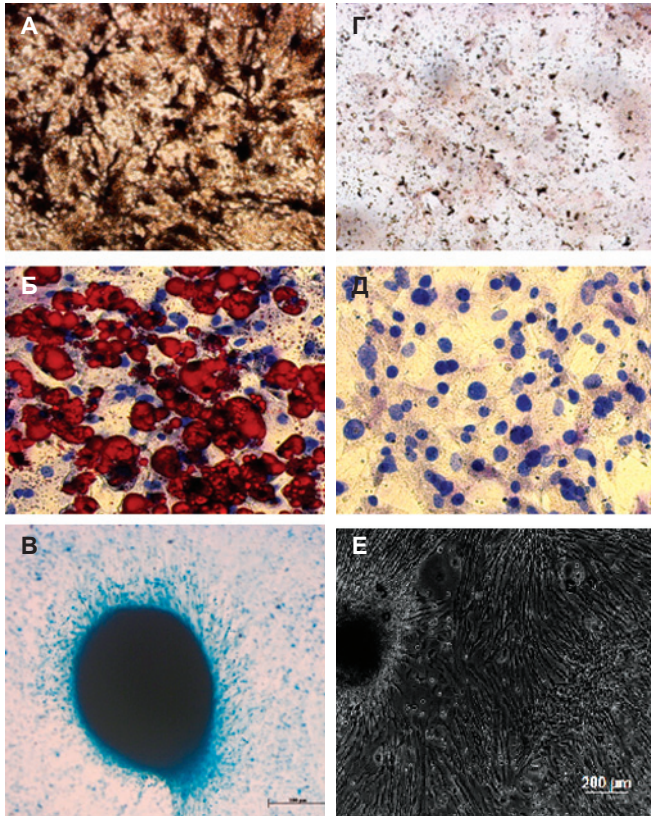


Рис. 6. Дифференцировочный потенциал ММСК собаки, полученных из жировой ткани: А (опыт); Г (контроль) – остеогенная дифференцировка, реакция Косса; Б (опыт); Д (контроль) – адипогенная дифференцировка, окрашивание Oil Red O, гематоксилин; В (опыт); Е (контроль) – хондрогенная дифференцировка: В – окрашивание Alcian Blue, Е – фазово-контрастная микроскопия. Ув. А, Б, Г, Д  $\times 10$ ; В, Е  $\times 5$

Уже через 18 ч после индукции хондрогенной дифференцировки при световой микроскопии наблюдали образование хрящеподобных структур (рис. 6В), которые в дальнейшем положительно окрашивались Alcian Blue на кислые мукополисахариды, характерные для хрящевой ткани (рис. 6Е).

Таким образом, полученные клетки обладают дифференцировочным потенциалом, характерным для ММСК.

Через 1 мес. на рентгенологическом снимке определяется начало образования костного регенерата (рис. 7А, Б). В настоящий момент металлоконструкция с лапы не демонтирована, за собакой ведется наблюдение. Животное приступает на лапу.

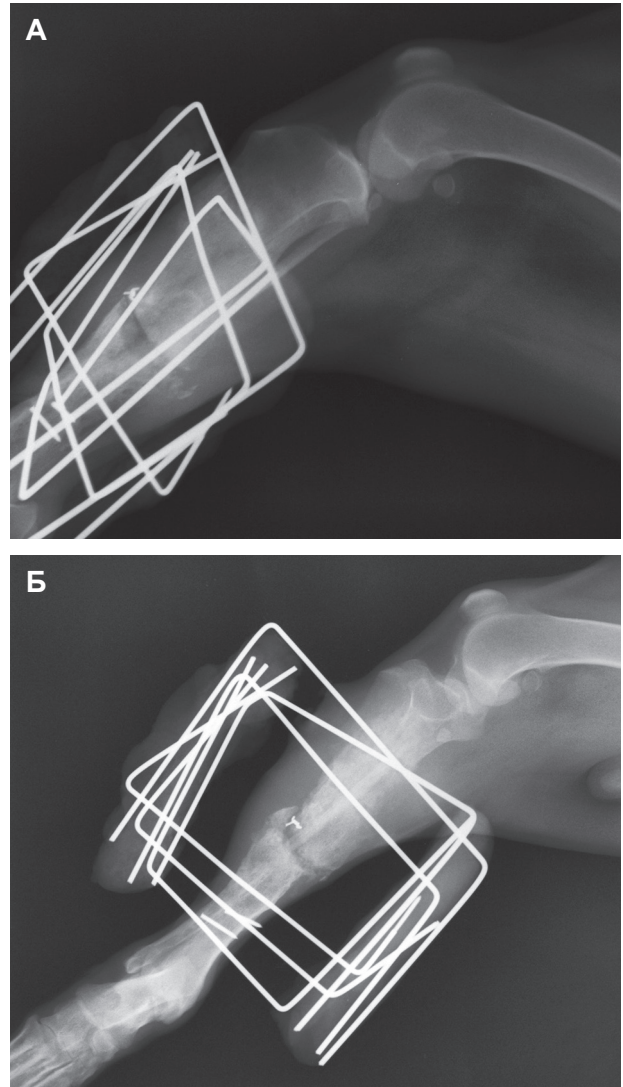


Рис. 7. Рентгенограммы оперированной конечности: А – через 2 нед.; Б – через 2 мес.

### Обсуждение

Результаты исследований показали эффективность применения аутогенных ММСК при лечении ложного сустава большеберцовой кости собаки, т.к. согласно рентгенологическим данным, через месяц после проведенной операции наблюдаются признаки консолидации перелома.

В настоящее время продолжается поиск способов индукции остеогенеза в условиях снижения местной микроциркуляции и нарушения трофики тканей. Одним из перспективных направлений признано

использование клеточных технологий в сочетании с классическими хирургическими методами лечения замедленно срастающихся переломов длинных трубчатых костей [6].

### Благодарности

*Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образователь-*

*ных центров и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Ризванов А.А. поддержан грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-433.2013.4. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. of Cell Science.* 2000; 113 (7): 1161-6.

2. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.

3. Сидибеев Б.Б. Анатомопографическое обоснование оперативных доступов и приемов при остеосинтезе бедренной и большеберцовой костей у собак [диссертация]. Москва: Ветерин. академ.; 1994.

4. Неверов А.В. Оперативное лечение ложных суставов костей голени у собак методом чрескостного компрессионно-дистракционного остеосинтеза аппаратом Г.А. Илизарова [диссертация]. Москва: Ветерин. академ.; 2004.

5. Катина М.Н., Гайфуллина Р.Ф., Хаятова З.Г. и др. Выделение, культивирование и дифференцировка мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из жировой ткани крыс *Rattus norvegicus* и хомяков *Mesocricetus auratus*. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012; 7(3): 82-7.

6. Масгутов Р.Ф., Салихов Р.З., Плаксейчук Ю.А. и др. Применение клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани при ложном суставе бедренной кости: клинический случай. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013;7(3): 116-8.

*Поступила: 17.08.2014*