

БИОТЕХНОЛОГИЯ/BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44>

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ ЛОШАДИНЫХ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВНУТРИСУСТАВНОМ ВВЕДЕНИИ

Научная статья

Аймалетдинов А.М.^{1,*}, Титова А.А.², Мансурова М.Н.³, Маланьева А.Г.⁴, Никифорова А.А.⁵, Закирова Е.Ю.⁶¹ORCID : 0000-0003-1403-8635;^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (aimaletdinowam[at]gmail.com)

Аннотация

Остеоартроз (ОА) — хроническое заболевание суставов, сопровождающееся воспалением и постепенным разрушением суставного хряща. В ветеринарной практике накоплен значительный клинический опыт применения методов регенеративной медицины при ОА. В основном этот вид терапии связан с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК). Однако внедрение МСК имеет ряд ограничений, в основном из-за стандартизации, контроля качества и коммерциализации. В настоящее время исследования показывают, что основной терапевтический эффект МСК реализуется за счет внеклеточных везикул (ВВ) — наноразмерных частиц, обладающих противовоспалительным, иммунорегуляторным и регенеративным действием. Целью этого исследования было изучение биораспределения ВВ после внутрисуставного введения при ОА. Исследования показали, что после инъекции ВВ в полость сустава (как при моделировании ОА, так и в здоровом суставе) везикулы сохранялись внутри в течение длительного времени. Электронная микроскопия показала, что ВВ адгезируются на поверхности мениска. Полученные данные открывают новые возможности для развития эффективных и стандартизированных биопрепаратов на основе ВВ для ветеринарии и, потенциально, для медицины.

Ключевые слова: остеоартроз (ОА), мезенхимные стволовые клетки (МСК), внеклеточные везикулы (ВВ), микровезикулы (МВ).

BIODISTRIBUTION OF MICROVESICLES FROM EQUINE ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS FOLLOWING INTRA-ARTICULAR ADMINISTRATION

Research article

Aimaletdinov A.M.^{1,*}, Titova A.A.², Mansurova M.N.³, Malaneva A.G.⁴, Nikiforova A.A.⁵, Zakirova Y.Y.⁶¹ORCID : 0000-0003-1403-8635;^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation

* Corresponding author (aimaletdinowam[at]gmail.com)

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic joint disease accompanied by inflammation and gradual destruction of joint cartilage. In veterinary practice, considerable clinical experience has been accumulated in the use of regenerative medicine methods for OA. This type of therapy is mainly associated with the use of mesenchymal stem cells (MSCs). However, the introduction of MSCs has a number of limitations, mainly due to standardisation, quality control and commercialisation. Current research shows that the main therapeutic effect of MSCs is achieved through extracellular vesicles (EVs) — nanoscale particles with anti-inflammatory, immunoregulatory and regenerative effects. The aim of this study was to examine the biodistribution of EV after intra-articular administration in OA. Studies have shown that after EV injection into the joint cavity (both in OA modelling and in healthy joints), the vesicles remained inside for a long time. Electron microscopy showed that EV adhere to the surface of the meniscus. The obtained data open up new opportunities for the development of effective and standardised EV-based biological products for veterinary medicine and, potentially, for human medicine.

Keywords: osteoarthritis (OA), mesenchymal stem cells (MSCs), extracellular vesicles (EVs), microvesicles (MVs).

Введение

Регенеративная медицина — перспективное направление современной медицины, ориентированное на разработку технологий восстановления и замещения поврежденных клеток, тканей и органов. Важнейшей стратегией этого направления выступает клеточная терапия, основанная на применении стволовых клеток. Основным объектом клеточной терапии являются мезенхимные стволовые клетки (МСК), что обусловлено их противовоспалительным, иммуномодулирующим и регенеративным потенциалом. В ветеринарной практике накоплен значительный клинический опыт применения МСК, подтверждающий эффективность этого подхода [1], [2]. Однако перспективы их широкого клинического использования ограничены сложностями стандартизации и коммерциализации [3].

В ветеринарной практике клеточная терапия нашла широкое применение, особенно при лечении патологий опорно-двигательного аппарата [4]. Стволовые клетки также демонстрируют значительный терапевтический потенциал в восстановлении поврежденных тканей у животных-компаньонов [3], [5].

Многочисленные исследования демонстрируют, что терапевтический эффект МСК в значительной степени опосредован внеклеточными везикулами (ВВ). Эти наноразмерные частицы обладают сходным с МСК противовоспалительным, иммунорегуляторным и регенеративным действием, а в некоторых случаях превосходят по эффективности клетки-продуценты [6].

Внеклеточные везикулы (ВВ) — это наноразмерные липидные двухслойные структуры, секретируемые практически всеми типами клеток. Их размер варьируется от 30 нм до нескольких микрометров. ВВ обычно классифицируют по размеру на три группы: апоптотические тельца имеют диаметр 800–5000 нм, микровезикулы — от 50 до 1000 нм, а нановезикулы (включая экзосомы) — от 40 до 150 нм [7]. ВВ способны транспортировать биологически активные молекулы, включая белки, липиды, РНК и ДНК, и играют ключевую роль в различных физиологических и патологических процессах. Благодаря своей природной способности переносить биологические молекулы, внеклеточные везикулы рассматриваются как перспективные терапевтические агенты и система доставки лекарственных средств. Использование бесклеточной терапии на основе ВВ считается перспективным подходом для стимуляции регенерации тканей [8]. ВВ преодолевают ключевые ограничения клеточной терапии, обладая такими преимуществами, как стабильность, низкая иммуногенность и гибкость дозирования (возможность применения в широком диапазоне терапевтических доз) [9], [10]. Исследования ВВ в ветеринарии все еще находятся на ранних этапах становления, хотя в последние годы было опубликовано несколько статей [11], [12].

Перед клиническим применением ВВ в качестве носителей для доставки лекарств и терапевтических агентов необходимо тщательно изучить их биораспределение и фармакокинетику [13]. Однако мониторинг биораспределения экзогенно введенных ВВ *in vivo* остается сложной задачей из-за их естественного происхождения, малого размера и короткого периода полувыведения [14]. Для отслеживания ВВ *in vivo* используются различные методы, включая маркировку липофильными флуоресцентными красителями или радиоизотопами, а также генетическую инженериию для экспрессии люминесцентных белков [7].

Цель настоящего исследования — изучение биораспределения ВВ, полученных при помощи цитохалазина В при внутрисуставном введении.

Методы и принципы исследования

2.1. Одобрение этического комитета

Данное исследование было одобрено Экспертным комитетом по биомедицинской этике Казанского федерального университета (Протокол 3, дата 5 мая 2015 г.) в соответствии как с институциональными, так и с международными этическими рекомендациями ARRIVE.

2.2. Выделение МСК лошади

МСК были получены из жировой ткани лошади. Жировая ткань была предоставлена ветеринарной службой Казанского ипподрома. Полученные образцы в стерильных условиях очищали от соединительной ткани, промывали фосфатным буферизованным физиологическим раствором (PBS, Панэко, Россия) и измельчали при помощи ножниц. Измельченную ткань инкубировали 1 ч с 0,2% коллагеназой краба (Панэко, Россия) в шейкере-инкубаторе. Далее клетки осаждали при помощи центрифуги в течение 10 мин при 800 g, супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 0,9% физиологическом растворе (Панэко, Россия). Отмытый осадок повторно суспендировали в среде для выращивания, состоящей из DMEM-Glutamax I (high glucose, Панэко, Россия) с добавлением 10% сыворотки плодов коров (FBS, Панэко, Россия) и 1% пенициллина-стрептомицина (Панэко, Россия), и высевали на фласки. Через 24 ч прикрепившиеся клетки промывали физиологическим раствором и полученную культуру клеток поддерживали в ростовой среде (10%FBS, DMEM: F12, L- глутамин, антибиотики) в увлажненной атмосфере 95% O₂ и 5% CO₂. Смену среды проводили через 3 дня.

2.3. Проточная цитометрия выделенных клеток

Принадлежность клеток к клеточному пулу стволовых клеток определяли окрашивая методами иммуноцитохимии на мембранные маркеры клеток мезенхимного происхождения. Для этого применяли антитела: CD 44 (Biolegend, clone IM7, USA), CD 90 (Sony Biotechnology, cat № 1612630, USA). В качестве отрицательного контроля окрашивали антителами к CD 34 (ICO115) (Santa Cruz, sc-7324, USA), CD 45 (BioLegend, cat №202205, USA). Окрашивание клеток проводили согласно инструкции фирм-производителей. Анализ результатов производили при помощи проточного цитофлуориметра Guava EasyCyte 8HT (Millipore, USA). Результат проточной цитометрии выражен в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту).

Также для подтверждения биологической активности выделенных клеток проводили дифференцировку в 3 направлениях (остеогенном, хондрогенном, адипогенном) по методике, описанной ранее [15].

Фиксировали результаты дифференциации с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

2.4. Получение МВ из МСК лошади

Получение микровезикул (МВ) из культуры клеток МСК лошади осуществляли по методике, опубликованной ранее [16]. При достижении культурой клеток плотности монослоя 90%, отбирали питательную среду, дважды промывали культуру от остатков среды с помощью PBS. Клетки открепляли с культурального пластика при помощи 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия), затем отмывали клетки PBS. Полученную суспензию инкубировали в 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: 500 об/мин 10 мин, супернатант отбирали и центрифугировали 500 об/мин 20 минут, супернатант отбирали и центрифугировали 3000 об/мин 25 минут. Осадок, содержащий МВ, отмывали большим количеством PBS, центрифугируют при 3000 об/мин 25 минут. Полученный осадок МВ использовали далее в работе.

2.5. Исследование биораспределения МВ МСК лошади на мышах

Для оценки миграционного потенциала МВ из МСК лошади окрашивали витальным красителем Dil (Lumiprobe, Россия). Для этого МСК лошади окрашивали красителем Dil и получали из них МВ. МВ вводили внутрь коленного сустава мышей под общей анестезией. Доза МВ была эквивалентна 500 тыс МСК, из которых они были получены. Биораспределение оценивали при помощи прибора IVIS Spectrum Perkin Elmer (США) на 3, 7, 14 21 сутки после их введения.

2.6. Исследование биораспределения МВ МСК лошади при моделировании остеоартроза на крысах

ОА была воспроизведена на крысах самцах линии Вистар массой 300-350 г. Всех экспериментальных и контрольных животных содержали, кормили в соответствии с установленными Законом стандартами. ОА воспроизводили хирургическим путем. Операцию проводили под общей анестезией. Для этого использовали Золетил 100 (Virbac, Франция) и Ксилазина (Nitr-Pharm, Россия). Для обезболивания использовали Мелоксидин (Промветсервис, Беларусь). ОА вызывали путем рассечения медиальной коллатеральной связки. Для этого медиальный мениск захватывали кровоостанавливающим зажимом и отрезали проксимально по направлению к бедренной кости. Мениск рассекали скальпелем или маленькими хирургическими ножницами. Кожа ушивалась шелковыми нитками 4-0.

Для оценки миграционного потенциала МВ вводились внутрисуставно через 24 часа после проведения операции. Для визуализации их окрашивали при помощи витального красителя Dil (Lumiprobe, Россия). Биораспределение оценивали при помощи прибора IVIS Spectrum Perkin Elmer на 1, 3, 7, 14 день после их введения. Доза МВ была эквивалентна 1млн МСК из которых они были получены.

2.7. Визуализация МВ при помощи электронной микроскопии

Для визуализации МВ использовали сканирующую электронную микроскопию (SEM). Для этого крысам с индуцированным ОА внутрисуставно вводили МВ. Через 3сут изымали поврежденные мениски микроскопировали. Для этого напыляли сплав Au/Pd в соотношении 80/20. При проведении количественного и качественного анализа Au/Pd были исключены. Зафиксированные на держатель образцы помещались в камеру электронного микроскопа, где проводилось зондирование выбранных участков. Исследования проводились на автоэмиссионном сканирующем электронном микроскопе Merlin (Carl Zeiss). Микроскоп оснащен спектрометром энергетической дисперсии AZtec X-Max (Oxford Instruments). Разрешение спектрометра 127 эВ. Съемка морфологии поверхности и элементный анализ проводился при ускоряющем напряжении 20 кэВ и рабочем отрезке 9 мм, что позволяет избежать минимальных погрешностей. Глубина зондирования при проведении элементного анализа составляет менее 1 микрона. Съемка выполнена с BSE-детектором, фазовый контраст.

Основные результаты

Клетки, выделенные из жировой ткани лошади, несли на своей поверхности характерные маркеры МСК и не имели маркеры гематопозитических стволовых клеток: CD34 (0%), CD45 (0%), CD44 (91%) и CD90 (100%). Также полученные клетки дифференцировались в адипо-, хондро- и остеогенном направлении при культивировании в соответствующих дифференцировочных средах результаты показаны на рисунке 1. Проведенные эксперименты показали, что клетки, полученные из жировой ткани лошади являются мезенхимными стволовыми клетками (рис.1). Далее для исследований из этих клеток были получены МВ.

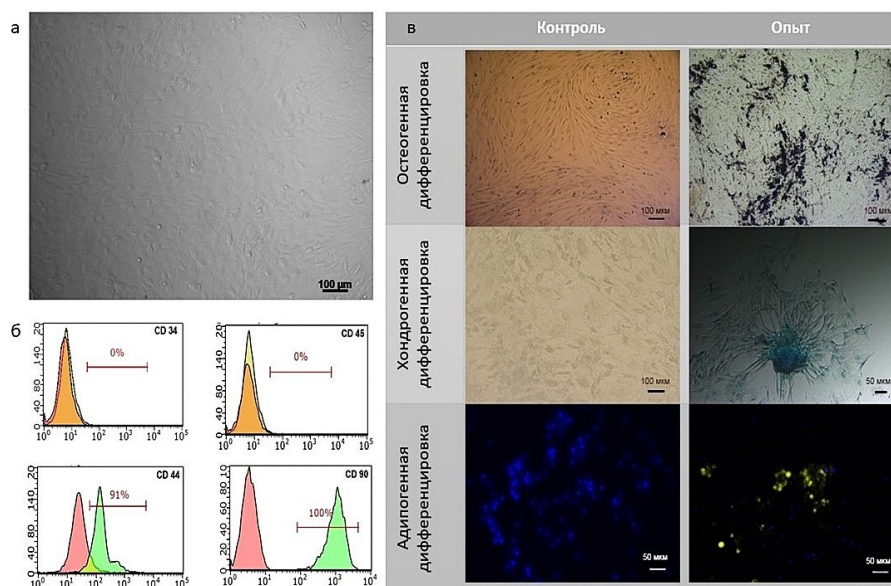


Рисунок 1 - Характеристика стволовых клеток лошади:

а – монослой МСК; б – результат анализа МСК с помощью проточного цитофлуориметра; в – результат дифференцировки МСК

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.1>

Для оценки применимости, полученных из МСК МВ в качестве терапевтического агента, было изучено биораспределение МВ при внутрисуставном введении. На первом этапе была проведена предварительная оценка биораспределения МВ при внутрисуставном введении мышам. Исследование показало, что при введении МВ внутрь сустава они сохранялись на протяжении 14 суток. На 21 сутки флуоресцирующий сигнал не обнаруживался. Результаты представлены на рисунке 2.

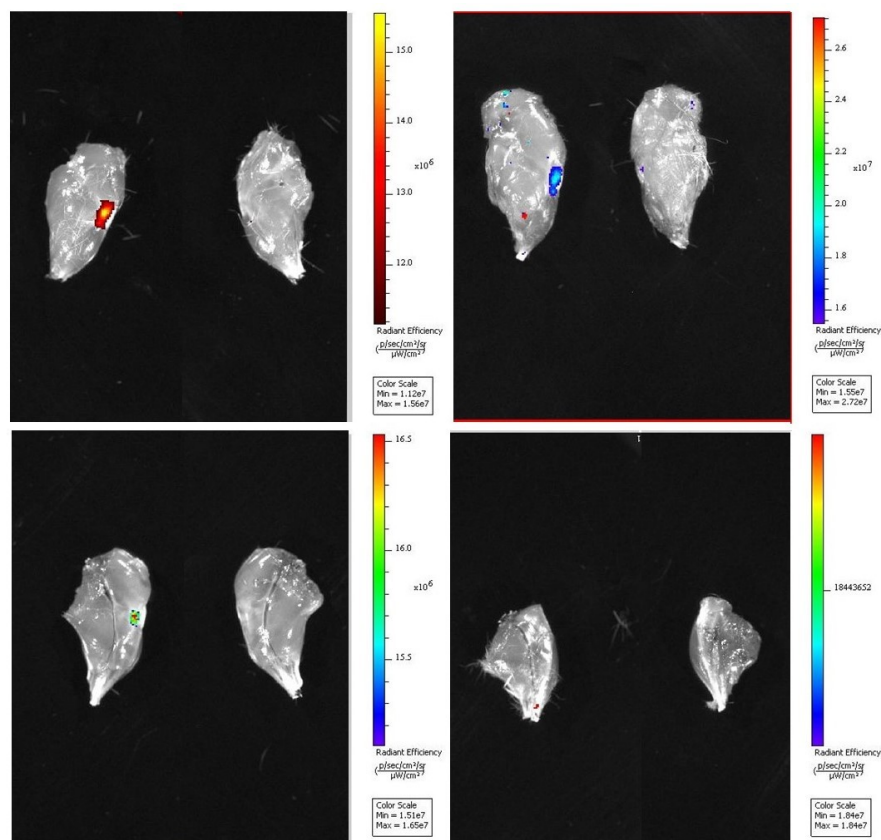


Рисунок 2 - Оценка биораспределения на мышах при внутрисуставном введении:

а – 3 сутки; б – 7 сутки; в – 14 сутки; з – 21 сутки

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.2>

Примечание: слева – суставная поверхность мениска после введения MB; справа – контроль

Далее было изучено биораспределение MB при моделировании ОА на крысах. Полученные в результате эксперимента данные показали, что меченные Dil MB начинали флуоресцировать через сутки после введения в сустав, далее свечение выявляли на 3 и 7 сутки. Уже через 14 дней свечение не обнаруживалось. Результаты представлены на рисунке 3.

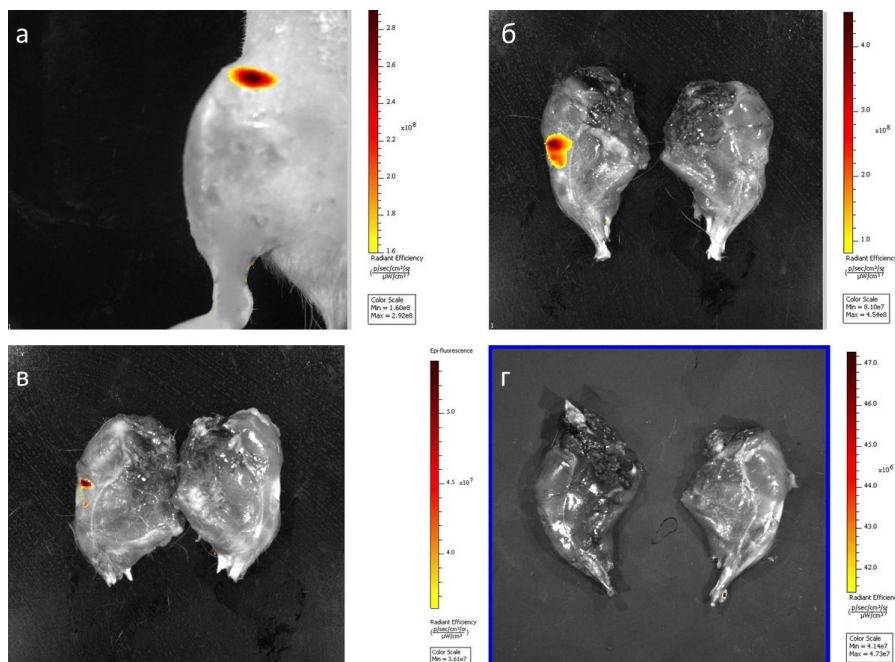


Рисунок 3 - Биораспределение МВ при внутрисуставном введении после моделирования ОА на крысах:
а – флуоресценция на 1-е сутки; б – флуоресценция на 3-и сутки; в – флуоресценция на 7-сутки; г – флуоресценция на 14-е сутки

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.3>

Примечание: слева – суставная поверхность мениска после введения МВ; справа – контроль

Следующим этапом исследования было визуализация МВ на поверхности мениска после внутрисуставного введения. Анализ данных, полученных при помощи SEM, показал, что через 3 суток после введения МВ внутрь сустава они равномерно адгезировались на поверхности мениска. Результаты представлены на рисунке 4.

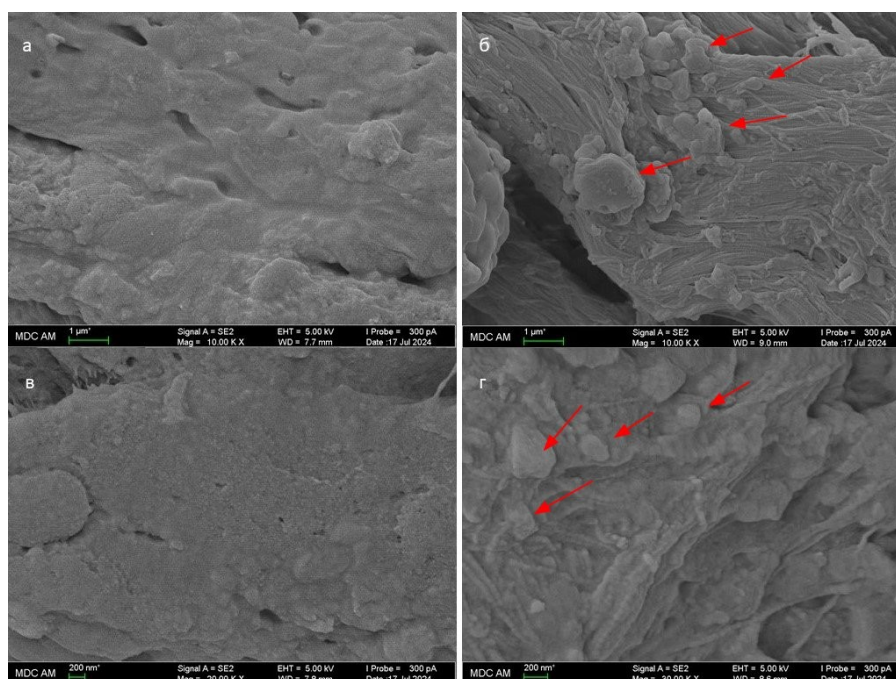


Рисунок 4 - Сканирующая электронная микроскопия поверхности мениска:
а, в – поверхность мениска без внутрисуставного введения МВ; б, г – поверхность мениска после внутрисуставного введения МВ

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.4>

Примечание: стрелками указаны микровезикулы

Таким образом, МВ могут оказывать свой терапевтический эффект по крайней мере в течение 2х недель после внутрисуставного введения. Более длительное нахождение МВ в суставах мышей, возможно связана с их интактностью, т.к. в суставах крысы с моделированным ОА шли воспалительные/регенеративные процессы, что, по всей видимости, усилило деградацию МВ.

Обсуждение

Различные доклинические исследования показали, что МВ из МСК являются перспективным источником бесклеточной терапии. Терапевтическая эффективность МВ была показана для многих заболеваний. Также имеются сведения использования их в терапии ОА [3]. Настоящее исследование посвящено изучению биораспределения ВВ в опытах *in vivo*.

Изучение биораспределения МВ являются важным этапом в доклинических исследованиях. Современные исследования биораспределения МВ *in vivo* крайне неоднородны и используют самые разные методологии [6]. Для изучения биораспределения мы в своих экспериментах применяли метод окрашивания МВ витальными липофильными красителями, которые относятся к классу карбоцианинов. Окрашивание МВ липофильными красителями позволяет получить высокоинтенсивный флуоресцентный сигнал, который был идентифицирован нами при помощи прибора при помощи прибора IVIS Spectrum Perkin Elmer (США). Исследование биораспределения меченых МВ *in vivo* показало, что интенсивность флуоресценции внутри сустава достигала пика через 24 часа после введения, а затем постепенно снижалась до 21 суток.

Визуализация МВ после введения внутрь сустава проводили при помощи сканирующей электронной микроскопии. Этот метод позволяет показывать расположение МВ и адгезию в тканях. Исследование является важным, так как показывает взаимодействие МВ с тканью мишенью. Наши исследования показали, что МВ через 3 суток адгезировались на поверхности мениска.

Полученные результаты исследований послужат базой для других доклинических и клинических исследований.

Заключение

Проведенные эксперименты показали, что МВ после введения адгезируются на хрящевых поверхностях сустава и располагаются в суставе на протяжении довольно большого срока. Исследования показывают, что МВ могут быть неплохим инструментом для терапии ОА, так как они располагаются в пораженном органе довольно долго и, следовательно, долго могут оказывать действие на ткани.

Финансирование

Работа выполнена за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан».

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Рубцова Л.Н., Санкт-Петербургский Государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург Российская Федерация
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.1>

Funding

The work was carried out with the support of a grant from the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan, provided to young candidates of science (postdoctoral researchers) for the purpose of defending their doctoral dissertations, conducting scientific research, and performing work duties in scientific and educational organisations of the Republic of Tatarstan within the framework of the State Programme of the Republic of Tatarstan "Scientific and Technological Development of the Republic of Tatarstan".

Conflict of Interest

None declared.

Review

Rubtsova L.N., St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint-Petersburg Russian Federation
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2025.159.44.1>

Список литературы на английском языке / References in English

1. Volk S.W. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine / S.W. Volk // Wound Repair Regen. — 2013. — Vol. 1. — № 3. — P. 382–394.
2. Dehghan M.M. Transplantation of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Platelet-Rich Plasma Accelerate Distraction Osteogenesis in A Canine Model / M.M. Dehghan, M. Baghaban Eslaminejad, N. Motallebizadeh [et al.] // Cell J. — 2015. — Vol. 17. — № 2. — P. 243–252.
3. O'Brien T.J. Extracellular vesicles in the treatment and prevention of osteoarthritis: can horses help us translate this therapy to humans? / T.J. O'Brien, F. Hollinshead, L.R. Goodrich // Extracell Vesicles Circ Nucl Acids. — 2023. — Vol. 4. — № 2. — P. 151–169.
4. Franco G.G. Percutaneous application of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell in dogs submitted to minimally invasive plate osteosynthesis of the tibia / G.G. Franco GG, B.W. Minto BW, R.M. Dreibi [et al.] // Acta Cir Bras. — 2021. — Vol. 36. — № 2. — P. e360206.

5. Valeeva A.N. Subconjunctival Use of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Canine Ulcerative / A.N. Valeeva, A.G. Malanyeva, C.S. Rutland [et al.] // *Opera Medica et Physiologica*. — 2024. — № 1. — P. 94–102.
6. Aimaletdinov A.M. Tracking of Extracellular Vesicles' Biodistribution: New Methods and Approaches / A.M. Aimaletdinov, M.O. Gomzikova // *Int J Mol Sci*. — 2022. — Vol. 23. — № 19. — P. 11312.
7. Martin-Rufino J.D. Targeting the Immune System With Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles: What Is the Cargo's Mechanism of Action? / J.D. Martin-Rufino, N. Espinosa-Lara, L. Osugui [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol*. — 2019. — № 7. — P. 308.
8. Konala V.B. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration / V.B. Konala, M.K. Mamidi, R. Bhonde [et al.] // *Cytotherapy*. — 2016. — Vol. 18. — № 1. — P. 13–24.
9. Raposo G. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends / G. Raposo, W. Stoorvogel // *J Cell Biol*. — 2013. — Vol. 200. — № 4. — P. 373–383.
10. Lanci A. Therapeutic Application of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells in Domestic Animals / A. Lanci, E. Iacono, B. Merlo // *Animals (Basel)*. — 2024. — Vol. 14. — № 15. — P. 2147.
11. Xiong Y. Emerging role of extracellular vesicles in veterinary practice: novel opportunities and potential challenges / Y. Xiong, P. Lou, C. Xu [et al.] // *Front. Vet. Sci*. — 2024. — № 11. — P. 1335107.
12. Vella L.J. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases / L.J. Vella, R.A. Sharples, R.M. Nisbet [et al.] // *Eur Biophys J*. — 2008. — Vol. 27. — № 3. — P. 323–332.
13. Kang M. Biodistribution of extracellular vesicles following administration into animals: A systematic review / M. Kang, V. Jordan, C. Blenkiron [et al.] // *J Extracell Vesicles*. — 2021. — Vol. 10. — № 8. — P. e12085.
14. Chulpanova D.S. Human Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin 2 Can Suppress Proliferation of Neuroblastoma Cells in Co-Culture and Activate Mononuclear Cells In Vitro / D.S. Chulpanova, V.V. Solovyeva, V. James [et al.] // *Bioengineering (Basel)*. — 2020. — Vol. 7. — № 2. — P. 59.
15. Zakirova E, Aimaletdinov A, Mansurova M, Titova A, Kurilov I, Rutland CS, Malanyeva A, Rizvanov A. Artificial Microvesicles: New Perspective on Healing Tendon Wounds / E. Zakirova, A. Aimaletdinov, M. Mansurova [et al.] // *Cells Tissues Organs*. — 2024. — Vol. 213. — № 1. — P. 24–39.