

УДК 576.532

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. Е. Ю. Закирова^{1, *}, А. М. Аймалетдинов¹, М. А. Тамбовский^{1, **}, А. А. Ризванов^{1, 2}

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

²Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, 420064 Россия

*E-mail: lenahamzina@yandex.ru

**E-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com

Поступила в редакцию 07.11.2020 г.

После доработки 11.12.2020 г.

Принята к публикации 18.12.2020 г.

В последние годы в ветеринарной медицине все чаще появляются сообщения о клеточной терапии с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК) животных. В большинстве случаев МСК животных описываются без необходимой иммунофенотипической характеристики, а дифференцировка *in vitro* проводится редко. Отсутствие единого маркера, специфичного для МСК и ограниченная доступность антител для МСК животных затрудняют эти исследования. В настоящей работе описаны иммунофенотипы линий МСК, выделенных из подкожно-жировой ткани собаки, кошки, лошади, свиньи, мыши, крысы и человека. Показана успешная дифференцировка в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях полученных нами клеток.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, идентификация, животные

DOI: 10.31857/S0041377121020097

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются очень перспективной субпопуляцией взрослых стволовых клеток, применяемых как в регенеративной медицине, как и в ветеринарии. МСК жировой ткани взрослого человека представляют собой фибробластоподобные мультипотентные стволовые клетки, способные к адгезии на пластике при культивировании в лабораториях. Считается, что минимальными признаками для идентификации выделенных из жировой ткани клеток как МСК является наличие на цитоплазматической мембране маркеров CD105, CD73, CD90, CD44, HLA-ABC, и отсутствие маркеров CD45, CD34 и HLA-DR. Предполагаемые МСК должны дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и хондробласты *in vitro* (Dominici et al., 2006). Те же рекомендации были приняты и для характеристики МСК животных (Gugjoo et al., 2019).

В ветеринарной практике для терапии заболеваний и травм животных, которые не поддаются лечению классическими методами, также используют МСК (Закирова и др., 2015; Ardanaz et al., 2016). Исследования в области ветеринарной регенеративной медицины были сосредоточены, главным образом, на домашних и спортивных животных. Однако критическое прочтение опубликованных результатов в сочетании с избранными работами, в которых ис-

пользовали разные виды домашнего скота, позволяет получить ценную информацию о будущем применении регенеративной медицины в животноводстве. У животных были идентифицированы два класса стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки и взрослые (соматические) стволовые клетки. Соматические стволовые клетки включают в себя мезенхимные, гемопоэтические и тканеспецифичные (клетки-предшественники) стволовые клетки (Hill et al., 2019).

Однако в лечебной ветеринарной практике в случае применения МСК остро стоит вопрос идентификации полученных от животных клеток (Zakirova et al., 2017). Это связано с тем, что в настоящее время ограничена доступность моноклональных антител для МСК домашних и сельскохозяйственных животных. При этом успешная дифференциация клеток в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях является дополнительным этапом проверки их биологической активности и принадлежности к пулу МСК (De Schauwer et al., 2012).

Для проведения научно-исследовательских работ в рамках медицинских и ветеринарных проектов нами были получены фибробластоподобные клетки, выделенные из подкожной жировой ткани мыши, крысы, собаки, кошки, свиньи, лошади и человека. Целью данного исследования было подтвердить их принадлежность к МСК.

Принятые сокращения: МСК – мезенхимные стволовые клетки.

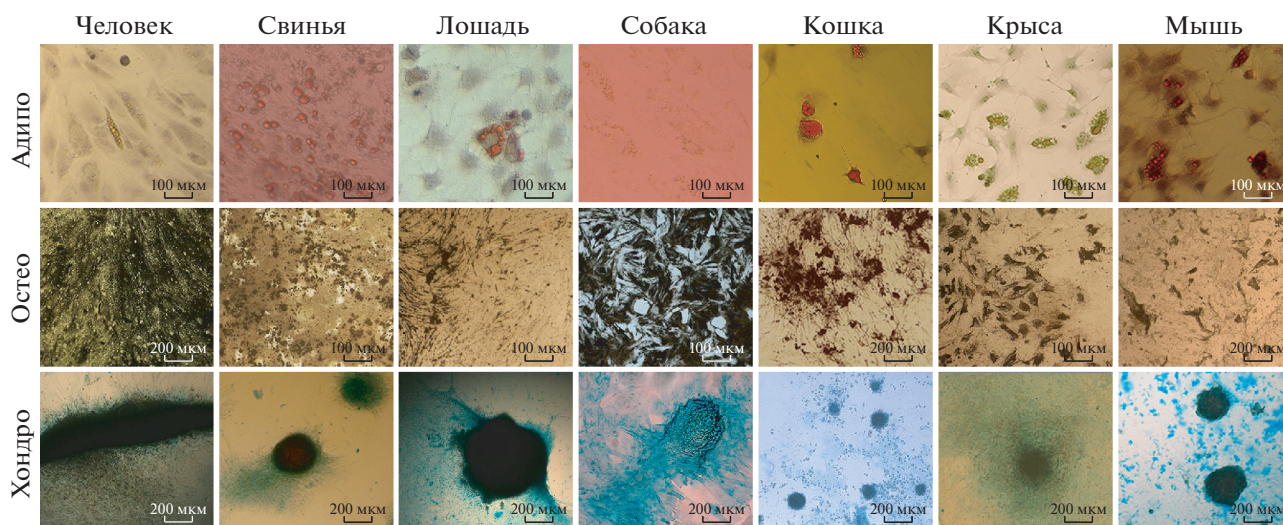


Рис. 1. МСК животных адипогенного происхождения после индукции дифференцировки в трех направлениях: адипогенном (Адипо), остеогенном (Остео) и хондрогенном (Хондро). Вновь образованные жировые включения в клетках (Адипо) окрашены липофильным красителем Суданом-3 в желто-оранжевый цвет; ядра на препаратах докрашены гематоксилин-эозином (синий цвет). Минеральные кальциевые отложения, образующиеся во время дифференцировки МСК (Остео), окрашиваются в серо-коричневый цвет при проведении реакции von Kossa. Кислые мукополисахариды внеклеточного матрикса, образующиеся при дифференцировке МСК в хондроциты (Хондро), окрашиваются в голубой цвет красителем Альциановым голубым.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали лабораторных животных: белых беспородных мышей (*Mus albus*) и крыс (*Rattus albus*), а также мини-пигов (*Sus scrofa domestica*), которых содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. У домашних животных – кошки (*Felis catus*), собаки (*Canis lupus*), лошади (*Equus caballus*) и человека (*Homo sapiens*) забор жировой ткани производили во время плановых операций.

Получение культуры МСК жировой ткани. У мышей и крыс забор жировой ткани производили после декапитации с целью избежать влияния наркотизирующего средства на ход и результаты эксперимента. У свиней, собак и кошек под общей анестезией в условиях ветеринарной операционной выделяли фрагмент жировой ткани. У лошади подкожную жировую клетчатку получали иссечением под местной анестезией в области основания хвоста. У человека забор жировой ткани был осуществляли методом липосакции.

Все клетки были выделены из жировой ткани по стандартной методике (Закирова и др., 2014). Полученные образцы жировой ткани от животных и человека доставляли в лабораторию в стерильном контейнере с буферным фосфатно-солевым раствором (PBS, Биолот, Россия), содержащем смесь пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия). Затем проводили выделение стромально-васкулярной фракции: жировую ткань механически измельчали на фрагменты объемом около 1 мм³ и инкубировали в растворе коллагеназы краба (Биолот, Россия) в конечной

концентрации 0.2% в течение 1 ч при температуре 37°C при покачивании на шейкере. Полученную суспензию клеток осаждали путем центрифугирования при 1500 об./мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли. Третье осадок ресуспензировали в 0.9%-ном NaCl (ПанЭко, Россия) и осаждали центрифугированием. Полученные клетки культивировали в среде α -MEM (Пан-Эко, Россия), содержащей 10% сыворотки плодов коров (FBS, ПанЭко, Россия), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). Через 24 ч питательную среду заменяли на свежую ростовую среду. При этом удалялись не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки. В последующем смену ростовой среды проводили 1 раз в течение 3 сут. При достижении 80%-ной плотности монослоя МСК рассевали. Пересев осуществляли методом трипсинизации, используя 0.25%-ную смесь трипсин–EDTA (ПанЭко, РФ).

В работе анализировали клетки 4–5-ого пассажей, полученные от 3–5 доноров. Это связано с тем, что МСК 3-го пассажа оцениваются как уже однородные и стабильные популяции, а клетки 8-го пассажа являются стареющими клетками, которые уже проявляют признаки генетической нестабильности и снижение дифференцировочного потенциала (Yang et al., 2018; Alonso-Goulart et al., 2018).

Дифференцировка МСК. Для исследования способности полученных клеточных культур к дифференцировке клетки третьего пассажа высевали в 12-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку и инкубировали в ростовой среде до получения моно-

слоя. В дальнейшем для индукции дифференцировки клеточные культуры культивировали в специальных дифференцировочных средах. Дифференцировку осуществляли в трех направлениях: в остеогенном, адипогенном и хондрогенном. Фиксировали результаты дифференциации с помощью инвертированного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Остеогенная дифференцировка. Использовали среду α -MEM, содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 нМ дексаметазона (Sigma, США), 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия). В качестве контрольной среды использовали среду α -MEM того же состава, но не содержащую дексаметазон. Через 10 сут культивирования в среду для остеогенной дифференцировки так же, как и в контрольную, добавляли 0,2 мкМ раствора β -глицерофосфата (Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для определения минерализации, являющейся признаком остеогенной дифференцировки, использовали окрашивание с помощью реакции von Kossa. Эта реакция основана на связывании ионов серебра с фосфатными группами. Полученное соединение подвергается фотохимической деградации с выделением ионов серебра, придающим минеральным депозитам серо-коричневый цвет. Для этого перед окрашиванием удаляли питательную среду из лунок планшета, клетки промывали 0,9%-ным NaCl и фиксировали 4%-ным раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Затем тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза, заливали 2%-ным раствором нитрата серебра в дистиллированной воде и инкубировали в темноте в течение 10 мин. Затем клетки промывали дистиллированной водой и инкубировали при ярком свете в течение 1 ч.

Адипогенная дифференцировка. Для ее индукции использовали среду DMEM High glucose (ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 1 мкМ дексаметазона, 100 мкМ индометацина (Sigma, США), 500 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX, Sigma, США) и 10 мкг/мл инсулина (Sigma, США). Через 10 сут среду заменяли на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. В качестве контрольной среды на всех этапах использовали среду DMEM High glucose, содержащую 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для выявления дифференцировки в адипогенном направлении использовали окрашивание жировых включений красителем Суданом-3 (Sigma, США). Для этого удаляли питательную среду и фиксировали

клетки 4%-ным раствором формалина 30 мин при комнатной температуре. Перед окрашиванием тщательно промывали лунки достаточным количеством дистиллированной воды 3 раза по 5 мин.

При окрашивании Суданом-3 ядра клеток докрасивали гематоксилин-эозином. Краситель Судан-3 готовили растворением 0,02 г порошка в 10 мл 70%-ного этилового спирта. Смесь инкубировали 2 ч при 58°C. Затем раствор фильтровали, окрашивали образцы при комнатной температуре 15–30 мин, промывали 0,9%-ным NaCl и окрашивали гематоксилин-эозином. Для приготовления раствора гематоксилина-эозина и окраски клеток использовали стандартную методику (Bancroft, Gamble, 2002).

Хондрогенная дифференцировка. И для дифференцировки, и для контрольного варианта использовали 9×10^5 клеток 3–6 пассажа. Клетки отмывали от питательной среды, осаждали и ресуспендировали в 90 мкл дифференцировочной среды или в 90 мкл контрольной среды. Суспензии (контрольную и экспериментальную) наносили капельно по 10 мкл в лунки 24-х луночного планшета, используя 3 лунки для каждого варианта клеток. Клетки культивировали при 37°C в течение 2 ч для их адгезии, после чего добавляли по 500 мкл соответствующей среды в каждую лунку. В качестве контрольной среды использовали α -MEM с добавлением 10% FBS, 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты (Sigma, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Хондрогенная среда DMEM-High glucose содержала 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, 100 мкМ/л пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 1-кратный ITS, 1 мкМ дексаметазона, 0,5 мкМ 2-фосфата аскорбиновой кислоты и 10 нг/мл TGF- β 1 (все от Sigma, США). Смену сред проводили каждые 3 сут. Дифференцировку проводили в течение 21 сут.

Для выявления хондрогенной дифференцировки клетки окрашивали на присутствие кислых мукополисахаридов, являющихся маркером хондрообразования. Для этого клеточные культуры фиксировали по 5 мин в 95%-, затем в 70%-ном этиловом спирте. Клетки промывали дистиллированной водой по 30 с 3 раза и окрашивали в течение 1 ч раствором Альцианового голубого (Alcian Blue; Sigma, США). После этого клетки промывали под проточной водой 2 мин. Образцы заливали дистиллированной водой и визуализировали в видимом свете с помощью инвертированного микроскопа. Раствор Альцианового голубого готовили, растворяя 1 г порошка в 100 мл 0,1 н HCl.

Дифференцировку МСК человека проводили по тем же методикам, но с использованием коммерческих наборов дифференцировочных сред (Gibco, США).

Проточная цитофлюорометрия. МСК снимали с культурального пластика методом трипсинизации как описано выше. Затем промывали натрий-фосфатным буфером Дульбекко (DPBS; ПанЭко, Россия) ме-

Таблица 1. Используемые в работе антитела к маркерам, присутствующим на поверхности МСК разных животных

Маркер	Моноклональные антитела			
	клон	видовая реактивность	хозяин	фирма
Thy-1 (CD90)/PE-Cy5	5E10	Человек, африканская зеленая мартышка, павиан, макака-резус, свинья	Мышь	Biolegend, США
CD90/FITC	30-H12	Мышь	Крыса	Sigma-Aldrich, США
CD44/PE	IM7	Мышь, человек, павиан, шимпанзе, цино-молгус, макака-резус, белка, обезьяна, лошадь, крупный рогатый скот, свинья, собака, кошка	Крыса	Biolegend, США
CD44/PE	BJ18	Человек, африканская зеленая мартышка, бабуин, макака-резус	Мышь	Biolegend, США
CD73/PE	AD2	Человек, африканская зеленая мартышка, бабуин	Мышь	Biolegend, США
CD29/PE	HM β 1-1	Мышь, крыса	Армянский хомяк	Biolegend, США
CD29/APC	TS2/ 16	Человек, африканская зеленая мартышка, павиан, крупный рогатый скот (корова), собака, лошади, макака-резус	Мышь	Sony, США
Антитела, использованные в качестве изотипического контроля				
PE/IgG1	МОРС-21	Не известно	Мышь	Biolegend, США
APC-Cy7/ Mouse IgG1	МОРС-21	Не известно	Мышь	Biolegend, США
Ig/FITC	F(ab') ₂	Не известно	Козел	Сорбент, Россия
IgG2b PerCP-Cy5.5	MPC-11	Не известно	Мышь	Biolegend, США

Примечание. Антитела мечены PE, APC, APC-Cy7, E-Cy5, PerCP-Cy5.5 или FITC.

тодом центрифугирования 5 мин 1500 об./мин и фиксировали 4%-ным формалином 20 мин при комнатной температуре. После этого отмывали DPBS, ресуспендировали и аликвоты окрашивали с помощью антител, конъюгированных с красителями, согласно инструкции фирм-производителей (табл. 1). Анализ клеток на наличие мембранных маркеров проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACS Aria III (BD Biosciences, США). Результат проточной цитометрии выражен в % от общего числа клеток в образце (не менее 100 тыс. клеток на 1 аликвоту). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов первичного статистического анализа при помощи программы Excel 2016, результаты которого представлены в виде среднего арифметического значения по выборке и стандартного отклонения. Вторичную статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все клетки, изолированные из жировой ткани животных и человека, адгезировались на культу-

ральном пластике и имели фибробластоподобную морфологию. Маркеры и их содержание в клетках разных животных и человека, выявленных с помощью проточной цитометрии, отражены в табл. 2.

Маркер Thy-1 (CD90). Все МСК, выделенные из всех животных, включенных в настоящую работу, имели на клеточной мембране маркер Thy-1 (CD90). Этот маркер представляет собой гликопротеин, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) и присутствует на мембранах МСК, а также у взрослых клеток и раковых стволовых клеток. Изучено его участие во многих биологических событиях, включающих активацию клеток, миграцию и адгезию, а также подавление роста опухоли (Park et al., 2016). Согласно литературным данным, маркер Thy-1 был детектирован на МСК адипогенного происхождения у человека (Fitzsimmons et al., 2018), свиньи (Park et al., 2016), крысы (Davies et al., 2015), мыши (Yamamoto et al., 2014), лошади (Bundgaard et al., 2018), кошки (Kim et al., 2017) и собаки (DePompeo et al., 2019). Хотя некоторые авторы, как и в нашем случае, говорят о небольшом количестве МСК адипогенного происхождения этот маркер (Takemitsu et al., 2012).

Таблица 2. Поверхностные маркеры МСК разных животных и человека. Проточная цитометрия

Маркер	Производитель антител (США)	Содержание маркера МСК животного, %						
		мышь <i>n</i> = 5	крыса <i>n</i> = 5	лошадь <i>n</i> = 3	свинья <i>n</i> = 5	кошка <i>n</i> = 5	собака <i>n</i> = 5	человек <i>n</i> = 5
Thy-1 (CD90)	Biolegend	НИ	95 ± 3	99 ± 1	98 ± 2	97 ± 3	30 ± 5	98 ± 1
CD90	Sigma-Aldrich	90 ± 2	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ
CD44	Biolegend, клон IM7	80 ± 2	НИ	83 ± 3	0	0	95 ± 3	97 ± 3
	Biolegend, клон BJ18	НИ	98 ± 1	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ
CD29	Biolegend	99 ± 1	99 ± 1	7 ± 1	0	55 ± 6	83 ± 3	НИ
	Sony	НИ	НИ	НИ	97 ± 3	НИ	НИ	98 ± 2
CD73	Biolegend	44 ± 3	94 ± 5	94 ± 3	95 ± 5	НИ	97 ± 1	99 ± 1

Примечание. НИ – не исследовано; 0 – отрицательные результаты окрашивания. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения по выборке (*n*) и стандартного отклонения.

Маркер CD44. В нашей работе, даже несмотря на наличие заявленной производителем антител кросс-реактивности CD44, выделенные МСК из свиньи и кошки не несли на своих клеточных мембранах этот маркер. Согласно литературным данным, CD44 присутствует на клеточной мембране МСК адипогенного происхождения человека (Hamid et al., 2012), крысы (Bayati et al., 2013), собаки (Takemitsu et al., 2012), свиньи (Hu et al., 2016), лошади (Bundgaard et al., 2018) мыши (Huang et al., 2013), кошки (Kim et al., 2017). Он идентифицирован как маркер для стволовых клеток нескольких типов, а также является молекулярным маркером стволовых раковых клеток и представляет собой некиназный трансмембранный гликопротеин. Гиалуронан, являющийся основным лигандом для CD44, связывается и активирует CD44. Это приводит к активации клеточных сигнальных путей, которые индуцируют пролиферацию клеток, увеличивают выживание клеток, модулируют изменения цитоскелета и повышают клеточную подвижность (Chen et al., 2018).

Маркер CD73. Полученные нами результаты говорят о том, что этот маркер находится на цитоплазматической мембране практически всех МСК исследуемых нами животных, за исключением МСК кошки (исследования нами не проводились). Известно, что CD73 является мембранным гликопротеином и связан с функциональным статусом МСК (Goza et al., 2018). Он идентифицирован в МСК человека (Hamid et al., 2012), крысы (Bayati et al., 2018) и лошади (De Schauwer et al., 2012). Согласно данным из литературы, CD73 не найден в МСК кошки (Kim et al., 2017). Мы не нашли в литературе данных о наличии маркера CD73 на клеточной мембране МСК свиней и мыши. Есть упоминание о небольшом количестве клеток (63%), несущих этот маркер, на цитоплазматической мембране МСК собаки (Russell et al., 2016). Наши результаты демонстрируют наличие CD73 на клеточной мембране 95% МСК свиней, 97% МСК собак и 44% МСК мыши (табл. 2).

Маркер CD29. Согласно полученным нами результатам почти 100% МСК мыши, крысы, свиньи и человека имели CD29 на цитоплазматических мембранах. В то время как чуть меньшее количество МСК кошки и собаки несло данный маркер, а на МСК лошади его практически нет. Хотя данные из литературы говорят о том, что CD29 найден на клеточной мембране МСК лошади (Bundgaard et al., 2018), а также МСК из жировой ткани человека (Katz et al., 2005), свиньи (Hu et al., 2016), кошки (Kim et al., 2017), собаки (Takemitsu et al., 2012), крысы (Davies et al., 2015) и мыши (Zheng et al., 2006).

При окрашивании МСК свиньи на наличие CD29 мы столкнулись с явлением афинности антител. Нами показано, что антитела к CD29 от производителя Sony (США) положительно окрашивали МСК свиньи, тогда как антитела к CD29 от производителя Biolegend (США) не выявляли их наличие на цитоплазматической мембране тех же клеток. Оба варианта использованных нами антител не имели заявленной кросс-реактивности к МСК свиней. Но антитела к CD29 от производителя Sony (США) имели большее число кросс-реактивно окрашиваемых МСК животных, чем антитела к CD29 от фирмы Biolegend (США). Вероятно, поэтому они и выявляли маркер CD29 на клеточной мембране МСК свиньи.

Мембранный клеточный маркер CD29 является интегрином $\beta 1$, рецептором для фибронектина. Согласно опубликованным данным, он является маркером МСК и участвует в миграции клеток *in vivo* (Ode et al., 2011).

Полученные нами результаты, вместе с данными из литературы, говорят о том, что отсутствие или ограниченная доступность моноклональных антител к МСК животных, в частности МСК лошади, сильно затрудняют иммунофенотипическую характеристику МСК. Это является проблемой не только для российских, но и зарубежных ученых. В связи с этим, зарубежные коллеги рекомендуют в качестве дополнительного подтверждения результатов ис-

пользовать дифференцировку в адипо-, остео- и хондрогенном направлениях (De Schauwer et al., 2012). Все МСК адипогенного происхождения, полученные нами от разных животных, дифференцировались в адипо-, хондро- и остеогенном направлении при культивировании в соответствующих дифференцировочных средах (рис. 1).

Полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе. Так, например, в 3-х направлениях дифференцируются МСК адипогенного происхождения от кошки (Kim et al., 2017), собаки (Teshima et al., 2019), лошади (Vidal et al., 2008), мыши, крысы (Zheng et al., 2018). Однако согласно тем же данным, МСК свиньи дифференцируются только в адипо- и остеогенном направлениях (Williams et al., 2008). Но в условиях нашей лаборатории МСК свиньи успешно дифференцировались по всем трем классическим направлениям.

В литературе описаны случаи, когда дифференцировка предполагаемых МСК животных не проходит в заданном направлении. Авторы связывают ее отсутствие с некорректно подобранной средой (Patricio et al., 2013). Полученные нами результаты дифференцировки МСК человека, крысы, мыши, свиньи, кошки, собаки и лошади подчеркивают, что корректировка условий культивирования и среды дифференцировки в отношении МСК имеет важное значение для достижения необходимого результата.

Таким образом, клетки, выделенные нами из подкожной жировой ткани человека, мыши, крысы, свиньи, кошки, собаки и лошади являются МСК, т.к. имеют характерные свойства и признаки. Однако иммунофенотипирование МСК животных все еще остается сложной задачей из-за ограниченной доступности подходящих антител высокого качества и стабильной эффективности в разных лабораториях. Поэтому принадлежность выделенных и культивируемых клеток к пулу МСК подтверждается их дифференцировкой в трех направлениях.

В ходе нашей работы получены типированные МСК животных, которые могут использоваться для создания новых клеточных систем с заданными свойствами на основе стволовых клеток млекопитающих (Mukhamedshina et al., 2017), в том числе сельскохозяйственных животных для ветеринарии, вирусологии и биотехнологии, а также для применения в лечебных целях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-016-00022), а также в рамках Госзадания Казанского федерального университета (№ 0671-2020-0058). Работу выполняли согласно программе повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

На проведение процедур по забору жировой ткани было получено разрешение локального этического комитета Казанского федерального университета (№ 1 от 23.02.2015 на проведение научного исследования по теме “Генная и клеточная терапия в регенеративной ветеринарной медицине”). На проведение всех операций по забору жировой ткани были получены письменные согласия владельцев животных, если они имелись. Было получено от пациентов письменное информированное согласие на проведение процедуры липосакции, а также разрешение локального этического комитета в рамках темы Государственного автономного учреждения здравоохранения “Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан” “Усовершенствование методов лечения повреждений и заболеваний крупных суставов”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф., Усманов Р.А., Ризванов А.А. 2014. Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости. Клетки и гены. Т. 9. № 3. С. 70. (Zakirova E.Y., Zhuravleva M.N., Masgutov R.F., Usmanov R.A., Rizvanov A.A. 2014. Isolation, analysis and application of authogenic adipose derived multipotential mesenchymal stromal cells from dog for therapy pseudoarthrosis of tibial bone. Genes and Cells. V. 9. № 3. P. 70.)
- Закирова Е.Ю., Валеева А.Н., Файзуллина Р.Р., Ахметшин Р.Ф., Неведовская Л.В., Ризванов А.А. 2015. Использование мезенхимальных стромальных клеток для лечения посттравматических язв роговицы у кошек. Гены и Клетки. Т. 10. № 3. С. 49. (Zakirova E.Y., Valeeva A.N., Faizullina R.R., Akhmetshin R.F., Nefedovskaya L.V., Rizvanov A.A. 2015. Transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cell for treating corneal ulcers in cats. Gene and Cells. V. 10. № 3. P. 49.)
- Alonso-Goulart V., Ferreira L., Duarte C., de Lima I., Ferreira E., de Oliveira B., Vargas L., de Moraes D., Silva I., Faria R., de Souza A., de Souza Castro-Filice L. 2018. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: A literature review. Biotechnol. Res. Innovation. V. 2. P. 74. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.005>
- Ardanaz N., Vazquez F. J., Romero A., Remacha A. R., Barrachina L., Sanz A., Ranera B., Vitoria A., Albareda J., Prades M., Zaragoza P., Martin-Burriel I. and Rodellar C. 2016. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. BMC Vet. Res. V. 12. P. 65.
- Bayati V., Hashemitabar M., Gazor R., Nejatbakhsh R. and Bijannejad D. 2013. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study. Anat. Cell Biol. V. 46. P. 113.

- Bancroft J.D., Gamble M.* 2002. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh et al.: Churchill Livingstone.
- Bundgaard L., Stensballe A., Elbaek K.J., Berg L.C.* 2018. Mapping of equine mesenchymal stromal cell surface proteomes for identification of specific markers using proteomics and gene expression analysis: an in vitro cross-sectional study. *Stem Cell Res. Ther.* V. 9. P. 288.
- Chen C., Zhao S., Karnad A., Freeman J.W.* 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J. Hematol. Oncol.* V. 11. P. 64.
- Davies O.G., Cooper P.R., Shelton R.M., Smith A.J., Scheven B.A.* 2015. Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J. Tiss. Eng.* 6. P. 2041731415592356. <https://doi.org/10.1177/2041731415592356>
- De Schauwer, Piepers C., S., Van de Walle G.R., Demeyere K., Hoogewijs M.K., Govaere J.L., Braeckmans K., Van Soom A., Meyer E.* 2012. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry A.* V. 81. P.312.
- DePompeo C.M., Giassetti M.I., Elnaggar M.M., Oatley J.M., Davis W.C., Fransson B.A.* 2019. Isolation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells from falciiform tissue obtained via laparoscopic morcellation: A pilot study. *Vet. Surg.* V. 49. S. 1. P. O28. <https://doi.org/10.1111/vsu.13267>
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.* 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Int. Sos. Cel. Ther. Position Statement. Cytotherapy.* V. 8. P. 315.
- Fitzsimmons Ross E.B., Mazurek M.S., Simmons A., Craig A.* 2018. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells Int.* V. 2018. P. 8031718. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>
- Goya U., Jaiswal C., Ta M.* 2018. Isolation and establishment of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. *Bio-Protocol.* V. 8. P. e2735. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2735>
- Gugjoo M.B., Fazili M.R., Gayas M.A., Ahmad R., Dhama K.* 2019. Animal mesenchymal stem cell research in cartilage regenerative medicine – a review. *Vet. Q.* V. 39. P. 95.
- Hamid A.A., Idrus R.B., Saim A.B., Sathappan S., Chua K.H.* 2012. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics (Sao Paulo).* V. 67. P. 99.
- Hill A.B.T., Bressan F.F., Murphy B.D., Garcia J.M.* 2019. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Res. Ther.* V. 10. P. 44.
- Hu C., Zhou N., Li J., Shi D., Cao H., Li J., Li L.* 2016. Porcine adipose-derived mesenchymal stem cells retain their stem cell characteristics and cell activities while enhancing the expression of liver-specific genes after acute liver failure. *Int. J. Mol. Sci.* V. 17. P. 62. <https://doi.org/10.3390/ijms17010062>
- Huang S.J., Fu R.H., Shyu W.C., Liu S.P., Jong G.P., Chiu Y.W., Wu H.S., Tsou Y.A., Cheng C.W., Lin S.Z.* 2013. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant.* V. 22. P. 701.
- Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C.* 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells.* V. 23. P. 412.
- Kim H.R., Lee J., Byeon J.S., Gu N.Y., Lee J., Cho I.S., Cha S.H.* 2017. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* V. 18. P. 299.
- Mukhamedshina Y.O., Zakirova E.Y., Galieva L.R., Kostennikov A.A., Akhmetzyanova E.R., Rizvanov A.A.* 2017. Distribution and survival of transplanted adipose-derived mesenchymal stem cells in the spinal cord injury. *BioNanoSci.* V. 7. P. 608. <https://doi.org/10.1007/s12668-017-0440-0>
- Ode A., Kopf J., Kurtz A, Schmidt-Bleek K., Schrade P., Kolar P., Buttgerit F., Lehmann K., Hutmacher D.W., Duda G.N., Kasper G.* 2011. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur. Cells Mat.* V. 22. P. 26.
- Park K., Kim J., Choi C.Y., Bae J., Kim S.H., Kim Y.H., Chun T.* 2016. Molecular cloning and expression analysis of pig CD90. *Anim. Biotechnol.* V. 27. P. 133.
- Patricio L.F.L., Rebelatto C.L.K., Brofman P., Maciel B.B., Beltrame O., Brito H., Dittrich R.* 2013. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arquivo Bras. Med. Vet. Zootec.* V. 65. P. 946.
- Russell K.A., Chow N.H., Dukoff D., Gibson T.W., LaMarre J., Betts D.H., Koch T.G.* 2016. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* V. 11. P. e0167442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167442>
- Takemitsu H., Zhao D., Yamamoto I., Harada Y., Michishita M., Arai T.* 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.* V. 8. P. 150.
- Teshima T., Matsuoka A., Shiba M., Dairaku K., Matsumoto H., Suzuki R., Koyama H.* 2019. Comparison of properties of stem cells isolated from adipose tissue and lipomas in dogs. *Stem Cells Int.* V. 2019. P. 1609876. <https://doi.org/10.1155/2019/1609876>
- Vidal M.A., Robinson S.O., Lopez M.J., Paulsen D.B., Borkhse-nious O., Johnson J.R., Moore R.M., Gimble J.M.* 2008. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. *Vet. Surg.* V. 37. P. 713. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2008.00462.x>
- Williams K.J., Picou A.A., Kish S.L., Giraldo A.M., Godke R.A., Bondioli K.R.* 2008. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. *Cells Tiss. Organs.* V. 188. P. 251.
- Yamamoto M., Nakata H., Hao J., Chou J., Kasugai S., Kuroda S.* 2014. Osteogenic potential of mouse adipose-derived stem cells sorted for CD90 and CD105 in vitro. *Stem Cells Int.* V. 2014. P. 576358. <https://doi.org/10.1155/2014/576358>
- Yang Y.H.K., Ogando C.R., Wang See C., Chang T., Barabino G.* 2018. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell*

Res. Ther. V. 9. P. 131.

<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>

Zakirova E.Y., Valeeva A.N., Masgutov R.F., Naumenko E.A., Rizvanov A.A. 2017. Application of allogenic adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells from cat for tibial bone pseudoarthrosis therapy (case report). *Bionan-*

nosci. V. 7. P. 207.

<https://doi.org/10.1007/s12668-016-0306-x>

Zheng Cao B.B., Li G., Huard J. 2006. Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tiss. Eng.* V. 12. P. 1891.
<https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1891>

Comparative Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Lines from Different Animal Species

E. Yu. Zakirova^{a,*}, A. M. Aimaletdinov^a, M. A. Tambovsky^{a,**}, and A. A. Rizvanov^{a,b}

^a*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^b*Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan, 420064 Russia*

**e-mail: lenahamzina@yandex.ru*

***e-mail: maxim.tambovsky.kfu@gmail.com*

In recent years, in veterinary medicine, there have been increasing reports of cell therapy using animal mesenchymal stem cells (MSCs). In most of these investigations, animal MSCs are described without the necessary immunophenotypic characteristics, and in vitro differentiation is rarely performed. The lack of specific single marker for MSCs and limited availability of animal MSCs antibodies complicate these studies. In this work, we described the immunophenotypes of MSCs lines isolated from the subcutaneous adipose tissue of dogs, cats, horses, pigs, mice, rats, and humans. The data obtained showed a successful differentiation in the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage for all cells.

Keywords: mesenchymal stem cells, identification, animals