

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Олжаев Фархад Сайдикаримович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ
РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Виктор Александрович Акулинин

Омск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
ГЛАВА 1 МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ ПЕРЕЛОМОВ КОСТНОЙ ТКАНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	18
1.1 Основные причины и механизмы возникновения переломов.	18
1.2 Бисфосфонаты для терапии костных переломов.	19
1.3 Применение мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани.	22
1.3.1 Основные характеристики мезенхимальных стволовых клеток.	22
1.3.2 Механизмы действия мезенхимальных стволовых клеток в регенерации костной ткани.	23
1.3.3 Стратегии и методы применения мезенхимальных стволовых клеток для лечения костных переломов.	24
1.3.4 Клинические исследования и результаты применения мезенхимальных стволовых клеток.	26
1.4 Роль белка Cdc42 в функционировании мезенхимальных стволовых клеток и возможный терапевтический потенциал в регулировании клеточной терапии.	28
1.4.1 Описание белка Cdc42 и его роль в клеточных процессах.	28
1.4.2 Cdc42 как молекулярная мишень для регулирования старения.	31
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	36
2.1 Реактивы и материалы.	36
2.2 Синтез полимера.	36
2.3 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток.	37
2.4 Иммунофлуоресцентный метод.	38
2.5 Функционализация мезенхимальных стволовых клеток остеофильным полимером.	38
2.6 Оценка пролиферации мезенхимальных стволовых клеток.	38
2.7 Окрашивание на ализариновый красный.	39

2.8 Иммуноферментный анализ уровня щелочной фосфотазы.	39
2.9 Выделение остеокластов.	39
2.10 Определение активности остеокластов.	39
2.11 Ингибирование Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках.	40
2.12 Анализ G-LISA Cdc42.	41
2.13 Анализ миграционной способности мезенхимальных стволовых клеток.	41
2.14 Оценка воздействия кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток.	42
2.15 Схема эксперимента.	42
2.16 Модель остеопороза и перелома локтевой кости.	44
2.17 Анализ костной плотности с помощью имиджера микроКТ IVIS SpectrumCT.	47
2.18 Гистологический анализ.	48
2.19 Трансфекция мезенхимальных стволовых клеток с репортерным вектором гена люциферазы LVT-Luc2.	49
2.20 Статистический анализ.	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.	51
3.1 Оценка влияния синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и его способность ингибировать активность остеокластов <i>in vitro</i>	51
3.2 Оценка влияния ингибирования Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках на остеогенный, миграционный, антиостеокластный потенциал мезенхимальных стволовых клеток <i>in vitro</i>	58
3.3 Оценка регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных синтетическим бисфосфонат-содержащим полимером на модели перелома локтевой кости у крыс-самок с эстроген- зависимым остеопорозом.	69
3.3.1 Влияние остеофильного бисфосфонатного полимера и модифицированных им мезенхимальных стволовых клеток на	

морфологические проявления регенерации дефекта локтевой кости.	73
3.4 Оценка терапевтического потенциала модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 на <i>in vivo</i> модели перелома локтевой кости у возрастных крыс.	85
3.4.1 Влияние таргетированных по Cdc42 мезенхимальных стволовых клеток на процесс восстановления дефекта локтевой кости.	91
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	109
ВЫВОДЫ.	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	116
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Травматические повреждения костной ткани у лиц пожилого возраста являются важной проблемой общественного здравоохранения, особенно в связи с тем, что с увеличением возраста людей возрастает и риск таких травм [Foulke B. A. et al., 2016; Wang S.-M. et al., 2020]. Снижение костной массы и прочности костей при старении происходит из-за повышенной активности остеокластов и уменьшения количества предшественников остеобластов [Нестеров А. В. и др., 2011; Иорданишвили А. К. и др., 2014; Дудинская Е. Н. и др., 2019]. Поэтому одним из наиболее перспективных подходов к лечению переломов костей в пожилом и старческом возрасте является заместительная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток [Gómez-Barrena E. et al., 2015; Lin W. et al., 2017; Brown M. G. et al., 2024; Theodosaki A. M. et al., 2024]. Клеточным ресурсом могут быть как клетки самого пациента (аутологичные клетки), так и донорские (аллогенные) клетки [Пак Н. В. и др., 2024]. Согласно последним исследованиям, основным фактором, ограничивающим применение аутологичных клеток, считается возраст пациента, так как МСК подвергаются старению, что приводит к снижению их регенераторного потенциала [Carvalho M. S et al., 2021; Siennicka K. et al., 2021; Heyman E. et al., 2025]. Результаты исследований говорят о том, что изменения, связанные со старением стволовых клеток, на самом деле являются обратимыми [Geiger H., Naan de G., Florian M. C., 2013]. Возможность обратимости старения стволовых клеток активизировала поиск научных исследований и привела к разработке нескольких стратегий усиления эффективности терапии стволовыми клетками, основанных на регуляции процессов старения [Khatiwala R., Cai C., 2016; Olmedo-Moreno L. et al., 2022]. Одним из перспективных методов регуляции старения стволовых клеток может являться таргетирование белка – малая Rho ГТФаза Cdc42 – дерегуляция которого связана с нарушением функций стволовых клеток и ускорением процессов старения [Umbayev B. et al., 2018, 2023].

Ингибирование активности Cdc42 может способствовать восстановлению функций стареющих стволовых клеток и не только замедлить процессы клеточного старения, но и повысить эффективность клеточной терапии, особенно у пожилых пациентов, у которых регенераторный потенциал клеток изначально снижен [Khatiwala R., Cai C., 2016; Umbayev B. et al., 2018, 2023]. Таким образом, таргетирование Cdc42 открывает новые возможности в разработке стратегий клеточной терапии для лечения травматических повреждений костной ткани у лиц пожилого возраста.

Другим важным фактором, замедляющим заживление переломов костей, является активный остеопороз, нарушающий регенерацию и приводящий к техническим сложностям фиксации переломов в измененной костной ткани. Существует несколько стратегий лечения остеопороза, которые включают и бисфосфонаты [Белая Ж. Е. и др., 2021]. Бисфосфонаты являются химическими аналогами пирофосфатов ($\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$), где центральная группа представляет собой гидролитически лабильную связь P-O-P, которая замещена устойчивой к гидролизу связью P-C-P, что дает им возможность избирательно взаимодействовать с группами гидроксиапатита в месте резорбции кости. Терапия с применением препаратов на основе бисфосфонатов широко используется в клинической практике для лечения не только остеопороза, но и других схожих патологий, таких как болезнь Педжета.

Известно, что нарушения регенерации при остеопорозе связаны с изменениями пролиферации и дифференцировки МСК. Поэтому одним из наиболее привлекательных подходов к лечению переломов при остеопорозе является использование МСК [Cho S. W. et al., 2009; Teitelbaum S. L., 2010; Souza A. T. P. et al., 2024]. Существенным недостатком данного метода является отсутствие сродства МСК к костной ткани. Логично, что оптимальной стратегией лечения переломов может быть комбинированное применение бисфосфонатов и МСК. Ранее нами был описан остеофильный полимер, имеющий в своей структуре бисфосфонатные группы, способные избирательно связываться с МСК, увеличивая их сродство к костной ткани *in vitro* [D'Souza S. et al., 2014].

Однако вопрос о влиянии ингибирования активности Cdc42 в МСК и обработки этих клеток бисфосфонатами на их морфофункциональные свойства остается недостаточно изученным. В частности, требуется дальнейшее исследование характеристик МСК, выделенных из стромально-васкулярной фракции жировой ткани, особенно из висцерального жира.

Степень разработанности темы диссертации

В связи с развитием методов регенеративной медицины и биоинженерии, применение МСК, факторов роста и синтетических скаффолдов является перспективным направлением в лечении остеопороза [Teitelbaum S. L. 2010; An S. H. et al., 2012; Jeon O. H., Elisseeff J., 2015; Safarova Y. et al., 2020]. Тем не менее, целенаправленная регуляция заживления переломов остается сложной проблемой современной медицины. Исход лечения в большой степени зависит от возраста и наличия остеопороза.

Ряд исследований посвящен улучшению регенеративных свойств МСК за счет модификации их поверхности и внедрения биосовместимых матриц [Safarova Y. et al., 2020; Starnitz S., Klimczak A., 2021; Re F. et al., 2023]. В частности показано, что функционализация поверхности МСК бисфосфонатами может повысить их направленную миграцию в костную ткань и улучшить их остеогенный потенциал. Встраивание бисфосфонатов в полимерные носители или внеклеточный матрикс способствует их пролонгированному высвобождению, что может оказывать благоприятное воздействие на остеоиндукцию в области повреждения кости. Например, комбинированное использование МСК с гидроксиапатит-керамическими скаффолдами или β -трикальцийфосфатными конструкциями привело к ускоренному заживлению дефектов черепа у животных моделей [Safarova Y. et al., 2020]. Метод поверхностной модификации мезенхимальных стромальных клеток превосходит традиционные подходы, такие как их инкапсуляция в скаффолды или генетическая модификация, за счет повышения эффективности доставки и взаимодействия с костной тканью [Safarova Y. et al., 2020]. В отличие от скаффолдов, которые требуют

хирургической имплантации и могут ограничивать клеточную миграцию, функционализированные МСК демонстрируют улучшенную адгезию, пролиферацию и остеогенную дифференцировку в месте введения. В отличие от генетической модификации, поверхностная функционализация является более безопасной, так как не затрагивает клеточный геном и снижает риски неопластической трансформации и иммунных реакций. Дополнительное связывание с костноспецифическими лигандами, такими как бисфосфонаты или биосовместимые полимеры, усиливает способность клеток к приживлению и активирует остеогенез без изменения их фундаментальных биологических свойств [Safarova Y. et al., 2020].

Одной из проблем клеточной терапии переломов может являться возраст донора и реципиента клеток, особенно при аутологичной терапии, который влияет на пролиферацию и дифференциацию клеток [Choudhery M. S. et al., 2014; Carvalho M. S. et al., 2021; Heyman E. et al., 2025; Hirata H. et al., 2022]. Например, МСК, полученные от молодых доноров, более эффективны, чем полученные от пожилых доноров. Старение МСК в костной ткани сопровождается снижением их пролиферативного и дифференцировочного потенциала, что способствует возрастным заболеваниям костной ткани [Cheng M. et al., 2023]. Омоложение МСК может быть достигнуто с помощью генетического перепрограммирования (iPSC, сверхэкспрессия теломеразы), использования малых метаболитов (ресвератрол, никотинамидрибозид), малых молекул, антиоксидантов (Sirt3, коэнзим Q10) и инженерных гидрогелей, улучшающих микроокружение клеток [Cheng M. et al., 2023]. Поэтому омоложение стареющих МСК является многообещающей терапевтической стратегией, которая может ускорить регенерацию кости при переломах. Однако для широкого клинического применения необходимы дополнительные исследования *in vivo*, учитывающие возможные риски канцерогенеза и влияние на регенерацию кости.

В то же время целый ряд вопросов относительно параметров и возможных механизмов реализации потенциала МСК, обработанных бисфосфонатным полимером или ингибиторами Cdc42, в частности, пролиферативный,

миграционный и дифференцировочный потенциал, влияние на остеогенез в зоне повреждения костей особенно при остеопорозе в возрастном аспекте не изучены.

Цель исследования

Охарактеризовать морфофункциональные особенности репаративной регенерации костной ткани у крыс при использовании модифицированных остеофильным полимером и таргетированных по Cdc42 аллогенных мезенхимальных стволовых клеток.

Задачи исследования

1. Оценить влияние синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани крыс и его способность ингибировать активность остеокластов *in vitro*.
2. Оценить влияние ингибирования Cdc42 мезенхимальных стволовых клетках стромально-васкулярной фракции жировой ткани крыс на остеогенный, миграционный, антиостеокластный потенциал клеток *in vitro*.
3. Изучить регенераторный потенциал мезенхимальных стволовых клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани, модифицированных синтетическим бисфосфонат-содержащим полимером на модели перелома локтевой кости у крыс-самок с эстроген-зависимым остеопорозом.
4. Изучить структурно-функциональные особенности репаративного остеогенеза в ответ на локальные инъекции мезенхимальных стволовых клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани, таргетированных по Cdc42 на модели *in vivo*.

Научная новизна

Разработан новый способ стимуляции репаративного остеогенеза в зоне перелома костей при остеопорозе и схожих патологиях костной ткани, отличающийся тем, что используют комбинированное применение клеточной

терапии МСК и синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера (патент Республики Казахстан на изобретение № 34147 от 07.02.2020). Данный способ представляет собой новейший подход в стимуляции репаративной регенерации при лечении костных переломов на фоне возраст-ассоциированных патологических состояний, таких как остеопороз.

Впервые изучено влияние остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию МСК стромально-васкулярной фракции жировой ткани (ADMSCs) крыс. Согласно нашим данным, остеофильный полимер не является цитотоксичным и не оказывает влияния на скорость пролиферации ADMSCs *in vitro*. Приоритетными явились данные о том, что полимер способен ингибировать резорбтивную активность остеокластов прямо пропорционально своей концентрации.

Новизна нашего метода заключается в применении ADMSCs, модифицированных синтетическим остеофильным бисфосфонатным полимером, который, во-первых, обеспечивает стабильное связывание ADMSCs с поверхностью костной ткани, увеличивая, таким образом, вероятный пул клеток-предшественников остеобластов в зоне перелома; во-вторых, предотвращает деминерализацию костной ткани ингибацией резорбтивной активности остеокластов, что подтверждается увеличением плотности костной ткани на 21,5 % при переломе локтевой кости у крыс-самок с эстроген-зависимым остеопорозом.

Приоритетными являются данные о том, что наиболее выраженное восстановление пула предшественников хондробластов/хондроцитов и остеобластов/остеоцитов происходило при использовании ADMSCs, обработанных CASIN и siRNA. При этом на модели перелома локтевой кости у возрастных крыс показано статистически значимое увеличение плотности костной ткани, соответственно, на 44 и 93 % через четыре месяца после остеотомии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты исследования позволяют оценить влияние ADMSCs и остеофильного синтетического бисфосфонатного полимера на остеопороз. Изучение комплексной реакции показало увеличение плотности костной ткани, значительное улучшение процесса репаративного остеогенеза с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата при переломе локтевой кости у крыс-самок с эстроген-зависимым остеопорозом. Полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что обработанные остеофильным полимером ADMSCs могут быть использованы при дальнейших экспериментах на лабораторных животных для оценки эффективности предлагаемого метода стимуляции репаративного остеогенеза *in vivo* с использованием животной модели остеопороза с созданием остеопороз-ассоциированных переломов трубчатых костей. Использование ADMSCs, модифицированных остеофильным полимером, значительно улучшает процесс репарации при переломах трубчатых костей у пациентов с остеопорозом, что делает этот метод перспективным для комбинированной терапии этого заболевания.

Вторая часть нашего исследования посвящена методу снижения активности белка Cdc42 в ADMSCs, полученных от возрастных животных, с целью улучшения исходов клеточной терапии возраст-ассоциированных травматических переломов кости. Понимание ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе старения стволовых клеток, является фундаментом для разработки новых стратегий омоложения, регенеративной медицины и клеточной терапии. В свою очередь применение ADMSCs, обработанных малой молекулой CASIN и трансфицированных siRNA, увеличивает остеогенный и миграционный потенциал ADMSCs, а также антиостеокластное действие *in vitro*. Целенаправленное ингибирование активности белка Cdc42 перед трансплантацией ADMSCs значительно улучшало формирование незрелой костной мозоли и процесс ее трансформации в зрелую трубчатую кость у возрастных животных, причем наиболее значимые изменения происходили при трансфицировании siRNA. Эти

результаты подтверждают перспективность и целесообразность применения метода таргетирования Cdc42 в рамках комбинированной терапии переломов у пожилых людей.

Методология и методы диссертационного исследования

Методология диссертации основана на современных принципах системного анализа и включает экспериментальные исследования на крысах, световую микроскопию, биохимические и морфометрические методы, клеточные технологии и статистический анализ. Дизайн исследования соответствует требованиям современной науки и стандартам этического обращения с лабораторными животными. На первом этапе проведён синтез остеофильного бисфосфонатного полимера, выделена первичная культура ADMSCs крыс, оценены их пролиферативный и остеогенный потенциал, а также показано подавление активности остеокластов *in vitro* и в очаге замедленного сращения кости при остеопороз-ассоциированных переломах. На втором этапе изучены изменения в остеогенном, миграционном и антиостеокластном потенциале ADMSCs после таргетирования Cdc42 и терапевтическая эффективность таргетированных МСК на модели перелома.

Положения, выносимые на защиту

1. Синтетический остеофильный бисфосфонатный полимер не является цитотоксичным, не оказывает влияния на пролиферативную активность и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, однако существенно ингибирует резорбтивную активность остеокластов в условиях *in vitro*. Ингибирование Cdc42 малой молекулой CASIN и использование трансфицированных siRNA увеличивает остеогенный потенциал дифференцировки, миграцию мезенхимальных стволовых клеток и их антиостеокластное действие.

2. Использование мезенхимальных стволовых клеток после воздействия на них полимера значительно улучшает процесс репаративного остеогенеза с

различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата, увеличением плотности костной ткани при переломе локтевой кости у крыс-самок с эстроген-зависимым остеопорозом. Морфофункциональные изменения предшественников хондробластов и остеобластов, а также хондроцитов и остеоцитов костной ткани, таргетированных белком Cdc42, показало, что наиболее выраженное восстановление пула мезенхимальных стволовых клеток происходило при использовании трансфицированных siRNA на модели *in vivo* перелома локтевой кости у возрастных животных.

Степень достоверности

Высокая степень достоверности полученных результатов исследования обоснована использованием проверенных методик, таких как стандартные и апробированные методы клеточных исследований, включая синтез полимеров и выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани. Процедуры культивирования, функционализации и тестирования клеток выполнены в соответствии с протоколами, подтвержденными научными публикациями, что усиливает доверие к достоверности методик. Для обеспечения адекватности экспериментальных моделей были использованы современные *in vitro* и *in vivo* системы, включая модель перелома у крыс с эстроген-зависимым остеопорозом, соответствующую международным стандартам. Результаты исследования подтверждены морфологическим и гистологическим анализом, компьютерной томографией, а также биохимическими и молекулярными тестами на остеогенез и клеточную пролиферацию, что способствует всесторонней проверке и надежности выводов. Применение современных статистических методов минимизирует вероятность случайных ошибок, повышая обоснованность и достоверность полученных данных. Дополнительно, детальное описание методологий, протоколов и статистических подходов в работе способствует независимой оценке качества исследования и повышает доверие к результатам.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: международном научном симпозиуме «The Newest Technologies of Cell Technologies in Medicine» (Новосибирск, 2014), международной научной конференции «1st Biennial Conference BioMaH» (Рим, Италия, 2016), 4-й международной научной конференции «Regenerative Medicine and Healthy Aging» (Астана, Казахстан, 2016), 3-й международной научной конференции «Personalized Medicine & Global Health» (Астана, Казахстан, 2017), 3-м Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2017), международном научном симпозиуме «Astana Biotech» (Астана, Казахстан, 2018), 3-м Съезде травматологов-ортопедов Республики Казахстан и 7-м Евразийском конгрессе травматологов-ортопедов (Нур-Султан, Казахстан, 2019), международном научном онлайн-форуме Американского общества клеточной биологии (ASCB) и Европейской организации молекулярной биологии (EMBO) «Cell Bio Virtual 2021» (2021), международной научной конференции «4th Herbert Fleisch Workshop» (Брюгге, Бельгия, 2022), международной научно-практической конференции «Horizons of Modern Traumatology and Orthopedics» (Туркестан, Казахстан, 2022), международной научной конференции «The International Conference on Frailty & Sarcopenia Research (ICFSR)» (Бостон, США, 2022), международной научной конференции «4th BioMaH Conference 2024» (Рим, Италия, 2024) и Nazarbayev University Research Week 2024 (Астана, Казахстан, 2024).

Диссертационная работа апробирована на расширенном межкафедральном заседании сотрудников кафедр гистологии, цитологии и эмбриологии, биологии, анатомии человека, патологической анатомии, физиологии человека, топографической анатомии и оперативной хирургии, судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (Омск, 2025).

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр ортодонтии, восстановительных технологий и остеопатии ДПО; травматологии и ортопедии, а также гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, в экспериментальную работу Лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины ЧУ «National Laboratory Astana» АОО «Назарбаев Университет» (Республика Казахстан).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 24 научные работы, в том числе 1 патент на изобретение и 6 статей в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (6 статей в журналах категории K1, 1 публикация в издании категории K2, входящих в список изданий, распределённых по категориям K1, K2, K3, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of Science).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материала и методов, 2 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 136 источниками, из которых 124 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 2 таблиц и 41 рисунка.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в формулировании целей и задач исследования, проведении анализа отечественной и зарубежной литературы, определении методологического подхода, выполнении полного комплекса запланированных методов, а также в проведении статистической обработки, интерпретации и публикации результатов. Отдельные подходы к решению задач, поставленных в диссертационной работе, были сформированы в процессе обсуждения с научными консультантами. Профессор, канд. биол. н., PhD Аскарлова Ш. Н., заведующий лабораторией биоинженерии и регенеративной медицины ЧУ «National Laboratory Astana» АОО «Назарбаев Университет», внесла значительный вклад, благодаря своей экспертизе в области регенеративной медицины и стволовых клеток, что позволило автору сформировать научно обоснованный подход к исследованию. Ассоциированный профессор, PhD Умбаев Б. А., обладающий опытом в клеточной биологии, оказал методологическую поддержку, особенно в экспериментах по ингибированию Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) и оценке их остеогенного потенциала. Совместно со ст. науч. сотр. PhD Сафаровой Ю. И. на базе лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины ЧУ «National Laboratory Astana» были проведены исследования по изучению роли МСК, функционализированных бисфосфонат-содержащим полимером, и их терапевтического потенциала в коррекции остеопороз-ассоциированных переломов у крыс.

В тесном сотрудничестве с научным руководителем диссертационной работы д-ром. мед. наук, профессором Акулининым В. А., заведующим кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, был проведен микроскопический анализ образцов. Под его руководством были применены методы световой микроскопии, что позволило изучить морфологические изменения костной ткани, оценить взаимодействие мезенхимальных стволовых клеток с синтетическим остеофильным бисфосфонатным полимером, степень регенерации костной ткани, влияние ингибирования Cdc42 на активность остеокластов, а также роль

биоматериалов в стимуляции костной регенерации.

Автор также самостоятельно провел исследования по оценке регенераторного потенциала ADMSCs, модифицированных бисфосфонат-содержащим полимером, и терапевтического потенциала клеток, ингибированных по Cdc42, на моделях остеопороза и возрастных животных *in vivo*. Эти исследования внесли значимый вклад в понимание механизмов регенерации костной ткани и перспективы применения стволовых клеток и синтетических полимеров для лечения остеопороз-ассоциированных переломов.

ГЛАВА 1 МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В ЛЕЧЕНИИ ПЕРЕЛОМОВ КОСТНОЙ ТКАНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Основные причины и механизмы возникновения переломов

Переломы костей можно разделить на два основных типа: травматические и нетравматические [Bigham-Sadegh A., Oryan A., 2015; Camal Ruggieri I. N. et al., 2021]. Травматические переломы обычно возникают в результате высокоэнергетических ударов или внезапных, сильных внешних нагрузок на костную структуру, часто в результате серьезных аварий, таких как столкновения автомобилей, катастрофические падения со значительной высоты или участие в спортивных и развлекательных мероприятиях с высокой отдачей [Lane N. E., 2006]. Напротив, нетравматические или низкоэнергетические переломы, известные как «хрупкие переломы», более тесно связаны с основными изнурительными заболеваниями, нарушающими структурную целостность и прочность костей, такими как остеопороз, метаболические заболевания костей и некоторые эндокринные расстройства [Ensrud K. E., 2013]. Эти хрупкие переломы могут возникать даже при относительно незначительной травме, например, при падении с высоты стояния, и особенно распространены среди пожилых людей, у которых риск повышен из-за естественного возрастного снижения массы и качества костной ткани [Chehade M., Gill T. K., Visvanathan R., 2015]. В обширной литературе подчеркивается значительно более высокая восприимчивость и уязвимость пожилых людей к переломам костей, особенно тех, кто страдает такими возраст-ассоциированными заболеваниями, как остеопороз, характеризующиеся снижением массы костной ткани и нарушением микроархитектоники костной ткани, что приводит к увеличению хрупкости кости и повышению риска переломов [Hippisley-Cox J., Coupland C., 2009; Abdallah B. M. et al., 2015; Salari N. et al., 2021; Bhatnagar A., Kekatpure A. L., 2022]. Следует отметить, что одним из ключевых факторов риска переломов кости у пожилых является остеопороз, который является растущей глобальной

проблемой, число случаев которого увеличилось с 20,3 млн в 1990 году до 41,5 млн в 2019 году и, по прогнозам, достигнет 263,2 млн к 2030–2034 гг. [Salari N. et al., 2021; Xiao P.-L. et al., 2022]. Наибольшая распространенность отмечается среди женщин (154,4 млн прогнозируемых случаев против 108,8 млн у мужчин). По данным исследования, глобальная распространенность остеопороза составляет 18,3 %, при этом самые высокие показатели зафиксированы в Африке (39,5 %) и Азии (23,1 %), а самые низкие – в Южной Америке (6,9 %). Ожидается, что с увеличением продолжительности жизни и старением населения заболеваемость будет продолжать расти, требуя эффективных стратегий профилактики и лечения [Salari N. et al., 2021; Xiao P.-L. et al., 2022].

Одними из основных препаратов для терапии остеопороза являются бисфосфонаты. Бисфосфонаты (алендронат, ризедронат, ибандронат, золедроновая кислота) снижают резорбцию кости, подавляя активность остеокластов [Ховасова Н. О. и др., 2022].

1.2 Бисфосфонаты для терапии костных переломов

Бисфосфонаты – это класс синтетических соединений, которые становятся все более заметными в области здоровья костей и лечения заболеваний. Бисфосфонаты являются химическими аналогами пирофосфатов ($\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$), где центральная группа представляет собой гидролитически лабильную связь $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, замещенную устойчивой к гидролизу связью $\text{P}-\text{C}-\text{P}$. Эти соединения имеют уникальную химическую структуру, характеризующуюся центральным атомом углерода с двумя фосфонатными группами, что придает им высокое сродство к кальцию и позволяет избирательно накапливаться и сохраняться в костной ткани. Эта способность специфически нацеливаться на скелетную систему и оставаться в ней является ключевым фактором, обуславливающим терапевтическую эффективность бисфосфонатов [Drake M. T. et al., 2008].

Основной механизм действия бисфосфонатов заключается в их способности подавлять резорбцию костной ткани, опосредованную остеокластами. Это

достигается за счет многогранного подхода. Бисфосфонаты преимущественно поглощаются скелетом, где они затем высвобождаются и интернализуются остеокластами в процессе резорбции кости [Papadopoulos S. E. et al., 1992]. Попадая в остеокласты, бисфосфонаты нарушают различные клеточные и молекулярные пути, которые имеют решающее значение для функционирования и выживания остеокластов [Fleisch H., 1998]. Это нарушение приводит к снижению выработки ключевых регуляторов активности остеокластов, таких как пренилированные белки, тем самым нарушая функцию остеокластов и вызывая апоптоз или запрограммированную гибель клеток.

В частности, некоторые бисфосфонаты, такие как азотсодержащие соединения, способны нарушать мевалонатный путь, важнейший метаболический процесс в остеокластах. Нарушение мевалонатного пути способствует дальнейшему ухудшению функции и выживаемости остеокластов. Помимо прямого воздействия на зрелые остеокласты, бисфосфонаты могут также подавлять набор и дифференцировку предшественников остеокластов, что еще больше усиливает их антирезорбтивные свойства [Rogers M. J. et al., 2000; Santini D. et al., 2003]. Сочетание этих механизмов приводит к значительному снижению резорбции костной ткани, что является основным терапевтическим эффектом лечения бисфосфонатами.

Способность бисфосфонатов избирательно воздействовать на скелетную систему и накапливаться в ней, а также их мощное ингибирование костной резорбции, опосредованной остеокластами, делают их бесценными терапевтическими агентами при лечении различных заболеваний и состояний, связанных с костной системой, к ним, в частности, относятся болезнь Педжета, опухоль-индуцированные заболевания костей и остеопороз. Снижая скорость резорбции и оборота костной ткани, бисфосфонаты повышают минеральную плотность кости, улучшают ее структурные и материальные свойства и в итоге снижают риск переломов [Мкртумян А. М., Бирюкова Е. В., 2008]. Бисфосфонаты стали основным средством лечения заболеваний, связанных с повышенной резорбцией костной ткани и снижением ее плотности, таких как остеопороз. Эти

препараты подавляют активность остеокластов – специализированных клеток, ответственных за разрушение костной ткани, что приводит к увеличению минеральной плотности кости и повышению ее прочности. Существует несколько стратегий лечения остеопороза, где наиболее распространенными препаратами являются бисфосфонаты [Cranney A. et al., 2002; Bone Henry G. et al., 2025].

Механизм, с помощью которого бисфосфонаты снижают риск переломов, многогранен. Подавляя активность остеокластов и снижая резорбцию костной ткани, эти препараты приводят к увеличению минеральной плотности кости и улучшению ее микроархитектуры [Rogers M. J. et al., 2000; Rogers M. J. et al., 2020]. В результате кости становятся более прочными и устойчивыми к переломам, даже в случае падения или травмы. Кроме того, бисфосфонаты оказывают обезболивающее действие, уменьшая боль, связанную с существующими переломами, и потенциально способствуя процессу заживления. Следует отметить, что применение бисфосфонатов представляет собой многообещающий подход к лечению заболеваний, связанных с костной тканью, и снижению риска переломов, обеспечивая пациентам улучшение мобильности, независимости и качества жизни.

Важным ограничением бисфосфонатов является способ их введения. Внутривенные препараты, несмотря на свою эффективность, требуют регулярного посещения больницы и могут быть неудобны для пациентов, особенно проживающих в отдаленных или сельских районах. Это может стать препятствием для доступа к лечению и его соблюдения, особенно для пожилых людей или людей с ограниченной подвижностью. С другой стороны, пероральные бисфосфонаты могут плохо переноситься желудочно-кишечным трактом и плохо всасываться, что еще больше снижает их общую эффективность. Неудобства и побочные эффекты, связанные с приемом бисфосфонатов, могут стать серьезным препятствием для длительной терапии, что приводит к неоптимальным результатам лечения и снижению приверженности пациентов к лечению [Reyes C. et al., 2016].

1.3 Применение мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани

1.3.1 Основные характеристики мезенхимальных стволовых клеток

Мезенхимальные стволовые клетки – это популяция мультипотентных прогениторных клеток, которые могут быть выделены из различных тканей взрослого человека, таких как костный мозг, жировая ткань и пуповинная кровь [Pittenger M. F. et al., 2019]. Характеризуясь способностью к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток, включая остеобласты, хондроциты и адипоциты, МСК стали универсальным инструментом для применения в регенеративной медицине [Otto W. R., Wright N. A., 2011; Patel D. M. et al., 2013; Shintani N. et al., 2013]. Эти клетки не имеют экспрессии поверхностных маркеров кроветворных и эндотелиальных клеток, но обладают специфическим набором рецепторов клеточной поверхности, включая CD105, CD73 и CD90, которые обычно используются в качестве идентификационных маркеров для МСК [Newman R. E. et al., 2009]. Относительная редкость МСК в их родной тканевой среде, составляющая всего 0,001–0,01 % от общей популяции клеток в костном мозге, подчеркивает важность эффективных протоколов выделения и экспансии для получения клинически значимого количества клеток для терапевтического применения. Фундаментальные свойства МСК, такие как способность дифференцироваться в различные мезенхимальные линии, выделять широкий спектр биологически активных факторов и модулировать иммунные реакции, сделали их перспективными кандидатами для широкого спектра регенеративных терапий, включая лечение дефектов костной и хрящевой ткани, сердечно-сосудистых заболеваний и аутоиммунных расстройств [Ayala-Cuellar A. P. et al., 2019]. МСК обладают уникальной способностью прикрепляться к местам травм и воспалений, где они могут способствовать восстановлению тканей за счет секреции различных факторов роста и цитокинов. Кроме того, было показано, что МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, что

делает их перспективным кандидатом для лечения различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Мезенхимальные стволовые клетки представляют собой перспективный источник клеток для клеточной терапии и тканевой инженерии благодаря своей способности размножаться и дифференцироваться в различные типы клеток, включая те, которые составляют такие ткани, как кости, связки, сухожилия, хрящи и жировая ткань [Fernández Vallone V. B. et al., 2013; Zhidu S. et al., 2024]. В настоящее время МСК тестируются в ряде клинических испытаний для различных заболеваний, которые включают инфаркт миокарда, инсульт, диабет и дефекты хряща [Galderisi U. et al., 2022; Maldonado V. V. et al., 2023]. Простота выделения, способность к самообновлению и потенциал МСК к дифференцировке по нескольким линиям способствовали их все более широкому использованию в инженерии костной ткани и регенеративной терапии. В целом, замечательные характеристики МСК делают их весьма перспективным терапевтическим подходом для регенерации и восстановления поврежденной или больной костной ткани.

1.3.2 Механизмы действия мезенхимальных стволовых клеток в регенерации костной ткани

Мезенхимальные стволовые клетки способствуют регенерации костной ткани благодаря многогранному механизму действия. Основным механизмом заключается в дифференциации МСК в остеобласты – специализированные клетки, ответственные за формирование и минерализацию нового костного матрикса [Garg P. et al., 2017]. МСК могут давать начало остеобластам, которые откладывают новый костный матрикс и способствуют процессу минерализации, непосредственно усиливая формирование и восстановление костной ткани. Кроме того, МСК выделяют различные факторы роста и сигнальные молекулы, такие как костные морфогенетические белки, сосудистый эндотелиальный фактор роста и инсулиноподобный фактор роста, которые могут стимулировать набор и активность других костеобразующих клеток, включая эндогенные прогениторные

клетки и сосудистые эндотелиальные клетки [Han Y. et al., 2022]. Эта косвенная стимуляция естественной регенеративной способности организма еще больше усиливает процесс восстановления и регенерации костной ткани, которому способствуют МСК. Кроме того, МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, которые могут создавать благоприятную микросреду для регенерации костной ткани. Эти клетки могут подавлять активацию и пролиферацию воспалительных клеток, таких как Т-клетки, и способствовать секреции противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-10 и трансформирующий фактор роста-бета [Medhat D. et al., 2019; Baron M. et al., 2023]. Это помогает смягчить негативное влияние воспаления на процесс заживления костей, поскольку воспаление может нарушить процесс регенерации костной ткани. Еще одним важнейшим механизмом, с помощью которого эти клетки способствуют регенерации костной ткани, является прикрепление и миграция МСК к местам повреждения или заболевания костей. Экспрессия специфических рецепторов клеточной поверхности, таких как, и хемокинов, таких как стромальный клеточный фактор-1, позволяет МСК чувствовать и реагировать на сигналы из травмированной или больной костной среды, способствуя их набору и накоплению в целевом месте [Yellowley C., 2013]. Попадая в место повреждения, МСК могут оказывать регенеративное воздействие путем прямой дифференцировки в остеобласты, а также непрямой паракринной сигнализации, стимулирующей активность эндогенных костеобразующих клеток [Li C. et al., 2016; Sharaf-Eldin W. E. et al., 2016].

1.3.3 Стратегии и методы применения мезенхимальных стволовых клеток для лечения костных переломов

Для использования мезенхимальных стволовых клеток в лечении переломов, дефектов и других повреждений, и заболеваний, связанных с костной тканью, были широко изучены различные стратегии и методы [Battafarano G. et al., 2021]. Одним из распространенных подходов является прямая трансплантация

МСК, либо в их недифференцированном состоянии, либо после индуцирования дифференцировки в остеогенную (костеобразующую) линию, непосредственно в место перелома или дефекта кости. Это может быть достигнуто с помощью различных методов доставки, таких как прямая инъекция, имплантация на основе строительных лесов или инкапсуляция МСК в гидрогели, содержащие клетки [Safarova Y. et al., 2020]. Использование биоматериалов, таких как коллагеновые, гидроксиапатитовые или кальций-фосфатные матрицы, может обеспечить благоприятную среду для трансплантированных МСК. Это может способствовать их выживанию, пролиферации и дифференцировке в остеобласты – специализированные костеобразующие клетки. Эти подмошки также могут служить носителями для локальной доставки факторов роста, сигнальных молекул и других биологически активных соединений, которые могут дополнительно стимулировать и усиливать процесс регенерации кости. Другая перспективная стратегия предполагает использование секретома МСК – сложной смеси факторов роста, цитокинов, хемокинов и внеклеточных везикул, секретируемых этими клетками [Vo T. N. et al., 2012; Marolt Presen D. et al., 2019]. Было показано, что секретом МСК обладает мощными регенеративными и иммуномодулирующими свойствами, а его доставка, либо в виде очищенного препарата, либо посредством введения полученных из клеток внеклеточных везикул, может стимулировать эндогенные механизмы восстановления тканей хозяина, способствуя тем самым более эффективной и скоординированной регенерации костной ткани [Liu S. et al., 2020; Arifka M. et al., 2022]. Кроме того, генетическая модификация МСК для сверхэкспрессии специфических остеогенных транскрипционных факторов или факторов роста, таких как BMP-2 или Runx2, была изучена в качестве стратегии дальнейшего повышения их потенциала регенерации костной ткани. Такой подход может усилить паракринные сигнальные способности МСК, что приведет к более надежному и направленному восстановлению и регенерации костной ткани. Например, в исследовании Сафаровой и др. [Safarova Y. et al., 2020] изучалось использование синтетических полимеров, нацеленных на костную ткань, для покрытия

мезенхимальных стволовых клеток с целью повышения их терапевтической эффективности для регенерации костей. Исследователи предположили, что остеонаправленные полимеры помогут мезенхимальным стволовым клеткам более эффективно прикрепляться к местам повреждения или заболевания кости, тем самым повышая их способность способствовать регенерации костной ткани. Результаты этого исследования показали, что мезенхимальные стволовые клетки, покрытые полимером, продемонстрировали повышенную остеогенную дифференцировку, улучшенную способность к заживлению костей и улучшенное прикрепление к целевым участкам по сравнению с немодифицированными клетками. Это позволяет предположить, что стратегия использования костнонаправленных полимеров для модификации мезенхимальных стволовых клеток может стать перспективным подходом для повышения терапевтического потенциала этих клеток при лечении переломов костей, несращений и других заболеваний, связанных с костями. Кроме того, использование биоматериалов, таких как коллагеновые, гидроксиапатитовые или кальций-фосфатные матрицы, может обеспечить благоприятную среду для трансплантированных МСК. Это может способствовать их выживанию, пролиферации и дифференцировке в остеобласты – специализированные костеобразующие клетки. Такие подмости также могут служить носителями для локальной доставки факторов роста, сигнальных молекул и других биологически активных соединений, которые могут дополнительно стимулировать и усиливать процесс регенерации кости.

1.3.4 Клинические исследования и результаты применения мезенхимальных стволовых клеток

Клиническое применение мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани широко изучено, и в многочисленных клинических исследованиях изучается их терапевтический потенциал. Основное внимание уделяется лечению остеоартрита – дегенеративного заболевания суставов, характеризующегося постепенным разрушением суставного хряща.

Доклинические исследования продемонстрировали способность МСК дифференцироваться в хондроциты и выделять факторы, способствующие восстановлению и регенерации хряща. В нескольких клинических исследованиях были получены многообещающие результаты, свидетельствующие об улучшении боли, функции сустава и качества хряща у пациентов с остеоартритом после применения терапии на основе МСК. Еще одной областью клинических исследований является использование МСК для лечения переломов и несращений костей, которые часто трудно поддаются лечению и требуют дополнительных вмешательств. Клинические исследования показали, что местное введение МСК, как отдельно, так и в сочетании с биоматериалами, может увеличить скорость заживления костей и улучшить качество регенерированной костной ткани. В контексте остеопороза – заболевания, характеризующегося снижением костной массы и повышенным риском переломов, – терапия на основе МСК продемонстрировала потенциал стимулирования образования новой костной ткани и улучшения минеральной плотности костей. Клинические испытания показали, что системное или местное введение МСК может способствовать восстановлению костного гомеостаза и снижению риска переломов у пациентов с остеопорозом [Cho S. W. et al., 2009; Teitelbaum S. L., 2010; Yao W., Lane N. E., 2015]. Описан метод лечения остеопороза, при котором пациенту внутривенно вводят биотрансплантат, содержащий от 50 до 500 млн МСК [Yamada Y et al., 2003]. Другой подход – имплантация культивируемых аутологичных или аллогенных мезенхимальных плюрипотентных стволовых клеток, вводимых в зону повреждения кости для улучшения процессов репаративного остеогенеза [Tasso R. et al., 2013; Huang S. et al., 2015; Jagwant S. et al., 2015]. Недостатками этих методов являются отсутствие сродства МСК к костной ткани и отсутствие ингибирования активности остеокластов. Однако существуют некоторые ограничения для терапевтического использования МСК. В случае аллогенной трансплантации МСК от здоровых молодых доноров производство желаемого количества и качества МСК, необходимых для клинического применения, в основном зависит от условий культивирования [Sotiropoulou P. A. et al., 2006;

Chen H. H. et al., 2009], в то время как аутологичная терапия также ограничена возрастом пациента [Dai L.-J. et al., 2009; Mareschi K. et al., 2006]. Как и другие соматические клетки, МСК стареют, и это старение сопровождается прогрессирующим снижением функции стволовых клеток. Кроме того, способность человеческих МСК делиться снижается с возрастом человека [Mareschi K. et al., 2006]. В целом, клиническое использование мезенхимальных стволовых клеток для регенерации костной ткани дало многообещающие результаты, а продолжающиеся исследования и испытания направлены на дальнейшую оптимизацию эффективности и безопасности этих клеточных методов лечения.

1.4 Роль белка Cdc42 в функционировании мезенхимальных стволовых клеток и возможный терапевтический потенциал в регулирование клеточной терапии

1.4.1 Описание белка Cdc42 и его роль в клеточных процессах

В настоящее время накапливается все больше данных, которые свидетельствуют о том, что на функции стволовых клеток влияет возраст донора [Geiger H. et al., 2013; Gómez-Barrena E. et al., 2015; Khatiwala R., Cai C., 2016; Dufrane D., 2017]. Было отмечено, что возраст оказывает негативное воздействие на скорость пролиферации [Khatiwala R., Cai C., 2016], апоптоз [Geiger H., Haan de G., Florian M. C., 2013], репликативный потенциал [Infante A., Rodríguez C. I., 2018] и дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток [Gómez-Barrena E. et al., 2015].

В ряде работ предполагают, что одним из регуляторов старения стволовых клеток является гомолог белка контроля клеточного деления 42, член семейства Rho GTPase (Cdc42), был впервые обнаружен в клетках *Saccharomyces cerevisiae*, где он маркировал локусы для формирования новых почек [Xiao X.-H. et al., 2018]. Cdc42 является классическим членом семейства Rho малых GTPases в

суперсемействе Ras-белков. Для него как для члена семейства Rho характерно наличие Rho-специфичной вставки, расположенной между G4 и G5-боксами и участвующей в связывании с эффекторами и регуляторами [Freeman J. L. et al., 1996]. Для функционирования белков семейства Rho, как для всех членов суперсемейства Ras, характерен общий биохимический механизм: они неактивны, когда связаны с гуанозиндифосфатом (GDP), и активны, когда связаны с гуанозинтрифосфатом (GTP), то есть они представляют собой ГТФ-связывающие и гидролизующие белки (ГТФазы), которые действуют как бинарные, GDP-/GTP-регулируемые, циклические молекулярные переключатели [Jaffe A. B., Hall A., 2005]. Молекулярный переключатель Cdc42 работает в активном состоянии, связанном с GTP, и неактивном состоянии, связанном с GDP, причем его активация и инактивация жестко регулируется факторами обмена гуаниновых нуклеотидов, белками-активаторами ГТФазы и ингибиторами диссоциации гуаниновых нуклеотидов. GEFs катализируют обмен GDP на GTP, активируя Cdc42, который затем может активировать нижележащие эффекторы, что приводит к изменению клеточной пролиферации, полярности, адгезии и миграции, а также к динамическим изменениям цитоскелета и других важнейших клеточных функций.

Cdc42 является высококонсервативным белком: гомологи у различных представителей Metazoa обнаруживают 92–95 % сходства с человеческим Cdc42 [Beljan S. et al., 2020]. У человека Cdc42 кодируется специфическим геном CDC42, расположенным на коротком плече хромосомы 1 (1p36). Этот ген состоит из 6 экзонов с длиной транскрипта 1 512 п. н., транслируемых в 191 аминокислоту. Структурное ядро белка представлено доменом G, состоящим из 5 консервативных последовательностей G1-G5, вставкой Rho (остатки 122–135), С-концевым коротким гипервариабельным участком и блоком СААХ (где С – консервативная цистеиновая, Cys188 в Cdc42).

Cdc42 играет важную роль в физиологии костей [Ito Y. et al., 2010; Wirth F. et al., 2021]. Данные показывают, что Cdc42 влияет на гомеостаз костных клеток и снижает плотность костей [Ito Y. et al., 2010]. Делеция Cdc42 в ранних

остеобластах снижает функцию остеобластов, в то время как в дифференцирующихся остеобластах делеция *Cdc42* снижает их количество, что приводит к увеличению количества миелоидных предшественников в костном мозге и снижению минеральной плотности костей у мышей [Wirth F. et al., 2021]. Y. Ito показал, что овариоэктомия мышей с утраченной функцией *Cdc42* не вызывает потерю костной массы из-за подавления активности остеокластов, в то время как усиление функции *Cdc42* приводит к повышению резорбтивной способности остеокластов и развитию остеопороза [Ito Y. et al., 2010]. Исследование GWA показало, что у людей с однонуклеотидным полиморфизмом rs6426749 в 1p36.12 наблюдалась повышенная экспрессия *Cdc42* и высокая восприимчивость к остеопорозу; был сделан вывод, что rs6426749 активирует *Cdc42* посредством снижения регуляции LINC00339, и это может быть одним из потенциальных однонуклеотидных полиморфизмов, вызывающих остеопороз [Chen X.-F. et al., 2018]. Также было обнаружено, что *Cdc42* регулирует активность остеокластов через RANKL/M-CSF [Ito Y. et al., 2010].

Также данные свидетельствуют о том, что *Cdc42* играет роль в хондрогенезе, пролиферации хондроцитов, продолжительности жизни и дифференцировке [Aizawa R. et al., 2012; Suzuki W. et al., 2015]. В исследовании X. Hu и соавторов активация *Cdc42* наблюдалась на субхондральной поверхности и в костном мозге во время экспериментального остеоартрита [Hu X. et al., 2018]. Это исследование также продемонстрировало, что *Cdc42* участвует в разрушении хрящевого матрикса посредством усиления пути Янус-киназы (JAK)/STAT3. Более раннее исследование показало, что хондроциты мышей *Smad3* ex8/ex8, демонстрирующие фенотипы, сходные с человеческим остеоартритом, также имели повышенную экспрессию *Cdc42* [Wang H. et al., 2007]. Кроме того, скрининг диагностических маркеров остеоартрита, связанных с иммунной системой, показал, что экспрессия *Cdc42* является одним из 15 биомаркеров остеоартрита с высокой диагностической эффективностью [Yuan W.-H. et al., 2021]. Эти результаты показывают, что *Cdc42* является одним из важнейших игроков, участвующих в прогрессировании остеоартрита, и может служить

прогностическим маркером заболевания. С другой стороны, результаты, полученные L. A. Fortier противоречат вышеупомянутым исследованиям и показывают, что старые хондроциты показывают сниженную активность Cdc42, однако экспрессия Cdc42 остается стабильной [Fortier L. A., Miller B. J., 2006]. Поэтому необходимы дальнейшие исследования для изучения роли Cdc42 в развитии остеоартрита при старении.

Появляется все больше свидетельств того, что Cdc42 вовлечен в развитие процессов старения и различных возрастных патологий. Многие исследования предоставили доказательства того, что дисрегуляция Cdc42 часто обнаруживается при старении клеток и тканей [Florian M. C. et al., 2012, 2017, 2020; Umbayev B. et al., 2018, 2023; Tiwari R. L. et al., 2020; Walters H., Cox L. S., 2020].

1.4.2 Cdc42 как молекулярная мишень для регулирования старения

Учитывая ключевую роль, которую Cdc42 играет в старении и возрастных заболеваниях, этот белок вызвал значительный интерес в качестве молекулярной мишени для омоложения клеток. Основные исследования в настоящее время сосредоточены на ингибирующей активности Cdc42 с использованием фармакологических ингибиторов Cdc42 [Murphy N. P. et al., 2021]. Эти ингибиторы представляют собой небольшие синтетические молекулы, принадлежащие к различным химическим классам и влияющие на различные регуляторные элементы Cdc42. Кроме того, среди ингибиторов Cdc42 есть также природное соединение – куркумин. Различные механизмы таргетинга регуляции Cdc42 лежат в основе действия ингибиторов Cdc42, такие как: таргетинг взаимодействий Cdc42-GEF, таргетинг связывания нуклеотидов Cdc42, ингибция прикрепления мембраны Cdc42 и таргетинг эффекторов Cdc42 [Murphy N. P. et al., 2021].

В настоящее время наиболее широко используемым соединением, относящимся к синтетическим малым молекулярным ингибиторам Cdc42–GEF, является CASIN, который ингибирует катализируемую Cdc42-RhoGEF

диссоциацию GDP [Liu W. et al., 2019]. Несколько исследований показали, что обработка клеток с помощью CASIN может вызвать омоложение клеток. Исследование M. C. Florian было первым, проведенным в этой области [Florian M. C. et al., 2012]. Они продемонстрировали, что старые мышинные гемопоэтические клетки, характеризующиеся повышенной активностью Cdc42, имеют две отдельные субпопуляции, экспрессирующие низкие и сверхвысокие уровни индуцированного гиперацетилирования гистона H4 по лизину 16 (AcH4K16). Напротив, молодые клетки в основном имеют одну субпопуляцию с высокими уровнями. Кроме того, в то время как распределение AcH4K16 в ядрах молодых клеток было полярным и противоположным полюсу цитоплазматического тубулина, в старых клетках наблюдалось аполярное распределение. Фармакологическое ингибирование активности Cdc42 с помощью CASIN в старых клетках привело к восстановлению до молодых уровней: уровня и пространственного распределения AcH4K16 и функции омоложенных старых LT-HSC. Аналогичные результаты были получены и в человеческих HSC [Amoah A. et al., 2022]. Результаты эксперимента *in vivo* также подтвердили эти результаты [Liu W. et al., 2019]. Они показали, что внутрибрюшинное введение CASIN может вызывать долгосрочную мобилизацию гемопоэтических стволовых клеток у мышей. Кроме того, это исследование показало низкую токсичность CASIN. Основные механизмы, вовлеченные в омоложение полярности и функции HSC, вызванное CASIN, основаны на регуляции оси Cdc42-Borg4-Septin7 [Kandi R. et al., 2021]. Другое исследование установило, что фармакологическое лечение CASIN усилило экспрессию LaminA/C в старых мышинных HSC. Более того, ингибирование Cdc42 CASIN приводит к улучшению архитектуры хромосомы 11 старых HSC и улучшению функции стволовых клеток в анализах трансплантации старых мышинных HSC [Grigoryan A. et al., 2018]. Кроме того, Лейнс и др. показали, что обработанные CASIN, старые HSC восстановили иммунную систему до уровня молодой [Leins H. et al., 2018].

Способность CASIN ослаблять клеточное старение во взрослых стволовых клетках была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В нашем

исследовании мы показали, что в старых ADMSC повышенная активность Cdc42 была связана с биомаркерами старения, а фармакологическое ингибирование Cdc42 приводило к увеличению скорости пролиферации, адипогенного и остеогенного потенциала дифференцировки и снижению уровней окрашивания SA- β -Gal ROS, p16INK4a, F-актина и активности сигнальных путей ERK1/2 и JNK [Umbayev B. et al., 2018].

Существует возможный альтернативный механизм подавления старения путем ингибирования Cdc42. Недавно Н. Walters и L. S. Cox, показали, что перенос митохондрий из клетки в клетку между стареющими клетками через межклеточные мостики регулируется Cdc42 [Walters H., Cox L. S., 2020]. Это увлекательное исследование показало, что человеческие фибробласты через так называемые туннельные нанотрубки (TNT) или межклеточные мостики, содержащие F-актин и тубулин, могут осуществлять межклеточный митохондриальный транспорт во время старения в результате различных стрессов (репликативное истощение, повреждение ДНК или активация онкогенов). Примечательно, что ингибирование активности Cdc42 с помощью CASIN резко снизило количество TNT и перенос стареющих митохондрий в контрольные клетки. Авторы этой работы предполагают, что межклеточный митохондриальный транспорт может быть механизмом ускорения преждевременного старения.

Недавно М. С. Florian и др. заполнили пробел в знаниях о роли пути Cdc42 в регуляции продолжительности жизни [Florian M. C. et al., 2020]. Это исследование показывает, что краткосрочное системное лечение CASIN продлевает продолжительность жизни старых мышей на 10 процентов по сравнению с контролем без терапии. Хотя точный механизм того, как сигнал Cdc42 контролирует продолжительность жизни, неизвестен, эффект продления жизни ингибирования Cdc42 может быть обусловлен эпигенетическими изменениями и снижением уровней воспалительных цитокинов.

Однако, в отличие от CASIN, ингибитор связывания нуклеотида Cdc42 ML141 был изучен только в одном исследовании [Chaker D. et al., 2018]. ML141 активирует дифференциацию гепатоцитов из старых мезенхимальных стволовых

клеток человека, полученных из жировой ткани, через путь Wnt5a/PI3K/miR-122 [Chaker D. et al., 2018]. Более того, ML141 улучшил пролиферацию клеток, адгезию и жизнеспособность и снизил экспрессию биомаркеров клеточного старения p16, p53 и p21. Кроме того, было показано, что ингибирование Cdc42 в старых мезенхимальных стволовых клетках человека с помощью ML141 значительно меняет профиль цитокинов.

Хотя данные об антивозрастных эффектах ингибирования Cdc42 малыми молекулами ограничены, они показывают полезные результаты для омоложения и увеличения продолжительности жизни. Необходимо провести много исследований, чтобы понять точные механизмы, лежащие в основе обращения вспять старения, опосредованного Cdc42. Кроме того, текущие исследования сосредоточены в основном на ингибировании Cdc42, в то время как активация Cdc42 также может влиять на старение в некоторых тканях. Таким образом, активаторы Cdc42 были бы полезны в регуляции старения и могли бы иметь терапевтический потенциал. С другой стороны, отсутствие специфических соединений активатора Cdc42 является ограничивающим фактором для оценки потенциала этого подхода.

Ингибирование активности Cdc42 потенциально обратить старение мезенхимальных стволовых клеток, тем самым сохраняя более прочный пул этих регенеративных клеток в месте перелома. Это, в свою очередь, может способствовать более эффективной регенерации костной ткани и улучшению результатов заживления у пациентов с переломами костей. Однако сложные сигнальные пути с участием Cdc42 и его последующие эффекты на функции МСК в контексте заживления переломов костей требуют дальнейшего углубленного изучения. Более глубокое понимание этих сложных механизмов необходимо для разработки целевых терапевтических стратегий, которые могут эффективно модулировать активность Cdc42 для улучшения регенерации костной ткани и восстановления переломов. В целом, использование регуляторной роли Cdc42 в функционировании мезенхимальных стволовых клеток открывает большие перспективы для развития терапии переломов костей, но для полного выяснения основных механизмов и воплощения этих многообещающих результатов в

эффективные клинические вмешательства, способные улучшить состояние пациентов, необходимы дальнейшие исследования.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Реактивы и материалы

В работе использовали реактивы и материалы: DMEM (Gibco, США), FBS (HyClone, США), пенициллин/стрептомицин (Gibco, США), коллагеназа типа I (Sigma-Aldrich, США), трипсин/EDTA (Gibco, США), PBS (Gibco, США), алазариновый красный S, DAPI, CASIN, ALP Assay Kit, N,N-диметилакриламид, алендронат, N'-гидроксисукцинимидный эфир N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты, аскорбиновая кислота, β -глицерофосфата, дексаметазон, M-CSF6 RANKL, Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) kit, PIT Assay, гребенка Cell comb, BMP-2, кристаллический фиолетовый, сульфат протамина (Sigma-Aldrich, США), набор StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Invitrogen, США), первичные поликлональные антикрысиные кроличьи антитела CD90, CD105, CD34, CD45, CD31, Dynabeads® Goat anti-Mouse IgG, Opti-MEM (Invitrogen, США). Вторичные антитела козы против кролика, меченные Alexa 488 (SantaCruz). Анализ клеточной жизнеспособности проводили с использованием набора Cell-Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, США). Stealth RNAi siRNAs – ThermoScientific Stealth siRNA CDC42 (RSS329925-927), Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, США). Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) (Mybiosource, США). G-LISA® Cdc42 Activation Assay (Cytoskeleton, США). Алендронат (Landromax, GlobalPharm, Турция), лентевирусные частицы люциферазы светлячков (LVT-Luc2) (Eurogen, Россия).

2.2 Синтез полимера

Полимер был синтезирован методом радикальной полимеризации с переносом атома (ATRP), согласно опубликованному ранее протоколу [D'Souza S. et al., 2014]. Базовой молекулой при синтезе являлся кополимер, состоящий из двух мономеров – биологически инертного N, N-диметилакриламида (ДМАА) и

N'-гидроксисукцинимидного эфира N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты (NHS), с последующей полимеризацией и ковалентным присоединением бисфосфонатной группы. Характеризацию синтезируемого полимера проводили с использованием методов гель-хроматографии (GPC) для определения молекулярной длины полимера и ядерно-магнитного резонанса (NMR) для определения концентрации бисфосфонатов.

2.3 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток

Висцеральная жировая ткань вокруг половых органов крыс (*Rattus norvegicus*, линия Wistar) была выделена под ингаляционной анестезией (изофлуран, 5 % в O₂) и в асептических условиях согласно опубликованному ранее протоколу [Aragana M. et al., 2013]. Образцы обрабатывали 0,2 % раствором коллагеназы I в DMEM при 37 °C в течение 60 мин, с последующим центрифугированием (300 × g, 5 мин). Осадок ресуспендировали в полной питательной среде (DMEM + 15 % FBS + 1 % пенициллин/стрептомицин) и инкубировали в 75 см² культуральных флаконах при 37 °C, 5 % CO₂. Неадгезивные клетки удаляли на следующий день, среду обновляли каждые 48 ч. На 21 сут клетки, экспрессирующие CD105, отсортировали методом иммуномагнитного сортирования. Кратко, клетки были инкубированы с первичным антикрысиным мышинным антителом CD105 антителами, далее клетки инкубировали с конъюгированными с магнитными частицами Dynabeads® Goat anti-Mouse IgG. Затем пробирка была помещена в магнит, который удерживает CD105 позитивные клетки, после чего нежелательные клетки были удалены. Был использован магнит EasyEights™ EasySep™ Magnet (Stemcell Technologies, США). Выделенные CD105 + клетки культивировали до 4–5 пассажей.

2.4 Иммунофлуоресцентный метод

Для анализа клеток на наличие позитивных (CD90 и CD105) и негативных (CD31, CD34 и CD45) иммунофенотипических антигенов МСК использовали метод иммунофлуоресценции. Клетки фиксировали в 4 % растворе формальдегида в течение 30 мин. Далее проводили пермеабиллизацию клеток с помощью 0,1 % раствора тритон X-100 в течение 3 мин. Далее клетки инкубировали в 5 % растворе сывороточного альбумина в течение 1 ч. Затем проводили инкубацию с первичными антителами против CD90, CD105, CD34, CD45 и CD31 в течение 16 ч при температуре 4°C. Далее клетки промывали и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем флуорофором Alexa 488 (разведение 1 : 1 000, Invitrogen). Вторичные антитела козы против кролика или мыши, меченные Alexa 488, ядра докрашивали DAPI (BD, США). Микроскопия была выполнена с использованием микроскопов Olympus IX83 и Carl Zeiss Cell Observer SD. Изображения были получены с помощью, охлаждаемой CCD камеры и программного обеспечения MetaVue.

2.5 Функционализация мезенхимальных стволовых клеток остеофильным полимером

Клетки инкубировали с полимером (1 мг/мл) при 37 °C в PBS (pH 8,0) в течение 10 мин, затем трижды промывали PBS (pH 7,4) и ресуспендировали в свежей питательной среде.

2.6 Оценка пролиферации мезенхимальных стволовых клеток

Мезенхимальные стволовые клетки (1×10^4 клеток/лунку) засевали в 96-луночные планшеты, инкубировали 0, 1, 2, 4, 24, 48 и 72 ч. Жизнеспособность оценивали с помощью Cell-Titer Glo Luminescent Assay (Promega, США) на микропланшетном ридере Biotek Hybrid Reader (Biotek, США).

2.7 Окрашивание на ализариновый красный

Мезенхимальные стволовые клетки (1×10^6 клеток/мл) инкубировали с полимером (1 мг/мл, 10 мин), промывали и высевали в 24-луночные планшеты. Через 12 ч среду заменяли на остеогенную (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen) и культивировали 14 сут. Фиксацию клеток проводили 4 % формалином, окрашивание – ализариновым красным S. Количественную оценку минеральных отложений проводили с помощью спектрофотометра Synergy Hybrid H1 (BioTek, США) при 405 нм.

2.8 Иммуноферментный анализ уровня щелочной фосфатазы

Клетки высевали в 12-луночные планшеты (1×10^6 клеток/лунка), через 24 ч заменяли среду на остеогенную (DMEM, 10 % FBS, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10 mM β -глицерофосфата, 0,1 мкМ дексаметазона) и культивировали 14–21 сут. Оценка проводилась по окрашиванию на щелочную фосфатазу (ALP Assay Kit, Sigma-Aldrich, США).

2.9 Выделение остеокластов

Остеокласты выделяли из костного мозга трубчатых костей новорожденных крыс (1–3 сут), культивировали в MEM (10 % FBS, 10 нг/мл M-CSF) 3 сут [Tevlin R. et al., 2014]. Затем среду заменяли на дифференцировочную (MEM + 10 нг/мл M-CSF + 10 нг/мл RANKL). На 5 сут добавляли полимер (0,5–2 мг/мл) и алендронат (4×10^{-3} , 2×10^{-3} г/мл). Оценка проводилась методом TRAP-окрашивания.

2.10 Определение активности остеокластов

Анализ резорбции остеокластов проводили с использованием коммерчески доступного 24-луночного планшета, предварительно покрытого неорганической

костной имитацией поверхности (PIT assay). Клетки высевали в концентрации 2×10^4 на лунку. На следующий день среду меняли так, чтобы она содержала полимер в концентрации 0,5, 1 и 2 мг/мл. Контрольную группу обрабатывали обычной средой индукции остеокластов, а коммерчески доступный алендронат (Landromax, GlobalPharm) использовали в качестве положительного контроля. На 7 сут культивирования *in vitro* клетки инкубировали с 10 % раствором отбеливателя и контрастно окрашивали по фон Коссе для визуализации нерезорбированного субстрата. Изображения делали с помощью микроскопа Zeiss и анализировали с помощью программного обеспечения FIJI для резорбированной и нерезорбированной области.

2.11 Ингибирование Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках

Фармакологическое ингибирование и сайленсинг Cdc42 проводили на МСК выделенных из жировой ткани молодых (1 мес.) и возрастных (24 мес.) животных. МСК культивировали в DMEM (10 % FBS, 1 % Ab) до конfluence. Для осуществления фармакологического ингибирования клетки предварительно обрабатывали ингибитором Cdc42 (CASIN (Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мкМ в течение 16 ч.

Для проведения сайленсинга были использованы коммерческие малые интерферирующие РНК – Stealth siRNA CDC42. Трансфекцию проводили в течение 48 ч с использованием Lipofectamine® 2000. Кратко, клетки культивировались в 6-луночных планшетах в 2 мл DMEM без антибиотиков до достижения 70 % конfluence. Перед трансфекцией в 250 мкл Opti-MEM отдельно добавляли 5 мкл Lipofectamine 2000 и 1 нмоль siRNA, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Полученные комплексы добавляли к клеткам в каждую лунку, после чего планшеты осторожно встряхивали. По истечении 48 ч инкубации при 37 °C во влажной среде эффективность сайленсинга Cdc42 была оценена с помощью ПЦР реального времени.

2.12 Анализ G-LISA Cdc42

Активность Cdc42 была измерена с помощью набора G-LISA® Cdc42 Activation Assay Biochem Kit™ в соответствии с протоколом производителя.

2.13 Анализ миграционной способности мезенхимальных стволовых клеток

Скретч-анализ использовали для оценки миграции старых МСК *in vitro* с использованием Hybrid Reader Cytation5 (Biotek, США). Клетки засеивали и культивировали до конфлюэнтного состояния. После того, как клетки сформировали монослой, с помощью гребенки Cell comb разлиновывали лунки. Плашку 3 раза промывали полной средой и помещали в камеру инкубатора Hybrid Reader Cytation5. В камеру подавали 5 % CO₂ и поддерживали температуру 37 °C через 48 ч. Клетки фотографировали методом светлого поля при 4-кратном увеличении, после чего проводили количественный анализ.

Для анализа направленной миграции был использован метод Transwell. Для этого МСК были высеяны в верхние камеры трансвелл-планшетов с 2×10^4 клеток в каждой в 200 мкл безсывороточной среды на лунку, а нижние камеры были заполнены 600 мкл среды, содержащей 0,5 % фетальной бычьей сыворотки, с или без 100 нг/мл костный морфогенетический белок 2 (BMP-2). После инкубации во влажном инкубаторе при 37 °C, 5 % CO₂ в течение 24 ч мигрировавшие клетки на нижней стороне мембран были зафиксированы и окрашены 0,1 % кристаллическим фиолетовым. После промывания дистиллированной водой было рассчитано общее количество мигрирующих МСК с помощью программного обеспечения Image J.

2.14 Оценка воздействия кондиционированной среды мезенхимальных стволовых клеток

Кондиционированную среду МСК получали путем сбора супернатантов МСК, культивируемых в MEM, в течение 3 сут после фармакологического ингибирования и сайленсинга Cdc42. Остеокласты (1×10^6 клеток) помещали в 24-луночные планшеты и культивировали в среде для индукции остеокластов, с кондиционированной средой от ADMSCs, полученной от 1-мес. животных или 24-мес. животных с или без фармакологического ингибирования и сайленсинга Cdc42.

2.15 Схема эксперимента

Исследование было выполнено на 80 крысах-самцах и 40 крысах-самках породы Wistar разного возраста, полученных из вивария Национального центра биотехнологии, г. Астана, Казахстан. Все процедуры проводились в соответствии с этическими нормами и были одобрены локальными Этическими комитетами Центра наук о жизни ЧУ «National Laboratory Astana» АОО «Назарбаев Университет» (IORG 0006963) и ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, что подтверждено протоколом № 13 от 27.11.2023. Животных содержали по 5 крыс на клетку, при комнатной температуре ($22,0 \pm 0,5$) °C, влажности воздуха 65–70 %, 12 ч цикле день/ночь, свободном доступе к корму и питьевой воде. Содержание животных, эксперименты с животными выполнены с соблюдением принципов гуманности, в соответствии с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных и директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» [Directive of the European Parliament and of the Council, 2010].

Для испытания МСК с остеофильным полимером были проведены эксперименты на крысах. Для этого крысы-самки с экспериментальным

эстроген-зависимым остеопорозом ($n = 40$) были разделены на четыре группы. Начиная со следующего дня после остеотомии, им один раз в неделю в течение месяца локально в зону перелома локтевой кости вводили по 200 мкл следующих растворов: группа I (негативный контроль), $n = 10$, – фосфатно-солевой буферный раствор, ФсБР, PBS); группа II, $n = 10$ – остеофильный полимер в растворе ФсБР (1 мг/мл), группа III – суспензия мезенхимальных стволовых клеток в ФсБР (1×10^6 клеток/мл), группа IV – суспензия МСК, модифицированных остеофильным полимером (1 мг/мл и 1×10^6 клеток/мл). У животных всех этих групп материал для гистологического исследования из зоны перелома забирали через 1 ($n = 20$) и 6 ($n = 20$) мес. после операции (по пять на случай).

Для испытания МСК с ингибированием Cdc42 были проведены эксперименты на крысах-самцах в возрасте 24 мес. Всего было использовано 80 крыс самцов. Животные первой группы служили контролем и лечения не получали; животным второй группы вводили старые МСК, третьей группе – старые МСК, модифицированные малой молекулой CASIN, и четвертой группе – МСК, трансфицированные siRNA. Количество вводимых клеток было одинаковым для всех экспериментальных групп – 1×10^6 клеток в 200 мкл PBS. Процедуру трансплантации клеток проводили однократно через сутки после перелома. Инъекции выполняли 1 раз в неделю в течение месяца. Для оценки динамики образования костной мозоли оценивали минеральную плотность костной ткани в местах переломов в сроки 16 и 24 нед. Через 16 и 24 нед. проводили гистологический анализ (гематоксилин/эозин, Ван Гизон) и количественную оценку костной регенерации.

Дизайн исследования

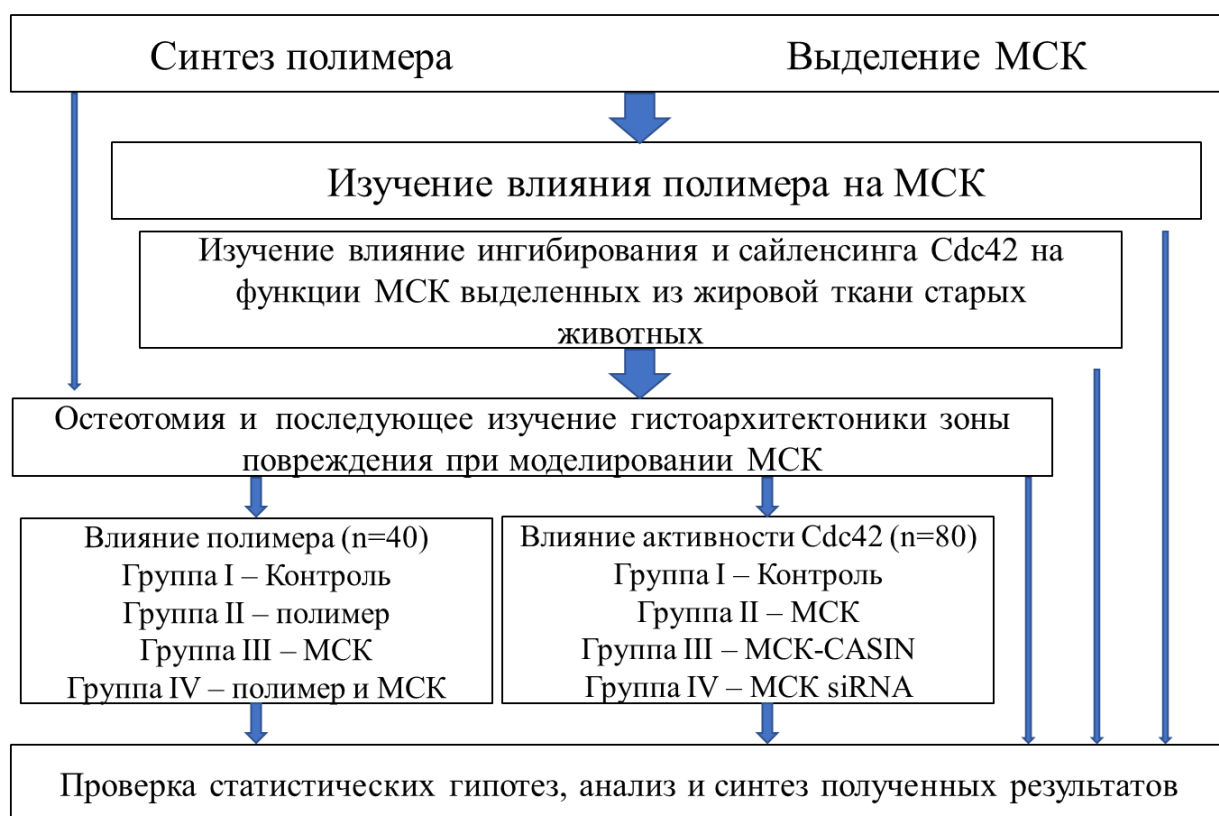


Рисунок 1 – Дизайн исследования

2.16 Модель остеопороза и перелома локтевой кости

Для создания модели остеопороза использовали 40 крыс-самок линии Wistar в возрасте 12 недель, средний вес которых составлял 200-300 г. Крыс содержали в клетках с температурой $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, относительной влажностью $(55 \pm 10)\%$ и 12 ч циклом день/ночь (с 7 : 00 до 19 : 00) с доступом к воде и пища без ограничений.

Модель остеопороза. Модель остеопороза у лабораторных крыс-самок была создана путем проведения стандартной билатеральной овариоэктомии (OVX), в возрасте 2 мес. Для инициации ингаляционной анестезии животные помещались в камеру системы газовой анестезии Harvard Apparatus с использованием 5 % раствора изофлурана при условиях 1,0 л/мин кислорода. После трехкратной обработки операционного поля была выполнена стандартная билатеральная

овариэктомия. Плотность костной ткани была оценена непосредственно перед операцией и через три месяца после проведения овариозектомии с помощью microCT IVIS SpectrumCT (PerkinElmer, USA).

Метод перелома локтевой кости. Экспериментальная модель перелома локтевой кости выполнялась посредством остеотомии локтевой кости.

а) Подготовительный этап:

В день оперативного вмешательства животных не кормили и не поили. С целью предоперационной подготовки область операционного поля заблаговременно была освобождена от шерсти. Согласно, стандартным операционным процедурам проверялась работоспособность и проводилась настройка microCT IVIS SpectrumCT (Caliper, США), биполярного коагулятора и системы газовой анестезии. Выполнялась хирургическая обработка рук по стандарту EN-1500 и раскладка стерильного хирургического инструментария, перевязочного материала и дезинфицирующих средств.

Анестезия была выполнена путем ингаляционной анестезии 5 % раствором изофлурана при условиях 1,0 л/мин кислорода (O_2) с применением системы газовой анестезии (Harvard Apparatus). При использовании препарат демонстрировал некоторое раздражающее действие, ларингеальный и фарингеальный рефлекс притуплялись на короткие сроки. Сердечный выброс и ритм практически не изменялись. После инициации хирургической стадии наркоза для поддержания анестезии была использована газовая смесь на основе кислорода (O_2) и 1,5 % Изофлурана.

б) Основной этап:

Экспериментальная модель перелома локтевой кости была выполнена путем создания модели некритического дефекта кости посредством выполнения стандартизированной остеотомии (2 мм). Никакой внутренней или внешней фиксации требовалось, так как наличие неповрежденной лучевой кости служило внутренней шиной и позволяло выдерживать последующую нагрузку на конечность.

Для инициации ингаляционной анестезии животное (крысу) помещали в камеру наркотизатора с использованием 5 % раствора изофлурана при условиях 1,0 л/мин кислорода (O_2). После погружения животного в хирургическую стадию наркоза для поддержания анестезии использовали газовую смесь на основе кислорода и 1,5 % изофлурана. Производилась укладка крысы на животе. Под левую верхнюю конечность с целью улучшения доступа к трубчатым костям левого предплечья при необходимости подкладывался валик.

В месте будущего кожного разреза наносили маркировочную линию. Далее трехкратно последовательно в широких пределах обрабатывали операционное поле, отдельными стерильными марлевыми тампонами, обильно смоченными одним из антисептиков в течение 3 мин. Для обработки операционного поля с целью достижения оптимального результата использовали водный раствор повидон-йода (10 % раствор «Бетадин»). Обработку операционного поля проводили от зоны предполагаемого разреза кожи к периферии. Просушивали операционное поле стерильной салфеткой и выполняли обкладывание операционного поля стерильным комплектом хирургических салфеток.

По маркировочной линии выполняли линейный разрез кожи и подкожной клетчатки размером от 1,0 до 1,5 см по латеральной поверхности передней конечности крысы в проекции локтевой кости, отступя на 1 см от средней линии локтевого сустава. Разрез выполняли аккуратно без особого давления на скальпель, двигаясь от проксимального отдела к дистальному отделу на границе средней и верхней трети предплечья. В журнале фиксировали время начала и окончания эксперимента. После рассечения подкожного слоя хирургическими ножницами рассекали поверхностную фасцию кожи. Далее тупым путем с использованием зажима типа Halsted-Mosquito-De Bakey методом раздвигания окружающих тканей мышц и острым путем с использованием микрохирургических ножниц методом диссекции под визуальным контролем выполняли хирургический доступ к локтевой кости. Далее острым путем с использованием хирургических ножниц обнажали локтевую кость на протяжении 0,5 см. После выполнялась стандартизированная остеотомия с помощью костно-

режущих щипцов Liston 14,0 см. При выполнении остеотомии кусачки устанавливали строго перпендикулярно телу локтевой кости с целью избегания погрешности линии остеотомии. Рана промывалась 0,9 % раствором NaCl. Производился контроль на инородные тела, гемостаз при необходимости и послойное ушивание послеоперационной раны нитью «Викрил» 6–0 на атравматичной игле. Выполнялась обработка послеоперационной раны 10 % раствором «Бетадина».

После закрытия по раны ингаляцию изофлурана прекращали, а ингаляцию O₂ не останавливали до вывода из наркоза и окончательного пробуждения животного. После операции животным в течение 5 сут вводили пероральные анестетики. В ходе всего эксперимента осуществлялось визуальное наблюдение за состоянием лабораторных животных (крыс) в ранний и отдалённый послеоперационные периоды. Оценивались следующие параметры: общее состояние, поведение, аппетит, опороспособность оперированной конечности, а также состояние кожных покровов и мягких тканей в области оперативного вмешательства. Все данные фиксировались в журнале наблюдений.

2.17 Анализ костной плотности с помощью имиджера microCT IVIS SpectrumCT (Caliper, США)

Аппарат microCT IVIS SpectrumCT (Caliper, США) использовали в рентгеновском режиме с размером вокселя 150 мкм, фитингом 440 Al, 50 кВ, разрешением 425, полем обзора Д × Ш × В 12 × 12 × 13 см. Приблизительная доза составила 52 мГв на сканирование. Трёхмерная реконструкция и оценка плотности кости были выполнены с использованием программы Living Image 4.3.1 (Caliper). Полученное изображение экспортировали в формате DICOM и хранили на жестком диске. Плотность кости определялась как оптическая плотность в объеме кости. Область интереса (ROI) измеряли 10-миллиметровым цилиндрическим объемом. Разницу в плотности костной ткани рассчитывали как отношение конечной плотности (4 нед.) к исходной (на момент перелома), равное

единице, у каждой крысы в отдельности. Затем рассчитывали среднее значение для каждой группы. При соотношении 1 – плотность кости не изменилась; если значение ≤ 1 , то плотность кости уменьшилась; если значение ≥ 1 , то плотность костной ткани увеличилась, активизировались регенеративные процессы. У контрольных животных, не получавших лечения, отмечена отрицательная динамика регенерации костной ткани (снижение минеральной плотности костной ткани на 13 %).

2.18 Гистологический анализ

После завершения эксперимента лабораторные животные подвергались умерщвлению методом цервикальной дислокации под анестезией с использованием изофлурана. Локтевая кость аккуратно отделялась от окружающих тканей для проведения макроскопической оценки полученного материала. Для последующего микроскопического анализа процессов регенерации в области сращения перелома образцы поврежденной локтевой кости фиксировались в 10 % нейтральном формалиновом растворе с pH 7,2–7,4. Далее фрагменты костной ткани подвергались предварительной декальцинации, после чего проводилась гистологическая обработка по стандартной методике с последующей заливкой в парафин. Из полученных парафиновых блоков на микротоме HM 450 (Thermo FS) изготавливались серийные срезы (по 5 с блока) толщиной 7–10 мкм, которые затем окрашивались гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона. Препараты изучались с использованием светового микроскопа «Leica DM 1000» (объективы: $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ и $\times 100$) на цифровых микрофотографиях высокого разрешения (tiff, 2592×1944 пикселя; камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, размер пикселя $1,4 \times 1,4$ мкм), с анализом 5 полей зрения со среза. Проводилось качественное описание структур и их морфометрическая количественная оценка.

2.19 Трансфекция мезенхимальных стволовых клеток с репортерным вектором гена люциферазы LVT-Luc2

Использовались лентивирусные частицы люциферазы светлячков (LVT-Luc2) (Eurogen). Клетки высевали с конечной плотностью 2×10^5 на лунку в 6-луночной планшете. В каждую лунку добавляли по 200 микролитров лентивирусных частиц ($0,5 \times 10^6$ единиц трансдукции на мл). Для усиления трансфекции использовали сульфат протамина (Sigma Aldrich, Сент-Луис, шт. Миссури, США). Сульфат протамина растворяли в воде MilliQ и добавляли в каждую лунку для получения конечной концентрации 100 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 24 ч при 37 °C, 5 % CO₂. Через 24 ч среду меняли для завершения DMEM (15 % FBS, 1 % Pen/Strep). Спустя семьдесят два часа клетки оценивали на эффективность трансфекции с помощью microCT IVIS SpectrumCT (In Vivo Imaging Spectrum, Caliper, США). Для биоломинесцентного анализа *in vitro* использовали D-люциферин Firefly (Caliper, США). Исходный раствор готовили в концентрации 30 мг/мл в стерильной воде путем осторожного переворачивания, аликвотировали и хранили при температуре – 20 °C. Рабочий раствор готовили в предварительно нагретой полной среде с конечной концентрацией 150 мкг/мл (1:200). Перед визуализацией старую среду аспирировали из лунок, и в каждую лунку добавляли рабочий раствор люциферина. Визуализацию проводили в режиме биоломинесценции с помощью IVIS.

2.20 Статистический анализ

Статистический анализ проводили по стандартным рекомендациям [Боровиков В., 2003; Festing M.F.W., Altman D.G., 2002]. Характер распределения вариационных рядов рассматриваемых переменных в нашем исследовании не соответствовал нормальному (Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilk tests), небольшие вариационные ряды, также отмечена неоднородность дисперсий

(Levene's test). Проверку статистических гипотез проводили непараметрическими критериями, не требующими соблюдения строгих ограничений. При сравнении сроков (один и шесть месяцев) использовали Mann – Whitney U Test для независимых выборок. Множественное сравнение четырех групп – ANOVA Kruskal – Wallis test. Компьютерную статистическую обработку полученных исходных данных выполняли с использованием программного обеспечения из пакета StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA, version 8.0. Количественные данные представляли в виде медианы (Me – 50-й percentile, Q_2), интерквартильного диапазона (Q_1 – Q_3 – 25–75-й перцентили). Относительные показатели (%) рассчитывались на основе абсолютных значений. Уровень значимости для отклонения нулевой гипотезы с учетом четырех групп сравнения принимали с поправкой – $p < 0,013$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оценка влияния синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и его способность ингибировать активность остеокластов *in vitro*

Свежеизолированная стромальная фракция жировой ткани крыс была представлена гетерогенной клеточной популяцией и позитивно окрашивалась на маркеры гематопозитических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) (Рисунок 2).

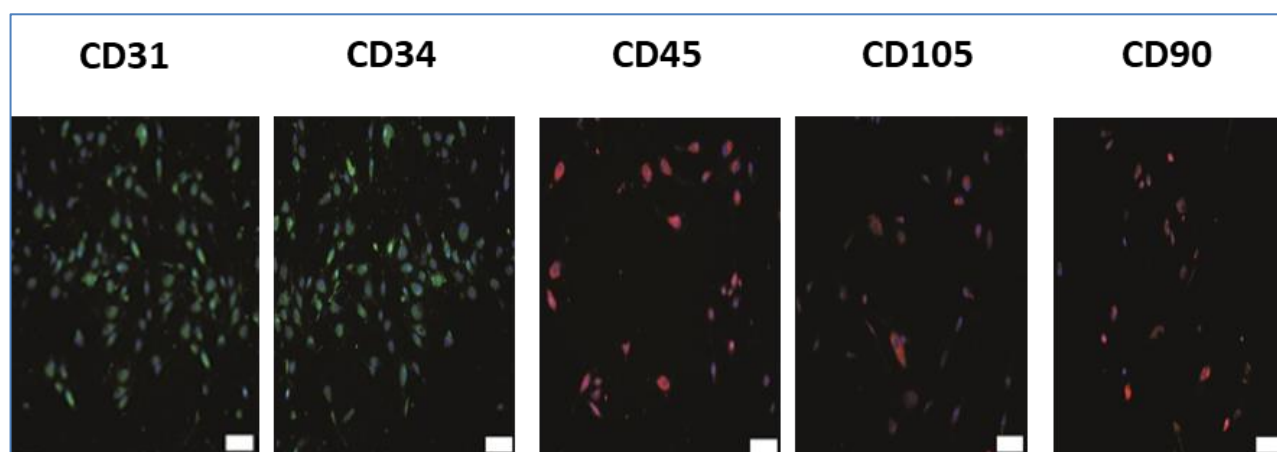


Рисунок 2 – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры: CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ядра клеток окрашены DAPI.

Ув. 100. Шкала 50 мкм.

По прошествии 21 сут культивирования клетки, экспрессирующие на своей поверхности маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки были культивированы до 4–5 пассажей. Была

получена популяция ADMSCs с конфлюэнтностью 80–90 %. Клетки имели фибробласт-подобную морфологию и адгезировались к пластику (Рисунок 3).

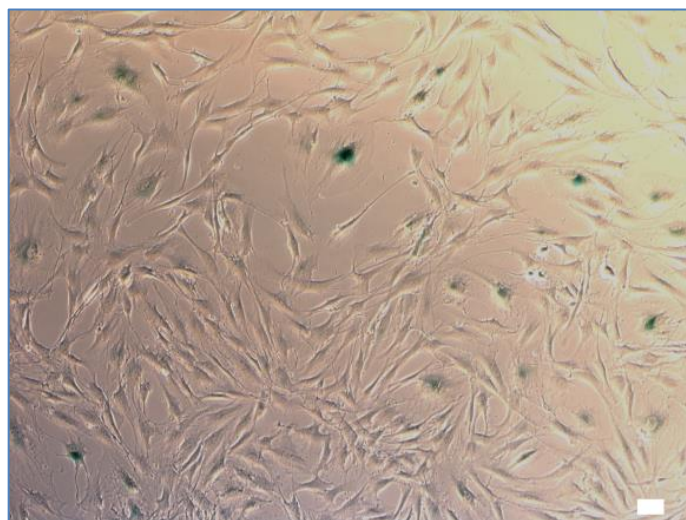


Рисунок 3 – Культура CD105-положительных ADMSCs. Ув. 100. Шкала 100 мкм.

Для дальнейшего подтверждения их мезенхимальной природы было проведено окрашивание на поверхностные маркеры, специфичные именно для МСК, такие как CD105 и CD90. Данные на Рисунке 4 подтверждают наличие маркеров CD105 и CD90 и отсутствие CD31, CD34, CD45, что является характерным для мезенхимальной популяции. Также был проведен количественный анализ полученной популяции, и согласно результатам, представленным на Рисунке 5, выделенные клетки практически гомогенны по своей природе, так как процент клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45) и эндотелиальных клеток (CD31) меньше 3 %.

На Рисунке 6 представлены данные по интенсивности АТФ-индуцированной люминесценции клеток, инкубированных с 1 мг/мл полимера на протяжении 0–72 ч. Согласно полученным данным достоверной разницы между степенью пролиферации контрольных ADMSCs и клеток, обработанных полимером, не наблюдалось. Согласно полученным данным полимер не имеет

выраженного долгосрочного (72 ч) токсического эффекта на культуры ADMSCs *in vitro*.

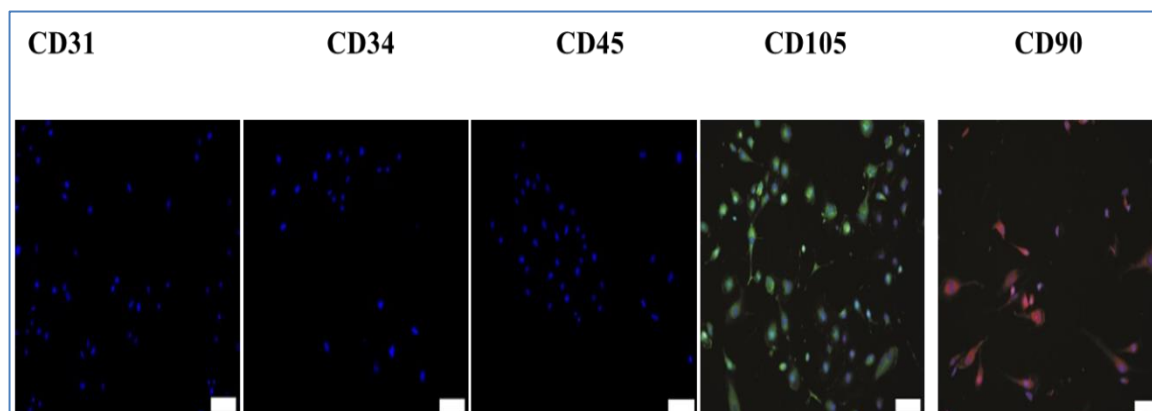


Рисунок 4 – Результаты окрашивания отсортированных клеток на отрицательные поверхностные маркеры CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ядра клеток окрашены DAPI. Ув. 100. Шкала 50 мкм.

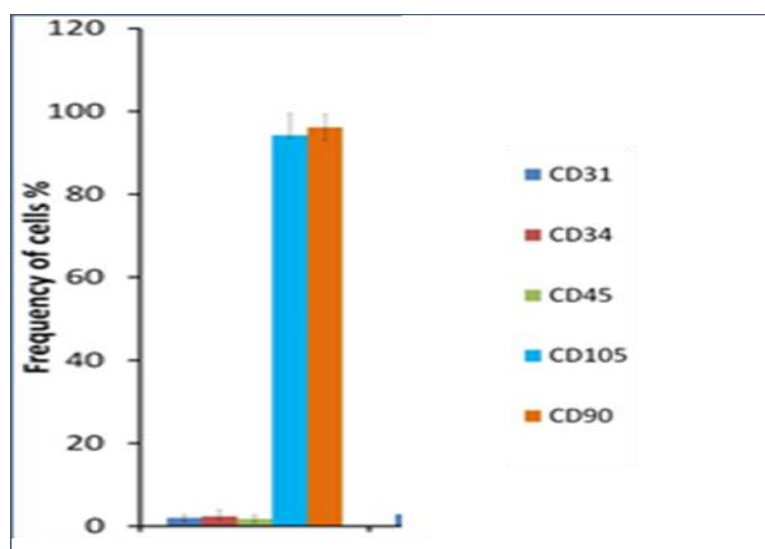
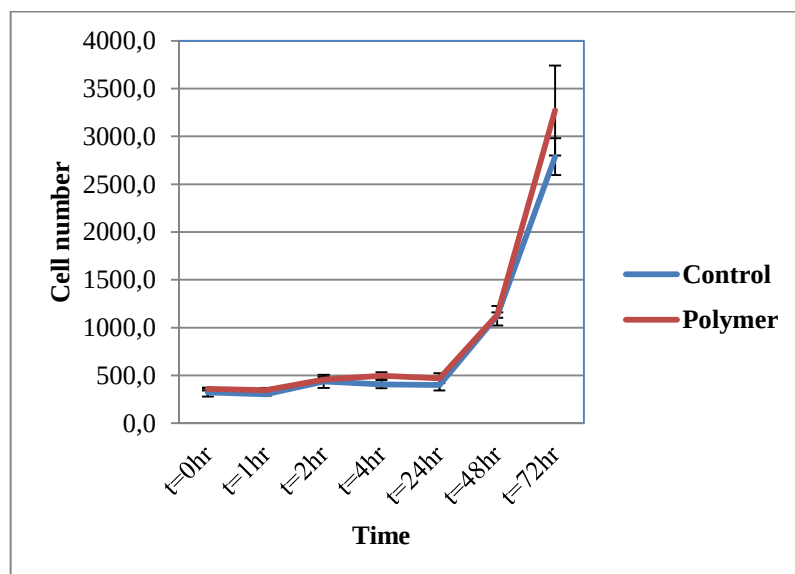


Рисунок 5 – Количественный анализ отсортированных клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) ($p \leq 0,001$, one-way ANOVA)

Оценка цитотоксичности остеофильного полимера проводилась при помощи теста Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA).

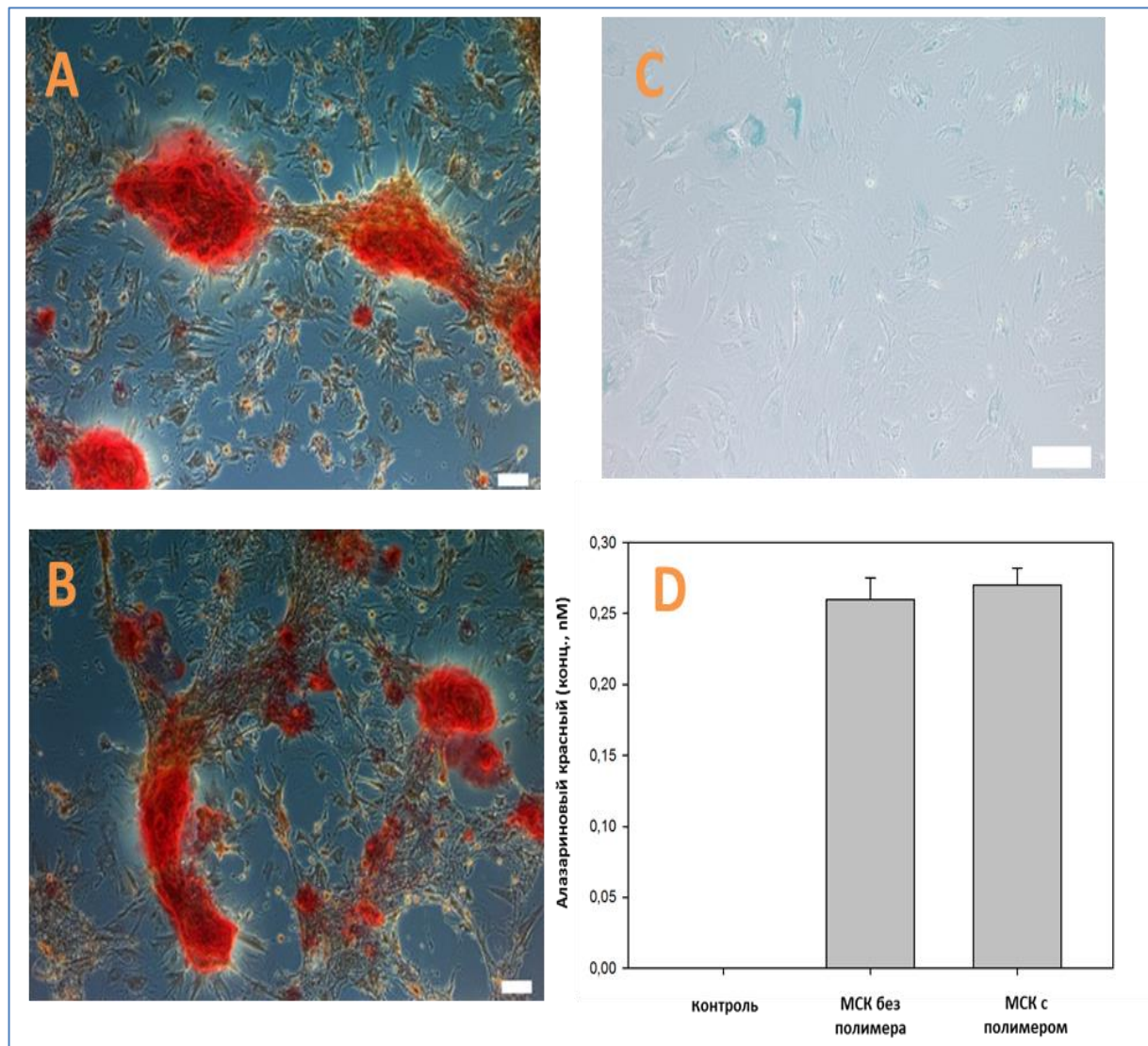


Примечание: one-way ANOVA, $p = 0,383$.

Рисунок 6 – Оценка токсичности полимера на пролиферацию ADMSCs *in vitro*

Микроскопический визуальный анализ препаратов, окрашенных алазариновым красным, выявил наличие участков с высокой концентрацией кальция, окрашенные в ярко красный цвет, что свидетельствовало о процессах остеогенной дифференциации (Рисунки 7А, 7В). Окрашивание клеток алазариновым красным показало, что культивирование мезенхимальных стволовых клеток в остеогенной среде на протяжении 14 сут приводит к индукции их остеогенной дифференциации (Рисунок 7А). В то же самое время, инкубирование клеток с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 мин в водяной бане 37 °С в 1 мл PBS при pH 8,0 не оказывало влияния на интенсивность окрашивания алазариновым красным (Рисунок 7В), из чего можно сделать вывод о том, что полимер не влияет на процессы остеогенной дифференцировки МСК и данные клетки могут быть использованы для дальнейших экспериментов на лабораторных животных. В качестве контроля, на микрофотографиях МСК, культивировавшихся в простой питательной среде

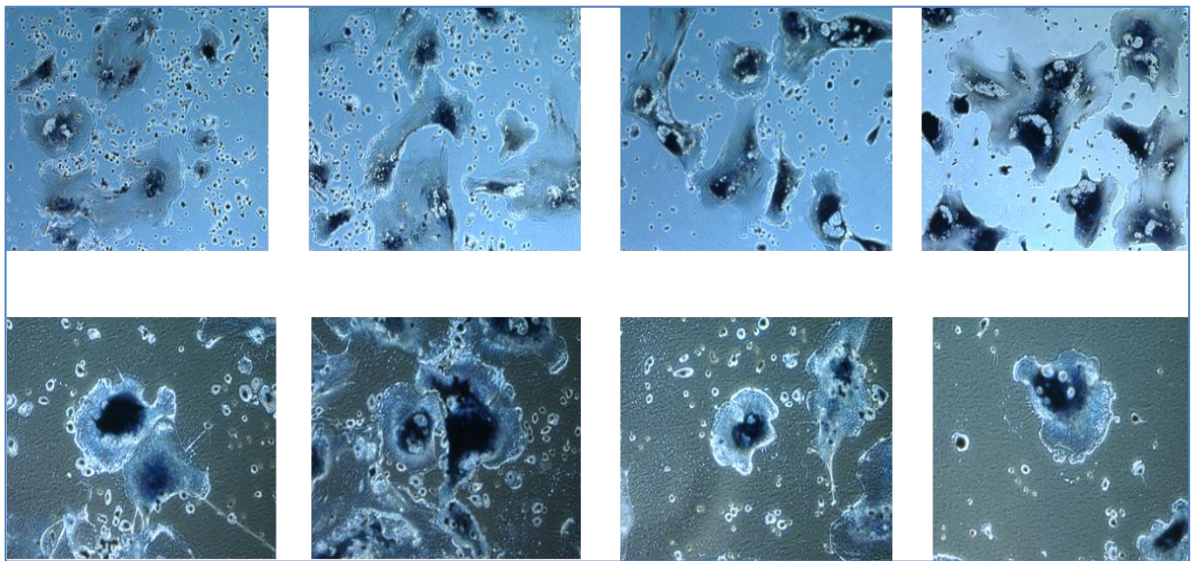
DMEM и не подвергавшихся остеогенной дифференцировке, не наблюдалось очагов красного окрашивания (Рисунок 7C). Результаты визуальных наблюдений были подтверждены количественным гистохимическим анализом (Рисунок 7D).



Примечание: культура ADMSCs (A) и культура ADMSCs, модифицированных остеофильным полимером (B), были дифференцированы с помощью остеогенной среды (OsteoMedia, Gibco) и окрашены Алзариновым Красным. Контрольные ADMSCs (C) без дифференцировочной среды не окрашивались Алзариновым Красным. Клеточные лизаты были проанализированы с помощью планшетного ридера Synergy Hybrid Reader с длиной волны 405 нм (D). Mann – Whitney U Test, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем, нет разницы между группами.

Рисунок 7 – Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации ADMSCs

Остеокластная природа выделенных клеток была подтверждена с помощью окраски на активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы, высокая активность которой присуща макрофагам и остеокластам. Остеокласты по своей природе происходят от гемопоэтической линии, что и обуславливает их схожесть с макрофагами. Еще одной характерной особенностью остеокластов является наличие большого количества ядер от 10–40 до 100. На Рисунке 8 представлены фотографии полученной культуры остеокластов: клетки имеют большое количество ядер (окраска гематоксилином по Джилс (Gill's Hematoxylin), форма клеток неправильная овальная или полигональная, иногда имеет отростки, которые постепенно сливаются с общим фоном. В силу функциональных особенностей остеокластов (деградация костной ткани) клетки могут содержать лизосомальные пузырьки.

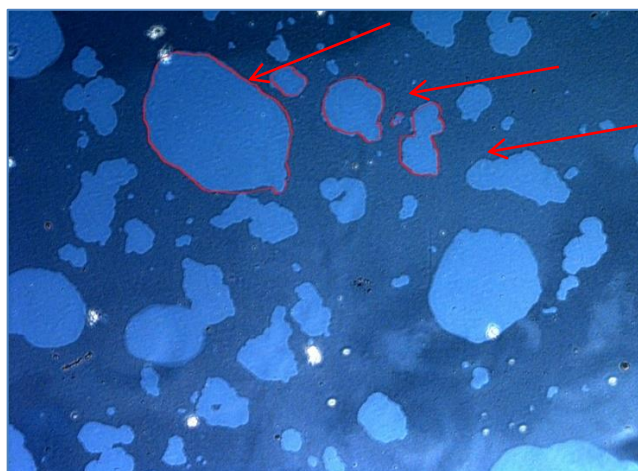


Примечание: верхний ряд – Ув. 100, нижний ряд – Ув. 200.

Рисунок 8 – Фазово-контрастные снимки остеокластов, окрашенных на активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP)

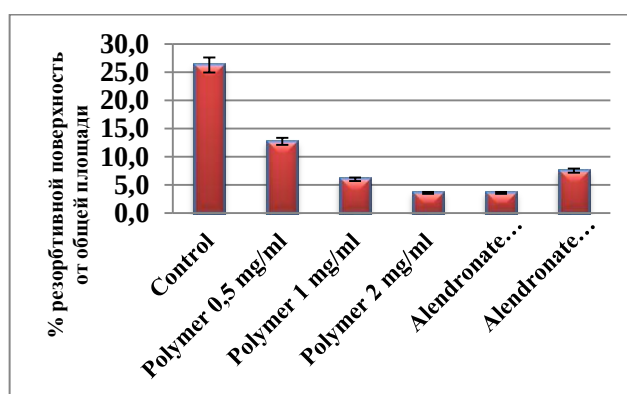
Для оценки влияния полимера на активность остеокластов проводили оценку Pit Assay. На Рисунке 9 показаны микрофотографии, на которых более светлые участки (указаны стрелками) являются участками резорбированного

остеокластами вещества, имитирующего костную ткань (OsteoPlates, Corning). Поверхность светлых участков измеряли с помощью программного обеспечения Fiji и рассчитывали процент от общей площади микрофотографии. На Рисунке 10 показаны данные количественного анализа площади резорбции. В качестве референтного вещества брали коммерческий препарат, содержащий алендронат.



Примечание: красными стрелками указаны места резорбции коллагенового покрытия, имитирующего костную ткань. Ув. 100.

Рисунок 9 – Окрашивание Pit Assay по методу Ван Косса



Примечание: $p \leq 0,001$, one-way ANOVA.

Рисунок 10 – Количественный анализ резорбтивной поверхности от общей площади

Из представленных данных видно, что в контрольной группе процент площади резорбции составил 26 %. Полимер в концентрации 0,5 мг/мл уменьшает резорбтивную активность остеокластов на 50 %, а в концентрации 2 мг/мл почти на 85 % и имеет схожий эффект с алендронатом в концентрации 4 мг/мл. Таким образом, результаты проведенного количественного анализа соответствуют ожидаемым и показывают, что концентрация полимера обратно пропорциональна площади резорбированной поверхности. Можно заключить, что полимер не обладает цитотоксическим действием на клетки и вызывает дозозависимое ингибирование активности остеокластов.

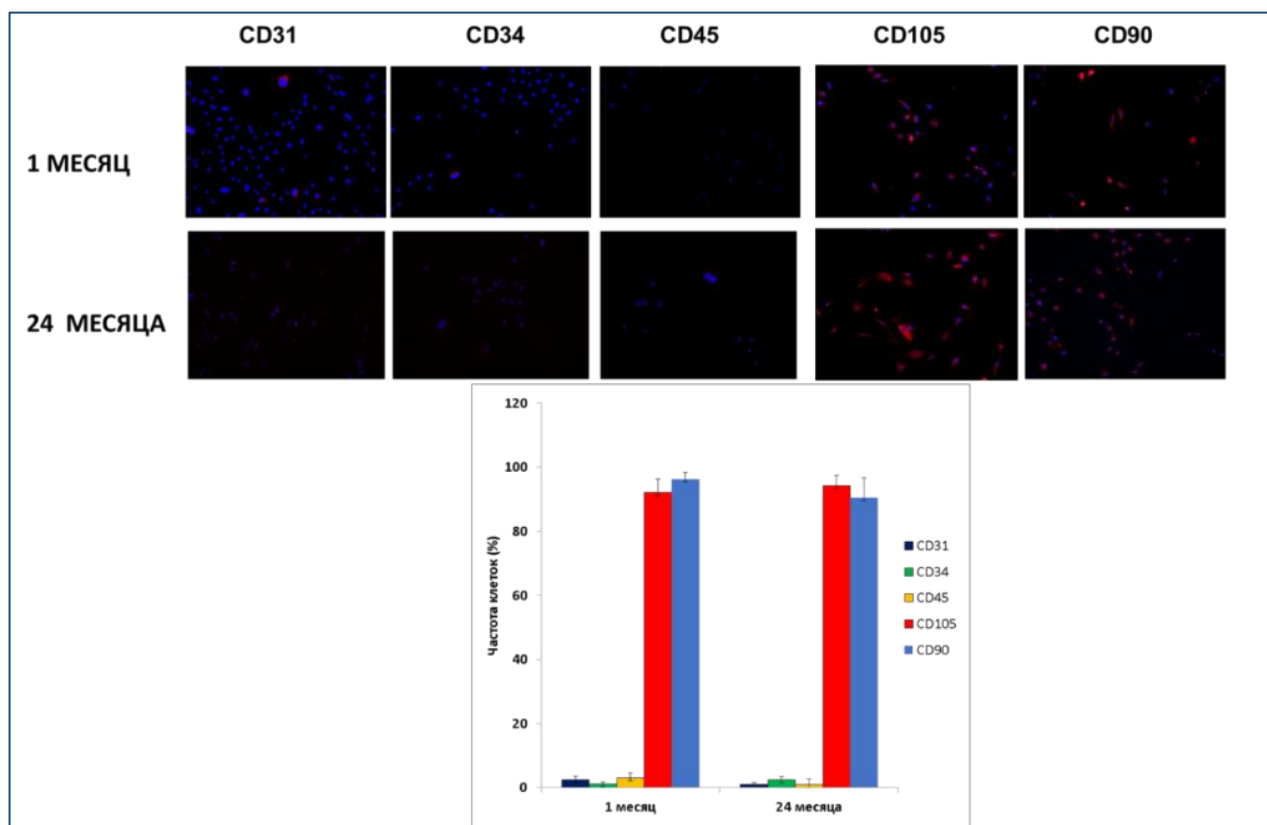
Заключение

В рамках настоящего исследования были успешно выделены мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани крыс (ADMSC), проведена их фенотипическая характеристика и иммуномагнитная сортировка по экспрессии CD105. Полученные ADMSC продемонстрировали типичный мезенхимальный фенотип и способность к остеогенной дифференцировке. Проведённая оценка биосовместимости остеофильного бисфосфонатного полимера показала его отсутствие цитотоксического эффекта, а также отсутствие негативного влияния на пролиферативную активность и остеогенный потенциал ADMSC *in vitro*. В то же время, данный полимер обладал выраженной способностью ингибировать резорбтивную активность остеокластов, причём этот эффект проявлялся в выраженной дозозависимой манере и превышал по эффективности действие референтного бисфосфоната – алендроната.

3.2 Оценка влияния ингибирования Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках на остеогенный, миграционный, антиостеокластный потенциал мезенхимальных стволовых клеток *in vitro*

В результате проведенного ферментативного выделения с последующим иммуномагнитным сортированием из жировой ткани крыс различного возраста были

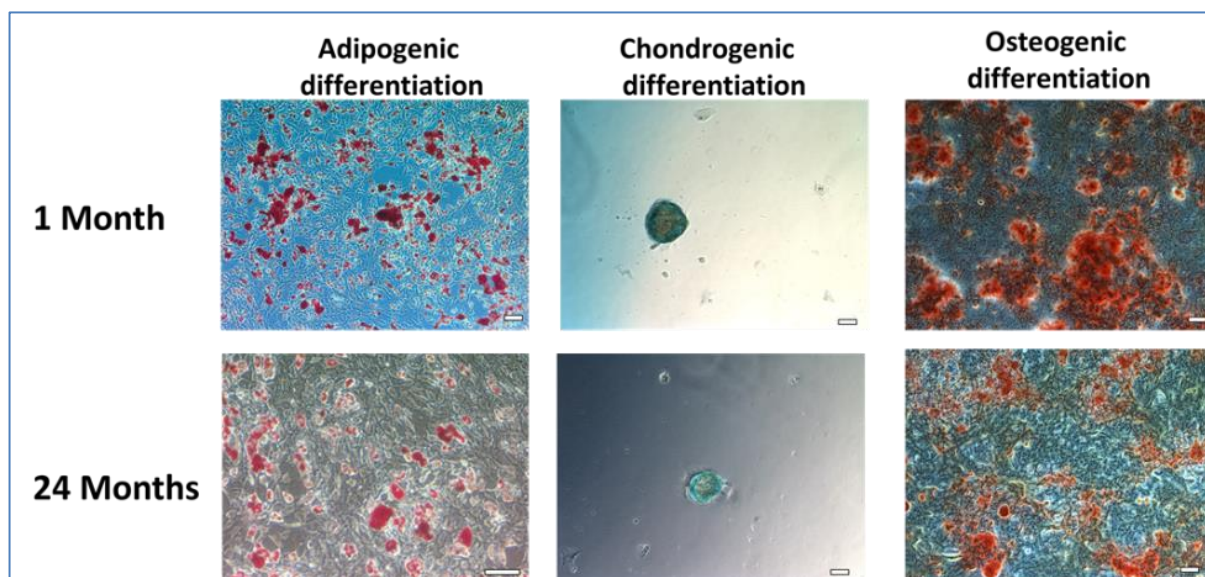
изолированы клетки морфологически схожие с фибробластами и способные расти в культуре, прикрепившись к пластику. Иммунофенотипирование показало, что CD105 позитивно отсортированные клетки после культивирования в течение 4–5 пассажей представляли собой достаточно однородную популяцию, в которой около 90 % клеток были положительными по мезенхимальным маркерам CD90 и CD105 и только малая часть клеток экспрессировала гемопоэтические маркеры CD34, CD45 и CD31 (Рисунок 11).



Примечание: Ядра клеток окрашены DAPI. Количественный анализ отсортированных клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90). One-way ANOVA, $p \leq 0,001$.

Рисунок 11 – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры через 1 и 24 месяца: CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ув. 100.

После воздействия адипогенной дифференцировочной среды, клетки накапливали липиды в виде гранул, которые окрашивались краситель Oil Red O в ярко-красный цвет. Это свидетельствует о адипогенной дифференциации МСК (Рисунок 12). После проведения хондрогенной дифференциации клетки образовывали шароподобные образования, которые окрашивались красителем альциановый синий, что свидетельствует о наличии протеогликанов и дифференцировке клеток в хондроциты. После остеогенной дифференцировки клетки накапливали кальций, который был визуализирован с помощью красителя Alizarin red (Рисунок 12). Это свидетельствует о дифференцировке в остеобласты.



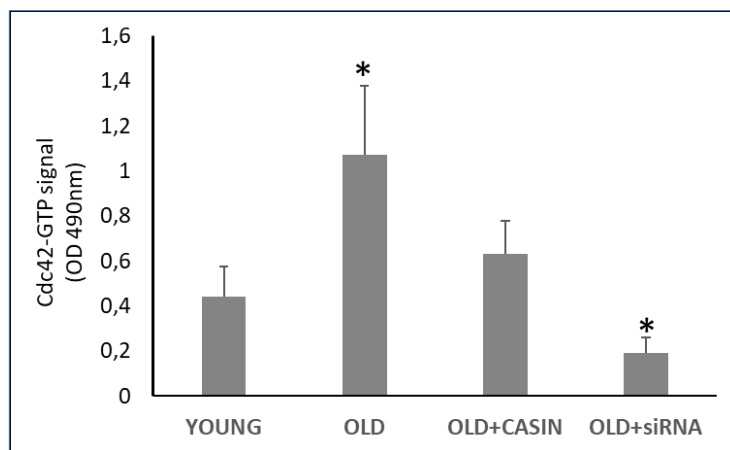
Примечание: при адипогенной дифференцировке липиды в виде гранул окрашивались красителем Oil Red O в ярко-красный цвет; при хондрогенной дифференцировке клетки окрашивались красителем альциановым синим в бирюзовый цвет и при остеогенной дифференцировки клетки визуализировались с помощью красителя Alizarin red в бордовый цвет.

Рисунок 12 – Адипогенная, хондрогенная и остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток через 1 и 24 месяца

Была проведена оценка фармакологического ингибирования и сайленсинга Cdc42 на маркеры пролиферации и старения МСК. Для проведения

фармакологического ингибирования клетки обрабатывали ингибитором Cdc42 (CASIN (Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мкМ в течение 16 ч. После воздействия активность Cdc42 оценивали с помощью метода G-LISA.

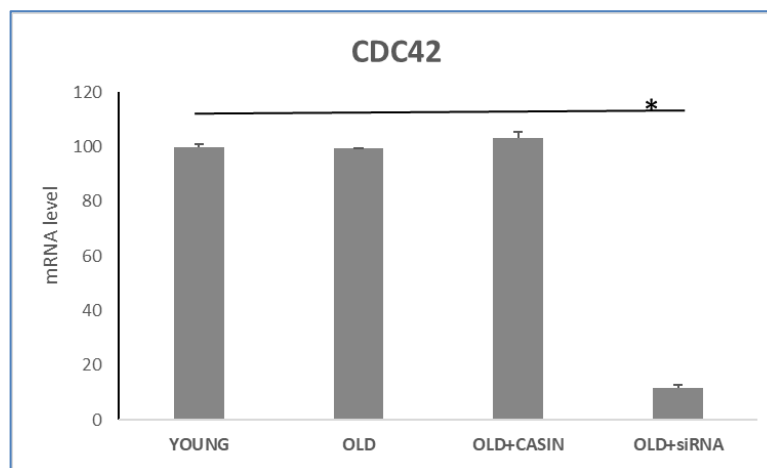
Для проведения сайленсинга использовали Stealth Cdc42 siRNAs: RSS329927 (ThermoFisherScientific). Трансфекция производилась в течение 48 ч, для проведения трансфекции использовался Lipofectamine® 2000. Эффективность трансфекции подтверждалась с помощью ОТ-ПЦР на Cdc42. Было показано, что CASIN подавлял активность Cdc42 в клетках в 2 раза по сравнению с необработанным контролем, сайленсинг приводил к падению активности в 5 раз (Рисунок 13).



Примечание: уровень Cdc42-GTP анализировали с помощью анализов G-LISA. Непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,05$ по сравнению с молодыми клетками YOUNG.

Рисунок 13 – Фармакологическое ингибирование CASIN и подавление siRNA снижает активность Cdc42 в старых МСК

В свою очередь сайленсинг снижал экспрессию белка Cdc42 до 10 %, но воздействие CASIN не приводило к изменениям в экспрессии белка Cdc42 (Рисунок 14).

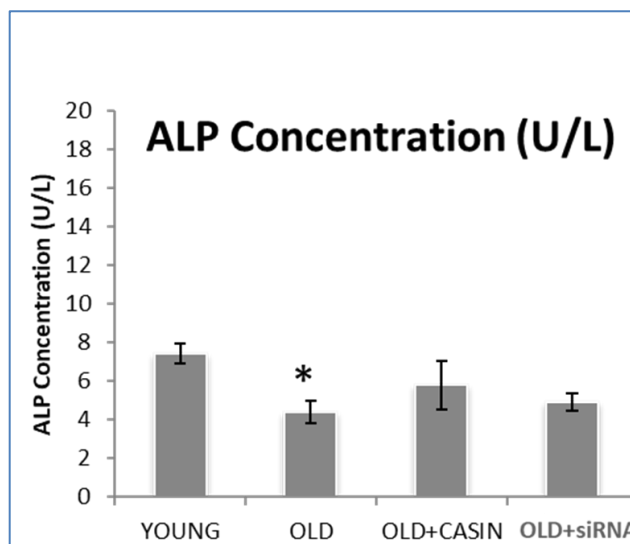


Примечание: уровень siRNA Cdc42 в МСК был рассчитан с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,001$ по сравнению с молодыми клетками YOUNG.

Рисунок 14 – Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени, демонстрирующие эффективность подавления генов последовательностями siRNA, нацеленными на Cdc42 в ADMSCs

Активность щелочной фосфатазы является маркером раннего остеогенеза и количественный анализ показал, что экспрессия данного фермента снижена в старых клетках по сравнению с молодыми клетками (Рисунок 15). Старые клетки, обработанные CASIN, достоверно не изменили экспрессию щелочной фосфатазы по сравнению со старыми клетками. Тогда как клетки, которые были подвергнуты Cdc42 сайленсингу с использованием stealth siRNA продемонстрировали уровень экспрессии сходный с молодыми клетками. Таким образом, было показано, что фармакологическое ингибирование и сайленсинг Cdc42 ускоряет остеогенную дифференцировку.

Было изучено влияние фармакологического ингибирования и сайленсинга Cdc42 на остеогенную дифференцировку МСК *in vitro*.

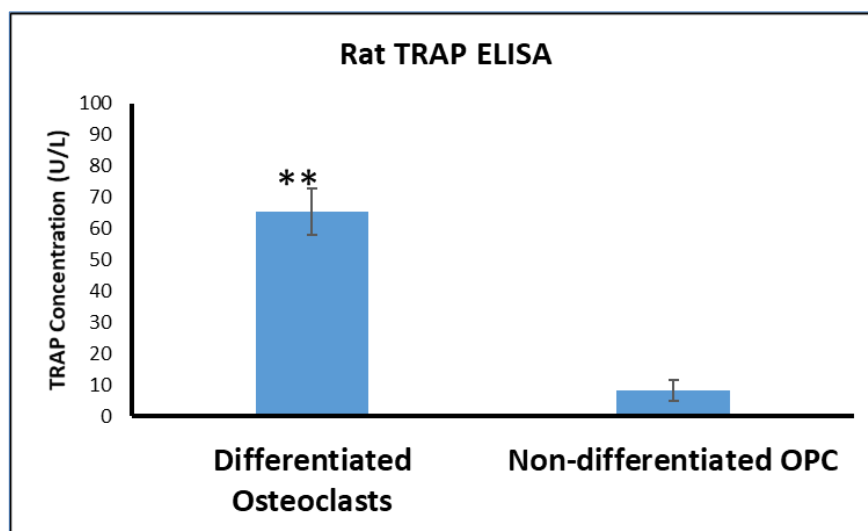


Примечание: непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,005$ по сравнению с молодыми клетками YOUNG.

Рисунок 15 – Иммуноферментный анализ супернатантов МСК на содержание щелочной фосфатазы через 14 сут остеогенной дифференцировки

Было изучено влияние фармакологического ингибирования и сайленсинга Cdc42 на антиостеокластическую активность старых МСК *in vitro*.

На первом этапе мы оценили остеокластический характер клеток (Рисунок 16). Иммуноферментный анализ показал, что клетки, выделенные из костного мозга, экспрессируют маркер остеокластов тартрат-устойчивую кислую фосфатазу (TRAP) (Рисунок 16).



Примечание: Mann – Whitney U Test, ** – $p < 0,01$ по сравнению с недифференцированными OPC.

Рисунок 16 – Иммуноферментный анализ на тартрат-устойчивую кислоту фосфатазу – TRAP

Для оценки влияния мезенхимальных стволовых клеток на функциональную активность остеокластов МСК культивировали в течение 72 часов, после чего собирали среду, содержащую секретируемые ими биологически активные молекулы, включая цитокины, хемокины и экзосомы. Эта кондиционированная среда затем применялась для обработки клеток-предшественников остеокластов, которые высаживались на специализированные планшеты с покрытием Corning Osteo Assay Surface. Эта поверхность имитирует минеральную матрицу кости и позволяет проводить количественную оценку резорбтивной активности остеокластов. Данный экспериментальный подход позволяет воспроизвести паракринные взаимодействия между МСК и остеокластами *in vitro* и исследовать влияние факторов, секретируемых МСК, на остеокластогенез и костную резорбцию (Рисунок 17).

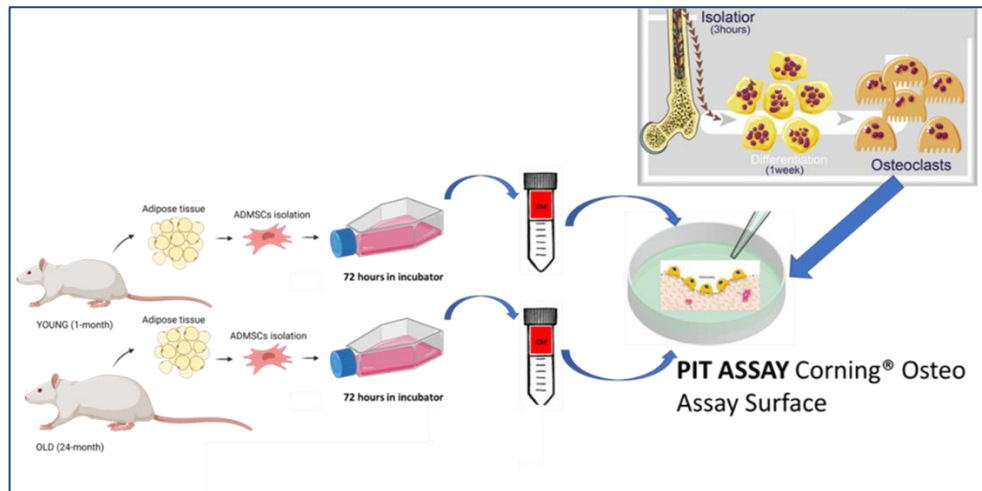
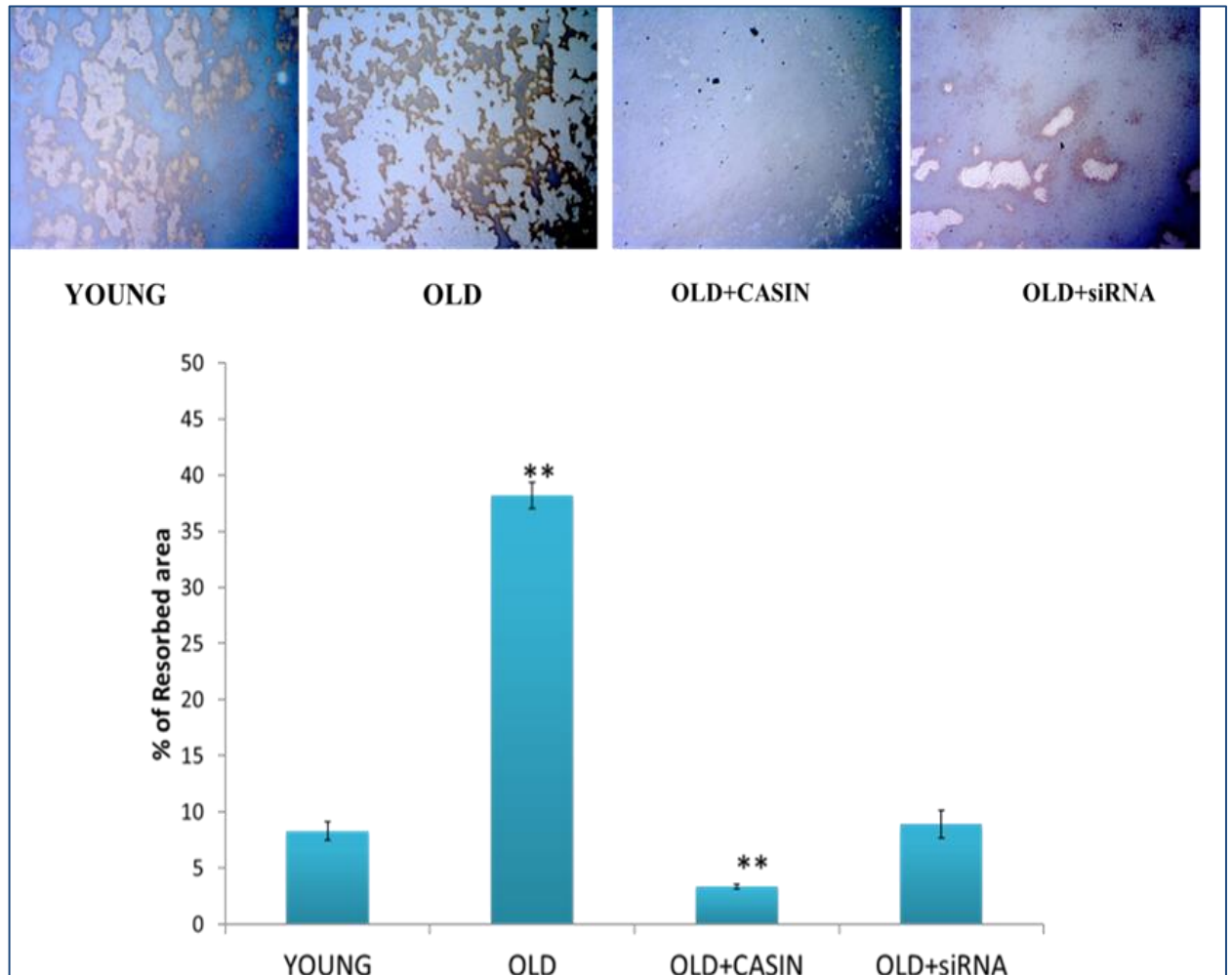


Рисунок 17 – Схема оценки антиостеокластической активности МСК



Примечание: непарный анализ Т-критерия, ** – $p < 0,01$ по сравнению с молодыми клетками YOUNG.

Рисунок 18 – Pit анализ влияния ингибитора Cdc42 малой молекулой CASIN и сайленсинга на резорбцию в поверхностных пластинах Corning Osteo Assay

Полученные результаты демонстрируют выраженный антиостеокластный эффект у кондиционированной среды, что проявляется в значительном снижении резорбирующей активности остеокластов. Данные микроскопического анализа (верхние изображения) указывают на уменьшение зон резорбции костного матрикса при обработке остеокластов средой от ингибированных Cdc42 МСК, что коррелируется с результатами количественного анализа (Рисунок 18). Наблюдается достоверное уменьшение площади костной резорбции по сравнению с контролем, что подтверждает способность ингибирования Cdc42 усиливать антиостеокластную активность МСК. Это может быть связано с изменением секреции МСК ключевых факторов и снижением секреции провоспалительных цитокинов, стимулирующих остеокластогенез [Abe T. et al., 2019]. Таким образом, фармакологическое или генетическое ингибирование Cdc42 в МСК представляет перспективную стратегию для подавления остеокластной активности и предотвращения костной резорбции, особенно в контексте возрастных изменений костного ремоделирования и остеопороза.

Были проведены эксперименты по влиянию фармакологического ингибирования на миграцию старых клеток ADMSCs *in vitro* с помощью 2 методов (Скрэтч анализ и Transwell).

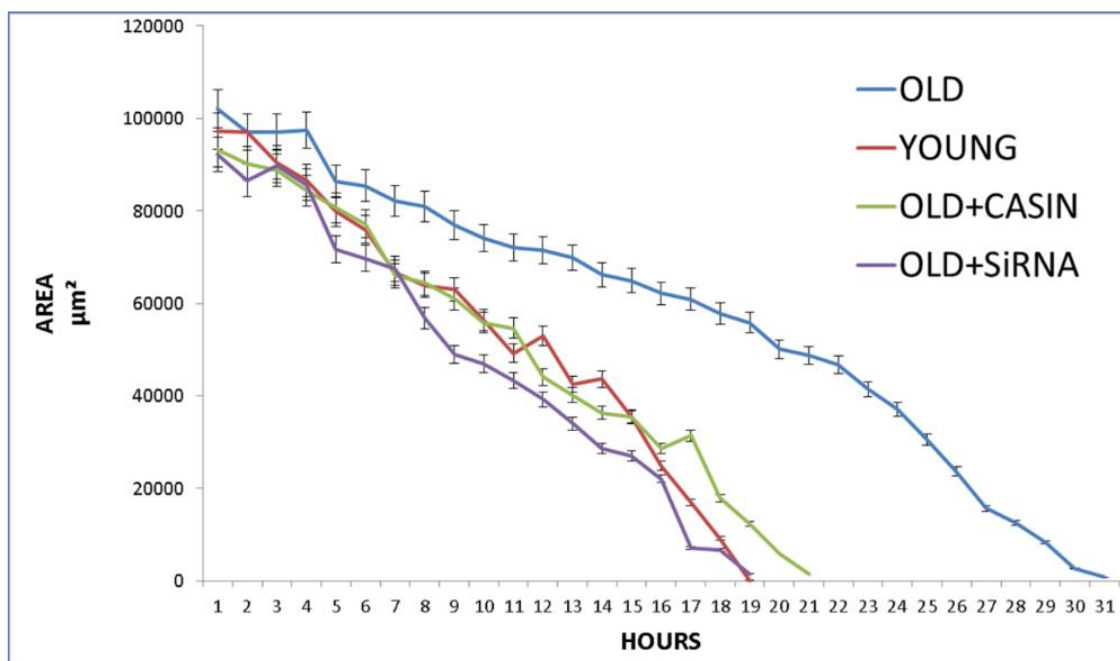
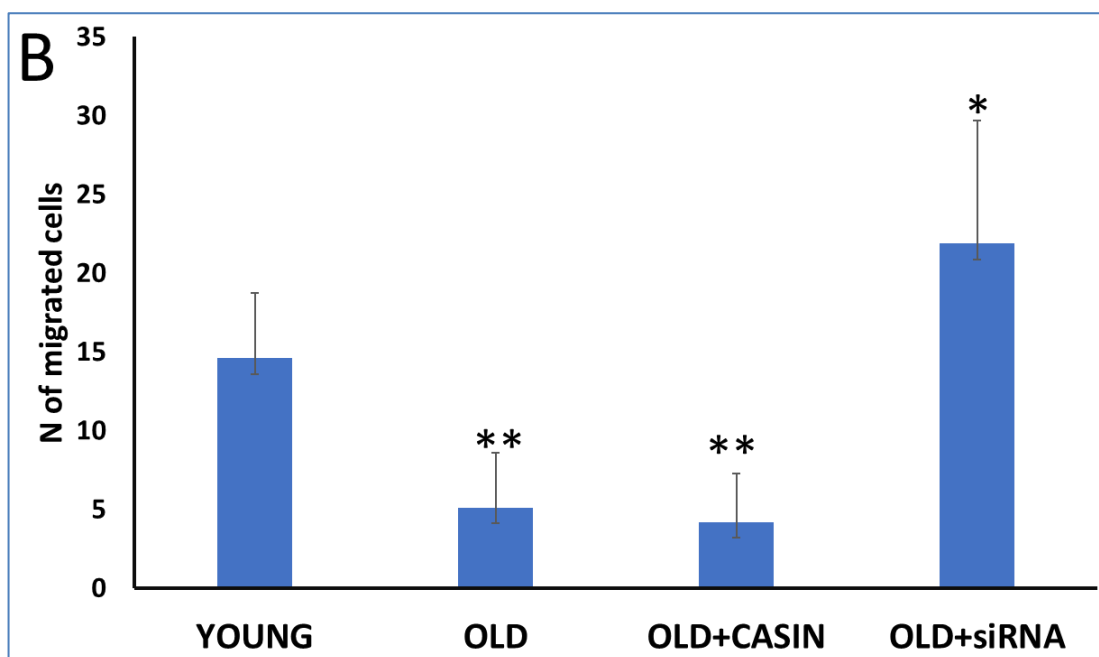


Рисунок 19 – Скретч-анализ миграции ADMSCs. Площадь закрытия царапины, μm^2

Скретч-анализ миграции ADMSCs (Рисунок 19) выявил, что молодые клетки обладают большим миграционным потенциалом и быстрее мигрируют, чем старые клетки. В свою очередь анализ заживления ран в условиях клеточной культуры показал, что старые ADMSCs, подвергшиеся воздействию CASIN и сайленсинга, мигрировали быстрее и разница преодоления разрыва у них и необработанного контроля была около 10 ч. Следует отметить, что ингибирование Cdc42 приводит к повышению миграционного потенциала старых клеток до уровня характерного для молодых клеток.



Примечание: непарный анализ Т-критерия, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с молодыми клетками YOUNG.

Рисунок 20 – Влияние ингибирования Cdc42 на миграцию МСК. Миграция ADMSCs, индуцированная BMP-2, была обнаружена с помощью анализа Transwell. Мигрировавшие клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Количественная оценка миграции после 24 ч обработки в указанных условиях

Анализ Transwell (Рисунок 20) использовали для сравнения различий в хемотаксической способности (миграционный ответ) по направлению к хемоаттрактанту – морфогенетическому белку 2 кости (BMP-2). BMP-2 представляет собой фактор роста из суперсемейства трансформирующих факторов роста-бета (TGFbeta), который действует как сигнальная молекула, вызывая остеогенную дифференцировку и миграцию МСК и общее костеобразование. Как показано на Рисунке 20, клетки всех четырех групп мигрировали в направлении BMP-2. Количественный анализ показал, что направленная миграция была выше у молодых клеток, тогда как в группе старых клеток и клеток, обработанных CASIN, способность к миграции была снижена. При этом, сайленсинг Cdc42 усиливал у старых клеток миграцию, которая превышала ее даже у молодых клеток. Таким образом, полученные результаты

свидетельствуют, что фармакологическое ингибирование и сайленсинга Cdc42 усиливает миграцию стволовых клеток, но направленную к хемоаттрактанту миграцию усиливал только сайленсинг.

Заключение

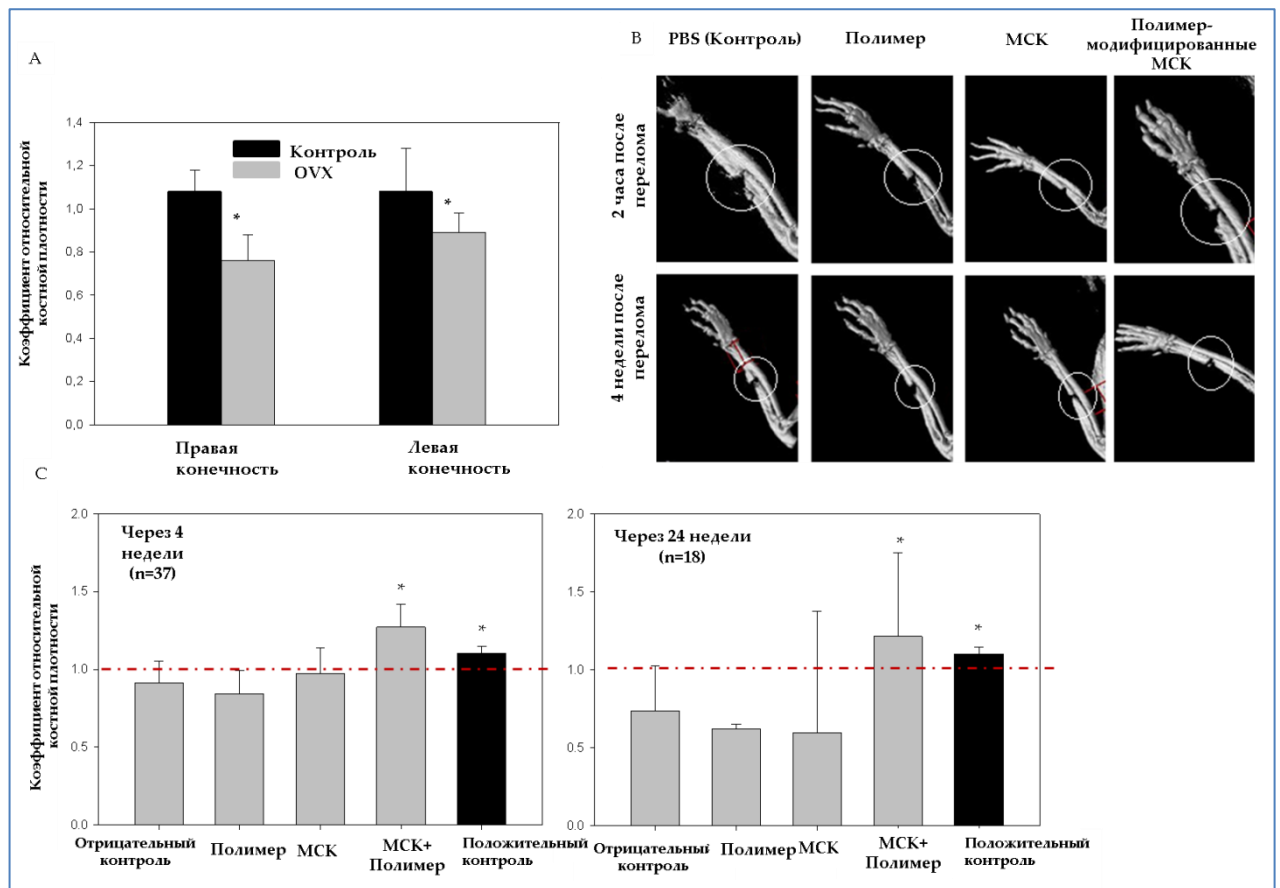
В настоящем исследовании изучена роль Cdc42 в регуляции остеогенного, миграционного и антиостеокластного потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из жировой ткани крыс разного возраста. Установлено, что фармакологическое ингибирование (CASIN) и сайленсинг Cdc42 (siRNA) способствуют восстановлению остеогенной дифференцировки и миграции старых МСК до уровня молодых клеток. Кондиционированная среда от МСК с ингибированным Cdc42 достоверно снижала резорбтивную активность остеокластов, указывая на выраженный антиостеокластный эффект.

3.3 Оценка регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных синтетическим бисфосфонат-содержащим полимером на модели перелома локтевой кости у крыс-самок с эстроген-зависимым остеопорозом

Модель эстроген-зависимого остеопороза была создана посредством билатеральной овариоэктомии [Safarova Y. et al., 2020]. Модель локтевого перелома была создана в нашей лаборатории на основе модели остеотомии локтевой кости кролика [Waters R. V. et al., 2000]. Модель использовалась для исследования заживления костей и показала снижение минеральной плотности костей при остеопорозе. Перелом локтевой кости удобен в методологическом плане, так как не требует внешней фиксации кости. Соседняя лучевая кость служит внутренней шиной и обеспечивает поддержку конечности. Плотность костной ткани оценивали за день до овариоэктомии и через три месяца после операции с помощью microCT IVIS SpectrumCT. Мы определили отношения конечной плотности костной ткани (через 3 мес. после OVX) к первоначальным

предоперационным измерениям у каждого животного. При соотношении «1» плотность костной ткани считается неизменной; соотношение ниже «1» указывает на снижение плотности костей. Индукция остеопороза считалась успешной, если плотность кости уменьшалась на 10 % или более по сравнению с первоначальными измерениями. На Рисунке 21А показано, что у контрольных животных плотность костей несколько увеличилась (на 8 %), что было связано с нормальным физиологическим созреванием животных. Напротив, в группе животных, подвергнутых OVX, плотность костей снизилась примерно на 20 %, что указывало на развитие эстроген-зависимого остеопороза.

После подтверждения остеопороза мы создавали модель перелома локтевой кости. На следующий день в зону перелома мы вводили PBS, полимер, интактные МСК и мезенхимальные стволовые клетки, модифицированные полимером. Плотность костной ткани в местах перелома оценивали через 2 ч после операции, а также на 4-й и 24-й неделях. Различия в плотности костей рассчитывали как отношение конечной плотности костей к исходной плотности (во время перелома) у каждой отдельной крысы. Затем были оценены средние значения для каждой группы (Таблица 1, Рисунок 21С). Если соотношение было равно 1, то плотность костной ткани не изменилась; значения > 1 считались показателями увеличения плотности костной ткани и регенерации костной ткани. На Рисунке 21В показаны репрезентативные рентгеновские изображения участков перелома через 2 ч после хирургически выполненных переломов и через 4 недели.



Примечание: А – непарный Т-критерий, данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD, * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем. С – попарное сравнение с использованием критерия суммы рангов Mann – Whitney U Test, данные представлены в виде медианы (IQR 0,25–0,75), * – $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем, * – $p \leq 0,05$ – по сравнению с положительным контролем.

Рисунок 21 – Показатель плотности костной ткани измеряли с помощью microCT IVIS SpectrumCT изображениях. А – контроль и модель остеопороза на крысах (билатеральная овариэктомия) при переломе локтевой кости через 4 и 24 нед. после лечения. Модель остеопороза: анализ костной плотности у 5 контрольных (без OVX) и 20 животных с OVX; данные представлены как отношение конечной плотности костной ткани (3 мес) к начальной (до операции). В – репрезентативные microCT-изображения конечностей крыс через 2 ч и 4 нед. после операции (In Vivo Imaging System, Caliper, США). С – плотность костной ткани в области переломов локтевой кости: данные представлены как отношение конечной плотности кости (через 4 или 24 нед. после операции) к начальной (через 2 ч после операции)

Таблица 1 – Соотношение плотности кости, измеренной на 4-й и 24-й нед. после перелома, к исходной плотности кости (через два часа после операции)

Группы животных	Коэффициент относительной плотности костей (костная плотность после перелома/до перелома) Медиана (IQR 0,25–0,75)	
	4 недели	24 недели
Отрицательный контроль (OVX, перелом локтевой кости)	0,914 (IQR 0,671–1,053) (n = 9)	0,737(IQR 0,640–1,029) (n = 4)
Полимер	0,845 (IQR 0,727–0,994) (n = 10) *P = 1,00 •P = 0,032	0,621(IQR 0,435–0,652) (n = 5) *P = 0,066 •P = 0,008
МСК	0.976(IQR 0,674–1,141) (n = 8) *P = 0,597 •P = 0,354	0.596(IQR 0,453–1,379) (n = 4) *P = 0,486 •P = 0,268
МСК + Полимер	1.274(IQR 1,046–1,421) (n = 10) *P = 0,003 •P = 0,058	1.215(IQR 1,124–1,754) (n = 5) *P = 0,032 •P = 0,095
Положительный контроль (без OVX, перелом локтевой кости)	1,103 (IQR 0,971–1,148) (n = 5) *P = 0,046	No data
Примечание: тест суммы рангов Mann – Whitney U Test использовался для сравнения различий между экспериментальными группами: * – $p \leq 0,05$ – по сравнению с отрицательным контролем; • – $p \leq 0,05$ – по сравнению с положительным контролем.		

Как видно из Рисунка 21С и из Таблицы 1, через четыре недели после операции наблюдалось небольшое снижение плотности костной ткани в контрольной группе (на 8,6 %), в группах, которые получали только полимер (15,5 %) и только МСК (2,4 %), однако мы не наблюдали статистически значимых различий между этими тремя группами. Напротив, в группе животных, которым вводили полимер-модифицированные МСК, плотность кости увеличилась на 27,4 % по сравнению с контролем. Через 4 нед. 19 крыс были умерщвлены и 18 крыс оставлены для дальнейших наблюдений. Через 24 нед. мы повторили

измерения и обнаружили продолжающееся снижение плотности костной ткани в группах 1–3 (26,3 %, 37,9 % и 40,4 % соответственно), и все еще не наблюдали статистических различий между этими тремя группами. В то же время в четвертой группе мы наблюдали увеличение плотности костной ткани на 21,5 % по сравнению с отрицательным контролем.

В качестве положительного контроля использовали группу животных с переломом локтевой кости, которым не проводилась операция OVX (n = 5, положительный контроль). Как показано на Рисунке 21С и в Таблице 1, существует значительная разница в плотности костей в этой группе через четыре недели после операции по сравнению с отрицательным контролем (OVX и перелом локтевой кости). Поскольку здоровые кости у крыс восстанавливают свои биомеханические свойства к 4 неделе [Funk J. R. et al., 2000], мы прекратили измерения на этом этапе и использовали те же данные в качестве положительного контроля для дальнейших экспериментов.

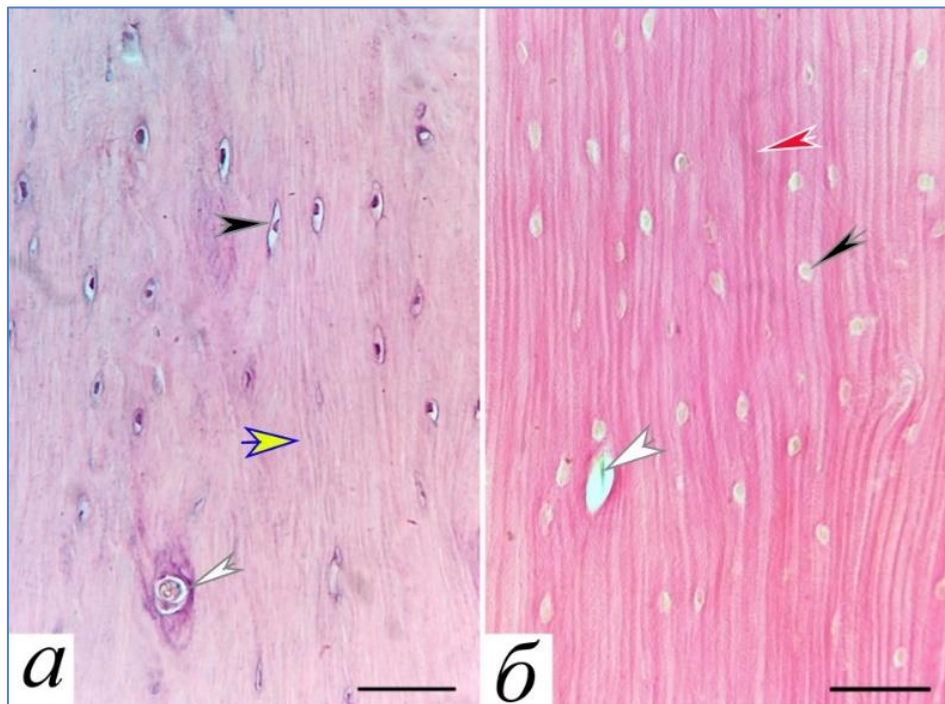
Заключение

Прижизненный анализ динамики изменения костной плотности в зоне перелома локтевой кости на фоне экспериментально индуцированного эстроген-зависимого остеопороза показал статистически значимое 27,4 % увеличение плотности костной ткани через 4 недели после остеотомии локтевой кости в группе животных, получавших 4-кратную трансплантацию модифицированных полимером МСК.

3.3.1 Влияние остеофильного бисфосфонатного полимера и модифицированных им мезенхимальных стволовых клеток на морфологические проявления регенерации дефекта локтевой кости

В норме диафиз локтевой кости белой крысы имел типичное строение компактной пластинчатой костной ткани с хорошо выраженными остеонами) и

небольшим количеством остеоцитов – 243 (209–268) на 1 мм² продольного среза (Рисунок 22).



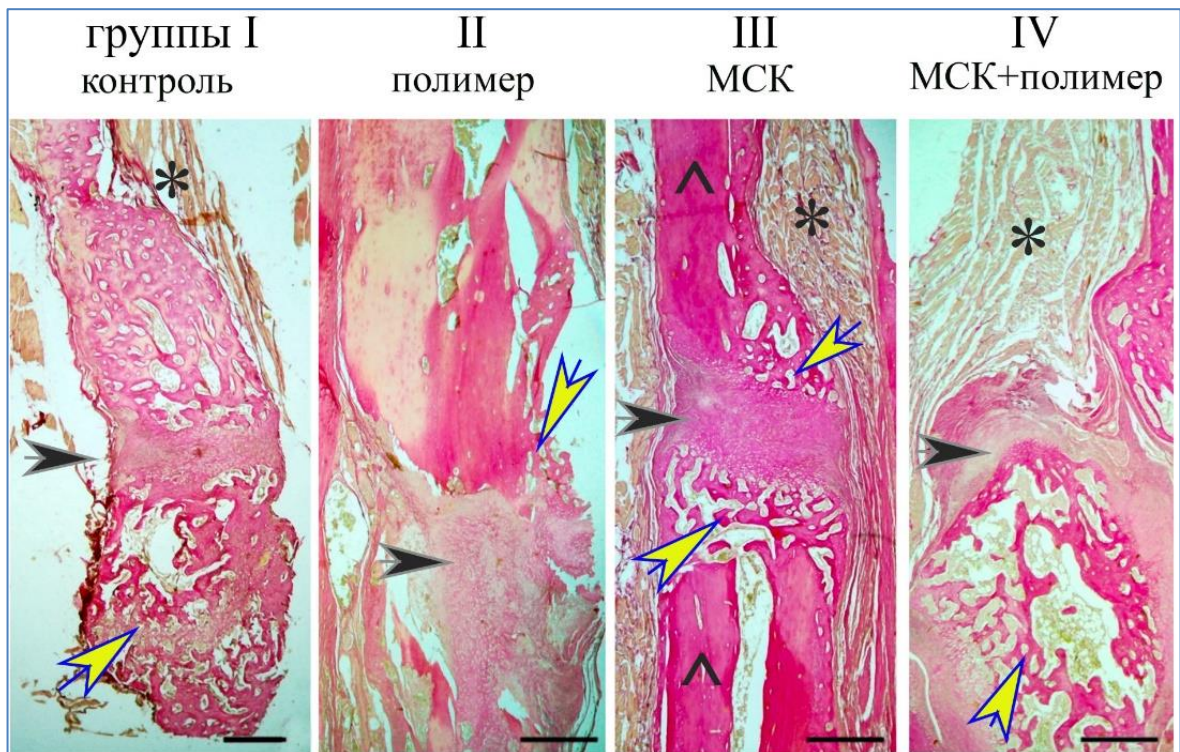
Примечание: черная стрелка – костные лакуны с телами остеоцитов, желтая стрелка – минерализованный костный матрикс, костные пластины, белая стрелка – гаверсов канал остеона, красная стрелка – упорядоченные коллагеновые волокна.

Рисунок 22 – Пластинчатая костная ткань диафиза локтевой кости на уровне перелома (норма). Окраска гематоксилин-эозином (а) и по Ван Гизону (б).

Ув. 400, шкала – 50 мкм.

Моделирование перелома путем остеотомии диафиза локтевой кости в нашем эксперименте приводило к появлению дефекта на месте перелома (Рисунок 22 а, б). По литературным данным, репаративная регенерация в таких случаях протекает в соответствии с этапами заживления тканевого дефекта и сопровождается тканевыми преобразованиями, согласно принципу провизорности. Данные гистогенеза являются детерминированным процессом, характеризуются появлением, на пути к дефинитивной, ряда промежуточных тканей [Соловьев Г. С. и др., 2005].

Через один месяц после травмы на месте дефекта локтевой кости всех групп животных происходило формирование сложного тканевого регенерата – провизорного субстрата, а затем на его месте – зрелой кости (дефинитивного органа). При этом пространственное расположение незрелого субстрата было в рамках границ дефекта и четко соответствовало расположению ранее удаленной части кости (Рисунки 21В, 23).

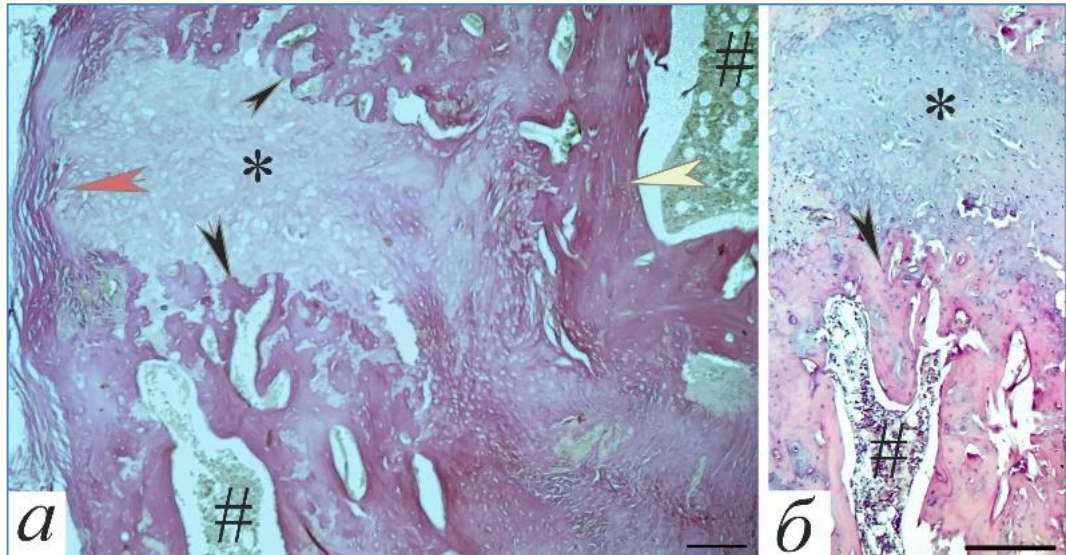


Примечание: черная стрелка – хрящевая ткань, желтая стрелка – незрелая губчатая костная ткань, ^ – типичная пластинчатая зрелая костная ткань, * – поперечнополосатая мышечная ткань вокруг поврежденной кости.

Рисунок 23 – Анатомо-гистотопографическое сравнение зоны костной мозоли, закрывающей дефект локтевой кости, через 1 мес. после перелома у животных групп I–IV. Окраска по Ван Гизон. Ув. 40, шкала – 500 мкм.

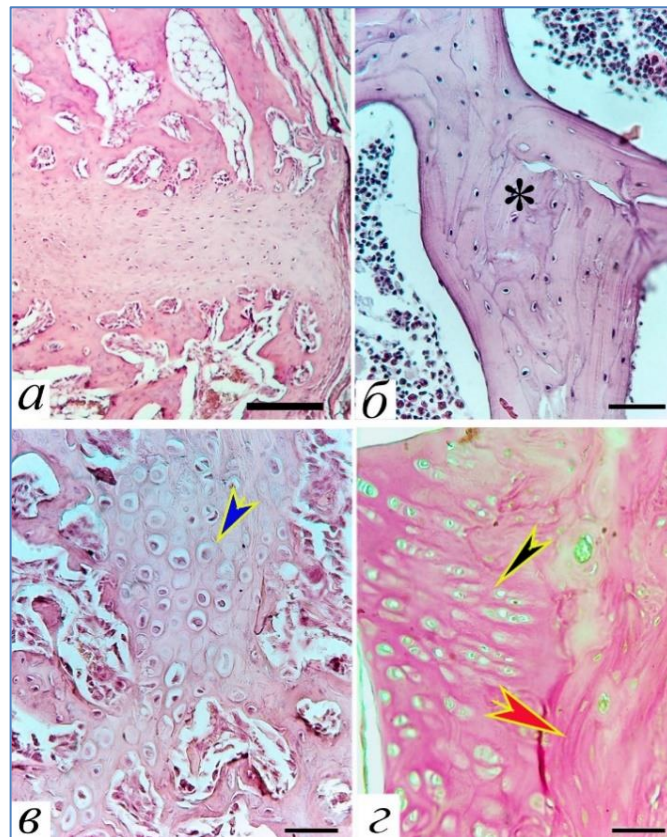
Регенерация осуществлялась с участием волокнистой соединительной и хрящевой ткани (Рисунки 24 а, б и 25 а, б, в, г). Формировалась ретикулофиброзная (грубоволокнистая, губчатая) костная ткань регенерата

(мягкая костная мозоль) – провизорный субстрат регенерирующей кости (Рисунок 24), которая затем в процессе минерализации превращалась в жесткую костную мозоль и пластинчатую костную ткань с гаверсовыми системами (Рисунок 25 б). На Рисунке 23 видно, что в контрольной группе в этот период (1 мес.) в зоне дефекта сохранялся большой объем губчатой ткани. Вероятно, индуцированный в результате овариоэктомии эстроген-зависимый остеопороз препятствовал образованию костной ткани, а использование МСК и полимера способствовали трансформации незрелой ткани в дефинитивную. По данным морфометрического исследования, через 1 мес. после травмы отношение площади продольного среза центральной (фиброзно-хрящевой) части костной мозоли к площади среза окружающей ее губчатой кости между группами статистически значимо различалось (Kruskal – Wallis test: $H [df = 3, N = 24] = 13,4 \quad p = 0,004$). Максимальное значение этого показателя было в группе I, составило 7,28 (4,52 – 8,10), в группе II – (3,92 [3,11–4,75], $p = 001^{1-2}$), группе III – (2,59 [2,23–3,44], $p = 0001^{1-3}$) и группе 4 – (4,35 [3,12–5,10], $p = 002^{1-4}$). При этом в группе IV – больше, чем в группе III ($p = 01^{3-4}$, Mann – Whitney U Test).



Примечание: * – хрящевая ткань, красная стрелка – соединительная ткань, черная стрелка – новообразованные костные балки из грубоволокнистой костной ткани, желтая стрелка – пластинчатая костная ткань, # – костномозговая полость, заполненная желтым костным мозгом.

Рисунок 24 – Зона формирования ретикулофиброзной костной ткани регенерата локтевой кости крысы через месяц после перелома (группа III). Окраска по Ван Гизону (а), гематоксилин-эозином (б). Ув. 100, шкала – 200 мкм.



Примечание: * – зрелые остециты, черная стрелка – стопки изогенных хондроцитов, синяя стрелка – крупные единичные хондроциты, красная стрелка – коллагеновые волокна.

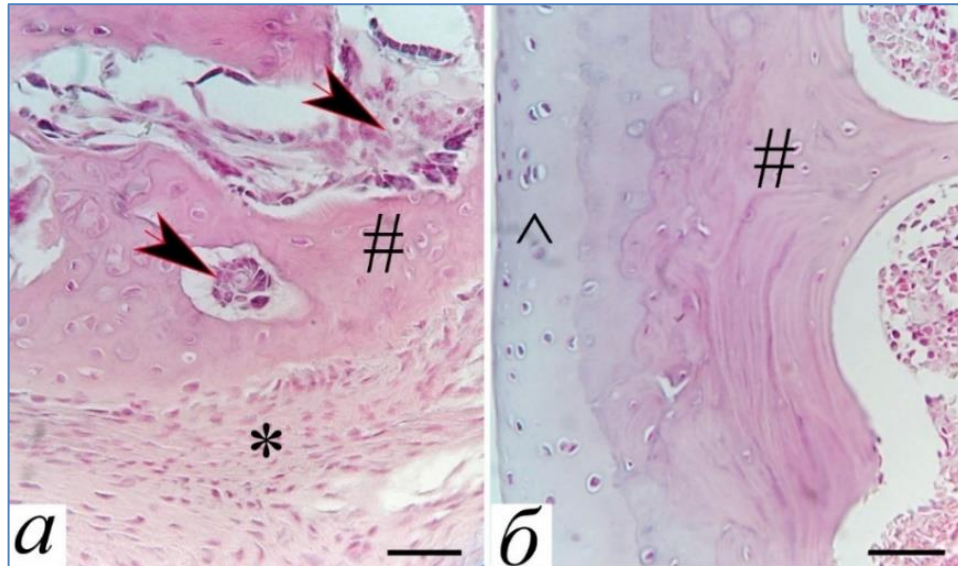
Рисунок 25 – Жесткая костная мозоль (а) и отдельные ее фрагменты со сформированной пластинчатой костной (б) и несформированной (в, г) хрящевой тканью через 1 мес. после перелома (а, б, в – группа III; г – группа II). Окраска: гематоксилин-эозином (а-в), по Ван Гизону (г).

Ув. 40 (а) и 400 (б-г), шкала – 200 мкм.

Таким образом, восстановление дефекта локтевой кости передней конечности белой крысы после остеотомии диафиза локтевой кости на фоне экспериментального эстроген-зависимого остеопороза, индуцированного в группах I, II и III, включало несколько похожих этапов, каждый из которых имел свои особенности. В течение 1 мес. происходило активное образование соединительной, хрящевой, незрелой губчатой костной ткани на месте перелома. Остеобласты и хондроциты начинали синтезировать коллаген и другие матриксные белки, образуя мягкую костную мозоль, а затем твердую костную

мозоль за счет активации процессов минерализации. Для животных группы II было характерно высокое содержание изогенных хондроцитов с разной степенью дифференцировки.

В группе IV, в которой локально вводили модифицированные остеофильным полимером МСК, восстановление костной ткани протекало несколько иначе – на фоне более выраженных изменений популяций мезенхимальных, фибро-, хондро- и остеобластных клеток, связанных с очагами регенерации, – переизбытка основных клеток репаративной регенерации. В этой группе через 1 мес. выявляли участки грубоволокнистой соединительной и хрящевой ткани (Рисунок 26 а, б). Вероятно, часть бластных клеток при искусственном введении модифицированных полимером МСК не успевала дифференцироваться в хондро- и остециты. Необходимо особо отметить, что для группы IV, как и группы II, было характерно большое содержание изогенных хондроцитов, лежащих в общей полости, отличающихся размерами, формой и, вероятно, степенью дифференцировки. При этом нами выявлено активное образование дефинитивной пластинчатой костной ткани и увеличение размеров хондроцитов по сравнению с другими группами в 1,2–1,5 раза (Mann – Whitney U Test, Kruskal – Wallis test).

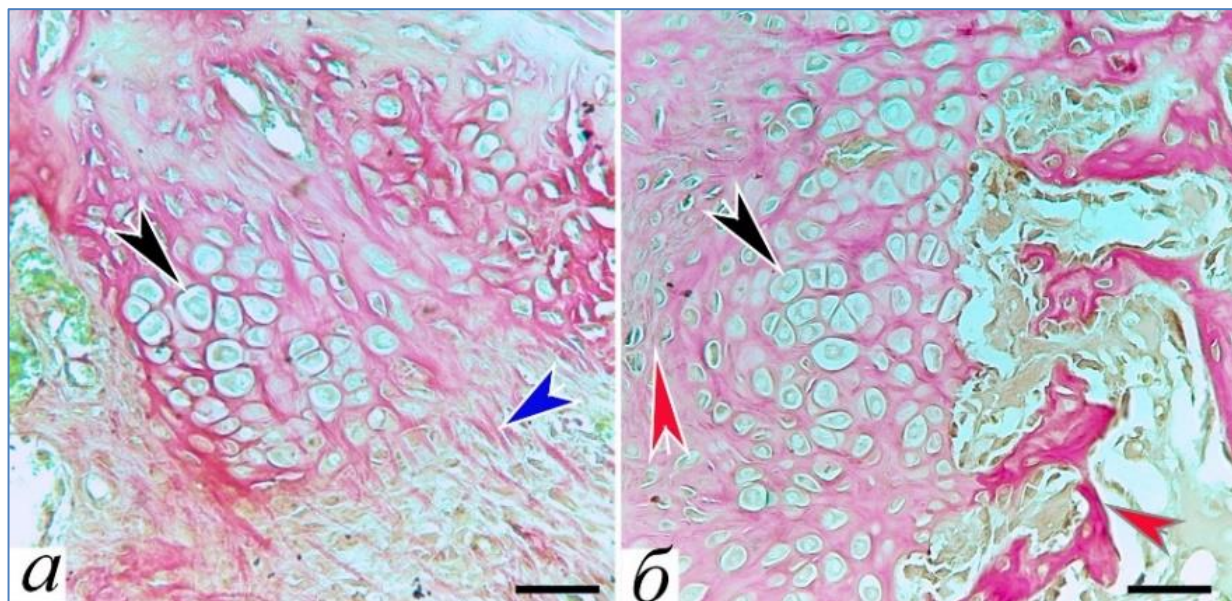


Примечание: * – высокое содержание фибробластов и неминерализированных коллагеновых волокон, ^ – зона хрящевой ткани, # – созревающая и зрелая костная ткань. Четко видны границы зон, много фибробластов, остеобластов, хондробластов.

Рисунок 26 – Взаимоотношение зон костной мозоли с различной степенью структурно-функционального созревания, очаги регенерации (черные стрелки), содержащие бластные клетки, локтевой кости крысы через 1 мес. после перелома (группа МСК + полимер, IV группа). Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 400, шкала – 50 мкм.

Следовательно, в течение 1 мес. после травмы у всех животных с билатеральной овариотомией в области перелома локтевой кости формировались очаги регенерации с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата (Рисунок 27 а, б). В центре перелома, где находятся мягкие костные мозоли, наблюдалась активная пролиферация клеток и формирование сосудистой сети. По мере перехода к твердой костной мозоли, происходило выравнивание клеток и их функциональная специализация, увеличивалась минерализация. Костные структуры постепенно становились более организованными, что в свою очередь улучшало механические свойства восстановленной костной ткани. Наиболее выражено вышеназванные изменения проявлялись при использовании модифицированных остеофильным полимером МСК. Это, вероятно, связано с высокой концентрацией стволовых

клеток и их фиксацией в зонах регенерации поврежденной кости с последующей стимуляцией остеогенеза. Однако полного перехода всего объема провизорного субстрата в дефинитивную костную ткань не происходило. Полноценное завершение стадии ремоделирования и модификации костной ткани, несмотря на использование модифицированных остеофильным полимером МСК, требует гораздо большего времени.



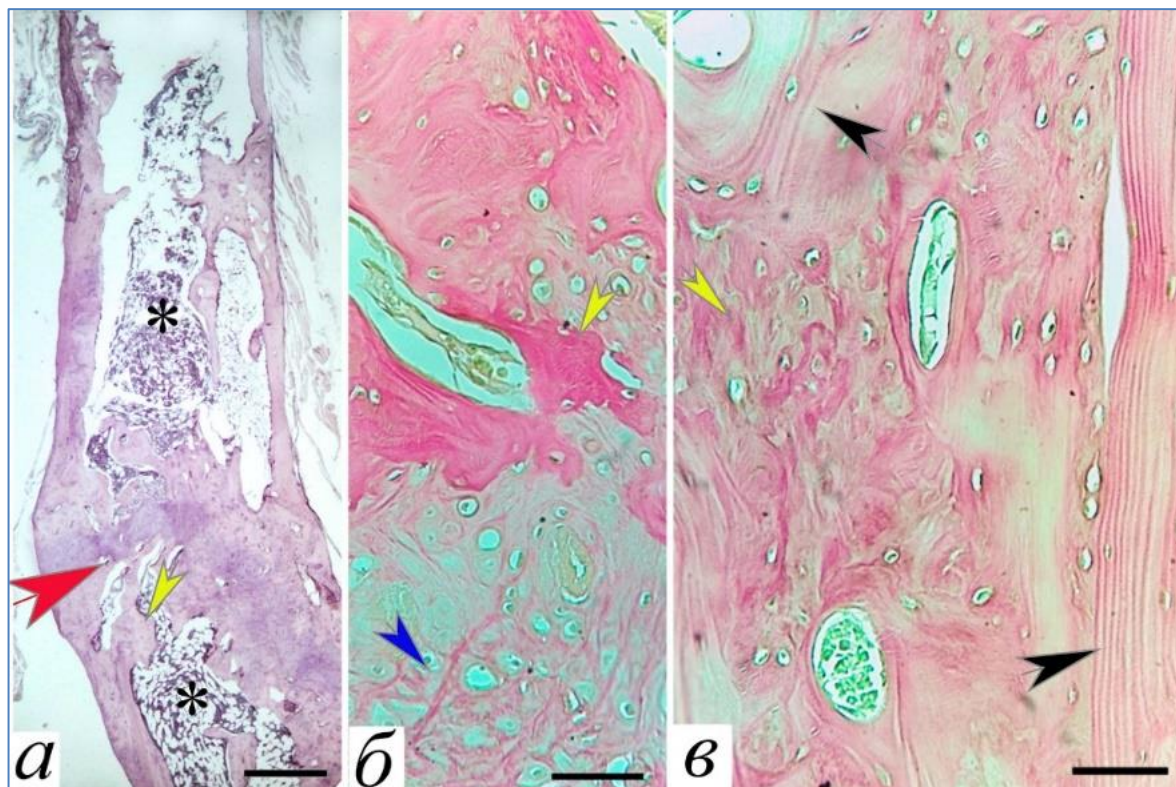
Примечание: высокое содержание изогенных хондробластоцитов (красная и черная стрелки) с различной степенью структурно-функционального созревания, очаги регенерации (синяя стрелка).

Рисунок 27 – Фрагмент костной мозоли у животных групп II (а) и IV (б) через 1 мес. после перелома. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 50 мкм.

Таким образом, наше экспериментальное светооптическое гистологическое исследование позволяет констатировать, что использование в течение 1 мес. локального введения модифицированных остеофильным полимером МСК, в концентрации 1×10^6 клеток/мл может изменить процессы восстановления костной ткани при переломах локтевой кости у белых крыс.

Через 6 месяцев после травмы, на стадии активации механизмов моделирования и ремоделирования, вероятно, происходило существенное изменение и оптимизация структуры кости, обусловленные взаимодействием

остеобластов и остеокластов. Ранее нами было установлено, что остеопороз смещал баланс этих двух клеточных систем, регулирующих костный гомеостаз в сторону уменьшения минеральной плотности вновь образованной костной ткани [Safarova Y. и др., 2020; Сафарова Ю. И. и др., 2019]. Об этом свидетельствует и длительное сохранение элементов незрелой кости по данным настоящего гистологического исследования (Рисунок 28 а, б, в).



Примечание: красная стрелка – зона замещенного дефекта, желтая стрелка – губчатая грубоволокнистая, синяя – фиброзно-хрящевая, черная – зрелая пластинчатая ткань гаверсовых систем костной мозоли, * – желтый костный мозг, сплошная костная полость еще не образована.

Рисунок 28 – Дефинитивная костная ткань (а) и ее отдельные зоны с преобладанием незрелой (б) и зрелой (в) через 6 мес. после повреждения локтевой кости белых крыс (группа IV). Окраска гематоксилин-эозином (а) и по Ван Гизону (б, в). Ув. 40 (а) и 400 (б, в), шкала – 500 (а) и 50 (б, в) мкм.

Следовательно, несмотря на высокий регенеративный потенциал при использовании модифицированных остеофильным полимером МСК, полного (до

исходного состояния) восстановления дефинитивной кости из провизорного субстрата (мягкая костная мозоль) у животных с эстроген-зависимым остеопорозом не происходило даже через 6 мес. Сохранялись участки незрелой костной ткани, а сплошная костная полость еще не образовалась.

Использование плагина «StarDist» для ImageJ/Fiji с обученной моделью распознавания клеток позволило дать точную морфометрическую характеристику костной мозоли по показателю общей численной плотности лакун, содержащих различные клетки (Рисунок 29 а, б; Таблица 2).

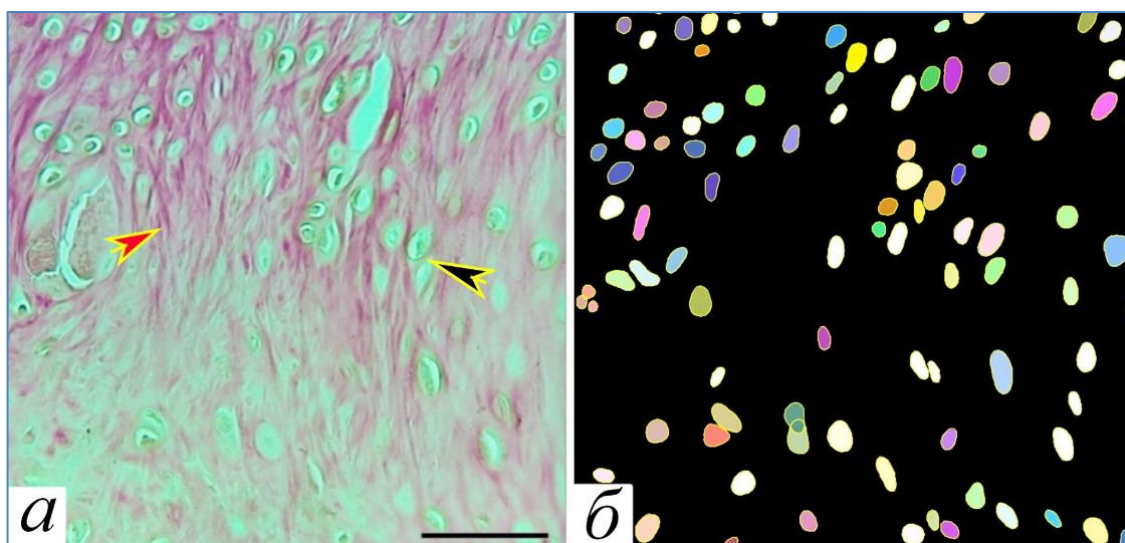


Рисунок 29 – Фрагмент фиброзно-хрящевой (мягкой незрелой) костной мозоли (а) локтевой кости белой крысы через 1 мес. (группа I) и результат распознавания ее клеток с помощью плагина «StarDist» (б). Окраска по Ван Гизону (а). Ув. 400, шкала – 50 (а) мкм.

Было установлено, что численная плотность клеток, расположенных в лакунах костной мозоли локтевой кости крысы, при различных способах коррекции репаративного процесса статистически значимо отличалась между группами и по срокам (Таблица 2).

Таблица 2 – Численная плотность клеток, расположенных в лакунах костной мозоли локтевой кости крысы, при различных способах коррекции репаративного процесса, Me (Q1-Q3)

Группы	Период эксперимента	
	1 месяц	6 месяцев
Группа I (контроль)	4 120 (3 994–4 367)	2 753 (2 656–3 530) $p = 0,01^{1-6}$
Группа II (полимер)	3 860 (2 876–4 222) $p = 0,14^{I-II}$	4 822 (4 699–4 956); $p = 0,01^{1-6}$ $p = 0,004^{I-II}$
Группа III (МСК)	2 784 (2 478–2 832) $p = 0,006^{I-III}$; $p = 0,04^{II-III}$	1 957 (1 829–2 132); $p = 0,004^{1-6}$ $p = 0,004^{I-III}$; $p = 0,004^{II-III}$
Группа IV (МСК + полимер)	3 344 (3 167–3 531) $p = 0,06^{I-IV}$; $p = 0,39^{II-IV}$; $p = 0,01^{III-IV}$	1 517 (1 309–1 765); $p = 0,004^{1-6}$ $p = 0,004^{I-IV}$; $p = 0,004^{II-IV}$; $p = 0,02^{III-IV}$
Kruskal – Wallis test (I, II, III и IV группы)	$H (df = 3, N = 24) = 12,2$; $p = 0,008$	$H (df = 3, N = 24) = 20,9$; $p = 0,0001$
Примечание: при парном сравнении по срокам (1 и 6 мес.) нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$. Для сравнения четырех групп (I–IV) с учетом поправки Бонферрони для каждого парного сравнения уровень значимости был установлен на уровне $< 0,01$. Me (Q1–Q3) обозначает медиану (нижний и верхний квантили).		

На основании этого можно предположить, что различная комбинация МСК и полимера была весомым фактором, определяющим выявленные статистически значимые различия. При этом наиболее полный регенераторный потенциал реализуется в группе IV, при использовании модифицированных остеофильным полимером мезенхимальных стволовых клеток. В этой группе через 6 мес. отмечено наиболее выраженное снижение численной плотности клеток, а размеры зрелых клеток значимо увеличивались.

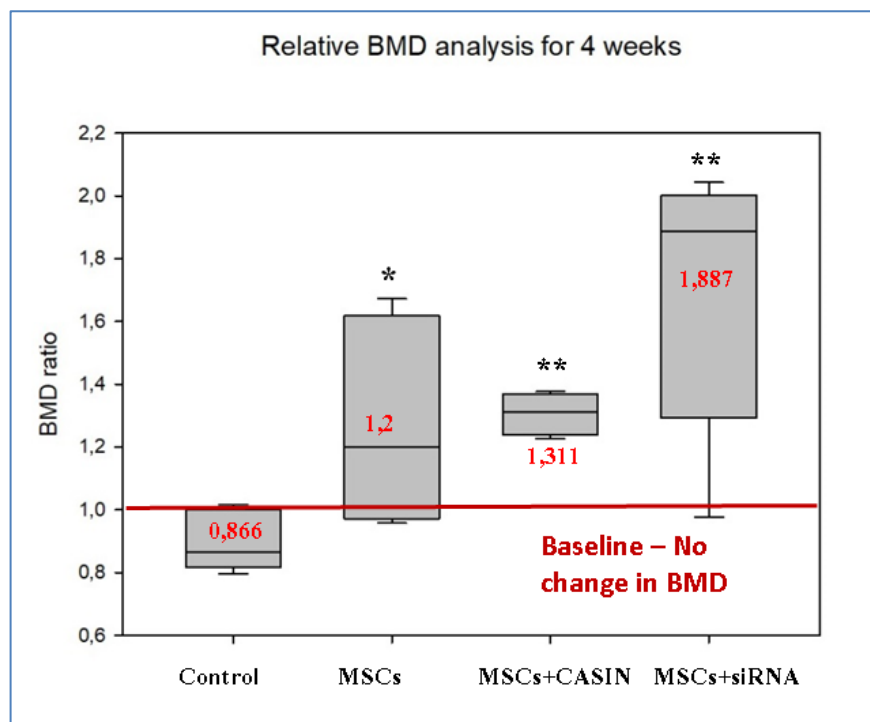
Заключение

Остеофильный полимер обладает способностью взаимодействовать с костной тканью, улучшая её регенерацию. Он может стимулировать образование

мягкой костной мозоли и служить каркасом для новой костной ткани, обеспечивая механическую поддержку. Кроме того, полимер может стимулировать процессы пролиферации и дифференциации остеобластов, что при переходе к твердой костной мозоли способствуют минерализации и стабилизации новой кости. Полимер также улучшает взаимодействие МСК с костной тканью, усиливая кооперативный эффект. В результате использование модифицированных остеофильным полимером МСК улучшает механические свойства костной ткани на примере гистологических препаратов перелома локтевой кости крыс при экспериментальном остеопорозе.

3.4 Оценка потенциала модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 на *in vivo* модели перелома локтевой кости у возрастных животных

Для оценки тренда динамики образования костной мозоли оценивали минеральную плотность костной ткани в местах переломов в сроки 4, 8, 16 и 24 нед. На Рисунке 30 представлены данные относительной минеральной плотности кости через 4 нед после перелома и последующего лечения. У контрольных животных, не получавших лечения, отмечена отрицательная динамика регенерации костной ткани (снижение минеральной плотности кости на 13 %). В то же время у животных, получавших локальное введение МСК, модифицированных малой молекулой CASIN, наблюдалось статистически значимое увеличение плотности кости на 31 % в местах переломов, а наиболее выраженная регенерация была представлена в группе, получавшей МСК, трансфицированные siRNA. – 88 %. Статистический анализ проводили с помощью SigmaPlot на однофакторном дисперсионном анализе (тест на нормальность пройден). В группе, получавшей простые инъекции МСК, минеральная плотность кости увеличилась на 20 %, но степень статистической значимости была ниже.



Примечание: непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,5$, ** – $p \leq 0,05$ количественные данные представлены нормализованными к контрольной группе («1» базовая линия).

Рисунок 30 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 4 нед. между контрольной и экспериментальной группами

Анализ через 8 нед (Рисунок 31) после лечения выявил статистически значимые результаты только в группах МСК + CASIN (38 %) и МСК + siRNA (94 %). Хотя в группе с простыми инъекциями МСК наблюдалось увеличение на 30 %, результаты не были статистически значимыми.

Длительный мониторинг минеральной плотности кости в области перелома позволяет наблюдать длительный эффект терапии. Анализ в течение 16 недель (Рисунок 32) показал стойкое увеличение в группе, которой вводили МСК + CASIN и МСК + siRNA, до 44 % и 93 % соответственно. В контрольной группе наблюдалось дальнейшее снижение до 21 %. Причиной срыва костной регенерации в контрольной группе может быть пожилой возраст животного и возрастной сдвиг костного метаболизма в сторону остеопороза. Изменения в группе трансплантированных МСК статистически не подтверждены.

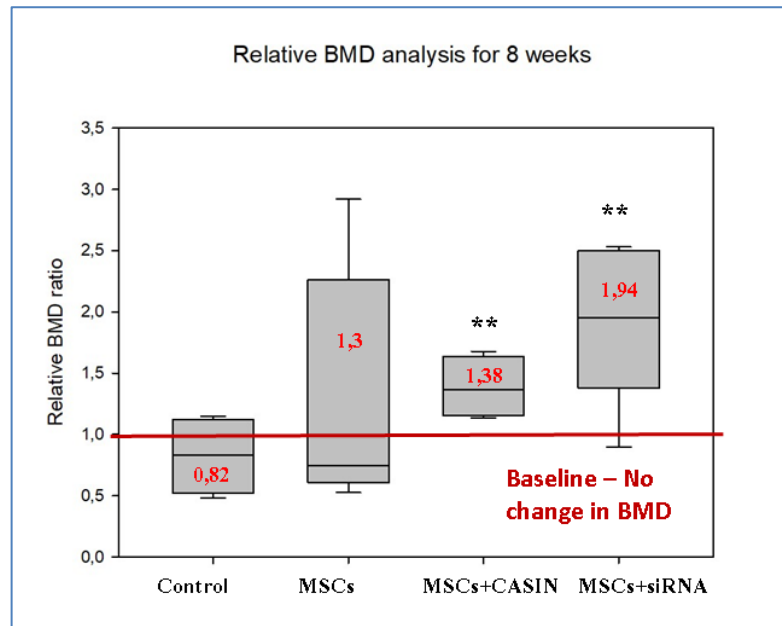
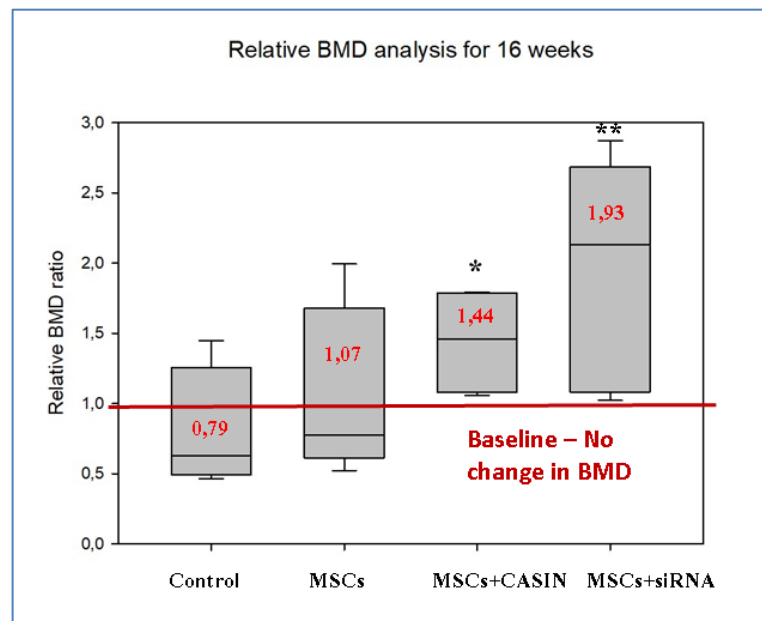


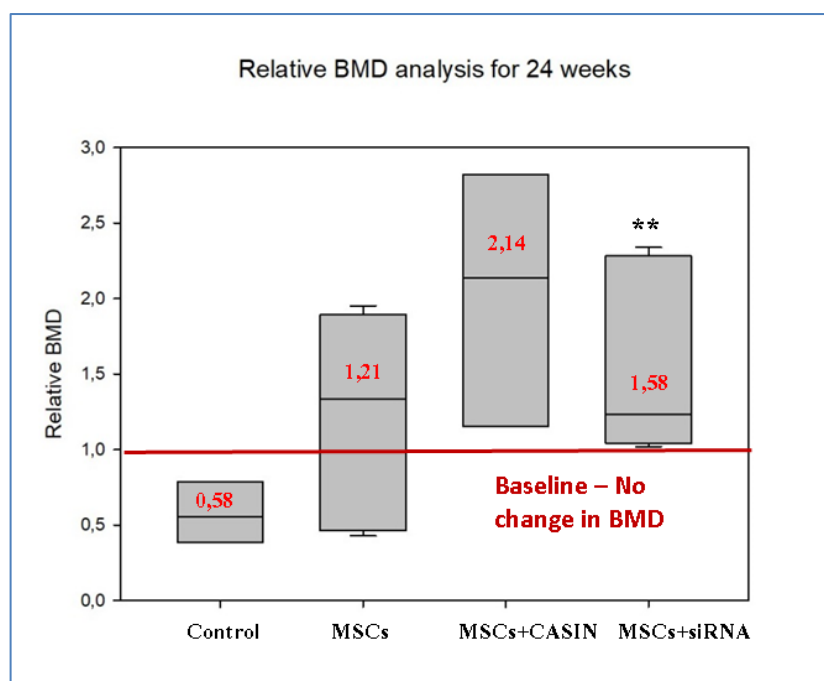
Рисунок 31 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 8 нед между группами



Примечание: непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,5$, ** – $p \leq 0,05$ количественные данные представлены нормализованными к контрольной группе («1» базовая линия).

Рисунок 32 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 16 нед между группами

Конечная точка эксперимента была установлена на 24 нед (Рисунок 33), чтобы обеспечить полное восстановление перелома. Минеральная плотность костной ткани в опытной группе МСК + siRNA снизилась по сравнению с 16-й нед, однако осталась выше по сравнению с контрольной группой – 58 % ($p \leq 0,05$). Изменения минеральной плотности кости в двух других экспериментальных группах – МСК и МСК + CASIN не оказались статистически значимыми. В контрольной группе были выявлены дегенеративные изменения, которые показали дальнейшее снижение до 40 %.



Примечание: непарный анализ Т-критерия, * – $p \leq 0,5$, ** – $p \leq 0,05$ количественные данные представлены нормализованными к контрольной группе («1» базовая линия).

Рисунок 33 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 24 нед. между группами

Судьбу трансплантированных клеток контролировали с помощью экспрессирующих люциферазу лентивирусных частиц Luc-LVT («Евроген», Россия). Клетки сначала трансфицировали трансформирующими элементами

LUC-LVT и наблюдали в поле люминесценции для подтверждения трансфекции. Результаты показаны на Рисунке 34.

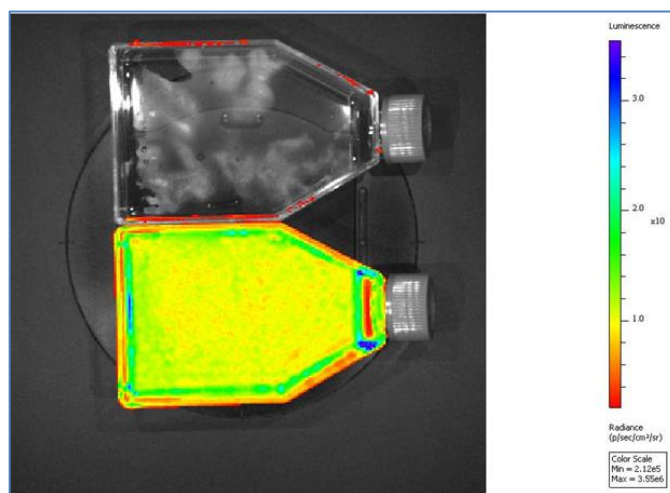


Рисунок 34 – МСК, трансфицированные LUC-лентивирусными наночастицами (Евроген, Россия) через 48 ч после трансфекции. Люминесцентный режим, полученный с помощью IVIS Spectrum CT (Caliper, США)

Далее клетки модифицировали в соответствии с экспериментальной группой – CASIN и siRNA. Трансплантацию клеток проводили под изофлурановым наркозом. Люциферин (SigmaAldrich) использовали в качестве субстрата и вводили внутривенно в концентрации 150 мг/кг массы тела. Результаты, показывающие люминесцентный сигнал, представлены на Рисунке 35. Представленные результаты показали выживаемость трансплантированных МСК через 48 ч после трансплантации.

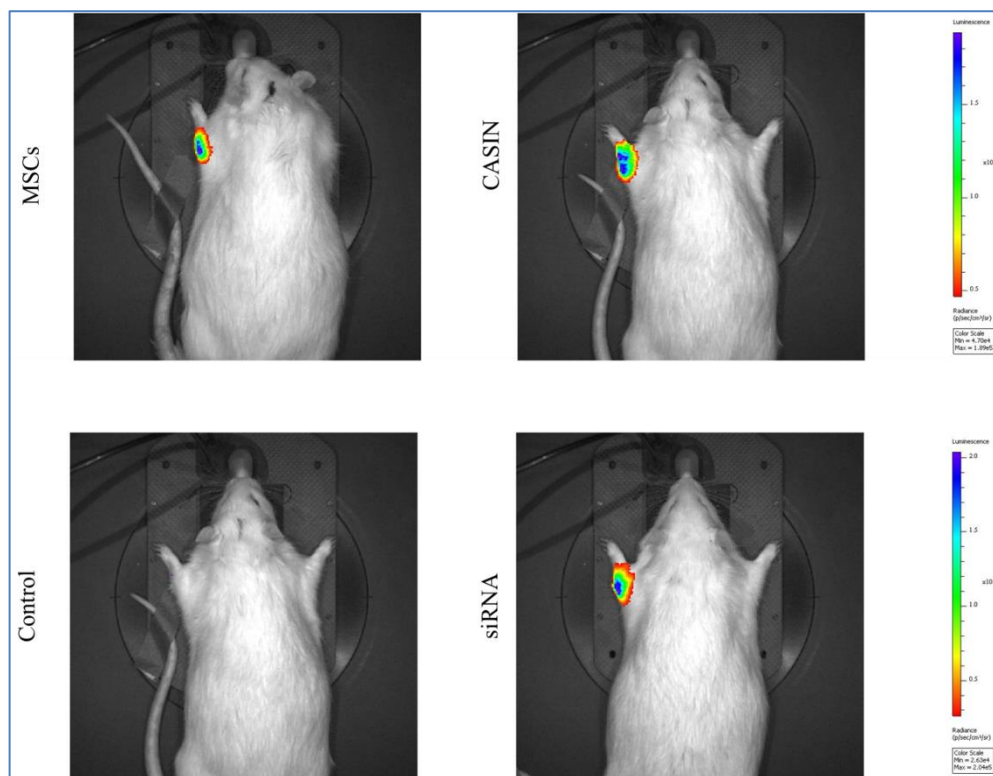


Рисунок 35 – Визуализация МСК, трансфицированных LUC (клетки $1e6$), через 48 ч после трансплантации. Субстрат люциферин вводили в концентрации 150 мг/кг массы тела животного (D-люциферин, SigmaAldrich) за 30 мин до визуализации.

Люминесцентный режим, полученный с помощью IVIS Spectrum CT
продолжительностью 10 мин (Caliper, США)

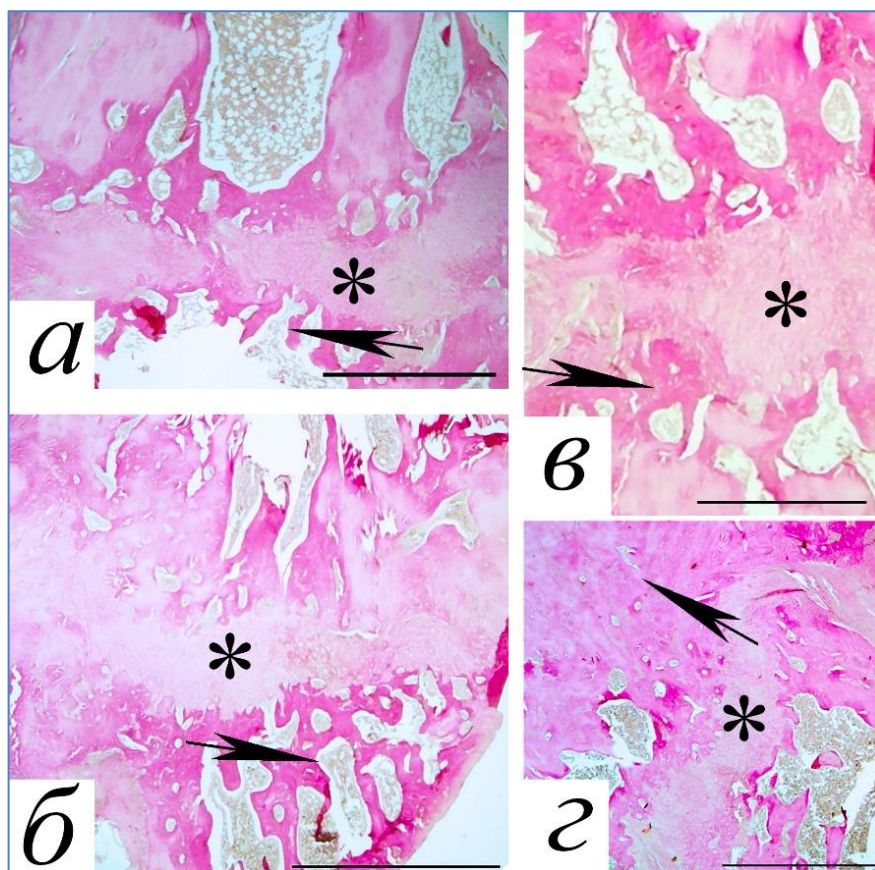
Заключение

Ранее по литературным [Mierke C. T. et al., 2020; Murphy N. P. et al., 2021; Rudiansyah M. et al., 2022] и собственным [Олжаев Ф. С. и др., 2024] данным было установлено, что МСК могут усиливать процесс восстановления и реконструкции как мягкой, так и твердой костной мозоли, что улучшает механические свойства новообразованной ткани и способствует восстановлению физиологического гомеостаза костной ткани. Мы показали, что заживление дефекта кости проходило через стадию образования мягкой и твердой костных мозолей, как временного субстрата, который в течение 1 мес. после травмы заполнял все пространство дефекта, последовательно трансформируясь из незрелой формы в зрелую [Олжаев Ф. С. и др., 2024].

3.4.1 Влияние таргетированных по Cdc42 мезенхимальных стволовых клеток на процесс восстановления дефекта локтевой кости

В настоящем исследовании гистологическое сравнение зон костной мозоли проводили в отдаленном периоде – через 4 и 6 мес. у животных без лечения и при использовании мезенхимальных стволовых клеток [Олжаев Ф. С. и др., 2024]. Показало, что через 4 мес. после травмы максимальное количество новообразованной зрелой костной ткани было выявлено у животных группы III и IV, которым трансплантировали МСК, трансфицированные CASIN и siRNA (Рисунок 36). При трансплантации немодифицированных МСК (группа II) выявлялось максимальное для всех групп содержание грубоволокнистой (незрелой) костной ткани (Рисунок 36 б). Эта ткань характеризуется хаотичным расположением коллагеновых волокон и высокой плотностью клеток с пониженным содержанием минеральных солей. В процессе созревания она заменяется зрелой пластинчатой костью.

Необходимо отметить, что у животных на протяжении всего времени наблюдения сохранялся значительный объем хрящевой ткани, вокруг и за счет которой формировалась костная ткань. Однако, ее количество и интенсивность окраски, форма границы отличались у животных без лечения и при трансплантации МСК (Рисунок 36 а, б, в, г). Для получения дополнительных количественных данных мы использовали анализ пиксельного состава полученных изображений (Рисунок 37 а, б, в, г).

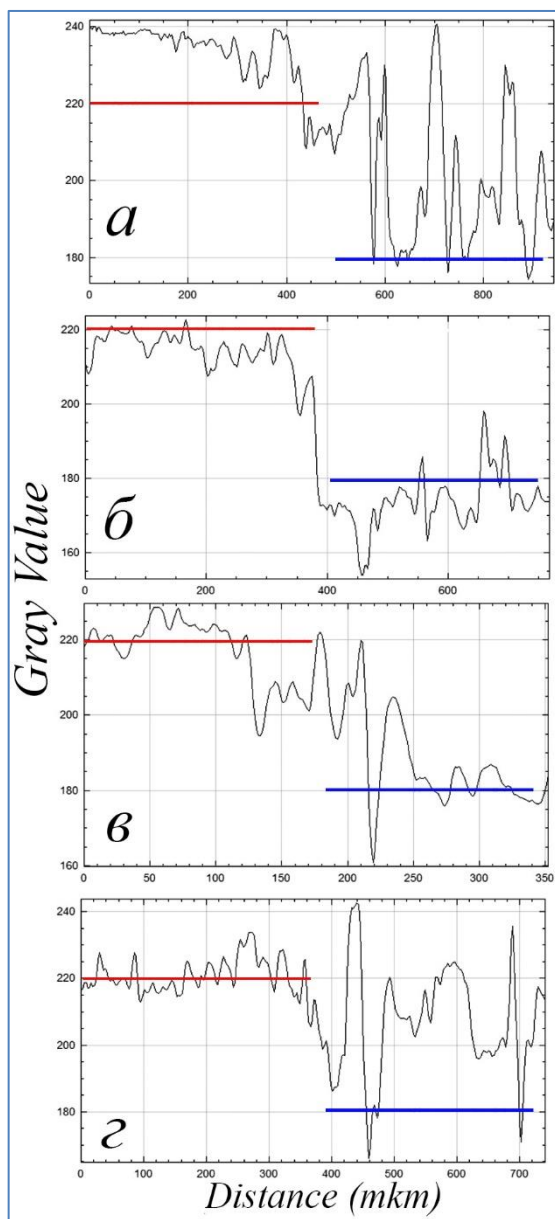


Примечание: звездочка – хрящевая ткань, стрелка – незрелая губчатая костная ткань.

Рисунок 36 – Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 мес. после перелома у животных групп I (а), II (б), III (в) и IV (г). Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала (а, б, г) – 1000 мкм, шкала (в) – 500 мкм

Установлено, что при окраске по Ван Гизону граница хрящевой и незрелой губчатой костной ткани имела высокий показатель контрастности по пиксельному составу. Выявлены критические уровни яркости пикселей этих зон. Яркость пикселей хрящевой ткани (на Рисунке 37 отмечена красной линией) варьировалась в пределах 210–240 (в диапазоне 0–255 у. е.), а незрелой кости (на Рисунке 37 отмечена синей линией) – 140–180. Согласно гистограммам, наибольший разброс показателей данной переменной был характерен для группы I (без МСК). В группе I, вероятно, было много более ярких пикселей, характерных для изображения хрящевой ткани (около 240 у. е.), и в целом более выраженный остеопороз (Рисунок 37 а). При использовании МСК (группы II–IV) этот

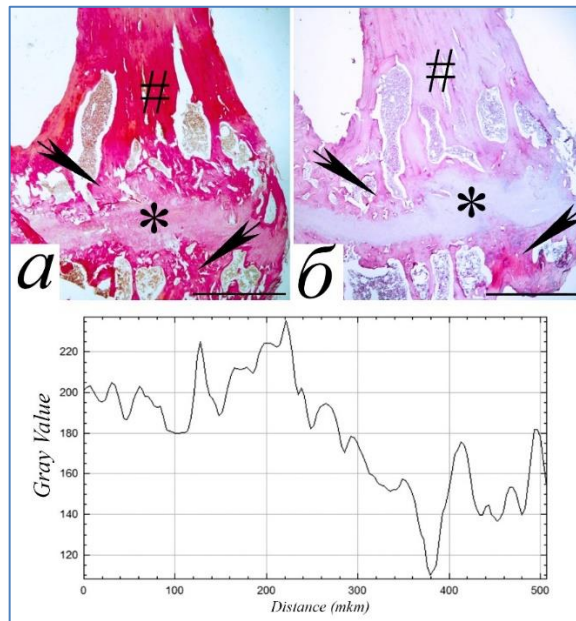
показатель снижался до 220 у. е. (критерий Манна – Уитни, $p = 0,01$). Вполне вероятно, что это было связано с активацией образования коллагена и его минерализацией этими клетками.



Примечание: красная линия – указывает приграничную зону хрящевой ткани, синяя линия – зону костной ткани. См. рисунок 36. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала (а, б, г) – 1 000 мкм, шкала (в) – 500 мкм.

Рисунок 37 – Гистограммы распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани, при сравнении через 4 мес. после перелома у животных группа I (а), II (б), III (в) и IV (г)

Еще более глубокие изменения в направлении увеличения плотности регенерата у животных группы IV были выявлены через 6 мес. после травмы (Рисунок 38). В зоне хрящевой ткани яркость пикселей снижалась до (180 ± 15) у. е., а незрелой костной ткани – (140 ± 20) у. е. (критерий Манна – Уитни, $p = 0,006$; $p = 0,005$).



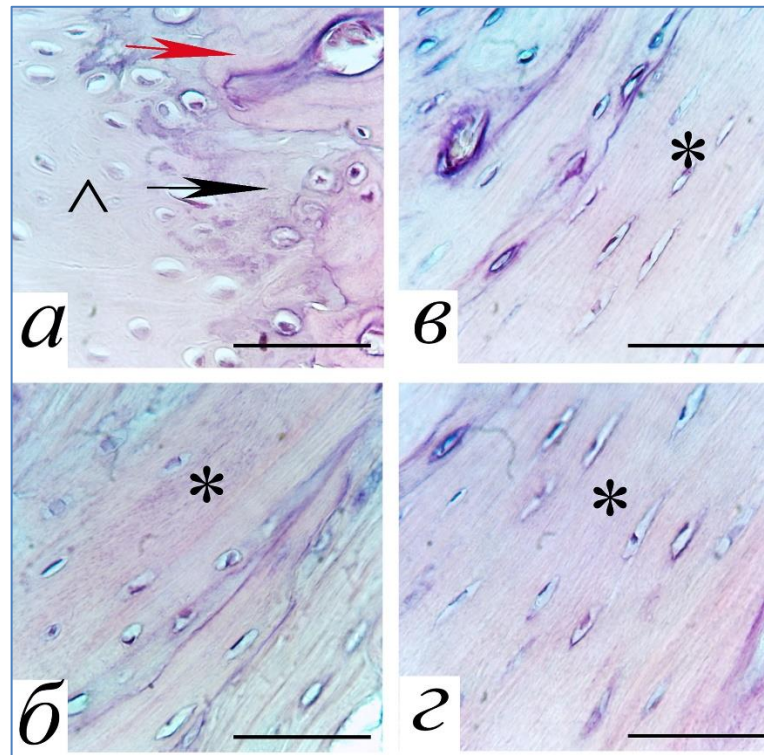
Примечание: звездочка – хрящевая ткань, стрелки – незрелая губчатая костная ткань.

Рисунок 38 – Зона костной мозоли локтевой кости через 6 мес. после перелома у животного группа IV. Гистограмма распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани. Окраска по Ван Гизону (а) и гематоксилин-эозином (б).

Ув. 400, шкала – 1 000 мкм.

Таким образом, через 4 и 6 мес. после перелома локтевой кости во всех группах мягкая костная мозоль была представлена в основном незрелой губчатой костью и хрящевой тканью. На препаратах она выглядела как рыхлая, ячеистая структура с обилием клеток (Рисунки 36, 39 и 40). Твердая костная мозоль формировалась из зрелой пластинчатой кости. Она имела более упорядоченную структуру по сравнению с мягкой мозолью, с четко выраженными остеонами и компактной организацией (Рисунок 39 а, б). При окраске гематоксилин-эозином

зрелая кость окрашивалась в более темные оттенки розового или красного цвета из-за высокой минерализации и наличия коллагена. В твердой костной мозоли преобладали остециты, расположенные в лакунах, а также остеобласты на поверхности кости. Остеокласты встречались на границе между старой и новой костной тканью, где происходит ремоделирование.



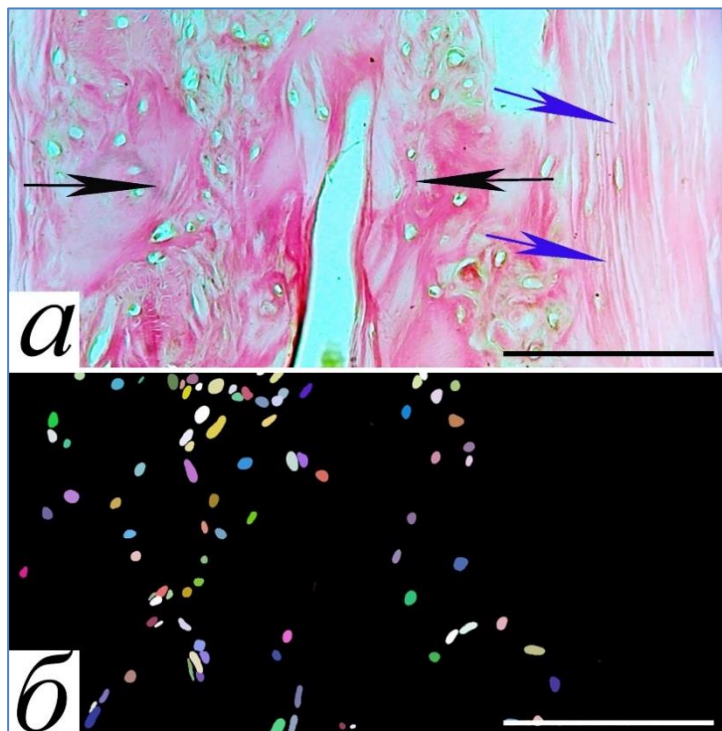
Примечание: звездочка – зрелая пластинчатая костная ткань, черная стрелка – незрелая губчатая костная ткань, красная стрелка – остеон с кровеносным сосудом.

Рисунок 39 – Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 (а, б) и 6 (в, г) мес. после перелома у крыс группы IV.

Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 100, шкала – 50 мкм.

Через 6 мес. после травмы процесс ремоделирования не завершился, но был более выраженным у животных группы III и IV (Рисунок 39 в, г). В зрелой костной ткани происходила более глубокая минерализация, что, вероятно, делало ее прочной и устойчивой к механическим нагрузкам. Зрелая костная ткань (пластинчатая) имела упорядоченную структуру, состоящую из остеонов

(структурных единиц), которые формировали концентрические цилиндры вокруг центрального канала (Рисунок 39 а). Коллагеновые волокна пластинчатой ткани располагались в определенном порядке, что придавало прочность и устойчивость (Рисунок 40 а). Кроме того, в участках сохранившейся хрящевой ткани животных групп III и IV выявлялись мощные пучки коллагеновых волокон вокруг лакун с бластными клетками (Рисунок 41). Вероятно, именно за счет этой конгломерации формировалась сначала губчатая незрелая, а затем и зрелая пластинчатая костная ткань. При этом использование модифицированных МСК оказывало положительное влияние на неоостеогенез.



Примечание: В участках незрелой ткани многочисленные лакуны. Синяя стрелка – зрелая пластинчатая костная ткань, черная стрелка – незрелая губчатая костная ткань.

Рисунок 40 – Зона костной мозоли локтевой кости (а) и ее маска с выделенными с помощью StarDist лакунами (б), через 6 мес. после травмы, группа IV. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 100 мкм.

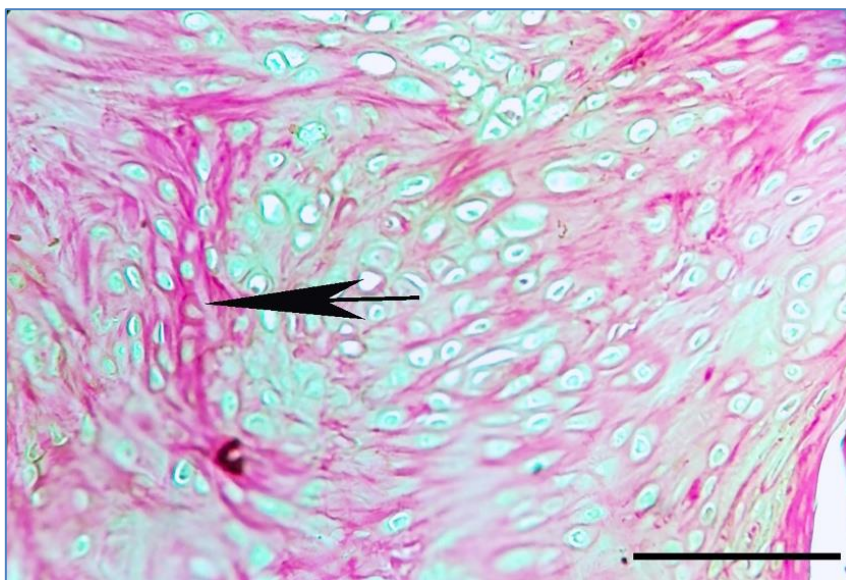


Рисунок 41 – Участок костной мозоли локтевой кости с высоким содержанием коллагеновых волокон (черная стрелка) в хрящевой ткани вокруг лакун, через 6 мес. после травмы, группа IV. Многочисленные лакуны. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 100 мкм.

В ходе данного исследования была проведена оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток, модифицированных малой молекулой CASIN и siRNA, на процесс восстановления костной ткани после перелома диафиза локтевой кости у белых крыс. Результаты показали статистически значимые различия в минеральной плотности костной ткани между группами животных, что указывает на важность терапии с использованием модифицированных МСК для улучшения процессов остеогенеза.

У животных, не получавших лечения (группа I), наблюдалось снижение минеральной плотности. В то же время, у животных группы III, получавших МСК, модифицированные CASIN, была зафиксирована статистически значимая положительная динамика – увеличение плотности. Наиболее выраженное увеличение наблюдалось в группе IV, где использовались МСК, трансфицированные siRNA. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что терапевтическое снижение активности Cdc42 в МСК способствует минерализации костной мозоли.

Гистологическое сравнение через 4 и 6 мес. после травмы показало, что максимальное количество зрелой костной ткани формировалось у животных групп III и IV. При этом у группы II, получавшей немодифицированные МСК, наблюдалось преобладание незрелой губчатой костной ткани. Эти результаты подчеркивают важность модификации МСК для достижения оптимальных результатов в восстановлении костной ткани.

Зрелая костная ткань имела упорядоченную структуру с четко выраженными остеонами и высокой минерализацией, что делает ее прочной и устойчивой к механическим нагрузкам. В то время как незрелая губчатая кость характеризовалась хаотичным расположением коллагеновых волокон и высоким содержанием клеток.

Использование модифицированных МСК оказывало значительное положительное влияние на неоостеогенез, способствуя формированию как мягкой, так и твердой костной мозоли. Это подтверждается гистологическими данными о наличии мощных пучков коллагеновых волокон вокруг лакун в зрелой костной ткани.

Заключение

Использование модифицированных МСК оказывало значительное положительное влияние на неоостеогенез, способствуя формированию как мягкой, так и твердой костной мозоли. Это подтверждается гистологическими данными о наличии мощных пучков коллагеновых волокон вокруг лакун в зрелой костной ткани. Зрелая костная ткань имела упорядоченную структуру с четко выраженными остеонами и высокой минерализацией, что делает ее прочной и устойчивой к механическим нагрузкам. В то время как незрелая губчатая кость характеризовалась хаотичным расположением коллагеновых волокон и высоким содержанием клеток. Гистологическое сравнение через 4 и 6 мес. после травмы показало, что максимальное количество зрелой костной ткани формировалось у животных групп III и IV. При этом у группы II, получавшей

немодифицированные МСК, наблюдалось преобладание незрелой губчатой костной ткани.

Таким образом, результаты исследования подчеркивают эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток, модифицированных по активности Cdc42, для улучшения процессов восстановления костной ткани после переломов. Эти данные открывают новые перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению остеопороза и других заболеваний, связанных с нарушением регенерации костной ткани.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На данный момент для регенерации костных дефектов существует ряд перспективных подходов, включая классические аутологичные костные трансплантаты, а также инновационные методы с применением факторов роста и синтетических скаффолдов [Baksh D. et al., 2007; Nakase T. et al., 2009; Hernlund E. et al., 2013; Aryal R. et al., 2014; D'Souza S. et al., 2014; Safarova Y. et al., 2020]. Тем не менее, заживление переломов – это сложный процесс регенерации костной ткани, который зависит от возраста и наличия остеопороза. В последние годы были получены данные, свидетельствующие о том, что регенерация костной ткани на фоне остеопороз-ассоциированных переломов заметно отличается от здоровой, и это может иметь важное значение при оценке влияния нового перспективного подхода лечения остеопороз-ассоциированных переломов [Cranney A. et al., 2002; Hernlund E. et al., 2013]. Таким образом, разработка эффективных методов стимулирования процессов регенерации костной ткани в зоне замедленного сращения переломов при остеопорозе и схожих патологиях является одним из приоритетных направлений в современной науке и медицине.

В настоящее время существует несколько методов лечения остеопороза, но наиболее распространенным являются лекарства на основе бисфосфонатных соединений [Rogers M. J. et al., 2000; Santini D. et al., 2003; Rogers M. J. et al., 2020; Bastounis A. et al., 2022]. Бисфосфонаты являются аналогами пирофосфатов ($\text{H}_2\text{O}_3\text{P}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$), где центральная гидролитически лабильная P-O-P связь заменена на гидролизоустойчивую P-C-P группу. Они взаимодействуют в селективном порядке с гидроксипатитными группами на резорбтивной поверхности костной ткани, снижают метаболизм и функциональную активность остеокластов, тем самым уменьшая скорость резорбции костной ткани, а также стимулируют образование новой кости. Препараты на основе бисфосфонатов применяются в медицинской практике не только для лечения остеопороза, но и таких заболеваний как болезнь Педжета и малигнантная гиперкальциемия.

Бисфосфонаты также способны подавлять остеолитическую способность раковых клеток в костных тканях [Bastounis A. et al., 2022].

Снижение плотности и прочности кости при остеопорозе происходит не только из-за усиления функциональной активности остеокластов, но также в результате снижения количества клеток-предшественников остеобластов и развития так называемой «остеогенной недостаточности», и как следствие, невозможности обеспечения надлежащего уровня остеорепарации. В этой связи одним из многообещающих направлений в лечении остеопороз-зависимых переломов, может быть, клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками, являющимся предшественниками остеобластов [Cho S. W. et al., 2009; Teitelbaum S. L., 2010; Lin W. et al., 2017]. Описан способ лечения остеопороза, характеризующийся тем, что пациенту проводят внутривенное введение биотрансплантата, содержащего от 50 до 500 млн МСК [Yamada Y. et al., 2003]. Другим вариантом подхода является инъекционная имплантация в зону костного повреждения культивированных аутологичных или аллогенных мезенхимальных полипотентных стволовых клеток для улучшения процессов репаративного остеогенеза [Tasso R. et al., 2013; Huang S. et al., 2015; Singh J., Onimowo J. O., Khan W. S., 2015]. Недостатками данных методов является отсутствие аффинности МСК к костной ткани и отсутствие эффекта ингибирования резорбтивной активности остеокластов трансферной радикальной полимеризации, что дает нам возможность контролировать количество встраиваемых бисфосфонатных групп, и соответственно, эффективность связывания полимера с костью; данный процесс также позволяет контролировать финальную длину полимера, что может быть решающим фактором, определяющим биологическую активность бисфосфонатов. Тем не менее, главная новизна метода заключается в применении клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками, функционализированных полимером, имеющим в своем составе активные бисфосфонатные группы. Данный полимер, во-первых, обеспечивает стабильное связывание МСК с поверхностью костной ткани, увеличивая, таким образом, пул клеток-предшественников остеобластов в зоне перелома, и, во-вторых,

предотвращает деминерализацию костной ткани путем ингибирования резорбтивной активности остеокластов.

Проведенные доклинические исследования на лабораторных животных свидетельствуют о том, что предлагаемый метод является безопасным и значительно ускоряет скорость регенерации костной ткани при патологических переломах. Результаты проведенных доклинических исследований могут быть использованы в качестве базисной модели Протокола клинических испытаний. Мы полагаем, что применение методов клеточной терапии МСК, функционализированных остеофильным полимером, позволят улучшить результаты лечения остеопороз-ассоциированных и других низко-энергических травматических переломов, сократить сроки лечения и снизить процент инвалидизации среди пациентов данной категории.

В связи с вышесказанным, разработанный нами метод стимулирования регенеративных процессов в зоне сращения костных переломов с применением клеточной терапии и остеофильного полимера в качестве «таргетной транспортной платформы» обладает рядом преимуществ. Во-первых, для синтеза полимеров мы используем контролируемую реакцию атомной трансферной радикальной полимеризации, что дает нам возможность контролировать количество встраиваемых бисфосфонатных групп, и соответственно, эффективность связывания полимера с костью; данный процесс также позволяет контролировать финальную длину полимера, что может быть решающим фактором, определяющим биологическую активность бисфосфонатов. Тем не менее, главная новизна метода заключается в применении клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками, функционализированными полимером, имеющим в своем составе активные бисфосфонатные группы. Данный полимер, во-первых, обеспечивает стабильное связывание МСК с поверхностью костной ткани, увеличивая, таким образом, пул клеток-предшественников остеобластов в зоне перелома, и, во-вторых, предотвращает деминерализацию костной ткани путем ингибирования резорбтивной активности остеокластов. Проведенные доклинические исследования на лабораторных животных свидетельствуют о том,

что предлагаемый метод является безопасным и значительно ускоряет скорость регенерации костной ткани при патологических переломах. Результаты проведенных доклинических исследований могут быть использованы в качестве базисной модели Протокола клинических испытаний. Мы полагаем, что применение методов клеточной терапии МСК, функционализированных остеофильным полимером, позволят улучшить результаты лечения остеопороз-ассоциированных и других низко-энергических травматических переломов, сократить сроки лечения и снизить процент инвалидизации среди пациентов данной категории.

Задержка заживления переломов при эстрогенозависимым остеопорозе связана с увеличением активности остеокластов и снижением числа мезенхимальных стволовых клеток [Tasso R. et al., 2013; Huang S. et al., 2015; Singh J. et al., 2015]. В этом контексте трансплантация МСК представляет собой многообещающий подход к лечению заболеваний костей, особенно в условиях, связанных с возрастом, таких как остеопороз [Teitelbaum S. L., 2010; Ma S. et al., 2014].

Однако изоляция клинически значимого числа аутологичных МСК у пожилых людей является проблематичной, и клетки необходимо накапливать и размножать *in vitro*. В свою очередь, *in vitro* МСК изменяет профиль их поверхностных рецепторов и влияет на их способность к гомингу (перемещению к месту действия) по сравнению с только что изолированными МСК [Yao W., Lane N. E., 2015], кроме того, трансплантированные МСК имеют тенденцию мигрировать к участкам аномальной клеточной пролиферации. Чтобы преодолеть эти ограничения, мы добавили к МСК костно-ориентированную группу с помощью мембранной инженерии с использованием полимеров, содержащих бисфосфонаты, которые обладают высокой аффинностью к гидроксиапатиту. Покрытие МСК полимером позволило клеткам специфически связываться с компонентом НА (гидроксиапатит) кости. В *in vitro* исследованиях полимер оказался не цитотоксичным и не препятствовал дифференцированному потенциалу МСК. Кроме того, бисфосфонаты также ингибируют фермент

фарнезилпирофосфатсинтазу, который является ключевым ферментом в метаболизме остеокластов. Группы алендроната в полимере сохраняли свою функциональную активность по сравнению с терапевтическими дозами коммерчески доступных аналогов алендроната.

Для оценки потенциала регенерации переломов МСК, покрытых костно-ориентированным полимером в остеопоротических условиях, мы создали модель эстрогенозависимого остеопороза с помощью овариоэктомии. Существуют различные модели животных, которые имитируют постменопаузальный эстрогенозависимый остеопороз типа I и возрастной остеопороз типа II. Поскольку большинство остеопоротических состояний соответствуют эстрогенозависимому типу, модель овариоэктомии обычно принимается и одобрена FDA.

Мы также разработали модель несращения костного перелома, созданного путем остеотомии локтевой кости. Ожидается, что несращение костного перелома у здоровых крыс восстановит свои биомеханические свойства через 4 недели и полностью заживет к 12 неделям [Сафарова Ю. И. и др., 2019].

Однако остеопоротическое состояние задерживает восстановление перелома. Согласно имеющимся исследованиям [Namkung-Matthai H. et al., 2001], остеопороз влияет на заживление перелома на ранней стадии и приводит к снижению плотности кости на 23 % и уменьшению образования костного каллюса через 3 недели после перелома. К 12 неделям радиологический и гистологический анализы выявили снижение плотности костной ткани и уменьшение количества каллюса, что нарушило формирование волокнистой кости. В соответствии с опубликованными исследованиями наши результаты показали, что плотность кости в контрольной группе снизилась на 8.6 % через 4 недели и упала еще больше до 26.3 % через 24 недели.

Группа животных, получившая только бисфосфонатный полимер, показала аналогичное снижение плотности кости на 15,5 % через 4 недели, однако затем произошло резкое снижение на 37,9 % через 24 недели. Тем не менее, эти данные не являются статистически значимыми и требуют дальнейшего изучения. В свою

очередь, инъекция обычных МСК привела к незначительному снижению плотности кости через 4 недели, но к 24 неделям плотность кости достигла такого же снижения на 40,4 %, как в группе с полимером. Эти данные могут указывать на то, что МСК оказали некоторый положительный эффект сразу после инъекции, но не имели пролонгированного действия. Напротив, группа животных, получившая покрытые МСК, показала выраженное статистически значимое увеличение плотности кости (27,4 %) в зоне перелома через 4 недели. Долгосрочный эффект инъекции полимер-модифицированных МСК привел к постоянному поддержанию плотности кости на уровне 21,5 %, наблюдаемому через 24 недели, хотя гистологическая картина не улучшилась значительно по сравнению с 4 неделями. Это может быть следствием продолжающегося остеопоротического процесса, так как мы прекратили лечение после четвертой недели.

Заживление перелома обычно проходит в три фазы. Первая фаза носит реактивный характер и характеризуется образованием гематомы перелома, воспалением и формированием грануляционной ткани. Во время второй репаративной фазы коллагеновые волокна соединяют сломанные концы костей, в то время как остеобласты начинают формировать губчатую кость. На этом этапе могут также появляться некоторые шипики (спикула). Образующийся фиброкартилагинозный каллюс преобразуется в жесткую кальцинированную ткань (волокистую кость) путем эндохондральной оссификации. Последняя фаза — это ремоделирование костей, во время которого кость восстанавливается до своей исходной формы, структуры и механической прочности.

В нашем исследовании гистологическая оценка контрольной группы через 4 недели продемонстрировала некоторые признаки ранних репаративных процессов с наличием фиброзного соединения старых фрагментов костей. Группы II и III имели дополнительные доказательства минерализации и формирования костных шипиков, в то время как группа с полимерно-покрытыми МСК показала активную остеогенезу с образованием фиброкартилагинозного каллюса. Хотя мы не наблюдали полного заживления перелома ни в одной из групп через 24 недели,

наиболее выраженное образование волокнистой кости было отмечено в группе IV. Мы предположили, что модификация поверхности бисфосфонатными группами усиливает процесс регенерации двумя способами: во-первых, увеличивая рекрутирование трансплантированных МСК к местам повреждения костей, обеспечивая тем самым факторы роста и потенциальную дифференциацию в остеобласты; во-вторых, нарушая функциональную активность остеокластов и тем самым уменьшая процесс резорбции костей.

В нашем исследовании мы продемонстрировали, что использование МСК, покрытых синтетическим бисфосфонатным полимером для таргетирования костей, является более эффективным методом стимуляции репаративной остеогенезы в зоне задержанного сращения остеопоротических переломов по сравнению с лечением немодифицированными МСК. Таким образом, этот комбинированный подход с использованием полимера и трансплантации клеток демонстрирует перспективы и требует дальнейшего изучения безопасности биологических материалов и клинических испытаний.

Известно, что активность гена *Cdc42* повышается при некоторых хронических заболеваниях, связанных с возрастом, опухолями и активации клеточных сигнальных путей, ассоциированных со старением [Umbayev B. et al., 2018, 2023].

В ходе данного исследования была проведена оценка эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток, модифицированных малой молекулой CASIN и siRNA, на процесс восстановления костной ткани после перелома диафиза локтевой кости у белых крыс. Результаты показали статистически значимые различия в минеральной плотности костной ткани между группами животных, что указывает на важность терапии с использованием модифицированных МСК для улучшения процессов остеогенеза.

У животных, не получавших лечения (группа I), наблюдалось снижение минеральной плотности. В то же время, у животных группы III, получавших МСК, модифицированные CASIN, была зафиксирована статистически значимая положительная динамика – увеличение плотности. Наиболее выраженное

увеличение наблюдалось в группе IV, где использовались МСК, трансфицированные siRNA. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что терапевтическое снижение активности Cdc42 в МСК способствует минерализации костной мозоли.

Гистологическое сравнение через 4 и 6 мес. после травмы показало, что максимальное количество зрелой костной ткани формировалось у животных групп III и IV. При этом у группы II, получавшей немодифицированные МСК, наблюдалось преобладание незрелой губчатой костной ткани. Эти результаты подчеркивают важность модификации МСК для достижения оптимальных результатов в восстановлении костной ткани.

Зрелая костная ткань имела упорядоченную структуру с четко выраженными остеонами и высокой минерализацией, что делает ее прочной и устойчивой к механическим нагрузкам. В то время как незрелая губчатая кость характеризовалась хаотичным расположением коллагеновых волокон и высоким содержанием клеток.

Использование модифицированных МСК оказывало значительное положительное влияние на неоостеогенез, способствуя формированию как мягкой, так и твердой костной мозоли. Это подтверждается гистологическими данными о наличии мощных пучков коллагеновых волокон вокруг лакун в зрелой костной ткани.

Исходя из наших результатов возможными механизмами повышения эффективности клеточной терапии могут быть усиление остеобластной дифференциации МСК, повышение миграционного потенциала и подавление активности остеокластов.

Однако, возможно, что на уровне *in vivo* позитивные эффекты ингибирования Cdc42 в трансплантированных МСК могут быть связаны с секретомом МСК. Предполагается, что до 80 % терапевтического эффекта МСК, вероятно, опосредовано паракринными механизмами [Múzes G., Sipos F., 2022]. Кроме того, данные последних лет свидетельствуют о том, что стареющие клетки секретируют ряд матриксных металлопротеиназ и воспалительных цитокинов и

хемокинов, которые могут изменять структуру окружающих тканей и вызывать локальное воспаление [Ohtani N. 2022; Siraj Y. et al., 2023]. Этот феномен получил название секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP) [Siraj Y. et al., 2023]. В этом отношении интересно, что ингибирование Cdc42 пожилых человеческих МСК с помощью ML141 значительно меняет профили цитокинов [Chaker D. et al., 2018], а также что симвастатин снижает SASP стареющих клеток за счет снижения активности Cdc42 [Langert K. A. et al., 2013].

Таким образом, результаты исследования подчеркивают эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток, модифицированных по активности Cdc42, для улучшения процессов восстановления костной ткани после переломов. Эти данные открывают новые перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению остеопороза и других заболеваний, связанных с нарушением регенерации костной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение остеопороз-ассоциированных переломов представляет собой одну из ключевых проблем современной медицины и регенеративной биологии. Остеопороз является широко распространённым заболеванием, особенно среди пожилых людей, и характеризуется снижением минеральной плотности кости и ухудшением её структурной целостности, что приводит к повышенному риску переломов и значительному снижению качества жизни пациентов. Традиционные методы лечения, такие как применение бисфосфонатов, обладают определёнными ограничениями, включая необходимость длительного приёма, риск побочных эффектов и недостаточную эффективность при тяжёлых формах остеопороза. В связи с этим, разработка новых стратегий клеточной терапии, направленных на регенерацию костной ткани, является актуальной задачей.

В последние годы значительное внимание уделяется применению мезенхимальных стволовых клеток, обладающих высокой способностью к пролиферации, остеогенной дифференцировке и модуляции костного ремоделирования. Однако возрастные изменения, а также низкое сродство мезенхимальных стволовых клеток к костной ткани требуют разработки новых подходов к их модификации для повышения эффективности терапии.

Настоящая диссертационная работа посвящена изучению морфофункциональных особенностей репаративной регенерации костной ткани при использовании модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных остеофильным бисфосфонатным полимером и ингибированных по Cdc42. Проведённое исследование направлено на решение проблемы остеопороз-ассоциированных переломов, особенно у возрастных пациентов, у которых стандартные терапевтические подходы не всегда обеспечивают удовлетворительные результаты.

Проведённые исследования продемонстрировали эффективность двух подходов, направленных на стимуляцию процессов костной регенерации:

использование остеофильного полимера и трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК), модифицированных с ингибированием Cdc42.

Остеофильный полимер проявил выраженные антиостеокластные свойства *in vitro*, снижая резорбтивную активность остеокластов в дозозависимой манере, при этом не оказывая токсического воздействия на мезенхимальные стволовые клетки и не нарушая их остеогенную дифференцировку. В условиях *in vivo* локальное применение остеофильного полимера способствовало улучшению репаративного остеогенеза, повышению плотности костной ткани и восстановлению костной структуры при моделировании эстроген-зависимого остеопороза.

Отдельно проведённые эксперименты с мезенхимальными стволовыми клетками, подвергнутыми ингибированию белка Cdc42 с использованием CASIN и siRNA, показали, что такая модификация усиливает остеогенные, миграционные и антиостеокластные свойства клеток у старых животных. Трансплантация модифицированных мезенхимальных стволовых клеток привела к значительному усилению неоостеогенеза, более высокой плотности костной ткани, улучшенной архитектонике костной мозоли и восстановлению клеточного пула остео-и хондрогенных клеток на поздних этапах регенерации.

Таким образом, оба подхода продемонстрировали высокий потенциал для применения в восстановительной медицине и лечении нарушений костной регенерации, в том числе возрастных и гормонально обусловленных форм остеопороза. Полученные результаты могут стать основой для дальнейшей разработки персонализированных и клеточно-ориентированных терапевтических стратегий.

ВЫВОДЫ

1. Остеогенный полимер не оказывает токсического эффекта на культуру мезенхимальных стволовых клеток и не влияет на процессы остеогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток *in vitro*. Полимер ингибирует резорбтивную активность остеокластов в условиях *in vitro* прямо пропорционально своей концентрации – 0,5 мг/мл уменьшает резорбтивную активность на 50 %, а в концентрации 2 мг/мл – на 85 %. Результаты количественного анализа показывают, что концентрация полимера обратно пропорциональна площади резорбированной поверхности.

2. Использование мезенхимальных стволовых клеток после воздействия на них полимера значительно улучшает процесс репаративного остеогенеза с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата, происходит увеличение плотности костной ткани на 27,4 % через 4 недели после остеотомии локтевой кости у самок крыс с эстроген-зависимым остеопорозом.

3. Ингибирование Cdc42 с помощью CASIN и siRNA приводит к повышению остеогенного, миграционного и антиостеокластного потенциала мезенхимальных стволовых клеток, выделенных у возрастных животных (24 месяца).

4. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток после ингибирования Cdc42 повышает плотность кости по сравнению с контролем, причем наибольший эффект проявляется у мезенхимальных стволовых клеток при воздействии CASIN (на 44 %) и введении siRNA (на 93 %) – через четыре месяца после остеотомии диафиза локтевой кости у возрастных крыс.

5. Выраженные качественные и количественные показатели восстановления пула предшественников хондробластов и остеобластов, а также хондроцитов и остеоцитов в зоне перелома, происходит при использовании мезенхимальных стволовых клеток трансфицированных siRNA через четыре и шесть месяцев после остеотомии диафиза локтевой кости у возрастных крыс.

6. С помощью гистологического морфометрического исследования, зоны повреждения локтевой кости, установлено статистически значимое влияние локального использования остеофильного полимера. Сочетание модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 на гистоархитектонику провизорной и окончательной костной мозоли усилило дифференцировку бластных клеток, их пролиферативный потенциал, образование коллагена и его минерализацию.

7. Использование модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 оказывало значительное влияние на неоостеогенез, способствуя формированию как мягкой, так и твердой костной мозоли, включающих увеличение в 1,2–1,3 раза пучков коллагеновых волокон вокруг лакун в зрелой костной ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для снижения активности белка Cdc42 рекомендовано использовать МСК с малой молекулой CASIN и трансфицированные siRNA, что увеличивает остеогенный потенциал дифференцировки, а также миграцию МСК и их антиостеокластное действие.
2. Рекомендуется использование мезенхимальных стволовых клеток после воздействия на них остефильного полимера, что значительно улучшает процесс репаративного остеогенеза с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата (на 27,4% увеличивается плотность костной ткани).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ-аза – фермент, гидролизующий гуанозинтрифосфат

ЖТ-МСК – жировые мезенхимальные стволовые клетки

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

МСК-ЖТ – мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани

ОТ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

ФсБР – фосфатно-солевой буферный раствор

ADMSCs – жировые мезенхимальные стволовые клетки

ALP – щелочная фосфатаза

ATRP – радикальная полимеризация с переносом атома

BMP-2 – костный морфогенетический белок 2

CASIN – малая молекула, ингибитор Cdc42

CD31 – маркер эндотелиальных клеток

CD34 – маркер гемопоэтических стволовых клеток

CD45 – маркер лейкоцитов

CD90 – маркер мезенхимальных стволовых клеток

CD105 – маркер мезенхимальных стволовых клеток

Cdc42 – малая ГТФаза семейства Rho

DAPI – краситель для окрашивания ядер клеток

DICOM – стандарт медицинской визуализации

DMEM – среда Дульбекко для культивирования клеток

DMAA – N,N-диметилакриламид

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EN-1500 – европейский стандарт для дезинфицирующих средств для рук

ERK1/2 – внеклеточно-регулируемые киназы 1/2

FBS – фетальная бычья сыворотка

G-LISA (GTPase Activation Assay) – анализ активации GTPаз

GDP – гуанозиндифосфат

GEF – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
GPLC – гель-проникающая жидкостная хроматография
GTP – гуанозинтрифосфат
HSC – гемопоэтические стволовые клетки
IFA – иммуноферментный анализ
JAK/STAT3 – сигнальный путь Янус-киназ и активатора транскрипции 3
JNK – c-Jun N-концевые киназы
LINC00339 – длинная некодирующая РНК, регулирующая экспрессию Cdc42
LVT-Luc2 – лентивирусные частицы люциферазы светлячков
M-CSF – макрофагальный колониестимулирующий фактор
NHS – N-гидроксисукцинимид
OPC – клетки-предшественники остеокластов
OPG – остеопротегерин
OVX – билатеральная овариэктомия
PBS – фосфатно-солевой буферный раствор
PIT assay – анализ резорбции остеокластов
RANKL – лиганды рецептора активатора ядерного фактора каппа-B
RANKL/M-CSF – сигнальный путь дифференцировки остеокластов
rs6426749 – однонуклеотидный полиморфизм, ассоциированный с остеопорозом
siRNA – малая интерферирующая РНК
Stealth siRNA – модифицированные малые интерферирующие РНК
TGFbeta – трансформирующий фактор роста бета
TNT – туннельные нанотрубки
TRAP – тартрат-резистентная кислая фосфатаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровиков, В. Статистика. Искусство анализа данных на компьютере / В. Боровиков. – 2-е изд. – Санкт-Петербург : Питер, 2003. – 688 с.
2. Влияние костно-анаболической терапии на параметры костного ремоделирования и плотность кости у гериатрических пациентов с остеопорозом и синдромом падений / Н. О. Ховасова, Е. Н. Дудинская, А. В. Наумов [и др.] // Проблемы Эндокринологии. – 2022. – Т. 68. – № 3. – С. 67–75.
3. Влияние путей и доз введения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток на эффективность клеточной терапии / Н. В. Пак, Е. В. Мурзина, Н. В. Аксенова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2024. – Т. 26. – № 2. – С. 126–134.
4. Возрастные аспекты регенерации костной ткани / А. В. Нестеров, Т. В. Павлова, Л. А. Павлова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 7. – С. 120–123.
5. Возрастные особенности репаративного остеогенеза челюстей / А. К. Иорданишвили, А. Г. Слугина, Д. В. Балин, А. А. Сериков // Человек и его здоровье. – 2014. – № 3. – С. 15–20.
6. Мкртумян, А. М. Бифосфонаты в терапии остеопороза / А. М. Мкртумян, Е. В. Бирюкова // Проблемы Эндокринологии. – 2008. – Т. 54. – № 3. – С. 51–54.
7. Олжаев, Ф. С. Морфологическая характеристика зоны перелома локтевой кости крыс на фоне терапии модифицированными мезенхимальными стволовыми клетками при экспериментальном остеопорозе / Ф. С. Олжаев, В. А. Акулинин, Б. А. Умбаев // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2024. – Т. 13. – № 3. – С. 49–59.
8. Олжаев, Ф. С. Морфофункциональные особенности восстановления костной ткани при локальном использовании мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 / Ф. С. Олжаев, Б. А. Умбаев, В. А. Акулинин // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2024. – Т. 13. – № 4. – С. 36–44.

9. Остеопороз у пожилых пациентов / Е. Н. Дудинская, Н. В. Браилова, В. А. Кузнецова, О. Н. Ткачева // Остеопороз и остеопатии. – 2019. – Т. 22. – № 3. – С. 34–40.
10. Сафарова, Ю. И. Перспективные подходы лечения низкоэнергических травматических повреждений костной ткани с использованием методов биоинженерии и клеточной терапии / Ю. И. Сафарова, Ф. С. Олжаев, Б. А. Умбаев // Наука и Здравоохранение. – 2019. – Т. 5. – № 21. – С. 68–80.
11. Соловьев, Г. С. Принцип провизорности как универсальный механизм эволюционирования гисто- и органогенезов / Г. С. Соловьев, В. Л. Янин, С. М. Пантелеев // Фундаментальные исследования. – 2005. – Т. 9. – С. 32–34.
12. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза / Ж. Е. Белая, К. Ю. Белова, Е. В. Бирюкова [и др.] // Остеопороз и остеопатии. – 2021. – Т. 24. – № 2. – С. 4–47.
13. A Wnt5a-Cdc42 axis controls aging and rejuvenation of hair-follicle stem cells / R. L. Tiwari, P. Mishra, N. Martin [et al.] // bioRxiv. – 2020. – С. 2020.10.22.351544.
14. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization / M. Arana, M. Mazo, P. Aranda [et al.] // Methods in molecular biology. – 2013. – Т. 1036. – С. 47–61.
15. Aged murine hematopoietic stem cells drive aging-associated immune remodeling / H. Leins, M. Mulaw, K. Eiwien [et al.] // Blood. – 2018. – Т. 132. – № 6. – С. 565–576.
16. Ageing attenuates bone healing by mesenchymal stem cells in a microribbon hydrogel with a murine long bone critical-size defect model / H. Hirata, N. Zhang, M. Ueno [et al.] // Immunity & Ageing. – 2022. – Т. 19. – № 1. – С. e14.
17. Aging of human hematopoietic stem cells is linked to changes in Cdc42 activity / A. Amoah, A. Keller, R. Emini [et al.] // Haematologica. – 2022. – Т. 107. – № 2. – С. 393–402.

18. Altered Gene Expression in Articular Chondrocytes of Smad3ex8/ex8 Mice, Revealed by Gene Profiling Using Microarrays / H. Wang, J. Zhang, Q. Sun, X. Yang // *Journal of Genetics and Genomics*. – 2007. – T. 34. – № 8. – C. 698–708.
19. An Osteoporosis Risk SNP at 1p36.12 Acts as an Allele-Specific Enhancer to Modulate LINC00339 Expression via Long-Range Loop Formation / X.-F. Chen, D.-L. Zhu, M. Yang [et al.] // *American journal of human genetics*. – 2018. – T. 102. – № 5. – C. 776–793.
20. Assessing the Effectiveness of Bisphosphonates for the Prevention of Fragility Fractures: An Updated Systematic Review and Network Meta-Analyses / A. Bastounis, T. Langley, S. Davis [et al.] // *JBMR Plus*. – 2022. – T. 6. – № 5. – C. e10620.
21. Association of Alcohol Intake and Fracture Risk in Elderly Varied by Affected Bones: A Nationwide Longitudinal Study. / S.-M. Wang, K.-D. Han, N.-Y. Kim [et al.] // *Psychiatry investigation*. – 2020. – T. 17. – № 10. – C. 1013–1020.
22. Baksh, D. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow / D. Baksh, R. Yao, R. S. Tuan // *Stem Cells*. – 2007. – T. 25. – № 6. – C. 1384–1392.
23. Beljan, S. Rho Family of Ras-Like GTPases in Early-Branching Animals / S. Beljan, M. Herak Bosnar, H. Četković // *Cells*. – 2020. – T. 9. – № 10. – C. e2279.
24. Bhatnagar, A. Postmenopausal Osteoporosis: A Literature Review / A. Bhatnagar, A. L. Kekatpure // *Cureus*. – 2022. – T. 14. – № 9. – C. e29367.
25. Bigham-Sadegh, A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures / A. Bigham-Sadegh, A. Oryan // *International wound journal*. – 2015. – T. 12. – № 3. – C. 238–247.
26. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats / J. R. Funk, J. E. Hale, D. Carmines [et al.] // *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. – 2000. – T. 18. – № 1. – C. 126–132.

27. Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Bone Tissue Regeneration: New Insight and Perspectives / R. Aryal, X. Chen, C. Fang, Y. Hu // *Orthopaedic Surgery*. – 2014. – T. 6. – № 3. – C. 171–178.
28. Bone Regeneration Using Mesenchymal Stromal Cells and Biocompatible Scaffolds: A Concise Review of the Current Clinical Trials / F. Re, E. Borsani, R. Rezzani [et al.] // *Gels*. – 2023. – T. 9. – № 5. – C. e389.
29. Bone Regeneration with Mesenchymal Stem Cells in Scaffolds: Systematic Review of Human Clinical Trials / A. M. Theodosaki, M. Tzemi, N. Galanis [et al.] // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2024. – T. 20. – № 4. – C. 938–966.
30. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions / E. Gómez-Barrena, P. Rosset, D. Lozano [et al.] // *Bone*. – 2015. – T. 70. – C. 93–101.
31. Bone fracture healing: perspectives according to molecular basis. / I. N. Camal Ruggieri, A. M. Cícero, J. P. M. Issa, S. Feldman // *Journal of bone and mineral metabolism*. – 2021. – T. 39. – № 3. – C. 311–331.
32. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold / Y. Yamada, J. Seong Boo, R. Ozawa [et al.] // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. – 2003. – T. 31. – № 1. – C. 27–33.
33. Cdc42 Activity Regulates Hematopoietic Stem Cell Aging and Rejuvenation / M. C. Florian, K. Dörr, A. Niebel [et al.] // *Cell stem cell*. – 2012. – T. 10. – № 5. – C. 520–530.
34. Cdc42 Is Critical for Cartilage Development During Endochondral Ossification / W. Suzuki, A. Yamada, R. Aizawa [et al.] // *Endocrinology*. – 2015. – T. 156. – № 1. – C. 314–322.
35. Cdc42 Is Essential for Both Articular Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Deterioration in Experimental Osteoarthritis / X. Hu, X. Ji, M. Yang [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2018. – T. 33. – № 5. – C. 945–958.
36. Cdc42 in osterix-expressing cells alters osteoblast behavior and myeloid lineage commitment / F. Wirth, K. Huck, A. Lubosch [et al.] // *Bone*. – 2021. – T. 153. – C. e116150.

37. Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development / R. Aizawa, A. Yamada, D. Suzuki [et al.] // *Mechanisms of Development*. – 2012. – T. 129. – № 1. – C. 38–50.
38. Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulating RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization / Y. Ito, S. L. Teitelbaum, W. Zou [et al.] // *J Clin Invest*. – 2010. – T. 120. – № 6. – C. 1981–93.
39. Cdc42-Borg4-Septin7 axis regulates HSC polarity and function / R. Kandi, K. Senger, A. Grigoryan [et al.] // *EMBO reports*. – 2021. – T. 22. – № 12. – C. e52931.
40. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates / M. J. Rogers, S. Gordon, H. L. Benford [et al.] // *Cancer*. – 2000. – T. 88. – № S12. – C. 2961–2978.
41. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells / P. A. Sotiropoulou, S. A. Perez, M. Salagianni [et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – T. 24. – № 2. – C. 462–471.
42. Chehade, M. Low Energy Trauma in Older Persons: Where to Next? / M. Chehade, T. K. Gill, R. Visvanathan // *The open orthopaedics journal*. – 2015. – T. 9. – C. 361–366.
43. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy / V. V. Maldonado, N. H. Patel, E. E. Smith [et al.] // *Journal of biological engineering*. – 2023. – T. 17. – № 1. – C. e44.
44. Comparison of the Donor Age-Dependent and In Vitro Culture-Dependent Mesenchymal Stem Cell Aging in Rat Model / K. Siennicka, A. Zołocińska, T. Dębski, Z. Pojda // *Stem cells international*. – 2021. – T. 2021. – C. e6665358.
45. Donor age and breed determine mesenchymal stromal cell characteristics / E. Heyman, M. Olenic, E. De Vlieghere [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2025. – T. 16. – № 1. – C. e99.
46. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation / M. S. Choudhery, M. Badowski, A. Muise [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2014. – T. 12. – № 1. – C. e8.

47. Drake, M. T. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice / M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla // Mayo Clinic proceedings. – 2008. – T. 83. – № 9. – C. 1032–1045.
48. Dufrane, D. Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering / D. Dufrane // Cell Transplantation. – 2017. – T. 26. – № 9. – C. 1496–1504.
49. Effect of PAK Inhibition on Cell Mechanics Depends on Rac1 / C. T. Mierke, S. Puder, C. Aermes [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – T. 8. – № 9. – C. 1–14.
50. Elevated levels of the small GTPase Cdc42 induces senescence in male rat mesenchymal stem cells / B. Umbayev, A.-R. Masoud, A. Tsoy [et al.] // Biogerontology. – 2018. – T. 19. – № (3-4). – C. 287–301.
51. Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using ATRP synthesis for bone targeting / S. D'Souza, H. Murata, M. V. Jose [et al.] // Biomaterials. – 2014. – T. 35. – № 35. – C. 9447–9458.
52. Ensrud, K. E. Epidemiology of fracture risk with advancing age / K. E. Ensrud // The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences. – 2013. – T. 68. – № 10. – C. 1236–1242.
53. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow / K. Mareschi, I. Ferrero, D. Rustichelli [et al.] // Journal of Cellular Biochemistry. – 2006. – T. 97. – № 4. – C. 744–754.
54. Expression and Activity of the Small RhoGTPase Cdc42 in Blood Cells of Older Adults Are Associated With Age and Cardiovascular Disease / M. C. Florian, J. Klenk, G. Marka [et al.] // The Journals of Gerontology: Series A. – 2017. – T. 72. – № 9. – C. 1196–1200.
55. Festing, M. F. W. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals / M. F. W. Festing, D. G. Altman // ILAR journal. – 2002. – T. 43. – № 4. – C. 244–258.
56. Fleisch, H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action / H. Fleisch // Endocr Rev. – 1998. – T. 19. – № 1. – C. 80–100.

57. Fortier, L. A. Signaling through the small G-protein Cdc42 is involved in insulin-like growth factor-I resistance in aging articular chondrocytes / L. A. Fortier, B. J. Miller // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2006. – T. 24. – № 8. – C. 1765–1772.
58. Fracture healing in the elderly: A review / B. A. Foulke, A. R. Kendal, D. W. Murray, H. Pandit // *Maturitas*. – 2016. – T. 92. – C. 49–55.
59. Freeman, J. L. Rac “Insert Region” Is a Novel Effector Region That Is Implicated in the Activation of NADPH Oxidase, but Not PAK65* / J. L. Freeman, A. Abo, J. D. Lambeth // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – T. 271. – № 33. – C. 19794–19801.
60. Galderisi, U. Clinical Trials Based on Mesenchymal Stromal Cells are Exponentially Increasing: Where are We in Recent Years? / U. Galderisi, G. Peluso, G. Di Bernardo // *Stem cell reviews and reports*. – 2022. – T. 18. – № 1. – C. 23–36.
61. Geiger, H. The ageing haematopoietic stem cell compartment / H. Geiger, G. de Haan, M. C. Florian // *Nat Rev Immunol*. – 2013. – T. 13. – № 5. – C. 376–389.
62. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis / P.-L. Xiao, A.-Y. Cui, C.-J. Hsu [et al.] // *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. – 2022. – T. 33. – № 10. – C. 2137–2153.
63. Heterogeneity of In Vitro Expanded Mesenchymal Stromal Cells and Strategies to Improve Their Therapeutic Actions / L. Olmedo-Moreno, Y. Aguilera, C. Baliña-Sánchez [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – T. 14. – № 5. – C. e1112.
64. Hippisley-Cox, J. Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores / J. Hippisley-Cox, C. Coupland // *BMJ*. – 2009. – T. 339. – C. b4229.
65. Immunobiology of mesenchymal stem cells / S. Ma, N. Xie, W. Li [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2014. – T. 21. – № 2. – C. 216–225.

66. Impact of Donor Age on the Osteogenic Supportive Capacity of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Matrix / M. S. Carvalho, L. Alves, I. Bogalho [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – T. 9. – C. e747521.

67. In Vivo Implanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Trigger a Cascade of Cellular Events Leading to the Formation of an Ectopic Bone Regenerative Niche / R. Tasso, V. Ulivi, D. Reverberi [et al.] // *Stem cells and development*. – 2013. – T. 22. – № 24. – C. 3178–3191.

68. In vitro initial expansion of mesenchymal stem cells is influenced by the culture parameters used in the isolation process / H. H. Chen, V. Decot, J. P. Ouyang [et al.] // *Bio-Medical Materials and Engineering*. – 2009. – T. 19. – C. 301–309.

69. Infante, A. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells / A. Infante, C. I. Rodríguez // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – T. 9. – № 1. – C. 244–244.

70. Inhibition of Cdc42 activity extends lifespan and decreases circulating inflammatory cytokines in aged female C57BL/6 mice / M. C. Florian, H. Leins, M. Gobs [et al.] // *Aging cell*. – 2020. – T. 19. – C. e13208.

71. Inhibition of the RhoGTPase Cdc42 by ML141 enhances hepatocyte differentiation from human adipose-derived mesenchymal stem cells via the Wnt5a/PI3K/miR-122 pathway: impact of the age of the donor / D. Chaker, C. Mouawad, A. Azar [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2018. – T. 9. – № 1. – C. e167.

72. Jaffe, A. B. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology / A. B. Jaffe, A. Hall // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2005. – T. 21. – № 1. – C. 247–269.

73. Jagwant, S. Bone Marrow Derived Stem Cells in Trauma and Orthopaedics: A Review of the Current Trend / S. Jagwant, O. O. Jemina, S. K. Wasim // *Current Stem Cell Research & Therapy*. – 2015. – T. 10. – № 1. – C. 37–42.

74. Jeon, O. H. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules / O. H. Jeon, J. Elisseff // *Drug Deliv Transl Res.* – 2015. – № 2. – C. 105–120.
75. Khatiwala, R. Strategies to Enhance the Effectiveness of Adult Stem Cell Therapy for Ischemic Heart Diseases Affecting the Elderly Patients / R. Khatiwala, C. Cai // *Stem cell reviews.* – 2016. – T. 12. – № 2. – C. 214–223.
76. LaminA/C regulates epigenetic and chromatin architecture changes upon aging of hematopoietic stem cells / A. Grigoryan, N. Guidi, K. Senger [et al.] // *Genome Biol.* – 2018. – T. 19. – № 1. – C. e189.
77. Lane, N. E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis / N. E. Lane // *American journal of obstetrics and gynecology.* – 2006. – T. 194. – № 2 Suppl. – C. S3–11.
78. Langert, K. A. Cdc42 GTPases facilitate TNF- α -mediated secretion of CCL2 from peripheral nerve microvascular endoneurial endothelial cells / K. A. Langert, C. L. Von Zee, E. B. J. Stubbs // *Journal of the peripheral nervous system : JPNS.* – 2013. – T. 18. – № 3. – C. 199–208.
79. Medhat, D. Immunomodulatory Effects of MSCs in Bone Healing. / D. Medhat, C. I. Rodríguez, A. Infante // *International journal of molecular sciences.* – 2019. – T. 20. – № 21. – C. e5467.
80. Mesenchymal Stem Cells Coated with Synthetic Bone-Targeting Polymers Enhance Osteoporotic Bone Fracture Regeneration / Y. Safarova, F. Olzhayev, B. Umbayev [et al.] // – 2020. – T. 7. – № 4. – C. e125.
81. Mesenchymal Stem Cells Modifications for Enhanced Bone Targeting and Bone Regeneration / Y. Safarova, B. Umbayev, G. Hortelano, S. Askarova // *Regenerative Medicine.* – 2020. – Vol. 15. – № 4. – P. 1579–1594.
82. Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Immunomodulatory and Bone Regeneration Potential after Tumor Excision in Osteosarcoma Patients / M. Baron, P. Drohat, B. Crawford [et al.] // *Bioengineering (Basel, Switzerland).* – 2023. – T. 10. – № 10. – C. 114–122.

83. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles / D. Marolt Presen, A. Traweger, M. Gimona, H. Redl // Bone regeneration with MSCs and secreted components. – 2019. – T. 7. – C. e352.

84. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress / M. F. Pittenger, D. E. Discher, B. M. Péault [et al.] // NPJ Regenerative medicine. – 2019. – T. 4. – C. e22.

85. Mesenchymal stem cell-based therapy for osteoporotic bones: Effects of the interaction between cells from healthy and osteoporotic rats on osteoblast differentiation and bone repair / A. T. P. Souza, G. P. Freitas, H. B. Lopes [et al.] // Life sciences. – 2024. – T. 340. – C. e122463.

86. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? / V. B. Fernández Vallone, M. A. Romaniuk, H. Choi [et al.] // Differentiation. – 2013. – T. 85. – № 1. – C. 1–10.

87. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing / W. Lin, L. Xu, S. Zwingenberger [et al.] // Journal of orthopaedic translation. – 2017. – T. 9. – C. 19–27.

88. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women / A. Cranney, G. Wells, A. Willan [et al.] // Endocr Rev. – 2002. – T. 23. – № 4. – C. 508–516.

89. Murphy, N. P. Progress in the therapeutic inhibition of Cdc42 signalling / N. P. Murphy, H. R. Mott, D. Owen // Biochem Soc Trans. – 2021. – T. 49. – № 3. – C. 1443–1456.

90. Múzes, G. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. / G. Múzes, F. Sipos // Cells. – 2022. – T. 11. – № 15. – C. e2300.

91. Ohtani, N. The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis? / N. Ohtani // Inflammation and Regeneration. – 2022. – T. 42. – № 1. – C. e11.

92. Osteoclast derivation from mouse bone marrow / R. Tevlin, A. McArdle, C. K. Chan [et al.] // Journal of visualized experiments: JoVE. – 2014. – № 93. – C. e52056.

93. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) / E. Hernlund, A. Svedbom, M. Ivergård [et al.] // Archives of Osteoporosis. – 2013. – T. 8. – № 1-2. – C. e136.

94. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model / H. Namkung-Matthai, R. Appleyard, J. Jansen [et al.] // Bone. – 2001. – T. 28. – № 1. – C. 80–86.

95. Osteoporosis treatment by mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes: Emphasis on signaling pathways and mechanisms / M. Rudiansyah, A. A. El-Sehrawy, I. Ahmad [et al.] // Life sciences. – 2022. – T. 306. – C. e120717.

96. Otto, W. R. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic / W. R. Otto, N. A. Wright // Fibrogenesis & Tissue Repair. – 2011. – T. 4. – № 1. – C. e20.

97. Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function / C. Li, G. Li, M. Liu [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2016. – T. 121. – № 2. – C. 213–219.

98. Patel, D. M. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine / D. M. Patel, J. Shah, A. S. Srivastava // Stem Cells Int. – 2013. – T. 2013. – C. e496218.

99. Polymeric Hydrogels as Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivery System in Biomedical Applications / M. Arifka, G. Wilar, K. M. Elamin, N. Wathoni // Polymers. – 2022. – T. 14. – № 6. – C. e1218.

100. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction / S. H. An, T. Matsumoto, H. Miyajima [et al.] // Dent Mater. – 2012. – T. 28. – № 12. – C. 1221–1231.

101. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts / P. Garg, M. M. Mazur, A. C. Buck [et al.] // Orthopaedic surgery. – 2017. – T. 9. – № 1. – C. 13–19.
102. Rational identification of a Cdc42 inhibitor presents a new regimen for long-term hematopoietic stem cell mobilization / W. Liu, W. Du, X. Shang [et al.] // Leukemia. – 2019. – T. 33. – № 3. – C. 749–761.
103. Regulating Cdc42 and Its Signaling Pathways in Cancer: Small Molecules and MicroRNA as New Treatment Candidates / X.-H. Xiao, L.-C. Lv, J. Duan [et al.] // Molecules. – 2018. – T. 23. – № 4. – C. e787.
104. Rejuvenation of Mesenchymal Stem Cells to Ameliorate Skeletal Aging / M. Cheng, W. Yuan, A. Moshaverinia, B. Yu // Cells. – 2023. – T. 12. – № 7. – C. e998.
105. Risks and Benefits of Bisphosphonate Therapies / C. Reyes, M. Hitz, D. Prieto-Alhambra, B. Abrahamsen // Journal of cellular biochemistry. – 2016. – T. 117. – № 1. – C. 20–28.
106. Rogers, M. J. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton / M. J. Rogers, J. Mönkkönen, M. A. Munoz // Bone. – 2020. – T. 139. – C. e115493.
107. Role of a small GTPase Cdc42 in aging and age-related diseases / B. Umbayev, Y. Safarova (Yantsen), A. Yermekova [et al.] // Biogerontology. – 2023. – T. 24. – №1. – C. 27–46.
108. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation / A. P. Ayala-Cuellar, J. H. Kang, E. B. Jeung, K. C. Choi // Biomol Ther (Seoul). – 2019. – T. 27. – № 1. – C. 25–33.
109. Screening of osteoarthritis diagnostic markers based on immune-related genes and immune infiltration / W.-H. Yuan, Q.-Q. Xie, K.-P. Wang [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – T. 11. – № 1. – C. e7032.
110. Shintani, N. TGF- β 1 Enhances the BMP-2-Induced Chondrogenesis of Bovine Synovial Explants and Arrests Downstream Differentiation at an Early Stage of

Hypertrophy / N. Shintani, K. A. Siebenrock, E. B. Hunziker // PLOS ONE. – 2013. – T. 8. – № 1. – C. e53086.

111. Singh, J. Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: a review of the current trend / J. Singh, J. O. Onimowo, W. S. Khan // Current stem cell research & therapy. – 2015. – T. 10. – № 1. – C. 37–42.

112. Siraj, Y. Senescence induces fundamental changes in the secretome of mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for the therapeutic use of MSCs and their derivatives / Y. Siraj, U. Galderisi, N. Alessio // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – T. 11. – C. e1148761.

113. Skeletal (stromal) stem cells: an update on intracellular signaling pathways controlling osteoblast differentiation / B. M. Abdallah, A. Jafari, W. Zaher [et al.] // Bone. – 2015. – T. 70. – C. 28–36.

114. Stammnitz, S. Mesenchymal Stem Cells, Bioactive Factors, and Scaffolds in Bone Repair: From Research Perspectives to Clinical Practice / S. Stammnitz, A. Klimczak // Cells. – 2021. – T. 10. – № 8. – C. e1925.

115. Stem Cells and Acellular Preparations in Bone Regeneration/Fracture Healing: Current Therapies and Future Directions / M. G. Brown, D. J. Brady, K. M. Healy [et al.] // Cells. – 2024. – T. 13. – № 12. – C. e1045.

116. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering / G. Battafarano, M. Rossi, V. De Martino [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – T. 22. – № 3. – C. e1128.

117. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats / S. Huang, L. Xu, Y. Zhang [et al.] // Cell Transplantation. – 2015. – T. 24. – № 12. – C. 2643–2655.

118. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model / R. V. Waters, S. C. Gamradt, P. Asnis [et al.] // Acta orthopaedica Scandinavica. – 2000. – T. 71. – № 3. – C. 316–321.

119. Teitelbaum, S. L. Stem cells and osteoporosis therapy / S. L. Teitelbaum // Cell stem cell. – 2010. – T. 7. – № 5. – C. 553–554.

120. Ten Years' Experience with Alendronate for Osteoporosis in Postmenopausal Women / G. Bone Henry, D. Hosking, J.-P. Devogelaer [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2025. – T. 350. – № 12. – C. 1189–1199.
121. The Application of MSCs-Derived Extracellular Vesicles in Bone Disorders: Novel Cell-Free Therapeutic Strategy / S. Liu, X. Xu, S. Liang [et al.] // *MSCs-EV Applied in Bone Disorders*. – 2020. – T. 8. – C. e619.
122. The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis / W. E. Sharaf-Eldin, N. Abu-Shahba, M. Mahmoud, N. El-Badri // *Stem cells international*. – 2016. – T. 2016. – C. e1908365.
123. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence / D. Santini, U. Vespasiani Gentilucci, B. Vincenzi [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2003. – T. 14. – № 10. – C. 1468–1476.
124. The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation / T. Abe, K. Sumi, R. Kunimatsu [et al.] // *Journal of Oral Science*. – 2019. – T. 61. – № 1. – C. 30–35.
125. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis / N. Salari, H. Ghasemi, L. Mohammadi [et al.] // *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. – 2021. – T. 16. – № 1. – C. e609.
126. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases / Y. Han, J. Yang, J. Fang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – T. 7. – № 1. – C. e92.
127. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis / L.-J. Dai, H. Y. Li, L.-X. Guan [et al.] // *Stem Cell Research*. – 2009. – T. 2. – № 1. – C. 16–25.
128. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis / S. E. Papapoulos, J. O. Landman, O. L. M. Bijvoet [et al.] // *Bone*. – 1992. – T. 13. – C. S41–S49.
129. Translational potential of mesenchymal stem cells in regenerative therapies for human diseases: challenges and opportunities / S. Zhidu, T. Ying, J. Rui, Z. Chao // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2024. – T. 15. – № 1. – C. e266.

130. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice / S. W. Cho, H. J. Sun, J. Y. Yang [et al.] // *Mol Ther.* – 2009. – T. 17. – № 11. – C. 1979–1987.

131. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells / R. E. Newman, D. Yoo, M. A. LeRoux, A. Danilkovitch-Miagkova // *Inflamm Allergy Drug Targets.* – 2009. – T. 8. – № 2. – C. 110–123.

132. Use of hydroxyapatite ceramics for treatment of nonunited osseous defect after open fracture of lower limbs / T. Nakase, M. Fujii, A. Myoui [et al.] // *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.* – 2009. – T. 129. – № 11. – C. 1539–1547.

133. Vo, T. N. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration / T. N. Vo, F. K. Kasper, A. G. Mikos // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2012. – T. 64. – № 12. – C. 1292–1309.

134. Walters, H. Intercellular transfer of mitochondria between senescent cells through cytoskeleton-supported intercellular bridges requires mTOR and Cdc42 signalling / H. Walters, L. S. Cox // *bioRxiv.* – 2020. – C. 2020.11.02.364919.

135. Yao, W. Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone / W. Yao, N. E. Lane // *Bone.* – 2015. – T. 70. – C. 62–65.

136. Yellowley, C. CXCL12/CXCR4 signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair / C. Yellowley // *BoneKEy reports.* – 2013. – T. 2. – C. e300.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1.	Рисунок 1 – Дизайн исследования.	С. 44
2.	Рисунок 2 – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры: CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ядра клеток окрашены DAPI. Ув. 100. Шкала 50 мкм.	С. 51
3.	Рисунок 3 – Культура CD105-положительных ADMSCs. Ув. 100. Шкала 100 мкм.	С. 52
4.	Рисунок 4 – Результаты окрашивания отсортированных клеток на отрицательные поверхностные маркеры CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ядра клеток окрашены DAPI. Ув. 100. Шкала 50 мкм.	С. 53
5.	Рисунок 5 – Количественный анализ отсортированных клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) ($p \leq 0,001$, one-way ANOVA). ...	С. 53
6.	Рисунок 6 – Оценка токсичности полимера на пролиферацию ADMSCs <i>in vitro</i>	С. 54
7.	Рисунок 7 – Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации ADMSCs.	С. 55
8.	Рисунок 8 – Фазово-контрастные снимки остеокластов, окрашенных на активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP).	С. 56
9.	Рисунок 9 – Окрашивание Pit Assay по методу Ван Косса.	С. 57
10.	Рисунок 10 – Количественный анализ резорбтивной поверхности от общей площади.	С. 57
11.	Рисунок 11 – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры через 1 и 24 месяца: CD31, CD34, CD45, CD105 и CD90. Ув. 100.	С. 59

12. Рисунок 12 – Адипогенная, хондрогенная и остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток через 1 и 24 месяца. С. 60
13. Рисунок 13 – Фармакологическое ингибирование CASIN и подавление siRNA снижает активность Cdc42 в старых МСК. С. 61
14. Рисунок 14 – Результаты ОТ-ПЦР в режиме реального времени, демонстрирующие эффективность подавления генов последовательностями siRNA, нацеленными на Cdc42 в ADMSCs. . С. 62
15. Рисунок 15 – Иммуноферментный анализ супернатантов МСК на содержание щелочной фосфатазы через 14 сут остеогенной дифференцировки. С. 63
16. Рисунок 16 – Иммуноферментный анализ на тартрат-устойчивую кислую фосфатазу – TRAP. С. 64
17. Рисунок 17 – Схема оценки антиостеокластической активности МСК. С. 65
18. Рисунок 18 – Pit анализ влияния ингибитора Cdc42 малой молекулой CASIN и сайленсинга на резорбцию в поверхностных пластинах Corning Osteo Assay. С. 65
19. Рисунок 19 – Скретч-анализ миграции ADMSCs. Площадь закрытия царапины, мкм². С. 67
20. Рисунок 20 – Влияние ингибирования Cdc42 на миграцию МСК. Миграция ADMSCs, индуцированная BMP-2, была обнаружена с помощью анализа Transwell. Мигрировавшие клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Количественная оценка миграции после 24 ч обработки в указанных условиях. С. 68
21. Рисунок 21 – Показатель плотности костной ткани измеряли с помощью microCT IVIS SpectrumCT изображениях. А – контроль и модель остеопороза на крысах (билатеральная овариоэктомия) при переломе локтевой кости через 4 и 24 нед. после лечения. Модель остеопороза: анализ костной плотности у 5 контрольных (без OVX)

- и 20 животных с OVX; данные представлены как отношение конечной плотности костной ткани (3 мес) к начальной (до операции). В – репрезентативные microCT-изображения конечностей крыс через 2 ч и 4 нед. после операции (In Vivo Imaging System, Caliper, США). С – плотность костной ткани в области переломов локтевой кости: данные представлены как отношение конечной плотности кости (через 4 или 24 нед. после операции) к начальной (через 2 ч после операции). С. 71
22. Рисунок 22 – Пластинчатая костная ткань диафиза локтевой кости на уровне перелома (норма). Окраска гематоксилин-эозином (а) и по Ван Гизону (б). Ув. 400, шкала – 50 мкм. С. 74
23. Рисунок 23 – Анатомо-гистотопографическое сравнение зоны костной мозоли, закрывающей дефект локтевой кости, через 1 мес. после перелома у животных групп I–IV. Окраска по Ван Гизон. Ув. 40, шкала – 500 мкм. С. 75
24. Рисунок 24 – Зона формирования ретикулофиброзной костной ткани регенерата локтевой кости крысы через месяц после перелома (группа III). Окраска по Ван Гизону (а), гематоксилин-эозином (б). Ув. 100, шкала – 200 мкм. С. 77
25. Рисунок 25 – Жесткая костная мозоль (а) и отдельные ее фрагменты со сформированной пластинчатой костной (б) и несформированной (в, г) хрящевой тканью через 1 мес. после перелома (а, б, в – группа III; г – группа II). Окраска: гематоксилин-эозином (а-в), по Ван Гизону (г). Ув. 40 (а) и 400 (б-г), шкала – 200 мкм. С. 78
26. Рисунок 26 – Взаимоотношение зон костной мозоли с различной степенью структурно-функционального созревания, очаги регенерации (черные стрелки), содержащие бластные клетки, локтевой кости крысы через 1 мес. после перелома (группа МСК + полимер, IV группа). Окраска гематоксилин-эозином.

- Ув. 400, шкала – 50 мкм. С. 80
27. Рисунок 27 – Фрагмент костной мозоли у животных групп II (а) и IV (б) через 1 мес. после перелома. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 50 мкм. С. 81
28. Рисунок 28 – Дефинитивная костная ткань (а) и ее отдельные зоны с преобладанием незрелой (б) и зрелой (в) через 6 мес. после повреждения локтевой кости белых крыс (группа IV). Окраска гематоксилин-эозином (а) и по Ван Гизону (б, в). Ув. 40 (а) и 400 (б, в), шкала – 500 (а) и 50 (б, в) мкм. С. 82
29. Рисунок 29 – Фрагмент фиброзно-хрящевой (мягкой незрелой) костной мозоли (а) локтевой кости белой крысы через 1 мес. (группа I) и результат распознавания ее клеток с помощью плагина «StarDist» (б). Окраска по Ван Гизону (а). Ув. 400, шкала – 50 (а) мкм. С. 83
30. Рисунок 30 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 4 нед. между контрольной и экспериментальной группами. С. 86
31. Рисунок 31 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 8 нед между группами. С. 87
32. Рисунок 32 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 16 нед между группами. С. 87
33. Рисунок 33 – Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 24 нед между группами. С. 88
34. Рисунок 34 – МСК, трансфицированные LUC-лентивирусными наночастицами (Евроген, Россия) через 48 ч после трансфекции. Люминесцентный режим, полученный с помощью IVIS SpectrumCT (Caliper, США). С. 89
35. Рисунок 35 – Визуализация МСК, трансфицированных LUC (клетки 1е6), через 48 ч после трансплантации. Субстрат люциферин вводили в концентрации 150 мг/кг массы тела

- животного (D-люциферин, SigmaAldrich) за 30 мин до визуализации. Люминесцентный режим, полученный с помощью IVIS SpectrumCT продолжительностью 10 мин (Caliper, США). . . . С. 90
36. Рисунок 36 – Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 мес. после перелома у животных групп I (а), II (б), III (в) и IV (г). Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала (а, б, г) – 1000 мкм, шкала (в) – 500 мкм. С. 92
37. Рисунок 37 – Гистограммы распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани, при сравнении через 4 мес. после перелома у животных группа I (а), II (б), III (в) и IV (г). С. 93
38. Рисунок 38 – Зона костной мозоли локтевой кости через 6 мес. после перелома у животного группа IV. Гистограмма распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани. Окраска по Ван Гизону (а) и гематоксилин-эозином (б). Ув. 400, шкала – 1 000 мкм. С. 94
39. Рисунок 39 – Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 (а, б) и 6 (в, г) мес. после перелома у крыс группы IV. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. 100, шкала – 50 мкм. С. 95
40. Рисунок 40 – Зона костной мозоли локтевой кости (а) и ее маска с выделенными с помощью StarDist лакунами (б), через 6 мес. после травмы, группа IV. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 100 мкм. С. 96
41. Рисунок 41 – Участок костной мозоли локтевой кости с высоким содержанием коллагеновых волокон (черная стрелка) в хрящевой ткани вокруг лакун, через 6 мес. после травмы, группа IV. Многочисленные лакуны. Окраска по Ван Гизону. Ув. 400, шкала – 100 мкм. С. 97
42. Таблица 1 – Соотношение плотности кости, измеренной на 4-й и 24-й нед. после перелома, к исходной плотности кости (через два

	часа после операции).	С. 72
43.	Таблица 2 – Численная плотность клеток, расположенных в лакунах костной мозоли локтевой кости крысы, при различных способах коррекции репаративного процесса, Ме (Q1-Q3).	С. 84