

Олжаев Фархад Сайдикаримович

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

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Акулинин Виктор Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Лыков Александр Петрович

(Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», лаборатория клеточных технологий, ведущий научный сотрудник)

доктор медицинских наук, доцент

Кирилова Ирина Анатольевна

(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, дирекция, учебно-методический отдел, заместитель директора по научной работе, доцент учебно-методического отдела)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 222-68-35); <https://new.ngmu.ru/dissers/get-file/4720>)

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Актуальность избранной темы обусловлена высокой частотой травматических повреждений костной ткани у пожилых, что связано со снижением костной массы и прочности вследствие гиперактивности остеокластов и дефицита остеобластных предшественников (Foulke B. A. et al., 2016; Wang S.-M. et al., 2020; Нестеров А. В. и др., 2011; Иорданишвили А. К. и др., 2014; Дудинская Е. Н. и др., 2019). Перспективным направлением лечения является использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК), однако их эффективность снижается с возрастом (Gómez-Barrena E. et al., 2015; Lin W. et al., 2017; Brown M. G. et al., 2024; Theodosaki A. M. et al., 2024; Пак Н. В. и др., 2024; Carvalho M. S et al., 2021; Siennicka K. et al., 2021; Heyman E. et al., 2025). Одним из ключевых молекулярных мишеней, влияющих на старение МСК, является Cdc42 – малая Rho ГТФаза, ингибирование которой восстанавливает их функции и повышает эффективность терапии (Umbayev B. et al., 2018, 2023; Khatiwala R., Cai C., 2016]. С другой стороны, заживление переломов у пожилых пациентов осложняется остеопорозом, нарушающим регенерацию и затрудняющим фиксацию костных отломков (Белая Ж. Е. и др., 2021). Поскольку остеопороз влияет на пролиферацию и дифференцировку МСК, их применение также рассматривается в терапии (Cho S. W. et al., 2009; Teitelbaum S. L., 2010; Souza A. T. P. et al., 2024), но ограничивается слабым сродством клеток к костной ткани. Одной из решений может быть комбинированное применение МСК и бисфосфонатов, в частности, с использованием описанного нами ранее остеофильного полимера с бисфосфонатными группами, способствующего направленному связыванию МСК с костной тканью in vitro (D'Souza S. et al., 2014).

Актуальным научным направлением является исследование воздействия ингибирования активности Cdc42 и обработки МСК остеофильным полимером с бисфосфонатными группами на морфофункциональные параметры репаративной регенерации костной ткани при трансплантации таких модифицированных МСК.

Степень разработанности темы диссертации. С развитием регенеративной медицины и биоинженерии применение МСК, факторов роста и синтетических скаффолдов стало перспективным направлением в терапии остеопороза (Teitelbaum S. L., 2010; An S. H. et al., 2012; Jeon O. H., Elisseeff J., 2015; Safarova Y. et al., 2020). Исход лечения во многом определяется возрастом пациента и наличием остеопороза. Ряд исследований посвящён повышению регенеративного потенциала МСК путём модификации их поверхности и использования биосовместимых матриц (Safarova Y. et al., 2020; Stannitz S., Klimczak A., 2021; Re F. et al., 2023). В частности, показано, что функционализация МСК бисфосфонатами улучшает их миграцию в костную ткань и остеогенную дифференцировку. Интеграция бисфосфонатов в полимерные носители способствует пролонгированному высвобождению и

остеоиндукции, а их сочетание с МСК и керамическими скаффолдами ускоряет заживление костных дефектов (Safarova Y. et al., 2020). Поверхностная модификация МСК превосходит инкапсуляцию и генетические методы за счёт безопасности и повышения приживаемости клеток. Вместе с тем возраст донора и реципиента существенно влияет на свойства МСК (Choudhery M. S. et al., 2014; Carvalho M. S. et al., 2021; Heyman E. et al., 2025; Hirata H. et al., 2022), так как старение снижает их пролиферативную и остеогенную активность (Cheng M. et al., 2023). Разрабатываются подходы к омоложению МСК – от генной терапии и метаболитических молекул до применения инженерных гидрогелей (Cheng M. et al., 2023), однако их безопасность требует дальнейшего изучения. На сегодняшний день остаются неизученными важные аспекты, связанные с влиянием ингибиторов Cdc42 и бисфосфонатных полимеров на пролиферацию, миграцию, остеогенную дифференцировку МСК и регенерацию костной ткани у возрастных пациентов и пациентов с остеопорозом.

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 остеофильным синтетическим 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 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 трансфекции 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 этичного 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 MCK 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 самок крыс 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. Необходимые процедуры выполнены в соответствии с протоколами, подтвержденными научными публикациями. Для обеспечения адекватности экспериментальных моделей были использованы современные *in vitro* и *in vivo* системы, соответствующие международным стандартам. Результаты исследования подтверждены морфологическим и гистологическим анализом, компьютерной томографией, а также биохимическими и молекулярными тестами. Применение современных статистических методов минимизирует вероятность случайных ошибок, повышая обоснованность и достоверность полученных данных.

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 К1, 1 публикация в издании категории К2, входящих в список изданий, распределённых по категориям К1, К2, К3, в том числе 4 публикации в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Web of Science).

Объем и структура диссертации. 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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-CSF, 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).

Синтез полимера. Полимер был синтезирован методом радикальной полимеризации с переносом атома (ATRP), согласно опубликованному ранее протоколу (D'Souza S. et al., 2014).

Выделение и культивирование МСК. Висцеральная жировая ткань вокруг половых органов крыс (*Rattus norvegicus*, линия Wistar) была выделена согласно опубликованному ранее протоколу (Arana M. et al., 2013). На 21-е сут клетки, экспрессирующие CD105, отсортировали методом иммуномагнитного сортирования. Использован магнит EasyEights™ EasySep™ Magnet (Stemcell Technologies, США) Выделенные CD105+ клетки культивировали до 4–5 пассажей.

Иммунофлуоресцентный метод. Для анализа клеток на наличие позитивных (CD90 и CD105) и негативных (CD31, CD34 и CD45) иммунофенотипических антигенов МСК использовали метод иммунофлуоресценции.

Функционализация МСК 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.

Оценка пролиферации МСК. МСК (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).

Остеогенная дифференцировка. Количественную оценку минеральных отложений проводили с помощью окрашивания МСК алазариновым красным S. Оценку щелочной фосфатазы проводили по окрашиванию на щелочную фосфатазу (ALP Assay Kit, Sigma-Aldrich, США)

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

М-CSF + 10 нг/мл RANKL). На 5-е сут добавляли полимер (0,5–2,0 мг/мл) и алендронат (4×10^{-3} , 2×10^{-3} г/мл). Оценку проводили методом TRAP-окрашивания.

Определение активности остеокластов. Использовали 24-луночный планшет. 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.

Ингибирования Cdc42 в МСК. Ингибирование и сайленсинг Cdc42 проводили на МСК, выделенных из жировой ткани молодых (1 мес.) и возрастных (24 мес.) крыс. Клетки культивировали в DMEM (10 % FBS, 1 % антибиотик) до конфлюэнтности. Для ингибирования использовали CASIN (5 мкМ, 16 ч), для сайленсинга – Stealth siRNA CDC42 с трансфекцией Lipofectamine (48 ч). Эффективность снижения экспрессии Cdc42 оценивали методом ОТ-ПЦР.

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

Анализ миграционной способности МСК. Для оценки миграции старых МСК *in vitro* использовали Скретч-анализ с Hybrid Reader Cytation5 (Biotek, США). Был использован также метод Transwell. Рассчитано общее количество мигрирующих МСК с помощью программного обеспечения ImageJ.

Оценка воздействия МСК-кондиционированной среды. Кондиционированную среду получали из супернатантов МСК, культивируемых в MEM в течение 3 сут после ингибирования или сайленсинга Cdc42. Остеокласты (1×10^6) культивировали в индукционной среде с добавлением кондиционированной среды от ADMSCs 1- и 24-месячных животных, с или без таргетирования Cdc42.

Схема in vivo эксперимента. Исследование было выполнено на 80 крысах-самцах и 40 крысах-самках породы Wistar разного возраста. 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. Для испытания МСК с остеофильным полимером животным с остеопорозом (n = 40) 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 использовали крыс-самцов в возрасте 24 мес. ($n = 80$). 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 недели. Через 16 и 24 недели проводили гистологический анализ (гематоксилин/эозин, Ван Гизон) и количественную оценку костной регенерации.

Модель остеопороза и перелома локтевой кости. В эксперименте использовано 40 самок крыс Wistar (12 недель, 200–300 г). Остеопороз моделировали билатеральной овариэктомией (OVX). Плотность костной ткани оценивали до и через 3 мес. после операции с помощью microCT IVIS SpectrumCT (PerkinElmer, США). Перелом локтевой кости создавали методом некритической остеотомии (2 мм) с использованием щипцов Liston. Анестезию проводили ингаляцией 5 % изофлурана (1,0 л/мин O_2 , система Harvard Apparatus), после операции – пероральные анальгетики в течение 5 сут. Сканирование выполняли на microCT IVIS SpectrumCT (Caliper, США) в рентгеновском режиме (воксель 150 мкм, 50 кВ, 425 рез., доза 52 мГв). Для анализа применяли ПО Living Image 4.3.1, изображения экспортировали в DICOM.

Гистологический анализ. После цервикальной дислокации крыс (под анестезией) локтевая кость фиксировалась в 10 % нейтральном формалиновом растворе с pH 7,2–7,4, подвергалась декальцинации и заключалась в парафин. Далее 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 изучали с использованием светового микроскопа «Leica DM 1000» (объективы: $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ и $\times 100$). На цифровых микрофотографиях высокого разрешения (tiff, $2\,592 \times 1\,944$ пикселя; камера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, размер пикселя $1,4 \times 1,4$ мкм) проводили качественное описание структур и их морфометрическую оценку.

Трансфекция МСК с репортерным вектором гена люциферазы LVT-Luc2. Для трансфекции использовали лентивирус Luc2 (Eurogen), высевая клетки с плотностью 2×10^5 /лунку (6-луночный планшет). Эффективность оценивали с помощью IVIS SpectrumCT (Caliper, США). Для *in vitro* биолюминесценции применяли D-люциферин Firefly (Caliper, США).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили по стандартным рекомендациям (Боровиков В., 2003; Festing M. F. W., Altman D. G., 2002]. Проверку

статистических гипотез проводили непараметрическими критериями. Использовали пакет StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA, version 8.0. Количественные данные представляли в виде медианы (Q2) и интерквартильного диапазона (Q1–Q3). Относительные показатели (%) рассчитывались на основе абсолютных значений. Уровень значимости для отклонения нулевой гипотезы с учетом четырех групп сравнения принимали с поправкой – $p < 0,013$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку МСК и его способность ингибировать активность остеокластов *in vitro*. После 4–5 пассажей получена культура МСК с 80–90 % конфлюэнтностью. Клетки имели фибробластоподобную морфологию, адгезировали к пластику, экспрессировали маркеры CD105 и CD90 при отсутствии CD31, CD34 и CD45, что подтверждает их мезенхимальную природу.

По результатам Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA), остеофильный полимер не оказывал цитотоксического действия: пролиферация МСК, обработанных полимером, не отличалась от контроля. При культивировании в остеогенной среде в течение 14 сут наблюдалась дифференцировка, подтверждённая интенсивной окраской алазариновым красным и накоплением кальция. Полимер не влиял на остеогенную дифференцировку, что подтверждено количественным гистохимическим анализом.

Остеокластная природа клеток подтверждена окраской на тартрат-резистентную кислую фосфатазу и наличием многоядерных структур. В Pit Assay полимер (2,0 мг/мл) снижал резорбтивную активность остеокластов на ~85 %, аналогично алендронату (4,0 мг/мл). Эффект был дозозависимым и не сопровождался цитотоксичностью, демонстрируя способность полимера ингибировать активность остеокластов.

Оценка влияния ингибирования Cdc42 в МСК на остеогенный, миграционный, антиостеокластный потенциал МСК клеток *in vitro*. Иммунофенотипирование показало, что CD105-позитивные клетки, отсортированные 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.

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 siRNA: RSS329927 (ThermoFisherScientific). 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. В свою очередь сайленсинг снижал экспрессию белка Cdc42 до 10 %, но воздействие CASIN не приводило к изменениям в экспрессии белка Cdc42.

Активность щелочной фосфатазы является маркером раннего остеогенеза. Количественный анализ показал, что экспрессия данного фермента снижена в старых клетках по сравнению с молодыми клетками. 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 антиостеокластическую активность старых МСК *in vitro*. Иммуноферментный анализ показал, что клетки, выделенные из костного мозга, экспрессируют маркер остеокластов – тартрат-устойчивую кислую фосфатазу (TRAP).

Полученные результаты демонстрируют выраженный антиостеокластный эффект у кондиционированной среды, что проявляется в значительном снижении резорбирующей активности остеокластов. Данные микроскопического анализа указывают на уменьшение зон резорбции костного матрикса при обработке остеокластов средой от ингибированных Cdc42 МСК, что коррелируется с результатами количественного анализа. 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 адипогенных МСК. Скретч-анализ миграции МСК выявил, что молодые клетки обладают большим миграционным потенциалом. Старые МСК, после воздействия CASIN и сайленсинга, мигрировали быстрее. Ингибирование Cdc42 приводит к повышению миграционного потенциала старых до уровня молодых клеток.

Анализ Transwell показал, что хемоаттрактант (BMP-2), который действует как сигнальная молекула, вызывает остеогенную дифференцировку, миграцию МСК и общее

костеобразование. Клетки всех четырех групп животных мигрировали в направлении BMP-2. 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 миграцию старых клеток больше, чем молодых.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что фармакологическое ингибирование и сайленсинг Cdc42 усиливает миграцию МСК, но направленную к хемоаттрактанту миграцию усиливал только сайленсинг.

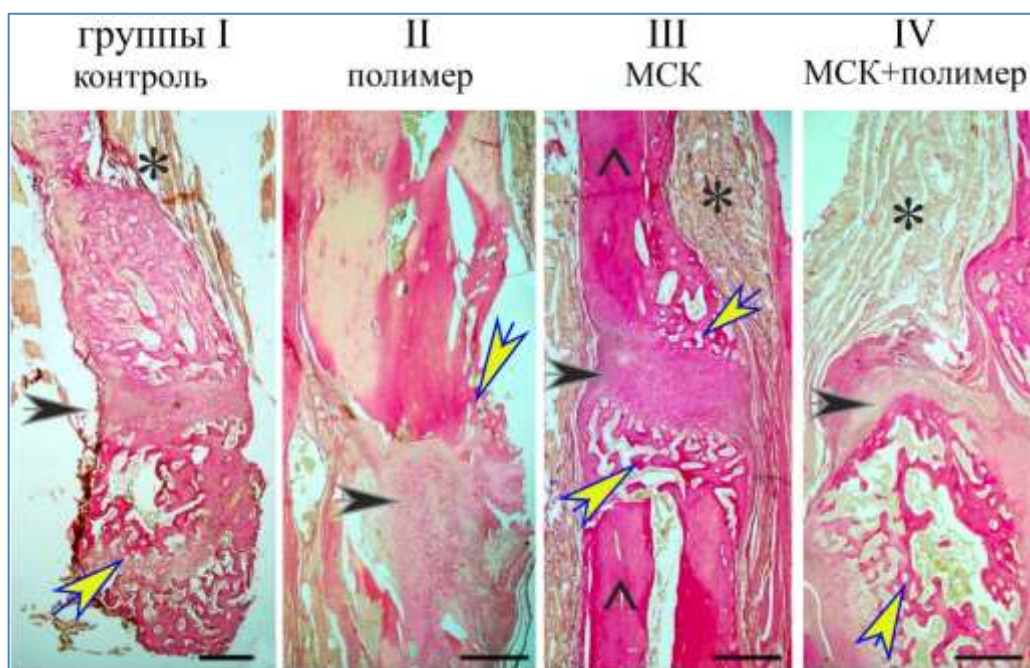
Оценка регенераторного потенциала МСК, функционализированных синтетическим бисфосфонат-содержащим полимером на модели перелома локтевой кости у самок крыс с эстроген-зависимым остеопорозом. Нами показано, что у контрольных животных плотность костей увеличилась на 8 % ($p = 0,03$), что было связано с нормальным физиологическим созревaniem животных. Напротив, в группе животных с остеопорозом плотность костей снизилась на 20 % ($p = 0,001$).

После подтверждения остеопороза мы создали 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. Через четыре недели после операции в группе животных, которым вводили полимер-модифицированные МСК, плотность кости увеличилась на 27,4 % (критерий Манна – Уитни, $p < 0,05$) по сравнению с контролем. Через 24 нед. обнаружили более низкую, по сравнению с контролем, плотность костной ткани в группах 1–3 (на 26,3 %, 37,9 % и 40,4 %; $p < 0,05$). В четвертой группе плотность костной ткани на 21,5 % ($p < 0,05$) превышала отрицательный контроль (остеопороз). В качестве положительного контроля использовали группу животных с переломом локтевой кости, которым не проводилась операция удаления яичников.

Влияние остеофильного бисфосфонатного полимера и модифицированных им мезенхимальных стволовых клеток на морфологические проявления регенерации дефекта локтевой кости. Моделирование перелома путем остеотомии диафиза локтевой кости в нашем эксперименте приводило к появлению дефекта на месте перелома. Через один месяц после травмы в месте дефекта происходило формирование сложного тканевого регенерата – провизорного субстрата, а затем – зрелой кости (дефинитивного органа). При этом пространственное расположение незрелого субстрата было в рамках границ дефекта и четко соответствовало расположению ранее удаленной части кости (Рисунок 1).

В течение 1 мес. после травмы у всех животных с остеопорозом в области перелома формировались очаги регенерации с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата. 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.



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

Рисунок 1 – 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

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.

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. Однако, несмотря на

высокий регенеративный потенциал при использовании модифицированных остеофильным полимером МСК, полного восстановления дефинитивной кости из провизорного субстрата у животных с остеопорозом не происходило даже через 6 мес. Сохранялись участки незрелой костной ткани, а сплошная костная полость еще не образовалась.

Установлено, что различная комбинация МСК и полимера была весомым фактором особенностей регенерации. 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.

Оценка потенциала модифицированных мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 на *in vivo* модели перелома локтевой кости у возрастных животных. Оценивали минеральную плотность костной ткани в местах переломов в сроки 4, 8, 16 и 24 недели. У животных без лечения отмечено снижение минеральной плотности кости на 13 % ($p = 0,01$). После введение МСК, модифицированных малой молекулой CASIN, наблюдалось статистически значимое увеличение плотности кости на 31 % ($p = 0,01$). Наиболее выраженная регенерация отмечена в группе, получавшей МСК, трансфицированных siRNA – 88 % ($p = 0,001$). В группе, получавшей простые инъекции МСК, минеральная плотность кости увеличилась на 20 % ($p = 0,02$). Через 8 недель после лечения выявили статистически значимые результаты только в группах МСК + CASIN (38 %, $p = 0,01$) и МСК + siRNA (94 %, $p = 0,0001$). Через 16 недель отмечено стойкое увеличение показателя в группе МСК + CASIN и МСК + siRNA, до 44 % ($p = 0,001$) и 93 % ($p = 0,0001$) соответственно. В контрольной группе наблюдалось дальнейшее снижение плотности до 21 %. Через 24 недели минеральная плотность костной ткани в группе МСК + siRNA снизилась по сравнению с 16-й неделей, однако осталась выше по сравнению с контрольной группой – 58 % ($p = 0,01$). Изменения минеральной плотности кости в группах МСК и МСК + CASIN не были статистически значимыми. В контрольной группе были выявлены дегенеративные изменения, которые показали дальнейшее снижение до 40 % ($p = 0,01$).

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 МСК. Через 4 мес. после травмы максимальное количество новообразованной зрелой костной ткани было выявлено у животных, которым трансплантировали МСК, трансфицированные CASIN и siRNA. При трансплантации немодифицированных МСК выявлялось максимальное для всех групп содержание грубоволокнистой (незрелой) костной ткани. На протяжении всего времени наблюдения

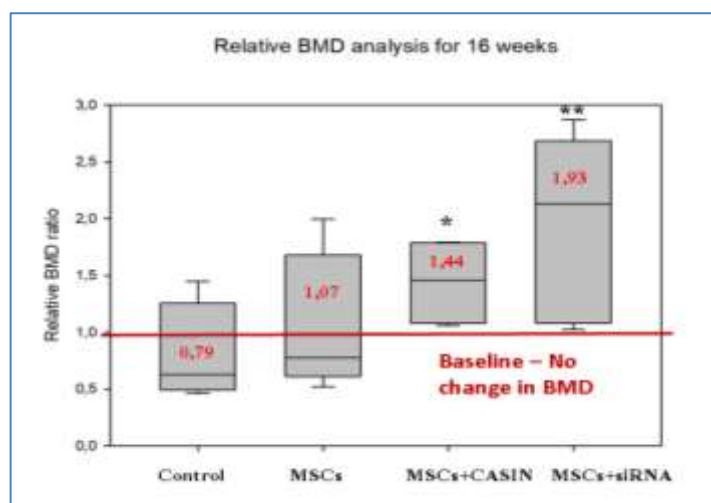
сохранялся значительный объем хрящевой ткани, вокруг и за счет которой формировалась костная ткань. Однако, ее количество и интенсивность окраски, форма границы отличались у животных без лечения и при трансплантации МСК. Наиболее глубокие изменения в направлении увеличения плотности регенерата у животных группы IV были выявлены через 6 мес. после травмы.

Через 4 и 6 мес. после перелома 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. 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. 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. Через 6 мес. после травмы процесс ремоделирования не завершился, но был более выраженным у животных групп III и IV.

Таким образом, у животных без лечения наблюдалось снижение минеральной плотности. У животных, получавших МСК, модифицированные CASIN, была зафиксирована статистически значимая положительная динамика – увеличение плотности. Наиболее выраженное увеличение наблюдалось в группе IV, где использовались МСК, трансфицированные siRNA (Рисунок 2).

Эти данные подтверждают гипотезу о том, что терапевтическое снижение активности Cdc42 в МСК способствует минерализации костной мозоли. Использование модифицированных МСК оказывало значительное положительное влияние на неоостеогенез, способствуя формированию как мягкой, так и твердой костной мозоли.

Полученные результаты открывают новые перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению остеопороза и других заболеваний, связанных с нарушением регенерации костной ткани.



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

Рисунок 2– Анализ относительного соотношения минеральной плотности кости через 16 нед. между группами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 МСК 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 МСК, подвергнутыми ингибированию белка Cdc42 с использованием CASIN и siRNA, показали, что такая модификация усиливает остеогенные, миграционные и антиостеокластные свойства клеток у возрастных животных. Трансплантация модифицированных МСК привела к значительному усилению неоosteогенеза, более высокой плотности костной ткани, улучшенной архитектонике костной мозоли и восстановлению клеточного пула osteo- 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 крыс-самок 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 мезенхимальных стволовых клеток и их антиостеокластное действие.

2. Рекомендуется использование мезенхимальных стволовых клеток после воздействия на них остеофильного 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 РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мезенхимальные стволовые клетки, модифицированные остеофильным полимером в регенерации костной ткани / Ю. И. Сафарова, **Ф. С. Олжаев**, Б. А. Умбаев [и др.] // III Национальный конгресс по регенеративной медицине : материалы конгресса // **Гены и клетки**. – 2017. – Т. 12, № 3. – С.34–35.

2. Исследование влияния остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку адипозных мезенхимальных стволовых клеток и изучение его способности ингибировать активность остеокластов in vitro / **Ф. С. Олжаев**, Ю. И. Сафарова (Янцен), А. К. Цой [и др.] // **Вестник КазНУ. Серия биологическая**. – 2018. – Т. 77, № 4. – С. 58–72.

3. Elevated levels of the small GTPase Cdc42 induces senescence in male rat mesenchymal stem cells / B. Umbayev, A-R. Masoud, A. Tsoy [et al., including **F. Olzhayev**] // **Biogerontology**. – 2018. – Vol. 19. – P. 287–301.

4. Перспективные подходы лечения низкоэнергических травматических повреждений костной ткани с использованием методов биоинженерии и клеточной терапии / Ю. И. Сафарова (Янцен), **Ф. С. Олжаев**, Б. А. Умбаев [и др.] // **Наука и Здравоохранение**. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 68–80.

5. Создание животной модели перелома локтевой кости на фоне эстрогензависимого остеопороза / **Ф. С. Олжаев**, Ю. И. Сафарова (Янцен), Б. А. Умбаев [и др.] // **Вестник КазНМУ**. – 2020. – Т. 3. – С. 192–197.

6. Mesenchymal stem cells membrane engineering enhances osteoporotic bone fracture regeneration / Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev**, B. Umbayev [et al.] // **Bioengineering**. – 2020. – Vol. 7, № 4. – P. 1–16.

7. 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 [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 49–59.
8. Морфофункциональные особенности восстановления костной ткани при локальном использовании мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 / **Ф. С. Олжаев**, Б. А. Умбаев, В. А. Акулинин, Ю. И. Сафарова [и др.] // **Журнал анатомии и гистопатологии**. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 36–44.
9. **Патент РК 34147** Республика Казахстан. Способ лечения перелома костей при остеопорозе и схожих патологиях костной ткани в эксперименте. Заявл. : 27.04.2018; опубл. : 07.02.2020 // Ш. Н. Аскарова, **Ф. С. Олжаев**, А. К. Цой, Ю. И. Сафарова, Б. А. Умбаев; заявитель и патентообладатель: частное учреждение «National Laboratory Astana» Назарбаев университет, Республика Казахстан. – Бюл. № 5. – С. 18.
10. Osteophilic polymer and mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration / Y. Yantsen, D. Idrissova, **F. Olzhayev**, B. Umbayev [et al.] // The newest technologies of cell technologies in Medicine: materials of the symposium. – Novosibirsk, 2014. – P. 85.
11. Mesenchymal stem cells and osteophilic polymer as promising agents in bone regeneration / Y. Yantsen, D. Idrissova, **F. Olzhayev** [et al.] // Regenerative Medicine and Healthy Aging : III International Scientific Conference. – Astana, Kazakhstan, 2014. – P. 105.
12. Mesenchymal stem cells coated with synthetic bone-targeted polymer as a new approach for managing of osteoporotic bone fracture regeneration / Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev**, D. Idrissova [et al.] // Biomaterials for Tissue and Genetic Engineering and the Role of Nanotechnology: materials of the conference. – Rome, Italy, 2016. – P. 227–230.
13. MSCs functionalized with osteophilic polymer enhance compact bone regeneration in osteoporotic rat model in vivo / Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev**, D. Idrissova [et al.] // Regenerative Medicine and Healthy Aging : IV International Scientific Conference. – Astana, Kazakhstan, 2016. – P. 45.
14. Osteophilic polymer and mesenchymal stem cells in bone regeneration / Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev**, B. Umbayev [et al.] // Personalized Medicine and Global Health : III International Scientific Conference. – Astana, Kazakhstan, 2017. – P. 72–73.
15. Регенераторный потенциал мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных остеофильным полимером при переломах трубчатых костей на фоне индуцированного остеопороза / Ю. И. Сафарова, **Ф. С. Олжаев**, Б. А. Умбаев [и др.] // Astana Biotech : materials of the International Symposium. – Астана, Казахстан, 2018. – С. 77.

16. Регуляция активности малой ГТФ-азы CDC42 при старении мезенхимальных стволовых клеток / А. Масуд, Б. А. Умбаев, Ш. Н. Аскарлова [и др., в том числе **Ф. С. Олжаев**] // Astana Biotech : materials of the International Symposium. – Астана, Казахстан, 2018. – С. 70.
17. Askarova, S. Perspective approaches for treatment of low-energy injury bone tissue injuries using bioengineering methods and cell therapy / S. Askarova, Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev** // VII Eurasian Congress of Traumatologists and Orthopedists & III Congress of Traumatologists and Orthopedists of the Republic of Kazakhstan : materials of the congress. – Нур-Султан, 2019. – С. 29.
18. Modulation of the aging-affected mesenchymal stem cell functions by Cdc42 protein activity / B. Umbayev, Y. Safarova (Yantsen), A. Yermekova [et al., including **F. Olzhayev**] // Cell Bio Virtual. – 2021. – № 1-10. – P. 1084.
19. Impact of the age-associated changes in the MSC-conditioned media on the resorption potential of the monocyte-derived osteoclasts and its modulation via Cdc42 inhibition / Y. Safarova, A. Nessipbekova, A. Syzdykova [et al., including **F. Olzhayev**] // The Journal of Frailty & Aging, Frailty and Sarcopenia Research (ICFSR) : the International Conference. – 2022. – Vol. 11. – P. 63.
20. Создание животной модели перелома локтевой кости у лабораторных крыс / **Ф. С. Олжаев**, Ю. И. Сафарова (Янцен), Б. А. Умбаев [и др.] // Горизонты современной травматологии и ортопедии : материалы международной научно-практической конференции. Traumatology and Orthopaedics of Kazakhstan. – Туркестан, Казахстан, 2022. – № 63. – С. 46–48.
21. Изучение изменений в резорбционном потенциале моноцитарных остеокластов при воздействии секрета мезенхиальных стволовых клеток (МСК), выделенных у старых крыс, и оценка влияния ингибирования Cdc42 в МСК / Б. А. Умбаев, Ю. И. Сафарова, **Ф. С. Олжаев** [и др.] // Горизонты современной травматологии и ортопедии : материалы международной научно-практической конференции. Traumatology and Orthopaedics of Kazakhstan. – Туркестан, Казахстан, 2022. – № 63. – С. 44–46.
22. Ulna fracture in laboratory rats as a model for bone regeneration research / **F. Olzhayev**, Y. Safarova (Yantsen), B. Umbayev [et al.] // 4th Herbert Fleisch Workshop : materials of the conference. – Brugge, Belgium, 2022. – P. 65.
23. Targeting small GTPase Cdc42 in aged adipose mesenchymal stem cell improves effectiveness of cell therapy in healing of rat ulna fracture / Y. Safarova (Yantsen), **F. Olzhayev**, A. Yermekova [et al.] // 4th Herbert Fleisch Workshop : materials of the conference. – Brugge, Belgium, 2022. – P. 53.
24. Age-related changes in the MSC-conditioned medium have an effect on the resorption capability of monocyte-derived osteoclasts and can be modified by inhibiting Cdc42 / B. Umbayev, Y. Safarova (Yantsen), A. Nessipbekova A. [et al., including **F. Olzhayev**] // 4th Herbert Fleisch Workshop : materials of the conference. – Brugge, Belgium, 2022. – P. 55.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

MCK	—	мезенхимальные стволовые клетки
ADMSCs	—	жировые мезенхимальные стволовые клетки
ALP	—	щелочная фосфатаза
CASIN	—	малая молекула, ингибитор Cdc42
Cdc42	—	малая ГТФаза семейства Rho
DAPI	—	краситель для окрашивания ядер клеток
IFA	—	иммуноферментный анализ
OVX	—	билатеральная овариоэктомия
PIT assay	—	анализ резорбции остеокластов
siRNA	—	малая интерферирующая РНК
TRAP	—	тартрат-резистентная кислая фосфатаза
PBS	—	фосфатно-солевой буферный раствор