

Получена: 7 июня 2019 / Принята: 29 августа 2019 / Опубликовано online: 30 октября 2019

УДК 616.71-007.234+602.9

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПОДХОДЫ ЛЕЧЕНИЯ НИЗКОЭНЕРГИЧЕСКИХ ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОИНЖЕНЕРИИ И КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Юлия И. Сафарова (Янцен)¹, <https://orcid.org/0000-0003-0695-0413>

Фархад С. Олжаев¹, <https://orcid.org/0000-0002-1906-6654>

Бауржан А. Умбаев¹, <https://orcid.org/0000-0002-0286-7252>

Акмарал С. Еркебаева², <https://orcid.org/0000-0002-0395-282X>

Айсулу С. Каренкина³, <https://orcid.org/0000-0002-0782-3099>

Иван В. Котов³, <https://orcid.org/0000-0003-0074-4520>

Alan J. Russell⁴, <https://orcid.org/0000-0001-5101-4371>

Шолпан Н. Аскарова^{1*}, <https://orcid.org/0000-0001-6161-1671>

¹ National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

² Школа естественных, социальных и гуманитарных наук, Назарбаев Университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

³ ГКП на ПХВ "Патологоанатомическое бюро" акимата города Нур-Султан, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

⁴ Institute for Complex Engineering Systems, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

Введение: В последнее время применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК), являющихся прогениторными клетками остеогенеза, в качестве активаторов репаративного остеогенеза в зоне замедленного сращения переломов при остеопорозе и схожих патологиях костной ткани, является одним из перспективных направлений научных исследований. В этой связи, в сотрудничестве с *Carnegie Mellon University* (USA), в качестве таргетной транспортной платформы, был разработан способный стабильно связываться с МСК остеофильный бисфосфонатный полимер РВР-f-NHS. Ранее было показано, что *in vitro* полимер способен ингибировать остеокластную активность, и в то же время не является цитотоксичным и не оказывает влияния на процессы остеогенной дифференцировки МСК.

Цель исследования: провести доклинические исследования острой и хронической токсичности полимера, оценить регенеративный потенциал локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных остеофильным полимером, при переломах локтевой кости мелких лабораторных животных на фоне экспериментально индуцированного остеопороза.

Методы: Для подтверждения клинической эффективности применения МСК, модифицированных остеофильным полимером, были проведены исследования *in vivo* с созданием модели индуцированного перелома локтевой кости у крыс на фоне экспериментального эстроген-зависимого остеопороза. Исследования острой и хронической токсичности остеофильного бисфосфонатного полимера проводились на базе РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники», Министерства Здравоохранения Республики Казахстан.

Результаты: Прижизненный анализ динамики изменения костной плотности в зоне перелома локтевой кости на фоне экспериментально индуцированного эстроген-зависимого остеопороза показал статистически значимое 27%-ное увеличение плотности костной ткани через 4 недели после остеотомии локтевой кости в группе животных, получавших 4-х кратную трансплантацию модифицированных полимером МСК. Результаты прижизненных наблюдений были подтверждены *post-mortem* анализом гистологических препаратов зоны перелома трубчатой кости. Изучение динамики внутритканевого распределения МСК показали наличие трансплантированных клеток в зоне костного дефекта на протяжении как минимум одной недели после локальной инъекции клеточного препарата. Результаты доклинических исследований биобезопасности показали отсутствие острой и хронической токсичности полимера.

Выводы: Полученные данные позволили сделать заключение о том, что предложенный мультипликативный подход, основанный на применении клеточной терапии МСК, модифицированных остеофильным полимером, имеющим в своем составе две функциональные группы – бисфосфонатную и гидроксисукцимидную, является безопасным и эффективным способом стимуляции репаративного остеогенеза при остеопороз-ассоциированных травматических повреждениях костной ткани.

Ключевые слова: остеопороз, репаративный остеогенез, мезенхимальные стволовые клетки, остеофильный полимер, клеточная терапия, таргетная транспортная платформа.

Abstract

**PERSPECTIVE APPROACHES FOR TREATMENT
OF LOW-ENERGY INJURY BONE TISSUE INJURIES
USING BIOENGINEERING METHODS AND CELL THERAPY****Yuliya I. Safarova (Yantsen)¹**, <https://orcid.org/0000-0003-0695-0413>**Farkhad S. Olzhayev¹**, <https://orcid.org/0000-0002-1906-6654>**Bauyrzhan A. Umbayev¹**, <https://orcid.org/0000-0002-0286-7252>**Akmaral S. Yerkebayeva²**, <https://orcid.org/0000-0002-0395-282X>**Aisulu S. Karenkina³**, <https://orcid.org/0000-0002-0782-3099>**Ivan V. Kotov³**, <https://orcid.org/0000-0003-0074-4520>**Alan J. Russell⁴**, <https://orcid.org/0000-0001-5101-4371>**Sholpan N. Askarova^{1*}**, <https://orcid.org/0000-0001-6161-1671>¹ National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;² School of Sciences and Humanities, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;³ GKP on PHV "Pathological Bureau" akimat Nur-Sultan city, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;⁴ Institute for Complex Engineering, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

Introduction: Autologous mesenchymal stem cells (MSCs) are osteogenesis progenitor cells that activate the reparative processes in the zone of delayed fracture healing in osteoporosis and similar bone pathologies. Use of MSCs in regenerative medicine is one of the promising areas of scientific research. In this regard, in cooperation with Carnegie Mellon University (USA), an osteophilic bisphosphonate polymer capable of stably binding to MSC has been developed as a targeted transport platform. It has been previously shown that the polymer is able to inhibit osteoclastic activity *in vitro*, and, at the same time, it is not cytotoxic and does not affect the osteogenic differentiation of MSCs.

Goal: to perform preclinical studies of acute and chronic polymer toxicity, to assess the regenerative potential of local transplantation of MSCs functionalized with an osteophilic polymer in experimentally induced osteoporotic ulna fracture of small laboratory animals.

Methods: To confirm the therapeutic potential of MSCs functionalized with osteophilic polymer, *in vivo* studies were conducted on rats with the experimentally induced ulna fracture and experimental estrogen-dependent osteoporosis. Studies of acute and chronic toxicity of an osteophilic bisphosphonate polymer were carried out on the basis of the Republican State Pharmacopoeia Laboratory at the National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan

Results: Intravital analysis of the bone density dynamics in the zone of ulna fracture showed a statistically significant 27% increase in bone density 4 weeks after osteotomy of the ulna in the group of animals receiving 4 transplantations (once per week) of the MSC modified with the polymer. The results of intravital observations were confirmed by post-mortem analysis of histological slices of the fracture zone. A study of the dynamics of interstitial distribution of the MSCs showed the presence of transplanted cells in the area of the bone defect for at least one week after local injection of the modified cell. The results of preclinical biosafety studies have shown the absence of acute and chronic polymer toxicity.

Conclusion: The data obtained allowed us to conclude that the proposed combined approach, based on the use of cell therapy for MSCs modified with an osteophilic polymer, which has two functional groups - bisphosphonate and hydroxysuccinimide, is a safe and an effective way to stimulate reparative osteogenesis in osteoporosis-associated traumatic bone injuries.

Keywords: osteoporosis, reparative osteogenesis, mesenchymal stem cells, osteophilic polymer, cell therapy, targeted delivery.

Түйіндеме

**БИОИНЖЕНЕРИЯ ЖӘНЕ ЖАСУША ТЕРАПИЯСЫН ҚОЛДАНУ
АРҚЫЛЫ СҮЙЕК ТІНДЕРІНІҢ АЗ ЭНЕРГИЯЛЫ ЖАРАҚАТТАРЫН
ЕМДЕУДІҢ ПЕРСПЕКТИВТІ ТӘСІЛДЕРІ****Юлия И. Сафарова (Янцен)¹**, <https://orcid.org/0000-0003-0695-0413>**Фархад С. Олжаев¹**, <https://orcid.org/0000-0002-1906-6654>**Бауржан А. Умбаев¹**, <https://orcid.org/0000-0002-0286-7252>

Акмарал С. Еркебаева², <https://orcid.org/0000-0002-0395-282X>

Айсұлу С. Каренкина³, <https://orcid.org/0000-0002-0782-3099>

Иван В. Котов³, <https://orcid.org/0000-0003-0074-4520>

Alan J. Russell⁴, <https://orcid.org/0000-0001-5101-4371>

Шолпан Н. Аскарова^{1*}, <https://orcid.org/0000-0001-6161-1671>

¹ National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

² Жаратылыстану, әлеуметтік және гуманитарлық ғылымдар мектебі, Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

³ Нұр-Сұлтан қаласы әкімдігінің шаруашылық жүргізу құқығындағы «Патологоанатомия бюро» МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы;

⁴ Institute for Complex Engineering, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

Кіріспе: Соңғы уақытта остеогенездің прогениторлы жасушалары болып табылатын аутологиялық мезенхималық бағаналы жасушаларды (МБЖ) пайдалану остеопороздағы және сол сияқты сүйек тіндерінің патологиясындағы сынықтардың баяу синтезделу аймағында репаративті остеогенездің қоздырғышы ретінде қолдану ғылыми зерттеулердің перспективалық бағыттарының бірі болып табылады. Осыған байланысты, Карнеги Меллон Университетімен (АҚШ) бірлесе отырып, мақсатты көлік платформасы ретінде МБЖ-мен тұрақты байланыстыруға қабілетті остеофильді PBP-f-NHS остеофильдік бисфосфонат полимері жасалды. Бұрын біз *in vitro* жағдайында полимердің остеокластикалық белсенділікті тежей алатындығын, сонымен бірге ол цитотоксикалық емес және МБЖ-ң остеогендік саралануына әсер етпейтінін көрсеттік.

Мақсаты: жедел және созылмалы полимерлі уыттылығын зерттеуге бағытталған клиникаға дейінгі зерттеулер жүргізу, эксперименталды остеопороз аясында кіші зертханалық жануарлардың шынтақ сүйегі сынған жағдайда, остеофильді полимермен жұмыс жасайтын мезенхималық бағаналы жасушалардың жергілікті трансплантациясының қалпына келуіне әсер етуін бағалау.

Әдістер: Остеофильді полимермен модификацияланған МБЖ-ң қолданудың клиникалық тиімділігін растау үшін, *in vivo* зерттеулерінде эстрогенге тәуелді остеопорозпен индукцияланған егеуқұйрықтардағы сыну моделін жасау арқылы зерттеулер жүргізілді. Остеофильдік бисфосфонат полимерінің жедел және созылмалы уыттылығын зерттеу Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің «Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығының» зертханасында негізінде жүргізілді.

Нәтижелер: Эксперименталды эстрогенге тәуелді остеопороздың эксперименталды эстрогенге тәуелді остеопорозы аясында шынтақ сүйегі сынуы аймағындағы сүйек тығыздығының өзгеру динамикасының өмірлік талдауы модификацияланған 4 есе полимер МБЖ трансплантацияны алған жануарлар тобында шынтақ сүйегінің остеоотомиясынан 4 апта өткеннен кейін сүйек тығыздығының 27% жоғарылауын көрсетті.

Тірі кезінде бақылаудың нәтижелері жіліктің сыну аймағының гистологиялық препараттарын өлімнен кейінгі талдау арқылы расталды. МБЖ-ң интерстициалды таралу динамикасын зерттеу жасуша препаратының жергілікті инъекциясынан кейін кем дегенде бір апта ішінде сүйек ақауы аймағында трансплантация жасушаларының болуын көрсетті. Клиникаға дейінгі биологиялық қауіпсіздік зерттеулерінің нәтижелері жедел және созылмалы полимерлі уыттылықтың жоқтығын көрсетті.

Қорытынды: Алынған мәліметтер екі функционалды тобы бар - бисфосфонат және гидроксисукцимид, остеофильді полимермен модификацияланған МБЖ-ң жасушалық терапиясын қолдануға негізделген ұсынылған мультипликативті тәсіл, остеопорозға байланысты сүйек тінінің жарақаттануы репаративті остеогенезді ынталандырудың қауіпсіз және тиімді әдісі деп тұжырым жасауға мүмкіндік берді.

Түйінді сөздер: *остеопороз, репаративті остеогенез, мезенхималық бағаналы жасушалар, остеофильді полимер, жасуша терапиясы, мақсатты көлік платформасы.*

Библиографическая ссылка:

Сафарова (Янцен) Ю.И., Олжаев Ф.С., Умбаев Б.А., Еркебаева А.С., Каренкина А.С., Котов И.В., Russell A.J., Аскарова Ш.Н. Перспективные подходы лечения низкоэнергических травматических повреждений костной ткани с использованием методов биоинженерии и клеточной терапии // Наука и Здравоохранение. 2019. 5 (Т.21). С. 68-80.

Safarova (Yantsen) Yu.I., Olzhayev F.S., Umbayev B.A., Yerkebayeva A.S., Karenkina A.S., Kotov I.V., Russell A.J., Askarova Sh.N. Perspective approaches for treatment of low-energy injury bone tissue injuries using bioengineering methods and cell therapy // *Nauka i Zdravookhranenie* [Science & Healthcare]. 2019, (Vol.21) 5, pp. 68-80.

Сафарова (Янцен) Ю.И., Олжаев Ф.С., Умбаев Б.А., Еркебаева А.С., Каренкина А.С., Котов И.В., Russell A.J., Аскарова Ш.Н. Биоинженерия және жасуша терапиясын қолдану арқылы сүйек тіндерінің аз энергиялы жарақаттарын емдеудің перспективті тәсілдері // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2019. 5 (Т.21). Б. 68-80.

Введение

В настоящее время, с бурным развитием методов регенеративной медицины и биоинженерии, применение клеточной терапии является перспективным направлением в лечении остеопороз-ассоциированных и других низкоэнергетических переломов костей. Снижение плотности и прочности кости при остеопорозе происходит, во-первых, из-за усиления функциональной активности остеокластов, и, во-вторых, в результате снижения количества клеток-предшественников остеобластов и развития так называемой «остеогенной недостаточности», и, как следствие, невозможности обеспечить надлежащий уровень остеорепарации. В этой связи, трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является одним из наиболее многообещающих подходов в улучшении регенерации костной ткани при патологических труднозаживающих переломах, так как данные клетки являются естественными предшественниками остеобластов, обладают иммуномодулирующими свойствами, способны секретировать факторы роста, ускоряющие процессы восстановления тканей [8].

Существует два основных пути трансплантации МСК: системный и местный. Системное введение включает внутривенную и внутриартериальную инъекцию суспензию клеток, тогда как местное введение включает прямую трансплантацию клеток в зону интереса [5]. Ранние исследования в области клеточной трансплантологии показали, что при системном введении большая часть трансплантированных клеток в первую очередь попадает в легкие, откуда они либо элиминируются, либо постепенно мигрируют в другие ткани [25,9,23,7,10]. Миграция МСК из легких, как полагают, в основном обусловлена воспалительными процессами, протекающими в других внутренних органах, так как в силу своей биологии, МСК являются очень чувствительными к хемокину CCL21, вырабатываемому клетками сосудистого эндотелия вблизи зоны воспаления [27, 21]. Таким образом, на эффективность системного введения МСК в случае патологий костной ткани могут в значительной мере влиять другие хронические состояния, присутствующие в организме реципиента. Другим недостатком системного введения МСК является агрегация трансплантированных клеток в областях аномальной пролифераций клеток, например при раке молочной железы, яичника и других онкологических заболеваниях [20]. С этой точки зрения, в случае терапии патологий костной ткани, местная трансплантация является предпочтительней, так как обеспечивает локальное введение высокого пула МСК непосредственно в зону дефекта.

Тем не менее, в некоторых исследованиях ставится под сомнение способность к выживанию клеток ввиду отсутствия кислорода и питательных веществ вдали от кровотока [26]. Применение методов поверхностной модификации клеток в данном случае может улучшить механизм хоуминга, а также, в зависимости от функциональной активности лиганды, иметь и сочетанный эффект.

Поверхностная модификация клеточной мембраны может улучшить эффективность хоуминга за счет

лиганд, имеющих высокую аффинность к костной ткани. В исследованиях Guan et al и Yao et al была разработана полимерная конструкция LLP2A-Ale, которая посредством лиганды LLP2A связывалась с поверхностью клеточной мембраны, а таргетная доставка к костной ткани обеспечивалась за счет высокой аффинности алендроната к костной ткани [12,33]. Применяемый в нашем исследовании остеофильный полимер PBP-f-NHS имеет в своем составе две функциональные группы – бисфосфонатную и гидроксисукцимидную (NHS). NHS-группа способна ковалентно связываться с аминными и карбоксильными группами, находящимися на поверхности клеточных мембран, и обеспечивает взаимодействие полимера с мезенхимальными стволовыми клетками. В свою очередь, бисфосфонаты, имеющие высокую степень сродства к гидроксиапатитам, составляющим почти 2/3 сухой массы кости, с одной стороны, призваны обеспечивать аффинность функционализированных полимером клеток к костной ткани, и, с другой стороны, ингибировать фагоцитарную активность остеокластов.

В наших предыдущих работах было показано, что полимер способен стабильно связываться с МСК и костной тканью, не оказывает влияния на процессы клеточной пролиферации и остеогенной дифференцировки МСК, и обладает остеокласт-ингибирующей активностью *in vitro* [6, 24]. Целью настоящего исследования явилось доклиническое исследование острой и хронической токсичности полимера, а также оценка регенеративного потенциала локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных остеофильным полимером, при переломах локтевой кости мелких лабораторных животных на фоне экспериментально индуцированного остеопороза.

Методы

Получение и культивирование МСК

МСК выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей 4-х недельных крыс согласно описанному ранее протоколу [34]. Вкратце, трубчатые кости (бедренные, плечевые) крыс помещали в фосфатный буфер, содержащий 1% антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), и очищали от мягких тканей. Эпифизы удаляли, а из диафизов вымывали костный мозг с помощью полноценной питательной среды DMEM, содержащей 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и 1% антибиотиков. Выделенную массу ресуспендировали и помещали в пробирку, с последующим центрифугированием при 300g в течение 10 минут. После удаления супернатанта осажденные клетки разводили в полноценной среде DMEM и высевали на культуральные матрасы. По достижении 95% конfluence проводили механическую очистку культуры МСК путем встряхивания культуральных матрасов на орбитальном шейкере при 800 оборотах в течение 1 часа. Затем клетки монослоя пересевали на почерные стекла и проводили оценку чистоты полученной культуры. Оценку чистоты культуры МСК проводили с помощью иммунофлуоресцентного анализа МСК негативных маркеров CD34 и CD19, которые экспрессируются в гемопоэтических клетках, а

также специфических МСК позитивных маркеров CD90 и CD105.

Трансфекция МСК люциферазным лентивирусным вектором и биолюминесцентный анализ in vitro

Были использованы лентивирусные частицы LVT-Luc2 (Eurogen). Клетки высевали с конечной плотностью 2×10^5 клеток в 12-луночные планшеты. Лентивирусные частицы оттаивали при комнатной температуре. 200 μ л лентивирусных частиц (0.5×10^6 трансдуцирующих единиц на мл.) добавляли в каждую лунку. Для усиления трансфекции использовали протамин сульфат (Sigma Aldrich). Протамин сульфат растворяли в воде MilliQ и добавляли в каждую лунку для достижения финальной концентрации 100 μ г/мл. Плашку инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5%CO₂. После среду заменяли на полную питательную

среду DMEM (15% ФБС, 1% Пен/Стреп). Спустя 72 часа проводили анализ на эффективность трансфекции с помощью системы для оптического имиджинга *in vivo* IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA). Для *in vitro* биолюминесцентного анализа использовали D-люциферин светляка (Perkin Elmer, USA). Маточный раствор готовили с концентрацией 30 мг/мл в стерильных условиях, аккуратно переворачивая, разливали и хранили при -20°C. Рабочий раствор готовили с использованием подогретой питательной среды для достижения финальной концентрации 150 μ г/мл (1:200). Перед проведением анализа с помощью имиджера рабочий раствор добавляли в каждую лунку. Анализ проводили в режиме биолюминесценции, контролем служили клетки, не подвергавшиеся трансфекции (рисунок 1).

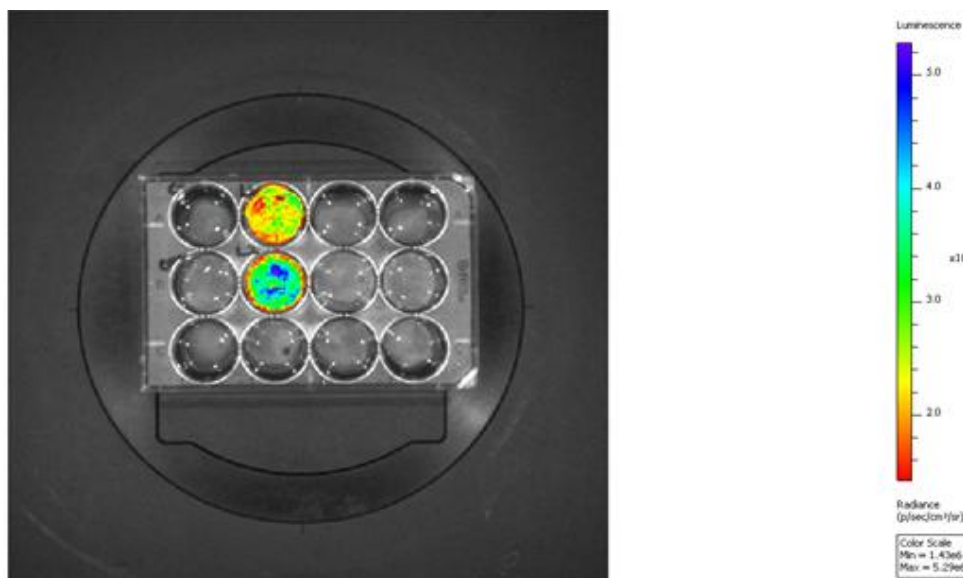


Рисунок 1. Детекция биолюминесценции популяций МСК, трансфецированных - (лунки № 2 и 6) и не трансфецированных люциферазным лентивирусным вектором - (лунки 1 и 5).

Синтез и химическая структура остеофильного бисфосфонатного полимера РВР-f-NHS

Процесс синтеза и химическая структура остеофильного бисфосфонатного полимера РВР-f-NHS были опубликованы в наших предыдущих работах [6, 24].

Функционализация МСК остеофильным полимером

Трансфецированные МСК инкубировали с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 минут в водяной бане 37°C в 1 мл PBS при pH 8.0. После инкубации взвесь клеток центрифугировали при 300g в течение 5 минут, промывали в PBS при pH 7.4; процедуру повторяли три раза.

Модель остеопороза и перелома локтевой кости

Модель остеопороза у лабораторных крыс была создана путем проведения стандартной билатеральной овариэктомии (OVX). Плотность костной ткани оценивали непосредственно перед операцией и через три месяца после проведения овариэктомии с помощью системы для оптического имиджинга *in vivo* IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA). Остеопороз считался подтвержденным при уменьшении плотности костной ткани на 10% и более по сравнению с

первоначальной. Для оценки регенеративного потенциала модифицированных МСК, клетки функционализировали полимером согласно описанной выше методике; была использована отработанная в нашей лаборатории модель хирургического перелома локтевой кости у крыс с остеотомией диафиза локтевой кости (рисунок 2) на фоне экспериментального эстроген-зависимого остеопороза.

Анализ костной плотности с помощью имиджера микроКТ IVIS (Caliper, USA)

Радиография и прижизненная оценка плотности костной ткани в зоне перелома проводилась при помощи аппарата микро КТ (IVIS Spectrum CT, Perkin Elmer.) раз в неделю. Использовали микроКТ с размером вокселей 150 μ , 440 альт., 50 кВ, разрешение 425, FOV LxWxH 12x12x13 см. Приблизительная доза составила 52 мГв на одно сканирование. 3-мерная реконструкция и оценка плотности кости выполнялась с использованием программного обеспечения Living Image 4.3.1 (Caliper). Полученное изображение было экспортировано в формате DICOM и сохранено на жестком диске. Плотность кости определяли как оптическую плотность в объеме кости.

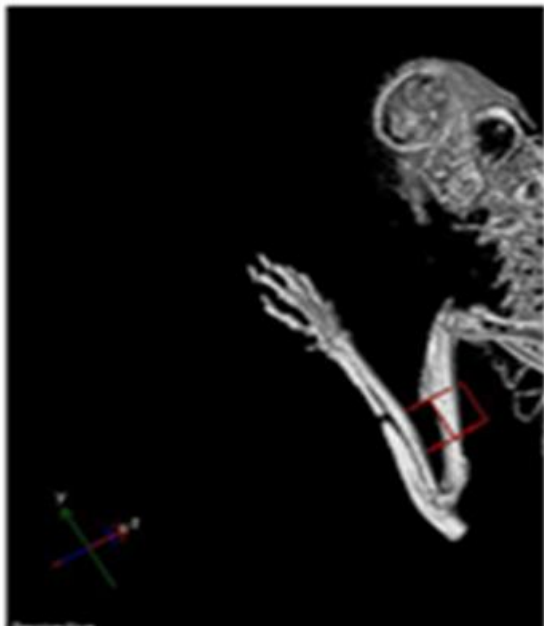


Рисунок 2. Остеотомия локтевой кости.

Гистологический анализ

После выведения из эксперимента, лабораторные животные умерщвлялись путем цервикальной дислокации под изофлурановой анестезией, локтевая кость отделялась от сопутствующих тканей, проводилась макроскопическая оценка материала. Для микроскопической оценки процессов регенерации в зоне сращения перелома, ткани локтевой кости поврежденной конечности были зафиксированы в 10% нейтральном растворе формалина (рН 7,2–7,4). Фрагменты костной ткани были подвергнуты предварительной декальцинации, с последующей гистологической обработкой по общепринятой технологии с заливкой в парафин. Из парафиновых блоков были изготовлены микротомные срезы толщиной 7-10 микрон с последующей окраской гематоксилином и эозином и изучением в светооптическом микроскопе.

Иммунофлюоресцентный анализ гистологических срезов на наличие маркеров люциферазы в костной ткани в зоне перелома

Трансдуцированные люциферазой клетки анализировали на гистологических срезах с помощью иммунофлюоресцентного анализа. Антитела Goat Luc Ab (Abcam) использовали как первичные антитела и Rabbit AntiGoat Alexa488 H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam) как вторичные. Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 700.

Изучение острой и хронической токсичности остеофильного бисфосфонатного полимера PBP-f-NHS

Исследования острой и хронической токсичности остеофильного бисфосфонатного полимера проводились на базе РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники», Министерства Здоровья Республики Казахстан.

Исследование острой токсичности проводилось на 12 белых инбредных половозрелых крысах обоего пола массой 180–200 г, разделенных на две группы.

Животные распределялись по группам случайным образом. В качестве критерия приемлемой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$). Животным первой исследовательской группы было введено 5 мл водного раствора полимера в начальной дозе 500 мг/кг внутривентриально однократно; животным контрольной группы была введена вода для инъекций в том же объеме. На протяжении 14 суток наблюдали за состоянием шерстного покрова и слизистых оболочек животных, поведенческими реакциями, регистрировали массу тела. О негативном влиянии введенных исследуемых образцов судили по клиническим симптомам интоксикации (общее состояние животных, особенности поведения, интенсивность двигательной активности, реакции на звуковые и световые раздражители, состояние кожного и волосяного покрова, окраска слизистых оболочек), динамике массы тела, потреблению кормов и воды, смертности.

Изучение хронической токсичности проводилось на белых инбредных половозрелых крысах обоего пола массой 180–200 г, разделенных на 4 группы. Животные распределялись по группам случайным образом. В качестве критерия приемлемой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела ($\pm 10\%$). В каждую группу было включено по 10 животных. Для изучения хронической токсичности исследуемые образцы вводились внутривентриально в максимально допустимом объеме 5.0 мл для крыс массой 180-200 г в течение 28 дней. При расчете дозировок для хронической токсичности использованы результаты определения параметров острого токсического действия образцов на крысах при внутривентриальном введении. В данном случае ЛД₅₀ исследуемых образцов составляет 1000 мг/кг. Исходя из расчета вводимые дозы исследуемых образцов составили: 200 мг/кг; 100 мг/кг и 50 мг/кг (соответственно 1/5; 1/10; 1/20 от 1000 мг/кг). Наблюдение за общим состоянием, поведением, двигательной активностью животных велось в течение 28 дней. В первый день после введения препарата животные находились под непрерывным наблюдением. На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием шерстного покрова и слизистых оболочек животных, поведенческими реакциями, регистрировали массу тела. О негативном влиянии введенных препаратов судили по клиническим симптомам интоксикации (общее состояние животных, особенности поведения, интенсивность двигательной активности и т.д.), динамике массы тела, смертности. Вычисляли среднее значение полученных величин и стандартное отклонение.

Статистический анализ

Полученные данные представлены в виде средней \pm стандартная погрешность средней величины ($M \pm SEM$). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Значения считались достоверно различными при $p \leq 0.05$. Анализ проводился с использованием статистической программы SigmaPlot.

Результаты

Оценка регенераторного потенциала локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, функционализированных остеофильным полимером, при переломах локтевой кости мелких лабораторных животных на фоне экспериментально индуцированного остеопороза.

Модель остеопороза у лабораторных крыс создавали путем удаления яичников. Удаление яичников является причиной эстроген-зависимого остеопороза: за счет уменьшения концентрации эстрогена уменьшается концентрация кальцитонина, что приводит к потере минеральных веществ, а в особенности кальция, и, соответственно «хрупкости кости»; другим эффектом снижения концентрации эстрогена в крови является усиление остеокластной активности. Исходя из выше-сказанного, билатеральная овариэктомия является эффективным способом создания модели остеопороза.

Удаление яичников производили у самок белых беспородных крыс в возрасте 2 месяца. Оценку плотности костной ткани производили непосредственно перед и на протяжении трех месяцев после удаления яичников при помощи микроКТ IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA). Оценку проводили в единицах измерения Hounsfield. У группы животных с экспериментально-индуцированным остеопорозом и у контрольной группы (без удаления яичников) определяли плотность костной ткани правой и левой верхней конечности.

Анализ динамики изменения плотности костной ткани, представленный на рисунке 3, проводили методом соотношения финальной плотности костной ткани, измерявшейся через три месяца после проведения операции, к начальной плотности костной ткани (непосредственно перед операцией), которая приравнивалась к единице.

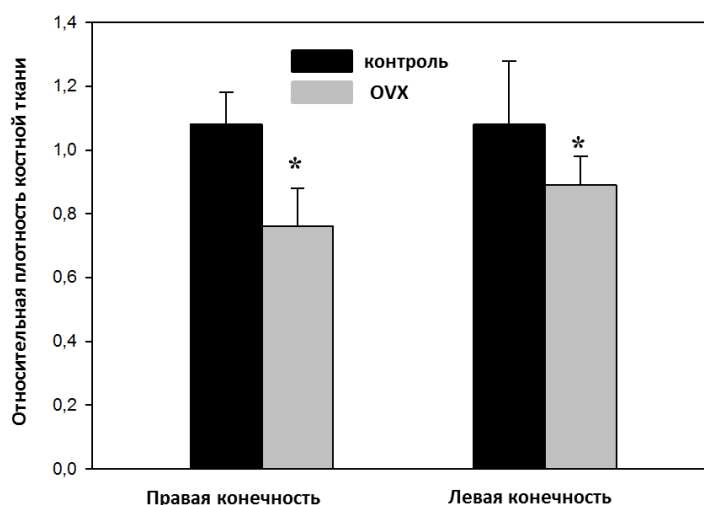


Рисунок 3. Анализ костной плотности у здоровых и OVX животных.

(Данные представлены в виде соотношения финальной плотности костной ткани (3 месяца) к начальной (до оперативного вмешательства); достоверность данных представлена тестом Стьюдента (* - $p < 0.05$ по сравнению с контролем, $n=20$)

При соотношении равному 1 - плотность костной ткани оставалась неизменной; если значение >1 , значит, плотность костной ткани увеличилась; если значение <1 , значит плотность костной ткани уменьшилась, \Rightarrow активные остеопоротические процессы. Из рисунка 3 видно, что у контрольных животных, не подвергшихся процедуре овариэктомии, плотность ткани незначительно повышалась (примерно на 10%), что связано с нормальным физиологическим взрослением животных. Напротив, у прооперированных животных через три месяца после овариэктомии наблюдалось $\sim 25\%$ -ое достоверное снижение плотности костной ткани, что свидетельствует о развитии эстроген-зависимого остеопороза у животных этой группы.

С целью оценки регенеративного потенциала МСК, модифицированных остеофильным полимером, была создана модель индуцированного перелома локтевой кости у крыс с остеотомией диафиза локтевой кости на фоне экспериментально эстроген-зависимого остеопороза (рисунок 3). Модель перелома локтевой кости была выполнена в 4 группах (по 5 животных).

Животные первой группы служила контролем и не получала никакого лечения; животным второй и третьей группы вводили либо остеофильный полимер, либо просто МСК, в то время как животным четвертой группы вводили МСК, модифицированные остеофильным полимером, в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Процедуру трансплантации клеток и полимера проводили раз в неделю на протяжении четырех недель. Для оценки динамики формирования костной мозоли на протяжении четырех недель проводили оценку плотности костной ткани в местах перелома. Разницу в костной плотности высчитывали как соотношение финальной плотности (4 неделя) к начальной (на момент перелома), приравненной к единице, у каждой крысы индивидуально. Затем среднее значение было подсчитано для каждой группы и представлено на рисунке 4. При соотношении равному 1 - плотность костной ткани осталась неизменной; если значение <1 , значит плотность костной ткани уменьшилась; если значение >1 , значит плотность костной ткани увеличилась, \Rightarrow активизируются регенеративные процессы. На рисунке 4 видно отсутствие динамики

регенерации костной ткани у контрольных животных, не подвергшихся лечению, и животных получавших только полимер или только МСК. В то же самое время, у животных, получавших местную инъекцию модифицированных МСК наблюдалось статистически

достоверное 27% увеличение плотности костной ткани в местах перелома (рисунок 4), а на рентгеновских снимках, полученных через четыре недели после перелома, четко видно формирование костной мозоли (рисунок 5).

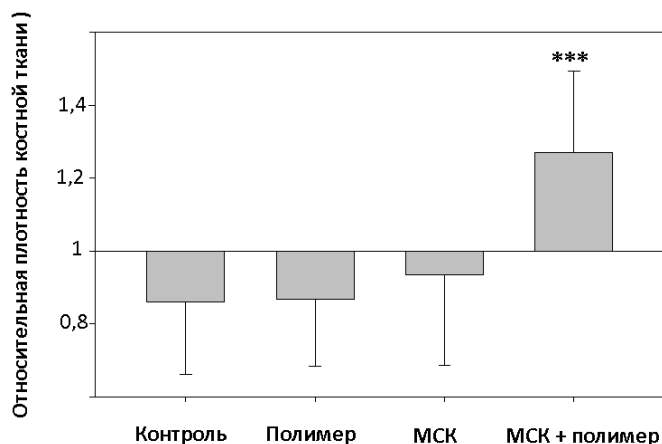
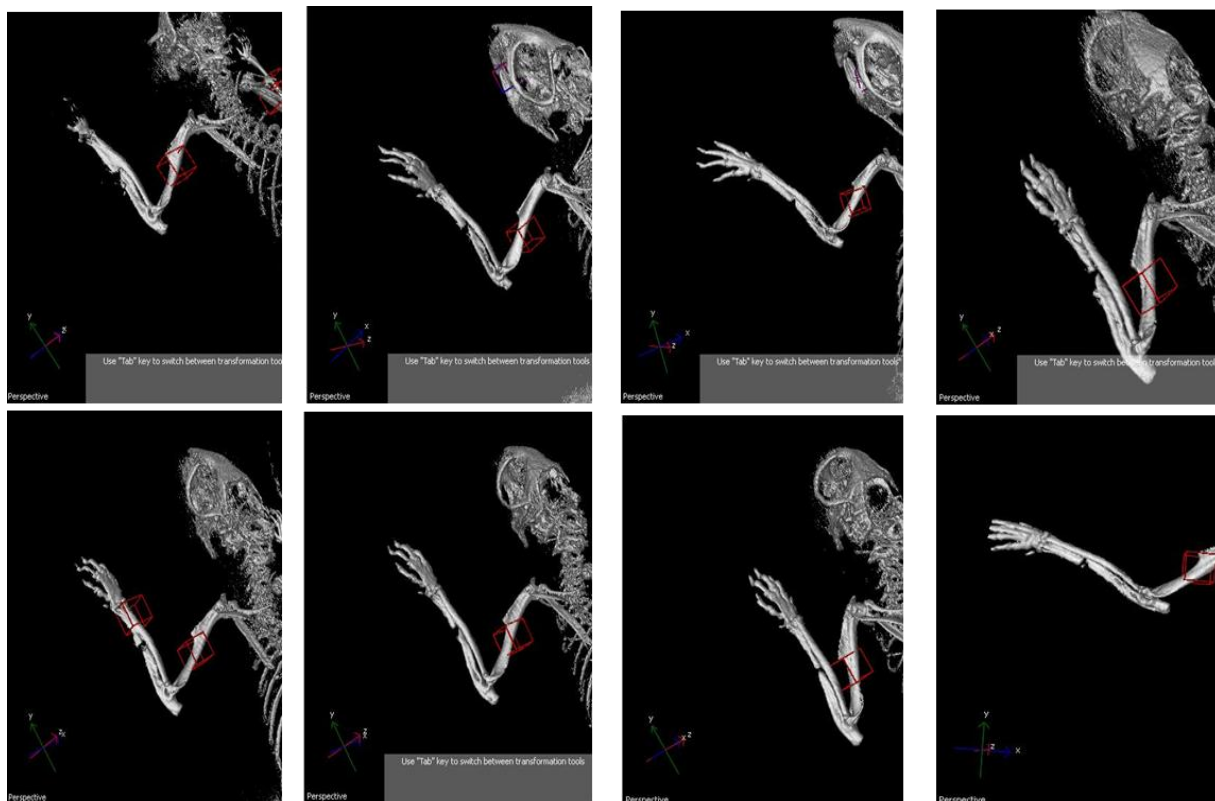


Рисунок 4. Оценка эффективности введения модифицированных остеофильным полимером МСК при переломе локтевой кости на фоне остеопороза.

(Количественные данные представлены в виде плотности костной ткани в зоне остеотомии через четыре недели после начала эксперимента, нормализованные к плотности костной ткани, измеренной непосредственно после оперативного вмешательства (приравненная к единице). Достоверность данных представлена тестом One Way ANOVA (***) - $p \leq 0.001$ по сравнению с контролем, $n=37$)



Группа 1
Контроль

Группа 2
(Полимер+PBS)

Группа 3 (МСК +
PBS)

Группа 4 (МСК +
Полимер+PBS)

Рисунок 5. Фотографии локтевой и лучевой костей левой верхней конечности лабораторных крыс, сделанные с помощью системы для оптического имиджинга in vivo IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA): верхний ряд – спустя 2 часа после перелома (остеотомии), нижний ряд – спустя 4 недели.

При проведении *post-mortem* анализа гистологических препаратов зоны перелома трубчатой кости у экспериментальных животных четвертой группы, по сравнению с животными других групп, была отмечена высокая активность процессов репаративного остеогенеза с солидными разрастаниями незрелых

клеток, выявлены зрелые остеобласты, участки пролиферации на поверхности уже сформированных костных балок. На границе с мягкими тканями, наблюдали образование узловатых остеообразующих клеточных пролифератов по типу костной мозоли (рисунок 6).

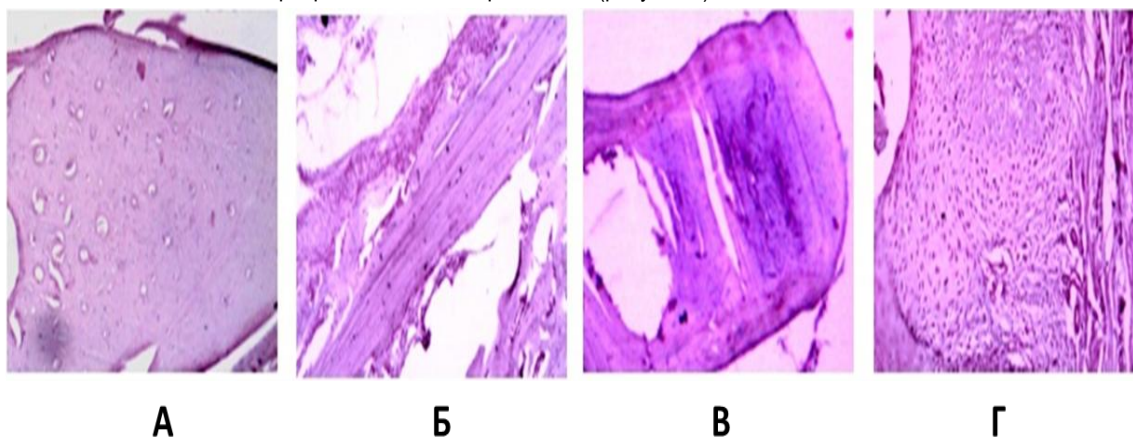


Рисунок 6. Гистологический анализ костной ткани в зоне перелома.

А – контрольная группа; Б – группа, получавшая только полимер; В – группа, получавшая только МСК; Г - группа, получавшая комбинированное лечение МСК, функционализированных полимером.

Для отслеживания динамики внутритканевого распределения трансплантированных клеток были использованы МСК, трансфицированные лентивирусными частицами Luc-LVT с люциферазой. Люцифераза - это фермент, субстратом для которого является люциферин. При попадании в клетки, экспрессирующие люциферазу, люциферины окисляются в присутствии данного фермента

с образованием оксильюциферина и излучают энергию в виде света - биолюминесценцию. Для детекции биолюминесцентного сигнала люциферина использовали систему для оптического имиджинга *in vivo* IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA). Результаты биолюминесцентного анализа на экспрессию люциферазы показаны на рисунке 7.

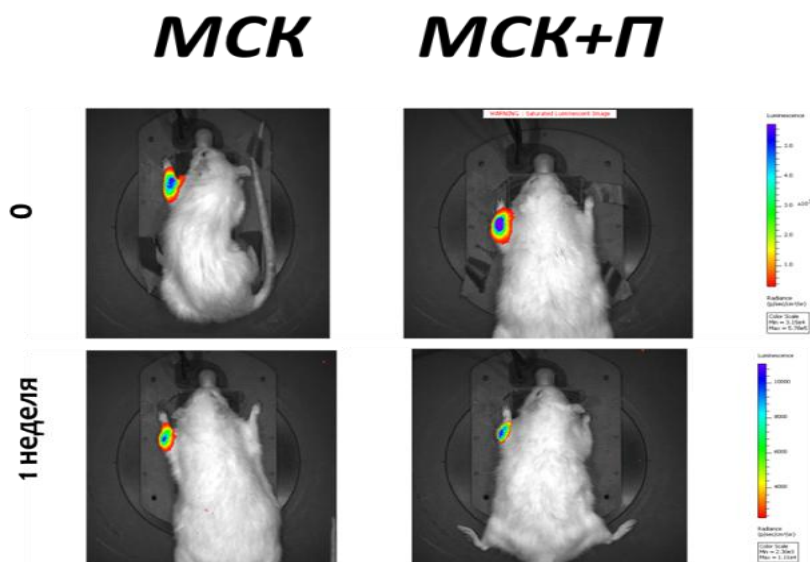


Рисунок 7. Биолюминесцентный анализ трансплантированных клеток.

Люминесцентный сигнал четко детектировался на протяжении одной недели после трансплантации клеток в третьей и четвертой экспериментальных группах, однако на третьей неделе сигнал не удалось детектировать в обеих группах животных. Возможно, это связано с либо с низким количеством выживших МСК, либо миграцией клеток в глубину костной ткани, что, ввиду ограниченной разрешающей способности имиджера, затрудняет детекцию биолюминесцентного сигнала.

Для дальнейшего изучения динамики внутритканевого распределения трансплантированных клеток был проведен иммунофлуоресцентный анализ гистологических срезов на наличие маркеров люциферазы в костной ткани в зоне перелома. Результаты анализа микрофотографий, представленные на рисунке 8, подтвердили наличие люцифераз - положительных клеток в составе костной ткани, что дает нам основания полагать о жизнеспособности и дифференциации трансплантированных МСК в клетки-остеобласты.

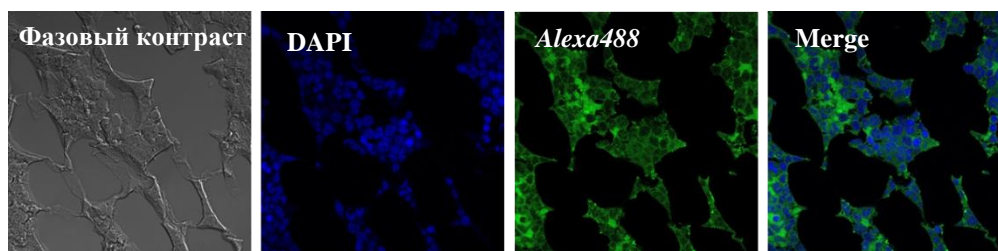


Рисунок 8. Иммунофлуоресцентный анализ на люцифераз-положительные клетки. Были использованы антитела Goat Luc Ab +AntiGoat Alexa488 produced in rabbit, 20X (Конфокальный микроскоп Carl Zeis LSM 700).

Доклиническое исследование острой токсичности полимера

При однократном внутрибрюшинном введении исследуемых образцов животным в дозе 500 мг/кг общее состояние животных опытной и контрольной группы не изменилось, падежа во всех опытных группах не наблюдалось. Реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители были без изменений. Для увеличения вводимой дозы начальная доза 500 мг была введена повторно. После двукратного введения начальной дозы 500 мг состояние животных также не изменилось. Введенная

суммарная доза исследуемых образцов в пересчете на активное соединение составила 1000 мг/кг. Поведенческие реакции экспериментальных животных не отклонялись от нормы. В состоянии шерстного и кожного покрова патологических изменений не обнаружено. Шерсть блестящая, густая, плотно прилегающая, хорошо удерживалась. Динамика массы тела экспериментальных животных была положительной (таблица 1). Как видно из таблицы животные из опытной группы прибавляли в весе в течение всего периода наблюдения. После окончания эксперимента животные были декапитированы.

Таблица 1. Динамика массы тела экспериментальных крыс.

№ гр	Дозы, путь введения	Динамика массы (г), сутки после начала опыта				Прирост массы тела, г
		Фон	через 24 часа	Через 7 дней	Через 14 дней	
1	Контрольные	♀184,1 ± 0,7	♀184,6 ± 0,4	♀190,3 ± 0,7	♀193,6 ± 1,4	♀+9,5 ♂+10,4
		♂184,7 ± 0,3	♂184,8 ± 0,3	♂190,2 ± 0,8	♂195,1 ± 1,2	
2	СОБП	♀184,1 ± 0,7	♀184,8 ± 0,7	♀189,8 ± 0,2	♀193,6 ± 0,9	♀+9,5 ♂+9,9
		♂184,7 ± 0,3	♂186,0 ± 0,5	♂190,9 ± 1,0	♂194,6 ± 1,0	

Для оценки состояния внутренних органов, было проведено вскрытие животных экспериментальной и контрольной группы. Визуальные наблюдения показали, что у животных обеих групп сердце было правильной формы, перикард чистый, без спаек и наложений, миокард равномерно окрашенный, насыщенного цвета, без изменений поверхности. Легкие светлые, равномерной окраски и консистенции. Печень гладкая, блестящая, равномерно окрашенная, без участков изменения структуры и цвета, края органа тупые, по форме и размеру печень соответствует норме. Почки равномерно окрашены, левая и правая почки не различаются. Коровое и мозговое вещество имеет четкие границы, дефектов на поверхности органов, изменения окраски, консистенции не отмечено. Слизистая желудка чистая, розовая, без наложений. Кишечник эластичный, без спаек и деформаций, без видимых нарушений целостности. Слизистая органа без

дефектов, гладкая, блестящая, нормально увлажненная на всем протяжении. Подобную патологоанатомическую картину наблюдали у всех подопытных животных, что говорит об отсутствии патологических изменений в органах и тканях, вызванных воздействием испытуемого препарата.

Доклиническое исследование хронической токсичности полимера.

Результаты исследований хронической токсичности полимера показали, что в течение всего опытного периода гибель животных отсутствовала. Более того, в течение эксперимента не наблюдались признаки интоксикации; полимер не оказал отрицательного влияния на динамику прироста массы тела. На протяжении всего исследования наблюдалась положительная динамика массы тела экспериментальных животных (таблица 2).

Таблица 2. Динамика массы тела экспериментальных крыс.

Период до/после введения препарата	Вес животных в граммах			
	Контрольная группа		Полимер	
До введения препарата	♀180,2 ± 1,0	♂181,4 ± 0,2	♀185,0 ± 0,3	♂182,6 ± 0,1
через 24 часа	♀180,2 ± 1,0	♂181,4 ± 0,2	♀185,0 ± 0,3	♂182,6 ± 0,1
через 7 дней	♀189,8 ± 0,8	♂190,1 ± 1,0	♀192,0 ± 0,3	♂193,8 ± 0,2
через 14 дней	♀196,0 ± 0,4	♂195,0 ± 0,2	♀196,6 ± 0,8	♂197,9 ± 0,3
через 21 дней	♀199,0 ± 0,8	♂198,5 ± 0,4	♀201,0 ± 0,1	♂200,5 ± 0,4
через 28 дней	♀203,1 ± 0,7	♂205,9 ± 0,5	♀206,2 ± 0,1	♂208,9 ± 0,2
Прирост массы тела, г	♀+22,9	♂+24,5	♀+21,2	♂+26,3

Состояние кожного и шерстного покрова экспериментальных животных в ходе эксперимента было в пределах нормы. Взвешивание внутренних органов крыс (сердце, печень, легкие, селезенка и почки) не установило значимых различий в массовых коэффициентах внутренних органов экспериментальных животных, что свидетельствует об отсутствии токсического влияния исследуемого образца на внутренние органы и системы.

Также была проведена оценка влияния синтетического остеофильного бисфосфонатного полимера на

периферическую кровь по 14 нормативным показателям. Исследуемый образец не оказал влияния ни на один гематологический показатель. В частности, уровень гемоглобина у крыс, которым вводили исследуемый образец в дозах 200 мг/кг; 100 мг/кг и 50 мг/кг, равнялся соответственно от 159,0 г/л до 179,0 г/л относительно контроля 172,0 г/л. Содержание эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов также были в пределах нормы относительно контроля (таблица 3).

Таблица 3. Показатели периферической крови (общий анализ крови).

Доза	Синтетический остеофильный бисфосфонатный полимер			Контроль
	200 мг/кг	100 мг/кг	50 мг/кг	
WBC*	9,88±0,1	14,6±1,01	17,01±2,0	17,9±0,01
LYM*	9,65±0,01	10,2±0,02	10,2±0,02	9,03±0,02
MID*	0,03±0,2	0,72±0,01	0,69±0,2	0,77±0,05
GRA*	0,20±1,0	4,1±1,02	5,0±0,1	2,16±0,8
LY%*	96,7±0,04	79,1±1,01	59,4±0,2	82,7±0,04
MI%*	0,3±0,01	4,1±0,02	2,4±0,1	3,7±0,07
GR%*	15,2±0,2	8,7±0,10	16,1±0,5	19,8±0,66
RBC*	5,10±0,02	8,06±0,12	7,11±0,10	8,94±0,11
HGB*	159±0,01	178±1,01	179±1,01	172±2,01
HCT*	46,01±2,01	37,16±0,06	51,66±0,07	41,7±0,15
MCV*	58,2±0,01	57,1±0,10	53,0±0,1	60,1±0,02
MCH*	20,8±0,02	20,4±0,2	19,1±0,12	17,3±0,17
MCHC*	387±1,02	398±0,10	399,1±0,21	376,2±0,03
PLT*	778±10,0	812,9±10,1	852±0,15	948,7±0,05

*WBC-лейкоциты, LYM-лимфоциты, MID-моноциты, GRA-гранулоциты, LY% - % лимфоцитов, MI% - % моноцитов, GR% - % гранулоцитов, RBC-эритроциты, HGB-гемоглобин, HCT-гематокрит, MCV-средний объем эритроцитов, MCH-среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC-средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, PLT-тромбоциты.

Проведенное патоморфологическое исследование внутренних органов подопытных животных, которым вводили синтетический остеофильный бисфосфонатный полимер, позволило сделать заключение об отсутствии изменений в тканях органов, в гистологическом строении, наблюдался лишь очаговый отек и полнокровие сосудов. Обнаруженные гистологические изменения участков внутренних органов животных свидетельствует об отсутствии токсического действия на внутренние органы, а небольшие изменения связаны с процессом декапитации.

Обсуждение

Остеопороз представляет собой хроническое системное заболевание, поражающее костную ткань и сопровождающееся снижением плотности и прочности костей, прогрессирующей потерей костной массы и нарушением костной микроархитектоники, что в конечном итоге приводит к высокому риску переломов. По данным ВОЗ остеопороз занимает четвертое место в мире в структуре заболеваний, наряду с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и сахарным диабетом [13, 15]. Согласно Международной Организации по вопросам остеопороза, в мире данным заболеванием страдают около 200 миллионов женщин (<https://www.iofbonehealth.org>). В Казахстане остеопорозом страдают 12,50% женщин и 9,09% мужчин. Ожидается, что к 2050 году количество больных остеопорозом в мире увеличится более чем в три раза, а частота переломов шейки бедра, самого

опасного и труднозаживаемого осложнения остеопороза, увеличится у мужчин на 310%, а у женщин на 240% (<https://www.iofbonehealth.org>). По прогнозам специалистов, распространенность инвалидности, вследствие остеопороз-ассоциированных переломов к 2025 году в мире составит около 2.6 млн. случаев, а число случаев смерти после перелома бедра достигнет порядка 700 тысяч в год [13,15].

Снижение плотности костей или остеопения происходит в результате увеличения резорбции кости остеокластами в процессе костного метаболизма (обновления кости), возрастного уменьшения клеток-предшественников остеобластов и ослабленной абсорбции кальция. Большинство научных исследований направлено на совершенствование методов лечения для сохранения костной массы и, таким образом, уменьшения риска переломов. С другой стороны гораздо меньше изучены непосредственно процессы регенерации костной ткани при переломе на фоне остеопороза по сравнению с исследованиями, посвященными предотвращению переломов остеопороза [11].

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 скафолдов [22,16,19,17,1]. 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 [11]. 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 [2,4,31]. Бисфосфонаты являются аналогами пирофосфатов ($H_2O_3P-O-PO_3H_2$), 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 Паджета и малигнантная гиперкальциемия. Бисфосфонаты также способны подавлять остеолитическую способность раковых клеток в костных тканях [2].

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, являющимися предшественниками остеобластов [33, 3, 30]. Описан способ лечения остеопороза, характеризующийся тем, что пациенту проводят внутривенное введение биотрансплантата, содержащего от 50 до 500 млн МСК [32]. Другим вариантом подхода является инъекционная имплантация в зону костного повреждения культивированных аутологичных или аллогенных мезенхимальных полипотентных стволовых клеток для улучшения процессов репаративного остеогенеза [28,29,14]. Недостатками данных методов является отсутствие аффинности МСК к костной ткани и отсутствие эффекта ингибирования резорбтивной активности остеокластов.

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 (АТРП), 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-энергетических травматических переломов, сократить сроки лечения и снизить процент инвалидизации среди пациентов данной категории.

Литература:

1. An S.H., Matsumoto T., Miyajima H., Nakahira A., Kim K.H., Imazato S. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction // *Dent Mater*. 2012,28: 1221-1231
2. Bone H.G., Hosking D., Devogelaer J.P., Tucci J.R., Emkey R.D., Tonino R.P., et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women // *N Engl J Med*. 2004,350:1189-1199.
3. Cho S.W., Sun H.J., Yang J.Y., Jung J.Y., An J.H., Cho H.Y., et al. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice // *Mol Ther*. 2009,17:1979-1987.
4. Cranney A., Wells G., Willan A., Griffith L., Zytaruk N., Robinson V., et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women // *Endocr Rev*. 2002,23:508-516.
5. De Becker A., Riet I.V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? // *World journal of stem cells* 2016, 8:73-87.
6. D'Souza S., Murata H., Jose M.V., Askarova S., Yantsen Y., Andersen J.D., et al. Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using ATRP synthesis for bone targeting // *Biomaterials*. 2014,35:9447-9458.
7. Eggenhofer E., Benseler V., Kroemer A., Popp F.C., Geissler E.K., Schlitt H.J., et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion // *Frontiers in immunology* 2012,3:297.

8. Egusa H., Sonoyama W., Nishimura M., Atsuta I., Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications // *Journal of prosthodontic research* 2012, 56:229-248.
9. Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., Monzon-Posadas W.O., Xue H., Savitz S.I., et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect // *Stem cells and development*. 2009,18:683-692.
10. Gholamrezaezhad A., Mirpour S., Bagheri M., Mohamadnejad M., Alimoghaddam K., Abdolazadeh L., et al. In vivo tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis // *Nuclear medicine and biology* 2011,38:961-967.
11. Giannoudis P., Tzioupis C., Almalki T., Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective // *Injury*. 2007,38 Suppl 1:S90-99.
12. Guan M., Yao W., Liu R., Lam K.S., Nolte J., Jia J., et al. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass // *Nature medicine*. 2012,18:456-462.
13. Hernlund E., Svedbom A., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., et al. 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) // *Archives of Osteoporosis*. 2013,8:136.
14. Huang S., Xu L., Zhang Y., Sun Y., Li G. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats // *Cell Transplant*. 2015,24:2643-2655
15. Ja K. WHO Technical Report. In. University of Sheffield, UK; 2007. pp. 66.
16. James R., Deng M., Laurencin C.T., Kumbar. S.G. Nanocomposites and bone regeneration // *Frontiers of Materials Science*. 2011,5:342-357.
17. Jeon O.H., Elisseff J. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules // *Drug Deliv Transl Res*. 2015: 105-20
18. Johnell O., Kanis J.A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures // *Osteoporos Int* 2006,17:1726-1733.
19. Kamrani R.S., Mehrpour S.R., Sorbi R., Aghamirsalim M., Farhadi L. Treatment of nonunion of the forearm bones with posterior interosseous bone flap // *J Orthop Sci*. 2013,18:563-568.
20. Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging // *Stem cells*. 2009,27:2614-2623.
21. Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells // *Cell death and differentiation*. 2014,21:216-225.
22. Nakase T., Fujii M., Myoui A., Tamai N., Hayaishi Y., Ueda T., et al. Use of hydroxyapatite ceramics for treatment of nonunited osseous defect after open fracture of lower limbs // *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009,129:1539-1547.
23. Nystedt J., Anderson H., Tikkanen J., Pietila M., Hirvonen T., Takalo R., et al. Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells // *Stem cells* 2013,31:317-326.
24. Olzhayev F., Tsoy A., Umbayev B., Askarova S. Cell therapy approach for correction of osteoporosis-associated fractures using adipose-derived mesenchymal stem cells functionalized with osteophilic polymer // *Experimental biology and medicine*. 2018,77:58-72.
25. Schrepfer S., Deuse T., Reichenspurner H., Fischbein M.P., Robbins R.C., Pelletier M.P. Stem cell transplantation: the lung barrier // *Transplantation proceedings*. 2007, 39:573-576.
26. Sarkar D., Spencer J.A., Phillips J.A., Zhao W., Schafer S., Spelke D.P., et al. Engineered cell homing // *Blood*. 2011,118:e184-191.
27. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type // *Journal of immunology*. 2008,180:2581-2587.
28. Singh J., Onimowo J.O., Khan W.S. Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: a review of the current trend // *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014,10: 37-42
29. Tasso R., Ulivi V., Reverberi D., Lo S.C., Descalzi F., Cancedda R. 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 // *Stem Cells Dev*. 2013,22: 3178-91
30. Teitelbaum S.L. Stem cells and osteoporosis therapy // *Cell Stem Cell*. 2010,7:553-554.
31. Wells G., Cranney A., Peterson J., Boucher M., Shea B., Robinson V., et al. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women // *Cochrane Database Syst Rev*. 2008: Cd004523.
32. Yamada Y., Boo J.S., Ozawa R., Nagasaka T., Okazaki Y., Hata K., et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold // *J Craniomaxillofac Surg*. 2003,31:27-33.
33. Yao W., Lane N.E. Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone // *Bone*. 2015,70:62-65.
34. Zhang L., Chan C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. *J Vis Exp* 2010, 37:1852

Контактная информация:

Аскарова Шолпан Несипбаевна – PhD, руководитель Лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан.

Почтовый адрес: 010000, Республика Казахстан, г. Нур-Султан, проспект Кабанбай батыра 53, блок S1.

E-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Телефон: +7 (7172) 70 65 14