

Научная статья

УДК 616.71–007–001.5+577.017.22:57.84

doi:10.18499/2225-7357-2024-13-3-49-59

1.5.22 – клеточная биология

3.3.2 – патологическая анатомия



## Морфологическая характеристика зоны перелома локтевой кости крыс на фоне терапии модифицированными мезенхимальными стволовыми клетками при экспериментальном остеопорозе

Ф. С. Олжаев<sup>1</sup>, В. А. Акулинин<sup>2✉</sup>, Б. А. Умбаев<sup>1</sup>, Ю. И. Сафарова<sup>1</sup>, С. С. Степанов<sup>2</sup>, Б. С. Гавриш<sup>2</sup>, Ш. Н. Аскарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Астана, Республика Казахстан

<sup>2</sup>Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия

**Аннотация.** Остеопороз представляет собой прогрессирующее системное заболевание, которое проявляется снижением плотности костной ткани. Это приводит к увеличению хрупкости костей и повышает вероятность переломов. Для эффективного лечения данной патологии разработаны новые подходы клеточной терапии, основанные на применении модифицированных остеофильным полимером мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для локального воздействия на поврежденные участки кости. **Цель исследования** – провести морфологическую оценку эффективности влияния модифицированных остеофильным полимером МСК на процессы репаративного остеогенеза в динамике посттравматического периода на животных с переломом локтевой кости на фоне остеопороза. **Материал и методы.** Эксперимент выполнен на крысах Wistar (самки, n=40; 200–300 г, возраст 3 месяца). Остеопороз вызывали билатеральной овариэктомией, перелом – остеотомией диафиза локтевой кости. Всех крыс случайным образом распределяли по четырем группам: группа I (контроль, n=10, – буферный раствор); группа II (n=10, остеофильный полимер, 1 мг/мл); группа III (n=10, суспензия МСК, 1×10<sup>6</sup>); группа IV (n=10, измененные остеофильным полимером МСК, 1×10<sup>6</sup>). Вывод из эксперимента проводили через 1 и 6 месяцев после перелома. **Результаты.** Для восстановления пула предшественников остеобластов в области перелома локтевой кости при экспериментальном остеопорозе применили МСК после воздействия на них остеофильного полимера. У всех животных в области перелома формировались очаги регенерации с различной степенью структурно-функционального созревания клеточного и межклеточного субстрата. Наиболее выражено процессы восстановления костной ткани проявлялись при использовании модифицированных остеофильным полимером МСК. Это, вероятно, связано с высокой концентрацией модифицированных остеофильным полимером МСК и их фиксацией в зонах регенерации поврежденной кости с последующей стимуляцией остеогенеза. Для более полного биологического понимания и трактовки найденных изменений использовали парадигму провизорности как универсальную модель проявления гисто- и органогенезов. **Заключение.** Использование МСК после воздействия на них остеофильного полимера значительно улучшает процесс репаративного остеогенеза при переломах трубчатых костей у пациентов с эстроген-индуцированным остеопорозом, что делает этот метод перспективным для комбинированной терапии.

**Ключевые слова:** остеопороз; перелом кости; мезенхимальные стволовые клетки; адресная доставка клеток

**Финансирование:** работа была поддержана грантом Министерства образования и науки Республики Казахстан АР13068215 Керамические пористые гранулы из трикальцийфосфата (ТСР), модифицированные стронцием (Sr) и медью (Cu), для регенерации переломов костей.

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Олжаев Ф.С., Акулинин В.А., Умбаев Б.А., Сафарова Ю.И., Степанов С.С., Гавриш Б.С., Аскарова Ш.Н. Морфологическая характеристика зоны перелома локтевой кости крыс на фоне терапии модифицированными мезенхимальными стволовыми клетками при экспериментальном остеопорозе // Журнал анатомии и гистопатологии. 2024. Т. 13, №3. С. 49–59. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-3-49-59>

Original article

## Morphological Characteristics of the Ulna Fracture Zone in Rats Undergoing Therapy With Modified Mesenchymal Stem Cells in Experimental Osteoporosis

F. S. Olzhayev<sup>1</sup>, V. A. Akulinin<sup>2✉</sup>, B. A. Umbayev<sup>1</sup>, Y. I. Safarova<sup>1</sup>, S. S. Stepanov<sup>2</sup>,  
B. S. Gavrish<sup>2</sup>, Sh. N. Askarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Astana, Republic of Kazakhstan

<sup>2</sup>Omsk State Medical University, Omsk, Russia

**Abstract.** Osteoporosis is a progressive systemic disease characterized by a decrease in bone density. This leads to increased bone fragility and a higher likelihood of fractures. New approaches to cellular therapy have been developed for the effective treatment of this pathology, based on the use of modified osteophilic polymers with mesenchymal stem cells (MSCs) for local action on damaged bone areas. **The aim** of the study was to morphologically assess the effectiveness of modified osteophilic polymer MSCs on reparative osteogenesis processes during the post-traumatic period in animals with a fracture of the ulna and underlying osteoporosis. **Material and methods.** The experiment involved Wistar rats (females, n=40; 200–300 g, 3 months old). Osteoporosis was simulated by bilateral ovariectomy, and the fracture was simulated through diaphysis osteotomy of the ulna. All rats were randomly distributed into four groups: Group I (control, n=10; buffered solution); Group II (n=10; osteophilic polymer, 1 mg/ml); Group III (n=10; MSC suspension, 1×10<sup>6</sup>); Group IV (n=10; modified osteophilic polymer MSCs, 1×10<sup>6</sup>). The experiment results were evaluated in 1 and 6 months after the fracture. **Results.** MSCs were applied after exposure to the osteophilic polymer to restore the pool of osteoblast precursors in the fracture area of the ulna in experimental osteoporosis. In all animals, regeneration foci with varying degrees of structural and functional maturation of cellular and intercellular substrates were formed in the fracture area. The most pronounced processes of bone tissue restoration were observed with the use of modified osteophilic polymer MSCs. This is likely associated with the high concentration of modified osteophilic polymer MSCs and their retention in zones of damaged bone regeneration, subsequently stimulating osteogenesis. The paradigm of provisionality, as a universal model manifesting histogenesis and organogenesis, was utilized to gain a more comprehensive biological understanding and interpretation of the observed changes. **Conclusion.** MSCs applied after exposure to an osteophilic polymer significantly enhance the process of reparative osteogenesis in fractures of long bones in patients with estrogen-induced osteoporosis, thus making this technology promising for combined therapy.

**Keywords:** osteoporosis; bone fracture; mesenchymal stem cells; targeted delivery of cells

**Funding:** the research study was supported by the grant from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan AR13068215 Ceramic porous tricalcium phosphate (TCP) granules modified with strontium (Sr) and copper (Cu) for the regeneration of bone fractures.

**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.

**For citation:** Olzhaev F.S., Akulinin V.A., Umbayev B.A., Safarova Yu.I., Stepanov S.S., Gavrish B.S., Askarova Sh.N. Morphological characteristics of the ulna fracture zone in rats undergoing therapy with modified mesenchymal stem cells in experimental osteoporosis. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2024. V. 13, №3. P. 49–59. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-3-49-59>

### Введение

Остеопороз представляет собой прогрессирующее заболевание, ассоциированное с возрастом, которое затрагивает костную систему. Оно проявляется в уменьшении костной массы и нарушении структуры костной ткани, что в свою очередь приводит к повышенной хрупкости костей и увеличивает вероятность переломов [19]. В зоне риска находятся прежде всего, женщины в постменопаузальном периоде из-за резкого снижения уровня эстрогенов [6]. Факторы, способствующие развитию остеопороза как полиэтиологического заболевания, включают генетические предрасположенности, возраст, гормональные изменения, недостаток кальция и витамина D, отсутствие физической активности, а также наличие сопутствующих заболеваний и использование определенных медикаментов [14, 22]. При остеопорозе наблюдается изменение минерального состава и плотности костной ткани по

сравнению с ее здоровыми аналогами, что связано с активной резорбцией, снижением числа остеобластов и ухудшением усвоения кальция [16]. Анализ существующей литературы показывает, что большинство исследований сосредоточено на методах лечения, направленных на сохранение костной ткани и уменьшение риска переломов, в то время как восстановление костей после переломов при остеопорозе остается менее изученной темой [13, 28]. В литературе представлены различные стратегии для ликвидации костных дефектов, включая аутологичные и аллогенные трансплантаты, а также новые методики с применением факторов роста и синтетических каркасов [4, 15, 16, 18, 20, 21, 25].

На сегодняшний день является очевидным, что процесс репаративной регенерации костной ткани у пациентов с остеопорозом значительно нарушается. Следовательно, необходимо поиск новых методов воздействия на все его компоненты [13, 19]. Наиболее распро-

страненными средствами для лечения остеопороза являются бисфосфонаты [7, 31]. Эти препараты являются аналогами пирофосфатов и ингибируют фермент фarnезилпирофосфатазу, что снижает активность остеокластов и стимулирует образование костного субстрата [5, 30]. Поскольку уменьшение плотности костной ткани связано не только с увеличением активности остеокластов, но и со снижением числа мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [27], одним из эффективных подходов к лечению остеопоротических переломов является терапия, включающая имплантацию МСК в область повреждения [21, 26]. Недостатком подобного метода является низкая степень сродства МСК к костной ткани и абсанс ингибирования остеокластов в месте перелома. Для решения этой проблемы было предложено использование водорастворимого полимера с бисфосфонатными цепями, который усиливает аффинность МСК к костной ткани [10]. Полимер содержит N-сукцинимидилкарбоксилаты, которые образуют ковалентные комплексы с клетками костной ткани. Присоединение полимера позволяет МСК связываться с гидроксипатитом кости.

Ранее нами показано положительное влияние полимера на пролиферацию и дифференцировку МСК, а также на активность остеокластов. Исследование динамики плотности костной ткани продемонстрировало ее рост на 27,4 и 21,5% через 1 и 6 месяцев соответственно после остеотомии локтевой кости у животных, которым было осуществлено локальное введение измененных МСК. В ходе работы было установлено, что трансплантация МСК, покрытых синтетическим полимером с добавлением бисфосфоната, может применяться для стимуляции регенерации переломов локтевой кости у крыс с остеопорозом [2, 25].

Положительные результаты, полученные в этом направлении, позволяют предположить, что использование синтетических полимеров с бисфосфонатами в сочетании с МСК может стать эффективной стратегией для стимуляции механизмов заживления переломов у пострадавших на фоне остеопороза. Появились новые возможности создания эффективных методов терапии, способных положительно влиять на восстановление костной ткани после переломов у лиц старшего возраста, у которых редукция костной массы является объективной закономерностью. Следует отметить еще и то, что основной механизм действия бисфосфонатов, ингибирующий резорбцию костной ткани, в сочетании с регенеративными свойствами МСК, может создать синергетический эффект, способствующий более быстрому и качественному восстановлению поврежденной микроархитектоники костной ткани. Возникает необходимость проведения комплекса морфологиче-

ских исследований для понимания причин оптимизации методов применения данной комбинации и определения ее влияния на процесс репаративного гистогенеза при остеопорозе, а также для выявления возможных побочных эффектов и противопоказаний.

Цель исследования – провести морфологическую оценку эффективности влияния модифицированных остеофильным полимером МСК на процессы репаративного остеогенеза в динамике посттравматического периода на самках крыс с индуцированным эстроген-зависимым остеопорозом и переломом локтевой кости.

### Материал и методы исследования

Эксперимент проводился на 45 самках крыс линии Wistar в возрасте 3 месяцев, массой от 200 до 300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария с круглосуточным доступом к воде и корму. Все процедуры проводились в соответствии с международными этическими нормами работы с животными и были одобрены Комитетом по этике ЧУ «National Laboratory Astana» Назарбаев Университета (регистрационный номер IORG 0006963).

Для моделирования остеопороза у 40 крыс была выполнена билатеральная овариэктомия [2]. Оценку плотности костной ткани проводили до операции и в течение трех месяцев после удаления яичников с использованием микроКТ IVIS Spectrum (Caliper, USA). Пять здоровых животных того же возраста служили контрольной группой для изучения нормальной костной ткани. Ранее мы установили, что в процессе физиологического взросления наблюдается незначительное увеличение плотности костной ткани, в то время как при развитии эстроген-зависимого остеопороза происходит значительное снижение этого показателя [2, 24].

Для создания дефекта локтевой кости была выполнена стандартизированная остеотомия в области диафиза левой локтевой кости под общей анестезией с использованием изофлурана. Операцию проводили на расстоянии 2,0 см проксимально от лучезапястного сустава (рис. 1а, б). Заживление дефекта кости проходило через стадию образования костных мозолей как временного субстрата, который в течение 1 месяца заполнял все пространство дефекта, последовательно трансформируясь из незрелой формы в зрелую (рис. 1в).

Животные, страдающие от экспериментального остеопороза (n=40), были разделены на группы I–IV. Начиная с первого дня после остеотомии, им еженедельно в течение месяца в область перелома локтевой кости вводили по 200 мкл различных растворов. В группе I (негативный контроль, n=10) использовался фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР);

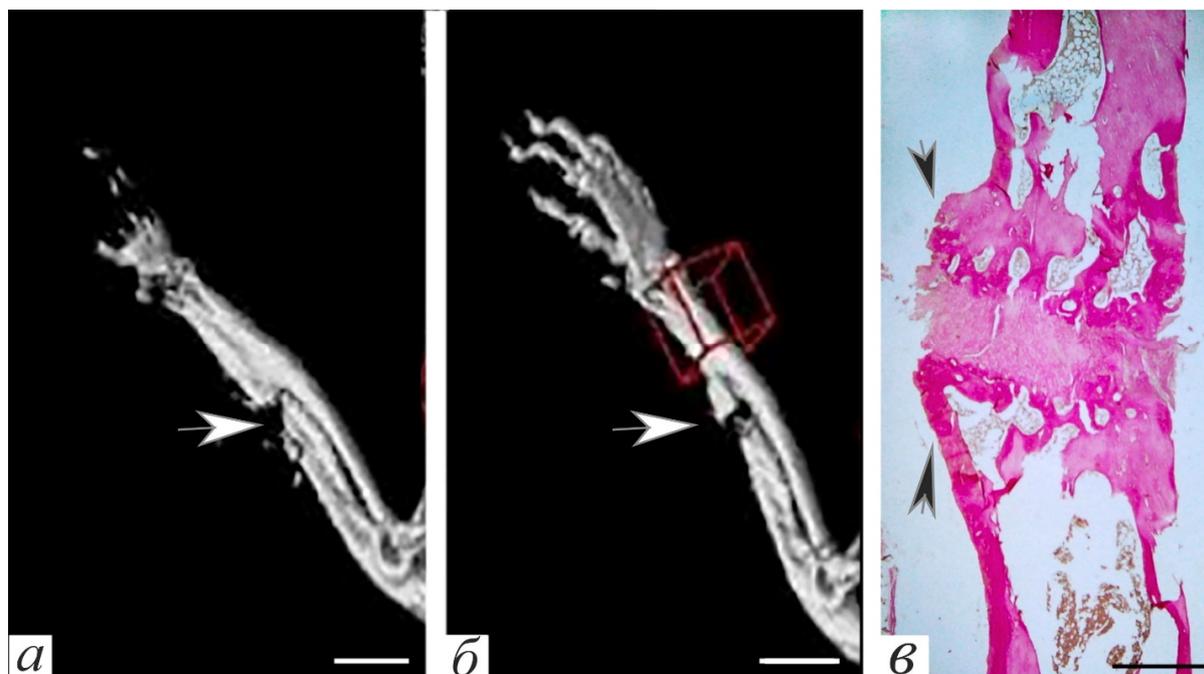


Рис. 1. Локтевая кость передней конечности крысы через 2 часа (а) и 1 месяц (б) после остеотомии (белые стрелки – дефект), IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA), шкала – 10 мм. Зона восстановления костной ткани через 1 месяц (в) обозначена черными стрелками (группа 3). Окраска по Ван Гизону. Об. 4, шкала – 600 мкм.

Fig. 1. The ulna of the forelimb of a rat 2 hours (a) and 1 month (b) after osteotomy (white arrows – defect), IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, USA), scale – 10 mm. Zone of bone tissue restoration after 1 month (c, black arrows, group 3), Van Gieson staining. Lens  $\times 4$ , scale bar – 600  $\mu\text{m}$ .

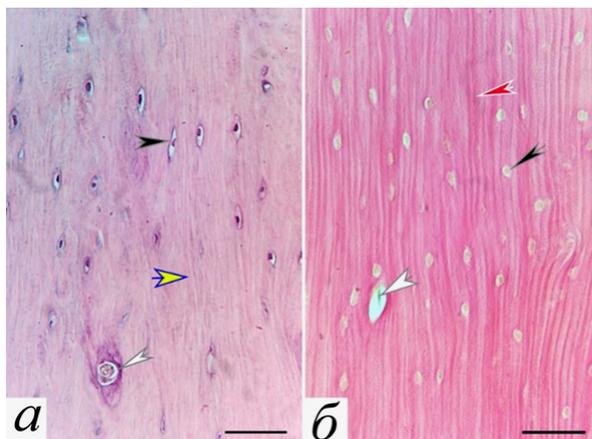
в группе II (n=10) применялся остеофильный полимер в растворе ФсБР (концентрация 1 мг/мл); в группе III проводилась инъекция суспензии МСК в ФсБР (концентрация  $1 \times 10^6$  клеток/мл), а в группе IV использовалась суспензия МСК, модифицированных остеофильным полимером (концентрации 1 мг/мл и  $1 \times 10^6$  клеток/мл). Материал для гистологического анализа у животных собирали из зоны перелома через 1 (n=20) и 6 (n=20) месяцев после вмешательства (по пять образцов на каждую группу).

После завершения эксперимента животных усыпляли с использованием анестезии на основе изофлурана, затем проводили эвтаназию методом цервикальной дислокации. Локтевую кость отделяли от прилегающих тканей для последующего макро- и микроскопического анализа полученного материала. Образцы из зоны повреждения локтевой кости фиксировали в 10% нейтральном формалине с рН 7,2–7,4, подвергали декальцинации, после чего осуществляли гистологическую обработку по установленной методике с использованием парафина. Из полученных блоков изготавливали серийные срезы (по 5 срезов с каждого блока) толщиной 7–10 мкм на микротоме HM 450 (Thermo FS). Срезы окрашивали с помощью гематоксилина и эозина, а также по методике Ван Гизона. Для изучения препаратов использовали световой микроскоп «Leica DM 1000». На цифровых микрофотографиях (по 5 полей зрения со среза) высокого разрешения (tiff, 2592 $\times$ 1944 пикселей; ка-

мера GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1.4 $\times$ 1.4  $\mu\text{m}$ ) проводили качественное описание структур и их морфометрическую количественную характеристику.

С помощью плагина «StarDist» для ImageJ/Fiji выделяли объекты в зонах интереса, а затем по их маскам определяли численную плотность и площадь (клетки, коллагеновые волокна). Этот плагин предназначен для сегментации и детекции объектов на изображениях, основанный на алгоритме глубокого обучения, и является мощным инструментом для обработки изображений и улучшения качества сегментации [29]. Использовали уже обученную модель Versatile (H&E nuclei) [https://imagej.net/plugins/StarDist].

Статистический анализ проводили по стандартным рекомендациям [1, 12]. Характер распределения вариационных рядов рассматриваемых переменных в нашем исследовании не соответствовал нормальному (Kolmogorov–Smirnov и Shapiro–Wilk tests), небольшие вариационные ряды, также отмечена неоднородность дисперсий (Levene’s test). Проверку статистических гипотез проводили непараметрическими критериями, не требующими соблюдения строгих ограничений. При сравнении сроков (один и шесть месяцев) использовали Mann–Whitney U Test для независимых выборок. Множественное сравнение четырех групп проводили с помощью ANOVA Kruskal–Wallis test. Компьютерную статистическую обработку полученных исход-



**Рис. 2.** Пластинчатая костная ткань диафиза локтевой кости на уровне перелома (норма). Черная стрелка – костные лакуны с телами остеоцитов, желтые стрелки – минерализованный костный матрикс, костные пластины, белая стрелка – гаверсов канал остеона, красная стрелка – упорядоченные коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином (а) и по Ван Гизону. Об. 40, шкала – 50 мкм.

**Fig. 2.** The lamellar bone tissue of the ulna diaphysis at the fracture level (normal). The black arrow – bone lacunae with osteocyte bodies, yellow arrows – mineralized bone matrix, bone plates, the white arrow – Haversian canal of osteon, the red arrow – ordered collagen fibers. Hematoxylin & Eosin (a) and Van Gieson staining. Lens  $\times 40$ , scale bar – 50  $\mu\text{m}$ .

ных данных выполняли с использованием программного обеспечения из пакета StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA, version 8.0. Количественные данные представляли в виде медианы и интерквартильного диапазона Me (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 и их обсуждение

В норме диафиз локтевой кости белой крысы имел типичное строение компактной пластинчатой костной ткани с хорошо выраженными остеонами и небольшим количеством остеоцитов – 243 (209; 268) на 1 мм<sup>2</sup> продольного среза (рис. 2).

Моделирование перелома путем остеотомии диафиза локтевой кости в нашем эксперименте приводило к появлению значительного дефекта на месте перелома (рис. 1а). Согласно данным Г.С. Соловьева с соавт., «...репаративная регенерация в подобных случаях проходит этапы заживления тканевого дефекта и сопровождается изменениями в тканях, соответствующими принципу временности (провизорности по автору). Эти процессы гистогенеза представляют собой предопределенный механизм, который характеризуется образованием ряда промежуточных тканей на пути к окончательному восстановлению» [3].

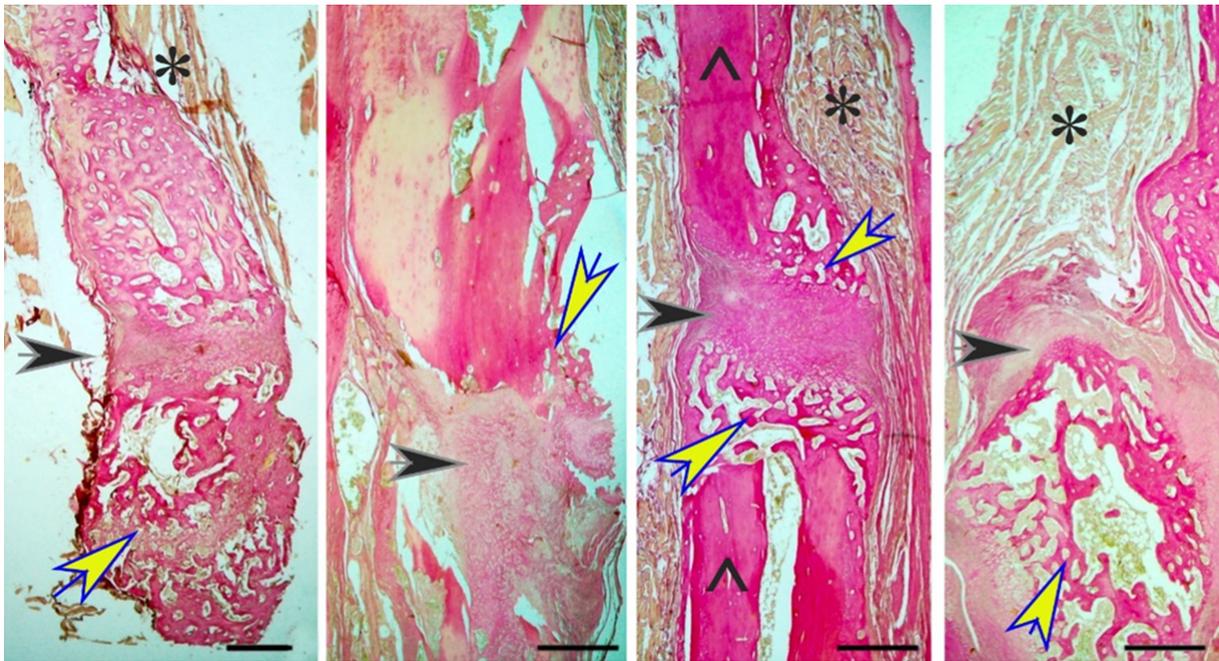
Через месяц после травмы на месте дефекта локтевой кости у всех групп животных наблюдалось формирование сложного тканевого регенерата – временного субстрата, который впоследствии заменялся зрелой костью (окончательным органом). При этом пространственное расположение незрелого субстрата находилось в пределах границ дефекта и четко соответствовало положению ранее удаленной части кости (рис. 1, 3).

Регенерация тканей происходила с участием волокнистой соединительной и хрящевой тканей (см. рис. 4а, б; 5а–г). На этом этапе формировалась ретикулофиброзная костная ткань, известная как мягкая костная мозоль, которая служила временным субстратом для регенерации кости (рис. 4). В ходе минерализации она преобразовывалась в жесткую костную мозоль и пластинчатую костную ткань с системой Гаверса (рис. 5б). На рис. 3 представлено, что в контрольной группе через месяц после операции в области дефекта оставалось значительное количество губчатой ткани. Это могло быть связано с тем, что остеопороз, зависимый от эстрогенов, затруднял формирование новой костной ткани, в то время как применение МСК и полимера способствовало превращению незрелой ткани в окончательную.

По данным морфометрического исследования, через 1 месяц после травмы отношение площади продольного среза центральной (фиброзно-хрящевой) части костной мозоли к площади среза окружающей ее губчатой кости между группами статистически значимо различалось (Kruskal–Wallis test:  $H [df=3, N=24] = 13,4, p=0,004$ ). Максимальное значение этого показателя было в группе I – 7,28 (4,52–8,10), группе II – (3,92 [3,11–4,75],  $p_{1-2}=0,001$ ), группе III – (2,59 [2,23–3,44],  $p_{1-3}=0,0001$ ) и группе IV – (4,35 [3,12–5,10],  $p_{1-4}=0,002$ ). При этом в группе IV было больше, чем в группе III ( $p_{3-4}=0,01$ , Mann–Whitney U Test).

Таким образом, восстановление дефекта локтевой кости передней конечности белой крысы после остеотомии ее диафиза на фоне экспериментального остеопороза в группах I, II и III включало несколько похожих этапов, каждый из которых имел свои особенности. В течение 1 месяца происходило активное образование соединительной, хрящевой, незрелой губчатой костной ткани на месте перелома. Остеобласты и хондроциты начинали синтезировать коллаген и другие матриксные белки, образуя мягкую костную мозоль, а затем – твердую костную мозоль за счет активации процессов минерализации. Для животных группы II было характерно высокое содержание изогенных хондроцитов с разной степенью дифференцировки.

В группе IV, в которой локально вводили модифицированные остеофильным полимером МСК, восстановление костной ткани протекало на фоне более выраженных



Группы I (контроль) II (полимер) III МСК IV МСК+полимер  
 Рис. 3. Анатомо-гисто-топографическое сравнение зоны костной мозоли, закрывающей дефект локтевой кости, через 1 месяц после перелома у животных I–IV групп. Черные стрелки – хрящевая ткань, желтые стрелки – незрелая губчатая костная ткань, ^ – типичная пластинчатая зрелая костная ткань, \* – поперечнополосатая мышечная ткань вокруг поврежденной кости. Окраска по Ван Гизону. Об. 4, шкала – 500 мкм.

Fig. 3. Anatomical, histo-topographical comparison of the callus area covering the ulna bone defect, 1 month after the fracture in animals of groups I–IV. Black arrows – cartilage tissue, yellow arrows – immature cancellous bone tissue, ^ – normal lamellar mature bone tissue, \* – striated muscle tissue around the damaged bone. Van Gieson staining. Lens  $\times 4$ , scale bar – 500  $\mu\text{m}$ .

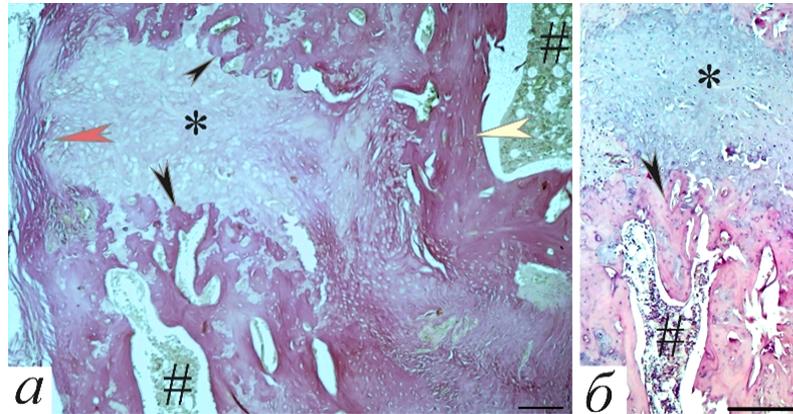


Рис. 4. Зона формирования ретикулофиброзной костной ткани регенерата локтевой кости крысы через месяц после перелома (группа III). Обозначения: \* – хрящевая ткань, красная стрелка – соединительная ткань, черные стрелки – новообразованные костные балки из грубоволокнистой костной ткани, желтая стрелка – пластинчатая костная ткань, # – костномозговая полость, заполненная желтым костным мозгом. Окраска по Ван Гизону (а), гематоксилином и эозином (б). Об. 10, шкала – 200 мкм.

Fig. 4. Zone of formation of reticulofibrous bone tissue of the regenerated rat ulna one month after fracture (group III). \* – cartilaginous tissue, red arrow – connective tissue, black arrows – newly formed bone beams from coarse-fibrous bone tissue, yellow arrow – lamellar bone tissue, # – bone marrow cavity filled with yellow bone marrow. Van Gieson staining (a), Hematoxylin & Eosin (b). Lens  $\times 10$ , scale bar – 200  $\mu\text{m}$ .

изменений популяций мезенхимальных, фибро-, хондро- и остеобластных клеток, связанных с очагами регенерации, т.е. в условиях переизбытка основных клеток репаративной

регенерации. В этой группе через 1 месяц выявляли участки грубоволокнистой соединительной и хрящевой ткани (рис. 6а, б). Вероятно, часть бластных клеток при искусственном введении модифицированных полимером МСК не успевала дифференцироваться в хондро- и остециты. Необходимо особо отметить, что для группы IV, как и для группы II, было характерно большое содержание изогенных хондроцитов, лежащих в общей полости, отличающихся размерами, формой и, вероятно, степенью дифференцировки. При этом нами выявлено активное образование дефинитивной пластинчатой костной ткани и увеличение размеров хондроцитов по сравнению с другими группами в 1,2–1,5 раза (Mann–Whitney U Test, Kruskal–Wallis test).

Следовательно, в течение 1 месяца после травмы у всех животных с билатеральной овариэктомией в области перелома локтевой кости формировались очаги регенерации с

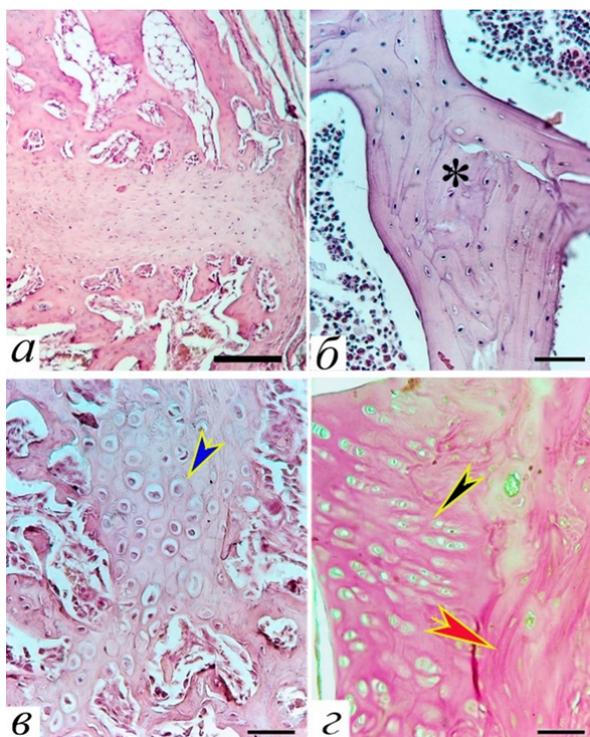


Рис. 5. Жесткая костная мозоль (а) и отдельные ее фрагменты со сформированной пластинчатой костной (б) и несформированной (в, г) хрящевой тканью через 1 месяц после перелома (а, б, в – группа III; г – группа II). Обозначения: \* – зрелые остеобласты, черная стрелка – стопки изогенных хондроцитов, синяя стрелка – крупные единичные хондроциты, красная стрелка – коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином (а–в), по Ван Гизону (г). Об. 4 (а) и  $\times 40$  (б–г), шкала – 200 мкм.

Fig. 5. Hard callus (a) and its separate fragments with the formed lamellar bone (b) and unformed (c, d) cartilage tissue 1 month after the fracture (a, b, c – group III; d – group II). \* – mature osteocytes, the black arrow – stacks of isogenic chondrocytes, blue arrow – large single chondrocytes, the red arrow – collagen fibers. Hematoxylin & Eosin (a-c), Van Gieson staining (d). Lens  $\times 4$  (a) and  $\times 40$  (b-d), scale bar – 200  $\mu\text{m}$ .

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 остеобластическим полимером МСК. Это, вероятно, связано с высокой концентрацией стволовых клеток и их фиксацией в зонах регенерации поврежденной кости с последующей стимуляцией остеогенеза. Однако полного пере-

хода всего объема временного субстрата в дефинитивную костную ткань не происходило. Полноценное завершение стадии ремоделирования и модификации костной ткани, несмотря на использование модифицированных остеобластическим полимером МСК, требует гораздо большего времени.

Таким образом, наше экспериментальное светоптическое гистологическое исследование позволяет констатировать, что использование в течение 1 месяца локального введения модифицированных МСК, в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл может изменить процессы восстановления костной ткани при переломах локтевой кости у белых крыс.

Через шесть месяцев после получения травмы, в период активации механизмов моделирования и ремоделирования, вероятно, наблюдались более значительные изменения и оптимизация структуры кости, обусловленные синергетической работой остеобластов и остеокластов. Ранее мы установили, что остеопороз изменяет баланс между этими двумя клеточными системами, которые регулируют костный гомеостаз в сторону снижения минеральной плотности новообразованной костной ткани [2, 24]. Об этом свидетельствует и длительное сохранение элементов незрелой кости по данным настоящего гистологического исследования (рис. 8 а, б, в).

Следовательно, несмотря на высокий регенеративный потенциал при использовании модифицированных остеобластическим полимером МСК, полного (до исходного состояния) восстановления дефинитивной кости из временного субстрата (мягкая костная мозоль) у животных с эстроген-зависимым остеопорозом не происходило даже через 6 месяцев. Сохранялись участки незрелой костной ткани, а сплошная костная полость еще не образовалась.

Использование плагина «StarDist» для ImageJ/Fiji с обученной моделью распознавания клеток позволило дать точную морфометрическую характеристику костной мозоли по показателю общей численной плотности лакун, содержащих различные клетки (рис. 9 а, б; табл. 1).

Было установлено, что численная плотность клеток, расположенных в лакунах костной мозоли локтевой кости крысы, при различных способах коррекции репаративного процесса статистически значимо отличалась между группами и по срокам (табл. 1).

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

Таблица 1 / Table 1

**Численная плотность клеток, расположенных в лакунах костной мозоли локтевой кости крысы, при различных способах коррекции репаративного процесса, Me (Q1; Q3)**  
**Numerical density of cells located in the callus lacunae of the rat ulna, with diverse options of the reparative process correction, Me (Q1; Q3)**

Группы	Период эксперимента, месяц	
	1	6
Группа I (контроль)	4120 (3994; 4367)	2753 (2656; 3530) $p=0,01^{1-6}$
Группа II (полимер)	3860 (2876; 4222) $p=0,14^{I-II}$	4822 (4699; 4956); $p=0,01^{1-6}$ $p=0,004^{I-II}$
Группа III (МСК)	2784 (2478; 2832) $p=0,006^{I-III}$ ; $p=0,04^{II-III}$	1957 (1829; 2132); $p=0,004^{1-6}$ $p=0,004^{I-III}$ ; $p=0,004^{II-III}$
Группа IV (МСК+полимер)	3344 (3167; 3531) $p=0,06^{I-IV}$ ; $p=0,39^{II-IV}$ ; $p=0,01^{III-IV}$	1517 (1309; 1765); $p=0,004^{1-6}$ $p=0,004^{I-IV}$ ; $p=0,004^{II-IV}$ ; $p=0,02^{III-IV}$
Kruskal-Wallis test (I, II, III и IV группы)	H (df=3, N= 24)=12,2; $p=0,008$	H (df=3, N= 24)=20,9; $p=0,0001$

При парном сравнении по срокам (1 и 6 месяцев) нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,05$ . Для сравнения четырех групп (I–IV) с учетом поправки Бонферрони для каждого парного сравнения уровень значимости был установлен на уровне  $< 0,01$ . Me (Q1; Q3) обозначает медиану (нижний и верхний квартили).

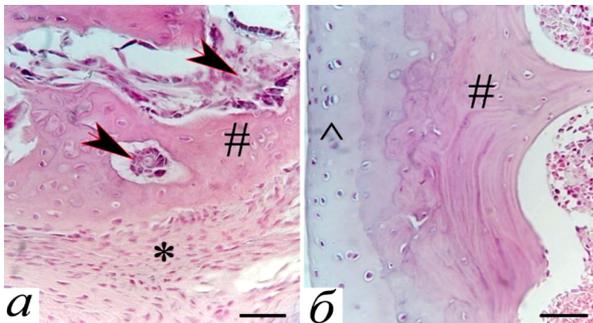


Рис. 6. Взаимоотношение зон костной мозоли с различной степенью структурно-функционального созревания, очаги регенерации (черные стрелки), содержащие бластные клетки, локтевой кости крысы через 1 месяц после перелома (группа МСК+полимер, IV группа). Обозначения: \* – высокое содержание фибробластов и неминерализованных коллагеновых волокон, ^ – зона хрящевой ткани, # – созревающая и зрелая костная ткань. Четко видны границы зон, много фибробластов, остеобластов, хондробластов. Окраска гематоксилином и эозином. Об.  $\times 40$ , шкала – 50 мкм.

Fig. 6. Relationship between callus zones with varying degrees of structural and functional maturation, regeneration foci (black arrows) containing blast cells of the rat ulna 1 month after the fracture (MSC+polymer, IV group). \* – high content of fibroblasts and non-mineralized collagen fibers, ^ – the cartilage tissue zone, # – the maturing and mature bone tissue. The boundaries of the zones are clearly visible; there are many fibroblasts, osteoblasts, and chondroblasts. Hematoxylin & Eosin staining. Lens  $\times 40$ , scale bar – 50  $\mu\text{m}$ .

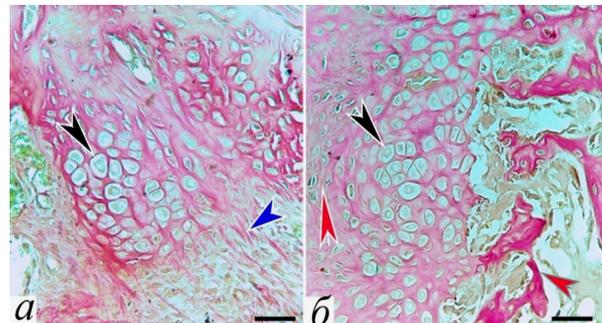


Рис. 7. Фрагмент костной мозоли у животных групп II (а) и IV (б) через 1 месяц после перелома. Высокое содержание изогенных хондробластоцитов (красная и черная стрелки) с различной степенью структурно-функционального созревания, очаги регенерации (желтая стрелка). Окраска по Ван Гизону. Об.  $\times 40$ , шкала – 50 мкм.

Fig. 7. A fragment of callus in animals of groups II (a) and IV (b) 1 month after the injury; high content of isogenic chondroblastocytos (red and black arrows) with varying degrees of structural and functional maturation, foci of regeneration (the yellow arrow). Van Gieson staining. Lens  $\times 40$ , scale bar – 50  $\mu\text{m}$ .

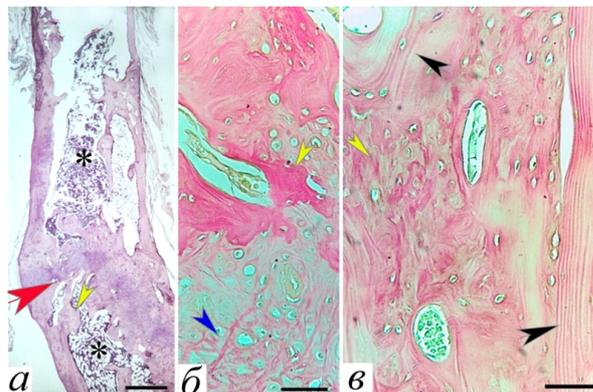


Рис. 8. Дефинитивная костная ткань (а) и ее отдельные зоны с преобладанием незрелой (б) и зрелой (в) ткани через 6 месяцев после повреждения локтевой кости белых крыс (группа IV). Обозначения: красная стрелка – зона замещенного дефекта, желтая стрелка – губчатая грубоволокнистая, синяя – фиброзно-хрящевая, черная – зрелая пластинчатая ткань заверсовых систем костной мозоли, \* – желтый костный мозг, сплошная костная полость еще не образована. Окраска гематоксилином и эозином (а), и по Ван Гизону (б, в). Об.  $\times 4$  (а) и  $\times 40$  (б, в), шкала – 500 (а) и 50 (б, в) мкм.

Fig. 8. The definitive bone tissue (a) and its separate zones with a predominance of immature (b) and mature (c); 6 months after the damage to the ulna, white rats (group IV): the red arrow – the zone of the replaced defect, the yellow arrow – the spongy coarse fibrous tissue, the blue – fibrocartilaginous, the black – the mature lamellar tissue of Haversian callus systems, \* – the yellow bone marrow, a solid bone cavity has not been formed yet. Hematoxylin & Eosin (a) and Van Gieson staining (b, c). Lens  $\times 4$  (a) and  $\times 40$  (b, c), scale bar – 500 (a) and – 50 (b, c)  $\mu\text{m}$ .

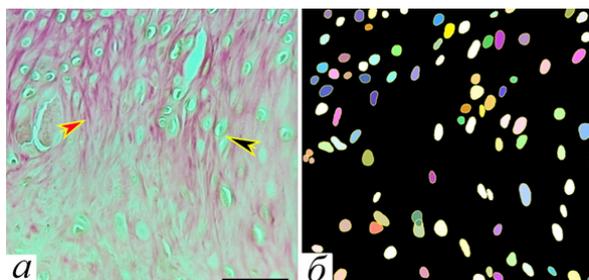


Рис. 9. Фрагмент фиброзно-хрящевой (мягкой незрелой) костной мозоли (а) локтевой кости белой крысы через 1 месяц (группа I) и результат распознавания ее клеток с помощью плагина «StarDist» (б). Окраска по Ван Гизону (а). Об. 40, шкала – 50 (а) мкм.

Fig. 9. A fragment of fibrocartilaginous (soft immature) callus (a) of the ulna bone in a white rat after 1 month (group I) and the result of cell recognition using the StarDist plugin (b). Van Gieson staining (a). Lens  $\times 40$ , scale bar – 50 (a)  $\mu\text{m}$ .

численной плотности клеток, а размеры зрелых клеток значимо увеличивались.

### Заключение

Локальное введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в контексте лечения переломов и восстановления костной ткани активно исследуется и может иметь ряд положительных эффектов на процесс заживления как мягкой, так и твердой костной мозоли [17, 25]. Мы считаем, что это происходит не только благодаря механизмам регуляции воспаления, ангиогенеза и пролиферации, инициируемым мезенхимальными стволовыми клетками на ранних стадиях образования временного (провизорного) субстрата, но и благодаря их участию в ремоделировании тканей. МСК могут усиливать процесс восстановления и реконструкции как мягкой, так и твердой костной мозоли, что улучшает механические свойства новообразованной ткани и способствует восстановлению физиологического гомеостаза костной ткани [23].

Остеофильные полимеры обладают способностью взаимодействовать с костной тканью, улучшая ее регенерацию. Они могут стимулировать образование мягкой костной мозоли и служить каркасом для новой костной ткани, обеспечивая механическую поддержку. Кроме того, полимеры могут стимулировать процессы пролиферации и дифференциации остеобластов, что при переходе к твердой костной мозоли способствует минерализации и стабилизации новой кости. Полимеры также улучшают взаимодействие МСК с костной тканью, усиливая кооперативный эффект. В результате использование модифицированных остеофильным полимером МСК улучшает механические свойства костной ткани, что особенно важно при остеопорозе [11].

Таким образом, модифицированные остеофильным полимером МСК могут оказывать положительное влияние на оба этапа за-

живления костной ткани, обеспечивая как функциональную, так и структурную поддержку процесса регенерации. Для подтверждения их эффективности и безопасности в лечении переломов у пациентов с остеопорозом необходимы дальнейшие экспериментальные и клинические исследования, которые могут значительно улучшить качество жизни этой группы пациентов.

### Список источников / References

1. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. 2-ое изд. СПб.: Питер, 2003. Borovikov V. Statistica. Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere. 2-oe izd. Saint-Petersburg: Piter, 2003 (In Russ.).
2. Сафарова Ю.И., Олжаев Ф.С., Умбаев Б.А., Еркебаева А.С. и др. Перспективные подходы лечения низкоэнергетических травматических повреждений костной ткани с использованием методов биоинженерии и клеточной терапии. Наука и здравоохранение, 2019;21(5):68–80. Safarova YuI, Olzhayev FS, Umbayev B.A., Erkebayeva AS, et al. Perspective Approaches for Treatment of Low-Energy Injury Bone Tissue Injuries Using Bioengineering Methods and Cell Therapy. Science & Healthcare, 2019;21(5):68–80 (In Russ.).
3. Соловьев Г.С., Янин В.Л., Пантелеев С.М., Вишарева Л.В., Истомина О.Ф., и др. Принцип провизорности как универсальный механизм эволюционирования гисто- и органогенезов. Фундаментальные исследования. 2005;9:32–4. Solov'ev GS, Yanin VL, Panteleev SM, Vikhareva LV, Istomina OF, i dr. Printsip provizornosti kak universal'nyi mekhanizm evolyutsionirovaniya gisto- i organogenezov. Fundamental'nye issledovaniya. 2005;9:32–4 (In Russ.).
4. An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Nakahira A, Kim KH, Imazato S. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. Dental Materials. 2012 Dec;28(12):1221–31. doi: 10.1016/j.dental.2012.09.001
5. Bastounis A, Langley T, Davis S, Paskins Z, Gittoes N, Leonardi-Bee J, et al. Assessing the Effectiveness of Bisphosphonates for the Prevention of Fragility Fractures: An Updated Systematic Review and Network Meta-Analyses. Repository@Nottingham (University of Nottingham). 2022 Mar 25;6(5):e10620. doi: 10.1002/jbm4.10620
6. Bhatnagar A, Kekatpure AL. Postmenopausal Osteoporosis: A Literature Review. Cureus. 2022 Sep 20;14(9):e29367. doi: 10.7759/cureus.29367
7. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten Years' Experience with Alendronate for Osteoporosis in Postmenopausal Women. New England Journal of Medicine. 2004 Mar 18;350(12):1189–99. doi: 10.1056/NEJMo030897
8. Chen L, Yang L, Yao M, Cui XJ, Xue CC, Wang YJ, et al. Biomechanical Characteristics of Osteoporotic Fracture Healing in Ovariectomized Rats: A Systematic Review. Dong Y, editor. PLOS ONE. 2016 Apr 7;11(4):e0153120. doi: 10.1371/journal.pone.0153120

9. Chen T, Yang T, Zhang W, Shao J. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in treating osteoporosis. *Biological Research*. 2021 Dec 20;54(1):42. doi: 10.1186/s40659-021-00366-y
10. D'Souza S, Murata H, Jose MV, Askarova S, Yantzen Y, Andersen JD, et al. Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using ATRP synthesis for bone targeting. *Biomaterials*. 2014 Nov 1;35(35):9447–58. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.041
11. Donnalaja F, Jacchetti E, Soncini M, Raimondi MT. Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers*. 2020 Apr 14;12(4):905. doi: 10.3390/polym12040905
12. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal*. 2002 Jan 1;43(4):244–58. doi: 10.1093/ilar.43.4.244
13. Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? *Injury*. 2007 Mar;38(1):S90–9. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.014
14. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. *Archives of Osteoporosis*. 2013 Oct 11;8(1-2). doi: 10.1007/s11657-013-0136-1
15. James R, Deng M, Laurencin CT, Kumbhar SG. Nanocomposites and bone regeneration. *Frontiers of Materials Science*. 2011 Nov 5;5(4):342–57. doi: 10.1007/s11706-011-0151-3
16. Jeon OH, Elisseeff J. Orthopedic tissue regeneration: cells, scaffolds, and small molecules. *Drug Delivery and Translational Research*. 2015 Dec 1;6(2):105–20. doi: 10.1007/s13346-015-0266-7
17. Jiang Y, Zhang P, Zhang X, Lv L, Zhou Y. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis. *Cell Proliferation*. 2020 Nov 18;54(1):e12956. doi: 10.1111/cpr.12956
18. Kamrani RS, Mehrpour SR, Sorbi R, Aghamirsalim M, Farhadi L. Treatment of nonunion of the forearm bones with posterior interosseous bone flap. *Journal of Orthopaedic Science*. 2013 Jul;18(4):563–8. doi: 10.1007/s00776-013-0395-0
19. Li H, Xiao Z, Quarles LD, Li W. Osteoporosis: Mechanism, Molecular Target, and Current Status on Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*. 2020 Mar 30;27(8):1489–507. doi: 10.2174/0929867327666200330142432
20. 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. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2009 Jun 23;129(11):1539–47. doi: 10.1007/s00402-009-0914-9
21. Patel D, Wairkar S. Bone regeneration in osteoporosis: opportunities and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022 Aug 22;13(2):419–32. doi: 10.1007/s13346-022-01222-6
22. Poursmaeili F, Kamali Dehghan B, Kamarehei M, Yong Meng G. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2018;14(1):2029–49. doi: 10.2147/TCRM.S138000
23. Rudiansyah M, El-Sehrawy AA, Ahmad I, Terefe EM, Abdelbasset WK, Bokov DO, et al. Osteoporosis treatment by mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes: Emphasis on signaling pathways and mechanisms. *Life Sciences*. 2022 Oct 1;306:120717. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120717
24. Safarova Y, Olzhayev F, Umbayev B, Tsoy A, Hortelano G, Tokay T, et al. Mesenchymal Stem Cells Coated with Synthetic Bone-Targeting Polymers Enhance Osteoporotic Bone Fracture Regeneration. *Bioengineering*. 2020 Oct 12;7(4):125. doi: 10.3390/bioengineering7040125
25. Safarova Y, Umbayev B, Hortelano G, Askarova S. Mesenchymal stem cells modifications for enhanced bone targeting and bone regeneration. *Regenerative Medicine*. 2020 Apr;15(4):1579–94. doi: 10.2217/rme-2019-0081
26. Singh J, Onimowo JO, Khan WS. Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: A review of the current trend. *Curr. Stem Cell Res*. 2015; 10(1):37-42. doi: 10.2174/1574888x09666140710105141
27. Teitelbaum SL. Stem cells and osteoporosis therapy. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):553-4. doi: 10.1016/j.stem.2010.10.004
28. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, Van K, Hyun D. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *P T*. 2018 Feb; 43(2):92-104.
29. Weigert M, Schmidt U. Nuclei Instance Segmentation and Classification in Histopathology Images with Stardist. 2022 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging Challenges (ISBIC). 2022 Mar 28. doi: 10.1109/ISBIC56247.2022.9854534
30. Wells GA, Cranney A, Peterson J, Boucher M, Shea B, Welch V, et al. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2008 Jan 23;(1):CD004523. doi: 10.1002/14651858.cd004523.pub3
31. Zeng Y, Yang Y, Wang J, Meng G. The Healing and therapeutic effects of perioperative bisphosphonate use in patients with fragility fractures: meta-analysis of 19 clinical trials. *Osteoporosis International*. 2024 Aug 8. doi: 10.1007/s00198-024-07191-5

#### Информация об авторах

Олжаев Фархад Сайдыкаримович – научный сотрудник лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины «National Laboratory Astana» Университета Назарбаев; folzhayev@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0002-1906-6654>

Акулинин Виктор Александрович – д-р. мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, ул. Ленина, 12, Омск, 644099, Россия; v\_akulinin@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

SPIN 3806-2878

#### Information about the authors

Farkhad S. Olzhaev – researcher of Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine «National Laboratory Astana» of Nazarbayev University; folzhayev@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0002-1906-6654>

Viktor A. Akulinin – Doct. Sci. (Med.), Professor, Head of Histology, Cytology and Embryology Department of Omsk State Medical University; v\_akulinin@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

SPIN 3806-2878

Умбаев Бауыржан Айтжанович – ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины «National Laboratory Astana» Университета Назарбаев; bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0002-0286-7252>

Сафарова Юлия Ивановна – старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины «National Laboratory Astana» Университета Назарбаев; yantsen@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0003-0695-0413>

Степанов Сергей Степанович – д-р мед. наук, старший научный сотрудник кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; serg\_stepanov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

SPIN 3241-2441

Гавриш Богдан Сергеевич – студент Омского государственного медицинского университета; pahizefalozavr@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0004-5282-5132>

Аскарлова Шолпан Несипбаевна – руководитель лаборатории биоинженерии и регенеративной медицины «National Laboratory Astana» Университета Назарбаев; shaskarova@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0001-6161-1671>

Bauyrzhan A. Umbaev – PhD, leading researcher of Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine «National Laboratory Astana» of Nazarbayev University; bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0002-0286-7252>

Yuliya I. Safarova – PhD, senior researcher of Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine «National Laboratory Astana» of Nazarbayev University; yantsen@nu.edu.kz

<https://orcid.org/0000-0003-0695-0413>

Sergei S. Stepanov – Doct. Sci. (Med.), senior researcher of Histology, Cytology and Embryology Department of Omsk State Medical University;

[serg\\_stepanov@mail.ru](mailto:serg_stepanov@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

SPIN 3241-2441

Bogdan S. Gavrish – student of Omsk State Medical University [pahizefalozavr@gmail.com](mailto:pahizefalozavr@gmail.com)

<https://orcid.org/0009-0004-5282-5132>

Sholpan N. Askarova – PhD, Head of Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine «National Laboratory Astana» of Nazarbayev University;

[shaskarova@nu.edu.kz](mailto:shaskarova@nu.edu.kz)

<https://orcid.org/0000-0001-6161-1671>

---

Статья поступила в редакцию 13.05.2024; одобрена после рецензирования 26.08.2024; принята к публикации 16.09.2024.  
Submitted 13.05.2024; Revised 26.08.2024; Accepted 16.09.2024.

---