

Научная статья

УДК 616.7–003.93–091.8:611.013.1  
doi:10.18499/2225-7357-2024-13-4-36-44  
1.5.22 – клеточная биология



## Морфофункциональные особенности восстановления костной ткани при локальном использовании мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42

Ф. С. Олжаев<sup>1</sup>, Б. А. Умбаев<sup>1</sup>, В. А. Акулинин<sup>2✉</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.** Цель исследования – морфологическая оценка влияния ингибирования Cdc42 в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) на процесс восстановления костного дефекта в отдаленном посттравматическом периоде у 24-месячных самцов крыс с переломом локтевой кости. **Материал и методы.** В эксперименте задействованы взрослые крысы Wistar (самцы массой 400–500 г, 24 мес; n=80), которым выполняли остеотомию диафиза локтевой кости. После травмы животных рандомизировали на четыре группы (по 10 крыс в группе). Животные группы I служили контролем и лечения не получали; животным группы II вводили старые МСК (клетки были выделены у крыс в возрасте 24 мес), группы III – старые МСК, модифицированные малой молекулой CASIN, группы IV – старые МСК, трансфицированные миРНК (нокдаун Cdc42). Выделяли два срока исследования через 4 и 6 мес после травмы. Количество вводимых клеток было одинаковым для всех экспериментальных групп –  $1 \times 10^6$  клеток в 200 мкл натрий-фосфатного буфера. Процедуру трансплантации клеток проводили однократно через сутки после перелома. Парафиновые срезы из зоны перелома окрашивали гематоксилином и эозином, а также по методике Ван Гизона. Морфометрический анализ проводили с помощью программы ImageJ 1.53 плагина StarDist. Проверку статистических гипотез осуществляли с использованием непараметрических критериев в программе Statistica 8.0. **Результаты.** У всех животных в области перелома на месте мягкой костной мозоли формировались очаги с различной степенью созревания клеточного и межклеточного субстрата твердой костной мозоли. Сравнение процесса заживления дефекта локтевой кости у животных контрольной группы, не получавших дополнительных источников остеогенеза, и у животных трех групп, отличающихся степенью активности Cdc42, трансплантированных в зону повреждения МСК, показало наличие статистически значимых различий в количестве клеток основных регенерирующих пулов. Через 4 и 6 мес после травмы наиболее выраженное восстановление пула предшественников хондробластов и остеобластов, а также хондроцитов и остеоцитов, происходило при использовании МСК, трансфицированных миРНК. Это, вероятно, связано с максимальным подавлением активности Cdc42 в МСК и частичной блокадой старения этих клеток в зонах регенерации локтевой кости, что способствовало дальнейшей стимуляции остеогенеза. **Заключение.** Целенаправленное ингибирование и подавление активности Cdc42 перед трансплантацией МСК, выделенных из жировой ткани, значительно улучшают формирование незрелой костной мозоли и процесс ее трансформации в зрелую трубчатую кость у старых животных. Эти результаты подтверждают перспективность и целесообразность применения метода таргетирования Cdc42 в рамках комбинированной терапии переломов у пожилых.

**Ключевые слова:** старение; перелом кости; мезенхимальные стволовые клетки; Cdc42; CASIN; siRNA

**Финансирование:** исследование профинансировано Назарбаев Университетом, грант проекта совместных исследований (CRP) №. 211123CRP1611.

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

**Для цитирования:** Олжаев Ф.С., Умбаев Б.А., Акулинин В.А., Сафарова Ю.И., Степанов С.С., Гавриш Б.С., Аскарова Ш.Н. Морфофункциональные особенности восстановления костной ткани при локальном использовании мезенхимальных стволовых клеток, таргетированных по Cdc42 // Журнал анатомии и гистопатологии. 2024. Т. 13, №4. С. 36–44. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-4-36-44>

## ORIGINAL ARTICLES

Original article

**Morphological Features of Bone Tissue Restoration with Local Use of Cdc42-Targeted Mesenchymal Stem Cells**F. S. Olzhayev<sup>1</sup>, B. A. Umbayev<sup>1</sup>, V. A. Akulinin<sup>2</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.** The aim was to evaluate morphological effect of Cdc42 inhibition in mesenchymal stem cells (MSCs) on the restoration process bone defects during the late post-traumatic period of 24-months male rats with ulnar fractures. **Material and methods.** The experiment involved adult Wistar rats (males, weighing 400–500 grams, aged 24 months; n=40) undergoing ulnar diaphysis osteotomy. After the injury, the animals were randomized into four groups (10 rats per group). Group I animals served as controls and received no treatment. Group II animals were administered aged MSCs (cells isolated from 24-month-old rats). Group III received aged MSCs modified with the small molecule CASIN, while Group IV received aged MSCs transfected with miRNA (Cdc42 knockdown). Observations were completed 4 and 6 months post-injury. The cell dose was identical across all experimental groups –  $1 \times 10^6$  cells in 200  $\mu$ L of sodium phosphate buffer. The cell transplantation procedure was performed once, 24 hours after the fracture. Paraffin sections from the fracture site were stained using hematoxylin & eosin and the Van Gieson method. Morphometric analysis was conducted using ImageJ 1.53 with the StarDist plugin, and statistical hypothesis testing was performed using non-parametric methods in Statistica 8.0 software. **Results.** In all animals, foci with varying degrees of maturation of the cellular and extracellular matrix of the hard callus formed at the fracture site. A comparison of ulnar defect healing in the control group (which did not receive additional osteogenesis sources) and in the three groups with varying degrees of Cdc42 activity in transplanted MSCs revealed statistically significant differences in the number of cells within key regenerating pools. At 4 and 6 months post-injury, the most pronounced restoration of chondroblast and osteoblast precursors, as well as chondrocytes and osteocytes, occurred when using MSCs transfected with miRNA. This was likely due to maximal suppression of Cdc42 activity in MSCs and partial inhibition of their aging in the regeneration zones of the ulnar bone, facilitating further osteogenesis stimulation. **Conclusion.** Targeted inhibition and suppression of Cdc42 activity before the transplantation of MSCs derived from adipose tissue significantly improve the formation of immature callus and its transformation into mature tubular bone in aged animals. These results confirm the potential and feasibility of using Cdc42 targeting as combination therapy for fractures in elderly individuals.

**Keywords:** osteoporosis; bone fracture; mesenchymal stem cells; Cdc42; CASIN; siRNA**Funding:** the research has been funded by the Nazarbayev University, Collaborative Research Project (CRP) Grant No. 211123CRP1611.**Conflict of interests:** the authors declare no conflict of interests.**For citation:** Olzhayev F.S., Umbayev B.A., Akulinin V.A., Safarova Y.I., Stepanov S.S., Gavrish B.S., Askarova Sh.N. Morphological features of bone tissue restoration with local use of Cdc42-targeted mesenchymal stem cells. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2024. V. 13, №4. P. 36–44. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2024-13-4-36-44>**Введение**

Травматические повреждения костной ткани у пожилых являются важной проблемой общественного здравоохранения, особенно в связи с тем, что с возрастом увеличивается заболеваемость остеопорозом, а количество пожилых людей растет [9, 22]. Люди преклонного возраста чаще подвержены переломам из-за повышенной хрупкости костей, саркопении, воспалений, сопутствующих заболеваний, гормональной недостаточности и т. д., вызванных сложными механизмами старения, которые определяются основными генетическими, эпигенетическими и экологическими факторами [9, 22]. Стоит отметить, что замедленное заживление переломов костей у пожилых людей также является серьезной проблемой общественного здравоохранения. В исследовании V.S. Nikolaou с соавт. пациентам в возрасте 65 лет и старше потребовался более значительный промежуток времени, необходимый для заживления переломов в

сравнении с пациентами в возрасте 18–40 лет [14].

Поиск эффективных способов коррекции процесса восстановления в зоне дефекта костной ткани привел к идее локального использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), модифицированных по активности белков, регулирующих клеточные сигнальные пути, вовлеченные в такие процессы как клеточная пролиферация и дифференциация. Одним из таких белков, членов семейства малых ГТФаз, является Cdc42, регулирующий множество клеточных процессов, включая поляризацию клеток, миграцию и деление [18, 19]. Множество исследований свидетельствует о том, что нарушение регуляции Cdc42 играет важную роль в старении клеток и тканей [18, 19, 23]. В этой связи вполне вероятно, что модуляция экспрессии и/или активности Cdc42 может приводить к изменениям репаративных процессов при старении. Одним из молекулярных ингибиторов Cdc42 является CASIN (Cdc42 Activity-Specific Inhibitor),

который был идентифицирован как специфический ингибитор Cdc42, не влияющий на другие ГТФазы, такие как Rac1 и RhoA 4. Это делает его потенциально полезным для целенаправленного ингибирования активности Cdc42 в МСК [5, 8].

Еще одним направлением влияния на активность МСК является трансфицирование малых интерферирующих РНК (siRNA, миРНК, микроРНК). Это небольшие некодирующие молекулы РНК, которые играют ключевую роль в регуляции генов на посттранскрипционном уровне. Они обычно состоят из 20–24 нуклеотидов и участвуют в процессе подавления экспрессии генов, связываясь с мРНК и препятствуя ее переводу в белки или способствуя ее деградации. Поэтому трансфицирование миРНК является распространенным методом для специфического подавления экспрессии генов. Этот процесс включает введение их в клетки для снижения уровня мРНК целевого гена, что может быть использовано для ингибирования Cdc42 на трансляционном уровне. Трансфицирование миРНК осуществляется различными методами, которые позволяют эффективно вводить эти молекулы в клетки для достижения необходимого эффекта [6, 12].

Поскольку Cdc42 участвует в регуляции различных функций МСК, то использование CASIN и трансфицирование миРНК может открыть новые возможности для разработки терапевтических методик, направленных на подавление Cdc42 в контексте регенерации больших дефектов костной ткани [6, 18]. Ингибирование Cdc42 в мезенхимальных клетках приводит к различным биологическим последствиям, которые могут существенно влиять на клеточные функции и процессы [18]. Например, к изменению формы клеток, так как Cdc42 участвует в регуляции актинового цитоскелета. Это может вызвать переход клеток от мезенхимального состояния к более зрелому, что связано с повышением экспрессии Е-кадгерина и другими признаками созревания. Ингибирование Cdc42 может привести к снижению подвижности мезенхимальных клеток, что особо важно для заживления ран. Изменяя активацию различных сигнальных путей клеточной адгезии и миграции, Cdc42 влияет на взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом и другими клетками, что имеет значение в контексте трансформации костной мозоли. Самым важным является то, что ингибирование Cdc42 в МСК может влиять на их дифференцировку, способствуя переходу к более специализированным формам [4, 10, 16, 20].

Ранее нами в экспериментальном исследовании было установлено, что ингибитор Cdc42 CASIN увеличивал потенциал адипогенной и остеогенной дифференциации в культуре МСК, полученных от старых животных, и снижал уровни биомаркеров старения,

таких как реактивные формы кислорода, p16INK4a, F-актин, ERK1/2 и JNK, которые были повышены в этих клетках [18]. Таким образом, согласно нашим предыдущим данным, Cdc42 является важнейшим регулятором функционирования МСК, оказывая глубокое влияние на их самообновление, пролиферацию и потенциал многостадийной дифференцировки, и играет важную роль в старении МСК, а фармакологическое снижение активности Cdc42 может быть стратегией лечения за счет частичного омоложения МСК [18].

По литературным и нашим данным, ингибирование и блокирование Cdc42 в МСК должно приводить к значительным изменениям в морфологии, миграции и дифференцировке этих клеток, что может иметь как физиологические, так и патофизиологические последствия при их локальном использовании. В результате этого силлогизма возникает потребность дальнейшего, более детального сравнительного изучения влияния обычных и таргетированных по Cdc42 МСК на исход процесса восстановления дефекта костной ткани. Особое значение при этом имеют данные о гистоархитектонике мягкой костной мозоли и ее трансформации в зрелую костную ткань в позднем посттравматическом периоде.

Цель исследования – морфологическая оценка влияния ингибирования Cdc42 в МСК на процесс восстановления костного дефекта в отдаленном посттравматическом периоде у 24-месячных самцов крыс с переломом локтевой кости.

## Материал и методы исследования

В эксперименте задействовали 80 крыс-самцов линии Wistar массой 400–500 г, которые содержались в виварии с круглосуточным доступом к воде и корму. Все манипуляции проводились в соответствии с международными этическими нормами работы с экспериментальными животными и были одобрены Комитетом по этике ЧУ «National Laboratory Astana» Назарбаев Университета (регистрационный номер IORG 0006963).

Выделение и культивирование МСК из жировой ткани крыс (n=10) проводили согласно протоколу [3] под ингаляционной анестезией изофлураном в асептических условиях. Образцы промывали в охлажденном растворе среды Игла и антибиотиков в течение 5 мин. Затем содержимое подвергали измельчению, переносили в пробирку и инкубировали с 0,2% раствором коллагеназы на протяжении 60 мин с прерывистым встряхиванием на водяной бане при температуре 37°C, центрифугировали, осадок ресуспендировали в растворе питательной среды и инкубировали в культуральных плашках при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Для удаления неадгезивных клеток планшеты трехкратно

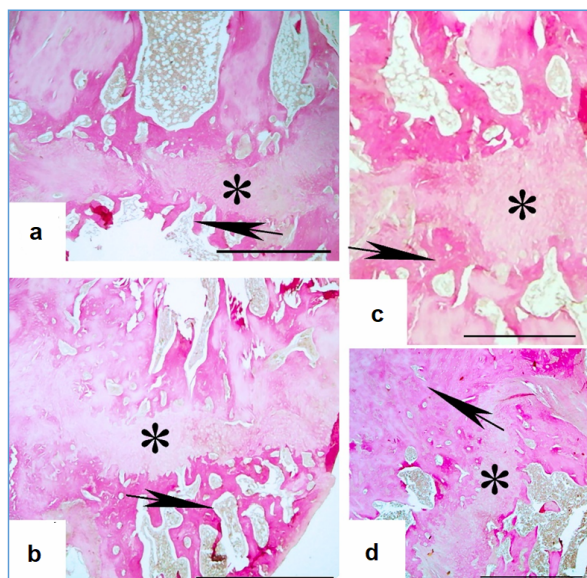


Рис. 1. Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 мес после перелома у животных групп I (a), II (b), III (c) и IV (d). Звездочка – хрящевая ткань, стрелки – незрелая губчатая костная ткань. Окраска по Ван Гизону. Об. 4, шкала (a, b, d) – 1000 мкм, шкала (c) – 500 мкм.

*Fig. 1. Histological comparison of the callus area of the ulna four months after fracture in animals from groups I (a), II (b), III (c), and IV (d). Asterisk indicates cartilage tissue, arrows indicate immature trabecular bone tissue. Staining according to Van Gieson. Lens  $\times 4$ , scale (a, b, d) – 1000  $\mu\text{m}$ , scale (c) – 500  $\mu\text{m}$ .*

промывали раствором натрий-фосфатного буфера на следующий день. Культуральную среду меняли каждые 48 ч на протяжении 3 нед. Через 21 сут культивирования, клетки, экспрессирующие на своей поверхности маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки культивировали до 4–5 пассажей. Мезенхимальная природа выделенных клеток идентифицировалась с помощью иммунофлуоресцентной окраски на маркеры CD90, CD105, CD34, CD45 и CD31. Микроскопический анализ выполнялся с использованием микроскопов Olympus IX83 и Carl Zeiss Cell Observer SD. Изображения были получены с помощью охлаждаемой CCD камеры и программного обеспечения MetaVue.

Для осуществления фармакологического ингибирования часть МСК предварительно обрабатывали ингибитором Cdc42 (CASIN, Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мкМ в течение 16 ч. Для подавления экспрессии Cdc42 использовали Stealth siRNA Cdc42 RSS329927 (Thermo Fisher Scientific). Транфекцию проводили согласно протоколу в течение 48 ч с использованием Lipofectamine® 2000.

Экспериментальный перелом локтевой кости моделировали путем остеотомии в области диафиза общей анестезией с использованием изофлурана [2, 17]. Животные первой

группы служили контролем и лечения не получали; животным второй группы вводили старые МСК, третьей группе – старые МСК, модифицированные малой молекулой CASIN, и четвертой группе – МСК, трансфицированные миРНК (нокдаун Cdc42). Количество вводимых клеток было одинаковым для всех экспериментальных групп –  $1 \times 10^6$  клеток в 200 мкл натрий-фосфатного буфера. Процедуру трансплантации клеток проводили однократно через сутки после перелома.

Материал для гистологического исследования забирали из зоны костной мозоли через 4 ( $n=20$ ) и 6 ( $n=20$ ) мес после вмешательства (по пять образцов на каждую группу). Под изофлурановой анестезией проводили эвтаназию путем цервикальной дислокации. Выделяли локтевую кость, фрагмент зоны повреждения фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7,2–7,4), после декальцинации, проводили гистологическое исследование. Готовили парафиновые блоки, серийные срезы толщиной 7–10 мкм (микротом HM 450, Thermo FS), которые окрашивали гематоксилином и эозином, а также и по методике Ван Гизона. На световом микроскопе «Leica DM 1000» (объективы:  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$  и  $\times 100$ ) с цифровой камерой GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB (pixel size  $1.4 \times 1.4 \mu\text{m}$ ) получали по пять изображений на срез (tiff,  $2592 \times 1944$  пикселей). На полученных изображениях, как описано в предыдущей статье [2], на базе плагина «StarDist» для ImageJ/Fiji [21] определяли численную плотность и площадь клеток костной мозоли.

Анализ количественных данных базировался на общепринятых критериях. В силу малого объема выборки, распределения вариационных рядов, отличного от нормального (Kolmogorov–Smirnov и Shapiro–Wilk tests), неоднородных дисперсий (Levene's test), использовали ранговые критерии (Mann–Whitney U Test, ANOVA Kruskal–Wallis test). Пользовались программным обеспечением из пакета StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA, version 8.0. Полученные данные представлены как медианы (Me) и интерквартильный диапазон ( $Q_1$ – $Q_3$ ). Нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,013$  с учетом поправки на множественную проверку [1, 7].

### Результаты и их обсуждение

Для оценки тренда динамики образования костной мозоли оценивали минеральную плотность костной ткани в местах переломов в начале наблюдения и через 4 мес. У животных группы I, не получавших лечения, отмечена отрицательная динамика (снижение на 13%,  $p=0,01$ , критерий Манна–Уитни для парного сравнения независимых выборок). В то же время у животных группы III, получавших локальное введение МСК, модифицирован-

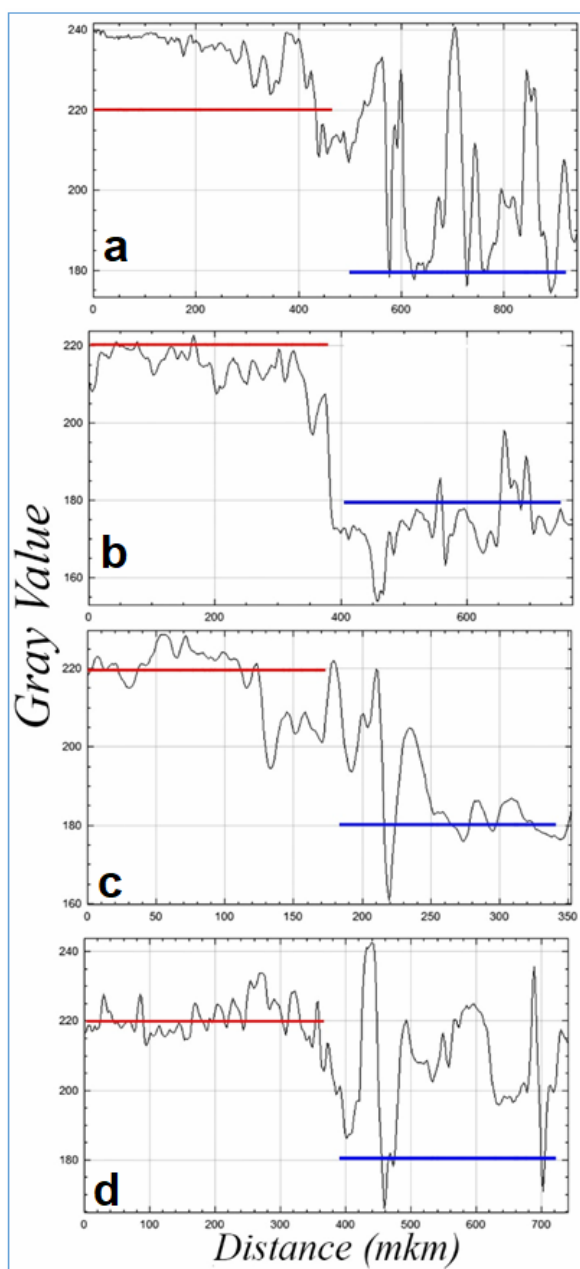


Рис. 2. Гистограммы распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани, при сравнении через 4 мес после перелома у животных группы I (a), II (b), III (c) и IV (d). Красная линия – указывает приграничную зону хрящевой ткани, синяя линия – зону костной ткани. Окраска по Ван Гизону. Об. 4, шкала (a, b, d) – 1000 мкм, шкала (c) – 500 мкм. См. рис. 1.

Fig. 2. Histograms of pixel distribution at the boundary between cartilage and immature bone tissue comparing four months after fracture in animals from groups I (a), II (b), III (c), and IV (d). Staining with Van Gieson. Lens  $\times 4$ , scale (a, b, d) – 1000  $\mu\text{m}$ , scale (c) – 500  $\mu\text{m}$ . See Fig. 1.

ных малой молекулой CASIN, наблюдалось статистически значимое увеличение плотности кости на 31% ( $p=0,001$ ), а наиболее выраженное увеличение этого показателя – на 88% ( $p=0,0001$ ) было представлено в группе IV, получавшей МСК, трансфицированных миРНК. В группе II, получавшей инъекции МСК с обычной активностью Cdc42 плотность

увеличилась на 20%, но степень статистической значимости была ниже ( $p=0,01$ ). Множественное сравнение четырех групп (ANOVA Краскела-Уоллиса) выявило наличие между ними статистически значимых различий по каждому сроку (4 мес.:  $df=3$ ,  $N=14,2$ ,  $p=0,01$ ; 6 мес.:  $df=3$ ,  $N=16,5$ ,  $p=0,001$ ). На основании этих результатов можно предположить, что терапевтическое снижение активности Cdc42 МСК влияет на процесс минерализации костной мозоли, увеличивая ее рентгенологическую плотность.

Ранее, по литературным [11, 13, 15] и собственным [2] данным, было установлено, что МСК могут усиливать процесс восстановления и реконструкции как мягкой, так и твердой костной мозоли, что улучшает механические свойства новообразованной ткани и способствует восстановлению физиологического гомеостаза костной ткани. Мы показали, что заживление дефекта кости проходило через стадию образования мягкой и твердой костных мозолей, как временного субстрата, который в течение 1 мес после травмы заполнял все пространство дефекта, последовательно трансформируясь из незрелой формы в зрелую [2].

В настоящем исследовании гистологическое сравнение зон костной мозоли проводили в отдаленном периоде – через 4 и 6 мес у животных без лечения и при использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Установлено, что через 4 мес после травмы максимальное количество новообразованной зрелой костной ткани было выявлено у животных группы III и IV, которым трансплантировали МСК, трансфицированные COSIN и миРНК (рис. 1). При трансплантации немодифицированных МСК (группа II) выявлялось максимальное для всех групп содержание грубоволокнистой (незрелой) костной ткани (рис. 1б). Эта ткань характеризуется хаотичным расположением коллагеновых волокон и высокой плотностью клеток с пониженным содержанием минеральных солей. В процессе созревания она заменяется зрелой пластинчатой костью.

Необходимо отметить, что у животных на протяжении всего времени наблюдения сохранялся значительный объем хрящевой ткани, вокруг и за счет которой формировалась костная ткань. Однако, ее количество и интенсивность окраски, форма границы отличались у животных без лечения и при трансплантации МСК (рис. 1).

Для получения дополнительных количественных данных мы использовали анализ пиксельного состава полученных изображений (рис. 2).

Установлено, что при окраске по Ван Гизону граница хрящевой и незрелой губчатой костной ткани имела высокий показатель контрастности по пиксельному составу. Выявлены критические уровни яркости пикселей



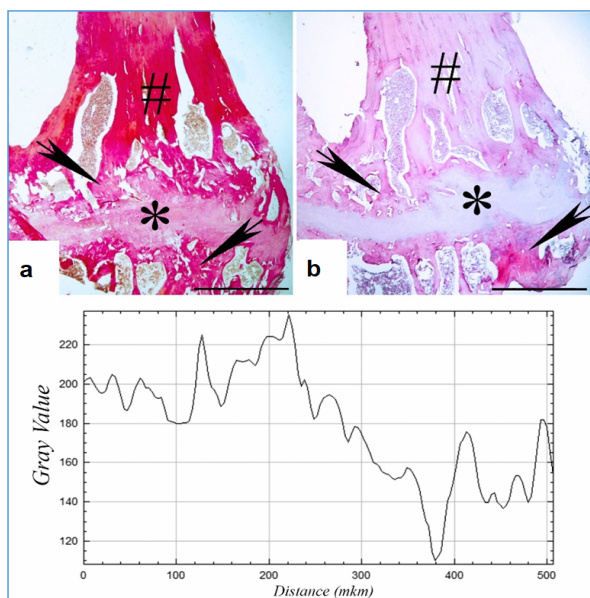


Рис. 3. Зона костной мозоли локтевой кости через 6 мес после перелома у животного группы IV. Гистограмма распределения пикселей на границе хрящевой и незрелой костной ткани. Звездочка – хрящевая ткань, стрелки – незрелая губчатая костная ткань. Окраска по Ван Гизону (а) и гематоксилином и эозином (б). Об. 4, шкала – 1000 мкм.

Fig. 3. The callus area of the ulna six months after fracture in an animal from group IV. Histogram of pixel distribution at the boundary between cartilage and immature bone tissue. Asterisk indicates cartilage tissue, arrows indicate immature trabecular bone tissue. Staining with Van Gieson (a) and hematoxylin & eosin (b). Lens  $\times 4$ , scale – 1000  $\mu\text{m}$ .

этих зон. Яркость пикселей хрящевой ткани (на рис. 2 отмечена красной линией) варьировала в пределах 210–240 (в диапазоне 0–255 у.е.), а незрелой кости (на рис. 2 отмечена синей линией) – 140–180. Согласно гистограммам, наибольший разброс показателей данной переменной был характерен для группы I (без МСК). В группе I, вероятно, было много более ярких пикселей, характерных для изображения хрящевой ткани (около 240 у.е.), и в целом более выраженное разрежение плотности костной ткани (рис. 2а). При использовании МСК (группы II–IV) этот показатель снижался до 220 у.е. (критерий Манна–Уитни,  $p=0,01$ ). Вполне вероятно, что это было связано с активацией образования коллагена и его минерализацией этими клетками.

Еще более глубокие изменения в направлении увеличения плотности регенерата у животных группы IV были выявлены через 6 мес после травмы (рис. 3). В зоне хрящевой ткани яркость пикселей снижалась до  $180 \pm 15$  у.е., а незрелой костной ткани – до  $140 \pm 20$  у.е. (критерий Манна–Уитни,  $p=0,006$ ;  $p=0,005$ ).

Таким образом, через 4 и 6 мес после перелома локтевой кости во всех группах мягкая костная мозоль была представлена в основном незрелой губчатой костью и хрящевой

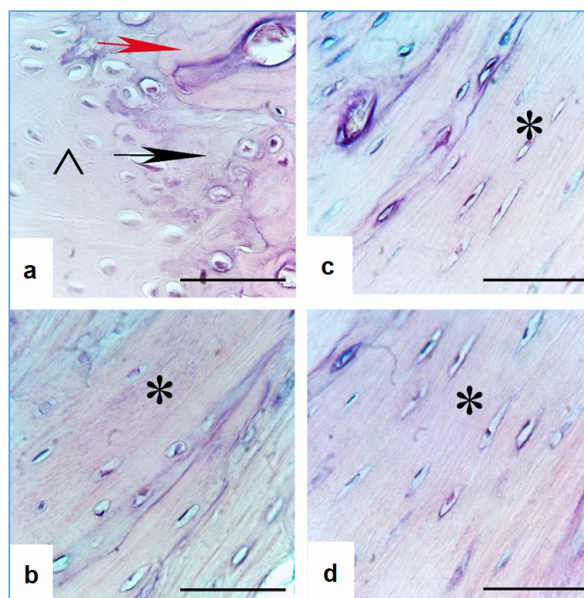


Рис. 4. Гистологическое сравнение зоны костной мозоли локтевой кости через 4 (а, б) и 6 (с, d) мес после перелома у животных группы IV. Звездочка – зрелая пластинчатая костная ткань, черная стрелка – незрелая губчатая костная ткань, красная стрелка – остеон с кровеносным сосудом. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100, шкала – 50 мкм.

Fig. 4. Histological comparison of the callus area of the ulna at four (a, b) and six (c, d) months after fracture in animals from group IV. Asterisk indicates mature lamellar bone tissue, black arrow indicates immature trabecular bone tissue, red arrow indicates an osteon with a blood vessel. Staining with hematoxylin & eosin. Lens  $\times 100$ , scale – 50  $\mu\text{m}$ .

тканью. На препаратах она выглядела как рыхлая, ячеистая структура с обилием клеток (рис. 1, 4, 5). Твердая костная мозоль формировалась из зрелой пластинчатой кости. Она имела более упорядоченную структуру по сравнению с мягкой мозолью, с четко выраженными остеонами и компактной организацией (рис. 4а, б). При окраске гематоксилином и эозином зрелая кость окрашивалась в более темные оттенки розового или красного цвета из-за высокой минерализации и наличия коллагена. В твердой костной мозоли преобладали остециты, расположенные в лакунах, а также остеобласты на поверхности кости. Остеокласты встречались на границе между старой и новой костной тканью, где происходит ремоделирование.

Через 6 мес после травмы процесс ремоделирования не завершился, но был более выраженным у животных группы III и IV (рис. 4с, d). В зрелой костной ткани происходила более глубокая минерализация, что, вероятно, делало ее прочной и устойчивой к механическим нагрузкам. Зрелая костная ткань (пластинчатая) имела упорядоченную структуру, состоящую из остеонов, которые формировали концентрические цилиндры вокруг центрального канала (рис. 4а). Коллагеновые волокна пластинчатой ткани располагались в

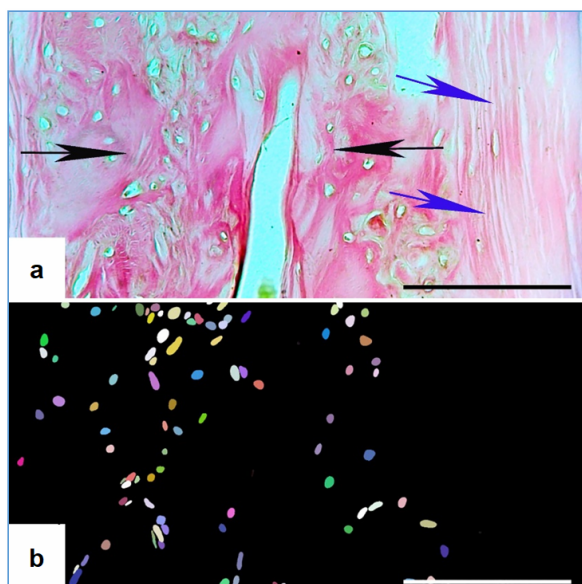


Рис. 5. Зона костной мозоли локтевой кости (а) и ее маска с выделенными с помощью StarDist лакунами (б), через 6 месяцев после травмы, группа IV. В участках незрелой ткани многочисленные лакуны. Синие стрелки – зрелая пластинчатая костная ткань, черные стрелки – незрелая губчатая костная ткань. Окраска по Ван Гизону. Об. 40, шкала – 100 мкм.

Fig. 5. The callus area of the ulna (a) and its mask with lacunae highlighted using StarDist (b) six months after fracture in an animal from group IV. In areas of immature tissue, numerous lacunae are present. Blue arrows indicate mature lamellar bone tissue, black arrows indicate immature trabecular bone tissue. Staining with Van Gieson. Lens  $\times 40$ , scale – 100  $\mu\text{m}$ .

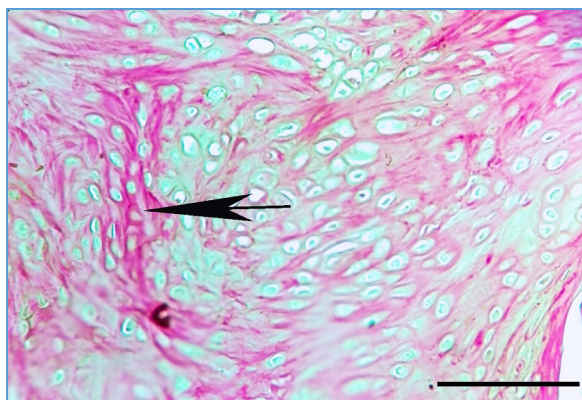


Рис. 6. Участок костной мозоли локтевой кости с высоким содержанием коллагеновых волокон (черная стрелка) в хрящевой ткани вокруг лакун, через 6 мес после травмы, группа IV. Многочисленные лакуны. Окраска по Ван Гизону. Об. 40, шкала – 100 мкм.

Fig. 6. Area of the callus in the ulna with a high content of collagen fibers (black arrow) in the cartilage tissue surrounding the lacunae, six months after injury, group IV. Numerous lacunae are present. Staining with Van Gieson. Lens  $\times 40$ , scale – 100  $\mu\text{m}$ .

определенном порядке, что придавало прочность и устойчивость (рис. 5а). Кроме того, в участках сохранившейся хрящевой ткани животных групп III и IV выявлялись мощные

пучки коллагеновых волокон вокруг лакун с бластными клетками (рис. 6). Вероятно, именно за счет этой конгломерации формировалась сначала губчатая незрелая, а затем и зрелая пластинчатая костная ткань. При этом использование модифицированных МСК оказывало положительное влияние на неоостеогенез.

### Заключение

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

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

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

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

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

Таким образом, результаты исследования подчеркивают эффективность примене-

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

### Список источников / References

1. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере. 2-ое изд. СПб.: Питер, 2003. 688.  
Borovikov V. Statistica. Iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere. 2-nd ed. SPb.: Piter, 2003. 688. (in Russ.).
2. Олжаев Ф.С., Акулинин В.А., Умбаев Б.А., Сафарова Ю.И., Степанов С.С., Гавриш Б.С., и др. Морфологическая характеристика зоны перелома локтевой кости крыс на фоне терапии модифицированными мезенхимальными стволовыми клетками при экспериментальном остеопорозе. Журнал анатомии и гистопатологии. 2024;13(3):49-59.  
Olzhaev F.S., Akulinin V.A., Umbaev B.A., Safarova Yu.I., Stepanov S.S., Gavrish B.S., i dr. Morfologicheskaya kharakteristika zony pereloma loktevoi kosti krysa na fone terapii modifitsirovannyimi mezenkhimallymi stvolovymi kletkami pri eksperimental'nom osteoporoze. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2024;13(3):49-59. (in Russ.).
3. Arana M., Mazo M., Aranda P., Pelacho B., Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol.* 2013;1036:47-61. DOI: 10.1007/978-1-62703-511-8\_4.
4. Banavar SP, Trogon M., Drawert B., Yi T.M., Petzold L.R., Campàs O. Coordinating cell polarization and morphogenesis through mechanical feedback. *PLoS Comput Biol.* 2021 Jan 28;17(1):e1007971. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007971.
5. Duan X., Perveen R., Dandamudi A., Adili R., Johnson J., Funk K., Berryman M., Davis A.K., Holinstat M., Zheng Y., Akbar H. Pharmacologic targeting of Cdc42 GTPase by a small molecule Cdc42 activity-specific inhibitor prevents platelet activation and thrombosis. *Sci Rep.* 2021 Jun 23;11(1):13170. DOI: 10.1038/s41598-021-92654-6.
6. Falato L., Gustin M., Langel Ü. Cell-penetrating peptides delivering siRNAs: an overview. *Methods Mol Biol.* 2021;2282:329-352. doi: 10.1007/978-1-0716-1298-9\_18
7. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 2002;43(4):244-58. DOI: doi.org/10.1093/ilar.43.4.244.
8. Florian M.C., Leins H., Gobs M., Han Y. et al. Inhibition of Cdc42 activity extends lifespan and decreases circulating inflammatory cytokines in aged female C57BL/6 mice. *Aging Cell.* 2020 Sep;19(9):e13208. DOI: 10.1111/ace1.13208.
9. Foulke B.A., Kendal A.R., Murray D.W., Pandit H. Fracture healing in the elderly: A review. *Maturitas.* 2016 Oct;92:49-55. DOI: 10.1016/j.maturitas.2016.07.014.
10. Liu G.X., Zhu J.C., Chen X.Y., Zhu A.Z., Liu C.C., Lai Q., Chen S.T. Inhibition of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by erythropoietin via activating ERK and P38 MAPK. *Genet Mol Res.* 2015 Jun 26;14(2):6968-77. DOI: 10.4238/2015.June.26.5.
11. Mierke C.T., Puder S., Aermes C., Fischer T., Kunschmann T. Effect inhibition on cell mechanics depends on Rac1. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jan 28;8:13. DOI: 10.3389/fcell.2020.00013.
12. Moazzam M., Zhang M., Hussain A., Yu X., Huang J., Huang Y. The landscape of nanoparticle-based siRNA delivery and therapeutic development. *Mol Ther.* 2024 Feb 7;32(2):284-312. DOI: 10.1016/j.ymthe.2024.01.005.
13. Murphy N.P., Mott H.R., Owen D. Progress in the therapeutic inhibition of Cdc42 signalling. *Biochem Soc Trans.* 2021 Jun 30;49(3):1443-1456. DOI: 10.1042/BST20210112.
14. Nikolaou V.S., Efstathopoulos N., Kontakis G., Kanakaris N.K., Giannoudis P.V. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury.* 2009 Jun;40(6):663-8. DOI: 10.1016/j.injury.2008.10.035.
15. Rudiansyah M., El-Sehrawy A.A., Ahmad I., Terefe E.M., Abdelbasset W.K., Bokov D.O., Salazar A., Rizaev J.A., Muthanna F.M.S., Shalaby M.N. Osteoporosis treatment by mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes: emphasis on signaling pathways and mechanisms. *Life Sci.* 2022 Oct 1;306:120717. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120717.
16. Rutkowski D.M., Vincenzetti V., Vavylonis D., Martin S.G. Cdc42 mobility and membrane flows regulate fission yeast cell shape and survival. 2023 Jul 21;2023.07.21.550042. DOI: 10.1101/2023.07.21.550042.
17. Safarova Y.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 (Basel).* 2020 Oct 12;7(4):125. DOI: 10.3390/bioengineering7040125.
18. Umbayev B., Masoud A.-R., Tsoy A., Alimbetov D., Olzhayev F., Shramko A., Kaiyrykyzy A., Safarova Y., Davis T., Askarova S. Elevated levels of the small GTPase Cdc42 induces senescence in male rat mesenchymal stem cells. *Biogeront.* 2018;19:287-301. DOI: 10.1007/s10522-018-9757-5.
19. Umbayev B., Safarova Y., Yermekova A., Nessipbekova A., Syzdykova A., Askarova S. Role of a small GTPase Cdc42 in aging and age-related diseases. *Biogeront.* 2023;24(1):27-46. DOI: 10.1007/s10522-022-10008-9.
20. Wang Y., Yao Y. Nanofiber alignment mediates the pattern of single cell migration. *Langmuir.* 2020 Mar 3;36(8):2129-2135. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b03314.
21. Weigert M., Schmidt U. Nuclei instance segmentation and classification in histopathology images with StarDist. In: *Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging Challenges (ISBIC)*, Kolkata, India, 2022 Aug 19. DOI: 10.1109/ISBIC56247.2022.9854534.



22. Woolf A.D., Akesson K. Preventing fractures in elderly people. *BMJ*. 2003 Jul 12;327(7406):89-95. DOI: 10.1136/bmj.327.7406.89.
23. Xu X.P., He H.L., Hu S.L., Han J.B., Huang L.L., Xu J.Y. et al. Ang II-AT2R increases mesenchymal stem cell migration by signaling through the FAK

and RhoA/Cdc42 pathways in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Jul 12;8(1):164. DOI: 10.1186/s13287-017-0617-z. Retraction in: *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jan 31;13(1):46. DOI: 10.1186/s13287-022-02733-2.

#### Информация об авторах

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

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

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>

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

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; pahizefaloazvr@gmail.com

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

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

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

#### 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>

Bauyrzhan A. Umbayev – 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>

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

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 Rresearcher of Histology, Cytology and Embryology Department of Omsk State Medical University;

serg\_stepanov@mail.ru

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

SPIN 3241-2441

Bogdan S. Gavrish – student of Omsk State Medical University; pahizefaloazvr@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

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

Статья поступила в редакцию 16.09.2024; одобрена после рецензирования 6.12.2024; принята к публикации 20.12.2024.  
Submitted 16.09.2024; Revised 6.12.2024; Accepted 20.12.2024.