

3-бөлім  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Section 3  
**BIOTECHNOLOGY**

---

Раздел 3  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**Олжаев Ф.С.<sup>1</sup>, Сафарова (Янцен) Ю.И.<sup>2</sup>, Цой А.К.<sup>3</sup>,  
Умбаев Б.А.<sup>4</sup>, Аскарова Ш.Н.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

<sup>2</sup>e-mail: yantsen@nu.edu.kz

<sup>3</sup>e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

<sup>5</sup>e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ  
ОСТЕОФИЛЬНОГО БИСФОСФОНАТНОГО ПОЛИМЕРА  
НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ, ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ  
АДИПОЗНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СПОСОБНОСТИ ИНГИБИРОВАТЬ  
АКТИВНОСТЬ ОСТЕОКЛАСТОВ *IN VITRO***

Остеопороз – это прогрессирующее системное заболевание, характеризующееся снижением костной массы и нарушением микроархитектоники костной ткани, приводящее к увеличению хрупкости кости и высокому риску возникновения переломов. Регресс плотности и прочности костной ткани при остеопорозе обусловлен усилением функциональной активности остеокластов и снижением количества клеток-предшественников остеобластов и развитием так называемой «остеогенной недостаточности». Нами разрабатывается новый способ клеточной терапии адипозными мезенхимальными стволовыми клетками (AT-MSCs), функционализированными синтетическим остеофильным бисфосфонатным полимером с целью восполнения популяции прогениторных клеток остеогенеза и ингибирования остеокластной активности в очаге замедленного сращения кости при остеопороз-ассоциированных переломах. В настоящей статье отражены данные по синтезу остеофильного полимера, выделению гомогенной клеточной культуры AT-MSCs с оценкой чистоты полученной клеточной популяции, исследованию влияния полимера на пролиферацию и остеогенную дифференцировку AT-MSCs и изучение его способности ингибировать активность остеокластов *in vitro*. Согласно полученным данным, полимер не является цитотоксичным, не оказывает влияния на пролиферативную активность и остеогенную дифференцировку AT-MSCs, однако существенно ингибирует фагоцитарную активность макрофагов костного мозга. По результатам исследований AT-MSCs, функционализированные остеофильным полимером могут быть использованы при дальнейших экспериментах на лабораторных животных для оценки эффективности предлагаемого метода стимуляции репаративного остеогенеза *in vivo* с использованием животной модели остеопороза с созданием остеопороз-ассоциированных переломов трубчатых костей.

**Ключевые слова:** остеопороз, остеокласты, репаративный остеогенез, адипозные мезенхимальные стволовые клетки, остеофильный полимер, клеточная терапия.

Olzhaev F.S.<sup>1</sup>, Safarova (Jancen) Ju.I.<sup>2</sup>, Tsoy A.K.<sup>3</sup>,  
Umbaev B.A.<sup>4</sup>, Askarova Sh.N.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

<sup>2</sup>e-mail: yantsen@nu.edu.kz

<sup>3</sup>e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

<sup>5</sup>e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, JSC "Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana

### **Cell therapy approach for correction of osteoporosis-associated fractures using adipose-derived mesenchymal stem cells functionalized with osteophilic polymer**

Osteoporosis is a progressive systemic skeletal disease characterized by reduced bone density and disrupted microarchitecture of the bone tissue that leads to increased bone fragility and elevated risk of bone fractures. In osteoporotic condition decrease in bone density and strength happens not only due to the increased osteoclastic activity but also due to the decreased number of osteoblast cells precursors (mesenchymal stem cells) and development of so called "osteogenic insufficiency". We proposed the new method of cell therapy with adipose derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) and surface modification with synthetic bisphosphonate osteophilic polymer that would restore the osteoblast progenitor pool and at the same time inhibit osteoclastic activity in the regeneration zone of osteoporosis associated fractures. In current paper we have outlined the process of osteophilic polymer synthesis, isolation of homogenic population of AT-MSCs and assessment of the purity of obtained cell populations, assessment of polymer effect on cell proliferation and subsequent differentiation down the osteogenic lineage and polymer effect on the osteoclastic activity in vitro. According to the obtained data polymer was not found to be cytotoxic and did not affect the speed of MSCs proliferation. Surface modification with the polymer has no effect on cell osteogenic differentiation however inhibits phagocytic activity of bone marrow derived macrophages. Polymer functionalized MSCs could be subsequently used in further animal studies to assess the efficacy of suggested approach for stimulation of regenerative processes in vivo using the animal model of osteoporosis and osteoporosis associated fractures of compact bones.

**Key words:** osteoporosis, osteoclasts, reparative osteogenesis, adipose mesenchymal stem cells, osteophilic polymer, cell therapy.

Олжаев Ф.С.<sup>1</sup>, Сафарова (Янцен) Ю.И.<sup>2</sup>, Цой А.К.<sup>3</sup>,  
Умбаев Б.А.<sup>4</sup>, Аскарова Ш.Н.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

<sup>2</sup>e-mail: yantsen@nu.edu.kz

<sup>3</sup>e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

<sup>4</sup>e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

<sup>5</sup>e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.

### **Остеопорозбен байланысқан сүйек сынуды түзетуде остеофильді полимермен өңделген адипозды мезенхимальді бағаналы жасушалармен жасушалық терапия әдісін қолдану**

Остеопороз – бұл сүйек массасының төмендеуімен және сүйектің микроархитектоникасының бұзылуымен сипатталатын, сүйек зақымдалуының жоғарылауына және сынудың жоғары тәуекеліне әкелетін прогрессивті жүйелі ауру. Остеопороздағы сүйек тығыздығының және беріктігінің регрессі остеокластардың функционалдық белсенділігінің артуымен ғана емес, остеобластардың прекурсорлық жасушаларының санының азаюымен және «остеогендік жеткіліксіздіктің» дамуымен байланысты. Остеопорозбен байланысты сынықтар кезінде сынған сүйектің баяу бітіп кетуі орталығында остеогенездің прогениторлық жасушалар популяциясын және остеокластикалық белсенділікті тежеу үшін синтетикалық остеофильді бисфосфонат полимерімен функционалданған адипозді мезенхимальды бағаналы жасушалармен жасушалық терапияның жаңа әдісін ұсындық. Бұл мақалада остеофильді полимердің синтезі, МҰ-МБЖ біртекті жасуша мәдениетін алу, алынған жасуша популяциясының тазалығын бағалау, МҰ-МБЖ-дің пролиферациясы мен остеогендік дифференциациясы бойынша полимердің әсерін зерттеу және оның остеокластық белсенділігін in vitro жағдайында емдеу қабілетін зерттеу туралы мәліметтер келтірілген. Алынған мәліметтерге сәйкес, полимер цитотоксикалық емес, МҰ-МБЖ in vitro пролиферация жылдамдығына әсер етпейді, ал полимердің МҰ-МБЖ-ны полимермен модификациясы олардың остеогендік дифференциалау процестеріне әсер етпейді, сонымен бірге сүйек кемегінің макрофагтарының фагоцитарлық белсенділігін төмендетеді. Зерттеу

нәтижелері бойынша остеофильді полимермен функционалданған МҰ-МБЖ-лар зертханалық жануарларда остеопорозбен байланысты түтікшелі сүйек сынықтарына негізделген жануарлар үлгісін қолдану арқылы *in vivo* жағдайында репаративті остеогенезді ынталандырудың тиімділігін бағалау үшін эксперименттерде ұсынылатын әдіс қолданыла алады.

**Түйін сөздер:** остеопороз, остеокластар, репаративті остеогенез, адипозді бағаналы жасушалар, остеофильді полимер, жасушалық терапия.

## Введение

По данным ВОЗ остеопороз наряду с сахарным диабетом, сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями занимает четвертое место в мире в структуре заболеваний [1, 2]. Международная Организация по вопросам остеопороза приводит сведения о том, что в мире данным заболеванием страдают около 200 миллионов женщин (<https://www.iofbonehealth.org>). Количество страдающих остеопорозом в Республике Казахстан составляет 12,50% женщин и 9,09% мужчин. В мире отмечается нарастающая динамика прогрессивного роста количества пациентов, страдающих остеопорозом, которая к началу 2050 года составит цифры трехкратного прироста числа больных и увеличением частоты остеопороз-ассоциированных переломов [3]. Согласно прогнозу экспертов, число больных в мире с переломами шейки бедра, вследствие остеопороза к 2025 году составит порядка 2.6 млн. человек, а летальность после ОАП возрастет до 700 тысяч случаев в год [1, 4]. На текущий момент в странах OECD финансовые потери, связанные с лечением и последующей реабилитацией пациентов с ОАП являются одной из превалирующих статей расходов в здравоохранении [4].

Остеопения или прогрессивное уменьшение плотности костей при остеопорозе происходит в результате нарастания резорбции кости остеокластами в процессе костного метаболизма, возрастного регресса клеток-предшественников остеобластов и сниженной абсорбции кальция. Преобладающее число научных изысканий в мире направлено на совершенствование методов терапии остеопороза с целью сохранения исходного уровня костной массы, и как следствие, приводящее к снижению риска возникновения переломов. Тем не менее, многие процессы регенерации костной ткани при переломе на фоне остеопороза до сих пор остаются «белыми пятнами», в сравнении с исследованиями, посвященными профилактике остеопороз-ассоциированных переломов [5].

В настоящее время в мире существует несколько методов фармацевтической коррекции

остеопороза, но наиболее распространенными являются лекарственная терапия для стимуляции остеогенеза на основе бисфосфонатных соединений [6-8]. Бисфосфонаты – это аналоги пирофосфатов ( $H_2O_3P-O-PO_3H_2$ ), отличающиеся тем, что центральная гидролитически лабильная P-O-P связь заменена на гидролизоустойчивую P-C-P группу. Механизм действия бисфосфонатных соединений заключается в селективном взаимодействии с гидроксипатитными группами на резорбтивной поверхности костной ткани и снижении скорости метаболизма и функциональной активности остеокластов, за счет ингибирования ключевого фермента в метаболизме остеокластов – FPP (farnesyl pyrophosphates) [9]. Большинство бисфосфонатных средств на рынке представлены соединениями золендроновой кислоты, алендроновой, памидроновой, ризедроновой, ибандроновой и др.

С другой стороны, регресс плотности и прочности костной ткани при остеопорозе обусловлен не только усилением функциональной активности остеокластов, но также и уменьшением количества прогениторных клеток остеогенеза. В этой связи, еще одним перспективным вектором в лечении осложненных переломов является клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (mesenchymal stem cells (MSCs)), которые считаются прогениторными клетками остеогенеза [10-23]. Хотя сведения о клиническом применении MSCs при остеопорозе пока не опубликованы, имеются исследования об использовании MSCs для лечения костных дефектов – системных [24] или локальных [18, 25]. Так, например, Horwitz et al показали улучшение регенерации костной ткани при врожденном несовершенном остеогенезе. Аутологичные MSCs вводили пациентам внутривенно, и спустя три месяца было отмечено значительное увеличение минеральной плотности костей по сравнению с контрольной группой [26]. В исследованиях Gangji et al аутологичные клетки костного мозга применяли для лечения асептического остеонекроза головки бедра. Предполагаемый механизм действия клеток связан со стимуляцией остеогенеза за счёт «свежей» стромальной фракции и ангиоге-

неза за счёт CD34(+)-клеток в, так называемых, «мёртвых зонах» кости [27].

Различают два основных источника получения стромальной фракции – это аспират костного мозга подвздошной кости и аспират жировой ткани. В силу физиологического расположения, аспират костного мозга содержит в себе большее количество MSCs по сравнению с аспирированием жировой ткани, и в основной массе опубликованных трудов средоточие исследований сфокусировано на MSCs, выделяемых из костного мозга. [10-22]. Однако, принимая во внимание степень инвазивности и сложности, связанные с получением MSCs из костного мозга в клинической медицине, в последнее время более пристальное внимание ученых привлекают технологии использования MSCs, выделенных из жировой ткани (AT-MSCs), ввиду возможности получения их в большом количестве с минимальным риском для пациента [28].

Стромально-васкулярная фракция жировой ткани, содержащая различные популяции стволовых клеток-предшественниц, может быть легко выделена ферментативным способом и использована при различных патологических состояниях. Тем не менее, одним из недостатков трансплантации стромальной фракции, полученной из аспирированной жировой ткани, является тот факт, что получаемый клеточный материал является гетерогенным по природе. В связи с тем, что для регенерации костной ткани необходимо преимущественно наличие популяции MSCs, сортировка и пролиферация в условиях *in vitro* мезенхимальных стволовых клеток, входящих в состав стромальной фракции жировой ткани, является необходимым этапом в подготовке клеточного материала для трансплантации.

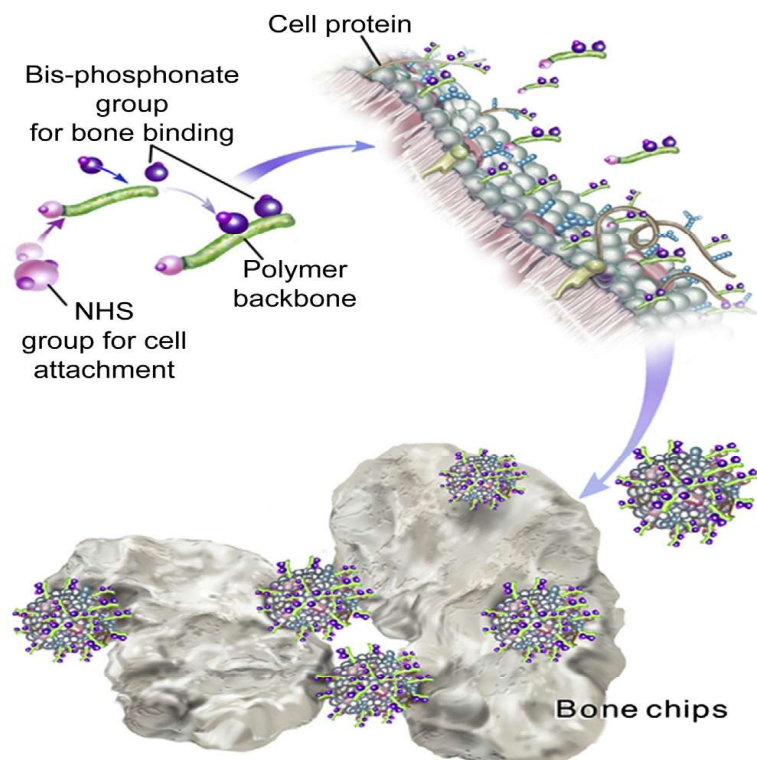
Несомненно важен и способ трансплантации увеличенных и/или модифицированных *in vitro* MSCs. Внутривенное введение считается наименее инвазивным, но в случае регенерации костной ткани большое количество исследовательских работ показало низкую эффективность хоуминга MSCs непосредственно к костной ткани [29]. Основная масса клеток в первые дни аккумуляровалась в легких [30-32]. По прошествии 7-10 дней все-таки наблюдалась миграция клеток к очагам воспаления, однако процент этих клеток составил лишь 3,5% от общей массы [33]. Кроме того, в случае внутривенного введения стоит соблюдать ряд предосторожностей в диагностическом плане, так как согласно исследованиям Kidd et al [34] **трансплантируемые вну-**

тривенно MSCs имеют также тропность к очагам развития опухолей, таких как рак груди или рак яичника. С этой точки зрения, локальное введение клеточного материала является клинически наиболее эффективным и безопасным, так как трансплантат попадает непосредственно в очаг поражения. Тем не менее, в некоторых исследованиях ставится под сомнение способность к выживанию клеток ввиду отсутствия кислорода и питательных веществ вдали от кровотока [35]. Применение методов поверхностной модификации 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 лигандов, 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 аллендроната к костной ткани [36, 37]. Работа американских ученых Sarkar et al основана на модификации клеточной мембраны с помощью рецептора sialyl Lewis X (SLeX), который улучшает ролинг и хоуминг к клеткам с увеличенной экспрессией Р-селектинов, ответственных за воспалительный процесс [35].

Применяемый в нашем исследовании остеофильный полимер имеет в своем составе две функциональные группы – бисфосфонатную и гидроксисукцимидную (NHS) [38]. Ранее нами было показано, что NHS-группа способна ковалентно связываться с аминными и карбоксильными группами, находящимися на поверхности клеточных мембран, и обеспечивает взаимодействие полимера с мезенхимальными стволовыми клетками (рисунок 1). 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 связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось изучение влияния полимера на пролиферацию и остеогенную дифференцировку стволовых клеток жировой ткани и изучение его способности ингибировать активность остеокластов *in vitro*.



**Рисунок 1** – Целенаправленная доставка клеток к кости. Мультифункциональный полимер содержит N-гидроксиукцимид (розовый) и педантную бисфосфонатную группу (сиреневый). N-гидроксиукцимид ковалентно связывается с компонентами клеточной мембраны, а бисфосфонатная группа селективно связывается с гидроксиапатитами на резорбтивной поверхности костной ткани. (D'Souza et al., 2014)

## Материалы и методы

### Синтез полимера

Полимер был синтезирован методом радикальной полимеризации с переносом атома (ATRP), согласно опубликованному ранее протоколу [38]. Базовой молекулой при синтезе являлся кополимер, состоящий из двух мономеров – биологически инертного N,N-диметилакриламида (ДМАА) и N'-гидроксиукцимидного эфира N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты (NHS), с последующей полимеризацией и ковалентным присоединением бисфосфонатной группы. Характеризацию синтезируемого полимера проводили с использованием методов гель-хроматографии (GPC) для определения молекулярной длины полимера и ядерно-магнитного резонанса (NMR) для определения концентрации бисфосфонатов.

Выделение и культивирование AT-MSCs из адипозной ткани мелких грызунов (крыс), подтверждение их мезенхимальной природы.

AT-MSCs крыс были получены из адипозной ткани животных согласно опубликованному ранее протоколу [39] с небольшими модификациями. Коротко, жировая ткань была выделена из крыс под ингаляционной анестезией изофлураном в асептических условиях. Образцы промывались в охлажденном DMEM, измельчались, инкубировались с 0.2% раствором коллагеназы и центрифугировались при 300xg на протяжении 5 минут. Осадок ресуспендировали в растворе полной питательной среды (DMEM + 15% FBS + 1% Пенициллин/Стрептомицин) и инкубировали в 75 см<sup>2</sup> культуральных плашках при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Для удаления неадгезивных клеток планшеты трехкратно промывали раствором PBS на следующий день, культуральную среду меняли каждые 48 часов на протяжении 3 недель.

*Подтверждение мезенхимальной природы выделенных клеток.*

По прошествии 21 дня культивирования клетки, экспрессирующие на своей поверхности

маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки были культивированы до 4-5 пассажей. Мезенхимальная природа выделенных клеток была идентифицирована с помощью иммунофлуоресцентной окраски на маркеры CD90, CD105, CD34, CD45 и CD31. Микроскопический анализ, в том числе и флуоресцентный, был выполнен с использованием микроскопов Olympus IX83 и Carl Zeiss Cell Observer Z1. Изображения были получены с помощью охлаждаемой CCD камеры и программного обеспечения MetaVue.

**Функционализация AT-MSCs остеофильным полимером**

AT-MSCs были инкубированы вместе с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 минут в водяной бане при температуре 37°C в 1 мл PBS при pH 8.0. После инкубации взвесь клеток AT-MSCs центрифугировали при 300g в течение 5 минут и промывали в PBS при pH 7.4; процедуру повторяли трехкратно.

**Оценка влияния полимера на клеточную пролиферацию**

AT-MSCs, функционализированные полимером были высеваны в 96-ти луночные планшеты и инкубированы на протяжении 0, 1, 2, 4, 24, 48 и 72 часов при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для оценки цитотоксичности полимера и его влияния на рост клеток был использован тест Cell-Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA) согласно протоколу производителя. Оценку количества люминесценции проводили с использованием микроплашечного ридера Biotek Hybrid Reader (Biotek, USA).

**Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации AT-MSCs**

AT-MSCs (1.0±1e6/мл) инкубировали с 1 мг/мл полимера на протяжении 10 минут и промывали трехкратно. Затем клетки высевали в 24-х луночные планшеты и инкубировали в полной питательной среде DMEM на протяжении 12 часов. Затем производили замену среды на готовую остеогенную среду (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen) и культивировали на протяжении 14 суток. Замену остеогенной среды производили каждые 48-72 часов. В качестве контроля применяли мезенхимальные клетки, не модифицированные полимером, но подвергшиеся тем же процедурам, и MSCs, культивировавшиеся в простой питательной среде DMEM. Спустя 14 дней клетки фиксировали в 4%-ном формалине и окрашивали 40 mM алазаринового красного, промывали в PBS и фотографировали

в проходящем свете под прямым микроскопом Carl Zeiss Cell Observer SD.

Дополнительно, остеогенная дифференцировка оценивалась количественно. Кратко, после фиксации МСК в формалине и окрашивания ализариновым красным, клетки инкубировали в 10%-ной ацетиловой кислоте и собирали с использованием клеточного скрабера в микроцентрифужные пробирки. После центрифугирования супернатант был перенесен в новые пробирки, и для нейтрализации ацетиловой кислоты в пробирки добавлялся 10%-ный гидроксид аммония. Концентрация алазаринового красного измерялась на приборе Synergy Hybrid H1 Microplate Reader при длине волны 405 нм.

**Оценка влияния полимера на остеокластную активность**

Остеокласты выделяли из костного мозга трубчатых костей новорожденных крыс (1-3 дня от рождения) согласно протоколу Tevlin et al[40]. Кратко, животных умерщвляли с помощью CO<sub>2</sub>. Кости очищали от мягких тканей в асептических условиях, затем в FACS растворе (PBS+10%FBS) измельчали в ступке, полученную суспензию фильтровали через клеточный фильтр с пропускной способностью 100 микрон. Далее клетки центрифугировали на протяжении 5 минут при 200xg при 4 °C. В полученную клеточную взвесь добавляли 10мл раствора FACS. Отдельно в 50 мл пробирку добавляли 10 мл коммерческого раствора для градиентной клеточной сепарации Histopaque (Sigma Aldrich), туда же сверху осторожно добавляли раствор FACS с клетками и центрифугировали при 200xg на протяжении 15 минут. Осторожно аспирировали средний мутный слой, который содержит необходимые для культивации клетки. Затем повторно промывали в растворе FACS при 200xg на протяжении 5 минут. Затем добавляли среду для индукции роста макрофагов (MEM, 1% Глутамат, 10% ФБС, 1% Пен/Стреп, 50µл M-CSF (10ng/ml, SigmaAldrich)). Клетки высевали в 24-х луночный остеопланшет с покрытием, имитирующим костную ткань (OsteoPlate, Corning). Культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C. На протяжении первых 3 дней среду не меняли. Затем производили смену среды на дифференцировочную (MEM, 1% Глутамат, 10% ФБС, 1% Пен/Стреп, 50µл M-CSF (10ng/ml, SigmaAldrich), 50µл RANKL (10ng/ml, SigmaAldrich)) на ежедневной основе на протяжении 5 дней. Через 5 дней добавляли исследуемые концентрации остеофильного полимера (0,5мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл) и референтного вещества алендроната (в концентрации

4e-3 и 2e-3 г/мл) [41]. Клетки культивировали на протяжении 5 дней, затем часть окрашивали на активность TRAP согласно протоколу производителя (Sigma Aldrich), а часть использовали для оценки остеокластной активности методом Pit Assay. Поверхность лунок оценивали под микроскопом, количественный анализ проводили с помощью программного обеспечения FIJI.

#### Статистический анализ

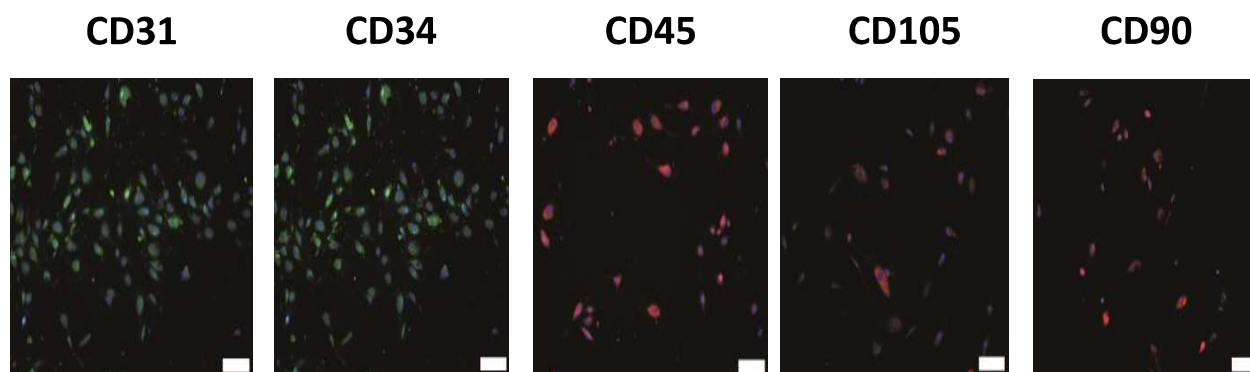
Полученные данные представлены в виде средней  $\pm$  стандартная погрешность средней величины (Mean  $\pm$  SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Значения

считались достоверно различными при  $p \leq 0.05$ . Анализ проводился с использованием статистической программы SigmaPlot.

### Результаты исследований и их обсуждение

*Подтверждение мезенхимальной природы AT-MSCs, выделенных из адипозной ткани крыс.*

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



**Рисунок 2** – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры:

ядра клеток были окрашены красителем DAPI (синий канал), гемопоэтических клеток – CD31(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), CD45 (красный канал, флюорофор Alexa 594), эндотелиальных клеток – CD34 (зеленый канал, флюорофор Alexa 488), мезенхимальных стволовых клеток – CD105 и CD90 (красный канал, флюорофор Alexa 594). Обх10. (Флуоресцентный микроскоп, Carl Zeiss Cell Observer Z1)

По прошествии 21 дня культивирования клетки, экспрессирующие на своей поверхности маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки были культивированы до 4-5 пассажей. Была получена популяция AT-MSCs с конфлюэнтностью 80-90%. Клетки имели фибробласт-подобную морфологию и адгезировались к пластику (рисунок 3).

Для дальнейшего подтверждения их мезенхимальной природы было проведено окрашивание на поверхностные маркеры, специфичные именно для AT-MSCs, такие как CD105 и CD90 (рисунок 4). Визуальная оценка представленных микрофотографий подтверждает наличие мар-

керов CD105 и CD90 и отсутствие CD31, CD34, CD45, что является характерным для мезенхимальной популяции. Также был проведен количественный анализ полученной популяции, и согласно результатам, представленным на рисунке 5, выделенные клетки практически гомогенны по своей природе, так как процент клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45) и эндотелиальных клеток (CD31) был меньше 3%.

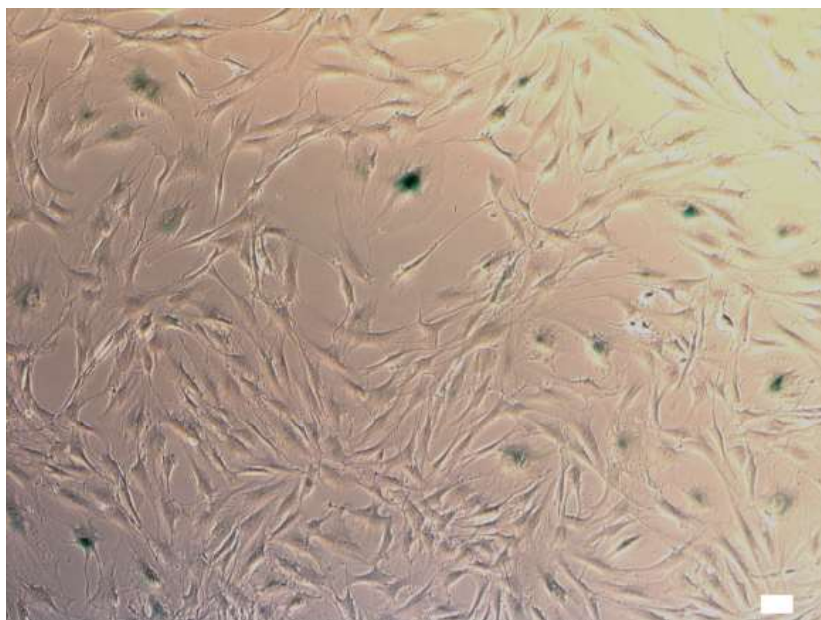
*Изучение влияния остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию AT-MSCs, выделенных из жировой ткани крыс.*

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



На рисунке 6 представлены данные по интенсивности АТФ-индуцированной люминесценции клеток, инкубированных с 1 мг/мл полимера на протяжении 0-72 часов. Согласно полученным данным достоверной разницы между степенью

пролиферации контрольных АТ-MSCs и клеток, обработанных полимером, не наблюдалось, что свидетельствует о том, что полимер не оказывает выраженного токсического эффекта на культуры АТ-MSCs *in vitro*.



**Рисунок 3** – Культура CD105-положительных АТ- МСК на 21 день культивации. Обх10. (Фазово-контрастные снимки, Carl Zeiss Cell Observer Z1)

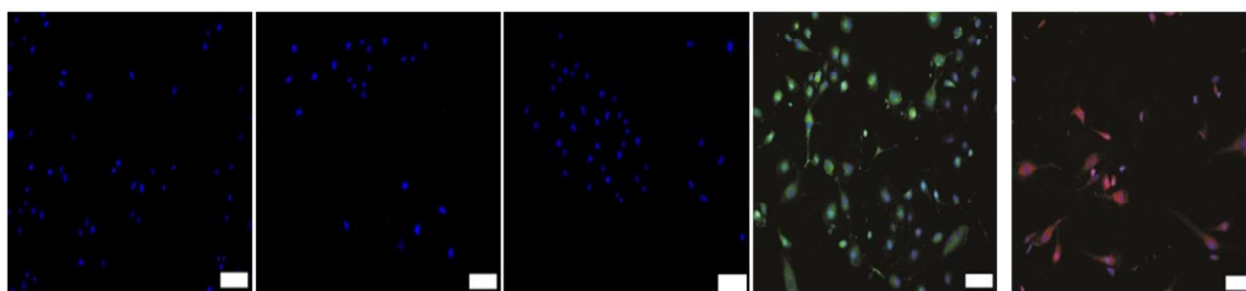
**CD31**

**CD34**

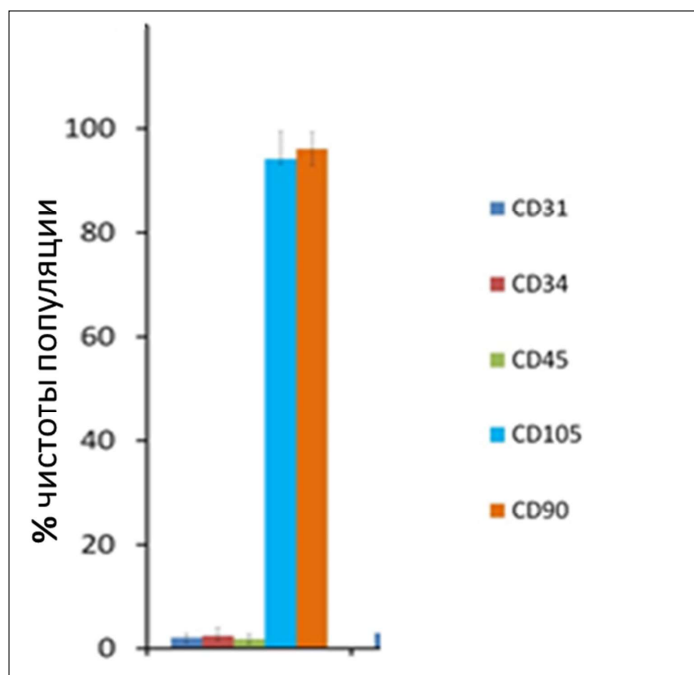
**CD45**

**CD105**

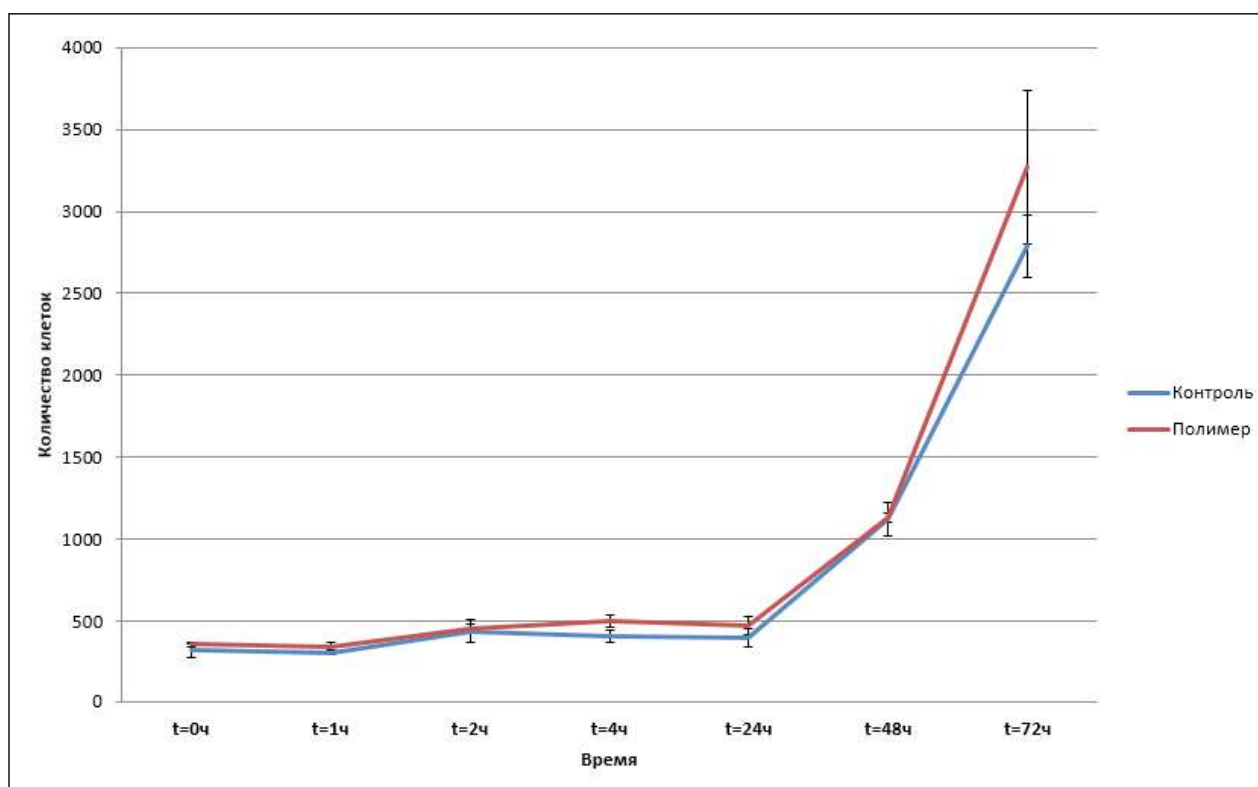
**CD90**



**Рисунок 4** – Результаты окрашивания отсортированных клеток на отрицательные поверхностные маркеры: гемопоэтических клеток – CD31(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), CD45, эндотелиальных клеток – CD34 (зеленый канал, флюорофор Alexa 488), ядра клеток были окрашены красителем DAPI (синий канал); и положительные поверхностные маркеры мезенхимальных стволовых клеток – CD105(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), и CD90 (красный канал, флюорофор Alexa 594). (Флуоресцентный микроскоп, Carl Zeiss Cell Observer Z1)



**Рисунок 5** – Количественный анализ отсортированных клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) ( $p \leq 0.001$ , one-way ANOVA)

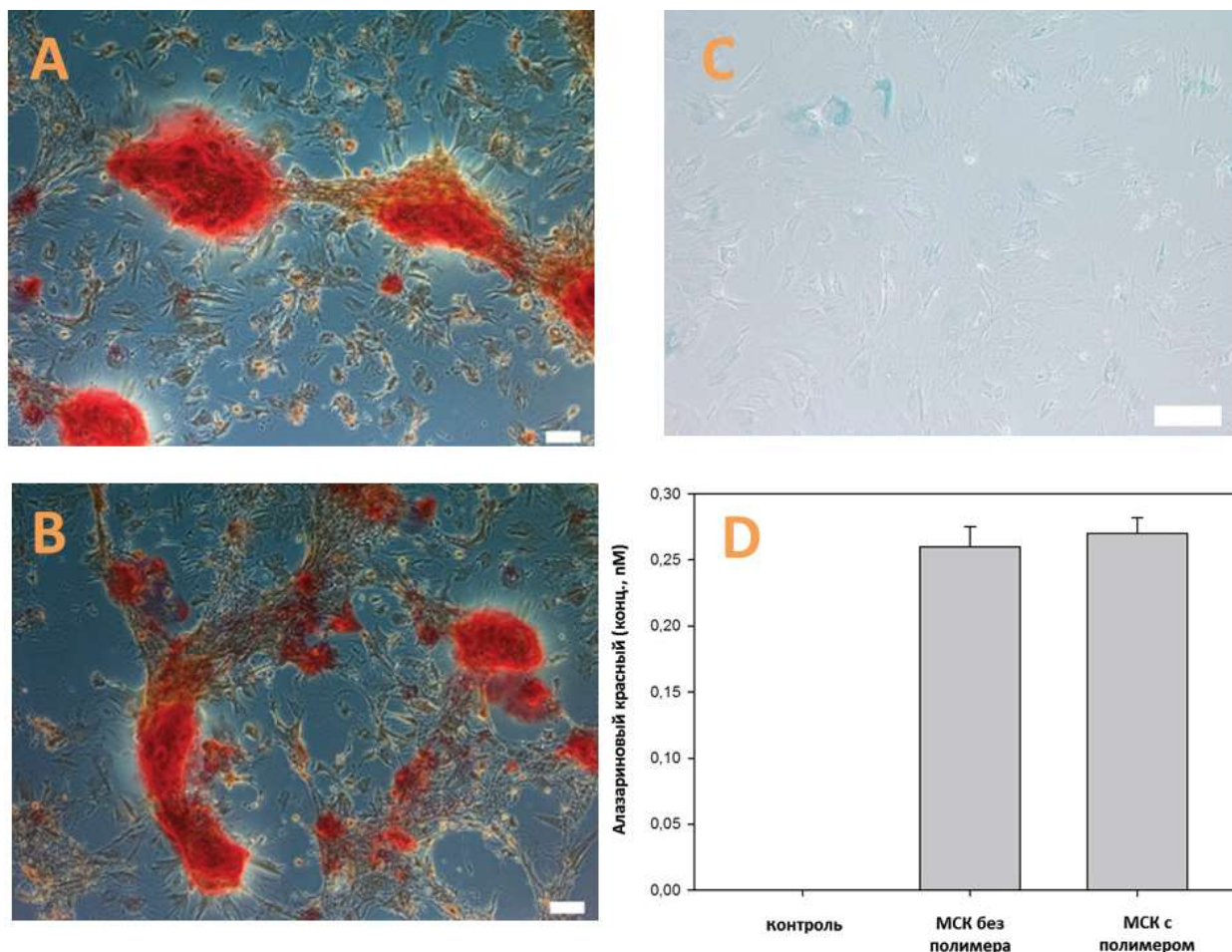


**Рисунок 6** – Оценка токсичности полимера на пролиферацию АТ-МСК *in vitro*

Изучение влияния полимера на остеогенную дифференцировку AT-MSCs *in vitro*.

Микроскопический визуальный анализ препаратов, окрашенных алазариновым красным, выявил наличие участков с высокой концентрацией кальция, окрашенные в ярко красный цвет, что свидетельствовало о процессах остеогенной дифференциации (рисунок 7-А, 7-В). Окрашивание клеток алазариновым красным показало, что культивирование мезенхимальных стволовых клеток в остеогенной среде на протяжении 14 дней приводит к индукции их остеогенной дифференциации (рисунок 7-А). В то же самое время, инкубирование клеток с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 минут

в водяной бане 37°C в 1 мл PBS при pH 8.0 не оказывало влияния на интенсивность окрашивания алазариновым красным (рисунок 7-В), из чего можно сделать вывод о том, что полимер не влияет на процессы остеогенной дифференцировки MSCs и данные клетки могут быть использованы для дальнейших экспериментов на лабораторных животных. В качестве контроля, на микрофотографиях MSCs, культивированных в простой питательной среде DMEM и не подвергавшихся остеогенной дифференцировке, не наблюдалось очагов красного окрашивания (рисунок 7-С). Результаты визуальных наблюдений были подтверждены количественным гистохимическим анализом (рисунок 7-Д).



**Рисунок 7** – Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации AT-MSCs. Культура AT-МСК (А) и культура AT-МСК, модифицированных остеофильным полимером (В), были дифференцированы с помощью остеогенной среды (OsteoMedia, Gibco) и окрашены Алазариновым Красным (Alizarin Red, SigmaAldrich). Контрольные AT-МСК (С) без дифференцировочной среды не окрасились Алазариновым Красным. Клеточные лизаты были проанализированы с помощью планшетного ридера Synergy Hybrid Reader (Biotek, USA) с длиной волны 405nm (D)

Оценка влияния остеофильного полимера на остеокластную активность

Остеокластная природа выделенных клеток была подтверждена с помощью окраски на активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP), высокая активность которой присуща макрофагам и остеокластам. Остеокласты по своей природе происходят от гемопоэтической линии, что и обуславливает их схожесть с макрофагами. Еще одной характерной особенностью остеокластов является наличие больш-

шого количества ядер от 10-40 до 100. На Рисунке 8 представлены фотографии полученной культуры остеокластов, клетки имеют большое количество ядер (окраска Гематоксилином по Джилс (Gill's Hematoxylin)), форма клеток неправильная овальная или полигональная, иногда имеет отростки, которые постепенно сливаются с общим фоном. В силу функциональных особенностей остеокластов (деградация костной ткани) клетки могут содержать лизосомальные пузырьки.

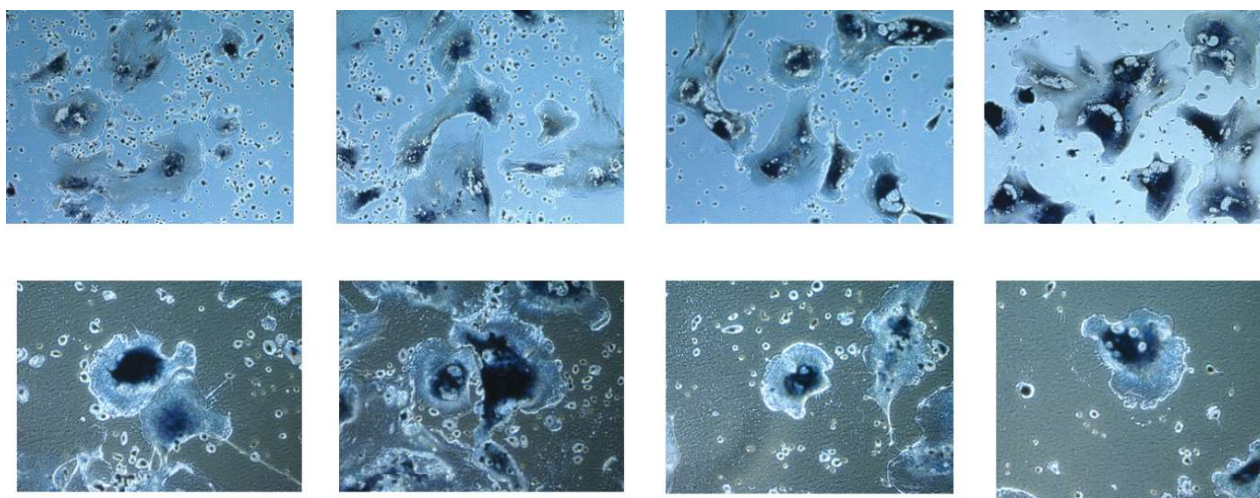


Рисунок 8 – Фазово-контрастные снимки остеокластов, окрашенных по методу TRAP. Верхний ряд – Об. x10; нижний ряд – Об. x20

Для оценки влияния полимера на активность остеокластов проводили оценку Pit Assay. На рисунке 9 показаны микрофотографии, на которых более светлые участки (указаны стрелками) являются участками резорбированного макрофагами вещества, имитирующего костную ткань (OsteoPlates, Corning). Поверхность светлых участков измеряли с помощью программного обеспечения Fiji и рассчитывали процент от общей площади микрофотографии.

На Рисунке 10 показаны данные количественного анализа площади резорбции. В качестве референтного вещества брали коммерческий препарат, содержащий алендронат. Из представленных данных видно, что в контрольной группе процент площади резорбции составил 26%. Полимер в концентрации 0,5 мг/мл уменьшает фагоцитарную активность макрофагов на 50%, а в концентрации 2мг/мл почти на 85% и имеет схожий эффект с алендронатом в концентрации 4мг/мл. Таким образом, результаты проведенного количественного анализа соот-

ветствуют ожидаемым и показывают, что концентрация полимера обратно пропорциональна площади резорбированной поверхности. Чем выше концентрация остеофильного полимера, тем активнее ингибируется фермент фанезил пирофосфатаза, который имеет ключевое значение в метаболизме остеокластов.

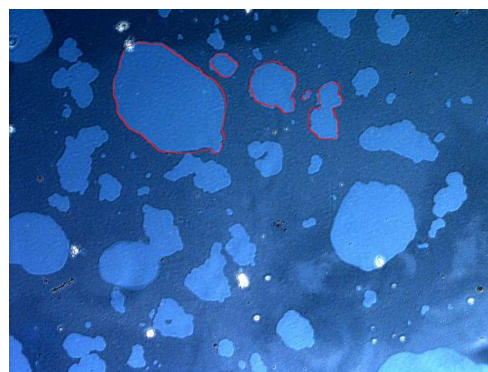


Рисунок 9 – Окрашивание Pit Assay по методу Ван Косса. Об. x10. Красными стрелками указаны места резорбции коллагенового покрытия, имитирующего костную ткань

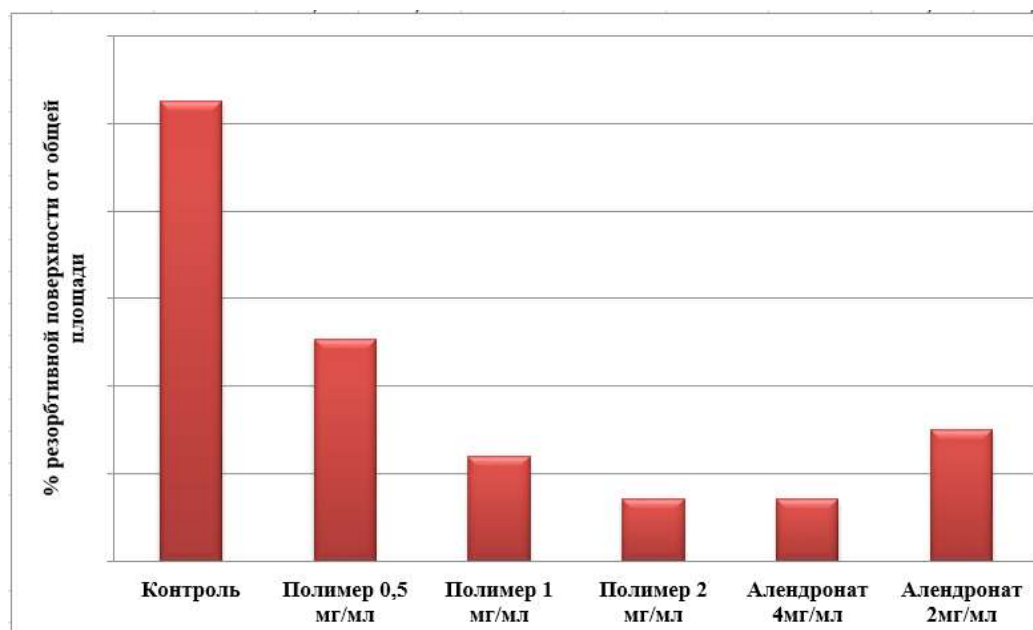


Рисунок 10 – Количественный анализ резорбтивной поверхности от общей площади ( $p \leq 0.001$ , one-way ANOVA)

### Заключение

В результате проведенных исследований были выделены адипозные мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани крыс и проведена оценка чистоты полученной популяции AT-MSCs. Было показано, что свежеизолированная стромальная фракция жировой ткани крыс представлена гетерогенной клеточной популяцией, содержащей гемапоэтические клетки, клетки – предшественники эндотелиоцитов и мезенхимальные стволовые клетки. В результате сортировки CD105 – положительных клеток из гетерогенной популяции для дальнейших исследований была получена гомогенная клеточная культура AT-MSCs.

Было изучено влияние остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию AT-MSCs, выделенных из жировой ткани крыс. Согласно полученным данным полимер не является цитотоксичным и не оказывает

влияния на скорость пролиферации AT-MSCs *in vitro*.

Было изучено влияние полимера на остеогенную дифференцировку AT-MSCs *in vitro*. Результаты проведенного исследования показали, что поверхностная модификация AT-MSCs полимером не влияет на процессы их остеогенной дифференцировки.

Была изучена способность полимера ингибировать активность остеокластов *in vitro*. Было показано, что остеофильный полимер ингибирует фагоцитарную активность остеокластов прямо пропорционально своей концентрации и на уровне, превосходящем активность референтного вещества алендроната.

По результатам исследований, AT-MSCs, функционализированные остеофильным полимером, могут быть использованы для дальнейших экспериментов на лабораторных животных с целью оценки эффективности стимуляции репаративного остеогенеза при остеопорозе *in vivo*.

### Литература

- 1 Hernlund E., Svedbom A., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., McCloskey E.V., Jönsson B., Kanis J.A. 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. – Vol. 8, № 1-2. – P. 136.
- 2 JA K. WHO Technical Report. – University of Sheffield, UK, 2007. – 66.
- 3 Gullberg B., Johnell O., Kanis J.A. World-wide projections for hip fracture // Osteoporos Int. – 1997. – Vol. 7, № 5. – P. 407-413.

- 4 Johnell O., Kanis J.A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures // *Osteoporos Int.* -2006. -Vol. 17, № 12. – P. 1726-1733.
- 5 Giannoudis P., Tzioupis C., Almallki T., Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective // *Injury.* -2007. -Vol. 38 Suppl 1. – P. S90-99.
- 6 Bone H.G., Hosking D., Devogelaer J.P., Tucci J.R., Emkey R.D., Tonino R.P., Rodriguez-Portales J.A., Downs R.W., Gupta J., Santora A.C., Liberman U.A. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women // *N Engl J Med.* – 2004. – Vol. 350, № 12. – P. 1189-1199.
- 7 Cranney A., Wells G., Willan A., Griffith L., Zytaruk N., Robinson V., Black D., Adachi J., Shea B., Tugwell P., Guyatt G. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women // *Endocr Rev.* -2002. -Vol. 23, № 4. – P. 508-516.
- 8 Wells G., Cranney A., Peterson J., Boucher M., Shea B., Robinson V., Coyle D., Tugwell P. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women // *Cochrane Database Syst Rev.* -2008. № 1. – P. Cd004523.
- 9 Drake M.T., Clarke B.L., Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice // *Mayo Clinic proceedings.* -2008. -Vol. 83, № 9. – P. 1032-1045.
- 10 Teitelbaum S.L. Stem cells and osteoporosis therapy // *Cell stem cell.* -2010. -Vol. 7, № 5. – P. 553-554.
- 11 Cho S.W., Sun H.J., Yang J.Y., Jung J.Y., An J.H., Cho H.Y., Choi H.J., Kim S.W., Kim S.Y., Kim D., Shin C.S. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice // *Mol Ther.* -2009. – Vol. 17, № 11. – P. 1979-1987.
- 12 Agacayak S., Gulsun B., Ucan M.C., Karaoz E., Nergiz Y. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2012. – Vol. 16.
- 13 Breitbart E.A., Meade S., Azad V., Yeh S., Al-Zube L., Lee Y.S. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus // *J Orthop Res.* – 2010. – Vol. 28.
- 14 Chen K.Y., Dong G.C., Hsu C.Y., Chen Y.S., Yao C.H. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *Drynaria fortunei* extract for bone repair // *J Biomed Mater Res A.* – 2013. – Vol. 101.
- 15 Granero-Molto F., Weis J.A., Miga M.I., Landis B., Myers T.J., O'Rear L. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27.
- 16 Ito H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources // *Mod Rheumatol.* -2011. -Vol. 21.
- 17 Pak J., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Lee S.H. Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: current insights // *Open Access J Sports Med.* – 2017. – Vol. 8. – P. 33-38.
- 18 Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 344.
- 19 Shao J., Zhang W., Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing // *Biological Research.* – 2015. – Vol. 48, № 1. – P. 1-7.
- 20 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. – Vol. 10.
- 21 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. – Vol. 22.
- 22 Voss P.J., Matsumoto A., Alvarado E., Schmelzeisen R., Duttchenhofer F., Poxleitner P. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells // *Odontology.* -2017.
- 23 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. – Vol. 24, № 12. – P. 2643-2655.
- 24 Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nature medicine.* – 1999. – Vol. 5, № 3. – P. 309-313.
- 25 Cancedda R., Bianchi G., Derubeis A., Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status // *Stem cells.* – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 610-619.
- 26 Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L., Koo W.W., Fitzpatrick L.A., Neel M.D., McCarville M.E., Orchard P.J., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 5. – P. 1227-1231.
- 27 Gangji V., Hauzeur J.P. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique // *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* – 2005. – Vol. 87 Suppl 1, № Pt 1. – P. 106-112.
- 28 Onishi K., Jones D.L., Riester S.M., Lewallen E.A., Lewallen D.G., Sellon J.L., Dietz A.B., Qu W., van Wijnen A.J., Smith J. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Remain Viable and Metabolically Active Following Needle Passage // *Pm r.* – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 844-854.
- 29 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. – Vol. 8, № 3. – P. 73-87.
- 30 Schrepfer S., Deuse T., Reichenspurner H., Fischbein M.P., Robbins R.C., Pelletier M.P. Stem cell transplantation: the lung barrier // *Transplantation proceedings.* – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 573-576.

- 31 Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., Monzon-Posadas W.O., Xue H., Savitz S.I., Laine G.A., Cox C.S., Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect // *Stem cells and development*. – 2009. – Vol. 18, № 5. – P. 683-692.
- 32 Eggenhofer E., Benseler V., Kroemer A., Popp F.C., Geissler E.K., Schlitt H.J., Baan C.C., Dahlke M.H., Hoogduijn M.J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion // *Frontiers in immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 297.
- 33 Kurtz A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate // *International journal of stem cells*. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 1-7.
- 34 Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula V.L., Weil M., Andreeff M., Marini F.C. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging // *Stem cells*. – 2009. – Vol. 27, № 10. – P. 2614-2623.
- 35 Sarkar D., Spencer J.A., Phillips J.A., Zhao W., Schafer S., Spelke D.P., Mortensen L.J., Ruiz J.P., Vemula P.K., Sridharan R., Kumar S., Karnik R., Lin C.P., Karp J.M. Engineered cell homing // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 25. – P. e184-191.
- 36 Guan M., Yao W., Liu R., Lam K.S., Nolte J., Jia J., Panganiban B., Meng L., Zhou P., Shahnazari M., Ritchie R.O., Lane N.E. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 456-462.
- 37 Yao W., Lane N.E. Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone // *Bone*. – 2015. – Vol. 70. – P. 62-65.
- 38 D'Souza S., Murata H., Jose M.V., Askarova S., Yantsen Y., Andersen J.D., Edington C.D., Clafshenkel W.P., Koepsel R.R., Russell A.J. Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using ATRP synthesis for bone targeting // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, № 35. – P. 9447-9458.
- 39 Arana M., Mazo M., Aranda P., Pelacho B., Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization // *Methods in molecular biology*. – 2013. – Vol. 1036. – P. 47-61.
- 40 Tevlin R., McArdle A., Chan C.K.F., Pluvinage J., Walmsley G.G., Wearda T., Marecic O., Hu M.S., Paik K.J., Senarath-Yapa K., Atashroo D.A., Zielins E.R., Wan D.C., Weissman I.L., Longaker M.T. Osteoclast Derivation from Mouse Bone Marrow // *Jove-Journal of Visualized Experiments*. – 2014. № 93.
- 41 Martins C.A., Leyhausen G., Volk J., Geurtsen W. Effects of Alendronate on Osteoclast Formation and Activity In Vitro // *Journal of Endodontics*. – 2015. – Vol. 41, № 1. – P. 45-49.

#### References

- 1 Agacayak S, B Gulsun, MC Ucan, E Karaoz, Y Nergiz (2012) Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* vol. 16.
- 2 Arana M, M Mazo, P Aranda, B Pelacho, F Prosper (2013) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol* vol. 1036, pp. 47-61.
- 3 Bone HG, D Hosking, JP Devogelaer, JR Tucci, RD Emkey, RP Tonino, JA Rodriguez-Portales, RW Downs, J Gupta, AC Santora, UA Liberman (2004) Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* vol. 350, pp. 1189-1199.
- 4 Breitbart EA, S Meade, V Azad, S Yeh, L Al-Zube, YS Lee (2010) Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus. *J Orthop Res* vol. 28.
- 5 Cancedda R, G Bianchi, A Derubeis, R Quarto (2003) Cell therapy for bone disease: A review of current status. *Stem Cells* vol. 21, pp. 610-619.
- 6 Chen KY, GC Dong, CY Hsu, YS Chen, CH Yao (2013) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *drynaria fortunei* extract for bone repair. *J Biomed Mater Res A* vol. 101.
- 7 Cho SW, HJ Sun, JY Yang, JY Jung, JH An, HY Cho, HJ Choi, SW Kim, SY Kim, D Kim, CS Shin (2009) Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing rank-fc or cxcr4 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 17, pp. 1979-1987.
- 8 Cranney A, G Wells, A Willan, L Griffith, N Zytaruk, V Robinson, D Black, J Adachi, B Shea, P Tugwell, G Guyatt (2002) Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocrine reviews* vol. 23, pp. 508-516.
- 9 D'Souza S, H Murata, MV Jose, S Askarova, Y Yantsen, JD Andersen, CD Edington, WP Clafshenkel, RR Koepsel, AJ Russell (2014) Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using atrp synthesis for bone targeting. *Biomaterials* vol. 35, pp. 9447-9458.
- 10 De Becker A, IV Riet (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* vol. 8, pp. 73-87.
- 11 Drake MT, BL Clarke, S Khosla (2008) Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* vol. 83, pp. 1032-1045.
- 12 Eggenhofer E, V Benseler, A Kroemer, FC Popp, EK Geissler, HJ Schlitt, CC Baan, MH Dahlke, MJ Hoogduijn (2012) Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* vol. 3, pp. 297.
- 13 Fischer UM, MT Harting, F Jimenez, WO Monzon-Posadas, H Xue, SI Savitz, GA Laine, CS Cox, Jr. (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* vol. 18, pp. 683-692.
- 14 Gangji V, JP Hauzeur (2005) Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *Surgical technique. J Bone Joint Surg Am* vol. 87 Suppl 1, pp. 106-112.

- 15 Giannoudis P, C Tzioupis, T Almalki, R Buckley (2007) Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective. *Injury* vol. 38 Suppl 1, pp. S90-99.
- 16 Granero-Molto F, JA Weis, MI Miga, B Landis, TJ Myers, L O'Rear (2009) Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* vol. 27.
- 17 Guan M, W Yao, R Liu, KS Lam, J Nolta, J Jia, B Panganiban, L Meng, P Zhou, M Shahnazari, RO Ritchie, NE Lane (2012) Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nat Med* vol. 18, pp. 456-462.
- 18 Gullberg B, O Johnell, JA Kanis (1997) World-wide projections for hip fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* vol. 7, pp. 407-413.
- 19 Hernlund E, A Svedbom, M Ivergård, J Compston, C Cooper, J Stenmark, EV McCloskey, B Jönsson, JA Kanis (2013) 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* vol. 8, pp. 136.
- 20 Horwitz EM, DJ Prockop, LA Fitzpatrick, WW Koo, PL Gordon, M Neel, M Sussman, P Orchard, JC Marx, RE Pyeritz, MK Brenner (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* vol. 5, pp. 309-313.
- 21 Horwitz EM, DJ Prockop, PL Gordon, WW Koo, LA Fitzpatrick, MD Neel, ME McCarville, PJ Orchard, RE Pyeritz, MK Brenner (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* vol. 97, pp. 1227-1231.
- 22 Huang S, L Xu, Y Zhang, Y Sun, G Li (2015) Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant* vol. 24, pp. 2643-2655.
- 23 Ito H (2011) Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: A novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol* vol. 21.
- 24 JA K. 2007. Who technical report. University of Sheffield, UK.
- 25 Johnell O, JA Kanis (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* vol. 17, pp. 1726-1733.
- 26 Kidd S, E Spaeth, JL Dembinski, M Dietrich, K Watson, A Klopp, VL Battula, M Weil, M Andreeff, FC Marini (2009) Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* vol. 27, pp. 2614-2623.
- 27 Kurtz A (2008) Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int J Stem Cells* vol. 1, pp. 1-7.
- 28 Martins CA, G Leyhausen, J Volk, W Geurtsen (2015) Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *J Endodont* vol. 41, pp. 45-49.
- 29 Onishi K, DL Jones, SM Riestler, EA Lewallen, DG Lewallen, JL Sellon, AB Dietz, W Qu, AJ van Wijnen, J Smith (2016) Human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells remain viable and metabolically active following needle passage. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* vol. 8, pp. 844-854.
- 30 Pak J, JH Lee, KS Park, JH Jeon, SH Lee (2017) Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: Current insights. *Open access journal of sports medicine* vol. 8, pp. 33-38.
- 31 Quarto R, M Mastrogiacomo, R Cancedda, SM Kutevov, V Mukhachev, A Lavroukov (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* vol. 344.
- 32 Sarkar D, JA Spencer, JA Phillips, W Zhao, S Schafer, DP Spelke, LJ Mortensen, JP Ruiz, PK Vemula, R Sridharan, S Kumar, R Karnik, CP Lin, JM Karp (2011) Engineered cell homing. *Blood* vol. 118, pp. e184-191.
- 33 Schrepfer S, T Deuse, H Reichenspurner, MP Fischbein, RC Robbins, MP Pelletier (2007) Stem cell transplantation: The lung barrier. *Transplant Proc* vol. 39, pp. 573-576.
- 34 Shao J, W Zhang, T Yang (2015) Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biological Research* vol. 48, pp. 1-7.
- 35 Singh J, JO Onimowo, WS Khan (2014) Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: A review of the current trend. *Curr Stem Cell Res Ther* vol. 10.
- 36 Tasso R, V Ulivi, D Reverberi, SC Lo, F Descalzi, R Cancedda (2013) 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* vol. 22.
- 37 Teitelbaum SL (2010) Stem cells and osteoporosis therapy. *Cell Stem Cell* vol. 7, pp. 553-554.
- 38 Tevlin R, A McArdle, CKF Chan, J Pluvinae, GG Walmsley, T Wearda, O Marecic, MS Hu, KJ Paik, K Senarath-Yapa, DA Atashroo, ER Zielins, DC Wan, IL Weissman, MT Longaker (2014) Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *Jove-J Vis Exp* vol.
- 39 Voss PJ, A Matsumoto, E Alvarado, R Schmelzeisen, F Duttonhofer, P Poxleitner (2017) Treatment of stage ii medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology* vol.
- 40 Wells G, A Cranney, J Peterson, M Boucher, B Shea, V Robinson, D Coyle, P Tugwell (2008) Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews* vol., pp. Cd004523.
- 41 Yao W, NE Lane (2015) Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone. *Bone* vol. 70, pp. 62-65.