

УДК 617.3-089.816:[611.018.1"712.4":611.013.395](045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872025156-64>

## Критерії якості біотехнологічних продуктів на основі аутологічного аспірата кісткового мозку для застосування в травматології та ортопедії

С. С. Страфун<sup>1</sup>, Є. Л. Голюк<sup>1</sup>, Д. О. Зубов<sup>1</sup>,  
О. М. Магомедов<sup>1</sup>, Г. С. Стародуб<sup>2</sup>, Х. К. Малова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ

<sup>2</sup> ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології НАМН України», Київ

<sup>3</sup> Міська клінічна лікарня № 9, Київ, Україна

*Autologous biotechnological products based on bone marrow (BM) are a source of stem cells, in particular, hematopoietic and multipotent mesenchymal stromal cells, and act as one of the alternative therapeutic agents that can slow cartilage degeneration, improve its repair and, ultimately, prevent joint replacement. Objective. To develop quality and safety criteria of minimally manipulated biotechnological products from autologous bone marrow for use in patients with pathology of the musculoskeletal system. Methods. The material for the development of quality and safety criteria for the manufacture and use of biotechnological products from autologous red bone marrow aspirate was 85 patients with osteoarthritis and aseptic necrosis of the hip and knee joints, who used biotechnological products made from it. Cell counts in the myelogram and CFU-analysis of MMSK-BM were performed in all patients. Results. As a result of the development of quality and safety criteria for biotechnological products from BM aspirate, 3 types of it were established: 1 — polymorphic (with the presence of progenitor cells of all types within the normal range), 2 — moderately cellular (with the presence of all types of progenitor cells, but some of them below the norm), 3 — hypocellular (with the presence of most types of progenitor cells, some of them below the norm). Functional quality criteria of biotechnological products from BM aspirate were developed on the basis of CFU-analysis and calculation of seeding efficiency coefficient (KEP) of MMSK-BM. Conclusions. Quality and safety criteria of biotechnological products based on autologous bone marrow aspirate based on the results of myelograms and CFU analysis have been established. According to the results of myelograms, type 1 BM aspirate was evaluated as excellent for the further manufacture of a biotechnological product, type 2 — good, type 3 — satisfactory. According to the results of the KUOf analysis, the KEP indicator < 0.001 % was evaluated as unsatisfactory, the KEP indicator within the range of 0.001–0.003 % — satisfactory, the KEP indicator > 0.003 % — good. The KEP < 0.001 % — unsuitable for use. Key words. Regenerative orthopedics, regenerative injection therapy, osteoarthritis, avascular necrosis, hip, knee.*

*Аутологічні біотехнологічні продукти на основі кісткового мозку (КМ) є джерелом стовбурових клітин, зокрема гемопоетичних і мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин. Вони являють собою один із альтернативних терапевтичних засобів, який може сповільнити дегенерацію хряща, покращити його репарацію та запобігти ендпротезуванню суглоба. Мета. Розробити критерії якості та безпеки маломаніпульованих біотехнологічних продуктів з аутологічного КМ для застосування в пацієнтів із патологією опорно-рухового апарата. Методи. Для отримання біотехнологічних продуктів використано аспірат червоного кісткового мозку 85 пацієнтів з остеоартрозом та асептичним некрозом кульшового та колінного суглобів. В усіх зразках проводили підрахунок клітин у мієлограмі та КУОф-аналіз мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин кісткового мозку (ММСК-КМ). Результати. Під час розробки зазначених якостей біотехнологічних продуктів з аспірата КМ встановлено 3 його типи: 1 — поліморфний (клітини-попередники усіх типів у межах норми); 2 — помірноклітинний (присутні всі типи клітин-попередників, але деякі з них нижче норми); 3 — гіпоклітинний (із наявністю більшості типів клітин-попередників, деякі з них нижче норми). Розроблено функціональні критерії якості біотехнологічних продуктів з аспірата КМ на підставі КУОф-аналізу й обрахунку коефіцієнта ефективності посіву (КЕП) ММСК-КМ. Висновки. Виявлено критерії якості та безпеки біотехнологічних продуктів на основі аутологічного аспірата КМ за результатами мієлограм та КУОф-аналізу. За результатами мієлограм тип 1 аспірата КМ оцінювали, як відмінний для подальшого виготовлення біотехнологічного продукту, тип 2 — добрий, тип 3 — задовільний. За КУОф-аналізом показник КЕП < 0,001 % визначали як незадовільний, у межах 0,001–0,003 % — задовільний, у разі > 0,003 % — хороший. Аспірат КМ із КЕП < 0,001 % розцінювали непридатним для застосування.*

**Ключові слова.** Регенеративна ортопедія, регенеративна ін'єкційна терапія, остеоартроз, асептичний некроз, кульшовий суглоб, колінний суглоб

## Вступ

Останні досягнення в галузі біотехнологій та регенеративної медицини значно розширили спектр застосування біотехнологічних продуктів, зокрема в травматології та ортопедії. Наразі джерелом клітинних і тканинних продуктів для лікування захворювань і травм опорно-рухового апарата є червоний кістковий мозок (КМ) [1, 2], бо вважається, що він є одним із найбільш доступних джерел мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин (ММСК) у дорослому організмі [3, 4]. Тому обговорення перспектив та ефективності використання біотехнологічних продуктів, отриманих із цих тканинних джерел для лікування остеоартрозу й асептичного некрозу кульшового та колінного суглобів, є досить актуальним питанням. Найчастіше в клінічній практиці на сьогодні застосовуються концентрати з КМ, які містять ММСК [5, 6].

Аутологічні біотехнологічні продукти на основі КМ є джерелом стовбурових клітин, зокрема ГСК і ММСК, та виступають одним з альтернативних терапевтичних засобів, який може сповільнити дегенерацію хряща, покращити його репарацію та, у підсумку, запобігти протезуванню суглоба [7, 8]. ММСК здатні не лише безпосередньо диференціюватися у хондроцити, а й продукують багато біологічно активних речовин, які мають імуномодуляторні та протизапальні ефекти, стимулюють ангиогенез і є індукторами хемотаксису для ендогенних прогеніторів. Завдяки високому проліферативному потенціалу *in vitro*, паракринним ефектам і здатності відновлювати uszkodжену хрящову і кісткову тканину *in vivo*, ММСК розглядають як ефективний інструмент для клітинної терапії патології опорно-рухового апарата. Серед досліджених джерел стовбурових і прогеніторних клітин за доступністю, безпекою й очікуваною терапевтичною ефективністю найбільш перспективними можна вважати саме ММСК червоного кісткового мозку (ММСК-КМ) [7].

Ключовими прогностичними характеристиками терапевтичної ефективності біотехнологічних продуктів на основі КМ для регенеративної ортопедії є показники клітинності та співвідношення клітинних типів у мієлограмі (гемопоетичні клітини) та під час проведення КУОф-аналізу стромальних клітин (ММСК-КМ).

**Мета:** розробити критерії якості та безпеки маломаніпульованих біотехнологічних продуктів з аутологічного кісткового мозку для застосу-

вання у пацієнтів з патологією опорно-рухового апарата.

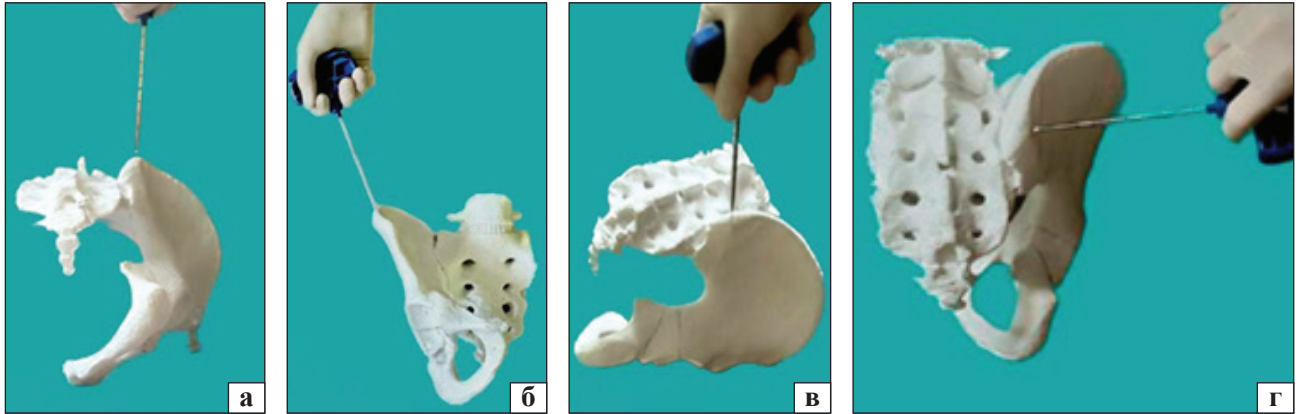
## Матеріал і методи

Дослідження проводилося на базі відділення тканинної та клітинної терапії ДУ «ІТО НАМН України» в період з 2021 по 2024 роки. В усіх пацієнтів перед проведенням дослідження та лікування було отримано інформовану згоду. Роботу виконували з дотриманням принципів біоетики (протокол № 1 засідання комітету з біоетики ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України від 11 січня 2021 року).

Під час дослідження використано аспірат червоного кісткового мозку 85 пацієнтів з остеоартрозом та асептичним некрозом кульшового та колінного суглобів, яким у подальшому виготовлялися біотехнологічні продукти з нього. Аспірат КМ 71 особи застосовано для підрахунку клітин у мієлограмі, а 14 пацієнтів — для КУОф-аналізу ММСК-КМ. Ми проводили виділення червоного кісткового мозку з гребня клубової кістки. Відповідно до літературних джерел ця локалізація переважає інші можливі за кількістю отриманих клітин-попередників порівняно з великоомілковою та п'ятковою кістками [9].

Ми використовували три доступи для аспірації КМ (рис. 1): передній паралельний (через крило клубової кістки) (рис. 1, а), задній паралельний (паралельно до задньої верхньої ості клубової кістки) (рис. 1, б, в) і задній перпендикулярний (перпендикулярно до задньої верхньої осі клубової кістки) (рис. 1, г).

Аспірацію виконували троакаром 11G довжиною 100 або 150 мм, попередньо промивши його просвіт невеликою кількістю гепарину. Після місцевої анестезії, вручну помістивши канюлю в гребінь клубової кістки, обертаючи її за та проти годинникової стрілки, одночасно застосовували осьову силу або притискали троакар до кістки, проштовхуючи канюлю через кірковий шар. Після його проходження, відчували певне полегшення руху троакару, потім заглиблювалися в спонгіозний шар клубової кістки ще на 0,5 см. Упевнившись у стабільному положенні троакару в товщі кістки, під'єднували шприц Luer-Lock, потім обережно тягнули його поршень на себе, без значних зусиль і переконалися в наявності аспірації кісткового мозку у його просвіті. З'ясувавши його наявність, подальший забір слід виконувати повільно, оскільки значні зусилля під час аспірації посилять больовий синдром у пацієнта.



**Рисунок.** Доступи до тазової кістки для забору аспірата КМ: а) передній паралельний; б), в) задній паралельний; г) задній перпендикулярний

Таблиця 1

**Приклад мієлограми пацієнта Г., аспірат якого непридатний для подальшого виготовлення біотехнологічного продукту**

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Ретикулярні клітини		—	0,1–1,6
Бласти, що не піддаються морфологічній диференціації		—	0,1–1,1
Мієлобласти		0	0,2–1,7
Нейтрофільні гранулоцити	Промієлоцити	0,2	1,0–4,1
	Мієлоцити	1,4	7,0–12,2
	Метамієлоцити	0,8	8,0–15,0
	Паличкоядерні	4,0	12,8–23,7
	Сегментоядерні	52,0	13,1–24,1
Еозинофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,5–5,8
	Мієлоцити	—	0,5–5,8
	Метамієлоцити	0,6	0,5–5,8
	Паличкоядерні	—	0,5–5,8
	Сегментоядерні	—	0,5–5,8
Базофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,0–0,5
	Мієлоцити	—	0,0–0,5
	Метамієлоцити	0,2	0,0–0,5
	Паличкоядерні	—	0,0–0,5
	Сегментоядерні	—	0,0–0,5
Елементи еритропоезу:			
– еритробласти		0	0,2–1,1
– пронормоцити		0,2	0,1–1,2
– нормоцити базофільні		2,2	1,4–4,6

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Нормоцити поліхроматофільні		7,2	8,9–16,9
Нормоцити оксифільні		0	0,8–5,6
Промегалобласти		—	—
Мегалобласти базофільні		—	—
Мегалобласти поліхроматофільні		—	—
Мегалобласти оксифільні		—	—
Елементи лімфопоезу:			
– лімфоцити		22,4	4,3–13,7
– плазмоцити		0,2	0,1–1,8
Елементи моноцитопоезу:			
– моноцити		8,6	0,7–3,1
– мітози елементів білого ростка		—	2 : 500
– мітози елементів червоного ростка		—	3 : 500
Індекси кісткового мозку:			
– лейко:еритро		9,4 : 1,0	3,5–4 : 1,0
– визрівання нейтрофілів		0,04	0,6–0,8
– визрівання еритрокаріоцитів		0,8	0,8–0,9

Забір кісткового мозку з однієї зони призводить до зниження кількості мезенхімальних стовбурових клітин через розведення периферичною кров'ю, тому після наповнення 2–3 шприців ми змінювали глибину забору. Отримували 100 мл аспірата для виділення однієї дози мононуклеар-

ної фракції. Для отримання кількох доз, проводили забір із кількох доступів. За потреби використовували для навігації УЗД або С-дугу.

Після завершення процедури забору аспірата КМ рекомендували пацієнту перебувати у горизонтальному положенні протягом 30 хв.

Таблиця 2

## Приклад мієлограми типу 1 пацієнтки С.

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Ретикулярні клітини		—	0,1–1,6
Бласти, що не піддаються морфологічній диференціації		—	0,1–1,1
Мієлобласти		0	0,2–1,7
Нейтрофільні гранулоцити	Промієлоцити	1,2	1,0–4,1
	Мієлоцити	10,4	7,0–12,2
	Метамієлоцити	6,0	8,0–15,0
	Паличкоядерні	15,2	12,8–23,7
	Сегментоядерні	26,4	13,1–24,1
Еозинофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,5–5,8
	Мієлоцити	—	0,5–5,8
	Метамієлоцити	0,4	0,5–5,8
	Паличкоядерні	—	0,5–5,8
	Сегментоядерні	—	0,5–5,8
Базофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,0–0,5
	Мієлоцити	—	0,0–0,5
	Метамієлоцити	0,4	0,0–0,5
	Паличкоядерні	—	0,0–0,5
	Сегментоядерні	—	0,0–0,5
Елементи еритропоезу:			
– еритробласти	0,4	0,2–1,1	
– пронормоцити	0,4	0,1–1,2	
– нормоцити базофільні	3,2	1,4–4,6	

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Нормоцити поліхроматофільні		9,6	8,9–16,9
Нормоцити оксифільні		6,4	0,8–5,6
Промегалобласти		—	—
Мегалобласти базофільні		—	—
Мегалобласти поліхроматофільні		—	—
Мегалобласти оксифільні		—	—
Елементи лімфопоезу:			
– лімфоцити	15,6	4,3–13,7	
– плазмоцити	0,4	0,1–1,8	
Елементи моноцитопоезу:			
– моноцити	4,0	0,7–3,1	
– мітози елементів білого ростка		—	2 : 500
– мітози елементів червоного ростка		—	3 : 500
Індекси кісткового мозку:			
– лейко:еритро	4,0 : 1,0	3,5–4 : 1,0	
– визрівання нейтрофілів	0,4	0,6–0,8	
– визрівання еритрокаріоцитів	0,8	0,8–0,9	

#### Виготовлення мазка аспірата кісткового мозку для підрахунку клітинного складу

Взявши предметне скло за довгі краї, торкалися його поверхнею (відступивши 0,5–1 см від вузького краю) до краплі аспірата (але не до шкіри). Крапля повинна бути невеликого розміру, і її треба розмістити так, щоб весь мазок містився на склі, не доходячи 1–1,5 см до його краю. Його фіксація відбувалася за Май-Грюнвальдом [10]. Забарвлювали мазок аспірата КМ за Романовським: фарбували елементи клітин у різні кольори і відтінки сумішшю основних (азур II) і кислих (водорозчинний жовтий еозин) фарб. Фарбування здійснювали готовим розчином фарби Романовського протягом 40 хв. Після повного висихання мазок готовий до підрахунку, який здійснювали в клінічно-діагностичній лабораторії комунального неприбуткового підприємства «Київська міська клінічна лікарня № 9». За результатами підрахунку мазків формували мієлограму відповідного зразка аспірата КМ.

#### КУОф-аналіз ММСК-КМ

Гепаринізований (2 од/мл гепарину натрія) аспірат червоного кісткового мозку, відібраний з гребеня клубової кістки, засівали в повне ростове середовище, що містило поживне базове середовище MEM alpha modified (BioWest), 10 % ETC (Sigma- Aldrich), 1 нг/мл bFGF (Sigma-Aldrich), розчин антибіотика-антимікотика (BioWest), 2 од/мл гепарину натрія з розрахунку 5,7 млн ядровмісних клітин аспірата червоного кісткового мозку на велику чашку Петрі діаметром 100 мм (3 чашки з 10 мл повного ростового середовища на кожний зразок кісткового мозку) та культивували протягом 14 діб в CO<sub>2</sub>-інкубаторі за 37 °C та в 5 % атмосфері вуглекисню і 96 % вологості. Зміну ростового середовища в чашках проводили кожну третю добу. Після 14 діб культивування чашки Петрі з колоніями (колонієутворюючі одиниці фібробластів, або КУОф) відмивали фосфатно-сольовим буфером та фіксували протягом 20 хв за кімнатної температури розчином забуференого формаліну та фарбували розчином гематоксиліну-еозину. Пофарбовані колонії підраховували.



Таблиця 3

## Приклад мієлограми типу 2 пацієнтки К.

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Ретикулярні клітини		—	0,1–1,6
Бласти, що не піддаються морфологічній диференціації		—	0,1–1,1
Мієлобласти		0,2	0,2–1,7
Нейтрофільні гранулоцити	Промієлоцити	0,6	1,0–4,1
	Мієлоцити	12,8	7,0–12,2
	Метамієлоцити	16,0	8,0–15,0
	Паличкоядерні	8,8	12,8–23,7
	Сегментоядерні	27,2	13,1–24,1
Еозинофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,5–5,8
	Мієлоцити	—	0,5–5,8
	Метамієлоцити	0,6	0,5–5,8
	Паличкоядерні	—	0,5–5,8
	Сегментоядерні	—	0,5–5,8
Базофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,0–0,5
	Мієлоцити	—	0,0–0,5
	Метамієлоцити	0,2	0,0–0,5
	Паличкоядерні	—	0,0–0,5
	Сегментоядерні	—	0,0–0,5
Елементи еритропоєзу:			
– еритробласти		0,2	0,2–1,1
– пронормоцити		0,6	0,1–1,2
– нормоцити базофільні		5,6	1,4–4,6

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Нормоцити поліхроматофільні		9,6	8,9–16,9
Нормоцити оксифільні		0	0,8–5,6
Промегалобласти		—	—
Мегалобласти базофільні		—	—
Мегалобласти поліхроматофільні		—	—
Мегалобласти оксифільні		—	—
Елементи лімфопоєзу:			
– лімфоцити		13,6	4,3–13,7
– плазмоцити		0,2	0,1–1,8
Елементи моноцитопоєзу:			
– моноцити		3,8	0,7–3,1
– мітози елементів білого ростка		—	2 : 500
– мітози елементів червоного ростка		—	3 : 500
Індекси кісткового мозку:			
– лейко:еритро		5,3 : 1,0	3,5–4 : 1,0
– визрівання нейтрофілів		0,8	0,6–0,8
– визрівання еритрокаріоцитів		0,6	0,8–0,9

## Результати

*Морфологічні критерії якості та безпеки аспірата КМ та біотехнологічних продуктів, виготовлених з нього*

За результатами аналізу мієлограм пацієнтів, яким виконувався забір для виготовлення біотехнологічного продукту, усі варіанти аспірованої рідини розділили на 2 типи: аспірат КМ та без ознак наявності КМ. Результати визначення типу аспірата КМ в отриманих 16 зразках — поліморфний, у 26 пробах — помірноклітинний, у 29 — гіпоклітинний.

Під час вивчення аспірованої рідини враховували 2 основні критерії — наявність мегакаріоцитів у мієлограмі, як клітинного маркера кісткового мозку, та показник лейко-еритроцитарного індексу. За відсутності мегакаріоцитів у мієлограмі та лейко-еритроцитарному індексі більше 20 : 1, аспірована рідина не є придатною для подальшого виготовлення біотехнологічного продукту (табл. 1).

Підсумок: пунктат кісткового мозку гіпоклітинний. Мегакаріоцити в препараті відсутні. Ураховуючи наближення клітинного складу кісткового мозку до клітинного складу периферичної крові, відсутність мегакаріоцитів і фрагментів кісткомозкового ретикулуму, не можна виключати значної домішки крові до аспірата.

У свою чергу, аспірат КМ, який отримували під час забору, за результатами аналізу мієлограм розділили на 3 типи. Перший — поліморфний, із наявністю клітин-попередників усіх типів у межах норми. Для такого варіанта аспірата характерна наявність мегакаріоцитів у мієлограмі, лейко-еритроцитарний індекс не перевищує 4 : 1. Приклад мієлограми цього типу аспірата КМ подано в таблиці 2.

Пунктат кісткового мозку помірноклітинний, поліморфний. Розміри еритроциту збережені (20,0 %), із нормальним дозріванням. Гранулоцитарний ряд збережений (59,2 %), переважають зрілі форми гранулоцитів. Мегакаріоцити поодинокі в препараті, вільно розміщені тромбоцити в достатній кількості.

Таблиця 4

## Приклад мієлограми типу 3 пацієнтки С.

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Ретикулярні клітини		—	0,1–1,6
Бласти, що не піддаються морфологічній диференціації		—	0,1–1,1
Мієлобласти		0	0,2–1,7
Нейтрофільні гранулоцити	Промієлоцити	0	1,0–4,1
	Мієлоцити	2,8	7,0–12,2
	Метамієлоцити	1,6	8,0–15,0
	Паличкоядерні	3,6	12,8–23,7
	Сегментоядерні	42,0	13,1–24,1
Еозинофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,5–5,8
	Мієлоцити	—	0,5–5,8
	Метамієлоцити	0,8	0,5–5,8
	Паличкоядерні	—	0,5–5,8
	Сегментоядерні	—	0,5–5,8
Базофільні гранулоцити	Промієлоцити	—	0,0–0,5
	Мієлоцити	—	0,0–0,5
	Метамієлоцити	0,4	0,0–0,5
	Паличкоядерні	—	0,0–0,5
	Сегментоядерні	—	0,0–0,5
Елементи еритропоезу:			
– еритробласти		0	0,2–1,1
– пронормоцити		0	0,1–1,2
– нормоцити базофільні		2,4	1,4–4,6

Клітинний елемент		Результат	Норма (в % за А. І. Воробйовим)
Нормоцити поліхроматофільні		6,4	8,9–16,9
Нормоцити оксифільні		1,2	0,8–5,6
Промегалобласти		—	—
Мегалобласти базофільні		—	—
Мегалобласти поліхроматофільні		—	—
Мегалобласти оксифільні		—	—
Елементи лімфопоезу:			
– лімфоцити		32,0	4,3–13,7
– плазмоцити		0	0,1–1,8
Елементи моноцитопоезу:			
– моноцити		6,4	0,7–3,1
– мітози елементів білого ростка		—	2 : 500
– мітози елементів червоного ростка		—	3 : 500
Індекси кісткового мозку:			
– лейко:еритро		9,0 : 1,0	3,5–4 : 1,0
– визрівання нейтрофілів		0,1	0,6–0,8
– визрівання еритрокаріоцитів		0,8	0,8–0,9

Тип 2 — помірноклітинний (із наявністю усіх типів клітин-попередників, але деякі з них нижче норми). Для цього варіанта аспірата характерна наявність мегакаріоцитів у мієлограмі, лейкоеритроцитарний індекс складає (5 : 1)–(10 : 1).

Приклад мієлограми такого типу аспірата КМ наведено в таблиці 3.

Отже, пунктат кісткового мозку помірноклітинний. Розміри еритрона збережені, ближче до нижньої межі норми, із затримкою дозрівання на молодих формах. Гранулоцитарний ряд збережений, із нормальним дозріванням. Мегакаріоцити поодинокі в препараті.

Тип 3 — гіпоклітинний, із наявністю більшості типів клітин-попередників, деякі з них нижче норми. Для цього варіанта аспірата характерна наявність мегакаріоцитів у мієлограмі, лейкоеритроцитарний індекс складає (10 : 1)–(20 : 1).

Приклад мієлограми такого типу аспірата КМ подано в таблиці 4.

Виявлено, що клітинність пунктату кісткового мозку знижена. Наведено клітини всіх паростків гемопоезу на різних етапах дозрівання.

Тип 1 аспірата КМ оцінювали, як відмінний для подальшого виготовлення біотехнологічного продукту, тип 2 — добрий, тип 3 — задовільний.

*Функціональні критерії якості аспірата КМ та біотехнологічних продуктів, виготовлених із нього*

На сьогодні КУОф-аналіз вважається одним із «золотих стандартів» для визначення частоти клоногенних ММСК-КМ. За результатами аналізу культивування ядровмісних клітин аспірата КМ підраховували кількість колоній у трьох пробах та визначали середній показник для кожного пацієнта. Розраховували коефіцієнт ефективності посіву (відсоток ММСК серед усіх ядровмісних клітин) за наступною формулою: КЕП (коефіцієнт ефективності посіву) = середня кількість колоній у трьох пробах кожного хворого \* 100 % / 5,7 млн (кількість ядровмісних клітин на 1 велику чашку Петрі). Результати визначення ефективності посіву наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

## Визначення ефективності посіву ядромісних клітин аспірата КМ

№ пацієнта	Кількість ядромісних клітин у 5 мл зразку аспірата КМ (млн)	Кількість колоній (КУО) ядромісних клітин (ЯВК) у трьох зразках	Середня кількість колоній ЯВК	КЕП (%)
1	145,0	246	199,00	0,0035
		163		
		188		
2	230,0	203	195,00	0,0034
		157		
		225		
3	79,5	345	336,70	0,0059
		298		
		367		
4	247,0	203	205,33	0,0036
		211		
		202		
5	83,0	139	127,67	0,0022
		126		
		118		
6	242,0	263	209,67	0,0037
		235		
		131		
7	150,0	104	94,66	0,0017
		117		
		63		
8	281,0	289	264,00	0,0046
		271		
		232		
9	77,0	55	78,33	0,0013
		77		
		103		
10	191,0	96	106,33	0,0019
		122		
		101		
11	316,0	88	85,00	0,0015
		87		
		80		
12	86,0	38	24,33	0,004
		24		
		11		
13	106,0	99	121,67	0,0020
		117		
		149		
14	167,0	129	165,67	0,0030
		158		
		210		

Вважали незадовільним показник КЕП  $< 0,001$  %, у межах  $0,001$ – $0,003$  % — задовільним, у разі  $> 0,003$  % — хорошим. Таким чином, аспірат КМ із КЕП  $< 0,001$  % розцінювали як такий, що є непридатним для застосування в якості біотехнологічного продукту. Оптимальним для використання є аспірат КМ із КЕП  $> 0,003$  % (тобто більше 3 клональних колоній ММСК на  $1 \times 10^5$  ЯСК аспірата КМ).

## Обговорення

На сьогодні аутологічний аспірат кісткового мозку все ширше використовується для лікування пацієнтів ортопедо-травматологічного профілю, зокрема за умов остеоартрозу й асептичного некрозу [11, 12]. Літературні джерела описують лікування аутологічним концентрованим аспіратом КМ здебільшого як «терапію стовбуровими клітинами» [13, 14]. Проте слід зазначити, що він містить різні типи клітин, більшість з яких належать до гемопоетичних ліній, а не мезенхімальних. Проведене нами дослідження також підтверджує цей факт. Ми, як і інші дослідники, виявили лише незначний відсоток мезенхімальних стовбурових клітин в аспіраті кісткового мозку [15, 16]. Цей факт засвідчує про доцільність детальнішого підходу до термінології біотехнологічних продуктів. Говорити про лікування мезенхімальними стовбуровими клітинами можна лише у випадку, якщо вони були виділені з аспірата кісткового мозку та культивовані *in vitro*.

У разі застосування аспірата КМ та його похідних (концентрований аспірат КМ, моноклеарна фракція аспірата КМ) доцільніше вживати термін «регенеративна терапія», оскільки найкращим поясненням позитивного впливу біотехнологічних продуктів із аспірата кісткового мозку є паракринний ефект отриманого клітинного концентрату за рахунок факторів росту, які він містить [17].

## Висновки

У результаті розробки критеріїв якості та безпеки біотехнологічних продуктів з аспірата кісткового мозку встановлено 3 його типи: 1 — поліморфний (із наявністю клітин-попередників усіх типів у межах норми); 2 — помірноклітинний (присутні усі типи клітин-попередників, але деякі з них нижче норми); 3 — гіпоклітинний (більшість типів клітин-попередників, деякі з них нижче норми). Тип 1 аспірата кісткового мозку оцінювали, як відмінний для подальшого виго-

товлення біотехнологічного продукту, тип 2 — добрий, тип 3 — задовільний.

Для визначення функціональних критеріїв якості біотехнологічних продуктів із аспірата КМ використовували КУОФ-аналіз та коефіцієнт ефективності посіву ММСК-КМ. За показника КЕП  $< 0,001$  % він незадовільний, у межах  $0,001$ – $0,003$  % оцінювали, як задовільний, у разі  $> 0,003$  % — як хороший. Аспірат КМ із КЕП  $< 0,001$  % є непридатним до застосування.

Встановлено, що мезенхімальні стовбурові клітини складають незначну популяцію в аспіраті кісткового мозку, а клінічний вплив біотехнологічних продуктів, виготовлених з аспірата кісткового мозку ймовірно відбувається за рахунок гемопоетичних клітин-попередників.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідження культивованих аутологічних та алогенних біотехнологічних продуктів кісткового мозку, розробка їх критеріїв якості та безпеки, розробка диференційованого та персоналізованого підходу до застосування мінімально маніпульованих і культивованих біотехнологічних продуктів у пацієнтів ортопедо-травматологічного профілю

**Інформація про фінансування.** Фінансування досліджень, результати яких опубліковані в статті, відбувалося в межах НДР «Розробити та експериментально дослідити регенеративні технології за остеоартрозу та асептичного некрозу кульшового та колінного суглобів» (№ держреєстрації 0122U000200).

**Внесок авторів.** Страфун С. С. — визначення напрямів дослідження, оформлення висновків; Голюк Є. Л. — аналіз результатів дослідження, написання статті; Зубов Д. О. — дослідження функціональних критеріїв якості аспірата кісткового мозку та біотехнологічних продуктів, виготовлених із нього, КУОФ-аналіз мультипотентних мезенхімальних стовбурових/стромальних клітини; Магомедов С. — обробка та виготовлення мазків аспірата кісткового мозку для підрахунку клітинного складу; Стародуб Г. С. — аналіз мієлограм пацієнтів; Малова Х. К. — підрахунок клітин у мієлограмах пацієнтів.

## Список літератури

1. Eder, C., Schmidt-Bleek, K., Geissler, S., Sass, F. A., Maleitzke, T., Pumberger, M., Perka, C., Duda, G. N., & Winkler, T. (2020). Mesenchymal stromal cell and bone marrow concentrate therapies for musculoskeletal indications: A concise review of current literature. *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4789–4814. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05428-0>
2. Deng, Z., Luo, F., Lin, Y., Luo, J., Ke, D., Song, C., & Xu, J. (2022). Research trends of mesenchymal stem cells application in orthopedics: A bibliometric analysis of the past 2 decades. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1021818>
3. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., & Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), 1402–1416. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.003>
4. Xia, P., Wang, X., Lin, Q., & Li, X. (2015). Efficacy of mesenchymal stem cells injection for the management of knee



- osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *International Orthopaedics*, 39(12), 2363–2372. <https://doi.org/10.1007/s00264-015-2785-8>
5. Puissant, B., Barreau, C., Bourin, P., Clavel, C., Corre, J., Bousquet, C., Taureau, C., Cousin, B., Abbal, M., Laharrague, P., Penicaud, L., Casteilla, L., & Blancher, A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 129(1), 118–129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x>
  6. Pak, J. (2011). Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: A case series. *Journal of Medical Case Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-296>
  7. Linetsky, F. S., Alfredson, H., Crane, D., & Centeno, C. J. (2014). Treatment of chronic painful musculoskeletal injuries and diseases with regenerative injection therapy (RIT): Regenerative injection therapy principles and practice. *Treatment of Chronic Pain by Integrative Approaches*, 145–168. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1821-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1821-8_12)
  8. Centeno, C. J., Kisdalay, J., Freeman, M., & John, R. S. (2006). Partial regeneration of the human hip via autologous bone marrow nucleated cell transfer: A case study. *Pain Physician*, 9, 253–256.
  9. Bowen, J. E. (2015). Technical issues in harvesting and concentrating stem cells (Bone marrow and adipose). *PM&R*, 7(4S). <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2015.01.025>
  10. Varenjuk, I. M., & Dzerzhynskyi, M. Ye. (2019). *The methods of cytohistologic diagnostic*. Kyiv, Interservice.
  11. Kim, G. B., Seo, M., Park, W. T., & Lee, G. W. (2020). Bone marrow aspirate concentrate: Its uses in osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3224. <https://doi.org/10.3390/ijms21093224>
  12. Jindal, K., Aggarwal, S., Kumar, P., & Rathod, P. (2021). Core decompression with bone marrow aspirate concentrate in post collapse avascular necrosis of hip: A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*, 17, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2021.02.010>
  13. Pithadia, P. (2021). BMAC and adipose-derived MSCs treatment for knee osteoarthritis: A systematic review. *International journal of clinical case reports and reviews*, 7(04), 01–11. <https://doi.org/10.31579/2690-4861/150>
  14. Brozovich, A., Sinicrope, B. J., Bauza, G., Niclot, F. B., Lintner, D., Taraballi, F., & McCulloch, P. C. (2021). High variability of Mesenchymal stem cells obtained via bone marrow aspirate concentrate compared with traditional bone marrow aspiration technique. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 9(12). <https://doi.org/10.1177/23259671211058459>
  15. Goodman, S. B., & Zwingenberger, S. (2021). Concentrated autologous bone marrow aspirate is not “stem cell” therapy in the repair of nonunions and bone defects. *Biomaterials and Biosystems*, 2, 100017. <https://doi.org/10.1016/j.bbioso.2021.100017>
  16. Schäfer, R., DeBaun, M. R., Fleck, E., Centeno, C. J., Kraft, D., Leibacher, J., Bieback, K., Seifried, E., & Drago, J. L. (2019). Quantitation of progenitor cell populations and growth factors after bone marrow aspirate concentration. *Journal of translational medicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1866-7>
  17. Sugaya, H., Yoshioka, T., Kato, T., Taniguchi, Y., Kumagai, H., Hyodo, K., Ohneda, O., Yamazaki, M., & Mishima, H. (2018). Comparative analysis of cellular and growth factor composition in bone marrow aspirate concentrate and platelet-rich plasma. *Bone marrow research*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/1549826>

Стаття надійшла до редакції 01.08.2024	Отримано після рецензування 10.01.2025	Прийнято до друку 16.01.2025
---	---	---------------------------------

## QUALITY CRITERIA FOR MINIMALLY MANIPULATED BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS BASED ON AUTOLOGOUS BONE MARROW ASPIRATE FOR USE IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPEDICS

S. S. Strafun<sup>1</sup>, Ye. L. Holiuk<sup>1</sup>, D. O. Zubov<sup>1</sup>, O. M. Magomedov<sup>1</sup>, H. S. Starodub<sup>2</sup>, H. K. Malova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> SI «National Institute of Traumatology and Orthopedics of the NAMS of Ukraine», Kyiv

<sup>2</sup> SU «National Scientific Center of Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the NAMS of Ukraine», Kyiv

<sup>3</sup> Kyiv City Clinical Hospital No. 9. Ukraine

✉ Sergiy Strafun, MD, Prof.: [strafun-s@ukr.net](mailto:strafun-s@ukr.net); <https://orcid.org/0000-0003-2485-5487>

✉ Yevhen Holiuk, MD, PhD in Orthopaedics and Traumatology: [holyuk@yahoo.com](mailto:holyuk@yahoo.com); <https://orcid.org/0000-0001-8940-8536>

✉ Dmytro Zubov, PhD in Biol.Sci: [Zoubov77@yahoo.com](mailto:Zoubov77@yahoo.com); <https://orcid.org/0000-0002-3134-2594>

✉ Sadrudin Magomedov, Dr in Biol. Sci, Prof.: [alexandr@magomedov.kiev.ua](mailto:alexandr@magomedov.kiev.ua); <https://orcid.org/0000-1234-5678-9101>

✉ Halyna Starodub, MD, PhD: [gal.starodub@gmail.com](mailto:gal.starodub@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-8402-2156>

✉ Hrustyna Malova, MD: [kristyna.malova@gmail.com](mailto:kristyna.malova@gmail.com); <https://orcid.org/0009-0000-6534-948X>