Journal of Translational Medicine

Scarpone et al. J Transl Med (2019) 17:10
https://doi.org/10.1186/s12967-018-1750-x

# Получение клинически приемлемых концентраций мезенхимальных стволовых клеток костного мозга без применения центрифугирования

## Isolation of clinically relevant concentrations of bone marrow mesenchymal stem cells without centrifugation

Майкл Скарпоне[1]*, Даниэл Кюблер[2]*, Эндрю Чамберс[3], Карло Мария Де Филиппо[4], Марианжела Аматуцио[5], Томас Э. Ичим[6], Амит Н. Патель[7] и Эудженио Карадонна[8]

## Резюме

**Предпосылки:** В этом исследовании изучалось качество аспиратов костного мозга, полученных с использованием нового, одобренного FDA метода для оптимального забора клеток с внутренней кортикальной поверхности подвздошной кости без необходимости центрифугирования. Метод основан на использовании заборов аспирата небольшого объема из одной точки прокола и обуславливает поступление аспирата только из нескольких боковых участков костной ткани (метод SSLM). В исследовании использовалась система аспирации костного мозга Marrow Celllutions (система MC), основанная на методе SSLM, которую затем сравнивали непосредственно с концентратами костного мозга (BMAC), полученными путем центрифугирования аспиратов, собранных с помощью стандартной аспирационной иглы.

**Методы**: Было проведено три прямых сравнения, оценивающих образцы SSLM и BMAC, полученных–из контралатеральных гребней подвздошных костей одного и того же пациента. Между различными пробами костного мозга сравнивали уровни TNC/мл, CD34+ клеток/мл, CD117+ клеток/мл и CFU-f/мл. Также анализировали клеточный состав серии образцов SSLM для определения общего количества ядросодержащих клеток (TNC) и концентрации мезенхимальных стволовых клеток/клеток-предшественников, которые оценивали по количеству колонии формирующих единиц фибробластов (CFU-f).

**Результаты:** При прямом сравнении с системами получения BMAC, образцы SSLM давали значительно более высокие концентрации CFU-f и сопоставимые концентрации клеток CD34+ и CD117+. Кроме того, среднее количество TNC/мл в группе из 30 пациентов, у которых применяли SSLM, составило $35{,}2 \times 10^6 \pm 17{,}1 \times 10^6$, а среднее количество CFU-f/мл — 2885 ± 1716. Обнаружены небольшие, но значимые корреляции между TNC/мл и SFU-f/мл при использовании метода SSLM, а также между возрастом пациента и CFU-f/мл.

**Выводы**: Устройство MC с использованием техники извлечения SSLM обеспечивало концентрации CFU-f, клеток CD34+ и клеток CD117+ сравнимые или превышающие концентрации в BMAC (концентратах), полученные от того же пациента. Учитывая высокую скорость и простоту использования устройства MC, мы считаем, что эта новая система обладает значительными практическими преимуществами по сравнению с другими доступными в настоящее время системами на основе центрифугирования.

[1] Центр спортивной медицины и реабилитации Тринити, Госпиталь Тринити, Стьюбенвилль, OH 43952, США.
[2] Кафедра биологии, Францисканский Университет в Стьюбенвилле, Стьюбенвилль, OH 43952, США.
[3] Кафедра биологии, Францисканский Университет в Стьюбенвилле, Стьюбенвилль, OH 43952, США.
[4] Центр исследований и разработки высоких технологий “Иоаннес Паулюс II”, Католический Университет Кампобассо, Кампобассо, Италия.
[5] Центр исследований и разработки высоких технологий “Иоаннес Паулюс II”, Католический Университет Кампобассо, Кампобассо, Италия.
[6] Творческие медицинские технологии, Феникс, AZ, США.
[7] Кафедра биоинженерии, Университет шт. Юта, Солт-лейк-сити, США.
[8] Центр исследований и разработки высоких технологий “Иоаннес Паулюс II”, Католический Университет Кампобассо, Кампобассо, Италия.
*Для связи: scarponesportsmedicine@trinityhealth.com; dkuebler@franciscan.edu

## Предпосылки

Аспират костного мозга (BMA) и его концентраты (BMAC) используются для лечения различных ортопедических случаев, а также при критической ишемии конечностей и сердечной недостаточности с положительными клиническими результатами, что связано с более высоким количеством стволовых клеток/клеток-предшественников в образце костного мозга [1–7]. В силу клинической важности существует множество методов увеличения выхода стволовых клеток/клеток-предшественников в аспирате костного мозга [6, 8]. К сожалению, попытки аспирации избыточного объема костного мозга (объемом более 1 мл из одного сайта) приводят к попаданию в аспират значительного количества периферической крови с меньшим количеством стволовых клеток/клеток-предшественников [9–11]. Кроме того, учитывая разнообразие ниш, в которых стволовые/прогениторные клетки располагаются в пространстве костной ткани и костного мозга [12-14], различные методы аспирации для преимущественного извлечения клеток из разных ниш могут быть более или менее эффективными.

Распространенным вариантом увеличения концентрации стволовых клеток/клеток-предшественников в аспиратах большого объема является концентрирование аспирата путем разделения в градиенте плотности с использованием систем на основе центрифуги [6, 11]. В то время как системы получения BMAC могут увеличивать концентрацию ядерных клеток в аспирате [11], поскольку они не различают компоненты периферической крови и костного мозга, они также могут просто повышать уровень ядросодержащих клеток периферической крови, среди которых очень мало стволовых клеток/клеток-предшественников.

Новый подход к потенциальному преодолению этой проблемы заключается в применении системы аспирации костного мозга Marrow Cellutions (далее система MC), в которой используется метод нескольконьких заборов материала небольшого объема (по 1 мл) из одного сайта пункции, что способствует потоку клеток одновременно из нескольких мест костного мозга, распложенных латерально в субкортикальном пространстве кости (метод SSLM). Известно, что эта анатомическая (субкортикальная) локализация содержит высокую концентрацию стволовых/прогениторных клеток костного мозга [12–14]. Кроме того, аспирационная канюля, используемая для применения этого метода: (1) закрыта на своем дистальном конце, чтобы ограничить поступление периферической крови с этой части канюли, (2) имеет боковые отверстия для забора клеток преимущественно из областей, ближайших к внутренней кортикальной пластинке, а не из срединной части подвздошной кости и (3) имеет механизм точного смещения боковых аспирационных отверстий относительно костномозгового пространства.

В этом исследовании мы провели три прямых сравнения аспиратов костного мозга, полученных с помощью SSLM, и систем BMAC с использованием контралатеральных гребней подвздошных костей у одного и того же пациента. В сравнении №1 метод SSLM сравнивался с BMAC, полученным с помощью системы Harvest из трех разных сайтов пункций. В сравнении №2 метод SSLM сравнивали с BMAC, полученным с помощью системы Harvest из одного сайта доступа/пункции. Наконец, в сравнении №3 метод SSLM сравнивался с BMAC, полученным с помощью системы EmCyte из одного сайта пункции. В этих сравнениях исследовались уровни TNC/мл, CFU-F/мл, CD34+/мл и CD117+/мл для определения различий в клеточных компонентах, полученных с использованием метода SSLM и систем получения BMAC. Как заключительный этап, мы измерили уровни TNC/мл и CFU-f/мл, собранные методом SSLM в серии из 30 пациентов. Мы обнаружили, что система MC позволяла получать концентрации CFU-fs, клеток CD34+ и клеток CD117+, которые были сопоставимы или превышали BMAC, полученные от того же пациента.

### Материалы и методы

Было проведено три различных прямых сравнения между методом SSLM (система MC) и различными системами получения BMAC. Во всех трех случаях для сравнения использовались образцы аспирата из контралатерального гребня подвздошных костей у одного и того же пациента. В первом сравнении уровни TNC, CFU-fs и CD34+ клеток, полученные с использованием метода SSLM (однократная пункция), сравнивали с BMAC, полученными с помощью трех пункций из контралатеральной области таза того же пациента. Во втором сравнении уровни TNC, клеток CD34+ и родственных гемопоэтических клеток-предшественников CD117+, полученных с помощью метода SSLM (однократная пункция), сравнивали с BMAC, полученными с помощью однократной пункции с использованием той же системы BMAC, что и для сравнения. Чтобы определить, повлияла ли конкретная методика центрифугирования на результаты, в третьем сравнении была протестирована дополнительная методика центрифугирования. В этом случае уровни TNC, CFU-fs и клеток CD34+, полученные с помощью метода SSLM (однократная пункция), сравнивали с BMAC, полученными с помощью однократной пункции с использованием другой системы получения BMAC. Дополнительно клеточный состав серии образцов SSLM был проанализирован для определения общего количества ядросодержащих клеток (TNC) и концентрации мезенхимальных стволовых клеток/клеток-предшественников, измеренных с помощью CFU-f, чтобы увидеть, как уровни CFU-f в случае использования SSLM метода соотносятся с ранее опубликованными пороговыми значениями уровней CFU-f, необходимыми для клинической эффективности.

## Аспирация костного мозга и концентрация

Все аспираты костного мозга (BMA) были взяты из задней верхней части гребня подвздошной кости. Перед аспирацией и обработкой системой Harvest BMAC, системой EmCyte BMAC и системой Marrow Celllution (MC), которая реализовывала метод SSLM, был проведен тщательный анализ самых последних инструкций производителей по использованию (письменных инструкций и онлайн-видео). Обработку BMAC по методам EmCyte и Harvest выполняли в процедурном кабинете в соответствии с рекомендациями производителей. В рамках метода SSLM аспирация выполнялась вдоль траектории введения канюли, сначала дистальнее от точки входа в пространство костного мозга, при этом устройство механически сдвигало аспирационные порты канюли в новое месторасположение после каждого 1 мл аспирации. Аспирация BMA производилась с помощью шприца на 10 мл с использованием быстрых резких движений поршня при каждом повороте устройства на 360 градусов. При каждом заборе 1 мл аспирационные порты сдвигались примерно на 3/4 см из костной ткани. Всего было собрано таким образом от 8 до 12 мл костного мозга. Затем образцы анализировали в одной из трех лабораторий с использованием протоколов, описанных ниже. Лаборатория 1: Францисканский университет Стьюбенвилля, Стьюбенвилль, штат Огайо. Лаборатория 2: Лаборатории BSR, Кембридж, Массачусетс. Лаборатория 3: Центр исследований и разработки высоких технологий «Иоаннес Паулюс II», Католический университет Кампобассо. Исследование было одобрено Институциональным наблюдательным советом Францисканского университета и Институциональным наблюдательным советом Католического университета Кампобассо, и от всех участников было получено информированное согласие.

## Первое сравнение с центрифугированием

Образцы аспирата костного мозга были собраны во время операции на позвоночнике из подвздошной кости клиницистом A у пяти пациентов, перенесших плановые ортопедические процедуры. Пробы BMA забирали из выбранных случайным образом гребней подвздошных костей с использованием либо системы Harvest BMAC, либо системы MC. Хотя клиницист A имел значительный опыт использования системы Harvest BMAC, это была его первая попытка использовать систему MC. Аспирация 20 мл из трех отдельных проколов была выполнена для образца Harvest BMAC для последующего центрифугирования; одиночную пункцию выполняли системой MC по описанной выше методике. Лабораторный анализ проводили в лаборатории 2. Уровни TNC подсчитывали с использованием автоматического анализатора (Coulter Ac.T diff2). Концентрации клеток CD34+ [15] и уровни CFU-f [16] анализировали с использованием методов, описанных ранее. Все образцы были обработаны в течение 24 часов после сбора.

## Второе сравнение с центрифугированием

Пять наборов образцов аспирата костного мозга были собраны из одной пункции у пациентов с терминальной стадией критической ишемии конечности из каждой подвздошной кости клиницистом B. BMA был аспирирован из распределенных случайным образом чередующихся гребней подвздошной кости с использованием либо системы Harvest BMAC, либо системы MC. Это была первая попытка клинициста B использовать систему MC. Уровни TNC, клеток CD34+ и клеток CD117+ в образцах затем анализировали в лаборатории 3 с использованием ранее опубликованных методологий [17]. Все образцы были обработаны в течение 8 часов после забора.

### Третье сравнение с центрифугированием

Образцы аспирата костного мозга были собраны одной пункцией из каждого крыла подвздошных костей, распределенным случайным образом по чередующимся гребням с использованием либо системы EmCyte BMAC, либо системы MC у трех пациентов, перенесших плановые ортопедические процедуры. Устройство MC было использовано клиницистом C с использованием того же метода, который описан выше. Затем образцы анализировали в лаборатории 1 для определения уровней TNC/мл, CD34+ клеток/мл и CFU-f/мл.

Для определения уровней TNC образец BMA разводили 1:20 в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS) и смешивали 1:1 с красителем AO/PI (Nexcelom Bioscience). Затем образец анализировали количественно с использованием цитометрической системы Cellometer Vision CBA (Nexcelom Bioscience) для определения концентрации живых и мертвых ядросодержащих клеток. Все образцы учитывались в двух экземплярах (дубликатах).

Для измерения уровней CFU-f 5-10 мкл неразбавленного аспирата костного мозга помещали в 6-луночные чашки, содержащие 3 мл среды DMEM/F12 (GIBCO) с добавлением 15% сертифицированной сыворотки MSC FBS (GIBCO) и смеси антибиотиков/антимикотиков (GIBCO). Клетки культивировали в стандартных условиях, 37 °C, 5% $CO_2$. Через 48 ч лунки четыре раза промывали HBSS для удаления не севших клеток. Затем клетки культивировали в течение 12 дополнительных дней со сменой среды каждые 3 дня. Всего через 14 дней колонии окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового в метаноле. Колонии со 100 и более клетками считали как CFU-f. Обработка всех образцов была продублирована.

Уровни CD34+ клеток определяли по установленному протоколу ISHAGE [18]. Вкратце, 50 мкл костного мозга смешивали с 40 мкл буфера для окрашивания клеток, 5 мкл PE-конъюгированных CD34+ антител (Biolegend) и 5 мкл FITC-конъюгированных CD45+ антител (Biolegend) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли буфер для лизиса эритроцитов, после чего образцы анализировали на проточной цитометрии Accuri, используя «ворота», установленные протоколом ISHAGE. Все образцы были обработаны в течение 8 часов после сбора.

### Серии случаев

Аспирация костного мозга с использованием системы MC для применения в плановых ортопедических процедурах была выполнена в группе из 30 последовательно выбранных пациентов одного и того же лечащего врача (врач C). Клиницист C ранее имел опыт использования системы MC, как описано выше. Полученные образцы анализировали в лаборатории 1 для определения уровней TNC/мл и CFU-f/мл с использованием методов, описанных выше. Все образцы были обработаны в течение 8 часов после сбора.

### Статистика

Для всех трех различных сравнений между системой MC и системами для центрифугирования уровни TNC, CFU-f, CD34+ и CD117+ сравнивали с использованием парных t-тестов Стьюдента. Для всех вышеуказанных статистических анализов использовали программное обеспечение Prism. Для серии из 30 клинических случаев возраст, количество TNC и количество CFU-f были представлены как средние значения ± стандартное отклонение. Данные были проанализированы на предмет нормального распределения с использованием критерия нормальности Шапиро-Уилка. Корреляции между количеством TNC и количеством CFU-f анализировали с использованием метода непараметрической корреляции Спирмена, поскольку значения TNC не имели нормального распределения. Корреляции между возрастом пациента и количеством CFU-f анализировали с использованием корреляции Пирсона, поскольку и возраст, и количество CFU-f имели нормальное распределение. Для каждого из двух наборов данных была выполнена линейная регрессия.

## Результаты

### Сравнение системы MC и системы центрифугирования № 1

Систему MC сравнивали у пяти пациентов с обработанным BMAC в системе Harvest, полученным из контралатерального гребня подвздошной кости (таблица 1). Было выполнено три отдельных пункции для аспирации костного мозга, используемого для процесса центрифугирования, в то время как для системы MC использовали только пункцию. Среднее количество TNC в случае системы MC составило 31,5 ± 15,5 млн/мл по сравнению с 66,1 ± 20,5 млн/мл для аспирата, взятого традиционной иглой (три пункции/забора) с последующей обработкой с использованием центрифужной системы Harvest (p = 0,0001). Точно так же среднее количество CD34+ для системы MC составило 71,2 ± 49,0 × $10^3$/мл против 254 ± 122 × $10^3$/мл для системы Harvest (p = 0,0034). Среднее количество CFU-f для системы MC составило 1583 ± 858/мл против 796,6 ± 508,5/мл для системы Harvest (p = 0,0346). Для всех трех измерений значения существенно отличались: система Harvest имела сильно повышенное количество TNC и CD34+, а система MC имела достоверно более высокое количество CFU-f.

**Таблица 1. Система MC в сравнении системы Harvest, сравнение №1**

| | Marrow Cellution | | | Система Harvest | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TNCs/mL × $10^6$ | CFU-f/mL | CD34+/mL x $10^3$ | TNCs/mL × $10^6$ | CFU-f/mL | CD34+/mL x $10^3$ |
| **Пациент 1** | 55.0 | 2915 | 157 | 96.0 | 1248 | 435 |
| **Пациент 2** | 27.2 | 1278 | 66 | 64.0 | 1312 | 308 |
| **Пациент 3** | 16.6 | 552 | 49 | 40.3 | 232 | 203 |
| **Пациент 4** | 20.5 | 1496 | 42 | 57.5 | 883 | 209 |
| **Пациент 5** | 38.0 | 1672 | 42 | 72.5 | 308 | 117 |
| **В среднем** | 31.5 ± 15.5** | 1583 ± 858* | 71.2 ± 49.0** | 66.1 ± 20.5 | 797 ± 509 | 254 ± 122 |

Уровни TNC, CFU-fs и CD34+ клеток в аспирате MC (одно место пункции) и концентратах костного мозга Harvest (три места пункции), взятых с контралатеральной стороны гребня подвздошной кости у того же больного. (* p < 0,05; ** p < 0,01)

### Сравнение системы MC и системы центрифугирования № 2

Собранные обработанные BMAC и аспираты, полученные с использованием системы MC, также сравнивали во второй группе пациентов (n = 5) с образцами, взятыми другим врачом (таблица 2), но в этом случае пункция для аспирации костного мозга, используемого для обработки как BMAC, была сделана только один раз. Среднее количество TNC для системы MC, 24,2 ± 11,6 млн / мл, было значительно ниже, чем значение, полученное с системой BMAC, обработанной в системе Harvest, 39,7 ± 17,2 млн / мл (p = 0,0454). Среднее количество CD34+ в материале от системы MC в этом сравнении составило 257 ± 115 × $10^3$/мл против 217 ± 143 × $10^3$/мл для системы Harvest, разница не достигла статистической значимости (p = 0,1378). В этих образцах не проводили подсчет CFU-f, однако в этом сравнении проверяли уровень клеток CD117+. Среднее число CD117+ для системы MC составило 272 ± 141 × $10^3$/мл против 180 ± 164 × $10^3$/мл для системы Harvest, разница не достигла статистической значимости (p = 0,0530).

В дополнение к тестированию двух систем в этом сравнении также был проведен анализ образца аспирата, взятого по традиционной методике, до того, как он был обработан с помощью системы Harvest. Когда аспират, полученный с помощью традиционной иглы, сравнивали перед центрифугированием с аспиратом системы MC, количество TNC (12,56 ± 2,6 млн/мл против 24,2 ± 11,6 млн/мл), количество CD34+ (68,8 ± 30,7 $10^3$/мл против 257 ± 115). $10^3$/мл) и количество CD117+ (65,0 ± 44,0 $10^3$/мл по сравнению с 272 ± 141 $10^3$/мл) были достоверно малы по сравнению с системой MC. Наконец, количество CD34+ сильно коррелировало с количеством CD117+ как в системе MC (коэффициент корреляции Пирсона = 0,894; p = 0,041), так и в системе Harvest (коэффициент корреляции Пирсона = 0,966; p = 0,007).

**Таблица 2. Система MC в сравнении системы Harvest, сравнение №2**

| | Marrow Cellution | | | Система Harvest | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TNCs/mL × $10^6$ | CD34+/mL x $10^3$ | CD117+/mL | TNCs/mL × $10^6$ | CD34+/mL x $10^3$ | CD117+/mL |
| **Пациент 1** | 23.1 | 235 | 348 | 15.7 | 91.2 | 89.7 |
| **Пациент 2** | 15.3 | 135 | 84.4 | 28.3 | 164 | 76.5 |
| **Пациент 3** | 16.4 | 177 | 193 | 44.8 | 125 | 89.6 |
| **Пациент 4** | 44.1 | 423 | 450 | 55.8 | 447 | 463 |
| **Пациент 5** | 22.1 | 315 | 282 | 53.7 | 258 | 183 |
| **В среднем** | 24.2 ± 11.6* | 257 ± 115 | 272 ± 141 | 39.7 ± 17.2 | 217 ± 143 | 180 ± 164 |

Уровни TNC, клеток CD34+ и CD117+ в аспиратах MC и концентратах костного мозга Harvest, взятых из контралатерального гребня подвздошной кости, взятых у одного и того же пациента. (* p < 0,05)

## Сравнение системы MC и центрифугирования № 3

В последнем сравнении вторую (дополнительную, EmCyte) систему центрифугирования BMAC сравнивали с системой MC. В этом случае аспираты из системы MC сравнивались у трех пациентов с обработанными в системе EmCyte образцами BMAC, полученными из контралатерального гребня подвздошной кости (таблица 3). Среднее количество TNC для системы MC составило 36,7 ± 17,7 млн/мл по сравнению с 60,5 ± 53,8 млн/мл в аспирате, полученном с помощью традиционной биопсийной иглы с последующей обработкой аспирата системой на основе центрифуги EmCyte (p = 0,1888). Среднее количество CD34+ для системы MC составило 237 ± 88 × $10^3$/мл против 146 ± 33 × $10^3$/мл для системы EmCyte (p = 0,0806). Аналогичным образом, среднее количество CFU-f для системы MC составило 2263 ± 1667/мл против 267 ± 76,4/мл для системы EmCyte (p = 0,0437). В то время как средние значения показали значительные различия для всех трех сравнений между системами MC и EmCyte, разница была значимой только в случае повышенных уровней CFU-f, обнаруженных в аспирате из системы MC (p <0,05).

**Таблица 3. Система MC в сравнении системы EmCyte, сравнение №3**

| | Marrow Cellution (система MC) | | | Система EmCyte | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TNCs/mL × $10^6$ | CFU-f/mL | CD34+/mL x $10^3$ | TNCs/mL × $10^6$ | CFU-f/mL | CD34+/mL x $10^3$ |
| **Пациент 1** | 57.2 | 3610 | 326 | 121 | 350 | 151 |
| **Пациент 2** | 25.9 | 1560 | 150 | 18 | 250 | 110 |
| **Пациент 3** | 27.1 | 1620 | 236 | 42 | 200 | 176 |
| **В среднем** | 36.7 ± 17.7 | 2263 ± 1667* | 237 ± 88 | 60.5 ± 53.8 | 267 ± 76.4 | 146 ± 33 |

Уровни TNC, CFU-fs и CD34+ клеток в аспирате MC и концентратах костного мозга EmCyte, полученных из контралатерального гребня подвздошной кости у одного и того же пациента (* p < 0,05).

## Уровни TNC и CFU-f серии 30 клинических случаев в аспиратах, полученных с помощью системы MC

Серия 30 образцов аспиратов костного мозга, полученных с использованием системы MC, была проанализирована касательно концентраций TNC и CFU-f. Количество TNC в образцах варьировало от 10,1 до 57,2 миллионов TNC/мл с единственным статистическим выбросом, показавшим 90,0 миллионов TNC/мл (см. таблицу 4). Среднее значение количества TNC со стандартным отклонением составило 35,2 миллиона TNC/мл ± 17,13 миллиона (рис. 1a). Среднее значение TNC/мл составило 36,0 млн. Поскольку количественный диапазон TNC у женщин из-за небольшого числа пациенток [4], включенных в исследование, был несколько ниже (10,1–38,2 миллиона), чем количественный диапазон у мужчин (13,6–57,2 миллиона), статистические различия не могли иметь места. Количество CFU-f в 30 образцах варьировалось от 300 до 7300 CFU-f/мл (см. таблицу 4). Среднее значение и стандартное отклонение количества CFU-f составили 2885 CFU-f/мл ± 1717 (рис. 1b) с медианой в 2500 /мл. Среднее количество CFU-f на миллион ядерных клеток составило 99,8 ± 123,5. В образцах наблюдались значительные вариации от 11,4 до 722,8.

**Таблица 4. Количество TNC и CFU-f в образцах BMA, взятых у 30 пациентов с использованием системы MC (метод SSLM)**

| TNC 1/mL | CFU-f 1/mL | Пол | Возраст | Сопутствующие заболевания |
|---|---|---|---|---|
| **44.6 × $10^6$** | 4200 | М | 52 | АГ, рефлюкс-эзофагит |
| **36.3 × $10^6$** | 3600 | М | 45 | Болезнь Крона, рефлюкс-эзофагит |
| **21.6 × $10^6$** | 3200 | М | 72 | АГ, ИБС |
| **15.5 × $10^6$** | 2000 | М | 59 | Отсутствуют |
| **46.1 × $10^6$** | 2500 | М | 37 | Низкий уровень IGF-1 |
| **26.4 × $10^6$** | 300 | М | 85 | Ревматоидный артрит, диабет, подагра, прием Адалимумáб (Humira) |
| **44.2 × $10^6$** | 2500 | М | 57 | Отсутствуют |
| **15.6 × $10^6$** | 1200 | Ж | 65 | Гипотиреоз |
| **37.4 × $10^6$** | 6700 | М | 22 | Отсутствуют |
| **20.9 × $10^6$** | 2400 | М | 69 | Отсутствуют |
| **38.2 × $10^6$** | 2900 | Ж | 76 | АГ |
| **17.8 × $10^6$** | 700 | М | 58 | Диабет, ожирение |
| **35.7 × $10^6$** | 4000 | Ж | 34 | Псиориатический артрит |
| **48.5 × $10^6$** | 2400 | М | 46 | Рефлюкс-эзофагит, курение |
| **51.0 × $10^6$** | 5400 | М | 44 | АГ, рефлюкс-эзофагит, подагра, ожирение |
| **15.3 × $10^6$** | 800 | М | 56 | Отсутствуют |
| **44.6 × $10^6$** | 4200 | М | 65 | ЯБЖДК |
| **10.1 × $10^6$** | 7300 | Ж | 61 | Отсутствуют |
| **45.9 × $10^6$** | 2610 | М | 68 | Остеоартрит, подагра, умеренная АГ, почечно-печеночная недостаточность |
| **13.6 × $10^6$** | 780 | М | 69 | Отсутствуют |
| **24.7 × $10^6$** | 1830 | М | 55 | Отсутствуют |
| **31.5 × $10^6$** | 4670 | М | 56 | Отсутствуют |
| **42.9 × $10^6$** | 2000 | М | 60 | Преддиабет |
| **48.4 × $10^6$** | 2390 | М | 78 | Отсутствуют |
| **23.4 × $10^6$** | 1110 | М | 70 | Отсутствуют |
| **57.2 × $10^6$** | 3610 | М | 65 | Остеоартрит, подагра, АГ |
| **55.2 × $10^6$** | 3835 | М | 21 | Отсутствуют |
| **90.0 × $10^6$** | 4225 | М | 23 | Отсутствуют |
| **25.9 × $10^6$** | 1560 | М | 65 | Остеоартрит, АГ, паническое расстройство |
| **27.1 × $10^6$** | 1620 | М | 43 | Мочекаменная болезнь, АГ |

У каждого пациента было взято от 8 до 10 мл аспирата костного мозга. Также указаны пол, возраст и сопутствующие заболевания каждого пациента.

 

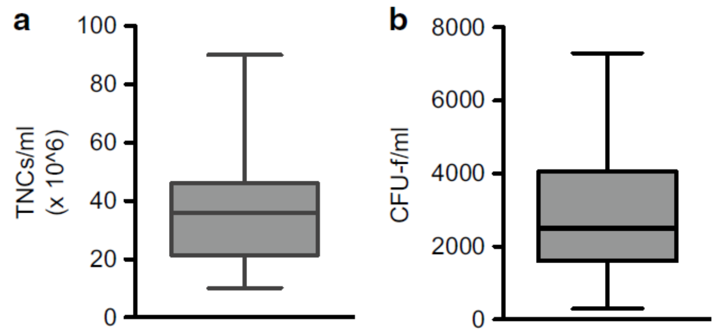


**Рис. 1**. Количество CFU-f и TNC в аспиратах костного мозга, полученных с помощью системы MC (метод SSLM). **A** Среднее количество TNC/мл составило $33{,}3 \times 10^6 \pm 13{,}9 \times 10^6$ при исключении случая выброса (90,0 миллионов TNC/мл). При включении всех случаев среднее число составило $35{,}2 \times 10^6 \pm 17{,}1 \times 10^6$ (n = 30). **B** Среднее число CFU-f/мл составило 2885 ± 1716 (n = 30).

Из тех четырех пациентов, у которых количество CFU-f было ниже 1000/мл, двое из них имели серьезные сопутствующие заболевания (диабет, ожирение, ревматоидный артрит и подагра). У двух других не было сопутствующих заболеваний, в то же время они не были стат-выбросами по параметру «возраст», поскольку у обоих значения были в пределах одного стандартного отклонения от среднего возраста тестируемой популяции. У четырех из семи человек с числом CFU-f свыше 4000/мл не было сопутствующих заболеваний. Из трех пациентов, у которых были сопутствующие заболевания, у одного наблюдалась язвенная болезнь, у другого артериальная гипертензия и гастро-эзофагальный рефлюкс (ГЭРБ), а в самом сложном случае наблюдались гипертония, ГЭРБ, подагра и ожирение (таблица 4). У 13 из 30 человек, включенных в исследование, не было сопутствующих заболеваний. У этих людей среднее значение CFU-f составляло 3118/мл ± 2115, в то время как у остальных лиц с сопутствующими заболеваниями среднее количество CFU-f существенно не отличалось и было 2705/мл ± 1381.

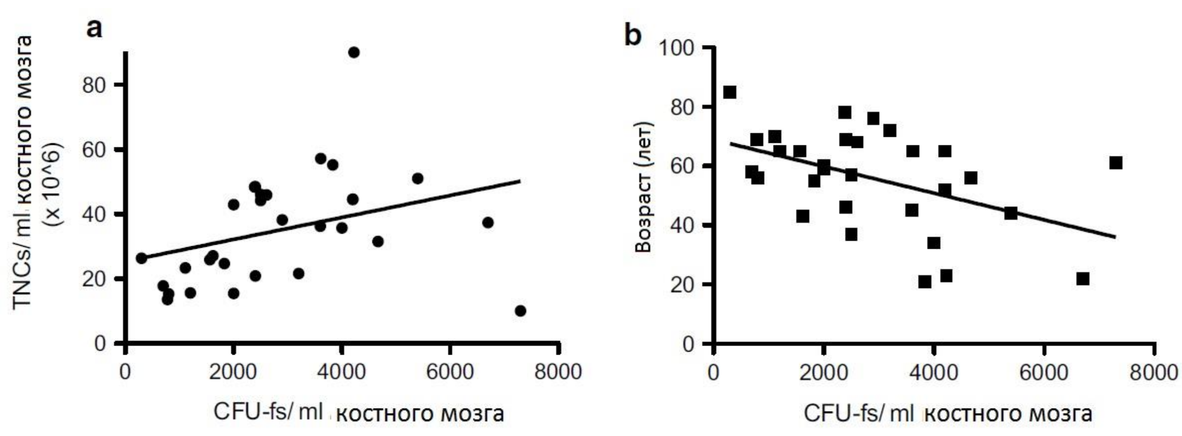


**Рис. 2. а**. Корреляция между CFU-f/мл и общим числом ядерных клеток/мл в аспиратах костного мозга, собранных с использованием метода SSLM. Поскольку данные не были нормально распределены, был использован критерий ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент Спирмена составил 0,4848, что указывает на значимую положительную корреляцию между двумя переменными (p = 0,0062).
**b** Корреляция между CFU-f/мл и возрастом в аспиратах костного мозга, полученных с использованием метода SSLM. Поскольку данные были распределены нормально, был использован критерий корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции Пирсона составил -0,4689, что указывает на значимую отрицательную корреляцию между двумя переменными (p = 0,009).

### Корреляции между возрастом, TNC и уровнями CFU-f в образцах, полученных с помощью MC system

Мы исследовали, существует ли корреляция между количеством TNC и количеством CFU-f в аспиратах, полученных с помощью системы MC. На рис. 2a показано количество CFU-f в каждом образце в зависимости от количества TNC. Коэффициент корреляции Спирмена для этих данных составляет 0,48837, что указывает на слабую положительную корреляцию между двумя значениями, величина которой была статистически значимой ($p = 0,0062$). Если исключить два стат-выброса (пациенты 7 и 28), то будет видна более сильная положительная связь, поскольку коэффициент корреляции Спирмена будет равен 0,6263 ($p = 0,0004$). Учитывая снижение регенеративной способности, происходящее с возрастом, мы исследовали, связано ли снижение количества CFU-f в аспирате костного мозга с возрастом пациента. На рис. 2b показано количество CFU-f в каждом образце в зависимости от возраста пациента. Данные показывают слабую отрицательную корреляцию между возрастом и числом CFU-f с коэффициентом корреляции Пирсона -0,4689 ($p = 0,009$), что указывает на то, что пожилые пациенты имеют тенденцию к более низкому количеству CFU-f.

## Обсуждение

Известно, что BMA и BMAC, имеющие в своем составе сложную смесь ядросодержащих клеток, тромбоцитов и факторов роста, способствуют заживлению тканей при различных повреждениях в ортопедии и способствуют ангиогенезу в ишемизированной ткани [2, 19–22]. Поскольку BMA и BMAC открывают значительные перспективы в клинике, важно протестировать отдельные препараты костного мозга, учитывая многочисленные методы аспирации и концентрации костного мозга, используемые в настоящее время [11], а также различное местоположение стволовых клеток в пространстве костного мозга [13, 14]. Это в частности важно, принимая во внимание, что в различных исследованиях было показано, что аспираты с более высоким уровнем клеток CFU-f и/или CD34+ коррелируют с улучшением результатов лечения пациентов [1–4, 21].

Учитывая связь между более высокими уровнями стволовых клеток/клеток-предшественников и положительными исходами у пациентов, проверка того, что препараты BMA и BMAC содержат достаточное количество этих клеток, имеет клиническое значение. В настоящем исследовании мы обнаружили, что система MC, в которой используется метод SSLM, позволяет получить ~ 10 мл аспирата с высокими концентрациями клеток CFU-fs и/или CD34+. Большинство традиционных аспирационных игл ведут свое начало от канюли с открытым дистальным концом без механических средств для точного перемещения канюли. Эти иглы для традиционных методов обычно позволяют получать аспираты, содержащие от 200 до 300 CFU-f/мл [11]. В трех прямых сравнениях с тремя разными клиницистами и двумя разными системами для центрифугирования система MC имела значительно более высокие количества CFU-fs и демонстрировала тенденцию к одинаковому или большему количеству клеток CD34+ и CD117+ в сравнении с системами на основе центрифугирования (таблицы 1, 2, 3). Единственным исключением были значительно более высокие уровни клеток CD34+ в первом сравнении, когда забор BMA проводился с использованием меньших аспираций в трех разных сайтах забора, в отличие от одной аспирации большого объема только в одном сайте забора, которая была выполнена в двух других сравнениях. Несмотря на повышенный уровень клеток CD34+ в этом BMAC, аспират системы MC по-прежнему имел значительно более высокие уровни CFU-f. Интересно, что аспирация меньшего объема, выполненная в трех разных сайтах доступа для забора BMA, по-видимому, предпочтительно увеличивала количество клеток CD34+ без соответствующего увеличения уровней CFU-f. Предыдущие исследования показали, что хотя CFU-f преимущественно обнаруживаются в популяции CD34+, только небольшая часть клеток CD34+ способна образовывать CFU-f, поэтому уровни могут не всегда коррелировать [23].

Появляется все больше доказательств того, что разные популяции МСК обнаруживаются в уникальных нишах внутри кости. Популяции МСК были идентифицированы в пределах кортикального костного пространства и трабекулярных костных ячеек [12, 24], а также в эндостальных и периваскулярных нишах костномозгового пространства [13, 25]. Возможно, что различные методы аспирации могут быть нацелены преимущественно на эти субпопуляции. Аспирация BMAC проводилась с помощью аспирационной иглы с канюлей с открытым концом, которая имеет пять боковых портов, но в которой аспирация преимущественно происходит через самый большой дистальный открытый конец, ориентированный к центру костномозгового пространства. В противоположность этому, в системе МС аспирация происходит только с боков канюли, а не через ее центр, так как ее дистальное отверстие закрыто. Учитывая эти различия, эндостальная популяция вблизи внутреннего кортикального пространства кости [13], где располагаются боковые порты системы МС, может быть предпочтительной целью метода SSLM. В результате, в то время как множественные небольшие аспирации с использованием традиционной иглы могут увеличивать количество CD34+, этот метод может быть нацелен на популяцию клеток из внутреннего пространства костного мозга, который не так богат клетками, составляющими CFU-f. Наши данные подтверждают гипотезу о том, что другая клеточная популяция, более богатая МСК, может располагаться вдоль эндостальной ниши вблизи кортикальной поверхности кости, и это популяция, которая может быть предпочтительной целью метода аспирации.

Высокие концентрации CFU-f были обнаружены с использованием системы МС двумя разными клиницистами на основе анализов из двух разных независимых лабораторий. В серии случаев система МС позволила получить 10 мл аспиратов со средней концентрацией 2885 CFU-f/мл. Общее количество CFU-f, обнаруженное в аспиратах, полученных с помощью системы МС, примерно 28 000 единиц клеток, представляющих собой фенотип клеток-предшественников/стволовых клеток, что соответствует количеству клеток из других исследований, показавших терапевтический успех в уменьшении боли в межпозвонковом диске [26], лечении остеонекроза тазобедренного сустава. [27] и устранение дефектов хряща [1]. Кроме того, число CFU-f/мл, обнаруженное здесь в серии клинических случаев, было больше или сходно с тем, что сообщалось ранее для конечных продуктов на основе применения центрифуг [11, 21].

В целом, представленные здесь данные бросают вызов обоснованию аспирации больших объемов костного мозга с последующим уменьшением объема посредством центрифугирования. Хотя системы на основе центрифугирования обеспечивают более высокие уровни TNC, что и было показано здесь, они в целом не давали BMAC с более высокими концентрациями CFU-f, CD34+ или CD117+, чем система МС. Выход CFU-f/мл в протестированных здесь BMAC находится на нижней границе диапазона по сравнению с предыдущими исследованиями BMAC, в которых выход CFU-f/мл находился в диапазоне 500–3000 [11, 16, 21, 26, 28]. Верхний предел этого диапазона похож на то, что было найдено здесь с серией клинических случаев применения системы МС. Сравнительные данные, основанные на уровнях CFU-f, CD34+ и CD117+, позволяют предположить, что при использовании метода SSLM можно получить более высокие концентрации HSCs (гемопоэтических стволовых клеток) и MSCs (мезенхимальных стволовых клеток) [29].

Существует несколько вероятных объяснений высокого уровня стволовых клеток/клеток-предшественников, полученных с помощью метода SSLM. Во-первых, система МС автоматически перемещает аспирационную канюлю, позволяя ей имитировать несколько мест пункции, каждое из которых требует аспирации объемом 1 мл. Предыдущие исследования показали, что аспираты большого объема (более 2 мл) из одного сайта с использованием традиционных игл, как правило, инфильтрируются значительным количеством периферической крови, которая содержит очень мало MSCs и HSCs и приводит к снижению содержания CFU-f и CD34+ клеток. [9, 10]. Это особенно важно у больных сахарным диабетом, атеросклерозом и пожилых пациентов, у которых количество MSCs и HSCs значительно снижено [30–32]. Во-вторых, в системе МС аспирация клеток идет через боковые порты канюли, тем самым (1) происходит забор жидкости из более обширной области пространства костного мозга и (2) используется эндостальная ниша, ближайшая к внутренней кортикальной пластинке, к той области, которая, как известно, богата стволовыми клетками. [13, 25]. Хотя для полного забора MSCs из этого участка необходима ферментативная обработка, аспирация костного мозга из этого региона, по-видимому, дает больше MSCs, чем костный мозг, полученный с помощью игл традиционных систем. Наконец, неэффективность процесса центрифугирования может привести к тому, что значительное количество стволовых клеток/клеток-предшественников останется в выброшенной части обработанного костного мозга. Исследования показали, что многие MSCs присутствуют в аспиратах костного мозга в виде агрегатов, которые можно удалить с помощью этапов фильтрации и центрифугирования, применяемых для получения препаратов BMAC [33, 34].

Кроме того, очень маленькие эмбрион-подобные стволовые клетки (VSEL), которые обнаруживаются в костном мозге и могут способствовать регенерации тканей, теряются при обычных протоколах центрифугирования из-за их высокого ядерно-цитоплазматического соотношения [35, 36]. Учитывая разнообразие клеток костного мозга, которые могут способствовать регенерации тканей (HSC, MSC, VSEL) [33, 37, 38], и тот факт, что значительное количество этих клеток может быть потеряно в процессе центрифугирования, возможность избежать центрифугирования может быть значительным преимуществом при получении надежного биологического препарата.

Чтобы лучше охарактеризовать аспираты, получаемые при помощи системы МС, мы исследовали корреляцию между количествами TNC и CFU-f, полученными из аспиратов, которые отбирали через систему МС. Было обнаружено, что эти два значения показали небольшую, но очень значимую корреляцию с более высокими значениями TNC, связанными с более высокими значениями CFU-f. Предыдущие исследования с использованием BMAC обнаружили аналогичную корреляцию [28]. Кроме того, мы обнаружили небольшую, но значимую корреляцию между возрастом и числом CFU-f, используя этот процесс, при этом аспираты от пожилых людей коррелируют с более низким выходом CFU-f. Эти результаты в целом согласуются с предыдущими исследованиями [39].

Хотя представленные здесь данные демонстрируют, что после применения метода SSLM образуется аспират с высокими уровнями CFU-f и CD34+, существуют ограничения, связанные с исследованием. Во-первых, несмотря на то, что это подходило для экспериментального исследования, размер выборки для каждого из трех сравнительных исследований был небольшим. Во-вторых, разные методики в трех лабораториях не были стандартизированы. Однако тот факт, что значения CFU-f были сопоставимы с данными двух лабораторий, которые оценивали CFU-f, предполагает, что различия в протоколах существенно не повлияли на результат исследования. Несмотря на это, будущие исследования должны включать большую выборку параллельных сравнений со стандартными лабораторными протоколами. Учитывая возможность того, что различные методы аспирации могут предпочтительно нацелены на разные ниши костного мозга, необходимы дальнейшие исследования, изучающие пространственное расположение различных типов клеток в пространстве костного мозга и влияние различных протоколов аспирации на забор этих клеток. В целом, учитывая, что большее количество МСК, измеренное с помощью CFU-f, было связано с положительными результатами лечения, будущие исследования должны включать последующее наблюдение за пациентами, получавшими эти аспираты.

## Выводы

Настоящее исследование демонстрирует, что образцы костного мозга, содержащие относительно высокие концентрации CFU-f/мл и CD34+/мл, могут быть получены с помощью системы МС без необходимости центрифугирования. В параллельных сравнениях с BMAC, полученными от тех же пациентов с использованием контралатерального гребня подвздошной кости, уровень CFU-f/мл был значительно выше в случае использования системы МС. Кроме того, аспираты из системы МС имели количество клеток CD34+ и CD117+ сравнительно одинаковое с системами центрифугирования. В финальной оценке уровни концентраций CFU-f/мл, полученные с использованием системы МС, положительно коррелировали с количеством TNC и отрицательно коррелировали с возрастом пациента. В результате, знание количества TNC и возраста пациента может предоставить некоторую информацию о потенциальном качестве аспирата костного мозга, полученного с помощью системы МС.

**Библиография (см. в исходном оригинале).**

## Дополнения: комментарии и мнения специалиста.

**Обобщение фактов, выявленных Scarpone et al.**

Авторы настоящей публикации сравнили характеристики получаемого клеточного материала с помощью стандартного метода забора костного мозга, усовершенствованного метода забора костного мозга и стандартного метода получения концентрата в клиническом обсервационном исследовании. Результаты этого сравнения можно представить в виде ряда фактов.

Факт 1. Техника усовершенствованного метода аспирации костного мозга небольшими порциями из одного места доступа через канюлю с боковыми портами (**S**mall draws from a **S**ingle puncture that promote only **L**ateral f**L**ow from **M**ultiple sites, SSLM) показывает многократное преимущество перед методами центрифугирования по качеству получаемого материала – в готовом к применению материале выявлено в несколько раз более высокое количество активных мезенхимальных стромальных стволовых клеток (по уровню CFU-f) при том, что центрифугирование имеет бесспорное преимущество по возможностям получения материала с большим количеством ядросодержащих клеток.

Факт 2. Обнаружено, что стандартная методика забора костного мозга иглой Джамшиди по сравнению с методикой SSLM отличается более низкой концентрацией ядросодержащих клеток, представляющих ценность для регенеративной терапии, в полученном аспирате в одновременного забора большой фракции периферической крови.

Факт 3. Большое количество ядросодержащих клеток в аспирате или концентрате костного мозга после обработки не означает, что полученный на основе аспирата клеточный препарат обеспечит ожидаемый клинический эффект на требуемом уровне. Эффективность такого клеточного препарата при регенерации мышечной или хрящевой тканей определяется главным образом количеством и активностью лишь отдельных видов мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МССК), поэтому эффективность метода по получению концентрата костного мозга (BMAC) следует оценивать именно по концентрации таких клеток в препарате.

Факт 4. Концентрация CFU-f (или МССК) в обработанном аспирате костного мозга слабо зависит от общего количества ядросодержащих клеток (см. рис.2). По этой причине в пробе аспирата после его концентрации с помощью центрифугирования может быть большое количество ядросодержащих клеток, но одновременно с этим лишь мизерное количество клеток будет обладать нужной пролиферативной активностью, и этого количества будет недостаточно для ожидаемого клинического эффекта.

Факт 5. На концентрацию CFU-f (МССК) влияет наличие/отсутствие сопутствующих заболеваний у пациента, однако сила влияния той или иной нозологии является предметом детального изучения.

Факт 6 (очевидный). Системы SSLM не конкурируют с методами центрифугирования. С помощью физической силы центробежного ускорения можно получить при центрифугировании сколь угодно плотную клеточную массу - все зависит от выбранного режима/метода изоляции клеточных фракций. Системы SSLM лишь повышают качество и клинический потенциал аспирата (фракцию МССК), что в определенных клинических случаях позволяет врачу обойтись без центрифугирования для экономии времени и средств ради целей и задач лечения.

**Отдельное мнение на обобщении.**

Мезенхимальные стволовые клетки в костном мозге существуют и функционируют во взаимодействии с остальными клеточными популяциями организма. Они являются непосредственными участниками паракринной внутритканевой регуляции, которая включает в себя не только экскрецию регуляторных везикул (нано-экзосом) и гуморальные факторы, но и непосредственное контактное межклеточное взаимодействие. Центрифугирование разрушает эту гармонию, нарушая межклеточные взаимодействия и резко изменяя паракринный фон в аспирате. Иными словами – центрифугирование разрушает ниши стволовых клеток, их микроокружение.

Метод SSLM учитывает это обстоятельство и направлен на сохранение микроокружения клеток и большинства функционирующих связей клеток костного мозга неизменными при переносе клеточного материала из костного мозга в область клинического интереса.

***Бичев Александр Алексеевич, к.м.н., консультант.***
***alexanderbichev@gmail.com***

**Примечание:**

Используемые в статье обозначения:

- CD34+ - гемопоэтические стволовые клетки, отвечают за кроветворение (миелоидная линия, лейкоциты, эритроциты), при трансплантации в другие ткани потенцируют ангиогенез;
- CD117+ -тучные клетки (иммунная система - синтез IgE), также родственные CD34+ гемопоэтические стволовые клетки, предшественники эндотелиоцитов;
- TNC - общее количество ядросодержащих клеток в аспирате (клетки всех фенотипов костного мозга и периферической крови за исключением эритроцитов и тромбоцитов);
- CFU-f - маркер определения активных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (фенотип CD90+, CD105+, CD44+, CD119+, CD34-, CD45-), способных к дифференцировке в большинство видов тканей организма