

СОЗЫЛМАЛЫ АУРУЛАР КЕЗІНДЕ СҮЙЕК КЕМІГІНІҢ АУТОЛОГИЯЛЫҚ КОМПОЗИТТІК ЖАСУШАЛЫҚ ӨНІМІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Ә.К. ЧУВАКОВА¹, А.К. БАЙГЕНЖИН¹, А.М. ГАНИНА¹, А.Ж. ЖУНУСОВ¹,
М.Б. АСКАРОВ¹, М.Е. ШОРАНОВ², Б.С. АСЕМБЕКОВ²

¹ «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Астана, Қазақстан

² С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

Түйіндеме

Кіріспе. Созылмалы аурулар кезінде аутологиялық сүйек кемігінен алынатын жасушалық өнімнің сапасы жасуша көзімен ғана емес, өсіру жағдайларымен, фенотиптік құрамымен және дақылдың морфологиялық жетілуімен де анықталады.

Мақсаты. Созылмалы аурулары бар пациенттерде сүйек кемігінен алынған аутологиялық композиттік жасушалық өнімді алу және зертханалық сипаттау мүмкіндігін бағалау.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ базасында зертханалық–трансляциялық жүргізілді. Өндірістік когортаға кардиологиялық, аутоиммундық, метаболикалық және гепатобилиарлық аурулары бар 132 пациент енгізілді. Сүйек кемігі аспиранты өңделіп, композиттік жасушалық фракция алынды. Стандартты жағдайдағы және L–глутамин қосылған дақылдар, автоматты жасуша санау, фенотиптеу, жарық және электрондық микроскопия бағаланды.

Нәтижелер. L–глутамин қосылған дақылдарда соңғы жасуша концентрациясы жоғары болды: медиана $4,01 \times 10^6$ жасуша/мл, ал L–глутаминсіз дақылдарда $2,30 \times 10^6$ жасуша/мл ($p=0.036$). Өсу еселігінің медианасы тиісінше 37,9 және 10,8 болды ($p=0.095$). Фенотиптеу MSC–ассоциацияланған, гемопоэтикалық/прогениторлық және иммунореттеуші популяциялары бар гетерогенді өнімді көрсетті. Ең қолайлы морфологиялық белгілер дақылдың 21–23 тәулігінде байқалды.

Қорытынды. Оңтайландырылған өсіру жасушалық шығымды арттырып, композиттік сүйек кемігі өнімінің морфологиялық жетілуімен қатар жүрді. Бұл деректер клиникалық қолдану алдында сапа және қауіпсіздік критерийлерін әрі қарай стандарттау қажеттігін көрсетеді.

Түйінді сөздер: жасушалық терапия, созылмалы ауру, сүйек кемігі, мезенхималық стромалық жасушалар, жасушаларды дақылдау әдістері, регенеративті медицина.

Кіріспе. Жасушалық технологиялар регенеративтік медицинаның перспективалы бағыттарының бірі ретінде қарастырылады, өйткені дін/стромалық жасушалар негізіндегі жасушалық препараттар мен өнімдер зақымдалған тіндерді қалпына келтіру және әртүрлі ауруларды емдеу мақсатында белсенді зерттелуде [1–3]. Сүйек кемігі аутологиялық жасушалық материалдың практикалық тұрғыдан маңызды көзі болып табылады, және де оның құрамында моноклеарлық, гемопоэтикалық, прогениторлық және мезенхималық стромалық жасушалық популяциялар бар [4]. Олардың ықтимал әсерлері зақымдалған жасушаларды алмастырумен ғана емес, сонымен қатар

паракриндік, иммуномодуляциялық және биореттеуші белсенділікпен де байланыстырылады [4,5].

Жасушалық технологияларды клиникалық практикаға трансляциялау үшін алынған жасушалардың саны ғана емес, соңғы өнімнің сапасы да қағидатты маңызға ие [6]. Мезенхималық стромалық жасушаларды сипаттаудың халықаралық тәсілдері адгезияны, фенотипті және дифференциалану әлеуетін бағалауды көздейді [7]. Сонымен қатар, нақты жағдайларда созылмалы аурулары бар пациенттерден алынған аутологиялық дақылдар айқын гетерогенділікті сақтауы мүмкін және әрдайым тазартылған MSC-дақыл критерийлеріне сәйкес келе бермейді. Бұл мұндай препараттарды сүйек кемігінің композиттік жасушалық өнімдері ретінде сипаттауда неғұрлым дәл терминологияны және нақты сипаттаманы талап етеді [8].

Ұзақ уақыт бойы сақталып келе жатқан созылмалы патологиясы бар пациенттерде бастапқы сүйек кемігі материалы қабынудың, метаболикалық стресстің, аутоиммундық белсенудің және ағзалық жеткіліксіздіктің ықпалында болуы мүмкін [9]. Сондықтан стандартты өсіру әрдайым жасушалардың жеткілікті шығымын және функционалдық жетілуін қамтамасыз ете бермейді [10]. Қоректік ортаны оңтайландыру, оның ішінде L-глутаминді метаболикалық субстрат ретінде мөлшерлеп қолдану, сондай-ақ дақылдың кеш деструкциясыз жетілу белгілерін көрсететін өсіру мерзімін анықтау ерекше қызығушылық тудырады [11].

Жасушалық өнімдерге арналған заманауи жарияланымдар бастапқы материалдың варибельділігі, дақылдық жағдайлардағы айырмашылықтар, сарысу құрамы, себу тығыздығы, пассаждар саны және сапаны бақылау нәтижелердің қайталанғыштығына елеулі әсер етуі мүмкін екенін атап көрсетеді [12,13]. Сондықтан аутологиялық жасушалық өнімдерге арналған жұмыстарда тек жасуша көзін және өсіру фактісін көрсету жеткіліксіз. Өндірістік когортаны, қосу және қоспау критерийлерін, материалды алу және өңдеу әдісін, орта компоненттерін, бақылаудың уақыттық нүктелерін, жасушаларды санау әдістерін, фенотиптеуді және дақылдың дайындық морфологиялық белгілерін сипаттау қажет [14].

Осыған байланысты, бұл зерттеудің мақсаты созылмалы аурулары бар пациенттерде сүйек кемігінің аутологиялық композиттік жасушалық өнімін алу мүмкіндігін, өсіруді оңтайландыруды және зертханалық сипаттамасын бағалау болды. Міндеттерге өндірістік когортаны сипаттау, L-глутаминмен және онсыз өсіру кезіндегі жасушалық шығымды салыстыру, фенотиптік құрамды талдау және дақылдың морфологиялық динамикасын бағалау кірді.

Материалдар мен әдістер.

Этикалық аспектілер

Зерттеу Ұлттық ғылыми медициналық орталығының жергілікті этикалық комитетімен мақұлданды (2021 жылғы 27 тамыздағы № 2 хаттама). Барлық қатысушылардан жазбаша ақпараттандырылған келісім алынды. Зерттеу Хельсинки декларациясының қағидаттарына сәйкес жүргізілді.

Зерттеу дизайны және жүргізілген орны

Зертханалық–трансляциялық зерттеу «Созылмалы және әлеуметтік маңызды ауруларды емдеуге арналған жасушалық өнім жасаудағы инновациялық тәсілдер» гранттық жобасы шеңберінде, «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ базасында (Астана, Қазақстан), оның ішінде бағаналы жасушалар биотехнологиясы зертханасында орындалды. Зерттеу жасушалық терапия тиімділігін бағалайтын клиникалық сынақ ретінде қарастырылған жоқ; талдаудың негізгі бірлігі аутологиялық сүйек кемігінің үлгісі және одан алынған дақыл болды.

Пациенттердің өндірістік когортасы

Өндірістік когортаға созылмалы аурулары бар 132 пациент енгізілді. Нозологиялық спектр дилатациялық және ишемиялық кардиомиопатияны, жүйелі склеродермияны, жүйелі қызыл жегіні, бастапқы билиарлық холангитті/циррозды, 1 және 2 типті қант диабетін және шашыраңқы склерозды қамтыды. Миелоэксфаузия алдында клиникалық-зертханалық тексеру жүргізілді. Енгізбеу критерийлері белсенді инфекция, АИТВ-инфекциясы немесе В/С вирустық гепатиттері маркерлерінің оң болуы, қатерлі жаңа түзілім немесе оған күдік, айқын зертханалық ауытқулар, негізгі аурудың ауыр декомпенсациясы, жүктілік, лактация немесе қатысудан бас тарту болды.

Сүйек кемігі аспиратын алу

Сүйек кемігі операциялық бөлменің стерильді жағдайында миелоэксфаузия әдісімен, негізінен мықын сүйегінің артқы қырларынан алынды; техникалық шектеулер болған жағдайда алдыңғы қырлардан алу рұқсат етілді. ВМЕ 13/7; 13G × 7 см инелері және антикоагулянтты бар стерильді контейнерлер қолданылды. Аспират мононуклеарлы жасушаларды, гемопоэтикалық және прогениторлық жасушаларды, мезенхималық стромалық/бағаналы популяцияларды және шеткері қан қоспасын қамтитын гетерогенді материал ретінде қарастырылды (Сурет 1).



Сурет 1. Жасушалық өнімді алудың жалпы сызбасы.

Бастапқы өңдеу аспиратты механикалық өңдеуді және/немесе жасушаларды фиколл градиентінде бөлуді, кейіннен кальций және магний иондарынсыз Хенкс стерильді ерітіндісімен немесе фосфатты-тұзды буфермен жууды қамтыды. Өсіру стерильді жағдайларда пластик дақылдық флакондарда және Петри табақшаларында жүргізілді. Негізгі қоректік орталар ретінде DMEM және DMEM-F12 қолданылды. Оңтайландырылған нұсқа құрамына глюкозасы жоғары DMEM-F12, 20% ұрықтық бұзау сарысуы (FBS), L-глутаминді мөлшерлеп қосу, рекомбинантты адам инсулин және ЦЕФ-3 антибиотигі кірді. Дақылдар 24 сағаттан, 72 сағаттан кейін, 3–4 тәулікте, 7 тәулікте, 21–23 тәулікте және одан кейінгі мерзімдерде, соның ішінде 38–42 тәулікте бағаланды.

Зертханалық нәтижелер және жасушаларды санау

Негізгі зертханалық нәтижелік көрсеткіш L-глутамин қосылған жағдайда өсіруден кейінгі жасушалар шығымының оны қоспаған жағдайлармен салыстырғандағы өзгерісі болды. Қосымша түрде жасушалардың соңғы концентрациясы, өсім еселігі, фенотиптік құрамы және дақыл жетілуінің морфологиялық белгілері бағаланды. Жасушаларды санау TC20 Automated Cell Counter / BIO-RAD құрылғысында жүргізілді, нәтижелер жасуша/мл түрінде берілді. Өсім еселігі өсіруден кейінгі концентрацияның бастапқы концентрацияға қатынасы ретінде есептелді.

Дақылды фармакологиялық реттеудің ізденістік модулі

Кардиологиялық шығу тегі бар үлгілер үшін жеке ізденістік модульде 1 мкМ эмпирикалық түрде таңдалған концентрациядағы левосимендан арқылы дақылды фармакологиялық реттеу мүмкіндігі бағаланды. Бұл блок клиникалық тиімділіктің дербес дәлелі ретінде емес, метаболикалық және митохондриялық қолдаудың жасушалардың ультрақұрылымдық жағдайына әсерін алдын ала *in vitro* бағалау ретінде қарастырылды. Бұл модуль өсіру тиімділігінің негізгі талдауына енгізілген жоқ.

Фенотиптеу және морфологиялық бағалау

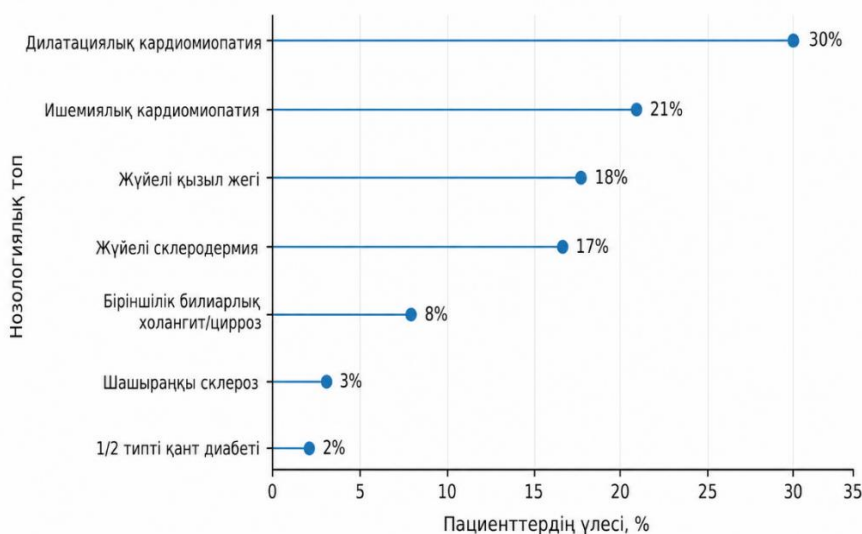
Фенотиптеу CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD34, CD45, CD73, CD105, CD117, CD45+CD34+, CD105+CD34+, CD4+CD25+ және CD4+FOXP3 көрсеткіштерін талдау арқылы ағындық цитометрия әдісімен жүргізілді. Морфологиялық бағалау жарық микроскопиясын және электрондық–микроскопиялық зерттеуді қамтыды. Жартылай жұқа және ультражұқа кесінділер Leica ультрамикротомында алынды; жартылай жұқа кесінділер метилен көгімен, азур II және негізгі фуксинмен боялды, ал ультражұқа кесінділер уранилацетатпен және қорғасын цитратымен контрастталды. Электрондық микроскопия Libra 120 құрылғысында жүргізілді.

Статистикалық талдау

Статистикалық талдау Python 3.13.5 бағдарламасында SciPy 1.17.0 кітапханасын пайдалану арқылы орындалды. Деректер медиана және диапазон түрінде немесе абсолюттік мәндер және пайыздар түрінде ұсынылды. Тәуелсіз дақыл топтарын салыстыру үшін Манн–Уитни критерийі қолданылды. Айырмашылықтар $p < 0,05$ болғанда статистикалық мәнді деп есептелді.

Нәтижелер. Жүйелік аутоиммундық аурулардың ішінде жүйелік қызыл жегі – 24 жағдай (18,2%) және жүйелік склеродермия – 22 жағдай (16,7%) жиірек ұсынылды. Бастапқы билиарлық холангит/цирроз 11 пациентте тіркелді (8,3%). Іріктеме құрылымында сирек кездескен нозологиялар шашыраңқы склероз – 4 жағдай (3,0%) және 1 және 2 типті қант диабеті – 3 жағдай (2,3%) болды.

Біріктірілген бағалау кезінде жүрек–қантамырлық нозологиялар 132 пациенттің 68 жағдайын, немесе бүкіл іріктеменің 51,5%-ын құрады. Жүйелік аутоиммундық аурулар 46 пациентпен ұсынылды (34,9%). Алғашқы төрт нозологиялық топ – дилатациялық кардиомиопатия, ишемиялық кардиомиопатия, жүйелік қызыл жегі және жүйелік склеродермия – жиынтық түрде 114 пациентті, яғни бүкіл зерттелетін топтың 86,4%-ын қамтыды (Сурет 2).



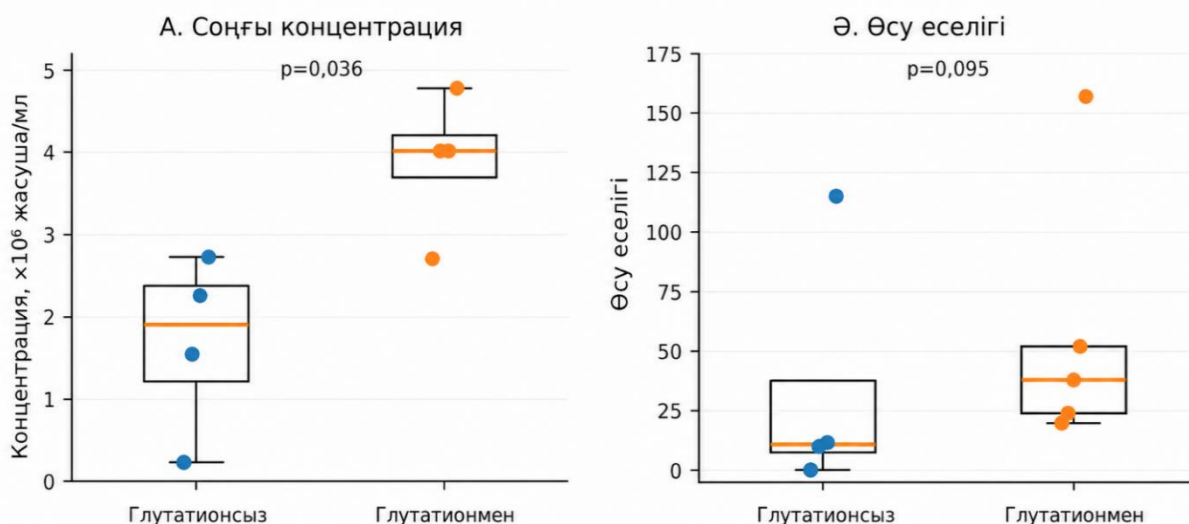
Сурет 2. Алынған сүйек кемігі жасушалық материалы массивіндегі пациенттердің нозологиялық бөлінісі.

L-глутамин қоспай культивациялаудан кейін жасушалардың соңғы концентрациясы $0,352,76 \times 10^6$ жасуша/мл аралығында болды, медианасы $2,30 \times 10^6$ жасуша/мл құрады. L-глутамин қосылған дақылдарда соңғы концентрация $2,75-75 \times 10^6$ жасуша/мл құрады, медианасы – $4,01 \times 10^6$ жасуша/мл. Топтар арасындағы соңғы концентрация айырмашылығы статистикалық тұрғыдан мәнді болды ($p=0,036$) (Кесте 1).

Кесте 1. Жасушаларды өсіруге дейін және одан кейін санау.

Үлгі	Жағдайы	Дейін, жасуша/мл	Кейін, жасуша/мл	Өсім еселігі
1	L-	$2,01 \times 10^4$	$2,30 \times 10^6$	114,4
2	глутаминсіз	$2,06 \times 10^6$	$2,76 \times 10^6$	1,3
3		$3,25 \times 10^4$	$3,50 \times 10^5$	10,8
4		$1,25 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6$	1,3
5		$2,36 \times 10^5$	$2,76 \times 10^6$	11,7
6	L-	$1,75 \times 10^4$	$2,75 \times 10^6$	157,1
7	глутаминмен	$2,05 \times 10^5$	$4,01 \times 10^6$	19,6
8		$9,01 \times 10^4$	$4,75 \times 10^6$	52,7
9		$1,79 \times 10^5$	$4,05 \times 10^6$	22,6
10		$1,05 \times 10^5$	$3,98 \times 10^6$	37,9

Бастапқы жасушалық концентрацияның бірдей болмауын ескере отырып, өсім еселігі қосымша есептелді. Жасушалар санының өсу еселігі медианасы L-глутаминсіз үлгілерде 10,8, ал L-глутаминмен үлгілерде 37,9 құрады; айырмашылық тенденция сипатында болды ($p=0,095$). 24 сағаттан кейін жүргізілген жарықтық-оптикалық бағалау L-глутамин қосылған репрезентативті жасуша дақылдарында жасушалық элементтердің тығыздығы жоғары екенін көрсетті (Сурет 3).



Сурет 3. L-глутаминсіз және L-глутаминмен өсіруден кейінгі жасушалардың соңғы концентрациясы және өсім еселігі.

Абсолюттік мәндер айқын үлгіаралық өзгергіштікті, әсіресе L-глутаминсіз топта көрсетті.

Фенотиптік талдау (Кесте 2) 21-тәулікте өнімнің гетерогенді құрамын анықтады. Мезенхималық стромалық жасушаларға байланысты CD73+ және CD105+ маркерлері анықталды, алайда бір мезгілде гемопоэтикалық/прогениторлық және иммунореттеуші

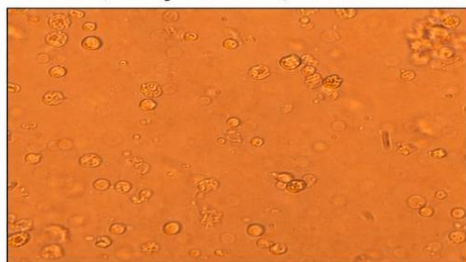
популяциялар, соның ішінде CD45+CD34+, CD105+CD34+, CD4+CD25+ және CD4+FOXP3 сақталды.

Кесте 2. 21-тәуліктегі дақылдың негізгі фенотиптік сипаттамалары.

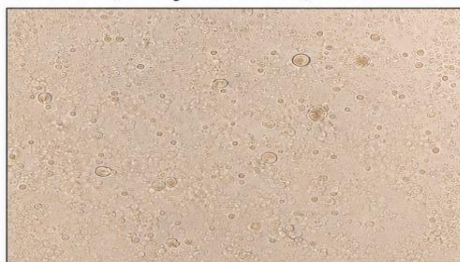
Маркер	ДКМП	ЖСД	ЖҚЖ
CD73+	4,92	3,96	5,73
CD105+	4,28	4,60	4,84
CD45+	3,15	1,32	0,61
CD34+	1,79	0,34	2,43
CD45+CD34+	79,47	87,24	87,18
CD105+CD34+	85,23	89,51	93,52
CD4+CD25+	71,06	45,09	86,12
CD4+FOXP3	75,17	46,19	94,24

Морфологиялық динамика дақылдың жетілуінің бірізді кезеңдерін көрсетті. Өсіруге дейін материал ультраструктуралық стресс белгілері бар гетерогенді мононуклеарлық фракция түрінде ұсынылды (Сурет 4).

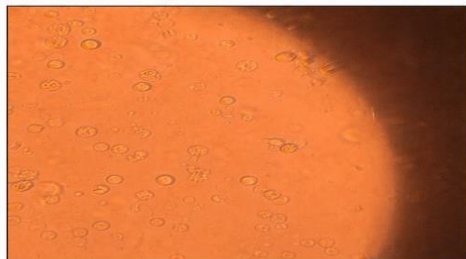
А. Үлгі 1, L-глутаминсіз, 24 сағ



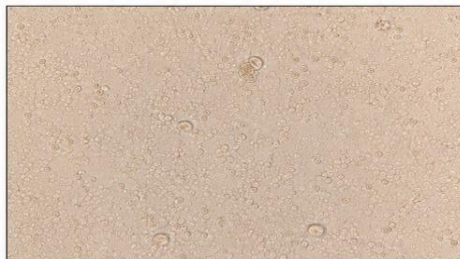
Ә. Үлгі 1, L-глутаминмен, 24 сағ



Б. Үлгі 2, L-глутаминсіз, 24 сағ



В. Үлгі 2, L-глутаминмен, 24 сағ



Сурет 4. L-глутаминсіз және L-глутаминмен 24 сағаттан кейінгі жасушалық дақылдардың репрезентативті жарық микроскопиясы.

3–4-тәулікте гемопозтикалық жасушалардың және сирек кездесетін бекінбеген стромалық элементтердің аралас популяциясы сақталды.

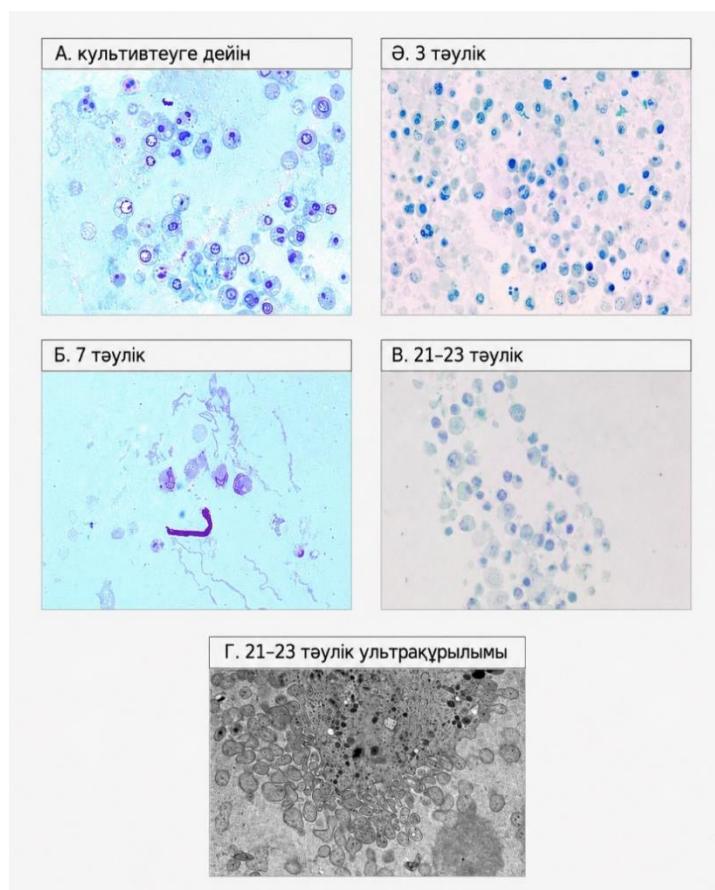
7-тәулікте дақыл жетілмеген күйде қалды.

21–23-тәулікте мезенхималық стромалық жасушаларға ұқсас жасушалар санының артуы, полиморфизм, микровезикулалар және прогениторлық белгілер байқалды.

Кейінгі мерзімдерде, соның ішінде 38–42-тәуліктерде, жасушалық деструкция белгілері пайда болды (Сурет 5, 6).



Сурет 5. Өсіру мерзіміне байланысты жасушалық дақылдың морфологиялық динамикасы.



Сурет 6. Жасушалық дақылдың үлгілік морфологиялық және ультрақұрылымдық динамикасы.

Талқылау. Алынған нәтижелер созылмалы аурулары бар пациенттерде өсірілетін аутологиялық сүйек кемігінің жасушалық өнімін алуға болатынын көрсетеді. Бұл ретте соңғы дақылдың сипаттамалары жасушалық материалдың көзіне ғана емес, сонымен қатар өсіру жағдайларына да байланысты болды. Осы зерттеуде L-глутаминді қосу оны қоспаған дақылдармен салыстырғанда жасушалардың соңғы концентрациясының жоғары болуымен қатар жүрді. Бұл нәтиже мезенхималық стромалық жасушалар мен сүйек кемігінен шыққан басқа да жасушалық популяциялардың пролиферациясы үшін аминқышқылдық метаболизмнің маңызы туралы түсініктермен сәйкес келеді [11,15]. Сонымен бірге өсу еселігі бойынша айырмашылықтар статистикалық мәнділікке жеткен жоқ, сондықтан L-глутаминнің әсерін үлгілер саны көбірек зерттеулерде растауды қажет ететін алдын ала бақылау ретінде қарастыру қажет.

Бастапқы жасушалар концентрациясының айқын вариабельділігі соңғы абсолютті жасушалық шығымды ғана емес, сонымен қатар дақылдың салыстырмалы өсімін де бағалау қажеттілігін көрсетеді [16]. Аутологиялық жасушалық өнімдер үшін бұл әсіресе маңызды, өйткені бастапқы сүйек кемігі материалы жасқа, негізгі ауруға, қабыну белсенділігіне, метаболикалық жағдайға және басқа да клиникалық-биологиялық факторларға байланысты ерекшеленуі мүмкін [17–19]. Сондықтан өсіру тиімділігін түсіндіру кезінде жасушалардың бастапқы саны да, өсіру үдерісіндегі олардың көбею динамикасы да ескерілуі тиіс.

Алынған деректер жасушалық өнімдерді сапасы бір ғана зертханалық көрсеткішпен емес, сипаттамалар жиынтығымен анықталатын биологиялық вариабельді препараттар ретінде қазіргі заманғы түсінікке сәйкес келеді [20]. Осы зерттеуде негізгі назар жасушалық шығымға, фенотиптік құрамға және дақылдың морфологиялық динамикасына аударылды, сондай-ақ жасушалық өнімді шығару критерийлерінің толық жиынтығы бағаланған жоқ. Болашақта мұндай өнімді стандартталған сипаттау үшін өміршендік, стерильділік, микоплазманың болмауы, эндотоксин, генетикалық тұрақтылық, функционалдық белсенділік және өндірістік үдерістің қайта өндірілуі сияқты қосымша көрсеткіштер қажет.

21-тәуліктегі фенотиптік талдау алынған өнімнің гетерогенді құрамын көрсетті. CD73+ және CD105+ жасушаларының анықталуы стромамен байланысты фракцияның бар екенін көрсетеді. Алайда бір мезгілде CD45+CD34+, CD105+CD34+, CD4+CD25+ және CD4+FOXP3 қоса алғанда, гемопоэтикалық, прогениторлық және иммунореттеуші популяциялар сақталды. Осыны ескере отырып, алынған өнімді ISCT минималды критерийлері бойынша тазартылған мезенхималық стромалық жасушалар дақылы ретінде белгілеуге болмайды [7]. «Аутологиялық композиттік сүйек кемігінің жасушалық өнімі» терминін қолдану неғұрлым дұрыс, өйткені ол жасушалық құрамның нақты гетерогенділігін көрсетеді.

Айта кету керек, осы зерттеудегі фенотиптеу панелі мезенхималық стромалық жасушалар фенотипін растау үшін қажетті маркерлердің толық жиынтығын, соның ішінде CD90, HLA-DR, CD14/CD11b және CD19/CD79a маркерлерін қамтыған жоқ. Бұдан басқа, үш бағытты дифференцировка бағаланбады. Сондықтан алынған фенотиптік деректер өнімді ISCT минималды критерийлерінің қатаң мағынасындағы толыққанды мезенхималық стромалық жасушалар препараты ретінде емес, стромамен байланысты, гемопоэтикалық/прогениторлық және иммунореттеуші компоненттері бар гетерогенді сүйек кемігі дақылы ретінде сипаттауға мүмкіндік береді.

Дақылдың морфологиялық динамикасы өсіру үдерісіндегі бірізді өзгерістерді көрсетті. Ерте мерзімдерде дақыл аралас және жетілмеген сипатын сақтады, ал 21–23-тәуліктерде мезенхималық стромалық жасушаларға ұқсас жасушалар санының артуын, жасушалық полиморфизмді, микровезикулаларды және прогениторлық белгілерді қоса алғанда, жетілудің ең қолайлы белгілері байқалды. Кейінгі мерзімдерде, соның ішінде 38–42-тәуліктерде, жасушалық деструкция белгілері пайда болды, бұл ұзақ уақыт өсіру кезіндегі стромалық жасушалардың морфологиялық және функционалдық өзгерістері туралы деректермен сәйкес келеді [21]. Бұл деректер қолданылған хаттама жағдайында 21–23-тәуліктерді дақылдың дайын болуының ең ықтимал морфологиялық терезесі ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

Сонымен қатар, морфологиялық белгілер жасушалық өнімнің дайындық деңгейінің дербес критерийі ретінде қарастырыла алмайды [22]. Жарық және электрондық микроскопия дақылдың құрылымы, жасушалардың жағдайы және жасушалық стресс белгілері туралы маңызды ақпарат береді, алайда олар сандық, фенотиптік, микробиологиялық және функционалдық тестілерді алмастырмайды. Сондықтан

морфологиялық бағалау өнім сапасының жалғыз критерийі ретінде емес, оның зертханалық сипаттамасының құрамдас бөліктерінің бірі ретінде қолданылуы тиіс.

Электрондық микроскопиялық зерттеу жарық микроскопиясының деректерін толықтырып, жасушалардың жағдайының ультрақұрылымдық белгілерін бағалауға мүмкіндік берді. 21–23 тәуліктерде микровезикулалардың байқалуы мезенхималық стромалық жасушалардың паракриндік белсенділігі және жасушадан тыс везикулалардың жасушааралық коммуникациядағы рөлі туралы деректерді ескере отырып қызығушылық тудырады. Алайда осы жұмыста микровезикулалар тек морфологиялық тұрғыдан бағаланды. Сондықтан олардың функционалдық маңызын жасушадан тыс везикулаларды талдаудың қосымша сандық және молекулалық әдістерінсіз анықтау мүмкін емес [23].

Кардиологиялық қосалқы блоктағы левосименданмен жүргізілген ізденістік модульді дақылдың фармакологиялық реттелуін *in vitro* жағдайында алдын ала бағалау ретінде қарастыру қажет. Алынған бақылаулар негізгі салыстырмалы талдауға енгізілген жоқ және клиникалық тиімділік немесе трансплантация алдындағы өңдеудің артықшылықтары туралы қорытынды жасауға мүмкіндік бермейді. Бұл блок метаболикалық және митохондриялық қолдаудың жасушалық дақылдардың ультрақұрылымдық жағдайына әсерін одан әрі зерттеу үшін ғана негіз ретінде қарастырылуы мүмкін.

Зерттеудің мықты жағы созылмалы аурулары бар пациенттердің сүйек кемігі материалын пайдалану болып табылады, бұл зертханалық модельді ықтимал аутологиялық қолдану жағдайларына жақындатады. Шартты түрде дені сау донорлардың материалында жүргізілген зерттеулерден айырмашылығы, мұндай тәсіл созылмалы қабыну, аутоиммундық белсенділік, метаболикалық бұзылыстар және ағзалық патологиямен байланысты жасушалық материалдың биологиялық вариабельділігін ескеруге мүмкіндік береді. Қосымша артықшылығына жасушаларды сандық есептеуді, фенотиптеуді, жарық микроскопиясын және электрондық микроскопиялық бағалауды біріктіру жатқызуға болады.

Зерттеудің шектеулері нозологиялық когортаның гетерогенділігін, L-глутамин бойынша салыстырмалы блоктағы үлгілер санының аздығын, мезенхималық стромалық жасушалар маркерлерінің толық панелінің болмауын, үш бағытты дифференциацияны бағалаудың жүргізілмеуін және жасушалық өнімді шығару критерийлерінің толық жиынтығының болмауын қамтиды. Сонымен қатар, морфологиялық бағалау негізінен сипаттамалық сипатта болды және сандық морфометриямен сүйемелденген жоқ. Бұл шектеулер нәтижелерді интерпретациялау және алдағы зерттеулерді жоспарлау кезінде ескерілуі тиіс.

Осылайша, зерттеу нәтижелері созылмалы аурулары бар пациенттерде аутологиялық композитті сүйек кемігінің жасушалық өнімін алу және сипаттаудың зертханалық кезеңін сипаттайды. Оңтайландырылған дақылдандыру жағдайлары жасушалардың соңғы концентрациясының артуымен қатар жүрді, ал фенотиптік және морфологиялық деректер алынған дақылдың гетерогенді сипатын растады. Алдағы зерттеулер жасушалық өнімнің құрамын, қауіпсіздігін, өміршендігін және функционалдық белсенділігін кеңейтілген стандарттауға бағытталуы тиіс.

Қорытынды. Аутологиялық сүйек кемігінің жасушалық материалын L-глутаминді мөлшерлеп қосу арқылы оңтайландырылған өсіру жасушалардың соңғы концентрациясының жоғарылауымен және дақылдың морфологиялық жетілуімен қатар жүрді. Дақылдың ең қолайлы белгілері 21–23-тәуліктерде байқалды. Фенотиптік бейіні өнімнің стромамен байланысты, гемопоэздік/прогениторлық және иммунорегуляторлық компоненттерді қамтитын композиттік табиғатын көрсетеді. Одан әрі стандарттау

жасушалық өнімнің қауіпсіздігі, тіршілікке қабілеттілігі, сәйкестілігі, тазалығы және функционалдық белсенділігі критерийлерін қамтуы тиіс.

Мүдделер қақтығысы. Авторлар мүдделер қақтығысы жоқ екенін мәлімдейді.

Авторлардың үлестері. Тұжырымдама, ЭЧ, АБ және МШ; әдістеме, БА; қолжазбаны жазу және дайындау, ЭЧ, АБ, АГ, АЖ, МА, МШ, БА; жазу – шолу және редакциялау, ЭЧ, АБ, АГ, АЖ, МА, МШ, БА жобаны әкімшілендіру, БА; қаржыландыруды тарту, БА. Барлық авторлар қолжазбаның жарияланған нұсқасын оқып, онымен келісінмін білдірді. Авторлар бұл материалдың бұрын жарияланбағанын және басқа баспаларда қарастырылып жатқан жоқ екенін мәлімдейді.

Қаржыландыру. Зерттеу және қолжазба BR28713159 «Созылмалы және әлеуметтік маңызды ауруларды емдеуге арналған жасушалық өнім жасаудағы инновациялық тәсілдер» гранттық жобасы шеңберінде дайындалды.

Деректердің қолжетімділігі туралы мәлімдеме. Осы зерттеудің нәтижелерін қолдайтын деректер мақала мәтінінің ішінде қамтылған.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo ATL, Nguyen QT, Phan TTK, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. Signal transduction and targeted therapy. 2022;7(1):272. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>.
2. Ntege EH, Sunami H, Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. Regenerative Therapy. 2020;14:136-53. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.01.004>.
3. Ganina AM, Akhaeva AA, Zhunusov AZh, Zhakupova AKh, Ulyanova OV, Kozina LV, Fakhradiyev IR. Perinatal mesenchymal stem cells and their cell-free derivatives in type 1 and type 2 diabetes: a systematic review. Vestnik KazNMU. 2025;4(75):18-42. <https://doi.org/10.53065/kaznmu.2025.75.4.102>.
4. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? Stem cells translational medicine. 2012;1(5):403-8. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0064>.
5. Fontaine MJ, Shih H, Schäfer R, Pittenger MF. Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. Transfusion medicine reviews. 2016;30(1):37-43. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2015.11.004>.
6. Xie Y, Liu W, Liu S, Wang L, Mu D, Cui Y, et al. The quality evaluation system establishment of mesenchymal stromal cells for cell-based therapy products. Stem cell research & therapy. 2020;11(1):176. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01696-6>.
7. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
8. Goodman SB, Zwingenberger S. Concentrated autologous bone marrow aspirate is not "stem cell" therapy in the repair of nonunions and bone defects. Biomaterials and biosystems. 2021;2:100017. <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2021.100017>.
9. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2021;78(2):447-67. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>.
10. Nie Y, Lau C, Lie A, Chan G, Mok M. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 2010;19(7):850-9. <https://doi.org/10.1177/0961203309361482>.
11. Higuera GA, Schop D, Spitters TW, van Dijkhuizen-Radersma R, Bracke M, de Bruijn JD, et al. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem

- cells. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(5-6):654-64. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0223>.
12. Calcat ICS, Rendra E, Scaccia E, Amadeo F, Hanson V, Wilm B, et al. Harmonised culture procedures minimise but do not eliminate mesenchymal stromal cell donor and tissue variability in a decentralised multicentre manufacturing approach. *Stem cell research & therapy*. 2023;14(1):120. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03352-1>.
 13. Shaz BH, Schäfer R, Fontaine MJ, Norris PJ, McKenna DH, Jin P, et al. Local manufacturing processes contribute to variability in human mesenchymal stromal cell expansion while growth media supplements contribute to variability in gene expression and cell function: a Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) collaborative study. *Cytotherapy*. 2024;26(6):531-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2023.11.003>.
 14. Renesme L, Cobey KD, Lalu MM, Bubela T, Chinnadurai R, De Vos J, et al. Delphi-driven consensus definition for mesenchymal stromal cells and clinical reporting guidelines for mesenchymal stromal cell-based therapeutics. *Cytotherapy*. 2025;27(2):146-68. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.10.008>.
 15. Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(5):643-52. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0196>.
 16. Nagai H, Miwa A, Yoneda K, Fujisawa K, Takami T. Optimizing the Seeding Density of Human Mononuclear Cells to Improve the Purity of Highly Proliferative Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*. 2023;10(1). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10010102>.
 17. Barreto-Durán E, Mejía-Cruz CC, Leal-García E, Pérez-Núñez R, Rodríguez-Pardo VM. Impact of donor characteristics on the quality of bone marrow as a source of mesenchymal stromal cells. *American journal of stem cells*. 2018;7(5):114-20.
 18. Trivedi A, Miyazawa B, Gibb S, Valanoski K, Vivona L, Lin M, et al. Bone marrow donor selection and characterization of MSCs is critical for pre-clinical and clinical cell dose production. *Journal of translational medicine*. 2019;17(1):128. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1877-4>.
 19. Zhukareva V, Obrocka M, Houle JD, Fischer I, Neuhuber B. Secretion profile of human bone marrow stromal cells: donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine*. 2010;50(3):317-21. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.01.004>.
 20. Robb KP, Fitzgerald JC, Barry F, Viswanathan S. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. *Cytotherapy*. 2019;21(3):289-306. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.10.014>.
 21. Danisovic L, Oravcova L, Krajciova L, Varchulova Novakova Z, Bohac M, Varga I, et al. Effect of long-term culture on the biological and morphological characteristics of human adipose tissue-derived stem Cells. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2017;68(1):149-58.
 22. Guadix JA, López-Beas J, Clares B, Soriano-Ruiz JL, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Principal Criteria for Evaluating the Quality, Safety and Efficacy of hMSC-Based Products in Clinical Practice: Current Approaches and Challenges. *Pharmaceutics*. 2019;11(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110552>.
 23. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*. 2018;7(1):1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

Авторлар туралы мәліметтер

Чувакова Эльмира Келесқызы, м.ғ.к., «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ ғылым жөніндегі Басқарма төрағасының орынбасары, Астана, Қазақстан, e.chuvakova@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-4745-1330>.

Байгенжин Абай Қабатайұлы, м.ғ.д., «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ Басқарма төрағасы, Астана, Қазақстан, a.baigenzhin@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-7703-5004>.

Ганина Анастасия Михайловна, биотехнолог, «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ жасушалық технологиялар және трансплантациялар бөлімінің меңгерушісі, Астана, Қазақстан, anastassiya_smelova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2047-1497>.

Жунусов Ануар Жанатұлы, хирург, «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ фетальды жасушалар трансплантациясы бөлімінің жетекшісі, Астана, Қазақстан, dr.anuar.zhunussov@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-4188-8700>

Аскаров Манарбек Бапұлы, хирург, м.ғ.д., «Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ Фундаменталды және қолданбалы медицина институтының директоры, Астана, Қазақстан, illak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4881-724X>.

Шоранов Марат Едігеұлы, м.ғ.к., «С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» Басқарма төрағасы – ректор, Алматы, Қазақстан, shoranov.m@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0009-0009-8373-2496>.

@Асембеков Батырбек Сейтзадаұлы, м.ғ.к., қауымдастырылған профессор, Б. Атшабаров атындағы Фундаменталды және қолданбалы медицина ғылыми-зерттеу институтының басшысы, Алматы, Қазақстан, assembekov.b@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0000-0001-6149-2748>.

Сведения об авторах

Чувакова Эльмира Келесовна, к.м.н., заместитель председателя правления по науке АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан, e.chuvakova@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-4745-1330>.

Байгенжин Абай Кабатаевич, д.м.н., Председатель правления АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан, a.baigenzhin@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-7703-5004>.

Ганина Анастасия Михайловна, биотехнолог, руководитель отдела клеточных технологий и трансплантаций АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан, anastassiya_smelova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2047-1497>.

Жунусов Ануар Жанатович, хирург, руководитель отдела трансплантации фетальных клеток АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан, dr.anuar.zhunussov@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-4188-8700>.

Аскаров Манарбек Бапович, хирург, д.м.н., директор Института фундаментальной и прикладной медицины АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан, illak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4881-724X>.

Шоранов Марат Едигеевич, к.м.н., Председатель правления – ректор Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан, shoranov.m@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0009-0009-8373-2496>.

@Асембеков Батырбек Сейтзадаұлы, к.м.н., ассоциированный профессор, руководитель научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атчабарова, Алматы, Казахстан, assembekov.b@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0000-0001-6149-2748>.

Information about authors

Chuvakova Elmira Kelesovna, Candidate of Medical Sciences, Deputy Chairman of the Management Board for Science, JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan, e.chuvakova@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-4745-1330>.

Baigenzhin Abay Kabataevich, Doctor of Medical Sciences, Chairman of the Management Board, JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan, a.baigenzhin@nmmc.kz, <https://orcid.org/0000-0002-7703-5004>.

Ganina Anastasia Mikhailovna, Biotechnologist, Head of the Department of Cell Technologies and Transplantation, JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan, anastassiya_smelova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2047-1497>.

Zhunosov Anuar Zhanatovich, Surgeon, Head of the Department of Fetal Cell Transplantation, JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan, dr.anuar.zhunosov@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0008-4188-8700>.

Askarov Manarbek Bapovich, Surgeon, Doctor of Medical Sciences, Director of the Institute of Fundamental and Applied Medicine, JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan, illak@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4881-724X>.

Shoranov Marat Yedigeevich, Candidate of Medical Sciences, Chairman of the Management Board – Rector, S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan, shoranov.m@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0009-0009-8373-2496>.

@Asembekov Batyrbek Seitzadauly, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the B. Atshabarov Research Institute of Fundamental and Applied Medicine, Almaty, Kazakhstan, assembekov.b@kaznmu.kz, <https://orcid.org/0000-0001-6149-2748>.

OPTIMIZATION OF AN AUTOLOGOUS COMPOSITE BONE MARROW CELL PRODUCT IN CHRONIC DISEASES

E.K. CHUVAKOVA¹, A.K. BAIGENZHIN¹, A.M. GANINA¹, A.ZH. ZHUNUSOV¹,
M.B. ASKAROV¹, M.E. SHORANOV², B.S. ASSEMBEKOV²

¹ JSC “National Scientific Medical Center”, Astana, Kazakhstan

² S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

Abstract

Introduction. The quality of an autologous bone marrow-derived cellular product in chronic disease depends on culture conditions, phenotypic composition and morphological maturation, not only on the cellular source.

Aim. To evaluate the generation and laboratory characterization of an autologous composite bone marrow-derived cellular product obtained from patients with chronic diseases.

Materials and methods. A laboratory-based translational study was conducted at the National Scientific Medical Center. The manufacturing cohort included 132 patients with cardiovascular, autoimmune, metabolic and hepatobiliary diseases. Bone marrow aspirates were processed to obtain a composite cellular fraction. Culture conditions with and without L-glutamine, automated cell counting, flow cytometry, light microscopy and electron microscopy were assessed.

Results. Final post-culture cell concentration was higher in L-glutamine-supplemented cultures: median 4.01×10^6 cells/ml versus 2.30×10^6 cells/ml without L-glutamine ($p=0.036$). Median fold expansion was 37.9 and 10.8, respectively ($p=0.095$). Flow cytometry demonstrated a heterogeneous product containing MSC-associated, hematopoietic/progenitor

and immunoregulatory populations. The most favorable morphological features were observed on culture days 21-23.

Conclusion. The optimized culture protocol increased cell yield and supported morphological maturation of the composite bone marrow-derived product. Further standardization of release, safety and potency criteria is required before clinical translation.

Key words: cell therapy, chronic disease, bone marrow, mesenchymal stem cells, cell culture techniques, regenerative medicine, chronic disease.

ОПТИМИЗАЦИЯ АУТОЛОГИЧНОГО КОМПОЗИТНОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Э.К. ЧУВАКОВА¹, А.К. БАЙГЕНЖИН¹, А.М. ГАНИНА¹, А.Ж. ЖУНУСОВ¹,
М.Б. АСКАРОВ¹, М.Е. ШОРАНОВ², Б.С. АСЕМБЕКОВ²

¹ АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан

² Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

Аннотация

Введение. Качество аутологичного костномозгового клеточного продукта при хронических заболеваниях зависит не только от источника клеток, но и от условий культивирования, фенотипического состава и морфологической зрелости культуры.

Цель. Оценить возможность получения и лабораторной характеристики аутологичного композитного клеточного продукта костного мозга у пациентов с хроническими заболеваниями.

Материалы и методы. Проведено лабораторно-трансляционное исследование на базе АО «Национальный научный медицинский центр». В производственную когорту вошли 132 пациента с кардиологическими, аутоиммунными, метаболическими и гепатобилиарными заболеваниями. Костномозговой аспират обрабатывали с получением композитной клеточной фракции. Оценивали культивирование в стандартных условиях и с добавлением L-глутамин, автоматический подсчет клеток, фенотипирование, световую и электронную микроскопию.

Результаты. Конечная концентрация клеток после культивирования была выше в культурах с L-глутамином (медиана $4,01 \times 10^6$ клетки/мл против $2,30 \times 10^6$ клетки/мл без L-глутамин), $p=0.036$. Медиана кратности прироста составила 37,9 и 10,8 соответственно ($p=0.095$). Фенотипирование выявило гетерогенный продукт с МСК-ассоциированными, гемопоэтическими/прогениторными и иммунорегуляторными популяциями. Наиболее благоприятные морфологические признаки наблюдались на 21-23 сутки культивирования.

Заключение. Оптимизированное культивирование повышало клеточный выход и сопровождалось морфологическим созреванием композитного костномозгового продукта. Полученные данные поддерживают необходимость дальнейшей стандартизации критериев качества и безопасности перед клиническим применением.

Ключевые слова: клеточная терапия, хроническое заболевание, костный мозг, мезенхимальные стромальные клетки, методы культивирования клеток, регенеративная медицина.