

# Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани и фибробласты – выбор клеточной составляющей для биологических трансплантатов

В.Г. Богдан<sup>1</sup>, М.М. Зафранская<sup>2</sup>, Ю.М. Гаин<sup>2</sup>, Ю.Е. Демидчик<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

**Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells of and fibroblast's cultures – choice of biological transplants cellular component**

V.G. Bogdan<sup>1</sup>, M.M. Zafranskaya<sup>2</sup>, Y.M. Gain<sup>2</sup>, Y.E. Demidchik<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

С целью осуществления выбора клеточной составляющей сложных многокомпонентных биологических трансплантатов для реконструктивно-восстановительной хирургии проведена оценка пролиферативного потенциала, морфологических и фенотипических характеристик культур клеток мезенхимального происхождения. Установлено, что первичная культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ) по своему пролиферативному потенциалу превосходит культуры фибробластов кожи и апоневроза. Культуры МСК ЖТ, фибробластов кожи, апоневроза и линии постнатальных фибробластов Foreskin характеризовались едиными морфологическими особенностями, обладали высокой жизнеспособностью и устойчивостью к средовым факторам. Первичная культура МСК ЖТ характеризовалась гетерогенной структурой с наличием клеток с гемопоэтическими маркерами CD34, CD31, CD45. Начиная с 1 пассажа, культуры клеток ЖТ приобрели характерный для ММСК клеточный фенотип CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>, который сохранялся вплоть до 3 пассажа. Стабильно высокий уровень экспрессии маркера CCR7, не меняющийся при пассировании, возможно является одним из признаков, специфичных для фенотипа ММСК ЖТ. Высокий пролиферативный потенциал ММСК, выраженная миграционная способность, морфологическое и фенотипическое единство с культурами фибробластов, отработанный протокол выделения из жировой ткани свидетельствует о преимуществе использования ММСК ЖТ в качестве клеточной составляющей для создания биологических трансплантатов.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани, фибробласты, пролиферативный потенциал, клеточный фенотип, морфологические особенности, миграционная способность.

Прогресс и глубокие исследования в области клеточных и молекулярных технологий в начале XXI в. не только в целом обогатили фундаментальную науку и медицину новыми знаниями и позволили достоверно обосновать понимание существующих закономерностей и ранее предложенных гипотез, но в то же время расширили перечень инновационных и актуальных областей для исследований.

Перспектива применения клеточных технологий в реконструктивно-восстановительной хирургии основывается на возможности получения культур

The estimation of proliferative potential, morphological and phenotypic characteristics of mesenchymal origin cultures for the purpose of a choice of the difficult multicomponent biological transplants cellular component for reconstructive-regenerative surgery was done. It's determined that the primary culture of adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells (adMSCs) is superior to skin fibroblasts and aponeurosis cultures in proliferative capacity. adMSCs, skin fibroblasts, the aponeurosis and the postnatal fibroblasts (Foreskin line) cultures are characterized by identical morphological features with the high viability and resistance to environmental factors. Primary cultures of adMSCs are characterized by heterogeneous structure with the presence of cells with hemopoietic CD34, CD31, CD45 markers. Cultures from the 1 till 3 passages assumed cellular phenotype as CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> characteristic for MSCs. Level of CCR7 expression was high and did not change while passaging that possible could be one of the specific for adMSCs phenotype features. High proliferative potential, expressed migratory ability, morphological and phenotypic similarity with the fibroblasts cultures, the elimination from adipose tissue well-tested protocol indicates the advantages of adMSCs application as a cell-component to build biological transplants.

**Key words:** adipose tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells, fibroblasts, proliferative capacity, cell phenotype, morphology, migratory ability.

ауто- или аллогенных клеток с заданными свойствами [1–5]. Наиболее востребованными для этих целей признаются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) [6–8]. В современных условиях среди всех популяций постнатальных стволовых и прогениторных клеток значительное внимание уделено ММСК жировой ткани (ЖТ), к преимуществам использования которой можно отнести простоту и малоинвазивность способа эксплантации их тканевого источника, большой «выход» клеток при выделении [8–12].

e-mail: bogdan-5@mail.ru

Перспективными в настоящее время являются исследования по разработке многокомпонентных тканеинженерных конструкций для хирургического лечения пациентов с обширными дефектами мягких тканей и, в частности, с послеоперационными вентральными грыжами [2, 3, 13–15].

Одним из ключевых вопросов в решении этой задачи с применением тканеинженерных подходов является обоснованный выбор клеточной составляющей биологического трансплантата.

В современных литературных источниках достаточно много внимания уделено изучению морфологии и фенотипа ММСК, в том числе выделенных из ЖТ. Именно эти характеристики и определены Комитетом по стволовым клеткам Международного общества клеточной терапии как специфичные для ММСК: а) адгезия к культуральному пластику и фибробластоподобная морфология; б) специфический иммунофенотип (экспрессия CD73, CD90, CD105 и отсутствие экспрессии CD34, CD45, HLA-DR); в) способность дифференцироваться в трех ортодоксальных направлениях — остеогенном, адипогенном и хондрогенном [16].

Вместе с тем, отсутствие уникального маркера для ММСК побуждает к более детальному изучению фенотипа клеточных культур с определением более обширного спектра антигенов [17]. Также в доступной нам литературе отсутствуют систематизированные данные о сравнительных исследованиях пролиферативной активности, морфологических и фенотипических особенностей культур ММСК ЖТ и фибробластов, полученных из различных источников с комплексным анализом возможности применения изучаемых клеток в лечении пациентов с обширными послеоперационными дефектами.

Таким образом, исследование направлено на осуществление выбора клеточной составляющей сложных многокомпонентных биологических трансплантатов для реконструктивно-восстановительной хирургии на основании оценки пролиферативного потенциала, морфологических и фенотипических характеристик культур клеток мезенхимального происхождения.

### **Материал и методы**

Проведение научного исследования было одобрено этическим комитетом УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко г. Минска», с подписанием пациентами информированного согласия на предоставление биологического материала, а также использование полученной в результате исследований информации для научных отчетов, статей, докладов, диссертационных работ. В исследование были включены 5 пациентов с послеоперационными вентральными грыжами больших размеров в качестве доноров жировой ткани и фрагментов апоневроза и кожи передней брюшной стенки, использованных для выделения ММСК и фибробластов.

#### *Получение биологического материала*

Эксплантацию биологического материала у пациента с послеоперационной вентральной грыжей больших размеров выполняли инцизионным способом. Полученные фрагменты подкожной жировой клетчатки в объеме до 5 см<sup>3</sup> участок кожи и апоневроза площадью до 2 см<sup>2</sup>, помещали в герметичный контейнер со стерильным раствором и транспорти-

ровали в течение ближайших 2 ч в лабораторию для выделения и культивирования ММСК ЖТ и фибробластов. Все пациенты подписывали информированное согласие.

#### *Выделение и культивирование ММСК ЖТ*

Для выделения ММСК гомогенизированную ЖТ промывали стерильным раствором Хенкса и инкубировали в течение 45 мин с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, США) (НИИ ЭИМ, РБ). Полученные в результате обработки коллагеназой клетки дважды отмывали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с пониженным содержанием глюкозы 1000 мг/мл (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС, 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и высевали в концентрации 5×10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup> в культуральные чашки диаметром 60 мм [12].

Смену среды производили каждые четвертые сутки. По достижении культурами ≈75% конfluenceности монослоя клетки снимали с поверхности культурального пластика с помощью 0,25% раствора трипсина/ЭДТА, затем трипсин ингибировали добавлением ФСБ, содержащего 10% ЭТС; после двукратного отмывания центрифугированием клетки засеивали в культуральные чашки в концентрации 1×10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup>.

#### *Выделение и культивирование фибробластов, полученных из различных источников*

Для выделения фибробластов человека использовали эксплантированные фрагменты кожи и апоневроза передней брюшной стенки (n = 5). Для расслоения кожи по базальной мембране и отделения дермы от эпидермиса кусочки кожи размером 1 см<sup>2</sup> инкубировали в 0,25% диспазе (Sigma, США) в течение 24 ч при 4°C. Дерму или фрагмент апоневроза передней брюшной стенки промывали стерильным раствором Хенкса, нарезали на участки размером 0,5 см<sup>2</sup> и инкубировали в течение 2 ч с 0,2% раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в ФСБ при 37°C. Нейтрализацию фермента проводили равным объемом ФСБ, содержащего 10% ЭТС. Полученные в результате обработки коллагеназой клетки дважды отмывали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде IMDM (Sigma, США) с добавлением 10% ЭТС, 100 У/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и высевали в концентрации 5×10<sup>4</sup> кл/см<sup>2</sup> в культуральные чашки диаметром 60 мм [12]. Смену среды производили каждые четвертые сутки.

Также в исследовании использовалась культура постнатальных фибробластов человека линии Foreskin (Human Foreskin Fibroblasts — HFF) [коллекция ATCC CRL 2429, ИИЦ РАН].

#### *Микроскопия и мониторинг клеточных культур*

Культуры исследовали на универсальных инвертированных микроскопах Micros (Австрия) и Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и

VareI-контрастов, эпифлуоресценции (окраска акридиновым оранжевым и Хекстом 33342/пропидий йодидом).

#### Оценка жизнеспособности клеток

Для оценки жизнеспособности культуры ММСК на разных этапах культивирования применялся метод витальной окраски клеток флуоресцентным красителем Хекстом-33342 (Sigma, Германия) в рабочей концентрации  $10^{-5}$  М.

#### Иммунофенотипирование клеточных культур

Для изучения экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров культурами клеток использовали мышинные моноклональные антитела (МАТ) к антигенам CD90-FITC, CD105-PE, CD44-FITC, CD34-APC, CD31-FITC/PE, CD45-PC7, CD119-PE, HLA-DR-PE, HLA-ABC-PE (Beckman Coulter, США), CCR7-PE (R&D Systems, Канада). Для внутриклеточного окрашивания клетки предварительно фиксировали и пермеабилizировали с использованием набора IntraPrep™ Permeabilization Reagent (R&D Systems, Канада). ММСК в концентрации  $1 \times 10^5/200$  мкл переносили в пробирки для проточной цитометрии, инкубировали с моноклональными антителами в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. После окончания инкубации, клетки осаждали центрифугированием. Измерения проводили с использованием проточного цитометра FC 500 (Beckman Coulter, США).

#### Статистическая обработка полученных результатов

Статистическая обработка данных осуществлена с применением прикладного программного пакета «STATISTICA 6,0» (StatSoft, USA). Результаты представлены в формате Me (25-й–75-й процентиля). Для сравнения динамики изменения показателя в исследуемых группах использовали критерий Вилкоксона для парных сравнений. При сравнении показателей в независимых группах применяли U-критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  [18].

#### Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ пролиферативного потенциала первичных культур ММСК ЖТ, фибробластов кожи и апоневроза пациентов с послеоперационными вентральными грыжами. Результаты представлены в табл. 1.

Полученные клеточные культуры отличались различной посевной концентрацией, скоростью роста, количеством клеток в первичной культуре.

Достоверное увеличение количества клеток первичной культуры более, чем в 2 раза выявлено только для ММСК ЖТ (с  $1 \times 10^6$  ( $0,6 \times 10^6$ – $1,4 \times 10^6$ ) до  $2,1 \times 10^6$  ( $2 \times 10^6$ – $2,2 \times 10^6$ , соответственно).

Для стандартизации полученных результатов производился пересчет увеличения клеточности культур из расчета на  $1 \times 10^6$  посеянных клеток. Показано, что МСК ЖТ характеризовались наибольшей скоростью пролиферации с количеством клеток в первичной культуре  $2,1 \times 10^6$  ( $2 \times 10^6$ – $2,2 \times 10^6$ ) после 2-недельного культивирования, в то время как фибробласты кожи отличались наименьшим показателем ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, при аналогичных сроках культивирования использование жировой ткани позволяет получить наибольший объем клеточного материала по сравнению с кожей и апоневрозом.

Сравнение на светооптическом уровне морфологической картины первичных культур клеток, выделенных из различных источников, не выявило существенных отличий. Культуры ММСК ЖТ, фибробластов кожи и апоневроза характеризовались сходным гомогенным клеточным составом, включающим веретеновидные, фибробластоподобные клетки с четко выраженным ядром, ядрышками и цитоплазматической перинуклеарной зернистостью (рис. 1).

Дальнейшее культивирование ММСК ЖТ позволило установить ряд особенностей. Благодаря высокому пролиферативному потенциалу, в течение 3–5 сут. культивирования образовывалось большое количество варьирующих по размеру колоний клеток с многочисленными межклеточными контактами (рис. 2А). К 14–20 сут. культивирования равномерный конфлюэнтный монослой «вихреобразно» растущих клеток покрывал 85–95% культурального пластика (рис. 2Б).

Таблица 1. Длительность культивирования и количество клеток первичной культуры ММСК ЖТ, фибробластов кожи и апоневроза при посеве и после снятия с пластика

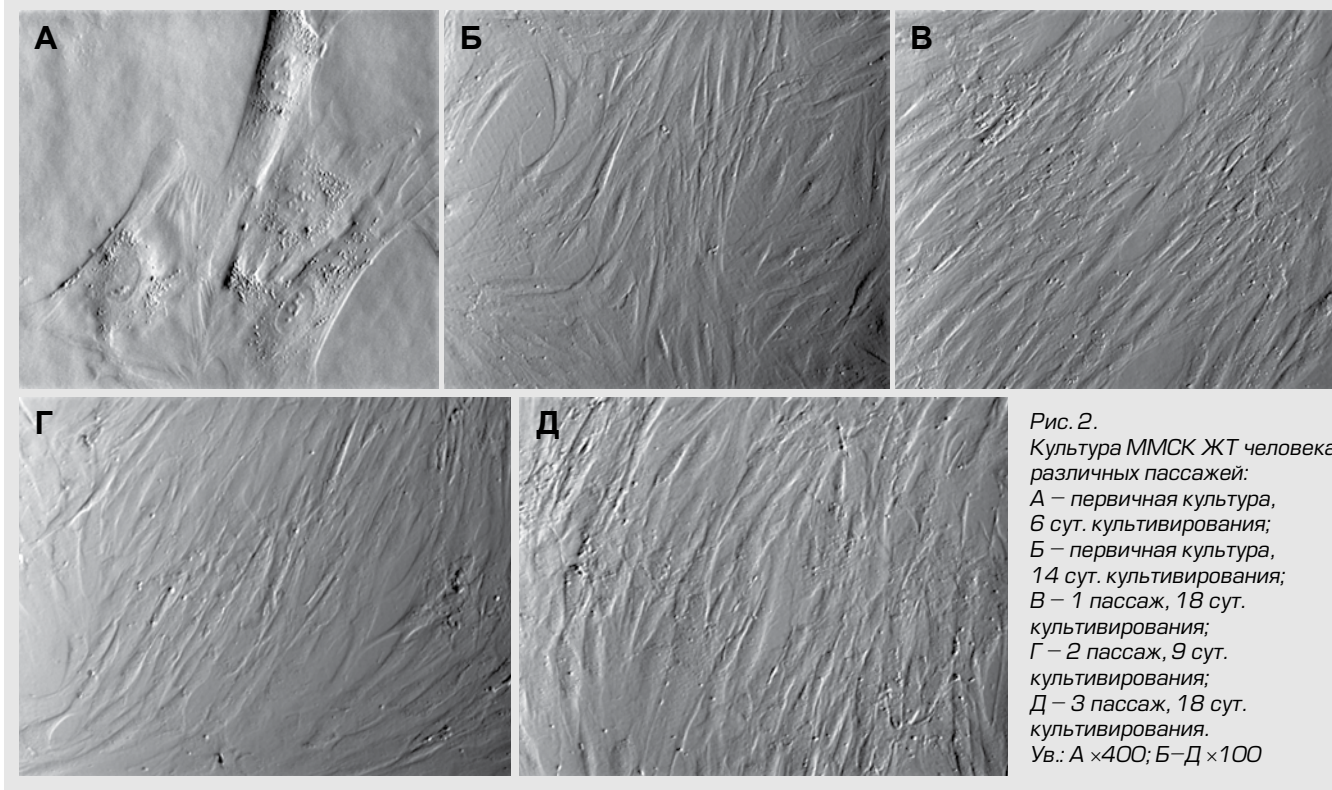
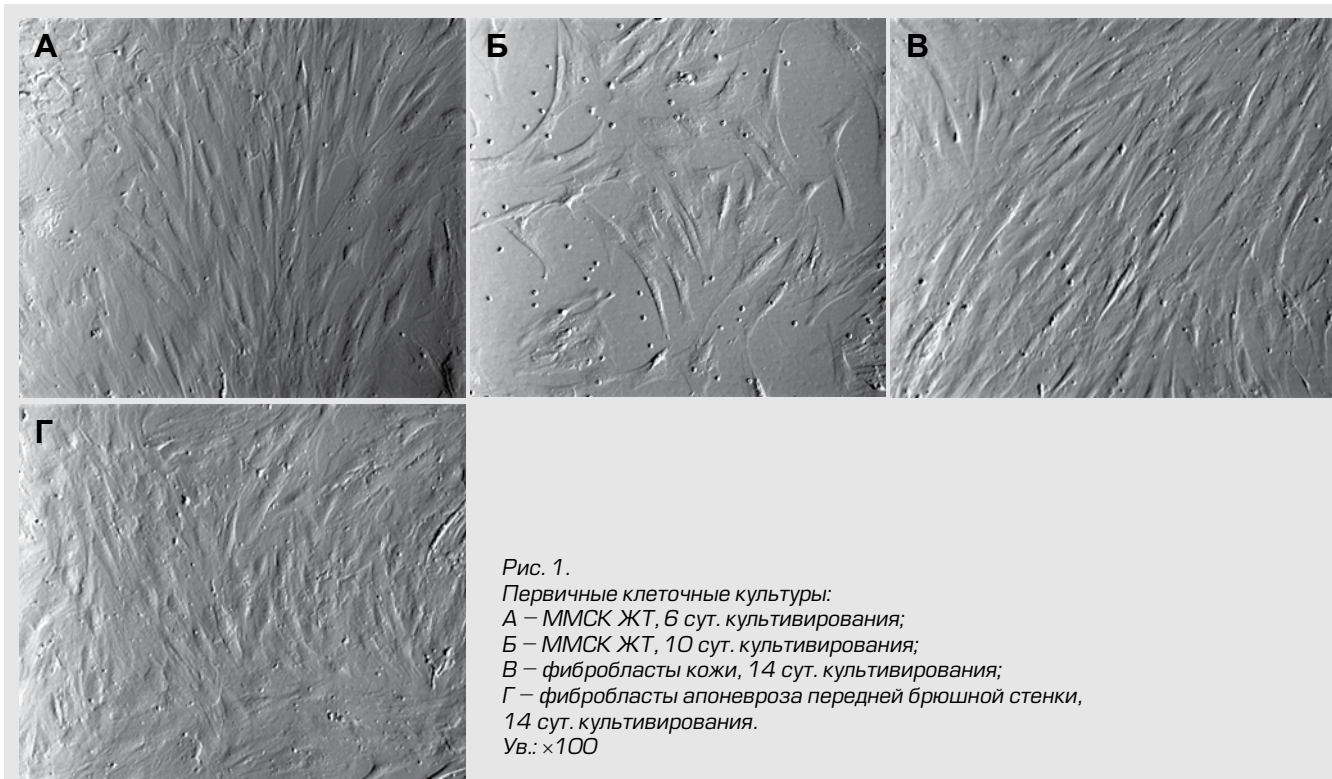
Вид первичной культуры	Количество клеток при посеве	Сроки культивирования, сутки	Количество клеток после снятия с пластика	Количество клеток после снятия с пластика (из расчета на $1 \times 10^6$ посеянных клеток)
ММСК ЖТ	$1 \times 10^6$ ( $0,6 \times 10^6$ – $1,4 \times 10^6$ )	15 (7–19)	$2,1 \times 10^6$ ( $2 \times 10^6$ – $2,2 \times 10^6$ )*	$2,1 \times 10^6$ ( $2 \times 10^6$ – $2,2 \times 10^6$ )**
Фибробласты кожи	$1,3 \times 10^6$ ( $0,5 \times 10^6$ – $3 \times 10^6$ )	20 (19–23)	$0,5 \times 10^6$ ( $0,4 \times 10^6$ – $0,9 \times 10^6$ )	$3,8 \times 10^5$ ( $3,1 \times 10^5$ – $4,2 \times 10^5$ )
Фибробласты апоневроза	$1,7 \times 10^6$ ( $1,3 \times 10^6$ – $2 \times 10^6$ )	20 (18–22)	$2 \times 10^6$ ( $0,9 \times 10^6$ – $2,1 \times 10^6$ )	$1,2 \times 10^6$ ( $0,7 \times 10^6$ – $1,4 \times 10^6$ )***

Примечание: \* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с количеством клеток при посеве; \*\* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с культурой фибробластов кожи и апоневроза; \*\*\* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с культурой фибробластов кожи.



С целью изучения возможных изменений морфологии клеток конфлюэнтные культуры ММСК ЖТ подвергались дальнейшему пассированию. В ходе мониторинга экспансии культур при пассировании был отмечен неравномерный рост клеток с образованием в субконфлюэнтной культуре зон гиперкон-

флюэнтности и участков с хаотично расположенными распластанными клетками (рис. 2В). Контактное торможение пролиферации в конфлюэнтных участках и низкий пролиферативный потенциал распластанных клеток приводили к увеличению сроков экспансии культуры (рис. 2 Г, Д).



На заключительных этапах культивирования проводилась оценка жизнеспособности культур с помощью методов витальной окраски клеток Хекстом 33342 (рис. 3). Жизнеспособность клеток составляла 96–98%.

В качестве положительного контроля использовалась культура постнатальных фибробластов человека 2 пассажа линии Foreskin (коллекция ATCC CRL 2429, ИНЦ РАН). Клетки характеризовались фибробластоподобной морфологией, с более мелкой и значительно выраженной цитоплазматической зернистостью по сравнению с ММСК (рис. 4).

Исследование культур фибробластов, выделенных из различных источников, не выявило существенных отличий их фенотипа от клеточного фенотипа ММСК ЖТ (табл. 2). Вместе с тем, проведенная оценка экспрессии поверхностных маркеров ММСК первичными культурами адгезивных клеток, выделенных из ЖТ, кожи, апоневроза передней брюшной стенки, а также фибробластов линии Foreskin, позволила выявить отдельные фенотипические особенности культуры ММСК ЖТ.

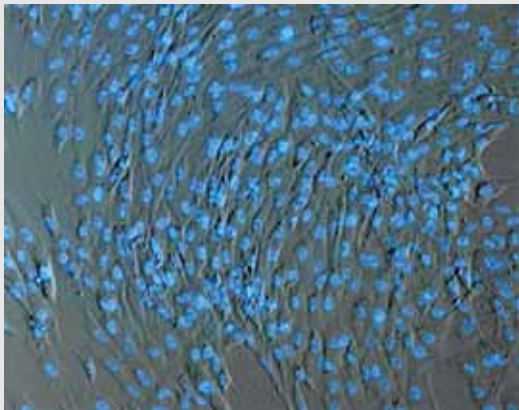


Рис. 3. ММСК ЖТ, 2-й пассаж, 10 сут. культивирования. Витальная окраска Хекстом 33342. Ув.:  $\times 100$

Нами подтверждена гетерогенная структура первичной культуры ММСК ЖТ с наличием клеток, экспрессирующих гемопозитические маркеры CD34, CD31, CD45, с достоверным увеличением CD34 относительно других клеточных линий. Также, культуры ММСК ЖТ, в отличие от дифференцированных фибробластов, экспрессировали хемокиновый рецептор CCR7 ( $p < 0,05$ ), характеризующий миграционную способность клеток.

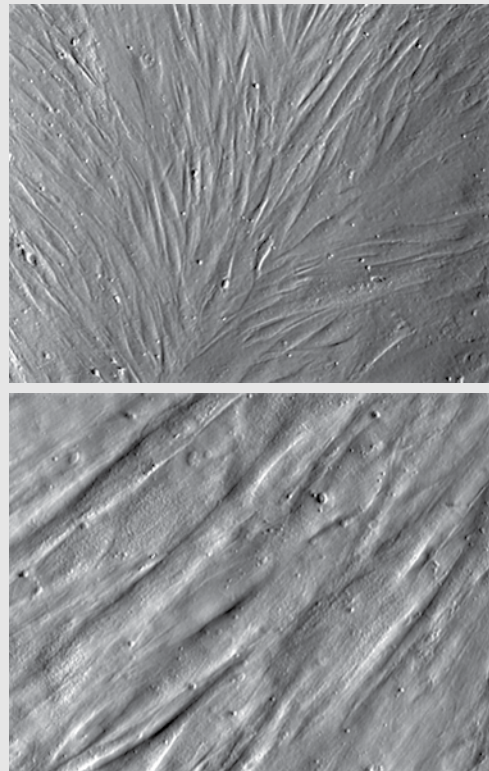


Рис. 4. Культура фибробластов человека линии Foreskin ATCC CRL 2429, 2-й пассаж, 10 сут. культивирования. Ув.: А  $\times 100$ ; Б  $\times 400$

Таблица 2. Иммунофенотипическая характеристика клеток

Поверхностные маркеры клеток	МСК ЖТ, первичная культура, Ме (25%–75%)	Фибробласты кожи, первичная культура, Ме (25%–75%)	Фибробласты апоневроза, первичная культура, Ме (25%–75%)	Фибробласты линии Foreskin, 3-й пассаж, Ме (25%–75%)
CD90	95,4(92,8–97,8)	84,02 (83,5–88,2)	81,9 (80,1–83,8)	99,1 (97,3–99,6)
CD105	97,7(96,8–99,3)	97,7 (96,3–98,2)	96,1 (95,4–97,1)	97,6(91,3–99,9)
CD44	93,6(84,3–99,7)	93,5 (91,2–96,3)	93,9 (91,8–95,1)	99,5 (99,3–99,8)
CD34	19,4(11,5–22,8)*	0,5(0,4–0,9)	0,3(0,2–1,0)	0,7 (0,2–1,1)
CD31	3,3(0,9–7,6)	0,3 (0,1–0,5)	0,4 (0,2–0,5)	0,5 (0,2–1,1)
CD45	2,0(1,78–2,28)	8,16 (3,8–9,2)	5,6 (4,1–8,1)	0,8 (0,6–1,8)
CD119	94,2(85,1–99,5)	99,78 (96,8–99,9)	92,5 (90,3–98,9)	91,9 (87,8–96,0)
CCR7	92,9(90,6–97,1)*	18,1(10,7–20,1)	9,8(5,1–13,9)	9,5(5,7–12,7)
HLA-ABC	99,6(97,3–99,9)	99,7(98,3–99,9)	99,1(98,1–99,8)	98,4(97,3–99,6)
HLA-DR	0,8(0,6–1,7)	0,04(0,01–0,08)	0,09(0,01–0,2)	2,8 (0,33–5,3)

Примечание: \* – различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ) при сравнении с культурами фибробластов.



В таблице 3 представлены основные фенотипические маркеры первичных культур и культур 1–3 пассажей ММСК ЖТ человека. Показано, что в первичных культурах адгезивных клеток, выделенных из ЖТ, наряду с экспрессией типичных для культур мезенхимального происхождения маркеров (CD90, CD105, CD44), часть клеток имели на своей поверхности маркеры гемопоэтических и эндотелиальных клеток CD34, CD31, CD45, экспрессия которых достоверно снижалась по мере пассирования, с сохранением стабильно высокого уровня CCR7. Таким образом, начиная с 1 пассажа, культуры клеток ЖТ приобретали характерный для ММСК клеточный фе-

нотип CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>. Данные фенотипические особенности сохранялись вплоть до 3 пассажа.

Было установлено, что количество фибробластов, позитивных по CCR7 рецептору, в среднем, составило 9,5%, тогда как в случае ММСК уровень экспрессии хемокинового рецептора достигал 89,4% (р < 0,05) (табл. 2–3).

В целом, высокий уровень CCR7 можно трактовать как выраженную миграционную способность ММСК ЖТ, по сравнению со зрелыми клетками фибропластического дифферона.

Таблица 3. Экспрессия антигенных маркеров ММСК ЖТ различных пассажей

Поверхностные маркеры клеток	МСК ЖТ, первичная культура, Ме (25%–75%)	МСК ЖТ, 1-й пассаж, Ме (25%–75%)	МСК ЖТ, 2-й пассаж, Ме (25%–75%)	МСК ЖТ, 3-й пассаж, Ме (25%–75%)
CD90	95,4(92,8–97,8)	97,9 (96,5–99,1)	98,1 (96,9–99,1)	98,7 (98,1–99,3)
CD105	97,7(96,8–99,3)	98,5 (95,3–99,3)	97,1 (93,8–98,2)	98,1 (95,9–99,1)
CD44	93,6(84,3–99,7)	95,1 (92,3–97,6)	99,4 (99,0–99,9)	99,1 (98,7–99,8)
CD34	19,6(9,7–29,0)	2,5 (1,7–3,9)	0,1 (0,0–0,3)	0,0 (0,0–0,0)
CD31	3,3(0,9–7,6)	1,3 (0,8–2,0)	0,4 (0,3–0,8)	0,1 (0,02–0,2)
CD45	2,0(1,78–2,28)	1,1 (0,7–1,8)	0,5 (0,3–0,9)	0,6 (0,3–1,0)
CD119	94,2(85,1–99,5)	97,3 (95,8–98,5)	91,5 (87,6–96,7)	90,2 (87,3–95,5)
CCR7	92,9(90,6–97,1)	87,9 (81,4–90,1)	91,3 (87,0–96,1)	89,4 (82,1–93,6)
HLA-ABC	99,6(97,3–99,9)	99,3 (99,1–99,9)	98 (95,0–98,9)	99,1 (98,6–99,8)
HLA-DR	0,8(0,6–1,7)	0,3 (0,1–0,5)	0,09 (0,01–0,2)	0,1 (0,03–0,3)

### Выводы

1. В первичной культуре ММСК ЖТ выявлена достоверная положительная динамика роста численности клеток и наибольшее их количество (из расчета на  $1 \times 10^6$  посеянных клеток), по сравнению с первичными культурами фибробластов кожи и апоневроза.

2. Культуры ММСК ЖТ, фибробластов кожи, апоневроза и линии постнатальных фибробластов Foreskin характеризуются едиными морфологическими особенностями, обладают высокой жизнеспособностью и устойчивостью к средовым факторам.

3. Подтверждена гетерогенность популяции первичной культуры стромальных клеток ЖТ с наличием клеток, экспрессирующих CD34, CD31, CD45, с достоверным преобладанием по маркеру CD34 относительно других клеточных линий.

4. Начиная с 1 пассажа культуры клеток ЖТ «очищались», приобретали характерный для ММСК клеточный фенотип CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD119<sup>+</sup>/

CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>, который сохранялся вплоть до 3-го пассажа клеточных культур.

5. Высокий уровень экспрессии CCR7 в культурах ММСК ЖТ, по сравнению со зрелыми клетками фибропластического дифферона, возможно, является одним из специфических признаков, который может быть использован как дополнительный маркер ММСК ЖТ.

6. Описанный высокий пролиферативный потенциал ММСК, выраженная миграционная способность, морфологическое и фенотипическое единство с культурами фибробластов и универсальная методика выделения из жировой ткани свидетельствует о преимуществе использования ММСК ЖТ в качестве клеточной составляющей для создания сложных многокомпонентных биологических трансплантатов для реконструктивно-восстановительной хирургии.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Егиев В.Н. Современное состояние и перспективы герниологии. Герниология 2006; 2(10): 5–10.

2. Егиев В.Н., Сологуб В.К., Чижов Д.В. и др. Сравнительная оценка степени фиксации фибробластов на синтетических эндопротезах, используемых для пластики дефектов передней брюшной стенки. Герниология 2006; 2(10): 37–41.

3. Гостевской А.А., Седов В.М., Хамид А.Х. и др. Сравнительный анализ полипропиленового и биологического сетчатых имплантатов в эксперименте. Медицинский академический журнал 2007; 7(3): 135–6.

4. Карлюк В.Б., Перова М.Д., Козлов В.А. и др. Экспериментальная модель реконструкции кости путем остеогенной трансформации аутоотрансплантированных свежеевыделенных стромальных

клеток жировой ткани. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии* 2007; 4: 14–8.

5. Skala C.E., Petry I.B., Gebhard S. et al. Isolation of fibroblasts for coating of meshes for reconstructive surgery: differences between mesh types. *Regen. Med.* 2009; 4(2): 197–204.

6. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J. Nippon. Med. Sch.* 2009; 76(2): 56–66.

7. Locke M., Windsor J., Dunbar P.R. et al. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J. Surg.* 2009; 79(4): 235–44.

8. Кирик В.М., Бутенко Г.М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной медицине. *Журнал АМН Украины* 2010; 16(4): 576–604.

9. Fraser J., Wulur I., Alfonso Z. et al. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. *Cytotherapy* 2007; 9(5): 459–67.

10. Zhu Y., Liu T., Song K. et al. Adipose-derived stem cell: A better stem cell than BMSC. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26(6): 664–75.

11. Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А. и др. Культивирование и характеристика негемопоэтических постнатальных стволовых клеток из жировой ткани человека. *Молекулярная медицина* 2006; 2: 23–9.

12. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 2001; 7(2): 211–28.

13. Мальцева Н.В., Панченко В.А., Прокопьева Е.Г. и др. Биоматрица на основе полипропиленовой сетки и эмбриональных фибробластов. Клеточные технологии в биологии и медицине 2008; 3: 128–31.

14. Langer C., Schwartz P., Krause P. et al. In-vitro study of the cellular response of human fibroblasts cultured on alloplastic hernia meshes. Influence of mesh material and structure. *Chirurg.* 2005; 76(9): 876–85.

15. Богдан В.Г., Зафранская М.М., Гаин Ю.М. и др. Сравнительная характеристика композиционных биоматриц с трехмерным желатиновым матриксом и мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани. Доклады Национальной академии наук Беларуси 2010; 54(3): 105–09.

16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–17.

17. Егорова В. А., Пономарёва А. С., Богданова Н. Б. и др. Характеристика фенотипа мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека методом проточной цитометрии. *Технологии живых систем* 2009; 5: 40–6.

18. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М. 2002.

Поступила 27.04.2012

**Система для проведения экстракорпорального фотофереза – UVAR XTS («Therakos», США)**

Экстракорпоральный фотоферез представляет собой метод, основанный на сочетании лазерфереза и отлучения лейкоцитов, предварительно обработанных фотосенсибилизатором (8-метоксиэтилораленом), ультрафиолетовым светом диапазона А (320 – 400 нм).

**Область применения:**

- Лечение онкологических, аутоиммунных, дерматологических и пролиферативных заболеваний:
- кожная Т-клеточная лимфома
- уменьшение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ)
- профилактика отторжения органов после трансплантации
- склеродермия
- дерматиты, псориаз
- ревматоидный артрит
- болезнь Крона

**Особенности системы:**

**Безопасность для пациента:**

- однократная система расходных материалов
- исключение риска воздушной эмболии
- исключение риска заражения
- осуществление контроля поступления антикоагулянта
- контроль давления в системе
- контроль скорости забора и возврата крови пациенту
- возможность изменения параметров процесса в течение процедуры
- при необходимости автоматическая блокировка системы магистралей

**Простота в работе и обслуживании:**

- удобное использование для оператора
- конструкция аппарата и расходных материалов исключает возможность ошибок при загрузке
- однократная вентуляция
- полная автоматизация процедуры
- быстрое и безопасное извлечение компонентов процедурного набора после завершения процедуры
- наличие ключа данных, на котором фиксируется вся информация о протекании процесса

**Система для выделения стволовых клеток – Serax («BioSafe», Швейцария)**

- Самая современная, компактная, мобильная система, позволяющая выделять гемопоэтические стволовые клетки из пуповинной, периферической крови, костного мозга, а также осуществлять их отмывку после криохранения
- Идеальная система для быстрой автоматической обработки крови или ее компонентов с высоким уровнем жизнеспособности клеток после процедуры
- Serax позволяет проводить 9 протоколов (выделение стволовых клеток, концентрация стволовых клеток в их отмывке)
- Принцип действия Serax основан на сепарации центрифугированием, позволяющем разделять компоненты крови в соответствии с их плотностью и размером
- Система предназначена для применения в онкогематологии и клеточной терапии (регенеративной медицине), где необходимо получение определенных компонентов крови
- Обработка крови или ее компонентов происходит в закрытой одноразовой стерильной системе
- Компоненты крови собираются в специальные мешки и готовы для дальнейшего использования (криоконсервация, иррадиация *in vitro*, трансплантация, др.)

Эксклюзивный представитель ООО «Инициативные медицинские технологии» Москва, Хоровское шоссе, д. 43 Г, тел: +7(495)380-36-62, факс: +7(499)797-01-64 E-mail: dr\_fedorov@imt-stemcells.ru, gds@imt-stemcells.ru, amy@imt-stemcells.ru

**Автоматизированная система для хранения стволовых клеток в жидком азоте – BioArchive («Thermogenesis», США).**

Система рассчитана на 3626 образцов стволовых клеток

- Низкая стоимость операционного процесса
- Низкий расход жидкого азота на один образец во время хранения и программного замораживания
- Полностью автоматизированный процесс сокращает время работы персонала
- Снижение затрат на оборудование
- Не требуется большого количества дьюаров для хранения (одна система BioArchive заменяет 6-7 дьюаров)
- Наличие двух встроенных программных замораживателей
- Безопасность и защита
- Полузакрытая система сокращает воздействие азота на оператора
- Источник бесперебойного питания позволяет разместить/извлечь образец в случае отключения электричества
- Параметры 24-х часового контроля и управления доступом включат в себя: Мониторинг уровня жидкого азота
- Пароль для доступа
- ID номер для оператора, хранящийся в базе данных

**Интегрированный программный замораживатель**

- Минимизирует температурные колебания
- Отсутствует этап ручного переноса образца из программного замораживателя в дьюар для хранения

**Криоконтейнер на 25 мл**

- Постоянный геометрический размер образца
- Воспротиводимый процессе заморозки для каждой единицы
- Возможность роботизированной закладки на хранение и извлечения образцов
- Сокращается вероятность ошибок, связанной с человеческим фактором

**Система управления образцом**

- Использование итрикс-вода исключает ошибки при перемещении образца
- Ответ по образцу: История образца
- Идентификация
- График замораживания

**Расходные материалы для культивирования стволовых клеток «CellGro» (Германия):**

**Комплекты CellGro для культивирования клеток в закрытых системах**

- CellGro HPC для культивирования гемопоэтических клеток, NK-клеток, Т-клеток
- CellGro DC для культивирования дендритных клеток

**Бессывороточные среды CellGro:**

- SCGM для культивирования гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток
- DC для культивирования дендритных клеток

**Культуральные мешки VaeLife**  
(сделаны из FEP Teflon)

**CellGro питокины**  
Для увеличения гемопоэтических прогениторных клеток, NK-клеток, Т-клеток и дендритных клеток

www.imt-stemcells.ru