

СТРОМАЛЬНО–ВАСКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

А.В. Веремеев¹, Р.Н. Болгарин¹, М.А. Петкова¹, Н. Кац¹, В.Г. Нестеренко²

¹ ООО «ДжоинТекСэлл», Москва, Россия

² Федеральный научно–исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Adipose–derived stromal vascular fraction as an alternative source of cells for the regenerative medicine

A.V. Veremeev¹, R.N. Bolgarin¹, M.A. Petkova¹, N. Katz¹, V.G. Nesterenko²

¹ "JoinTechCell" LLC, Moscow, Russia

² N.F. Gamaleya Federal Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Жировая ткань является наиболее удобным и богатым источником клеточного материала для регенеративной медицины вследствие высокого содержания прогениторных клеток, число которых многократно превосходит их количество в костном мозге и других тканях. Стромально–васкулярная фракция жировой ткани, содержащая различные популяции стволовых клеток–предшественниц, может быть легко выделена ферментативным способом и использована при различных патологических состояниях. Тем не менее, характеристика клеточного состава с выраженным терапевтическим потенциалом остается неясной, практически отсутствуют стандартизированные протоколы выделения и оценки клеточной фракции. В настоящем обзоре проведен анализ литературных данных об использовании стромально–васкулярной фракции жировой ткани для стимулирования процессов регенерации. Представлены основные вехи применения стромально–васкулярной фракции жировой ткани в историческом аспекте, источники и способы ее выделения, характеристика состава, иммунофенотип и направления дифференцировки клеток, входящих в её состав.

Ключевые слова: жировая ткань, стромально–васкулярная фракция, регенерация, дифференцировка, клеточная терапия.

Введение

Стремительное развитие науки в области регенеративной медицины и клеточной биологии, фундаментальные исследования и поиск перспективных терапевтических подходов в данном направлении обещают новые захватывающие открытия в ближайшем будущем [1]. Высокий интерес к технологиям применения различных видов стволовых клеток во многом определен их потенциалом в восстановлении поврежденных тканей и органов [1].

В настоящем обзоре рассмотрены основные исторические аспекты развития представлений о стволовых клетках взрослого организма и источниках их получения. Подробно описаны характеристики стромально–васкулярной фракции и направления ее клинического применения, как альтернативы костному мозгу. Отдельное внимание уделено способам выделения клеточного материала и проблемам, связанным с автоматизацией данных процессов и внедрением их в широкую клиническую практику.

Считается, что идеальной стволовой клеткой, обладающей тотипотентностью, то есть способностью дифференцироваться в любые типы клеток всех трех зародышевых листков, является оплодотворенная зигота – истинная эмбриональная стволовая клетка (ЭСК) [2, 3]. Однако высокий риск малигнизации, продолжающиеся этические и политические дебаты

The adipose tissue is considered as the most convenient and abundant source of cells for the regenerative medicine. The number of progenitor cells in the adipose tissue significantly exceeds their amount in the bone marrow and other tissues. Therefore, adipose–derived stromal vascular fraction comprising distinct populations of stem and progenitor cells can be relatively easily isolated from lipoaspirates and may then be used in various pathological conditions. However, the profile of this cell fraction with a significant therapeutic potential remains unclear, and there are no standardized protocols for its isolation and evaluation. In this article, we reviewed the data on the potential use of adipose–derived stromal vascular fraction in the regenerative medicine. We described the main historical milestones and performed a comprehensive analysis of the sources of adipose–derived stromal vascular fraction, techniques of its isolation, features, immunophenotype and differentiation pathways.

Keywords: adipose tissue, stromal vascular fraction, regeneration, differentiation, cytotherapy.

значительно ограничивают не только терапевтическое использование ЭСК, но и экспериментальные исследования в данной области [3, 4].

Открытие гемопоэтических стволовых клеток положило начало истории изучения регионарных стволовых клеток взрослого организма [5]. В пионерских работах А.Я. Фриденштейна и его сотрудников из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (1968, 1974) было показано наличие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в костном мозге (ММСК–КМ) [6, 7]. Кроме того, были разработаны методы, являющиеся базовыми для клеточных технологий, включая анализ формирования колоний ММСК–КМ, образование штаммов и трансплантацию клеток *in vivo*, была доказана дифференцировка ММСК–КМ в клетки костной, хрящевой и жировой тканей, а также в клетки стромы костного мозга [6, 7]. Описаны характеристики ММСК–КМ, определяющие их принадлежность к мультипотентным клеткам–предшественницам [8, 9]. Работы А.Я. Фриденштейна с соавт. (1968, 1974) во многом опередили свое время [6, 7]. Методы, созданные ими, используются до сих пор, а исследования по применению аутогенных клеток для регенерации тканей являются одним из наиболее развивающихся направлений современной биомедицины [10]. Существующие подходы основаны на

трансплантации клеточного материала как системно, так и непосредственно в зону дефекта тканей и (или) органов [10]. Аутогенная трансплантация характеризуется низким риском отторжения вследствие отсутствия иммунного ответа на клетки собственного организма [10]. В данном направлении использование ММСК-КМ является приемлемой альтернативой ЭСК [11]. ММСК-КМ уже показали свою эффективность в многочисленных доклинических и клинических исследованиях [11, 12]. Тем не менее, использование ММСК-КМ сопряжено со значительными трудностями при получении клеточного материала, включая высокую инвазивность процедуры аспирации костного мозга и небольшое количество получаемых прогениторных клеток [13–15]. Комплекс данных факторов дал толчок к поиску других эффективных источников ММСК [13–15].

В последние десять лет подкожная жировая клетчатка привлекает все большее внимание исследователей и врачей в качестве альтернативы костному мозгу как источника стволовых и прогениторных клеток для регенеративной медицины [14–18]. Основным преимуществом жировой ткани является малая инвазивность процедуры забора, которую проводят под местной или инфильтрационной анестезией с минимальным болевым синдромом, дискомфортом и риском для пациента [15]. Процедура липоаспирации широко применяется, стандартизирована, проста в исполнении, может проводиться в условиях процедурного кабинета, занимает не более 90 мин. [18, 19], а клеточные фракции, выделенные из жировой ткани, могут быть использованы в клинической практике без стадии культивирования [18, 20].

Кроме того, подкожная жировая клетчатка является богатым депо стволовых и прогениторных клеток, что показано во многих работах [14–18]. Ранее было описано, что из жировой ткани можно выделить значительно большее количество ММСК по сравнению с костным мозгом [13–16, 18]. Так 100 мл костномозгового трансплантата содержит 6×10^8 ядросодержащих клеток, из которых на долю ММСК приходится не более 0,001–0,01% [13, 14, 16]. В абсолютном значении данный диапазон составляет 0,006–0,06 $\times 10^6$ клеток на 100 мл костного мозга [13, 14, 16]. Для сравнения, число ядросодержащих клеток во фракции жировой ткани составляет примерно $0,5\text{--}2,0 \times 10^6$ на грамм ткани, а количество ММСК колеблется в диапазоне от 1 до 10% в зависимости от донора и места забора трансплантата [13, 15, 16]. Таким образом, из 100 граммов жировой ткани может быть получено $0,5\text{--}20 \times 10^6$ ММСК [13, 15, 16].

Как и костный мозг, жировая ткань содержит различные типы клеток. Гетерогенную фракцию, отделенную от стромы и адипоцитов с использованием коллагеназы, принято называть стромально-васкулярной фракцией жировой ткани (adipose-derived stromal vascular fraction, SVF) [13–16, 18]. SVF характеризуется неоднородностью и значительной вариабельностью клеточного состава в зависимости от состояния донора, его возраста и области забора биологического материала [15, 18]. После сортировки из SVF могут быть выделены различные популяции клеток, включая эндотелиальные и гладкомышечные, перicyты, фибробласты, тучные клетки и преадипоциты [13–16, 18]. Особый интерес представляют клетки, так называемой, «регенераторной

фракции», а именно комплекса «стволовых и прогениторных» клеток жировой ткани (adipose-derived stem cells, ADSCs), которые были впервые выделены и охарактеризованы еще в 2001 г. P.A. Zuk с соавт. по способности клеток дифференцироваться в нескольких направлениях. Проведенные исследования показали потенциал регенераторной фракции к последующему развитию, как минимум, в четырех различных направлениях [21]. В дальнейшем была доказана дифференцировка ADSCs в адипоциты, хондроциты, остеобласты, миоциты, нейрональные клетки, кардиомиоциты и гепатоциты [13–16, 21]. Перспективы терапевтического использования данного свойства ММСК жировой ткани были продемонстрированы в нескольких экспериментальных и клинических исследованиях [22–28].

Первые сообщения о трансплантации жировой ткани появились более ста лет назад [29, 30]. Адипогенные предшественники были выделены из SVF в 1976 г., а ММСК жировой ткани насчитывают в своей истории более десяти лет [31]. Важно заметить, что в условиях культивирования *in vitro* ADSCs приобретают фенотип ММСК-КМ и экспрессируют характерные для них антигены, что в значительной степени определило потенциал их использования в различных областях медицины [13–16]. Их исследуют для применения в лечении пациентов с дефектами мягких тканей, костей скелета, хроническими трофическими и лучевыми язвами, ожогами, болезнью Крона, рассеянным склерозом, инфарктом миокарда, инсультами различного генеза и др. [14, 15, 18, 32–34].

Выделение стромально-васкулярной фракции жировой ткани

Выделение SVF из жировой ткани – многоэтапный лабораторный процесс, требующий квалификации и определенных навыков в работе с клеточными культурами и биологическими объектами [15, 16, 18]. ММСК из жировой ткани были выделены группой P.A. Zuk с соавт. (2001) с использованием ручного метода, долгое время оставшегося единственным [21]. Принцип данного метода и всех его модификаций представлен на рис. 1.

Метод P.A. Zuk с соавт. (2001) основан на обработке липоаспирата 0,075% раствором коллагеназы I типа при температуре 37°C в течение 30 мин. с последующим центрифугированием получившейся суспензии при 800 g [21]. После центрифугирования суспензии клеток в супернатанте находятся адипоциты, а в осадке – SVF с примесью эритроцитов, которые удаляются во время инкубации в лизирующем растворе хлорида аммония [21]. Модификации ручного метода упрощали протокол, но не изменяли принципов выделения [20, 36–39]. Сегодня в лабораторных условиях активно применяются инкубаторы, автоматические шейкеры, клеточные фильтры и другие устройства, позволяющие получить более чистую фракцию с минимальным количеством остаточных ферментов, негативно влияющих на дальнейшее использование получившегося клеточного продукта [20, 36–39]. Вводятся дополнительные этапы промывки в буферных растворах [20, 36–39]. Тем не менее, большинство современных методик все равно основаны на применении коллагеназ с последующим осаждением клеточной массы центрифугированием [15, 16, 18].



Рис. 1. Общий принцип выделения стромально-васкулярной фракции и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (по [35] с изм.)

Однако все ручные методы характеризуются высокими временными и организационными затратами и предполагают наличие так называемого «человеческого фактора», который в эпоху повсеместного внедрения стандартов GMP (Good manufacturing practice) и GTP (Good tissue practice) неприемлем [19, 35]. Поэтому технологии выделения эволюционируют в сторону автоматизации процесса. Созданы автоматические и полуавтоматические системы выделения SVF: PNC's Multi Station, CHA Biotech Cha-Station, Cytori Celution 800/CRS System, Medi-Khan's Lipokit MaxStem, JTC's miniSTEM и NeoGenesis's UNiStation [20].

Практически все системы выделения состоят из аппаратной стационарной части и одноразовых стерильных блоков [19, 40–44]. Стерильный одноразовый блок, в свою очередь, содержит камеру обработки ткани, где происходят процессы ее отмывки, обработки ферментами и центрифугирования [19, 40–44]. В комплектацию одноразового блока производители системы включают шприцы для заливки коллагеназы и отбора готового образца, ферменты, а также соединительные трубки и расходные материалы, формирующие «индивидуальный набор» (kit) [19, 40–44]. В целом, автоматические системы имитируют ручной метод с тем отличием, что все процессы заранее запрограммированы и выполняются аппаратной частью вне зависимости от лаборанта или исследователя [19, 40–44]. Использование подобных устройств позволяет стандартизировать протокол выделения и значительно повысить качество и чистоту конечного продукта, но, несмотря на все достоинства, такие устройства и расходные материалы к ним очень дороги и поэтому недоступны для большинства лабораторий и пациентов [19, 40–44]. Таким образом, вопрос соответствия качества выделенного клеточного материала и доступности подобных технологий остается открытым.

Методы получения стволовых клеток из разных тканей взрослого организма — один из ключевых

драйверов всего комплекса применения аутогенного клеточного материала в регенеративной медицине. В то же время, отсутствие оптимизированных и стандартизированных технологий препаративного выделения аутогенных стволовых клеток является одной из важных причин низкого уровня применения и степени внедрения клеточных технологий в практику.

На основании требований к клинической эффективности и безопасности можно сформулировать основные принципы, на которых должен быть выстроен оптимальный протокол получения стволовых клеток в строгом соответствии стандартам GTP: безопасность (отсутствие возможности контаминации образца биологического материала); адекватные критерии эффективности и сохранения регенераторного потенциала клеточной фракции; простота использования (возможность проведения этапа выделения клиническими специалистами, минимальные требования к квалификации персонала в области клеточных технологий и техническому обслуживанию). Кроме того, необходимо учитывать, что экономические затраты должны быть оптимальными. Решение данной задачи в будущем позволит повысить доверие специалистов к использованию клеточных технологий в более широких масштабах, и они станут доступнее для пациентов.

Характеристика клеточного состава стромально-васкулярной фракции

SVF состоит из нескольких типов клеток, включая циркулирующие клетки крови, фибробласты, перicyты, эндотелиальные клетки и ADSCs, которые могут быть выделены из общей фракции путем культивирования на пластике, так как, в отличие от остальных, являются адгезивными [13–18]. Первичная культура ADSCs представляет собой достаточно однородную популяцию клеток по сравнению с гетерогенной SVF и характеризуется высокой экспрессией CD34 и отсутствием CD31 (PECAM) [14–18, 45]. При пассив-

ровании ADSCs несколько меняют свой фенотип и могут быть идентифицированы посредством проточной цитофлуориметрии и сортировки по нескольким конкретным поверхностным маркерам: CD34[±], CD45, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD14⁻ или CD11b⁻, CD79⁻ или CD19⁻ и HLA-DR⁻ [14–18, 45].

SVF определяется по экспрессии CD31 и CD34 (табл. 1) [14–17, 45]. Негемопозитические эндотелиальные предшественники, характеризующиеся ко-экспрессией CD31 и CD34 (CD31⁺/CD34⁺), находятся в капиллярах, в то время как зрелые эндотелиальные клетки CD31⁺/CD34⁻ локализованы на внутренней поверхности просвета мелких сосудов [14, 46–48]. Фенотип эндотелиальных клеток-предшественниц, полученных из жировой ткани, соответствует фенотипу подобных клеток из костного мозга и циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественниц (CD45/CD34⁺/VEGFR2⁺) [15, 16, 45–49]. В то же время их количество во фракции SVF на 3–5 порядков выше, что делает SVF перспективным кандидатом для применения регенеративной медицине [14–16, 18, 45].

Перициты SVF определяются, как правило, как CD45/CD31/CD146⁺-клетки [14, 15, 46–48]. В различных цитометрических исследованиях была показана ко-экспрессия CD34 и CD90 с CD31/CD146⁺ [14, 15, 46–48]. Клетки с фенотипом CD31/CD146⁺/CD34⁺ составляют около 0,5% в популяции ядродержащих клеток SVF [46–48]. Данный пул содержит переходную популяцию между перицитами и клетками супраадвентициального периваскулярного кольца [46–48]. Клетки с фенотипом CD45/CD31/CD34⁺/CD146⁻ (>90% CD90⁺), находящиеся в наружном сосудистом кольце, представляют собой супраадвентициальные стромальные клетки жировой ткани (SA-ASC) (рис. 2) [46–48].

Именно эта популяция в оригинальной работе К. Yoshimura с соавт. (2006) была охарактеризована как «жировые стромальные/стволовые клетки (ASC)» [50]. Впоследствии, на 2-й ежегодной конференции IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics and Science) было принято новое унифицированное наименование всей мультипотентной популяции – ADSCs.

Таблица 1. Клеточные популяции SVF [по 46, 47, 50, 51]

Фенотип	Процентное содержание, % (M±σ)	Тип клеток
CD34 ⁺ CD31 ⁻ CD146 ⁻	34,6±17,8	ADSC-подобные (SA-ACS)
CD34 ⁺ CD31 ⁺ CD146 ⁺	12,2±9,5	Эндотелиальные клетки-предшественники
CD34 ⁺ CD31 ⁻ CD146 ⁺	0,5±0,3	Переходные клетки
CD105 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺ CD140a ⁺ CD146 ⁺	н/д	Мезенхимоангиобласты
CD34 ⁻ CD31 ⁻ CD146 ⁺	10,3±9,9	Гладкомышечные клетки/Перициты
CD45 ⁻ CD31 ⁺ CD34 ⁻	2,7±0,8	Эндотелиальные клетки
CD45 ⁺ CD34 ⁻	14,2±2,3	Лейкоциты
CD45 ⁺ CD34 ⁺	5,2±1,3	HSC-подобные
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD117 ⁺	0,75±0,1	
CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁺	0,02±0,03	
CD45 ⁺ CD34 ⁻ CD3 ⁺	4,8±1,9	T-клетки
CD45 ⁺ CD34 ⁻ CD19 ⁺	0,2±0,03	B-клетки
CD45 ⁺ CD34 ⁻ CD117 ⁺	0,56±0,2	Тучные клетки
CD45 ⁺ CD11b ⁺	6,1±3,2	Гранулоциты
CD45 ⁺ CD14 ⁺	5,2±4,3	Моноциты

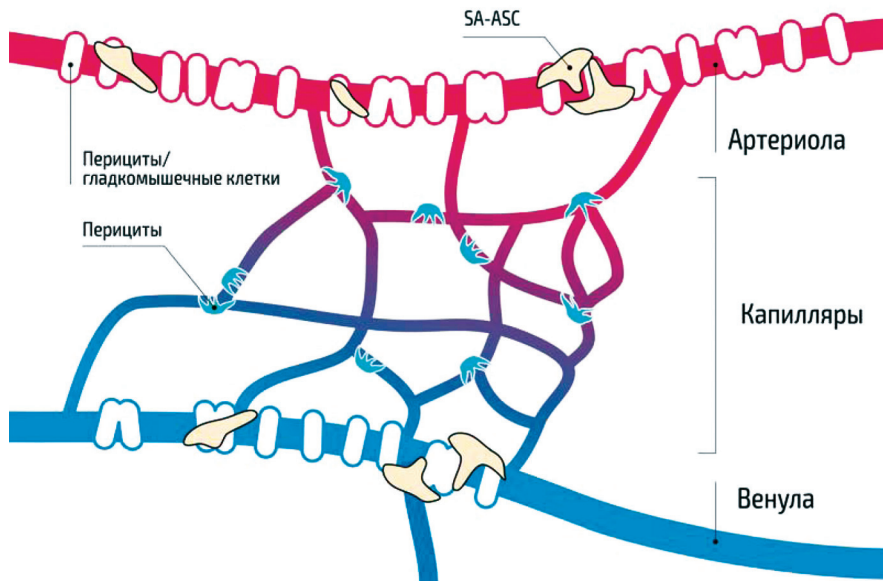


Рис. 2. Клеточный паттерн стромально-васкулярной фракции жировой ткани (по [46] с изм.)

Секреторные характеристики стволовых клеток жировой ткани

Секреторные и метаболические характеристики стволовых клеток из жировой ткани были подробно описаны в экспериментах и доклинических моделях [52–55]. Было показано, что ADSCs секретирует очень важный для интенсификации восстановительных процессов цитокиновый профиль, включающий ангиогенные, антиоксидантные и иммуносупрессивные факторы [52–55]. Секретом SVF содержит сосудистый эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), трансформирующий фактор роста (transforming growth factor, TGF), фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF), фактор роста плаценты (placental growth factor, PlGF) и основной фактор роста фибробластов (base fibroblast growth factor, bFGF) [52] в высоких концентрациях. Данный профиль биологически активных веществ определяет способность ADSCs стимулировать неоваскуляризацию и пролиферацию клеток в зоне повреждения [52].

Кроме того, ADSCs не вызывают неблагоприятных иммунных реакций из-за отсутствия HLA-DR, подавления пролиферации лимфоцитов, ингибирования секреции провоспалительных и стимулирования противовоспалительных цитокинов [14–16]. Иммуномодулирующие свойства SVF были описаны в ряде экспериментальных работ и сейчас перешли в стадию клинических исследований [56, 57].

Иммуномодулирующие и ангиогенные свойства стволовых клеток из жировой ткани определяют их возможную роль в онкогенезе [58, 59]. В последнее время опубликованы противоречивые данные, показывающие, что в одних экспериментах ADSCs могут способствовать росту и прогрессированию опухоли [60, 61], а в других наоборот – подавлять развитие

опухолевого процесса [62, 63]. В любом случае при исследовании терапевтических подходов с применением стволовых клеток требуется тщательная оценка рисков и преимуществ такой терапии.

Культивирование и потенциал дифференцировки стромально-васкулярной фракции

Культивирование SVF используется, как правило, для отделения фибробластоподобных клеток, так называемой «прилипающей» (адгезивной) фракции, а также увеличения количества ADSCs за счет пролиферации в питательной среде [14–18, 45]. Существующие технологии позволяют успешно реализовать данные цели, однако они занимают много времени, имеют высокую стоимость и экономически неэффективны ввиду необходимости внедрения правил GMP [35]. Кроме того, культивирование может отрицательно сказаться на функциональном состоянии клеточного трансплантата в связи с изменением экспрессии молекул адгезии в процессе культивирования, что в некоторых случаях делает невозможным дальнейшее использование клеток в клинической практике [15, 16]. Также культивирование может оказывать негативное влияние на дифференцировочный потенциал стволовых клеток [15, 16].

Выделенные из жировой ткани стволовые клетки обладают способностью к пролиферации в условиях *in vitro* и индуцированной дифференцировке в адипогенном, остеогенном, хондрогенном и миогенном направлениях [13–18, 21, 35]. Кроме этого, была описана возможность получения гепатоцитов, эндотелиальных клеток, клеток поджелудочной железы с выраженным эндокринным фенотипом, секретирующих инсулин, а также дифференцировка данного типа клеток в нейрогенном направлении (табл. 2) [15–18, 35].

Таблица 2. Дифференцировочный потенциал ADSCs [по 16, 18]

Клеточная линия	Индуктор дифференцировки
Адиipoциты	Дексаметазон, изобутилметилксантин, индометацин, инсулин, тиазолидиндион
Кардиомиоциты	Трансферрин, IL-3, IL-6, VEGF
Хондроциты	Аскорбиновая кислота, BMP-6, дексаметазон, инсулин, TGF- β
Эндотелиальные клетки	Запатентованная среда, содержащая аскорбат, гидрокортизон, EGF, bFGF
Миоциты	Дексаметазон, лошадиная сыворотка
Нейрональные клетки	Бутилатгидроксианизол, вальпроевая кислота, инсулин
Остеобласты	Аскорбиновая кислота, BMP-2, дексаметазон, 1,25-дигидроксивитамин D

ADSCs имеют исключительный потенциал дифференцировки в зрелые адипоциты, что открывает большие перспективы в разработке методов для коррекции дефектов мягких тканей [64-66]. В качестве факторов индукции в данном случае могут выступать инсулин, дексаметазон, розиглитазон и индометацин [16, 18]. В процессе дифференцировки ADSCs проходят стадию фибробластоподобных клеток звездчатой или веретеновидной формы, затем их морфология изменяется, что связано с появлением одной или нескольких липидных вакуолей [15, 16]. Клетки начинают экспрессировать некоторые антигены, характерные для зрелых адипоцитов, включая лептин, рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs), инсулин-зависимый транспортер глюкозы 4 (glucose transporter type 4, GLUT4) и глицерол-3-фосфатдегидрогеназу (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) [16, 18].

Остеогенная дифференцировка ADSCs может быть вызвана добавлением в среду культивирования дексаметазона, β -глицерофосфата и витамина D3 [16, 18]. Приобретение фенотипа остеобластов сопровождается экспрессией щелочной фосфатазы, коллагена I типа, остеопонтина, остеокальцина и фактора транскрипции 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) [16, 18]. Кроме того, остеогенную дифференцировку индуцируют трансфекцией определенных генов (*bmp2* и *runx2*) [67]. Данный метод оказался очень эффективным как в условиях культивирования, так и *in vivo*, что открывает значительные перспективы для создания новых подходов к восстановлению костной ткани [67].

Добавление в культуральную среду инсулиноподобного фактора роста (insulin-like growth factor, IGF), трансформирующего фактора роста бета (transforming growth factor beta, TGF- β), костных морфогенетических белков (bone morphogenetic proteins, BMPs) вызывает хондрогенную дифференцировку ADSCs [16, 18]. Также хондрогенная дифференцировка происходит путем посева ADSCs на искусственный матрикс из полигликолевой кислоты (PGA), что было продемонстрировано на экспериментальной модели [68].

Особый интерес представляет получение из ADSCs терминально дифференцированных миоцитов. ADSCs в условиях *in vitro* могут образовывать многоядерные миофибриллы [69, 70]. Данное свой-

ство активно изучается на доклинических моделях генетически детерминированной мышечной дистрофии [71, 72]. Другие исследования сосредоточены на способности ADSCs дифференцироваться в кардиомиоциты с возможностью их последующего применения в регенерации сердечной мышцы после ишемического повреждения [73, 74].

Экспериментально была показана дифференцировка ADSCs в эндотелиальном направлении [75]. Данные клетки выделяют ряд проангиогенных факторов, включая VEGF и PDGF [76].

Некоторые авторы сообщают о возможности превращения ADSCs в нейроноподобные клетки со схожей морфологией и экспрессией белков, характерных для фенотипа нейронов, таких, как нейрон-специфическая энлаза и нейрон-специфический ядерный протеин [77].

В ряде исследований показана индукция дифференцировки ADSCs в клетки панкреатических островков [78] и гепатоциты [79] с целью развития методов клеточной терапии для лечения таких заболеваний, как сахарный диабет и дисфункция печени [14]. Однако данные результаты имеют предварительный характер [14].

Заключение

За последние десять лет были разработаны многочисленные экспериментальные модели для применения стволовых и прогениторных клеток в регенерации органов и тканей. Регионарные стволовые клетки проявляют свой восстановительный потенциал, как путем направленной дифференцировки, так и за счет реализации паракринных механизмов. Особый интерес в данном направлении вызывают клетки SVF, которая представляет собой «минимально-манипулированную» фракцию, содержащую как зрелые, так и стволовые клетки. Развитие современных протеомных и биоаналитических инструментов позволило обнаружить и охарактеризовать молекулярные механизмы регенерации поврежденных тканей, однако из всего многообразия проведенных углубленных исследований секретомы и дифференцировочного потенциала невозможно сделать окончательного вывода об их клинической эффективности.

Кроме того, исследования способности клеток SVF и ADSCs к дифференцировке в естественных

условиях не показали сколько-нибудь убедительных результатов в первую очередь из-за отсутствия стандартов работы с подобным типом клеток. Важным шагом в данном направлении видится создание стандартизированных протоколов выделения и изоляции клеточного материала без использования этапа культивирования и предварительной дифференцировки клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Stoltz J.F., de Isla N., Li Y.P. et al. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21st Century. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 734731.
2. Desai N., Rambhia P., Gisho A. Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015; 13: 9.
3. Kingham E., Oreffo R.O. Embryonic and induced pluripotent stem cells: understanding, creating, and exploiting the nano-niche for regenerative medicine. *ACS Nano* 2013; 7(3): 1867-81.
4. Simonson O.E., Domogatskaya A., Volchkov P. et al. The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Ann. Med.* 2015; 47(5): 370-80.
5. Eaves C.J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015; 125(17): 2605-13.
6. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6(2): 230-47.
7. Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 1974; 2(2): 83-92.
8. Mabuchi Y., Houlihan D.D., Akazawa C. et al. Prospective isolation of murine and human bone marrow mesenchymal stem cells based on surface markers. *Stem Cells Int.* 2013; 2013: 507301.
9. Pourrajab F., Forouzannia S.K., Tabatabaee S.A. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. *Int. J. Cardiol.* 2013; 163(2): 125-31.
10. Vapniarsky N., Arzi B., Hu J.C. et al. Concise Review: Human Dermis as an Autologous Source of Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 2015; 4(10): 1187-98.
11. Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 2015; 35(2): e00191.
12. Bara J.J., Richards R.G., Alini M. et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells* 2014; 32(7): 1713-23.
13. Liao H.T., Chen C.T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 2014; 6(3): 288-95.
14. Johal K.S., Lees V.C., Reid A.J. Adipose-derived stem cells: selecting for translational success. *Regen. Med.* 2015; 10(1): 79-96.
15. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012; 30(5): 804-10.
16. Huang S.J., Fu R.H., Shyu W.C. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant.* 2013; 22(4): 701-9.
17. Uzbass F., May I.D., Parisi A.M. et al. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev.* 2015; 11(2): 298-308.
18. Gentile P., Orlandi A., Scioli M.G. et al. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl. Med.* 2012; 1(3): 230-6.
19. Doi K., Tanaka S., Iida H. et al. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013; 7(11): 864-70.
20. Zhu M., Heydarkhan-Hagvall S., Hedrick M. et al. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J. Vis. Exp.* 2013; (79): e50585.
21. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7(2): 211-28.
22. Fang X., Murakami H., Demura S. et al. A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. *PLoS One* 2014; 9(2): e88874.
23. Garcia-Contreras M., Vera-Donoso C.D., Hernandez-Andreu J.M. et al. Therapeutic potential of human adipose-derived stem cells (ADSCs) from cancer patients: a pilot study. *PLoS One* 2014; 9(11): e113288.
24. Guan J.J., Niu X., Gong F.X. et al. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology. *Tissue Eng. Part A* 2014; 20(13-14): 1794-806.
25. Peterson J.R., Eboda O., Agarwal S. et al. Targeting of ALK2, a receptor for bone morphogenetic proteins, using the Cre/lox System to enhance osseous regeneration by adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2014; 3(11): 1375-80.
26. Hong S.J., Jia S.X., Xie P. et al. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS One* 2013; 8(1): e55640.
27. Kim I., Bang S.I., Lee S.K. et al. Clinical implication of allogenic implantation of adipogenic differentiated adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2014; 3(11): 1312-21.
28. Tomita K., Madura T., Sakai Y. et al. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience* 2013; 236: 55-65.
29. Neuber F. Fetttransplantation. Bericht über die verhandlungen der deutschen gesellschaft für chirurgie. *Zbl. Chir.* 1893; 22: 66.
30. Tran T.T., Kahn C.R. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2010; 6(4): 195-213.
31. Mazzola R.F., Mazzola I.C. History of fat grafting: from ram fat to stem cells. *Clin. Plast. Surg.* 2015; 42(2): 147-53.
32. De Francesco F., Ricci G., D'Andrea F. et al. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2015; 21(6): 572-84.
33. Minteer D.M., Marra K.G., Rubin J.P. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin. Plast. Surg.* 2015; 42(2): 169-79.
34. Lim M.H., Ong W.K., Sugii S. The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications. *Expert Rev. Mol. Med.* 2014; 16: e8.
35. Gir P., Oni G., Brown S.A. et al. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast. Reconstr. Surg.* 2012; 129(6): 1277-90.
36. Qureshi A.T., Chen C., Shah F. et al. Human adipose-derived stromal/stem cell isolation, culture, and osteogenic differentiation. *Methods Enzymol.* 2014; 538: 67-88.
37. Doi K., Kuno S., Kobayashi A. et al. Enrichment isolation of adipose-derived stem/stromal cells from the liquid portion of liposuction aspirates with the use of an adherent column. *Cytotherapy* 2014; 16(3): 381-91.
38. Buehrer B.M., Cheatham B. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cells for use in tissue engineering. *Methods Mol. Biol.* 2013; 1001: 1-11.
39. Yu G., Floyd Z.E., Wu X. et al. Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates. *Methods Mol. Biol.* 2011; 702: 17-27.
40. Güven S., Karagianni M., Schwalbe M. et al. Validation of an automated procedure to isolate human adipose tissue-derived cells by using the Sepax® technology. *Tissue Eng. Part C Methods* 2012; 18(8): 575-82.
41. Williams S.K., Kosnik P.E., Kleinert L.B. et al. Adipose stromal vascular fraction cells isolated using an automated point of care system improve the patency of expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Tissue Eng. Part A* 2013; 19(11-12): 1295-302.
42. Fraser J.K., Hicok K.C., Shanahan R. et al. The Celution® System: automated processing of adipose-derived regenerative cells in a functionally closed system. *Adv. Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3(1): 38-45.
43. SundarRaj S., Deshmukh A., Priya N. et al. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 109353.
44. Cleveland E.C., Albano N.J., Hazen A. Roll, spin, wash, or filter? Processing of lipoaspirate for autologous fat grafting: an updated, evidence-based review of the literature. *Plast. Reconstr. Surg.* 2015; 136(4): 706-13.
45. Bourin P., Bunnell B.A., Casteilla L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15(6): 641-8.

Благодарности

Настоящая работа была поддержана Грантом Фонда Сколково в рамках проекта «Разработка и внедрение закрытой системы экспресс-выделения и обработки фракции стволовых и регенеративных клеток жировой ткани для применения в медицинской практике».

46. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Rubin J.P. et al. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry A* 2013; 83(1): 134-40.
47. Zimmerlin L., Donnenberg V.S., Pfeifer M.E. et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010; 77(1): 22-30.
48. Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonic S. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24(2): 376-85.
49. Navarro A., Marín S., Riol N. et al. Human adipose tissue-resident monocytes exhibit an endothelial-like phenotype and display angiogenic properties. *Stem Cell Res. Ther.* 2014; 5(2): 50.
50. Yoshimura K., Shigeura T., Matsumoto D. et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* 2006; 208(1): 64-76.
51. Varma M.J., Breuls R.G., Schouten T.E. et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(1): 91-104.
52. Kapur S.K., Katz A.J. Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 2013; 95(12): 2222-8.
53. Chiellini C., Cochet O., Negrani L. et al. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol. Biol.* 2008; 9: 26.
54. Tajiri N., Acosta S.A., Shahaduzzaman M. et al. Intravenous transplants of human adipose-derived stem cell protect the brain from traumatic brain injury-induced neurodegeneration and motor and cognitive impairments: cell graft biodistribution and soluble factors in young and aged rats. *J. Neurosci.* 2014; 34(1): 313-26.
55. Lee S.C., Jeong H.J., Lee S.K. et al. Lipopolysaccharide preconditioning of adipose-derived stem cells improves liver-regenerating activity of the secretome. *Stem Cell Res. Ther.* 2015; 6: 75.
56. Crop M.J., Baan C.C., Korevaar S.S. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(12): 1843-53.
57. Cohen C.A., Shea A.A., Heffron C.L. et al. Intra-abdominal fat depots represent distinct immunomodulatory microenvironments: a murine model. *PLoS One* 2013; 8(6): e66477.
58. Schweizer R., Tsuji W., Gorantla V.S. et al. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 120949.
59. Freese K.E., Kokai L., Edwards R.P. et al. Adipose-derived stem cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: a systematic review. *Cancer Res.* 2015; 75(7): 1161-8.
60. Wei H.J., Zeng R., Lu J.H. et al. Adipose-derived stem cells promote tumor initiation and accelerate tumor growth by interleukin-6 production. *Oncotarget* 2015; 6(10): 7713-26.
61. Chu Y., Tang H., Guo Y. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote cell proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer. *Exp. Cell Res.* 2015; 337(1): 16-27.
62. Yu X., Su B., Ge P. et al. Human adipose derived stem cells induced cell apoptosis and s phase arrest in bladder tumor. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 619290.
63. Ning H., Lei H.E., Xu Y.D. et al. Conversion of adipose-derived stem cells into natural killer-like cells with anti-tumor activities in nude mice. *PLoS One* 2014; 9(8): e106246.
64. Philips B.J., Marra K.G., Rubin J.P. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012; 12(2): 155-63.
65. Griffin M., Kalaskar D.M., Butler P.E. et al. The use of adipose stem cells in cranial facial surgery. *Stem Cell Rev.* 2014; 10(5): 671-85.
66. Philips B.J., Marra K.G., Rubin J.P. Healing of grafted adipose tissue: current clinical applications of adipose-derived stem cells for breast and face reconstruction. *Wound Repair Regen.* 2014; 22 Suppl 1: 11-3.
67. Lee S.J., Kang S.W., Do H.J. et al. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 2010; 31(21): 5652-9.
68. Lv X., Zhou G., Liu X. et al. Chondrogenesis by co-culture of adipose-derived stromal cells and chondrocytes in vitro. *Connect Tissue Res.* 2012; 53(6): 492-7.
69. Sung M.S., Mun J.Y., Kwon O. et al. Efficient myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by the transduction of engineered MyoD protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 437(1): 156-61.
70. Bayati V., Sadeghi Y., Shokrgozar M.A. et al. The evaluation of cyclic uniaxial strain on myogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Tissue Cell* 2011; 43(6): 359-66.
71. Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E. et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol. Cell* 2008; 100(4): 231-41.
72. Goudenege S., Pisani D.F., Wdziekonski B. et al. Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol. Ther.* 2009; 17(6): 1064-72.
73. Wang H., Shi J., Wang Y. et al. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. *Biomaterials* 2014; 35(13): 3986-98.
74. Song K., Wang Z., Li W. et al. In vitro culture, determination, and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013; 170(2): 459-70.
75. Deng M., Gu Y., Liu Z. et al. Endothelial Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Polyglycolic Acid/Polylactic Acid Mesh. *Stem Cells Int.* 2015; 2015: 350718.
76. Pallua N., Serin M., Wolter T.P. Characterisation of angiogenic growth factor production in adipose tissue-derived mesenchymal cells. *J. Plast. Surg. Hand Surg.* 2014; 48(6): 412-6.
77. Pavlova G., Lopatina T., Kalinina N. et al. In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19(30): 5170-7.
78. Nam J.S., Kang H.M., Kim J. et al. Transplantation of insulin-secreting cells differentiated from human adipose tissue-derived stem cells into type 2 diabetes mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 443(2): 775-81.
79. Zhang X., Dong J. Direct comparison of different coating matrix on the hepatic differentiation from adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 456(4): 938-44.

Поступила: 05.10.2015