https://doi.org/10.29296/25877305-2019-08-05

Эффективность выделения клеток стромально-васкулярной фракции из липоаспирата без ферментативной обработки

А. Мишра[1, 2],
А. Семченкова[2],
В. Жогов[2],
А. Бадер[3],
А. Мелерзанов[1], кандидат медицинских наук
[1]Московский физико-технический институт
[2]Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва
[3]Лейпцигский университет, Германия
E-mail: m83071@gmail.com

Исследование представляет собой сравнительный анализ методов получения стромально-васкулярной фракции из липоаспирата: 1-й метод – классическая изоляция клеточной популяции с использованием ферментативной обработки жировой ткани в клеточной лаборатории; 2-й метод может быть реализован в условиях операционной без использования ферментов и за небольшое время.

Ключевые слова: косметология, мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани, стромально-васкулярная фракция, биотехнологии, уход за кожей, регенеративная косметология.

Для цитирования: Мишра А., Семченкова А., Жогов В. и др. Эффективность выделения клеток стромально-васкулярной фракции из липоаспирата без ферментативной обработки // Врач. – 2019; 30 (8): 24–28. https://doi.org/10.29296/25877305-2019-08-05

Тема применения биотехнологических продуктов для восстановления (поддержания) нормального функционального состояния кожи стала особенно актуальной в последние 5 лет на фоне снижения интереса к травмирующим аппаратным методикам. Так называемое омоложение кожи лица может быть достигнуто с помощью 2 принципиально разных подходов: повреждение кожи с последующим развитием фиброза и улучшение метаболизма кожи вследствие применения биологически активных веществ – регенеративная косметология. Отдельно рассматривается холистический подход, предусматривающий не только внешний уход, но и улучшение общего состояния здоровья благодаря грамотно подобранным режимам питания, физической нагрузки и прочим процедурам, а также продуктам, относимым к геропротективным методикам здорового образа жизни.

Согласно статистике Американского общества пластических хирургов, с 2000 г. количество так назы-

ваемых малоинвазивных вмешательств возросло приблизительно на 200%. Однако предпочтение отдается применению таких методик, как филлеры для мягких тканей, ботулотоксин А и химический пилинг. Частота применения микродермабразии значительно снизилась [1]. Таким образом, можно констатировать, что интерес потенциальных пациентов, обращающихся за медицинской помощью для коррекции возрастных изменений лица, смещается в сторону наиболее физиологически обоснованных процедур, направленных на локальную коррекцию метаболизма, а не на провокацию развития фиброза вследствие применения аппаратных методик с высокотемпературными режимами.

В число биотехнологических продуктов, применяемых в регенеративной косметологии для поддержания оптимального качества кожи, входят витамины и микроэлементы, положительное влияние которых определяется директивами 2006/37/ЕС и 1170/2009/ЕС [2], ретиноиды, мочевина и глицерин (основные защитные компоненты косметики), а также аутологичные продукты, применяемые врачом по согласованию с пациентом и под собственную ответственность. Последние называются «продвинутыми медицинскими продуктами» *(advanced medicinal product)*, применение которых регламентируется европейским законодательством [3].

Аутологичные биотехнологические продукты включают в себя обогащенную тромбоцитами плазму, стромально-васкулярную фракцию (СВФ), полученную из жировой ткани; применяется также пересадка жира, в том числе в сочетании с обогащенной тромбоцитами плазмой или клетками СВФ. Особняком стоит применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из СВФ и размноженных в условиях биотехнологической лаборатории. Выделение этой технологии в отдельную категорию обусловлено ее значительным отличием от приведенных выше других биотехнологий, которые могут быть использованы непосредственно в операционной за сравнительно небольшое время.

Рассмотрим аутологичные продукты.

Обогащенная тромбоцитами плазма. В последние годы опубликован ряд статей, посвященных применению обогащенной тромбоцитами плазмы по разным показаниям, включая так называемое «омоложение» кожи лица. Большинство авторов считают результат применения обогащенной тромбоцитами плазмы скорее положительным, нежели нейтральным [4].

Долгое время интерес к применению СВФ, полученной из жировой ткани, не был ярковыраженным в связи с отсутствием доступных технологий ее получения в условиях реального времени «на месте». Появление новых шприцевых систем, таких, например, как «ПРОМОБАРРЕЛЬ», позволило резко снизить стоимость выделения СВФ из жировой ткани. В технологии отсутствует этап применения ферментной обработки жировой ткани, что, по нашему мнению, позволяет считать полученные клетки минимально манипулированным продуктом. Кроме того, получение данной фракции возможно в условиях клиник, не имеющих биотехнологической лаборатории.

По данным разных авторов, «СВФ, полученная из жировой ткани, представляет собой источник, богатый клетками-предшественниками с регенеративным потенциалом. Регенерация реализуется при созревании клеток с образованием адипоцитов и клеток сосудов» [5].

Ранее исследователи уже отмечали регенеративное действие, «изменяющее процесс старения кожи» при применении жира, обогащенного СВФ, полученной механическим методом без применения ферментной обработки [6].

Существуют 2 подхода к получению СВФ в условиях операционной: 1-й – использование автоматической закрытой системы выделения фракции; 2-й – шприцевой метод, предусматривающий открытую систему с использованием специальных шприцев и центрифугирования. Несмотря на то, что, по мнению некоторых авторов, автоматические системы дают несколько лучшие результаты с точки зрения количества получаемых клеток [7], стоимость получения СВФ с помощью автоматических систем и шприцевых систем типа «ПРОМОБАРРЕЛЬ» значительно различается. Считается, что большинство клиник пластической хирургии не могут позволить себе закупку автоматических систем в связи с их начальной высокой стоимостью и соответственно – необходимостью поддерживать высокую стоимость процедуры применения СВФ, что делает последнюю экономически неоправданной в большинстве случаев.

Задача данного исследования – определение количества клеток в СВФ жировой ткани и оценка их жизнеспособности и дифференцировочного потенциала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал для исследования был получен из липоаспиратов. Все 10 пациенток были женского пола в возрасте 41,2±4,4 года. Сахарного диабета, метаболического синдрома и других хронических заболеваний с выраженным влиянием на метаболизм в жировой ткани у них не выявлено. Индекс массы тела находился в пределах 30 (28,9±1,2) кг/м^2, что считается верхней границей нормы при избыточной массе тела, но не ожирением. Липоаспираты собирали с помощью закрытой стерильной системы «ПРОМОБАРРЕЛЬ» (PROMOBARREL). СВФ выделяли 2 методами: с применением ферментативной обработки материала коллагеназой – Колл(+) и механической обработки без применения ферментов – Колл(-). Колл(-) центрифугировали дважды в шприцах «ПРОМОБАРРЕЛЬ» со скоростью 2300 g в течение 10 мин. Образцы Колл(+) обрабатывали 0,2% коллагеназой 1-го типа (Панэко) и раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в течение 45 мин при температуре 37°С. Затем СВФ выделяли путем центрифугирования со скоростью 300 g в течение 5 мин (рис. 1).

Клеточная культура. МСК, происходящие из жировой ткани (жМСК), получали путем культивирования СВФ во флаконах-плашках Т-75 с использованием ростовой среды DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 ммоль глутамина и 40 мк/мл гентамицина. Клетки образовывали монослой, покрывая минимум 85% поверхности флакона перед каждым пересаживанием (пассажем).

Адипогенная дифференцировка. После 2 пересаживаний жМСК проходили процесс дифференцировки в адипоциты в течение 21 дня. Протокол включал в себя индукционную фазу в течение 4 дней с последующей фазой поддержания в течение 3 дней с 3-кратным повтором. Среда в индукционной фазе состояла из базовой среды для культивирования, 1 ммоль дексаметазона, 0,5 ммоль MIBMX, 0,2 ммоль индометацина и 10 ммоль инсулина. В фазе поддержания базовая среда для культивирования использовалась без добавок.

Гистологическое окрашивание и микроскопия. На 21-й день культивирования клетки фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 10 мин с последующим промыванием ФСБ и окрашивали OilRedO (Sigma) в течение 10 мин. Образцы анализировали с помощью конфокального микроскопа с 20-кратным увеличением, используя программу NI Selements (Nikon).

Проточная цитометрия. Стратегия выделения жМСК заключалась в последовательном многопараметровом гейтировании: 1-й шаг включал в себя избавление от конгломератов клеток (рис. 2, *а*), затем – выделение жизнеспособных ядросодержащих клеток, не связавших интеркалирующий краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD), но связавших нуклеотропный краситель Syto41 (см. рис. 2, *б, в*). Далее в пределах ядросодержащих клеток определяли клетки с фенотипом $CD45^-/CD34^+$ (рис. 3, *а, б*). Истинные жМСК оценивали путем отделения искомой популяции от клеток, неспецифически связавших антитела к молекуле CD29 (см. рис. 3, *в*). Оценивалась также экспрессия других характерных маркеров (CD59, CD90) для подтверждения истинности жМСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липоаспират собирали с помощью шприцевых систем «ПРОМОБАРРЕЛЬ» (PROMOBARREL) – 20 мл на 1 шприц. После центрифугирования со скоростью 2300 g в течение10 мин, СВФ (наиболее темный, бордовый слой) собирали отдельно. Колл(+) СВФ собирали классическим методом с обработкой липоаспирата коллагеназой 1-го типа (0,2%) в растворе ФСБ с добавлением 3 ммоль $MCaCl_2$ в течение 45 мин в шейкере после 3-кратного центрифугирования при скорости 300 g в течение 5 мин с последующим отбором после каждого центрифугирования избыточной жидкости между слоями жира и клеточного осадка. Клеточный осадок пропускали через клеточный фильтр 100 мкм и таким образом получали готовый к культивированию клеточный материал.

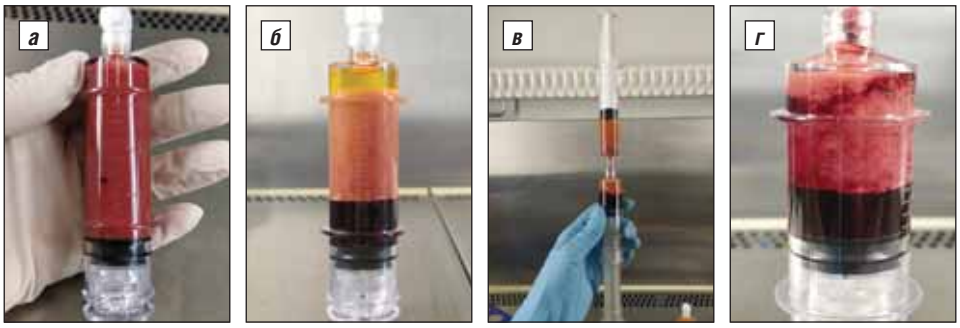

Рис. 1. Использование шприцов «ПРОМОБАРРЕЛЬ» (PROMOBARREL) для выделения СВФ: *а* – сбор липоаспирата в шприцевые системы перед центрифугированием; *б* – липоаспират после центрифугирования; *в* – сбор СВФ и удаление дебриса; *г* – стрелка указывает на область, содержащую максимальную концентрацию СВФ после центрифугирования

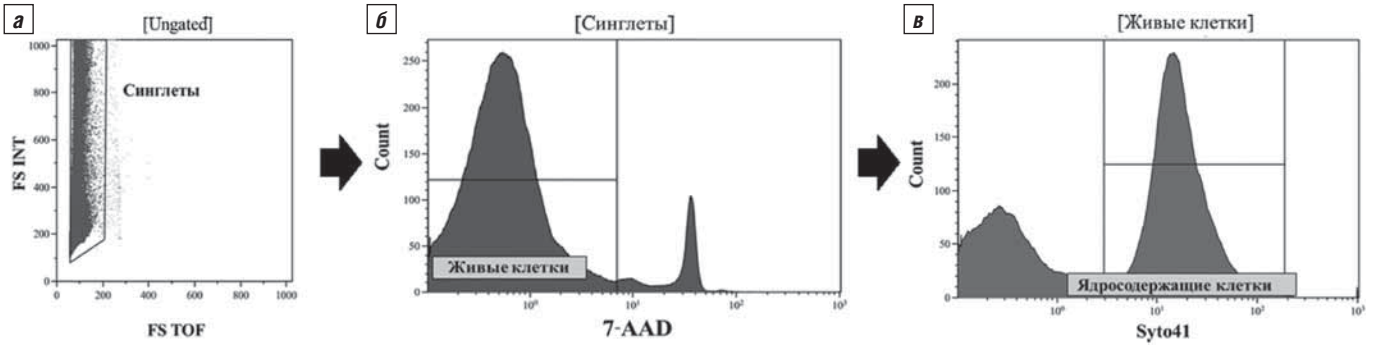

Рис. 2. Определение жМСК в СВФ; последовательность выделения живых ядросодержащих клеток для дальнейшего анализа жМСК; *а* – исключение конгломератов клеток; *б* – удаление из анализа нежизнеспособных клеток, связавших интеркалирующий краситель 7-AAD; *в* – выделение ядросодержащих клеток на основании положительной реакции Syto41

Обнаружение жМСК в СВФ – это ступенчатый последовательный процесс (см. рис. 2, 3). Сначала отделяли жМСК от безъядерных клеток, находящихся в смеси, затем проводили фенотипирование с целью обнаружения специфических поверхностных клеточных маркеров (CD45$^-$, 34$^+$, 73$^+$, 90$^+$, 59$^+$, Syto41$^+$, AAD$^-$). Фенотипический анализ клеток производили на проточном цитометре Navios с помощью программы Kaluza Analysis (и то, и другое – производства компании Beckman Coulter). К нашему удивлению, процентное содержание жМСК в Колл(-) и Колл(+) в целом значимо не различалось. Среднее содержание жМСК в образцах Колл(-) составляло 6,16%, в Колл(+) – 8,26% (исключение – донор №2, где разница была значительной). В настоящее время мы затрудняемся объяснить, чем обусловлена такая разница в относительном количестве жМСК; возможно, были какие-то погрешности в сборе или ресуспензировании СВФ. Другой причиной может быть аутофлюоресценция или неспецифическое связывание антител. Подобные феномены могут быть связаны не с источником СВФ (костный мозг, жировая ткань или «стимулированная» кровь), а со многими другими факторами и элементами (например, с фибриновыми волокнами). Количество полученных от доноров жМСК (см. таблицу) различалось существенно, несмотря на сравнительную однородность выборки по полу, возрасту и показателям избыточности массы тела, причем разница наблюдалась и при заборе материала из одних и тех же анатомических областей у разных доноров. Возможно, возраст доноров все-таки играл некоторую роль, однако корреляцию вывести сложно в связи с малым числом пациентов в выборке. Мы обратили внимание на то (данные не представлены в этой статье), что при повторных липосакциях одних и тех же областей количество ядерных клеток значимо снижалось. Достоверно обосновать факторы, повлиявшие на получение указанных результатов, не представляется возможным, так как мы не располагаем полным анамнезом пациентов.

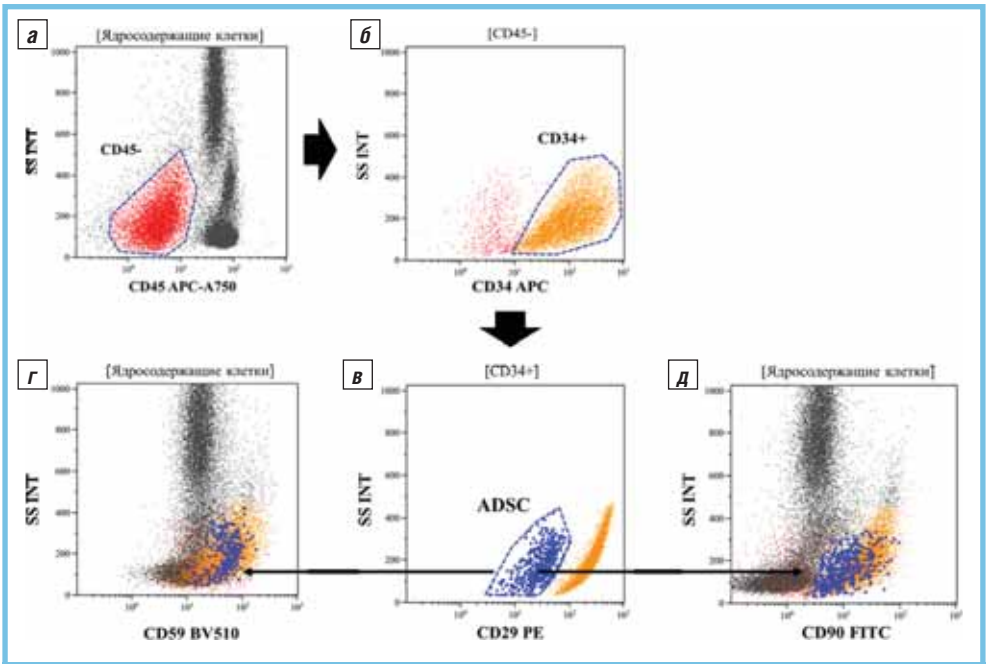

Рис. 3. Алгоритм поиска жМСК на основании экспрессии характерных мембранных маркеров; *а* – выделение CD45-негативной популяции среди жизнеспособных ядросодержащих клеток; *б* – определение CD34-позитивных клеток в пределах гейта CD45-; *в* – выявление истинных жМСК (показаны синим цветом), исходя из экспрессии маркера CD29, а также исключение из анализа неспецифически окрасившихся элементов (показаны оранжевым); *г, д* – оценка экспрессии маркеров CD59 и CD90 на поверхности выявленных клеток

Места получения липоаспирата для выделения жМСК

Донор	Коллагеназа	Количество ядросодержащих клеток	% жМСК	Место получения жира
1	–	2785	10,7	Живот, бока
	+	32 568	13,3	
2	–	12 412	2,3	Передняя внутренняя поверхность бедер
	+	100 561	10,3	
3	–	19 864	1,56	Передняя брюшная стенка
	+	56 446	2,5	
4	–	6614	4,23	Передняя брюшная стенка
	+	46 305	4,55	
5	–	9685	7,87	Передняя внутренняя поверхность бедер, колени
	+	12 564	8,32	
6	–	7571	5,65	Бедра
	+	79 811	7,2	
7	–	5645	5,18	Бока, живот, колени, спина
	+	45 010	6,37	
8	–	7654	9,89	Живот, руки, внутренняя часть бедра
	+	86 452	10,94	
9	–	14 789	8,61	Живот, бока, спина
	+	129 872	10,54	
10	–	3547	5,6	Передняя брюшная стенка
	+	458 779	8,59	

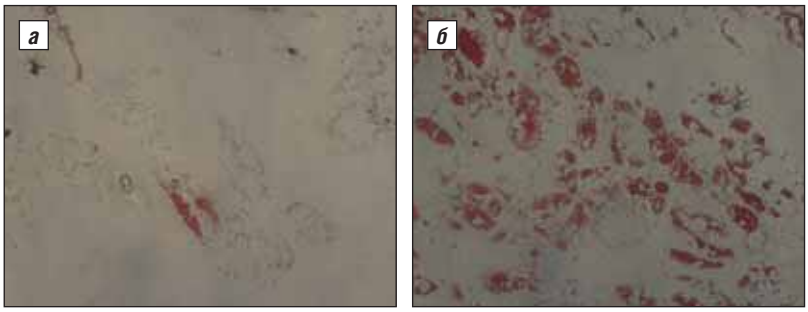

Рис. 4. Адипогенная дифференцировка жМСК; 20-кратное увеличение клеточной культуры, содержащей жМСК, преадипоциты и адипоциты; липидные вакуоли, окрашенные OilRedO: *а* – Колл(-) культура; *б* – Колл(+) культура

СВФ, полученные из Колл(-) и Колл(+), были посеяны и индуцированы в сторону адипогенной дифференцировки методами, описанными в разделе «Материалы и методы». После 21 дня культивирования клетки были окрашены красным OilRedO и изучены с помощью стандартного микроскопа. Преадипоциты и адипоциты идентифицировались по ярко-красным липидным вакуолям. В промежутках между окрашенными адипоцитами и преадипоцитами выявляли недифференцированные клетки – жМСК и другие клетки из СВФ (рис. 4). Можно видеть, что количество клеток в Колл(-) значительно ниже. Вероятно, это обусловлено в целом более низким содержанием жМСК, выделяемого и далее культивируемого (с адипогенной дифференцировкой) из одного и того же объема липоаспирата.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что шприцевой метод получения СВФ позволяет получать несколько меньшее количество клеток, чем другие методы, но эти количества сравнимы. При этом шприцевой метод может быть реализован в условиях операционной в отсутствие биотехнологической лаборатории и без ферментативной обработки первичного материала.

* * *

Конфликт интересов не заявлен.

Литература/Reference

1. American Society of Plastic Surgeons. New Statistics Reveal the Shape of Plastic Surgery. GlobeNewswire News Room / GlobeNewswire, 1 Mar. 2018, *www.globenewswire.com/news-release/2018/03/01/1402022/0/en/New-Statistics-Reveal-the-Shape-of-Plastic-Surgery.html/*

2. Anonymous. Regulations, Directives and Other Acts / European Union, 7 Mar. 2019, *www.europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_en*

3. Anonymous. Advanced Therapy Medicinal Products: Overview / European Medicines Agency, 16 Mar. 2019, *www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/advanced-therapy-medicinal-products-overview*

4. Peng G. Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation: Facts, Fiction, and Pearls for Practice // Facial Plastic Surgery Clinics. – 2019; 27 (3): 405–11. DOI: 10.1016/j.fsc.2019.04.006.

5. Gir Ph. et al. Human adipose stem cells: current clinical applications // Plastic and reconstructive surgery. – 2012; 129 (6): 1277–90. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31824ecae6

6. Charles-de-Sá L. et al. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells // Plastic and reconstructive surgery. – 2015; 135 (4): 999–1009. DOI: 10.1097/PRS.0000000000001123.

7. Doi K. et al. Stromal vascular fraction isolated from lipoaspirates using an automated processing system: bench and bed analysis // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2013; 7 (11): 864–70. DOI: 10.1002/term.1478.

EFFICIENCY OF ISOLATION OF STROMAL VASCULAR FRACTION CELLS FROM LIPOASPIRATE WITHOUT ENZYMATIC TREATMENT

***A. Mishra*[1, 2]; *A. Semchenkova*[2], *V. Zhogov*[2], *A. Bader*[3], *A. Melerzanov*[1]**, *Candidate of Medical Sciences*

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology*
[2]*Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow*
[3]*University of Leipzig, Germany*

This study is a comparative analysis of methods for obtaining a stromal vascular fraction from lipoaspirate. The first method is the classical isolation of a cell population using enzymatic treatment of adipose tissue in a cell laboratory. The second method can be implemented in the operating room, without using enzymes, and within a short time.

Key words: *cosmetology, adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, stromal vascular fraction, biotechnology, skin care, regenerative cosmetology.*

For citation: *Mishra A., Semchenkova A., Zhogov V. et al. Efficiency of isolation of stromal vascular fraction cells from lipoaspirate without enzymatic treatment // Vrach. – 2019; 30 (8): 24–28. https://doi.org/10.29296/25877305-2019-08-05*