

**Соцков А.Ю., Пономарев Д.Н., Карасов И.А., Колесникова Ю.А.,
Айрапетян А.А., Умаров А.Х., Храмова Н.И.
МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ
ФРАКЦИИ ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ**

Кафедра общественного здоровья и здравоохранения ФДПО
Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А.
Вагнера, г. Пермь, Российская федерация

**Sotskov A.Yu., Ponomarev D.N., Karasov I.A., Kolesnikova Y.A., Airapetyan A.A.,
Umarov A.H., Khramtsova N.I.**

**PROCEDURE FOR ISOLATION OF STROMAL-VASCULAR
FRACTION FROM ADAPTIVE TISSUE**

Department of Public Health and Healthcare FDPO
Perm State Medical University n. a. acad. E. A. Vagner, Perm, Russian
Federation

E-mail: danilpon07@gmail.com

Аннотация. Стремительное развитие регенеративной медицины и клеточной биологии открывает новые терапевтические возможности, которые будут доступны в ближайшем будущем. Стволовые клетки вызывают высокий интерес благодаря своему потенциалу к восстановлению тканей и органов. В статье описан протокол по выделению стромально-васкулярной фракции механическим методом.

Annotation. The rapid development of regenerative medicine and cell biology is opening up new therapeutic options that will be available in the near future. Stem cells are of great interest due to their potential for tissue and organ repair. The article describes a protocol for the isolation of the stromal-vascular fraction by a mechanical method.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция, стволовые клетки.

Key words: stromal-vascular fraction, stem cells.

Введение

Последнее десятилетнее огромное внимание ученых и врачей привлекает подкожная жировая клетчатка, которая является альтернативой костному мозгу как источника стволовых клеток. Жировая ткань является наиболее богатым источником прогениторных клеток, которые при специальной обработке являются великолепным материалом для использования в регенеративной медицине.

Огромным преимуществом жировой ткани является простота метода забора ткани, который не представляет трудностей для врача и является безболезненным и безопасным для пациента.

В регенеративной медицине широко используется стромально-васкулярная фракция (СВФ), которую получают из жировой ткани либо ферментативным путем с помощью коллагеназы, либо механическим способом. В состав СВФ входят мезенхимальные прогениторные клетки, преадипоциты, гладкомышечные клетки, эндотелиальные клетки, перициты, Т-клетки, макрофаги.

Механизм действия СВФ изучен в наше время не до конца и может быть специфичным для определенной ткани или органа. Биологическая активность СВФ может определяться микроокружением ткани хозяина. Известно, что основными функциями СВФ являются: ангиогенетическая, антиапоптотическая, антифибротическая, иммунная регуляция, противовоспалительная и трофическая.

Способность СВФ к дифференцировке в различные типы клеток отлично отвечает задачи пластической хирургии по устранению дефектов покровных и подлежащих тканей. В настоящее время трансплантация аутологичного жира с СВФ широко используется в реконструктивной хирургии лица и груди.

В челюстно-лицевой хирургии используется СВФ для регенерации костной ткани в области дефектов. Известно, что СВФ в комбинации с костной крошкой способна формировать костную ткань в дефектах при одонтогенных остеодеструктивных процессах.

СВФ успешно используется при лечении остеоартрита коленных суставов. СВФ может играть роль в локальном воспалительном процессе в суставе. Исследования показали, что СВФ оказывает противовоспалительный эффект как на хондроциты, так и на синовиоциты. СВФ проявляет иммунодепрессивное действие и способствует высвобождению противовоспалительных молекул, таких как ИЛ-10, ИЛ-1, трансформирующий фактор роста бета, индоламин-2,3-диоксигеназа, простагландин E2.

Терапия на основе стволовых клеток жировой ткани – одна из самых многообещающих терапевтических стратегий заживления ран, которая способствует таким физиологическим процессам, происходящих в ране, как реэпителизация, ангиогенез и иммуномодуляция.

Также СВФ успешно используется в колопроктологии, лечении урогенитальных заболеваний, заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем [1, 2].

Цель исследования – выделение стромально-васкулярной фракции из жировой ткани механическим методом.

Материалы и методы исследования

Проводилось исследование образцов жира («macrofat»), аспирированных с различных анатомических зон под местной инфильтрационной анестезией раствором Кляйна. Применялся метод механической липэктомии. Липоаспирацию производили с помощью канюли диаметром 4 мм. Липоаспират собирался с разных анатомических зон в разные шприцы в анаэробных условиях

и без дополнительной обработки, отмывания и фильтрации при комнатной температуре доставлялся в лабораторию в течение 3 часов с момента его забора.

Подсчет клеток производился при помощи камеры Горяева. Для подсчета клетки разводили в 20 раз 3% уксусной кислотой. Использовался микроскоп Микромед 1. При подсчёте клеток использовался окуляр 10х, объектив на 10х и 40х.

Результаты исследования и их обсуждение

После доставки в лабораторию жир отмывался физиологическим раствором натрия хлорида 0,9% для удаления эритроцитарной массы.

Далее следовала механическая фильтрация жира. Для фильтрации жира поочередно применялись анаэробные клеточные фильтры 1,4 мм, 1,2 мм и эмульсифицирующий фильтр, содержащий сетку с многочисленными ячейками с внутренним диаметром 0,5 мм («нанофильтр»).

После фильтрации жира производилось его центрифугирование в течение 10 минут. После центрифугирования на дне пробирки образовывалась клеточная взвесь, содержащая стромально-васкулярную фракцию. С помощью микропипетки стромально-васкулярная фракция переносилась в новую пробирку.

СВФ разбавлялась средой 199. Затем производилась повторное центрифугирование в течение 15 минут для отмывки от эритроцитарной массы. Данная процедура проводилась 2 раза.

С помощью дозатора верхний слой жидкости, содержащий эритроциты удалялся. Полученная на дне пробирки жидкость и есть стромально-васкулярная фракция.

190 мкл уксусной кислоты смешивали с 10 мкл клеточной взвеси в эпиндорфе. Полученной массой заполняли камеру Горяева.

В результате микроскопирования было подсчитано $3 \cdot 10^6$ фибробластоподобных клеток на 18 мл липоасpirата.

Получение СВФ из жира – многоэтапный процесс, который требует квалификации и определенных навыков работы с биологическими объектами. Выделение клеток СВФ принципиально можно разделить на два способа – механический и ферментативный с использованием коллагеназы. Механический метод относительно недорогой, однако позволяет получить меньше клеток на миллилитр обработанного липоасpirата, чем ферментативный. Также полученный состав клеток при использовании различных методов отличается. В популяции клеток, полученных механическим способом, отмечается меньшее содержание прогениторных клеток и большее содержание клеток CD 45+ по сравнению с ферментативным методом [3, 4].

Ферментативный способ выделения СВФ в настоящее время нашел более широкое применение в исследовательских и производственных лабораториях, чем механический. Однако этот способ достаточно дорогой, что ограничивает его применение в клинической практике. Кроме того, при использовании ферментативного метода необходимо учитывать дополнительные факторы в

отношении безопасности пациентов при клиническом применении СВФ. К таким факторам относят остаточную активность ферментов и аллергическую реакцию организма на фермент.

В связи с наличием ограничивающих факторов для использования ферментативного метода и поиском альтернативного способа, различные исследователи разработали неферментативные методы выделения СВФ. Так, Raposio с коллегами предложил использовать фазы встряхивания и центрифугирования при получении СВФ. Также было предложено использовать метод с использованием фильтров для получения наножира[5].

В нашем исследовании мы использовали механический метод в связи с его простотой, доступностью и дальнейшей возможностью безопасного клинического применения.

Выводы

Метод выделения стромално-васкулярной фракции, использованный нами, нуждается в доработке. Для получения большего количества прогениторных клеток требуется оптимизация протокола при работе с центрифугой, а также количеством пассажей при фильтрации жира.

Список литературы

1. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины / А.В. Веремеев, Р.Н. Болгарин, М.А. Петкова, Н. Кац // *Гены и клетки*. 2016. Т. 11. № 1. С. 35-42.
2. Andia I. Stromal Vascular Fraction Technologies and Clinical Applications / I. Andia, N. Maffulli, N. Burgos-Alonso // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2019. – Vol. 19, № 12. – P. 1289 – 1305.
3. Aronowit J. A. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue / J. A. Aronowitz, R. A. Lockhart, C. S. Hakakian // *Springerplus*. – 2015. – Vol. 4, № 713. – P. 1 – 9.
4. Mechanically Isolated Stromal Vascular Fraction Provides a Valid and Useful Collagenase-Free Alternative Technique: A Comparative Study / B. Chaput, N. Bertheuil, M. Escubes et al. // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2016. Vol. 138, № 4. – P. 807 – 819.
5. Shift toward Mechanical Isolation of Adipose-derived Stromal Vascular Fraction: Review of Upcoming Techniques / A. Condé-Green, V. S. Kotamarti, L. S. Sherman et al. // *Plast.Reconstr. Surg. Glob. Open*. – 2016. Vol. 4, №9. – P. 1017.

УДК [616.714.3+616.711.1]-006-089.8

Сысueva Д.Д., Дмитриева Е.Г., Комарова С.Ю.

**ХИРУРГИЧЕСКОЕ УДАЛЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ В ОБЛАСТИ
КРАНИОВЕРТЕБРАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА (НА ПРИМЕРЕ
КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ, РОБОТИЗИРОВАННОГО
ТРАНСОРАЛЬНОГО УДАЛЕНИЯ ХОРДОМЫ)**

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Sysueva D.D., Dmitrieva E. G Komarova S.Yu.

**SURGICAL REMOVAL OF TUMORS IN THE AREA OF THE
CRANIOVERTEBRAL JUNCTION (ON THE EXAMPLE OF A CLINICAL
CASE OF ROBOTIC TRANSORAL CHORDOMA REMOVAL)**

Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: sysuevadarina@yandex.ru

Аннотация. В статье рассмотрен клинический случай и тактика роботизированного трансорального удаления злокачественной опухоли (хордомы) С2 позвонка, обнаруженной у пациента 27 лет после автомобильной аварии. Данный случай был взят из публикаций Пенсильванского медицинского