Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани

Comparative characteristic of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue

В.Б. КАРПЮК[1], С.В. КОЧЕНОВА[2], проф. М.Г. ШУБИЧ
[1]Кубанская государственная медицинская академия, Краснодар
[2]МУП «Южно-Российский центр косметологии и пластической хирургии», Краснодар

V.B. KARPYUK[1], S.V. KOCHENOVA[2], professor M.G. SHUBICH
[1]Kubanskaya State Medical Academy, Krasnodar
[2]MUP «Yuzhno-Rossiysky Centre of Cosmetology and Plastic Surgery», Krasnodar

Введение

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются перспективным материалом для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Разработка этой проблемы сулит большие выгоды в решении задач пластической и реконструктивной хирургии. В обзоре представлена подробная характеристика свойств МСК взрослого организма. Описаны свойства популяции клеток, полученной из аспирированной жировой ткани. Установлено, что из липоаспирата может быть получена клеточная фракция, имеющая следующие характеристики: 1) преобладание клеток мезенхимального происхождения с фибробластной морфологией и фенотипическим сходством с МСК стромы костного мозга; 2) способность размножаться *in vitro* без специфических сывороток или добавок в среду; 3) мультилинейный потенциал с дифференцировкой по адипогенной, остеогенной, хондрогенной, миогенной и нейрогенной линиям; 4) линейный график роста клеточной популяции с незначительным старением клеток даже при длительном периоде культивирования. Таким образом, человеческая жировая ткань содержит мультипотентные клетки и может представлять альтернативный костному мозгу источник МСК.

Концепция мезенхимальной стволовой клетки зародилась в 1974 г., когда впервые отечественный ученый А.Я. Фриденштейн описал специфическую популяцию негематогенных клеток-предшественников стромы костного мозга, т.е. «колониеобразующие единицы фибробластов» [1, 2]. Позже это название было заменено на «стромальные костномозговые фибробласты» и «стромальные костномозговые клетки» [3]. Сейчас их называют мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) [4]. В конце 1990-х годов МСК впервые были изолированы, и с тех пор количество работ в области клеточной биологии нарастает лавинообразно. В 1999 г. идентификация соматических стволовых клеток рассматривалась журналом «Science» как крупнейшее научное достижение [5]. В настоящее время наблюдается всевозрастающий интерес к МСК, обусловленный их замечательными свойствами и простирающийся от тканевой инженерии и реконструктивной хирургии до генной терапии и лечения наследственных синдромов. Особенно перспективной стратегия аутологического замещения дефектов ткани

[1]В.Б. КАРПЮК,
350020, г. Краснодар, ул. Красная, д. 145
Тел.: (861) 255-99-76, тел./факс: (861) 252-78-02, vkarpyuk@mail.ru

[1]V.B. KARPYUK
ul. Krasnaya, 145, 350020 Krasnodar, Russia
Tel: (861) 255-99-76; tel/fax: (861) 252-78-02; E-mail: vkarpyuk@mail.ru

становится при установлении изобильного и легкодоступного источника МСК, каковым может служить человеческая жировая ткань, получаемая путем аспирации [6–8].

Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга

Строма красного костного мозга состоит из гетерогенной популяции клеток, в которую входят ретикулярные клетки макрофаги, тучные и плазматические клетки, остеогенные клетки и в небольшом количестве фибробластоподобные клетки. Межклеточное вещество представлено ретикулярными волокнами и основным аморфным веществом. Костномозговая ретикулярная ткань вместе с капиллярами синусоидного типа образуют широкопетлистую сеть, в которой располагаются созревающие клетки крови. Клеточное микроокружение играет важную роль в гемопоэзе, так как через комбинацию физических и химических сигналов регулирует пролиферацию и дифференцировку кроветворной клетки [9]. Фибробластоподобные клетки дают рост разнообразным типам зрелых клеток через процесс пошагового созревания, который по аналогии с гемопоэзом назван мезогенезом, а сами фибробластоподобные клетки костного мозга — мезенхимальными стволовыми клетками. Доля истинных «покоящихся» МСК в костном мозге взрослого человека не превышает 0,01–0,001 % и с возрастом их количество уменьшается. Так, если у новорожденного одна МСК приходится на 10 тыс. клеток костного мозга, то в 50 лет — на 400 тыс. клеток, а в 80 лет — на 1–2 млн клеток [10].

МСК легко размножаются и поддерживаются *in vitro* в классической среде, не требуя специфических добавок и стимуляторов роста. Популяция обладает способностью прилипать к подложке, формируя островки клеток [11]. В культуре эти мононуклеарные клетки имеют фибробластоподобную морфологию и следующие цитохимические характеристики: судан черный «+», щелочная фосфатаза «+», эстераза «–», коллаген IV «+», фибронектин «+» [12]. В 1991 г. P.G. Simmons с соавтором описал первое антитело Stro-1, которое послужило маркером для изоляции мезенхимальных клеток из костного мозга [13]. Позже был определен целый ряд антител-маркеров костномозговой МСК: SH2+ (CD 105); SH3+; SH4+ (CD73) [10]. В настоящее время для изоляции и обогащения этих клеток используют как простые свойства, имеющие способность к прилипанию, так и сложные коктейли антигенов, которые позволяют отбирать из костного мозга специфическую популяцию клеток [14]. Важная особенность МСК — рост культуры клонами, которые удается многократно пассировать и получать миллионы генетически однородных прогениторных плюрипотентных клеток. Они сохраняют маркеры слабо дифференцированных клеток (SH2, SH3, коллаген I и III типа, фибронектин, рецепторы адгезии VCAM и ICAM, кадгерин, CD44, CD71, CD90, CD120a, CD124) и не имеют антигенов кроветворной клетки — CD34, CD14 и CD45 [15]. За 2–3 пассажа удается нарастить от 50 до 300 млн незрелых клеток. После прекращения деления эти клетки могут дифференцироваться в адипоциты, гладкие миоциты, клетки хряща и костной ткани. Например, до 95 % адипоцитов возникают из стромальных незрелых клеток при добавлении в среду культивирования трех сигналов — изобутил-1-метилксантина (повышающего уровень внутриклеточного цАМФ), дексаметазона и индометацина (ингибитора синтеза тромбоксана). Из того же пула стромальных прогениторных клеток с помощью TGF-beta получают однородную популяцию хрящевых клеток. Клетки костной ткани образуются из той же культуры с помощью трех сигналов — β-глицерофосфата (донора неорганического фосфата), аскорбиновой кислоты и дексаметазона [10, 11].

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани

Костномозговая ткань человека и млекопитающих считается предпочтительным источником извлечения МСК. Однако клиническое использование костного мозга в качестве источника МСК проблематично, так как процедура его получения затруднительна, и в результате удается собрать малое количество клеток. Поэтому многие исследователи ведут поиск альтернативных источников МСК. В литературе описана идентификация МСК в коже, циркулирующей крови, сосудистом эндотелии пуповины, синовиальной оболочке сустава, плаценте [16–18].

Известно, что во время органогенеза идет интенсивная миграция клеток эмбриональной мезенхимы, что обеспечивает формирование клеточного каркаса (стромы) будущих органов и опережающее развитие кровеносных и лимфатических сосудов. Таким образом, стромальная основа всех органов и тканей возникает из общего пула МСК уже на стадии органогенеза. Во взрослом организме часть МСК сохраняется в строме рыхлой соединительной ткани. Жировая ткань, подобно ретикулярной ткани костного мозга, является производной эмбриональной мезенхимы и содержит строму, которая может быть легко изолирована. Этот факт дает основание считать, что жировая ткань может представлять альтернативный источник стволовых клеток.

При изучении этого вопроса выяснилось, что из жировой ткани могут быть получены клетки, которые, подобно костномозговым мезенхимальным стволовым клеткам, имеют фибробластную морфологию, поддерживаются и размножаются *in vitro* в стандартной среде, способны к мультилинейной дифференцировке [8, 19]. Из жировой ткани пациентов, полученной при косметической операции липосакции, полу-

чена стромальная фракция и выделена популяция предполагаемых стволовых клеток [20, 21]. Обработка 300 мл липоаспирата позволяет получить 2–6 × 10^8 таких клеток [19] или, по данным других авторов, 404±206 тыс. клеток на 1 мл аспирата [23]. Изучены кинетика роста и состав клеточной популяции, полученной из липоаспирата. Среднее время удвоения популяции составляет 60 ч, а за один пассаж популяция увеличивается в среднем в 1,5 раза. Выявлена линейная зависимость между кумулятивным удвоением популяции и количеством пассажей, что показывает относительное постоянство скорости увеличения популяции независимо от продолжительности исследования. Кроме того, выявлен низкий уровень старения клеток (тест на β-галактозу), причем вплоть до наиболее поздних пассажей.

По данным иммунофлюоресцентного анализа, большинство популяций составляют клетки с маркерами фибробластов и мезенхимных клеток. Так, антиген к специфическому моноклональному антителу фибробластов ASO2 экспрессирует 85,0±12,8 % клеток, а виментин (белок промежуточных филаментов цитоскелета клеток мезенхимального происхождения) — 63,2±5,6 %. Изучен профиль CD маркеров МСК, полученных из липоаспирата, и проведен сравнительный анализ с данными исследования МСК костного мозга. И клетки из липоаспирата, и костномозговые МСК экспрессируют CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3, которые считаются установленными маркерами мезенхимальной стволовой клетки [23]. В обеих группах выявлена экспрессия STRO-1, традиционно используемого для изоляции мультилинейных предшественников из костного мозга [24]. Напротив, не было экспрессии маркеров гемопоэтической линии CD31, CD34 и CD45 и в той, и в другой культурах.

Проточная цитометрия подтвердила результат иммунофлюоресцентного анализа и дополнительно выявила экспрессию CD13, а также отсутствие маркеров CD14, CD16, CD56, CD61, CD62E, CD104, CD106. Обнаружены различия по двум маркерам: CD 49d (α4-интегрин) и CD106 (VCAM). Клетки из жировой ткани позитивны для CD 49d и негативны для CD106, в то время, как костномозговые МСК, наоборот, для CD49d отрицательны и для CD106 положительны. Экспрессия молекул клеточной адгезии VCAM (CD106) функционально связана с гемопоэзом, поэтому отсутствие этого маркера у клеток стромы жировой ткани можно объяснить их локализацией вне кроветворной ткани (табл. 1).

Адипогенная дифференцировка подтверждается изменением морфологии клеток (растянутые клетки, заполненные жиром), специфическим окрашиванием Oil Red-O, увеличением активности липогенного энзима GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase), экспрессией специфических генов и протеинов (лептин, GLUT4, фактор транскрипции PPARγ2). Уровень адипогенной дифференцировки — 42±10,6 %. Наблюдаемая морфологическая картина сходна с изменениями костномозговых МСК и преадипоцитов клеточной линии 3T3-L1 в аналогичных условиях культивирования. При остеогенной дифференцировке, как и в культуре настоящих остеобластов, наблюдаются фазовые гистологические изменения (пролиферация, синтез матрикса и минерализация), появляются активность щелочной фосфатазы (ЩФ), экспрессия генов остеокальцина, остеонектина, остеопонтина, коллагена I типа, костного морфогенного протеина. Значительно увеличивается экспрессия специфического фактора транскрипции CBFA-1 (core-binding factor alpha 1). Уровень остеогенной дифференцировки, рассчитанный по количеству ЩФ-позитивных клеток, — 50,2±10,8 %. Культивирование клеток в хондрогенной среде сопровождается формированием плотных Alcian-Blue-позитивных узелков, что демонстрирует специфическое окрашивание сульфатированных протеогликанов в хрящевом матриксе. Подтверждением активного хондрогенеза служит также положительная экспрессия протеогликанов (кератан, аггрекан, декорин, бигликан) и хрящевого коллагена 2, 3 и 10-й изоформ. Миогенная индукция клеток приводит к экспрессии фактора миогенной детерминации MyoD1, слиянию и формированию многоядерных клеток, которые экспрессируют миозин тяжелой цепи. С помощью ПЦР выявлена экспрессия и других миогенных факторов транскрипции: десмина, миогенина, myf5 и myf6. Высокая способность к дифференцировке по вышеописанным клеточным линиям сохраняется в течение длительного периода культивирования [21, 19].

Кроме дифференцировки по мезенхимальным клеточным линиям, полученным из липоаспирата, клетки могут индуцироваться к дифференцировке в ранние нейрональные предшественники, которые являются эктодермальными по происхождению [25, 8]. Недифференцированные культуры клеток экспрессируют маркерные характеристики нейрональных клеток, таких, как нейрон-специфическая энолаза, виментин и нейрон-специфический нуклеарный протеин. После 2-недельной обработки изобутилметилксантином, индометацином и инсулином приблизительно 20–25 % клеток дифференцировали в клетки с типичными нейрональными морфологическими характеристиками, при этом демонстрировали увеличенную экспрессию вышеперечисленных нейрональных маркеров, а также имели зачаточный ионный калиевый канал. Авторы пришли к мнению, что полученные из липоаспирата клетки имеют потенциал к дифференцировке *in vitro* в ранние предшественники нейронов и/или глии [25, 26].

Чтобы доказать присутствие популяции стволовых клеток в жировой ткани и проследить формирование колонии из единичной клетки, пробы были культивированы в специальных условиях (табл. 2), при низком слиянии [26]. Так были получены клоны, которые демонстрировали дифференцировку по всем трем ли-

Таблица 1. Сравнительная характеристика маркеров мезенхимальной стволовой клетки (МСК) в зависимости от источника получения

Маркер-антитело	Клеточный антиген-рецептор	Костный мозг	Липо-аспират
Stro-1		+	+
SH2+	TGF-β	+	+
SH3+		+	+
SH4+		+	+
CD13	Аминопептидаза-N (aminopeptidase-N)	+	+
CD14	Липополисахарид (lipopolysacharide – LPS)	-	-
CD16	Fc-γ-рецептор для IgG (Fc-γ-RIII) или Leu 11	-	-
CD29	Интегрин β-1 / gpIIa – молекула клеточной адгезии	+	+
CD31	Гликопротеин, экспрессированный на эндотелиальных клетках и тромбоцитах (PECAM-1). Участвует в межклеточном сигналинге и адгезии клеток	-	-
CD34	Трансмембранный гликопротеин (single chain transmembrane glycoprotein), My 10	-	-
CD44	Гликопротеин клеточной поверхности, также известный как homing cell adhesion molecule (H-CAM), Phagocytic glycoprotein-1 (PgP-1), ECM-III, HUTCH-1, Hermes-1	+	+
CD45	Общий лейкоцитарный антиген (leucocyte common antigen – LCA), принадлежащий к семейству мембранных гликопротеинов, экспрессированных только на клетках гемопоэзной линии	-	-
CD49d	α4-интегрин	-	+
CD54	Молекула межклеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule)	+	Нет данных
CD56	Молекула нейральной клеточной адгезии (neural cell adhesion molecule – NCAM)	-	-
CD61	Гликопротеин (GPIIIa), обнаруженный на мегакариоцитах, тромбоцитах и их предшественниках. Участвует в агрегации тромбоцитов, а также служит рецептором для фибриногена, фибронектина	-	-
CD62E	Молекула адгезии эндотелиальных лейкоцитов (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 – ELAM-1) – селективная адгезивная молекула, обнаруживаемая только на активированных эндотелиоцитах и играющая важную роль во взаимодействии с микроокружением	-	-
CD71	Трансферрин клеточной поверхности (cell surface transferrin receptor), дисульфидный гомодимерный гликопротеин (disulfide-bonded homodimeric glycoprotein)	+	+
CD90	Гликозилфосфатидилинозитол-связанный поверхностный гликопротеин Thy-1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1). Участвует в активации Т-клеток, развитии и функционировании нервной системы и в апоптозе	+	Нет данных
CD106	Молекула васкулярной клеточной адгезии (vascular cell adhesion molecule-1 – VCAM-1)	+	-

Таблица 2. Специфическая индукция мультилинейной дифференцировки клеток, полученных из липоаспирата

Условие культивирования	Среда	Сыворотка	Добавления
Контроль	DMEM	10 %-я эмбриональная телячья сыворотка	1 %-й антибиотик/антимикотик
Адипогенез	DMEM	10 %-я эмбриональная телячья сыворотка	0,5 mM изобутилметилксантин, 1 μM дексаметазон, 10 μM инсулин, 200 μM индометацин, 1 %-й антибиотик/антимикотик
Остеогенез	DMEM	10 %-я эмбриональная телячья сыворотка	0,01 μM 0,25-дигидроксивитамин D3, 50 μM аскорбат-2-фосфат, 10 mM β-глицерофосфат, 1 %-й антибиотик/антимикотик
Хондрогенез	DMEM	10 %-я эмбриональная телячья сыворотка	6,25 μg/ml инсулин, 10 ng/ml TGFβ1, 50 nM аскорбат-2-фосфат, 1 %-й антибиотик/антимикотик
Миогенез	DMEM	10 %-я эмбриональная телячья сыворотка и 5 %-я лошадиная сыворотка	50 μM гидрокортизон, 1 %-й антибиотик/антимикотик

Примечание: DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium.

ниям, окрашиваясь позитивно на маркеры костной, жировой или хрящевой тканей. Авторы назвали эти трехлинейные клоны «стволовыми клетками жировой ткани» (ADSCs — adipose derived stem cells). Они имеют фибробластную морфологию и после экспансии не проявляют никаких признаков другой клеточной морфологии, что говорит о гомогенности культуры. Во всех популяциях ADSCs наблюдается качественное увеличение уровня дифференцировки по сравнению с гетерогенными пробами. Изоляция и экспансия ADSCs не нарушает профиль CD-маркеров. Подтверждая свой мультилинейный потенциал, ADSCs экспрессируют множественные генные характеристики остеогенной, адипогенной и хондрогенной линий.

Заключение

Таким образом, из жировой ткани может быть получена клеточная фракция, имеющая следующие характеристики: 1) преобладание клеток мезенхимального происхождения с фибробластной морфологией и фенотипическим сходством с мезенхимальными стволовыми клетками стромы костного мозга; 2) способность выживать *in vitro* без специфических сывороток или добавок в среду; 3) мультилинейный потенциал с дифференцировкой по адипогенной, остеогенной, хондрогенной, миогенной и нейрогенной линиям; 4) линейный график роста клеточной популяции с незначительным старением клеток даже при длительном периоде культивирования.

До недавнего времени эмбриональные стволовые клетки были «золотым стандартом», способным к дифференцировке в клетки всех трех эмбриональных зародышевых листков. Согласно традиционному взгляду, мезенхимальная стволовая клетка взрослого организма развивается необратимо по одному из направлений дифференцировки (в зависимости от микроокружения, определяемому локализацией в дефинитивном органе), давая рост ограниченному типу зрелых клеток в пределах мезодермального происхождения. Сейчас все большее подтверждение находит новый взгляд, согласно которому спектр развития МСК не столь ограничен, а дочерние клетки имеют трансгерминальный потенциал. В отличие от эмбриональных стволовых клеток, МСК взрослого организма представляют собой собственный восстановительный резерв. Риск иммунного отторжения аутогенных МСК отсутствует, минимальна возможность злокачественного перерождения. Применение их безупречно с морально-этической точки зрения. Имеется легкодоступный и изобильный источник в виде липоаспирата [6, 27, 28]. Вот почему МСК могут стать основой восстановительной медицины будущего.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С.* Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. — М.: Медицина. — 1973. — 223 С.
2. *Friedenstein A.J., Gorskaja J.F. and Kulagina N.N.* Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs // Experimental Hematology. — 1976. — Vol. 4. — P. 267-274.
3. *Kuznetsov S.A., Friedenstein A.J. and Robey P.G.* (1997). Factors required for bone marrow fibroblast colony formation in vitro // Brit. J. Haematol. — 1997 .— Vol. 97. — P. 561-570.
4. *Caplan A.I. and Bruder S.P.* Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century // Trends in Molecular Medicine. — 2001. — Vol. 7. — P. 259-264.
5. *Bloom F.E.* Breakthroughs 1999 // Science. — 1999. — Vol. 286. — P. 2267.
6. *De Ugarte D.A., Ashjian P.H., Elbarbary A., Hedrick M.H.* Future of fat as raw material for tissue regeneration // Ann Plast Surg. — 2003. — Vol. 50(2). — P. 215-219.
7. *Gimble J.M.* Adipose tissue-derived therapeutics // Expert Opin. Biol. Ther. — 2003. — Vol. 3 (5). — P. 705-713.
8. *Mizuno H.* Versatility of adipose tissue as a source of stem cells // J. Nippon. Med. Sch. — 2003. — Vol. 70(5). — P. 428-431.
9. *Eipers P.G., Kale S., Taichman R.S. et al.* Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor development // Exp. Hematol. — 2000. — Vol. 28. — P. 815-825.
10. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 143-147.
11. *Minguell J.J., Erices A. and Conget P.* Mesenchymal stem cells // Exp. Biol. and Med. — 2001. — Vol. 226. — P. 507-520.
12. *Friedenstein A.J.* Stromal mechanisms of bone marrow: Cloning in vitro and transplantation in vivo // Hematol Bluttransfus. — 1980. — Vol. 25. — P. 19-29.
13. *Simmons P.G., Torak-Storb B.* Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody STRO-1 // Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 55-62.
14. *Reyes M., Lund T., Lenvik T. et al.* Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells // Blood. — 2001. — Vol. 98. — P. 2615-2625.
15. *Hegalson C.D., Souvageau G., Lowrence H.J. et al.* Hematogenic stem cells // Blood. — 1996. — Vol. 87. — P. 2740-2749.
16. *Covas D.T., Siufi J.L.C., Silva A.R.L. and Orellana M.D.* Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells // Braz. J. Med. Biol. Res. — 2003. — Vol. 36(9). — P. 1179-1183.
17. *Fickert S., Fiedler J., Brenner R.E.* Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting // Osteoarthritis Cartilage. — 2003. — Vol. 11(11). — P. 790-800.
18. *Ochsenbein-Kolble N., Bilic G., Hall H. et al.* Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair // J. Perinat. Med. — 2003. — Vol. 31(4). — P. 287-294.
19. *Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H. et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // Tissue Eng. — 2001. — Vol. 7. — P. 211-226.
20. *Katz A.J., Liull R., Hedrick M.H. and Futrell J.W.* Emerging approaches to the tissue engineering of fat // Clin. Plast. Surg. — 1999. — Vol. 26. — P. 587.
21. *Mizuno H., Zuk P.A., Zhu M. at al.* Myogenic differentiation of human processed lipoaspirate cells // Plastic. Reconstr. Surg. — 2001. — Vol. 109. — P. 199-209.
22. *Aust L., Devlin B., Foster S. et al.* Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates // Cytotherapy. — 2004. — Vol. 6 (N1). — P. 7-14.

23. *Haynesworth S.E., Baber M.A. and Caplan A.J.* Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies // Bone. — 1992. — Vol. 13. — P. 69-80.

24. *Grontos S., Franclin D.M., Leddy H.A. et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // J. Cell. Physiol. — 2001. — Vol. 189 (1). — P. 54-63.

25. *Ashjian P.H., Elbarbary A.S., Edmonds B. et al.* In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors // Plast. Reconstr Surg. — 2003. — Vol. 111(6). — P. 1922-1931.

26. *Zuk P.A., Zhu M., Ashjan P. et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell. — 2002. — Vol. 13. — P. 4279-4295.

27. *Kuo C.K. and Tuan R.S.* Tissue engineering with mesenchymal stem cells // IEEE Eng. Med. Biol.Mag. — 2003. — Vol. 22 (5). — P. 51-56.

28. *Miller M.J.* Cryopreservation of adult stem cells derived from lipoaspirate // Plast. Reconstr. Surg. — 2003. — Vol. 111(7). — P. 2466-2468.