

Побочное действие: возможны аллергические реакции; при применении в высоких дозах возможны тошнота, рвота, нарушения стула, бессонница, повышенная возбудимость нервной системы.

Противопоказания: повышенная чувствительность к препаратам эхинацеи; аутоиммунные заболевания; нарушение углеводного обмена.

Все лекарственные препараты применяются по рекомендации и под контролем врача.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы исследования и фармакологической коррекции физической работоспособности человека / под ред. И.Б. Ушакова. – М. : Медицина, 2007.
2. Кулиненко О.С. Фармакологическая помощь спортсмену: коррекция факторов, лимитирующих спортивный результат / О. С. Кулиненко. – М. : Советский спорт, 2007.

*В. А. Малиновский,
кандидат биологических наук, доцент,
доцент кафедры общей и клинической фармакологии
Одесского медицинского института,
Международный гуманитарный университет*

ВЫДЕЛЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЛИПОАСПИРАТОВ

Мезенхимальные стволовые клетки, или мультиполярные стромальные клетки (МСК), относятся к классу соматических клеток и характеризуются способностью к пролиферации и дифференцировке в клетки жировой, костной, хрящевой, мышечной, печёночной и нервной тканей [20; 29]. При этом они выделяют в окружающую среду комплекс биоактивных молекул, модулирующих клеточный рост, инициирующих ангиогенез, поддерживающих цитокинез и другие клеточные функции [3]. Имеются также сообщения об их способности к плюрипотентной трансдифференцировке в линии эпителиальных [19; 22] и эндотелиальных [21] клеток. Важной биологической особенностью МСК является их низкая иммуногенность, способность к миграции в очаг повреждения и/или воспаления, гемопоэзстимулирующая и иммуномодулирующая активность, что позволяет рассматривать их, как потенциально активные индукторы и регуляторы репаративных процессов органов и тканей [1; 7; 8]. Так, в настоящее время активно обсуждается возможность использования МСК для неоангиогенеза [16; 3], а также для ускорения восстановления кроветворения и профилактики развития реакции «трансплантат против хозяина» (ТРПХ), часто наблюдаемой при трансплантации стволовых кроветворных клеток пациентам с гемобластозами после высокодозовой химиотерапии [2]. Кроме того, разрабатываются новые подходы по использованию МСК для восстановления репаративного остеогенеза [10] и хондрогенеза [4; 11] как местного, так и системного характера. Получены также обнадеживающие результаты для применения аллогенных и аутогенных мезенхимальных стволовых клеток для терапии ряда

других патологий, таких, как инфаркт миокарда, нефропатия, паркинсонизм, инсульт, сахарный диабет [5; 7; 23], а также для использования в эстетической медицине [18].

Обычно МСК выделяют из костного мозга, плаценты или жировой ткани [12]. Сравнительный анализ МСК различного тканевого происхождения показывает близость их метаболизма на ранних этапах клеточной дифференцировки и участие других генов на более поздних стадиях приобретения клетками тканеспецифических свойств [14]. В то же время, при длительном культивировании отмечается уменьшение пролиферативного потенциала у клеток, полученных из липоасpirатов, по сравнению с аналогичными клетками, выделенными из пупочных канатиков [6]. Тем не менее, выделение МСК из алло- и аутогенных липоасpirатов получило наибольшее распространение ввиду широкого применения липосакции в пластической хирургии и косметологической практике и поэтому является методом выбора [27].

Особенностью и существенным недостатком известных схем выделения МСК из липоасpirатов является тот факт, что в основу практически всех протоколов положено использование гидролитического фермента коллагеназы бактериального происхождения из *Clostridium histolyticum* различной степени чистоты. Даже значительно очищенные коммерческие препараты коллагеназы содержат чувствительное для клеток количество эндотоксина (пряжка 200-8000 EU/мл) [25; 26], избавиться от которого полностью не удаётся даже несмотря на использование целого ряда специальных методов очистки [9; 26]. Коллагеназа из *C. histolyticum* типа I и II (Sigma-Aldrich, Serva, Worthington, Invitrogen-GIBCO, USB, StemCell Technologies, Waco или Roche) используется в концентрациях 0,02 – 0,2%. Высвобождение МСК из жировой ткани обычно производят в конических эрленмейеровских колбах при лёгком орбитальном перемешивании суспензии в шейкере с добавлением фермента в один из следующих буферных растворов: 1X HBSS, 1X HBSS/HEPES, 1X PBS, 1X KRS/HEPES или DMEM F12. Гидролиз обычно занимает 30-60 мин при 37°C. Работу фермента прекращают добавлением DMEM/10% FBS.

Наиболее воспроизводимые и стабильные результаты получаются при использовании протоколов фирмы Miltenyi Biotec для открытой (ручной) и закрытой (аппаратной) схемы выделения МСК из липоасpirатов. Ниже приводится протокол первого типа [15].

Протокол выделения МСК из липоасpirатов ручным методом в открытой системе, но полностью стерильных условиях:

1. Собрать жировую ткань (липоасpirат) тумесцентной липосакцией. Необходимо минимум 250 мл, примерно 1×10^7 – 1×10^8 моноклеарных клеток в стромальной сосудистой фракции. Сохранять не дольше, чем 24 часа при температуре 2–4°C перед выделением.

2. Развести образец липоасpirата пополам раствором 1X PBS (phosphate-buffered saline). Распределить поровну и уравновесить в 500-мл конических пластиковых центрифужных пробирках с закручивающимися крышками (Corning No. 431123).

3. Центрифугировать при 430 g 10 минут без торможения. После центрифугирования собрать верхнюю целевую жировую фазу, содержащую клетки, и

перенести в новую центрифужную пробирку. Развести равным объёмом 1 X PBS.

4. Повторить этап 3 дважды.

5. Развести аспирированную липидную фракцию равным объёмом раствора коллагеназы (3 WüncH Units/мл коллагеназы NB 4G Proved Grade, Serva No. 17465.02) и перенести в 1-л стеклянную коническую колбу. Не наливать больше, чем 500 мл в 1-л сосуд!

6. Инкубировать смесь 30 мин при 37°C в предварительно прогретом орбитальном шейкере. Установить скорость вращения платформы 250 об/мин.

7. По окончании инкубации с ферментом остановить его гидролитическое действие добавлением равного объёма 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), содержащей 20% FBS (фетальной бычьей сыворотки), в каждую колбу.

8. Перераспределить переваренный препарат в новые конические 500-мл центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками и центрифугировать при 600 g в течение 10 мин. Супернатанты аспирировать и удалить.

9. Ресуспендировать осадок (так называемую стромальную сосудистую фракцию, SVF) в 10 мл негемопозитической среды (NH Expansion medium, или NHEM, Miltenyi Biotec No. 130-191-680).

10. Пропустить клеточную суспензию через 100-мкм сотовый фильтр для получения взвеси отдельных клеток и возможно мелких кластеров. Собрать фильтрат в 50-мл конические пробирки.

11. Центрифугировать пробирки с суспензией интактных клеток при 600 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аспирировать и удалить, а осадок ресуспендировать в 5 мл негемопозитической среды (NHEM, см. этап 9).

12. Повторно пропустить клеточную суспензию через сотовый фильтр, но уже с размером пор 40 мкм, для просеивания интактных клеток. Собрать фильтрат в новые 50-мл конические пробирки и посчитать количество выделенных клеток.

13. Довести концентрацию мононуклеарных клеток в суспензии до количества 1×10^7 в 15 мл с помощью разбавления NHEM средой. Произвести посев клеток в культуральные флаконы (матрасы) из расчёта 1×10^7 клеток на один 75-см² флакон и культивировать при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Менять NHEM среду на свежую каждые 24 часа.

Протоколы последующей дифференцировки и трансдифференцировки мультипотентных МСК в линии клеток конкретно необходимых тканей, таких как костную, хрящевую, печёночную, мышечную, эпителиальную и др.), приведены в ряде открытых публикаций [13; 14; 22; 24; 28; 29], а также частично в тематическом буклете фирмы Miltenyi Biotec [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses // *Blood*. – 2005. – V.105. – № 4. – P. 1815–1822.
2. Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness // *Blood*. – 2005. – V.105. – № 5. – P. 2214–2219.

3. Bronckaers A., Hilkens P., Martens W. et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis // *Pharmacol. Ther.* – 2014. – Epub. – S0163-7258(14)00052-7.
4. Bulte J.W.M., Kraitchman D.L., Mackay A.M. et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides // *Blood.* – 2004. – V.104. – № 10. – P. 3410–3413.
5. Choi Y.-H., Kurtz A., Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy // *Hum. Gene Ther.* – 2011. – V.22. – № 1. – P. 3–17.
6. Christodoulou I., Kolisis F.N., Papaevangelidou D. et al. Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy // *Stem Cells Int.* – 2013. – V.2013. – № 246134. – P. 1–12.
7. de Almeida D.C., Donizetti-Oliveira C., Barbosa-Costa P. et al. In search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury // *Clin. Biochem. Rev.* – 2013. – V.34. – № 3. – P. 131–144.
8. DiMarino A.M., Caplan A.I., Bonfield T.L. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair // *Front. Immunol.* – 2013. – V.4. – № 201. – P. 1–9.
9. Dolmans M.M., Michaux N., Camboni A. et al. Evaluation of Liberase, a purified enzyme blend, for the isolation of human primordial and primary ovarian follicles // *Hum. Reprod.* – 2006. – V.21. – № 2. – P. 413–420.
10. Fakhry M., Hamade E., Badran B. et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts // *World J. Stem Cells.* – 2013. – V.5. – № 4. – P. 136–148.
11. Jin X.-B., Sun Y.-S., Zhang K. et al. Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2007. – V.28. – № 5. – P. 663–671.
12. Kern S., Eichler H., Stoeve J. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue // *Stem Cells.* – 2006. – V.24. – № 5. – P. 1294–1301.
13. Lin Y., Luo E., Chen X. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo // *J. Cell Mol. Med.* – 2005. – V.9. – №4. – P. 929–939.
14. Liu T.M., Martina M., Huttmacher D.W. et al. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages // *Stem Cells.* – 2007. – V.25. – № 3. – P. 750–760.
15. MSC/ADSC isolation from human lipoaspirate. Special protocol // *Miltenyi Biotec.* – 2007. – 2 p.
16. Miranville A., Heeschen C., Sengenès C. et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells // *Circulation.* – 2004. – V.110. – № 3. – P. 349–355.
17. Nonhematopoietic (NH) stem cell media for human marrow stromal cells (MSCs) // *Miltenyi Biotec.* – 2007. – 39 p.
18. Pfaff M., Zellner W.W., Steinbacher D.M. Processing technique for lipofilling influences adipose-derived stem cell concentration and cell viability in lipoaspirate // *Aesthetic Plast. Surg.* – 2014. – V.38. – № 1. – P. 224–229.
19. Phinney D.G., Prockop D.J. Concise Review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views // *Stem Cells.* – 2007. – V.25. – № 11. – P. 2896–2902.
20. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999. – V.284. – № 5411. – P. 143–147.
21. Pittenger M.F., Martin B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics // *Circ. Res.* – 2004. – V.95. – № 1. – P. 9–20.
22. Sasaki M., Abe R., Fujita Y. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type // *J. Immunol.* – 2008. – V.180. – № 4. – P. 2581–2587.
23. Sykova E., Forostyak S. Stem cells in regenerative medicine // *Laser Ther.* – 2013. – V.22. – № 2. – P. 87–92.

24. Taléns-Visconti R., Bonora A., Jover R. et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells // World J. Gastroenterol. – 2006. – V. 12. – № 36. – P. 5834–5845.
25. Vargas F., Vives-Pi M., Somoza N. et al. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation // Transplantation. – 1998. – V.65. – № 5. – P. 722–727.
26. Wang Y., Paushter D., Wang S. et al. Highly purified versus filtered crude collagenase: comparable human islet isolation outcomes // Cell Transplant. – 2011. – V.20. – №11–12. – P. 1817–1825.
27. Williams A.R., Hare J.M. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease // Circ. Res. – 2011. – V.109. – № 8. – P. 923–940.
28. Winter A., Breit S., Parsch D. et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells // Arthritis Rheum. – 2003. – V. 48. – № 2. – P. 418–429.
29. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Molecular Biology of the Cell. – 2002. – V.13. – № 12. – P. 4279–4295.

Г. П. Пеклина,

*доктор медицинских наук, профессор,
директор Одесского медицинского института,
Международный гуманитарный университет*

В. А. Бочаров,

*доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры общей и клинической фармакологии
Одесского медицинского института,
Международный гуманитарный университет*

В. В. Бочарова,

*кандидат медицинских наук,
ассистент кафедры дерматовенерологии и косметологии
с циклом эстетической медицины ФПО,
Запорожский государственный медицинский университет*

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ОБОСНОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОСМЕТОЛОГИИ

Введение. В организме человека гиалуроновая кислота содержится в коже, суставной жидкости и связках, стекловидном теле, пуповине. Функции ее весьма разнообразны и касаются не только процессов регуляции содержания влаги в тканях, но и таких важных механизмов как миграция и дифференцировка клеток [1, с. 34–38; 2, с. 94–95].

Проведенный нами анализ косметических средств, где используется гиалуроновая кислота (или ее соль – гиалуронат натрия), свидетельствует о том, что она в основном применяется в качестве увлажняющего компонента [3, с. 16–19; 4, с. 72–77; 5, с. 105–109; 6, с. 251–258; 7, с. 354–358].

В этой связи гиалуроновую кислоту называют «молекулярной губкой», ибо даже 1% ее раствор обладает заметной вязкостью, а ее молекулы в воде