

## ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

**А. Веремеев**<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,

**Н. Кац**<sup>1</sup>, кандидат медицинских наук,

**Р. Болгарин**<sup>1</sup>,

**М. Петкова**<sup>1</sup>,

**И. Корниенко**<sup>2</sup>,

**А. Мелерзанов**<sup>2</sup>, кандидат медицинских наук,

**Н. Мантурова**<sup>3</sup>, доктор медицинских наук,

**В. Нестеренко**<sup>4</sup>, доктор медицинских наук, профессор

<sup>1</sup>ООО «ДжоинТекСэлл», Москва

<sup>2</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

<sup>4</sup>ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

**E-mail:** al.veremeev@gmail.com

*Представлена новая автоматизированная система выделения стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани, сочетающая требуемое качество с высокой скоростью работы и доступной стоимостью. Описаны необходимые условия выполнения процедуры липосакции и инфльтрационной анестезии, а также хранения липоасpirата, представлены оригинальный протокол выделения СВФ и производственный эксперимент по контролю качества.*

**Ключевые слова:** хирургия, пластическая хирургия, ортопедия, косметология, стромально-васкулярная фракция, жировая ткань, регенерация, клеточная терапия, автоматизированная система выделения.

**П**одкожная жировая клетчатка привлекает все большее внимание исследователей и врачей как альтернатива костному мозгу в качестве источника стволовых клеток для регенеративной медицины [1–5]. Обширной доказательной базой подтверждается [1–5, 38–40], что подкожная жировая клетчатка является богатым депо мезенхимальных стромальных клеток. Ранее было показано, что жировая ткань обеспечивает получение значительно большего количества мезенхимальных стромальных клеток, чем костный мозг [1, 6–9]. Важным преимуществом жировой ткани является малая инвазивность процедуры ее взятия, которая может быть проведена под местной анестезией с минимальными болезненностью, дискомфортом и риском для пациента [6].

В 2001 г. Р. Zuk и соавт. впервые описали популяцию мультипотентных стволовых клеток, полученную из жировой ткани [10]. С целью выделения клеточных фракций авторы использовали ферментативный метод обработки липоасpirата. Гетерогенная фракция, отделенная с использованием коллагеназы от стромы и адипоцитов, получила название стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани.

Показано, что после сортировки из СВФ могут быть выделены различные популяции клеток (эритроциты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки, перициты, фибробласты, тучные клетки и преадипоциты) [1, 6, 8–10]. Особый интерес представляют стволовые клетки жировой ткани (ADSCs), которые впервые охарактеризованы P. Zuk и соавт. [10] по их способности дифференцироваться как минимум в 4 различных направлениях [10]. В дальнейшем был подтвержден значительный потенциал данных клеток к дифференцировке в адипоциты, хондроциты, остеобласты, миоциты, нейрональные клетки, кардиомиоциты и гепатоциты [1, 6, 7, 9]. Использование этой возможности показано в ряде экспериментальных и клинических исследований [11–16].

Выделение СВФ из жировой ткани представляет собой многоэтапную процедуру и требует определенных навыков в работе с клеточными культурами [6–8, 39]. Протокол выделения СВФ [10] представлял собой относительно простую процедуру, которая требовала лишь стандартного лабораторного оборудования и простых реагентов (фосфатно-солевой буфер, стандартные культуральные среды и набор протеолитических ферментов, в частности коллагеназы). Однако обработка значительных объемов липоасpirата сопряжена с высокими временными и организационными затратами, требует наличия стерильных расходных материалов, а также соответствующих лабораторных помещений и обученного персонала [17, 18].

В качестве альтернативы ручному методу создан ряд автоматизированных систем, позволяющих избежать обозначенных проблем и открывающих возможность применения терапии непосредственно «у постели больного» без дополнительных лабораторных этапов [18, 19, 38]. Данные системы позволяют изолировать большое количество клеточного материала непосредственно после процедуры липоасpirации; пациенту клеточная фракция в разных медицинских целях может быть введена сразу после выделения [18, 19].

Практически все автоматизированные системы состоят из аппаратной стационарной части и одноразовых стерильных блоков [18–24], в каждый из которых входит камера для обработки ткани — ее отмывки, обработки ферментами и центрифугирования [18–24]. В комплектацию одноразового блока производители включают шприцы для заливки коллагеназы и отбора готового образца, ферменты, а также соединительные трубки и расходные материалы, формирующие «индивидуальный набор» (kit) [18–24]. В целом автоматизированные системы имитируют ручной метод с тем отличием, что все процессы заранее запрограммированы и выполняются аппаратной частью вне зависимости от лаборанта или исследователя [18, 19]. Использование подобных устройств позволяет стандартизировать протокол выделения и значительно повысить качество конечного продукта. Однако данные системы отличаются высокой стоимостью и поэтому малодоступны для широкой клинической практики [18, 19, 40]. С целью решения вопроса о гармонизации качества выделения клеточного материала и доступности подобных технологий разработана новая полуавтоматическая система для выделения СВФ.

#### ТРЕБОВАНИЯ К ЛИПОСАКЦИИ

С целью выделения СВФ может быть использована жировая ткань в разных формах — как отдельные сегменты, полученные в результате резекции, так и липоасpirат [25–27, 39]. Оба метода подходят для выделения СВФ при условии

соблюдения всех требований к процедуре взятия материала [25–27]. В то же время метод липосакции имеет ряд преимуществ перед процедурой резекции, к которым относятся малая инвазивность процедуры и короткий период послеоперационного восстановления [25–27]. В последние 10 лет появилось много вариантов липосакции [28], однако наиболее распространенной остается процедура тумесцентной липосакции, при которой в жировую клетчатку вводят большое количество физиологического раствора с анестетиками и сосудосуживающими препаратами с последующей вакуумной аспирацией [29]. Количество выделенных клеток и их жизнеспособность значительно варьируют в зависимости от метода. К примеру, вакуумная или ультразвуковая липосакция может приводить к уменьшению количества выделяемых клеток [30, 31].

Липосакцию выполняют с соблюдением следующих общих требований:

- пациент должен быть допущен к липосакции специалистом по пластической хирургии на основании общей оценки здоровья;
- рекомендуемый размер аспирационной канюли  $\leq 3$  мм (в идеале — 2,0–2,5 мм) [32];
- чрезмерная доза адреналина может уменьшить эффективность сбора клеток [33];
- устройства, производящие вибрации любой частоты, должны быть одобрены и проверены на предмет жизнеспособности клеток, в противном случае использовать их не рекомендуется [30, 31];
- для применения СВФ в ортопедии необходимо в общей сложности 60–80 см<sup>3</sup> липоасpirата для каждой зоны применения; в других случаях расчет количества клеточного продукта должен быть основан на соотношении  $1,0\text{--}1,2 \cdot 10^5$  одноядерных клеток на 1 г декантированного жира;
- жир берут из брюшной или боковых областей (в зависимости от формы тела), однако предпочтительна брюшная или бедренная [34–36];
- для сбора липоасpirата используют входящие в комплект системы стерильные шприцы на 60 мл с luer-lock-соединением, которые после изъятия материала немедленно закрываются стерильным колпачком;
- процедура может быть выполнена под местной или общей анестезией, однако рекомендуется местная анестезия;
- в амбулаторных условиях применяется инфильтрационная анестезия.

**Инфильтрационная анестезия** осуществляется посредством введения до процедуры липосакции в подкожную жировую ткань большого объема разбавленного раствора анестетика — до тех пор, пока ткань не станет плотной или «припухшей». Типичный раствор анестетика содержит от 0,05 до 0,1% лидокаина, адреналин в соотношении 1:1 000 000 и бикарбонат натрия в 1 л физиологического раствора. Введение адреналина в ткани вызывает выраженное сужение капилляров, вследствие чего снижается скорость всасывания лидокаина и значительно уменьшается интраоперационная кровопотеря. Однако чрезмерная доза адреналина может негативно повлиять на эффективность сбора клеток жировой ткани [33].

На шприц наносят данные пациента, указывают время липосакции; перед транспортировкой каждый шприц нумеруют. Максимальное время между липосакцией и транспортировкой липоасpirата не должно превышать 2 ч. Транс-

портировку закрытых шприцев проводят при постоянно контролируемой температуре (2–8°C), избегая резких ее колебаний (можно использовать медицинские термоконтейнеры).

#### ХРАНЕНИЕ ЛИПОАСПИРАТА

Большое значение имеет время хранения биологического материала до начала выделения СВФ. В идеальном случае липоаспират должен быть обработан непосредственно после его взятия [37]. При отсутствии такой возможности липоаспират может без каких-либо негативных последствий храниться в течение 1 сут при температуре 4°C, хотя в этом случае значительно снижается конечный выход СВФ [37].

Образец липоаспираата поступает в лабораторию сразу после его получения лицензированным специалистом по пластической хирургии в лицензированном хирургическом центре. Процедура извлечения СВФ должна быть проведена не позже 16 ч с момента окончания липосакции. Если выделение клеток выполняется в сроки ≤6 ч с момента получения липоаспираата, его необходимо хранить при температуре 2–8°C. Если выделение клеток осуществляется в сроки >6 ч с момента получения липоаспираата, следует провести декантацию жира (отделение жидкой фазы липоаспираата). Для этого шприцы с липоаспиратом на 15 мин устанавливают в вертикальное положение, чтобы отделить пассивный жир от жидкой фазы. Жидкую фазу из шприцев удаляют в стерильную пластиковую емкость и, отобрав из нее пробы для теста на стерильность, утилизируют. Липоаспират после этой процедуры должен храниться при температуре 2–8°C. Обработку липоаспираата проводят за 2–4 ч до предполагаемого введения СВФ пациенту.

#### ПРОТОКОЛ

Во время работы предлагаемого устройства (герметичная емкость) в нем происходит процесс поэтапной отмывки и обработки жировой ткани (липоаспират) смесью протеолитических ферментов с целью выделения СВФ. В ходе центрифугирования СВФ проходит через систему микрофильтров в камеру для концентрирования клеток. Излишки жидкости удаляют, а осадок отмывают от остатков ферментов буферным раствором. Полученную СВФ отбирают через соответствующий канал.

Работа выполнена на 3 образцах липоаспираата, полученного в результате операции по липосакции. Липоаспират собирали в шприцы объемом 50 мл с luer-lock-соединением. Затем 100 мл липоаспираата аккуратно по стенке вносили в систему в камеру для обработки ткани через соответствующий канал посредством соединения шприца со штуцером-переходником и плотно закрывали крышку штуцера-переходника (общий вид системы



Рис. 1. Система для выделения СВФ жировой ткани

представлен на рис. 1). Вносили сбалансированный солевой раствор Хэнкса (100 мл) и плотно закрывали крышку штуцера переходника. Систему помещали в термостатируемую при 37°C камеру с шейкером со скоростью вращения 100–150 об/мин на 15–20 мин для промывки биологического материала. Систему центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. Не переворачивая систему, с помощью шприца аккуратно отбирали осадок в объеме 100 мл и плотно закрывали крышку. Повторяли цикл промывки 3 раза.

Вносили смесь коллагеназы I, коллагеназы II, термолизина, диспазы и трипсина (общий объем 10 мл) и сбалансированный солевой раствор Хэнкса (90 мл). Систему помещали в термостатируемую при 37°C камеру с шейкером со скоростью вращения 100–150 об/мин на 45 мин для ферментативной обработки биологического материала. Систему центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин.

Не переворачивая систему, с помощью шприца аккуратно отбирали примеси жира, стромы, дебриса и остатков эритроцитов в объеме 190 мл и вносили такой же объем сбалансированного солевого раствора Хэнкса, затем систему центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Процедуру промывки повторяли 3 раза.

Отбирали СВФ в объеме 2 мл.

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Полученная фракция клеток должна быть передана для контроля качества общепринятыми методами — определением количества клеток, их жизнеспособности и иммунофенотипа. В производственном эксперименте контроль качества проводился на 3 различных образцах следующим образом:

- 1) клетки были выделены с использованием системы по оригинальной методике и разведены фосфатно-солевым буфером. Средний объем СВФ составил 2 мл, общая концентрация клеток в образце — 66 000 клеток на 100 мкл;
- 2) оценку жизнеспособности клеток СВФ проводили с использованием набора Annexin V-FITC Kit согласно инструкции производителя (Приложение, A5-PI, BD Biosciences). Метод основан на использовании аннексина V (Annexin V, меченный FITC), аффинного к фосфатидилсерину, который в процессе апоптоза локализуется на клеточной поверхности и формирует один из специфических сигналов для распознавания апоптотических клеток. В исследуемой СВФ выявлено 98,94% живых клеток, 1,02% апоптотических и 0,04% разрушенных клеток;
- 3) иммунофенотипирование СВФ проводили с помощью метода проточной цитометрии на цитофлуориметре Accuri C (BD Biosciences) с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE), к маркерам:
  - линейный коктейль из CD105 PerCP-Cy5.5/CD73 APC/CD90 FITC — маркеров зрелых стволовых клеток, меченных FITC;
  - линейный коктейль из CD45/CD34/CD11b/CD19/HLA-DR PE — маркеров клеток гемопоэтического ряда, меченных PE;
  - отдельно CD105 PerCP-Cy5.5, CD73 APC, CD90 FITC;
  - отдельно CD44 PE (для добавления вместо линейного коктейля);
  - изотипический контроль.

Проводили анализ прямого и бокового светорассеяния в целях определения размеров изучаемых объектов и наличия внутриклеточных включений. Было проанализировано не менее 100 тыс. событий для каждого образца, результаты приведены в средних арифметических.

Выделенная СВФ характеризовалась высокой жизнеспособностью ( $91,0 \pm 4,2\%$  живых клеток), а также низким содержанием дублей и дебриса. Синглеты (отдельные клетки) составляли  $92,0 \pm 4,1\%$ , дубли (слипшиеся клетки) –  $1,4 \pm 0,1\%$ , а дебрис (остаточный мусор в образце и эритроциты) – лишь  $6,20 \pm 0,91\%$ . По оптическим характеристикам были определены 2 гейта: лимфоцитарно-моноцитарный (SVF-1) и целевая фракция клеток (SVF-2). Из пула отдельных клеток лимфоциты и моноциты составили  $91,8 \pm 1,3\%$ , целевая фракция –  $7,50 \pm 0,75\%$ . Выделенная СВФ содержала до  $20,0 \pm 2,1\%$  CD90-положительных клеток,  $0,24 \pm 0,08\%$  CD105-положительных клеток и не менее  $0,010 \pm 0,006\%$  CD44-положительных клеток. Важно отметить, что экспрессия CD105 (эндоглина) характерна для мультипотентных стволовых клеток после пассирования, однако данный маркер может экспрессироваться и на прогениторных клетках – мезенхимоангиобластах. Таким образом, процентное содержание стволовых клеток жировой ткани (высокая экспрессия CD44, CD73, CD90 и CD105) можно оценить на уровне  $0,5\%$ .

После пассирования клеток наблюдалось стойкое увеличение экспрессии CD 90 и CD 105, что характерно для мезенхимальных стромальных клеток в культуре (см. таблицу). На 5-е сутки каждого пассажа клетки достигали 100% конfluence (монослоя) (рис. 2).

Система характеризуется удобством использования, понятным протоколом выделения СВФ, низкими временными затратами (общая продолжительность процедуры – около 2 ч) и малыми трудозатратами. При помощи данной системы возможно выделение клеточной фракции, характеризующейся высокой выживаемостью клеток ( $\geq 98\%$ ), а также высоким содержанием ядросодержащих клеток лимфоцитарно-моноцитарного ряда и клеток-предшественников, что позволяет классифицировать ее как СВФ жировой ткани. Данная СВФ содержала не менее  $0,5\%$  стволовых клеток жировой ткани (высокая экспрессия CD44, CD90, CD73 и CD105), что в перспективе определяет возможность ее применения в клинической практике. Таким образом, показана эффективность представленной системы (ООО «Джоин Тек Сэлл») для экспресс-выделения СВФ жировой ткани.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе в целях фенотипической характеристики был использован ряд маркеров мезенхимальных стромальных клеток, в то время как СВФ гораздо более гетерогенна по своему составу. Данный набор маркеров выбран в целях доказательства наличия регенераторных клеток в общей фракции СВФ и анализа изменения фенотипа при культивировании. В дальнейших исследованиях предполагается более точная и полная характеристика фенотипа СВФ непосредственно после выделения.

#### Результаты окраски на маркеры Human MSC Analysis Kit (BD, cat#562245) (CD90, CD105, CD73, CD34, CD11b, CD19, CD45, CD44)

Маркер	P0	P1	P2
CD90	–	++	++
CD73	+	+	+
CD44	+	–	–
CD105	+	++	++
CD 34, 11b, 19, 45	–	+	+

*Примечание.* P0 – пассаж 0; P1 – пассаж 1; P2 – пассаж 2.

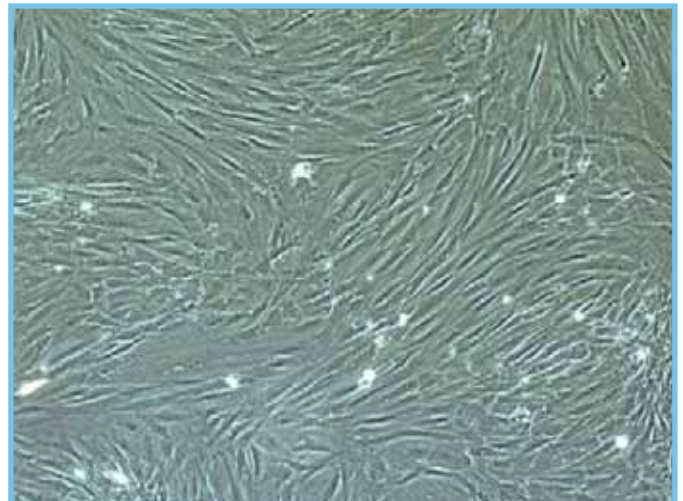


Рис. 2. Культура стромальных клеток на 5-е сутки культивирования

\*\*\*

*Работа 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».*

#### Литература

- Johal K., Lees V., Reid A. Adipose-derived stem cells: selecting for translational success // Regen. Med. – 2015; 10 (1): 79–96.
- Minteer D., Marra K., Rubin J. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential // Clin. Plast. Surg. – 2015; 42 (2): 169–79.



### XIV НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ РЕВМАТОЛОГИИ

20 – 21 АПРЕЛЯ 2017 ГОДА  
ЗДАНИЕ ПРАВИТЕЛЬСТВА МОСКВЫ  
НОВЫЙ АРБАТ, 36

3. Lim M., Ong W., Sugii S. The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications // *Expert Rev. Mol. Med.* – 2014; 16: e8.
4. Uzbas F., May I., Parisi A. et al. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells // *Stem. Cell. Rev.* – 2015; 11 (2): 298–308.
5. 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.
6. Mizuno H., Tobita M., Uysal A. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine // *Stem. Cells.* – 2012; 30 (5): 804–10.
7. Huang S., Fu R., Shyu W. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential // *Cell. Transplant.* – 2013; 22 (4): 701–9.
8. Gentile P., Orlandi A., Scioli M. 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.
9. Liao H., Chen C. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells // *World J. Stem Cells.* – 2014; 6 (3): 288–95.
10. Zuk P., Zhu M., Mizuno H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* – 2001; 7 (2): 211–28.
11. Morris M., Beare J., Reed R. et al. Systemically delivered adipose stromal vascular fraction cells disseminate to peripheral artery walls and reduce vasomotor tone through a CD11b+ cell-dependent mechanism // *Stem Cells Transl. Med.* – 2015; 4 (4): 369–80.
12. Granel B., Daumas A., Jouve E. et al. Safety, tolerability and potential efficacy of injection of autologous adipose-derived stromal vascular fraction in the fingers of patients with systemic sclerosis: an open-label phase I trial // *Ann. Rheum. Dis.* – 2015; 74 (12): 2175–82.
13. Atalay S., Coruh A., Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing // *Burns.* – 2014; 40 (7): 1375–83.
14. Rodriguez J., Boucher F., Lequeux C. et al. Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015; 6: 241.
15. Gotoh M., Yamamoto T., Kato M. et al. Regenerative treatment of male stress urinary incontinence by periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells: 1-year outcomes in 11 patients // *Int. J. Urol.* – 2014; 21 (3): 294–300.
16. Kim I., Bang S., Lee S. et al. Clinical implication of allogenic implantation of adipogenic differentiated adipose-derived stem cells // *Stem Cells Transl. Med.* – 2014; 3 (11): 1312–21.
17. Gir P., Oni G., Brown S. et al. Human adipose stem cells: current clinical applications // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2012; 129 (6): 1277–90.
18. Oberbauer E., Steffenhagen C., Wurzer C. et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art // *Cell Regen. (Lond.)*. – 2015; 4: 7.
19. Aronowitz J., Ellenhorn J. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2013; 132 (6): 932–9.
20. Doi K., Tanaka S., Iida H. 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.
21. 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.
22. Fraser J., Hicok K., 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.
23. Sundar-Raj 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.
24. Cleveland E., Albano N., 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.
25. Torio-Padron N., Huotari A., Eisenhardt S. et al. Comparison of pre-adipocyte yield, growth and differentiation characteristics from excised versus aspirated adipose tissue // *Cells Tissues Organs.* – 2010; 191 (5): 365–71.
26. Park H., Williams R., Goldman N. et al. Comparison of effects of 2 harvesting methods on fat autograft // *Laryngoscope.* – 2008; 118 (8): 1493–9.
27. von Heimburg D., Hemmrich K., Haydarlioglu S. et al. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue // *Cells Tissues Organs.* – 2004; 178 (2): 87–92.
28. Sterodimas A., Boriani F., Magarakis E. et al. Thirtyfour years of liposuction: past, present and future // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2012; 16 (3): 393–406.
29. Lozinski A., Huq N. Tumescence liposuction // *Clin. Plast. Surg.* – 2013; 40 (4): 593–613.
30. Oedayrajsingh-Varma M., van Ham S., Knippenberg M. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure // *Cytotherapy.* – 2006; 8 (2): 166–77.
31. Chung M., Zimmermann A., Paik K. et al. Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine // *Stem Cells Transl. Med.* – 2013; 2 (10): 808–17.
32. Mojallal A., Auxenfans C., Lequeux C. et al. Influence of negative pressure when harvesting adipose tissue on cell yield of the stromal-vascular fraction // *Biomed. Mater. Eng.* – 2008; 18 (4–5): 193–7.
33. Muscari C., Bonafè F., Fiumana E. et al. Comparison between stem cells harvested from wet and dry lipoaspirates // *Connect. Tissue Res.* – 2013; 54 (1): 34–40.
34. Iyyanki T., Hubenak J., Liu J. et al. Harvesting technique affects adipose-derived stem cell yield // *Aesthet. Surg. J.* – 2015; 35 (4): 467–76.
35. Fraser J., Wulur I., Alfonso Z. et al. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots // *Cytotherapy.* – 2007; 9 (5): 459–67.
36. Faustini M., Bucco M., Chlapanidas T. et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues // *Tissue Eng. Part C Methods.* – 2010; 16 (6): 1515–21.
37. Matsumoto D., Shigeura T., Sato K. et al. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2007; 120 (6): 1510–7.
38. Веремеев А.В., Болгарин Р.Н., Кац Н.Г. и др. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины // *Гены и клетки.* – 2016; XI (1): 35–42.
39. Мелерзанов А.В., Мантурова Н.Е. и др. Липосакция и клеточная терапия // *Врач.* – 2014; 4: 12–4.
40. Мелерзанов А.В., Мантурова Н.Е. Минимально манипулируемый клеточный продукт в пластической хирургии и регенеративной медицине // *Врач.* – 2015; 8: 78–80.

**SYSTEM FOR ISOLATION OF ADIPOSE-DERIVED STROMAL VASCULAR FRACTION ESTIMATION**

**A. Veremeev<sup>1</sup>**, Candidate of Medical Sciences; **N. Katz<sup>1</sup>**, Candidate of Medical Sciences; **R. Bolgarin<sup>1</sup>**; **M. Petkova<sup>1</sup>**; **I. Kornienko<sup>2</sup>**; **A. Melerzanov<sup>2</sup>**, Candidate of Medical Sciences; **N. Manturova<sup>3</sup>**, MD; **Professor V. Nesterenko<sup>4</sup>**, MD

<sup>1</sup>JoinTechCell LLC, Moscow

<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

<sup>4</sup>Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

*There are a number of approaches to the isolation of adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) for the applications in regenerative medicine. Despite all advantages, existing approaches are expensive and therefore hardly available for the clinical use. Here we present a new automated system for the isolation of adipose-derived SVF which combines an acceptable quality with high speed and acceptable cost. We describe the requirements for liposuction, infiltration anesthesia, and preservation of lipoaspirate, an original protocol of SVF isolation, and a quality control experiment. According to the flow cytometry data, SVF isolated by system contained 66,000 cells (≥98% alive, ≥92% nuclear) per 100 μL. The proportion of lymphocytes/monocytes and target cell fraction amongst the nuclear cells was 91.8% and 7.5%, respectively. The proportion of adipose-derived stem cells in SVF was ≥0.5%. Therefore, system is efficient for the rapid isolation of adipose-derived SVF.*

**Key words:** surgery, liposuction, orthopedics, cosmetology, stromal vascular fraction; adipose tissue; regeneration; cell therapy; automated isolation system.