

МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ АУТОЛОГИЧНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Романенков Н.С., Мовчан К.Н.

СПб ГБУЗ «Медицинский информационно-аналитический центр» Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург, e-mail: Mail@miac.zdrav.spb.ru

Представлены данные многих авторов, о методиках получения мезенхимальных стволовых клеток из аутологичной жировой ткани. Проанализированы позитивные и негативные стороны способов изоляции мультипотентных клеток из адипозной ткани человека с учетом технологических особенностей их получения, в том числе и при использовании промышленных автоматизированных систем. Целенаправленно изучены сведения об этапах мануального выделения стволовых клеток из жировой ткани пациента в условиях учреждений, сотрудники которых используют технологии клеточной терапии. Отдельно рассмотрена информация о реактивах и оборудовании, необходимых для выделения стволовых клеток из жировой ткани. Основываясь на результатах анализа данных ученых разных стран, рассмотрены возможные направления дальнейшего поиска путей оптимизации, как мануального, так и автоматизированного способов получения стволовых клеток из аутологичной жировой ткани пациента в асептических условиях закрытой системы. Подчеркнута необходимость мультидисциплинарного подхода специалистов разных профилей деятельности в области регенеративной медицины к вопросам использования методик выделения стволовых клеток из жировой ткани.

Ключевые слова: регенеративная медицина, мезенхимальные стволовые клетки, жировая ткань.

ADIPOSE DERIVED STEM CELLS ISOLATION TECHNIQUES

Romanenkov N.S., Movchan K.N.

Medical Information and Analytical Center, Saint-Petersburg, e-mail: Mail@miac.zdrav.spb.ru

Presented the data of many authors about methods of obtaining mesenchymal stem cells from autologous adipose tissue. Analyzed positive, negative sides and technological features of multipotent cells isolation from human adipose tissue using automatic systems. The information about stages of manual isolation of stem cells from the adipose tissue studied in terms of cell therapy technologies. Collected information about reagents and equipment required for stem cells isolation from adipose tissue. Features of automated mesenchymal stem cells isolation from autologous adipose tissue were analyzed due to available data about industrial machines for this manipulation. Discussed availability of basic equipment for the isolation of mesenchymal stem cells on the international market of medical devices. Considered possible directions for further research of automated closed aseptic system methods of stem cells obtaining from autologous adipose tissue. Stressed the need for a multidisciplinary approach to the problems of regenerative medicine and cell technologies, adipose derived stem cells isolation techniques.

Keywords: regenerative medicine, mesenchymal stem cells, adipose tissue.

Возможности клеточных технологий в регенеративной медицине все больше привлекают внимание не только специалистов в области молекулярной биологии и генной инженерии, но и оказываются объектом научных изысканий практикующих врачей разных специальностей. В течение длительного времени целенаправленное клиническое применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) ограничивалось травматичностью получения биологических материалов, изымающихся из донорских зон организма человека, прежде всего из костного мозга ирисками развивающихся при этом осложнений [4,26,43]. В 2001 году группе ученых под руководством Р.А. Zuk [46] удалось культивировать и изучить свойства мультипотентных клеток, выделенных из аутологичной жировой ткани (АЖТ) человека. После этих исследований многие специалисты стали целенаправленно

осуществлять поиск путей повышения безопасности забора собственной жировой ткани (ЖТ), как биологического материала пациентов с целью оптимизации технологического процесса изоляции и культивирования выделяемых из нестволовых клеток (СК) [1,11,13,22,28,38].

Пока не сформировано единое мнение исследователей об оптимальном способе забора ЖТ из донорского участка тела человека для получения из нее СК. Базисный способ получения СК из ЖТ основывается на проведении данного процесса исключительно в мануальном режиме посредством применения методик ферментирования липоасpirата (ЛА) [46].

Жировая ткань, пригодная для выделения СК, может добываться при резекции липодермальных лоскутов кожи или липосакции (ЛС) [9, 10, 13, 14].[22, 23, 30, 36]. Многие исследователи приходят к выводу, что ЛС оказывается хирургическим вмешательством, предпочтительным в плане получения ЖТ, пригодной для изоляции из нее СК, по причине наименьшей травматичности этой операции, не сопряженной с необходимостью длительной реабилитации пациентов в послеоперационном периоде. В настоящее время ЛС осуществляется посредством разных технических приемов ее выполнения с использованием современной (ультразвуковой, лазерной и др.) аппаратуры [1]. Тем не менее наиболее распространенным вариантом выполнения данной операции по-прежнему остается классическая туменесцентная ЛС, при которой ЖТ в донорской зоне тела человека инфильтрируется стерильным солевым раствором, содержащим небольшие концентрации местного анестетика и адреналина [39]. Методика проведения ЛС может влиять на число и жизнеспособность СК, получаемых из ЖТ. В частности, при классической ЛС повышение уровня отрицательного давления в аспираторе может негативно сказаться на количестве выделяемых полипотентных клеток [28].

Согласно рекомендациям D. Matsumotoetal., 2007 [26] ЛА при извлечении из него СК должен обрабатываться в первые сутки после экстракции биоматериала из организма, поскольку хранение изымаемого при ЛС жирового субстрата в условиях комнатной температуры сопряжено с уменьшением потенции СК к выживаемости. Консервация матричной ЖТ при температуре 4 °С, в отличие от условий хранения ЛА при обычной температуре, с течением времени существенно не изменяет количества МСК, получаемых из биологического материала [26]. Небольшие порции АЖТ, экстрагируемые из тела донора шприцем, в процессе выделения МСК перерабатываются без каких-либо трудностей, в то время как обработка ЛА большого объема сопряжена с определенными особенностями [18, 27].

В настоящее время специалисты используют ряд модифицированных методик выделения СК из ЛА, большинство из которых отличаются от базисного варианта оригинальностью технических особенностей [37, 43, 44]. Однако в целом технологии изоляции СК из ЛА с применением ферментирования за последние десятилетия практически не изменились. При классической ЛС сущность базисной методики выделения СК из ЖТ заключается в разделении биологического субстрата, аспирированного из организма донора, на три слоя (верхний – маслянистый, содержащий гомогенат из зрелых адипоцитов, разрушаемых в ходе операции; средний – слой интактной ЖТ и нижний, содержащий компоненты раствора, инфильтрируемого в ткани пациента перед хирургическим вмешательством, а также плазму и форменные элементы крови). Сепарация слоев осуществляется на основании использования эффекта действия силы тяжести. Перед непосредственной обработкой ЖТ из емкости, содержащей ЛА, удаляют его верхний и нижний слои (M.P. Franciset al., 2010 [11] считают, что нижний слой также может быть источником СК). Оставшийся жировой слой промывается стерильным раствором фосфатного буфера с добавлением антибактериальных и противомикотических средств для снижения вероятности микробной контаминации биологического материала и исключения возможности тканевых (неклеточных) загрязнений сформированного биологического материала [4, 6, 9]. После промывания ЖТ ферментируется стерильным раствором коллагеназы, с целью освобождения компонентов стромальной сосудистой фракции (ССФ), содержащей СК [2, 3].

Применяются разные типы фермента, однако чаще всего используется коллагеназа IA-типа, т.к. считается, что эта ее разновидность оказывается наиболее эффективной в процессе выделения МСК [6, 9, 46]. На международном рынке лабораторных реактивов доступны более десятка типов коллагеназы, каждый из которых обладает тропностью к определенным тканям человеческого организма. Специалисты компании SigmaAldrich (США) для ферментирования ЖТ рекомендуют применять коллагеназы I и II типов [6, 9, 29, 43]. В своем оригинальном исследовании P.A. Zuketal., (2001) для ферментирования ЛА использовали бычью коллагеназу IA-типа [46]. В настоящее время в большинстве случаев для коммерческого воспроизводства коллагеназы IA-типа применяются генно-инженерные технологии с использованием свойств анаэробных бактерий *Clostridium histolyticum* или *Escherichiacoli*, генетически модифицированных с *C. histolyticum* [4].

В современных условиях специалистам в области клеточной терапии доступны промышленные ферментные смеси, содержащие высокоочищенную коллагеназу I и II типов, а также нейтральные протеазы – диспазу и термолизин. L.Pilgaardetal., 2008 [44], V.

Zacharetal., 2011 [43] сообщают о высокой эффективности ферментирования ЖТ посредством использования смеси коллагеназы и термолизина.

Особое внимание при выделении СК из ЖТ авторы уделяют определению оптимальных сроков ферментативного воздействия на ЛА. Ряд исследователей рекомендует ферментировать ЛА в течение 1–2 часов [19-21]. L. Pilgaardetal., 2008 [33] полагают, что ферментативное расщепление ЖТ до однородного вида ЛА при температуре 37 °С в течение 2-х часов обеспечивает наилучший баланс между степенью диссоциации исходного биологического материала и количеством получаемых СК [33, 43].

По завершении ферментативного расщепления ЛА осуществляется центрифугирование компонентов ССФ до полной изоляции СК. Физические эффекты центрифугирования так же, как и параметры давления при вакуумной ЛС, могут влиять на жизнеспособность и количество СК, используемых в итоге для культивирования [8, 35]. M. Kuritaetal., 2008 [20] продемонстрировали, что при скорости центрифугирования, превышающей 3000×g, возможны повреждения СК. В ходе центрифугирования в пробирке формируются несколько слоев: верхний слой состоит из масла и белых адипоцитов, средний слой содержит коллагеназу и осадок жировых клеток, а нижний – клетки ССФ, в том числе СК [34].

Существенным недостатком мануальной методики изоляции МСК из АЖТ считается невозможность их быстрого выделения в асептических условиях. Поэтому в настоящее время целенаправленно разрабатываются устройства, обеспечивающие автоматизацию процесса получения СК из ЖТ, поскольку применение таких технологий способствует изоляции стерильной культуры СК и позволяет использовать их непосредственно в операционной [38, 40].

Трансплантация АЖТ по эстетическим показаниям проще и безопаснее, чем применение для этих целей синтетических филлеров [12, 17]. В настоящее время широкое клиническое применение пересадки АЖТ ограничивается высоким риском возможности развития частичного некроза аутоадипотрансплантатов большого объема. Использование МСК в формате клеточно-связанного липотрансфера для улучшения выживаемости трансплантатов и повышения степени их васкуляризации, вероятно, может способствовать устранению этих ограничений [15, 16, 21, 25].

В основу функционирования автоматизированных систем выделения МСК из АЖТ положены базисные принципы, сформулированные в оригинальных исследованиях по воздействию на липоаспират определенных концентраций ферментов с учетом обеспечения точных параметров центрифугирования, проведения современных методик лизиса эритроцитов и фильтрации получаемых биологических субстратов [5, 7, 24, 31, 32, 42, 45].

В настоящее время для автоматизированного выделения СК из ЛА с применением ферментирования предлагается ряд систем: AdiStem™ Small/Large Kit and Adi Light (Adi Stem Pty Ltd., КНР); Sepax 2 (Biosafe Group SA, Швейцария); Cellthera Kit I и II – метод изоляции ССФ из ЖТ (Cellthera, s.r.o., Чехия); A-Stromal™ kit (Cellular Biomedicine Group, Inc./Cellular Biomedicine Group HK, Ltd., США); Celution® 800/CRS и 820/CRS (Cytori Therapeutics, Inc., США); Sceldis® (EDCo. Ltd. & PurebiotechCo., Ltd., Южная Корея/MedicaGroup, ОАЭ); автоматизированные системы и методы для изоляции СК из ЖТ (General Electric Company, США); GIDSVF-1™ (GID Group, Inc., США); Huri Cell (Hurim Bio Cell, Co., Ltd., Южная Корея); аппарат и методы клеточной изоляции (Ingeneron, Inc., США); STEM-X™ (Medikan International Inc., США); Beauty Cell (N-Biotek, Inc., Южная Корея); UNISTATION™ (NeoGenesisCo., Ltd., Южная Корея); CHASTATION™ и Multi Station (PNC International Co., Ltd., Южная Корея /PNC North America Division Of Advanced Bio-Medical Equipment Co., INC); CID300 (SNJCo., Ltd., Южная Корея /TOPMEDCO., LTD., Южная Корея); Stempeutron™ (Stempeutics Research Pvt. Ltd., Индия); Tissue Genesis I collator Cell I solation System [2, 3].

Использование ферментов при изоляции СК из ЖТ сопряжено с существенными материальными затратами и может быть небезопасным в плане индифферентности получаемого клеточного продукта [7]. Данное обстоятельство может обуславливать снижение эффективности применения СК из ЖТ в клинической практике, поэтому ряд ученых предлагает использовать неферментные методики выделения МСК, основанные на механических принципах [7, 19].

Выделение СК из ЛА при механическом воздействии на исходный биологический материал возможно, используя следующие автоматизированные системы: устройства для забора и гомогенизации ЖТ (Baxter International Inc., США); Puregraft® (Bimini Technologies LLC, США); Fastkit (Fastem) (CORIOSSoc. Coop., Италия); LipiVage™ (Genesis Biosystems, Inc., США); Revolve™/GID 700™ (Life Cell Corporation, USA/GID Group, Inc., США); Lipogems® (Lipogems International S.p.A., Италия); Lipo-Kit GT (Medikan International Inc., США); Stroma Cell™ (MicroAire Surgical Instruments, LLC, США) и my Stem® (MyStem LLC, США).

Применяя некоторые другие неферментные устройства, на завершающем этапе выделения СК, оказывается возможным получить чистую ССФ. Среди подобных технологий: метод изоляции ССФ (Agency Science, Tech&Res, КНР); устройство для выделения СК из ЖТ взрослого человека (Human Med AG, Германия); неферментный метод изоляции СК из ЖТ (Pennington Biomedical Research Center, США); изоляция СК из ЖТ при ультразвуковой кавитации (Rusty Property Holdings Pty Ltd., Australia /Amberdale Enterprises

PtyLtd., Australia/Tavid Pty, Австралия); избирательный лизис клеток с применением ультразвука (Solta Medical, Inc., США).

Долгие годы отечественные и зарубежные ученые осуществляют целенаправленные исследования, посвященные оценке возможностей применения в составе клеточной терапии мультипотентных клеток из жировой ткани пациента. На многие вопросы, касающиеся изучения способов быстрого и эффективного выделения СК из ЖТ человека в стерильных условиях, как мануальным, так и аппаратным способами, пока ответов нет. Вероятно, одним из основных направлений дальнейшей разработки и совершенствования технологий по выделению СК из ЖТ может быть создание условий, обеспечивающих замкнутый, стерильный и безопасный процесс изоляции мезенхимальных клеточных структур. Нельзя не замечать, что каждый метод или система сепарации СК имеет свои преимущества и недостатки.

Регенеративная терапия является одним из динамически развивающихся направлений медицинской науки. Создание универсального метода выделения СК из ЖТ – заветная мечта специалистов в клеточной терапии. Данные исследователей, специально занимающихся этой деятельностью, с осторожным оптимизмом позволяют надеяться на разработку в будущем универсальных автоматизированных устройств для быстрой изоляции чистой культуры МСК. Это комплексная мультидисциплинарная проблема. Однако, безусловно, и то, что научный поиск в данном направлении является для авторов одним из перспективных подходов при целенаправленных изысканиях в области регенеративной медицины и клеточной терапии в частности. Активно следуя в данном направлении, вероятно, можно найти оптимальные решения, что, в свою очередь, позволит более широко использовать уникальные возможности стволовых клеток в клинической практике специалистов разных профилей медицинской деятельности.

Список литературы

1. Ahmad J. The American Society for Aesthetic Plastic Surgery (ASAPS) survey: current trends in liposuction /J. Ahmad [et al.]// Aesthet. Surg. J. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 214-224.
2. Aronowitz J.A., Ellenhorn J.D. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems /J.A. Aronowitz, J.D. Ellenhorn// Plast. Reconstr. Surg. – 2013. – Vol. 132, no. 6. – P. 932-939.
3. Bianchi F. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates /F. Bianchi [et al.]// Cell Transplant. – 2013. – Vol. 22, no. 11. – P. 2063-2077.

4. Boquest A.C. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue / A.C. Boquest [et al.]// *Methods Mol. Biol.* – 2006. – No. 325. – P. 35-46.
5. Bourin P. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) /P. Bourin, [et al.]// *Cytotherapy.* – 2013. – Vol.15, no. 6. – P. 641-648.
6. Bunnell B.A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B.A. Bunnell [et al.]// *Methods.* – 2008. – Vol. 45, no. 2. – P. 115-120.
7. Carvalho P.P. Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells / P.P. Carvalho [et al.]// *Tissue Eng. Part C Meth.* – 2013. – Vol. 19, no. 6. – P. 473-478.
8. Domenis R. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques /R. Domenis [et al.]// *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, no. 1. – P. 2.
9. Dubois S.G. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens /S.G. Dubois [et al.]// *Methods Mol. Biol.* – 2008. – № 449. – P. 69-79.
10. Eom Y.W. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates /Y.W. Eom [et al.]// *Yonsei Med. J.* – 2011. – Vol. 52, no. 6. – P. 999-1007.
11. Francis M.P. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction /M.P. Francis [et al.]// *Organogenesis.* – 2010. – Vol.6, no. 1. – P. 11-14.
12. Garza R.M. Studies in fat grafting: part III. Fat grafting irradiated tissue—improved skin quality and decreased fat graft retention /R.M. Garza [et al.]// *Plast. Reconstr. Surg.* – 2014. Vol. 134, no. 2. – P. 249-57.
13. Gimble J.M. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells /J.M. Gimble [et al.]// *Stem Cell Res. Ther.* – 2010. – Vol. 1, no. 2. – P. 19.
14. Gir P. Human adipose stem cells: current clinical applications /P. Gir [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2012. – Vol. 129, no. 6. – P. 1277-1290.
15. Holnthoner W. Adipose-derived stem cells induce vascular tube formation of outgrowth endothelial cells in a fibrin matrix /W. Holnthoner [et al.] // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2015. – Vol. 9, no. 2. – P. 127-136.
16. Jiang A. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF /A. Jiang [et al.] // *The Scientific World J.* – 2015. – Vol. 12, no. 6. – P. 96-105.
17. Kakagia D., Pallua N. Autologous fat grafting: in search of the optimal technique / D. Kakagia, N. Pallua// *Surg. Innov.* – 2014. – Vol. 21, no. 3. – P. 327-36.

18. Kakudo N. Adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting: optimal cell concentration and effects on grafted fat characteristics /N. Kakudo, [et al.]// J. Transl. Med. – 2013. – No. 11. – P 254.
19. Kirkpatrick C.J. Comparative effects of trypsin, collagenase and mechanical harvesting on cell membrane lipids studied in monolayer-cultured endothelial cells and a green monkey kidney cell line /C.J. Kirkpatrick [et al.]// Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – Vol. 846, no. 1. – P. 120-126.
20. Kurita, M. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation /M. Kurita [et al.]// Plast. Reconstr. Surg. – 2008. – Vol. 121, no. 3. – P. 1033-1041.
21. Li L. Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres /L. Li [et al.] // Cell Biol. Int. – 2014. – Vol. 38, no. 8. – P. 962-970.
22. Lin G. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue /G. Lin [et al.] // Stem Cells Dev. – 2008. – Vol. 17, no. 6. – P. 1053-1063.
23. Lin K. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system /K. Lin [et al.]// Cytotherapy. – 2008. – Vol. 10, no. 4. – P. 417-426.
24. Markarian C.F. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods /C.F. Markarian [et al.]// Biotechnol. Lett. – 2014. – Vol. 36, no. 4. – P. 693-702.
25. Matsumoto, D. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection /D. Matsumoto [et al.]// Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12, no. 12. – P. 3375-3382.
26. Matsumoto D. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates /D. Matsumoto [et al.]// Plast. Reconstr. Surg. – 2007. – Vol. 120, no. 6. – P. 1510-1517.
27. Mizuno H. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine /H. Mizuno [et al.]// Stem Cells. – 2012. – Vol. 30, no. 5. – P. 804-810.
28. Mojallal A. Influence of negative pressure when harvesting adipose tissue on cell yield of the stromal-vascular fraction /A. Mojallal [et al.]// Biomed. Mater. Eng. – 2008. – Vol. 18, no. 4–5. – P. 193-197.
29. Mosna F. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide /F. Mosna [et al.]// StemCellsDev. – 2010. – Vol. 19, no. 10. – 1449-1470.
30. Oedayrajsingh-Varma M.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure / M.J. Oedayrajsingh-Varma [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, no. 2. – P. 166-177.

31. Patrikoski M. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells /M. Patrikoski [et al.]// *Stem Cell Res Ther.* – 2013. – Vol. 4, no. 2. – P. 27.
32. Philips B.J. Adipose stem cell-based soft tissue regeneration / B.J. Philips [et al.]// *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2012. – Vol. 12, no. 2. – P. 155-163.
33. Pilgaard L. Comparative analysis of highly defined proteases for the isolation of adipose tissue-derived stem cells /L. Pilgaard [et al.]// *Regen. Med.* – 2008. – Vol. 3, no. 5. – P. 705-715.
34. Poloni A. Human dedifferentiated adipocytes show similar properties to bone marrow-derived mesenchymal stem cells /A. Poloni [et al.]// *Stem Cells.* – 2012. – Vol. 30, no. 5. –P. 965-974.
35. Schafer M.E. Acute adipocyte viability after third-generation ultrasound-assisted liposuction /M.E. Schafer [et al.]// *Aesthet. Surg. J. Am. Soc. Aesthet. Plast. Surg.* – 2013. – Vol. 33, no. 5. – P. 698-704.
36. Schreml S. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction / S. Schreml [et al.]// *Cytotherapy.* – 2009. - Vol.11, no. 7. – P. 947–957.
37. Shah F.S. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells /F.S. Shah [et al.]// *Cytotherapy.* – 2013. – Vol. 15, no. 8. – P. 979-985.
38. Sterodimas A. Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study /A. Sterodimas [et al.]// *Aesthet. Surg. J.* – 2011. – Vol. 31, no. 6. – P. 682-693.
39. Tierney E.P. Safety of tumescent and laser-assisted liposuction: review of the literature / E.P. Tierney [et al.]// *J. Drugs Dermatol.* – 2012. – Vol. 10, no. 12. – P. 1363-1369.
40. Tobita M. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives /M. Tobita [et al.]// *Discov. Med.* – 2011. – Vol. 11, no. 57. – P. 160-170.
41. Williams S.K. Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion /S.K. Williams [et al.]// *Cell Transplant.* – 1995. Vol. 4, no. 3. – P. 281-289.
42. Yang X.F. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells /X.F. Yang [et al.]// *J. Biomed. Sci.* – 2011. – No. 18. – P. 59.
43. Zachar V. Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells /V. Zachar [et al.]// *Methods Mol. Biol.* – 2011. – No. 698. – P. 37-49.
44. Zhu M. Comparison of three different fat graft preparation methods: gravity separation, centrifugation, and simultaneous washing with filtration in a closed system /M. Zhu [et al.]// *Plast. Reconstr. Surg.* – 2013. – Vol. 131, no. 4. – P. 873-880.
45. Zuk P.A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells /P.A. Zuk [et al.]// *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – Vol. 13, no. 12. – P. 4279-4295.
46. Zuk P.A. Multi-lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk [et al.] // *Tissue Engineering.* – 2001. – Vol.7, no. 2. – P. 211–226.