

Ю.А. ПЕТРЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
Харьков

E-mail: yuripetrenko@cryo.org.ua

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СПОСОБНОСТЬ К МУЛЬТИЛИНЕЙНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ПРОЦЕССЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЯ



Исследованы морфологические и иммунофенотипические свойства, а также способность к направленной дифференцировке in vitro в адипогенном и остеогенном направлениях стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) взрослого человека на 0-м и 4-м пассажах культивирования. Показано, что первичные культуры СКЖТ характеризовались присутствием меньшего количества клеток, экспрессирующих мезенхимальные маркеры (CD73, CD105), чем клетки 4-го пассажа, однако содержали эндотелиальные клетки-предшественники, экспрессирующие маркер CD34 и способные к формированию капиллярно-подобных структур во внеклеточном матриксе. Обе популяции клеток в равной степени были способны дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях.

© Ю.А. ПЕТРЕНКО, А.Ю. ПЕТРЕНКО, 2012

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 1

Введение. В настоящее время костный мозг взрослого человека является наиболее распространенным источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК). Вместе с тем эти клетки присутствуют и в других тканях взрослого человека, таких как жировая ткань [1–3], мышцы [4], синовиальная мембрана [5], дерма [6], периферическая кровь [7], кордовая кровь [8, 9] и др.

Жировая ткань представляет собой альтернативный костному мозгу источник МСК, преимуществами которого является высокое содержание стволовых/прогениторных клеток и возможность их получения в достаточных для трансплантации количествах при минимальной инвазивности для пациента процедуры забора материала. Показано, что после экспансии в течение двух и более пассажей стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) взрослого человека по морфологическим и иммуномодулирующим свойствам, а также иммунофенотипическому составу близки МСК костного мозга. продемонстрирована также способность СКЖТ после экспансии к индуцированной мультилинейной дифференцировке в адипогенном, остеогенном, хондрогенном и других направлениях [1, 2, 10]. Вместе с тем состав и свойства СКЖТ на начальных этапах культивирования остаются мало изученными.

В связи с этим в настоящей работе исследовали морфологические и иммунофенотипические свойства, а также способность к направленной адипогенной и остеогенной дифференцировке стромальных клеток жировой ткани взрослого человека на 0-м и 4-м пассажах культивирования.

Материалы и методы. Жировую ткань человека (5–10 г) получали из сальника взрослых доноров в ходе плановых полостных операций после их письменного согласия с соблюдением врачебной этики. Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли, как описано нами ранее [11]. Для этого кусочки жировой ткани промывали солевым раствором Хенкса и тщательно измельчали в чашке Петри, после чего смешивали в соотношении 1:3 с 0,05%-ным раствором

коллагеназы 2-го типа и инкубировали на водяной бане при 37 °С и радиальном встряхивании в течение 1,5 ч. Полученную суспензию центрифугировали при 2500 об/мин в течение 15 мин. Супернатант, содержащий свободный жир и адипоциты, сливали, а осадок ресуспендировали в среде 199. После центрифугирования при 1000 об/мин в течение 10 мин осадок ресуспендировали в среде α -МЕМ, содержащей 15 % эмбриональной сыворотки (ЭС) крупного рогатого скота, 50 ед/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 0,2 мМ L-глутамин, и переносили во флаконы по 75 см². Клетки культивировали во влажной камере при 37 °С и 5 % CO₂. Через 24 ч неприкрепившиеся клетки убрали со сменой среды, а адгезивные клетки культивировали еще в течение 72 ч. Характеристику первичных культур клеток проводили после 96 ч культивирования. По достижении культурами клеток 70 % конфлуентного монослоя их трипсинизировали по стандартной методике с использованием смеси трипсин : версен в соотношении 1 : 4 и рассеивали с коэффициентом пересева 1 : 3. Фенотипический анализ и способность к мультилинейной дифференцировке определяли в первичных культурах клеток (через 96 ч культивирования) и после 4-го пассажа.

Для оценки иммунофенотипа клетки трипсинизировали по стандартной методике и окрашивали в течение 30 мин FITC- или PE-конъюгированными моноклональными антителами CD34-FITC (Dako), CD45-PE (Serotec), CD73 (BD Biosciences), CD105 (Serotec). После двукратной отмывки в фосфатном буфере иммунофенотип клеток определяли на проточном цитометре FACS Calibur («BD Biosciences», ОК). Полученные данные анализировали с использованием программы WinMDI v. 2.8. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента в программе Origin 6.1. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Эндотелиальный потенциал клеток на различных этапах культивирования оцени-

вали по способности образовывать капиллярноподобные структуры во внеклеточном матриксе Матригель (BD Biosciences, ОК). Для этого заранее охлажденный Матригель вносили по 100 мкл в 96-луночный планшет и оставляли на 30–40 мин при 37 °С. Затем на поверхность матрикса наносили 100 мкл суспензии клеток в концентрации 10⁵ клеток на 1 мл и культивировали в течение 24 ч в среде EGM-2 (Endothelial Growth Medium-2, «Lonza», Бельгия). Анализ проводили под световым инвертированным микроскопом «Ceti» (Бельгия).

Для оценки способности клеток к направленной адипогенной дифференцировке клетки переводили в питательную среду α -МЕМ с 10 % ЭС, L-глутамином и антибиотиками, содержащую индукторы адипогенеза: 0,5 мМ 3-изобутил-1-метил-ксантин (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 мкМ дексаметазон (Sigma-Aldrich), 10 мкг/мл инсулин, и 100 мкМ индометацин (Sigma-Aldrich). Клетки культивировали в указанной среде в течение 21 сут. Замену среды производили два раза в неделю. После 21 сут культивирования клеточные культуры фиксировали 10%-ным забуференным формалином в течение 30 мин и окрашивали раствором Oil Red O (30 мг/мл в 60%-ном изопропиловом спирте) в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для оценки способности клеток к направленной остеогенной дифференцировке в качестве индукторов использовали 20 мМ аскорбиновую кислоту (Sigma-Aldrich), 10 мМ β -глицеролфосфат (Sigma-Aldrich) и 1 мкМ дексаметазон (Sigma-Aldrich). Клетки культивировали в упомянутой среде в течение 21 сут. Замену среды производили два раза в неделю. После 21 сут культивирования культуры фиксировали 10%-ным забуференным формалином в течение 30 мин и оценивали экспрессию щелочной фосфатазы с использованием набора Fast Blue RR Salt, Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution kit № 85 (Sigma-Aldrich) согласно инструкции производителя.

Минерализацию внеклеточного матрикса оценивали с помощью окрашивания моно слоя по методу вон Косса [33]. Для этого фиксированные препараты инкубировали в 2%-ном нитрате серебра («Sigma», США) в течение 1 ч, после чего 5 мин фиксировали в 2,5%-ном тиосульфате натрия («Sigma», США) и тщательно промывали дистиллированной водой.

Результаты исследований и их обсуждение. Первичная культура СКЖТ взрослого человека представляла собой гетерогенную популяцию клеточных элементов (рис. 1, а). При микроскопических исследованиях наряду с фибробластоподобными клетками удавалось различить многоугольные клетки с множеством отростков и большим ядром, а также небольшое количество преадипоцитов и адипоцитов, содержащих характерные внутриклеточные липидные включения.

После культивирования стромальных клеток в течение четырех пассажей наблюдалась унификация клеточного моно слоя при полном преобладании клеток с фибробластоподобной морфологией, формирующих характерные вихревые потоки (рис. 1, б).

Имунофенотипический анализ адгезивных СКЖТ 0-го пассажа подтвердил данные микроскопических исследований о гетерогенности клеточной культуры. Клетки экспрессировали антигены CD34, CD73 и CD105 (рис. 2). Количество клеток, экспрессирующих маркеры мезенхимальных стромальных клеток CD73 и CD105, в первичных культурах составляло 30 ± 10 и 51 ± 7 % соответственно. Содержание CD34+ клеток составляло 32 ± 7 %. При этом CD45-положительные клетки практически отсутствовали.

После культивирования в течение четырех пассажей количество клеток, экспрессирующих CD73 и CD105, составляло более 95 %. CD45+ клетки не выявлялись, а содержание CD34-положительных клеток снижалось до фоновых значений (менее 5 %).

Для индукции адипогенной дифференцировки СКЖТ первичной культуры и 4-го пас-

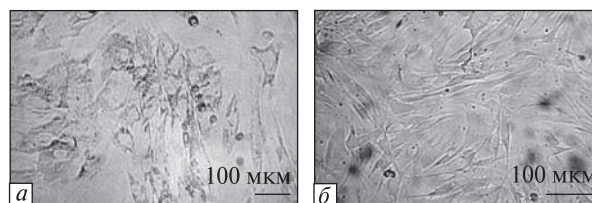


Рис. 1. Морфология культивированных СКЖТ в первичной культуре (а) и на 4-м пассаже культивирования (б)

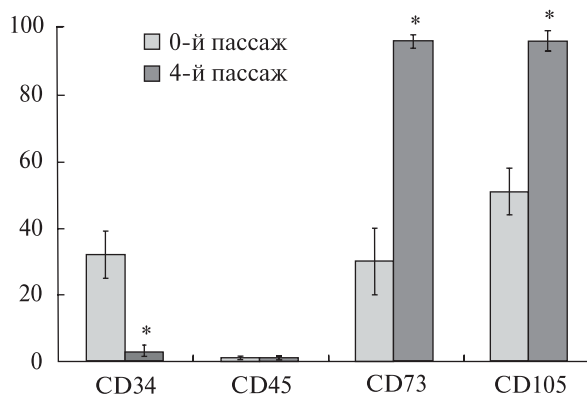


Рис. 2. Имунофенотип СКЖТ на различных этапах культивирования: по вертикали — количество клеток; по горизонтали — маркеры. * Значения достоверно отличаются от данных, полученных на 0-м пассаже ($p < 0,05$)

сажа переводили в среду, содержащую изобутил-метилксантин, дексаметазон, инсулин и индометацин. При культивировании СКЖТ первичной культуры в адипогенной среде на 3-й неделе выявлялись клетки округлой формы с вакуолями, содержащими нейтральные липиды, которые позитивно окрашивались Oil Red O (рис. 3, а). СКЖТ 4-го пассажа также были способны к индуцированной дифференцировке в адипогенном направлении (рис. 3, б).

Индукция остеогенной дифференцировки в клеточных культурах приводила к морфологическим изменениям, характерным для костных клеток. После трех недель индукции клетки экспрессировали щелочную фосфатазу (рис. 3, в, г), при этом наблюдалась минерализация внеклеточного матрикса, оцененная окрашиванием нитратом серебра по методу вон Косса (рис. 3, д, е). Сущест-

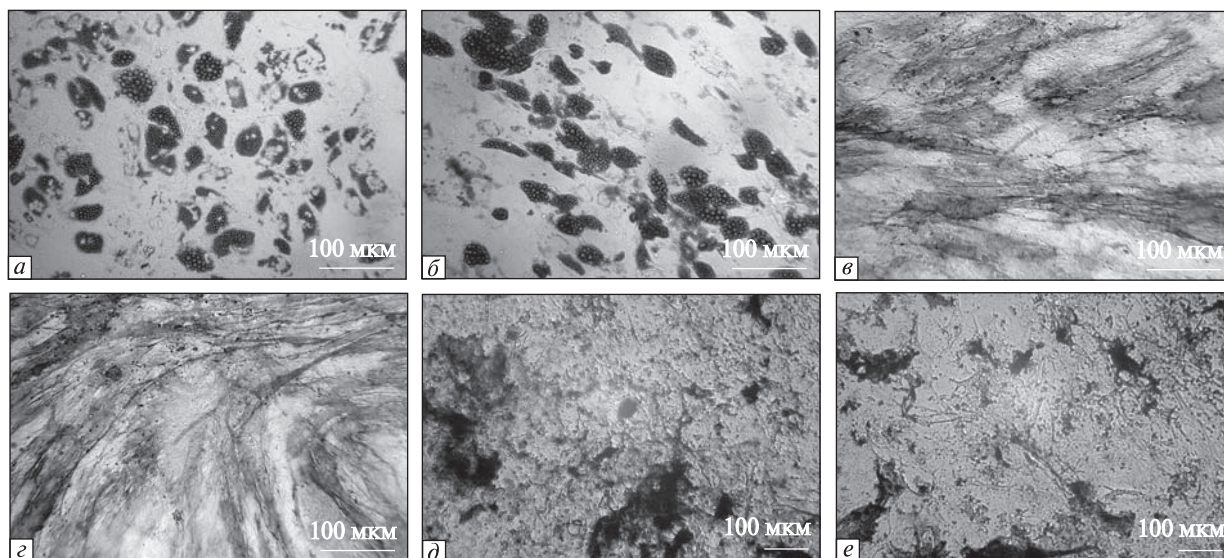


Рис. 3. Направленная дифференцировка СКЖТ первичной культуры (а, в, д) и 4-го пассажа (б, г, е) в адипогенном (а, б) и остеогенном (в–е) направлениях: а, б – окрашивание внутриклеточных нейтральных липидов Oil Red O; в, г – экспрессия щелочной фосфатазы; д, е – окрашивание минерализованного матрикса нитратом серебра по методу вон Косса [33]

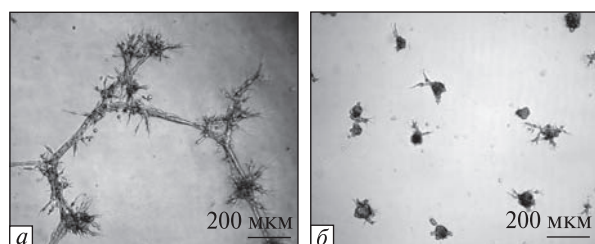


Рис. 4. Формирование капилляроподобных структур СКЖТ жировой ткани: а – СКЖТ первичной культуры; б – СКЖТ 4-го пассажа

венных различий в способности к остеогенной дифференцировке СКЖТ 0-го и 4-го пассажей обнаружено не было.

Для выявления эндотелиально-коммитированных клеток оценивали способность СКЖТ образовывать капилляроподобные структуры во внеклеточном матриксе Матригель.

Из рис. 4, а видно, что через 24 ч культивирования СКЖТ первичной культуры в присутствии VEGF и других индукторов эндотелиальной дифференцировки клеточные элементы были ориентированы в пространстве Матригеля в виде клеточных тяжей и рыхлых скоплений (узлов), которые харак-

терны для капилляроподобных структур, полученных рядом авторов *in vitro* [12–14]. Вместе с тем СКЖТ, полученные на 4-м пассаже монослойного культивирования, капилляроподобных структур не образовывали. Вместо этого происходило формирование сферических агрегатов, на внешней поверхности которых наблюдались короткие лучеобразные «отростки» (рис. 3, б).

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что жировая ткань представляет собой альтернативный костному мозгу источник мультипотентных МСК для регенеративной медицины и тканевой инженерии. После субкультивирования в течение четырех пассажей клетки соответствовали минимальным критериям МСК [15, 16]: характеризовались клоногенным ростом, более 95 % клеток экспрессировали мезенхимальные маркеры (CD73 и CD105) и не экспрессировали CD34 и CD45. Эти клетки также были способны к мультилинейной дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях. Это заключение подтверждает результаты большого количества работ [1–3, 10, 11, 17, 18].

В большинстве работ описываются свойства и дифференцировочный потенциал СКЖТ после субкультивирования в условиях, обеспечивающих экспансию МСК костного мозга, начиная со 2-го пассажа или позднее [10, 17, 19, 20]. В ходе такого субкультивирования происходит унификация клеточных элементов по морфологическим свойствам и иммунофенотипу. Первичная культура адгезивных клеток стромально-сосудистой фракции жировой ткани, изученная в настоящем исследовании, представлена большим разнообразием клеточных элементов. Около 50 % клеток экспрессируют рецептор TGF- β CD105 (SH2 или эндоглин), который рассматривается в качестве одного из основных маркеров в панели идентификации МСК [15, 16, 21]. Уровень экспрессии CD105 в первичной адгезивной культуре СКЖТ соответствовал данным работы [22], где упомянутый маркер присутствовал у $42,6 \pm 17,7$ % клеток. Другой мезенхимальный маркер CD73 – экто-5-нуклеотидаза, исходно выявленный как антиген, распознаваемый моноклональными антителами SH3 и SH4, был экспрессирован на 30 ± 10 % клеток. Наличие мезенхимальных стромальных клеток в первичной культуре СКЖТ подтверждается их способностью к направленной дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях, причем эффективность дифференцировки в обоих направлениях СКЖТ первичной культуры и 4-го пассажа практически не отличалась.

Относительно низкий процент клеток, экспрессирующих мезенхимальные маркеры, в первичной суспензии СКЖТ компенсируется клетками других линий. Особый интерес в этом отношении вызывает антиген CD34 – поверхностный гликопротеин, который экспрессируется на примитивных кроветворных [23] и эндотелиальных [24, 25] клетках, а также на овальных клетках печени [26, 27]. Экспрессия антигена CD34 в первичной культуре адгезивных клеток СКЖТ обнаружена в ряде исследований,

где уровень его экспрессии варьирует в широких пределах, достигая 60 % [22]. В настоящей работе содержание CD34-позитивных клеток было весьма значительным (32 ± 7 %), поэтому выяснение природы этих клеток представляло определенный интерес. Учитывая, что на гемопоэтических клетках-предшественниках антиген CD34 коэкспрессируется с общим лейкоцитарным антигеном CD45, который отсутствовал в первичной адгезивной культуре СКЖТ, наиболее вероятными носителями антигена CD34 являются примитивные клетки эндотелиального ростка [25, 28]. Для выявления эндотелиально-коммитированных клеток исследовали их способность образовывать капилляроподобные структуры во внеклеточном матриксе. Действительно, было установлено, что клетки первичной культуры при переносе на Матригель формировали капилляроподобную сеть из тяжелой различной длины и диаметра, соединенных узлами. Этот факт свидетельствует об эндотелиальной природе CD34+ клеток в первичной культуре СКЖТ.

В ходе субкультивирования количество CD34-положительных клеток резко снижалось, что сопровождалось утратой способности образовывать капилляроподобные структуры. Эти данные свидетельствуют о том, что субкультивирование в условиях, обеспечивающих экспансию МСК, приводит к потере эндотелиальных клеток-предшественников.

Потенциал субкультивированных в течение четырех пассажей СКЖТ не ограничивался так называемыми ортодоксальными (остеогенный, адипогенный и хондрогенный) направлениями дифференцировки. В частности, продемонстрирована способность этих клеток к индуцированной дифференцировке в миогенном и нейрогенном направлениях [1, 2, 10].

Нами недавно показано, что СКЖТ 4-го пассажа при длительном воздействии соответствующих индукторов способны к направленной дифференцировке *in vitro* в

эндотелиальном направлении [30], а также в инсулин-продуцирующие клетки [31].

Высокий мультилинейный дифференцировочный потенциал субкультивированных СКЖТ может быть обусловлен как пластичностью этих клеток, так и сохранением в ходе «мезенхимальной» экспансии минорного количества клеток с более высоким дифференцировочным потенциалом. Эти клетки не активны при экспансии мезенхимальных клеток, но начинают пролиферировать и дифференцироваться при культивировании в соответствующих условиях. Последнее предположение согласуется с выявлением в СКЖТ человека генов клеток эндодермального происхождения (альбумин, альфафетопротеин, СК18, СК19) [32]. В этой связи интересно отметить сохранение после субкультивирования небольшого (до 3 %) количества клеток, экспрессирующих антиген CD34, поскольку показано [21], что популяция клеток жировой ткани, коэкспрессирующих CD34 и CD105, обладает свойствами мультипотентных клеток, способных к дифференцировке не только в ортодоксальных, но и нейрональном направлении. Для выяснения вопроса о природе неортодоксальной мультипотентности дифференцировки СКЖТ требуются дополнительные исследования на колониях, образованных единичными клетками.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что первичные культуры СКЖТ содержат не только мезенхимальные стромальные клетки, но и эндотелиальные клетки-предшественники, что расширяет перспективы их применения в регенеративной медицине.

Yu.A. Petrenko, A.Yu. Petrenko

PHENOTYPICAL PROPERTIES AND ABILITY TO MULTILINEAGE DIFFERENTIATION OF ADIPOSE TISSUE STROMAL CELLS DURING SUBCULTURING

Morphological and immunophenotypical properties of human adult adipose tissue stromal cells (ATSC) at cultivation passage 0 and 4 as well as their ability to induced *in vitro* differentiation into adipogenic and

osteogenic directions were studied in this work. It was shown that primary cultures of ATSC were characterized by the presence of the lower number of cells expressing mesenchymal markers (CD73, CD105) than the cells of the 4th passage, but contained endothelial progenitor cells expressing CD34 and capable to form capillary-like structures within extracellular matrix. Both cell populations could equally differentiate into adipogenic and osteogenic lineages.

Ю.О. Петренко, О.Ю. Петренко

ФЕНОТИПІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ І ЗДАТНІСТЬ ДО МУЛЬТИЛІНІЙНОГО ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ В ПРОЦЕСІ СУБКУЛЬТИВУВАННЯ

Досліджували морфологічні та імунофенотипічні властивості, а також здатність до спрямованого диференціювання *in vitro* у адипогенному та остеогенному напрямках стромальних клітин жирової тканини (СКЖТ) дорослої людини на 0-му та 4-му пасажах культивування. Показано, що первинні культури СКЖТ характеризувались наявністю меншої кількості клітин, що експресують мезенхімальні маркери (CD73, CD105), ніж клітини 4-го пасажу, але вміщували ендотеліальні клітини-попередники, які експресували маркер CD34 і були здатні до формування капіляроподібних структур у позаклітинному матриксі. Обидві популяції клітин рівною мірою були здатні до диференціювання у адипогенному та остеогенному напрямках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies // *Tissue Eng.* – 2001. – 7, № 2. – P. 211–228.
2. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – 13, № 12. – P. 4279–4295.
3. Guilak F., Lott K.E., Awad H.A., Cao Q., Hicok K.C., Fermor B., Gimple J.M. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose derived adult stem cells // *J. Cell. Physiol.* – 2006. – 206, № 1. – P. 229–237.
4. Jackson W.M., Nesti L.J., Tuan R.S. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells // *Exp. Opin. Biol. Ther.* – 2010. – 10, № 4. – P. 505–517.
5. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult

- human synovial membrane // *Arthritis Rheum.* – 2001. – **44**, № 8. – P. 1928–1942.
6. *Crigler L., Kazhanie A., Yoon T-J., Zakhari J., Anders J., Taylor B., Virador V.M.* Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages // *FASEB J.* – 2007. – **21**, № 9. – P. 2050–2063.
 7. *Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S., Sotomura K., Bianco P., Robey P.G.* Circulating skeletal stem cells // *J. Cell Biol.* – 2001. – **153**, № 3. – P. 1133–1140.
 8. *Gang E.J., Hong S.H., Jeong J.A., Hwang S.H., Kim S.W., Yang I.H., Ahn C., Han H., Kim H.* In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **321**, № 1. – P. 102–108.
 9. *Toupadakis C.A., Wong A., Genetos D.C., Cheung W.K., Borjesson D.L., Ferraro G.L., Galuppo L.D., Leach J.K., Owens S.D., Yellowley C.E.* Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue // *Amer. J. Vet. Res.* – 2010. – **71**, № 10. – P. 1237–1245.
 10. *Gimble J., Guilak F.* Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential // *Cytotherapy.* – 2003. – **5**, № 5. – P. 362–369.
 11. *Петренко А.Ю., Петренко Ю.А., Скоробогатова Н.Г., Жуликов О.А., Правдюк А.И., Мазур С.П., Горохова Н.А., Грищук В.П., Волкова Н.А., Грищенко В.И.* Выделение, фенотипические и дифференцировочные свойства стромальных клеток-предшественников, выделенных из жировой ткани при монослойном культивировании // *Журн. АМН України.* – 2008. – **14**, № 2. – С. 354–365.
 12. *Oswald J., Boxberger S., Jorgensen B., Feldmann S., Ehninger G., Bornhauser M., Werner C.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro // *Stem cells.* – 2004. – **22**, № 3. – P. 377–384.
 13. *Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R.C.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – **332**, № 2. – P. 370–379.
 14. *Chen M.Y., Lie P.C., Li Z.L., Wei X.* Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *Exp. Hematol.* – 2009. – **37**, № 5. – P. 629–640.
 15. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells // *Science.* – 1999. – **284**, № 5411. – P. 143–147.
 16. *Dominici M., Le Blank K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* – 2006. – **8**, № 4. – P. 315–317.
 17. *Strem B.M., Hicok K.C., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z., Schreiber R.E., Fraser J.K., Hedrick M.H.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells // *Keio J. Med.* – 2005. – **54**, № 3. – P. 132–141.
 18. *Rada T., Reis R.L., Gomes M.E.* Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering // *Tissue Engineer. Part B.* – 2009. – **15**, № 2. – P. 113–125.
 19. *Katz A.J., Tholpady A., Tholpady S.S., Shang H., Ogle R.C.* Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells // *Stem Cells.* – 2005. – **23**, № 3. – P. 412–423.
 20. *Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimble J.M.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // *J. Cell. Physiol.* – 2001. – **189**, № 1. – P. 54–63.
 21. *Boquest A.C., Shahdadfar A., Fronsdal K., Sigurjonsson O., Tunheim S.H., Collas P., Brinckmann J.E.* Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – **16**, № 3. – P. 1131–1141.
 22. *Mitchell J.B., Macintosh D., Zvonic S., Garrett S., Floyd Z.E., Kloster A., DiHalvorsen Y., Storms R.W., Goh B., Kilroy G., Wu X., Gimble J.M.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers // *Stem Cells.* – 2006. – **24**, № 2. – P. 376–385.
 23. *Porretti L., Lazzari L., Lopa R.* Immunophenotyping of ex vivo expanded CD34+ cells from cord blood // *Exp. Hematol.* – 2000. – **28**, № 12. (Suppl 1). – P. 73.
 24. *Fina L., Molgaard H.V., Roberston D.* Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells // *Blood.* – 1990. – **75**, № 12. – P. 2417–2426.
 25. *Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S.* Expression of VEGFR-2 and

- AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors // *Blood*. – 2000. – **95**, № 3. – P. 952–958.
26. *Dabeva M.D., Shafritz D.A.* Hepatic stem cells and liver repopulation // *Semin. Liver. Dis.* – 2003. – **23**, № 4. – P. 349–362.
 27. *Petersen B.E., Grossbard B., Hatch H., Pi L., Deng J., Scott E.W.* Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers // *Hepatology*. – 2003. – **37**, № 3. – P. 632–640.
 28. *Kim S., Von Recum H.* Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection, and application // *Tissue Eng. Part B*. – 2008. – **14**, № 1. – P. 133–147
 29. *Safford K.M., Hicok K.C., Safford S.D., Halvorsen Y.D., Wilkison W.O., Gimble J.M., Rice H.E.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – **294**, № 2. – P. 371–379.
 30. *Петренко Ю.О., Домбровський Д.Б., Салютін Р.В., Петренко О.Ю.* Формування капілярподібних структур стромальними клітинами жирової тканини і фетальної печінки людини в процесі культивування // *Львів. мед. часопис*. – 2010. – **16**, № 1. – С. 40–45.
 31. *Петренко Ю.А., Петренко А.Ю., Блох К., Варди П.* Получение инсулинпродуцирующих клеток из мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани // *Журн. АМН Украины*. – 2010. – **16** (додаток). – С. 143.
 32. *Zemel R., Bachmetov L., Ad-El D., Abraham A., Turkaspa R.* Expression of liver-specific markers in naive adipose-derived mesenchymal stem cells // *Liver Int.* – 2009. – **29**, № 9. – P. 1326–1337.
 33. *Puchtler H., Meloan S.N.* Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction // *Histochemistry*. – 1978. – **56**, № 3/4. – P. 177–185.

Поступила 02.12.10