

## ХАРАКТЕРИСТИКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЛИПОАСПИРАТА ЧЕЛОВЕКА, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРИ ПОНИЖЕННОМ СОДЕРЖАНИИ КИСЛОРОДА

© Л. Б. Буравкова, О. С. Гринаковская, Е. Р. Андреева, А. П. Жамбалова, М. П. Козионова

*Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;  
электронный адрес: grinakovskaya@imbp.ru*

Исследовано влияние пониженного содержания кислорода в среде культивирования на пролиферативную активность, жизнеспособность и иммунофенотип мезенхимных стромальных клеток из липоаспирата человека (лМСК). Показано, что пролиферативная активность клеток в условиях гипоксии (5 % O<sub>2</sub>) была в среднем в 2.9 раза выше по сравнению с культивированием в стандартных условиях нормоксии (20 % O<sub>2</sub>). Уменьшение содержания кислорода в среде культивирования не изменяло жизнеспособность и иммунофенотип лМСК. Таким образом, постоянное культивирование лМСК в среде с пониженным содержанием кислорода может оказаться полезным подходом для получения большего количества клеток с неизменными свойствами за меньшее время, что может быть востребовано в области регенеративной и восстановительной терапии.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки-предшественники из жировой ткани, гипоксия, нормоксия, пролиферация, иммунофенотип.

Принятые сокращения: МСК — мезенхимные стромальные клетки, лМСК — МСК из жировой ткани (липоаспирата).

В современной исследовательской практике культивирование клеток проводится обычно с использованием газовой среды, содержание кислорода в которой соответствует содержанию кислорода в воздухе. Однако хорошо известно, что такая концентрация кислорода в несколько раз превышает физиологические значения в тканях организма, составляющие от 4 до 7 % (Guyton, Hall, 2006). Состав газовой среды является одним из важнейших факторов, которые могут модулировать такие функции клеток, как пролиферативная активность, жизнеспособность и др. В исследованиях, проведенных в ряде лабораторий, было показано, что культивирование мезенхимных стромальных клеток (МСК)-предшественников из костного мозга в условиях пониженного содержания O<sub>2</sub> стимулирует их пролиферацию и не оказывает повреждающего эффекта, снижающего их жизнеспособность (Lennon et al., 2001; Bosch et al., 2006; Grayson et al., 2006; Буравкова, Анохина, 2007). В настоящее время интерес к получению значительного количества МСК возрос в связи с возможностью использования их в регенеративной медицине. При этом большое значение имеют как поиск альтернативных источников МСК, так и оптимизация условий их культивирования для получения большего количества клеток за меньшее время культивирования.

В последние годы одним из перспективных источников получения МСК рассматривается жировая ткань человека. Задача данной работы состояла в изучении влияния культивирования МСК в среде с пониженным содержанием O<sub>2</sub> на пролиферативную активность, жизнеспособность и иммунофенотип МСК из липоаспирата человека (лМСК).

### Материал и методика

Химические реактивы. Использовали среду ДМЕМ с низким содержанием глюкозы с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина, 1 г/л натрия бикарбоната (Gibco, США), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Nucclone, Бельгия), 50 мкг/мл амфотерицина В (Sigma-Aldrich, США). Отмывку клеток от среды и эритроцитов проводили 20 мМ фосфатным буфером (D-PBS; Gibco, США), трипсинизацию проводили смесью растворов трипсина (0.25 %) и ЭДТА (0.04 %) (Gibco, США). Для ферментативного выделения клеток использовали 0.15%-ный раствор коллагеназы IA (Sigma-Aldrich, США). Оценку жизнеспособности лМСК проводили с использованием набора Annexin V-FITC Kit (Immunotech, Франция). Иммунофенотипирование проводили с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцеинизотиоционатом (FITC) или фикоэритрином (PE) (Immunotech, Франция), к антигенам CD31, CD34, CD62L, CD62E, CD62P, CD117(c-kit), HLA-DR, CD9, CD54, CD71, CD90, CD105, HLA-ABC и виментину. В качестве изотипического контроля к антителам использовали FITC- и PE-меченные IgG соответствующего класса.

Выделение лМСК и получение первичной культуры. Было исследовано 5 образцов липоаспирата. Выделение проводили, используя описанную методику (Zuk et al., 2001) с модификациями. Жировую ткань помещали в центрифужную пробирку, доливали PBS (2/3 объема) и дважды центрифугировали (5 мин при 1500 об/мин и 10 мин при 1000 об/мин). После отмывки липоаспира

взвешивали и добавляли раствор коллагеназы IA до конечной концентрации 0.075 %. Инкубировали на водяной бане при 37 °С 30 мин, периодически встряхивая. После инактивации фермента средой, содержащей 10 % FBS, повторно центрифугировали (5 мин, 1500 об/мин), осадок ресуспендировали и пропускали через клеточный фильтр. Отбирали аликвоту среды с клетками и подсчитывали в гематцитометре количество ядросодержащих клеток. Плотность посадки составляла  $(2-3) \cdot 10^5$  ядросодержащих клеток на 1 см<sup>2</sup>. Через 24 ч культуры отмывали от неприкрепившихся клеток D-PBS и заменяли среду культивирования на свежую. Пассировали клетки при достижении 70—80%-ной конfluence. Для проведения экспериментов использовали клетки 2-го пассажа.

После выделения клетки переносили в культуральные флаконы, часть из которых помещали в стандартные условия культивирования — 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % воздуха (20 % O<sub>2</sub>), 37 °С, влажность 100 % (клетки в нормоксии), другую часть — в мультигазовый термостат Sanyo (Япония), в котором поддерживалась концентрация кислорода 5 % (клетки в гипоксии).

Изучение пролиферативной активности лМСК в культуре. Использовали метод видеомикроскопии. С помощью микроскопа Leica DM IL (Leica, Germany, об. 10×), снабженного цифровой видеокамерой, изображение передавалось на компьютер и впоследствии анализировалось. Фотографирование лМСК, культивируемых в газовой среде при стандартном (20 %) и пониженном (5 %) содержании кислорода, проводили через каждые 24 ч, начиная с 1-х сут после посадки и до момента пассирования. В каждом флаконе фотографировали по 10 стационарных полей зрения площадью 1 мм<sup>2</sup>. На полученных изображениях клетки подсчитывали с помощью программы анализа изображения SigmaScan Pro 5.0 Image Analysis Software (SPSS Inc., США). Эффективность прикрепления оценивали по количеству прикрепившихся клеток на 1 см<sup>2</sup> через 24 ч после посадки с плотностью в среднем 3000 клеток на 1 см<sup>2</sup>.

Оценка жизнеспособности лМСК. Жизнеспособность клеток оценивали в конце пассажа в суспензии клеток, приготовленных для субкультивирования, с помощью набора ANNEXIN V—FITCkit (Immunotech, Франция) по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Анализировали не менее 10 000 событий.

Анализ фенотипа культивируемых лМСК. Для иммунофенотипирования клетки после отбора среды культивирования промывали D-PBS, снимали смесью растворов трипсина и ЭДТА и ингибировали фермент избытком среды с пониженным содержанием глюкозы, содержащей 10 % FBS. Полученную суспензию центрифугировали (5 мин при 1000 об/мин), супернатант декантировали, ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащего 1 % FBS, после чего проводили подсчет клеток в гематцитометре и готовили пробы с концентрацией клеток  $1 \cdot 10^5$ . Клетки перемешивали и инкубировали с антиген-специфичными антителами или изотопическим контролем в течение 20 мин при 4 °С. После этого объем пробы довели до 500 мкл D-PBS и проводили фенотипирование по стандартной методике на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции фирмы-производителя. При непрямом иммуофлуоресцентном выявлении первичными антителами окрашивали по приведенной ранее схеме, затем отмывали от несвязав-

шейся метки (центрифугировали в избытке среды D-PBS, содержащей 1 % FBS, при 1000 об/мин 5 мин), добавляли вторичные FITC- или PE-антитела и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего довели объем пробы до 500 мкл и анализировали на проточном цитофлуориметре. Иммунофенотипирование проводили в нескольких повторах, для каждого антигена анализировали не менее 10 000 клеток.

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ MS Excel.

## Результаты

Сравнительная оценка пролиферативной активности и жизнеспособности лМСК, культивируемых при различном содержании O<sub>2</sub>. Через 24 ч после посадки как в нормоксических (20 % O<sub>2</sub>), так и в гипоксических (5 % O<sub>2</sub>) культурах можно было обнаружить клетки, которые располагались поодиночке или небольшими группами (рис. 1, а, в). Морфологические различия между клетками в нормоксии и гипоксии были незначительны. Можно было отметить, что в нормоксических культурах больше хорошо распластанных клеток с зернистостью в перинуклеарной области (рис. 1, а). В гипоксических культурах преобладали небольшие вытянутые клетки, утолщенные в околядерной области. Среди этих клеток можно было видеть небольшое число одиночных крупных хорошо распластанных клеток (рис. 1, в). После 4—6 сут культивирования морфологические различия между клетками в нормоксии и гипоксии становились более выраженными: нормоксические клетки были по-прежнему сильно распластаны, а зернистость вокруг ядра в них еще более заметна (рис. 1, б). В гипоксических культурах большинство клеток по форме соответствовало небольшим вытянутым клеткам, обнаруживаемым через 24 ч после посадки (рис. 1, з). Эффективность прикрепления клеток к пластику составляла 80—90 % от плотности посадки и практически не различалась в культурах, экспонируемых в средах с различным содержанием кислорода.

Для сравнения пролиферативной активности клеток в условиях различного содержания кислорода ежедневно определяли их количество в фиксированных полях зрения, как описано в разделе «Материал и методика». По результатам подсчета были построены кривые пролиферации для нормоксических и гипоксических клеток (рис. 2). Характер роста клеток в тех и других культурах описывался типичной для МСК кривой пролиферации: лаг-фаза в течение 48—72 ч, которая сменялась фазой роста.

В табл. 1 приведены данные, характеризующие пролиферативную активность клеток в средах с различным содержанием кислорода. Во всех изученных случаях пролиферативная активность гипоксических клеток была выше, чем у клеток в нормоксии. Кратность различий в пролиферативной активности по всем образцам составила  $2.9 \pm 0.2$  (табл. 1). Время удвоения клеток в исследуемых культурах варьировало в широких пределах и составляло от 18.9 до 144.0 ч в гипоксии и от 21.9 до 330.0 ч при культивировании в нормоксии. Во всех случаях время удвоения клеток в гипоксии было значительно меньше, а количество клеточных удвоений за то же время больше, чем в нормоксии.

При оценке жизнеспособности лМСК с помощью набора Annexin V—FITCkit оказалось, что культивирование в средах с различным содержанием кислорода

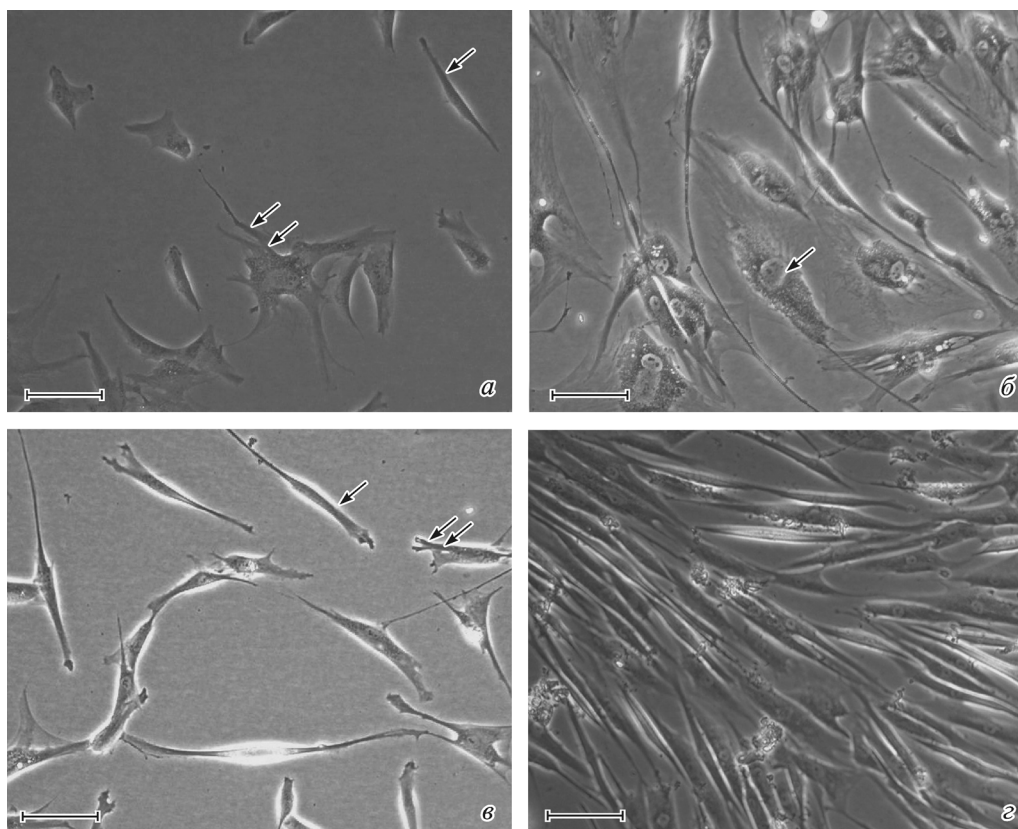


Рис. 1. Мезенхимные стромальные клетки из липоасpirата (лМСК), культивируемые в условиях нормоксии (20 % кислорода — *а, б*) и гипоксии (5 % кислорода — *в, г*).

*а* — 24 ч культивирования, *стрелками* указаны хорошо распластанные клетки с зернистостью в перинуклеарной области; *б* — 120 ч, культура состоит из крупных, хорошо распластанных клеток с выраженной зернистостью; *в* — 24 ч культивирования, *одиночными стрелками* указаны уплощенные клетки, *двойными* — хорошо распластанные клетки неправильной формы; *г* — 120 ч, культура состоит в основном из вытянутых клеток, уплощенных в околоядерной области. Фазово-контрастная микроскопия; *масштабные линейки* — 100 мкм.

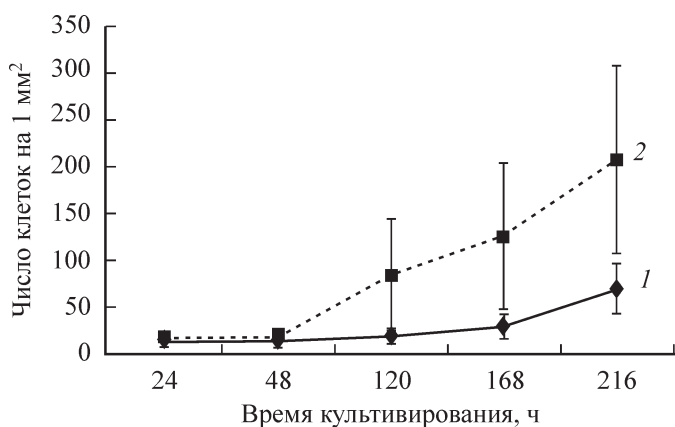


Рис. 2. Кривые пролиферации лМСК, культивируемых в условиях нормоксии (20 % кислорода, *кривая 1*) и гипоксии (5 % кислорода, *кривая 2*).

Подсчет лМСК проводили через каждые 24 ч, начиная с 1-х сут после посадки и до момента пассирования. В каждой точке определяли среднее количество клеток на 1 мм<sup>2</sup>. Приведены репрезентативные кривые пролиферации клеток, образец 2.

Таблица 1  
Проллиферативная активность лМСК, культивируемых в среде с различным содержанием кислорода

Образец	Гипоксия/нормоксия, кратность различий
1	2.5
2	2.7
3	3.0
4	2.0
5	3.1
<i>М ± m</i>	<i>2.9 ± 0.2</i>

Примечание. Нормоксия и гипоксия — соответственно 20 и 5 % кислорода в среде культивирования лМСК. *М ± m* — среднее и его стандартное отклонение. В культурах клеток каждого образца подсчитывали количество клеток в последние сутки перед субкультивированием и определяли кратность различий.

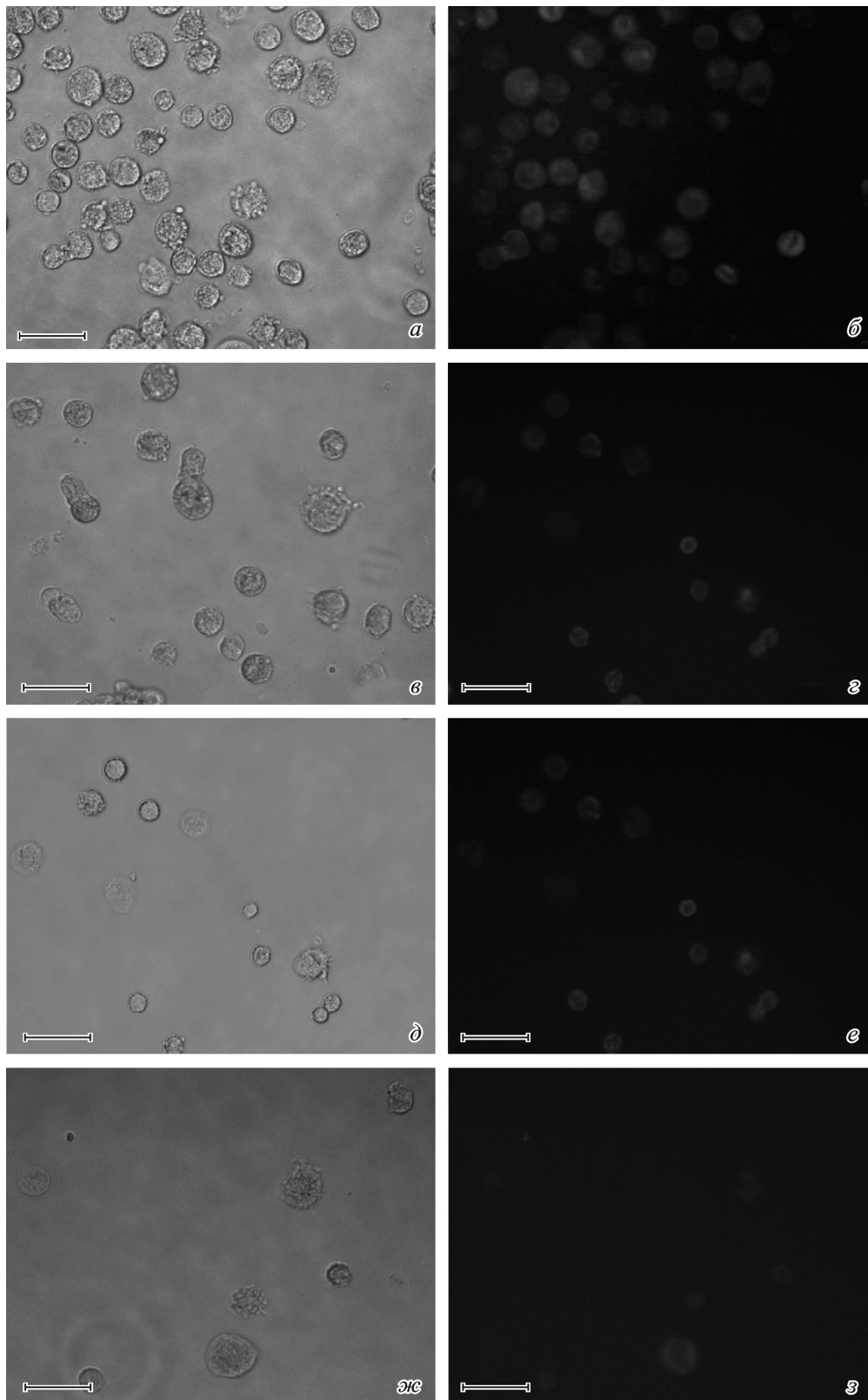


Рис. 3. Иммунофенотипическая идентификация лМСК.

лМСК из суспензии, подготовленной для иммунофенотипирования на проточном цитофлуориметре, исследовали также с помощью флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии. *a, б, д, ж* — фазовый контраст; *б, з, е, з* (те же поля зрения, что и *a—ж*) — флуоресценция FITC. Масштабные линейки — 100 мкм.



Таблица 2

## Имунофенотипирование лМСК, культивируемых в условиях различного содержания кислорода

Антиген	Экспрессия антигена, %	
	в нормоксии (20 % O <sub>2</sub> )	в гипоксии (5 % O <sub>2</sub> )
CD31	1.057—1.150	1.4
CD34	1.67—1.93	1.1—3.1
CD621	1.40—1.55	1.35—1.48
CD62E	0.70—1.05	0.80—1.60
CD62P	0.91—1.26	0.70—0.48
CD117(c-kit)	1.57—2.71	1.23—1.56
HLA-DR	0.0	0.0
CD9	26.61—50.39	26.33—51.87
CD54	34.00—70.15	66.00—73.63
CD71	95.00—97.50	97.87—98.99
CD90	38.90—93.09	66.81—93.69
CD105	48.93—97.57	83.87—97.02
CD106	11.90—36.80	3.90—35.29
HLA-ABC	98.60—99.46	99.05—99.64
Виментин	100.0	100.0
CD49d	1.50—2.27	12.60—13.80

(5 или 20 %) не влияло на жизнеспособность клеток, которая составляла в среднем около 90 % во всех изученных образцах.

Имуноцитохимическая характеристика лМСК, культивируемых в среде с различным содержанием O<sub>2</sub>. Имунофенотипирование проводили, используя моноклональные антитела к маркерам гемопоэтических и эндотелиальных клеток-предшественников — CD31, CD34, CD62L, CD62E, CD62P, CD117(c-kit) и HLA-DR, а также стромальных клеток-предшественников — CD9, CD54, CD71, CD90, CD105, HLA-ABC и виментину. При микроскопическом изучении на поверхности клеток можно было выявить флуоресценцию различной интенсивности, соответствующую местам связывания FITC-меченных антиген-специфичных антител. На рис. 3 показаны результаты иммуноцитохимического выявления некоторых из использованных антигенов. Количество окрашенных клеток варьировало в зависимости от исследуемого антигена. Результаты иммунофенотипирования 5 исследованных образцов приведены в табл. 2. Доля окрашенных антителами против одного и того же антигена клеток варьировала в достаточно широких пределах в зависимости от образца (табл. 2).

Во всех экспериментах как в нормоксических, так и в гипоксических культурах не было обнаружено клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для эндотелия и гематопоэтических клеток-предшественников — CD31, CD34, CD62L, CD62E, CD62P, CD117(c-kit) и HLA-DR. Культуры в нормоксии и гипоксии не различались по количеству клеток, несущих маркеры, специфичные для лМСК.

### Обсуждение

Быстро развивающееся в настоящее время направление клеточных технологий, связанное с использованием так называемых стволовых клеток взрослого организма,

привлекло внимание исследователей к МСК. Основным источником МСК до недавнего времени считался костный мозг, но трудности, возникающие из-за высокой травматичности процедуры биопсии, вынудили исследователей искать новые источники стволовых клеток (Carlán, Bruder, 2001; Zuk et al., 2001, 2002; Katz et al., 2005; Романов и др., 2006). Одним из наиболее доступных источников МСК является жировая ткань, которая так же как и костный мозг, является производным мезенхимы и содержит поддерживающую его строму, которая может быть легко изолирована (Zuk et al., 2001, 2002; Lee et al., 2004; Cao et al., 2005; Dicker et al., 2005; Katz et al., 2005; Leong et al., 2005).

лМСК в настоящее время рассматриваются как один из основных источников клеточного материала для удовлетворения потребностей регенеративной и восстановительной медицины. Однако непосредственно из постоперационного материала невозможно получить необходимое для дальнейшего использования количество клеток. Культивирование клеток вне организма позволяет решать задачи, связанные с быстрым наращиванием клеточной массы. В связи с этим разработку подходов к оптимизации способов получения и культивирования лМСК, а также их характеристика являются важной задачей современной клеточной физиологии и биотехнологии.

Газовый состав среды для выращивания клеток — наиболее консервативный параметр при культивировании. В частности, содержание кислорода в такой среде практически соответствует содержанию кислорода в воздухе. В научной литературе активно обсуждается вопрос о том, какая концентрация O<sub>2</sub> является физиологической для клеток. Поскольку физиологическое содержание кислорода в тканях составляет около 4—7 %, высказывается предположение о том, что именно такое его содержание должно быть оптимальным для культивируемых клеток (Gupton, Hall, 2006). Однако нет экспериментальных данных о том, как уменьшение концентрации кислорода в газовой среде при культивировании клеток повлияет на их морфофункциональное состояние. В ряде исследований, в том числе проведенных и в нашей лаборатории, было показано, что культивирование МСК, выделенных из костного мозга крыс, в условиях пониженного содержания кислорода приводит к увеличению их пролиферативной активности и жизнеспособности (Lennon et al., 2001; Буравкова, Анохина, 2007).

В настоящей работе мы показали, что пониженное содержание O<sub>2</sub> (5 %) в среде культивирования лМСК стимулирует их пролиферативную активность и не влияет на жизнеспособность и иммунофенотип по сравнению с лМСК, культивируемыми в среде со стандартным содержанием O<sub>2</sub> (20 %).

Для получения лМСК человека мы использовали предложенный протокол (Zuk et al., 2001) с некоторыми модификациями. В частности, перед обработкой ткани коллагеназой проводили двукратное центрифугирование, позволяющее удалить значительное количество эритроцитов, что в дальнейшем позволило получить более чистую суспензию лМСК. Выделенные нами и культивируемые в стандартных условиях (20 % O<sub>2</sub>) лМСК по своим морфологическим характеристикам, а также по экспрессии различных специфичных для МСК антигенов не отличались от клеток, описываемых другими авторами (Zuk et al., 2002; Fink et al., 2004; Lee et al., 2004; Тепляшин и др., 2005; Cao et al., 2005; Dicker et al., 2005; Katz et al., 2005). Так, наличие таких антигенов, как CD9, CD54,

CD71, CD90, CD105, CD106, HLA-ABC и виментин, свидетельствовало о том, что исследуемые нами клетки можно охарактеризовать как лМСК.

Сравнение клеток, культивируемых в газовой среде со стандартным (20 %) и пониженным (5 %) содержанием кислорода, выявило наличие морфологических различий между клетками, культивируемыми в среде с различным содержанием кислорода, а также более высокую пролиферативную активность клеток, находившихся в гипоксии. Характер роста нормоксических и гипоксических клеток не различался и описывался стандартной для МСК кривой пролиферации, включающей в себя лаг-фазу и фазу роста. Полученные нами данные о влиянии гипоксии на морфологию лМСК и их пролиферативную активность хорошо согласуются с данными, полученными ранее в нашей и в других лабораториях, о влиянии гипоксии на МСК из костного мозга крысы (Lennon et al., 2006; Буравкова, Анохина, 2007), мышцы (Ren et al., 2006) и свиньи (Bosch et al., 2006).

В нашем исследовании не обнаружено влияния изменения содержания кислорода в газовой среде на жизнеспособность лМСК, хотя для МСК из костного мозга крысы было показано защитное действие гипоксии на клетки, что выражалось в уменьшении количества апоптотических МСК в культуре на ранних пассажах (Буравкова, Анохина, 2007). Стоит отметить, что длительно культивируемые мезенхимные клетки-предшественники из костного мозга иначе реагировали на снижение содержания кислорода в среде (Анохина, Буравкова, 2006).

Анализ данных, полученных при иммунофенотипировании лМСК, показывает, что доля клеток, экспрессирующих специфичные маркеры, значительно варьирует от донора к донору, что соответствует данным других авторов (Lee et al., 2004; Тепляшин и др., 2005). При этом нам не удалось обнаружить достоверные различия между клетками, культивируемыми при разном содержании кислорода, что позволяет сделать вывод: культивирование в условиях измененного содержания кислорода не влияет на экспрессию антигенов, характерных для лМСК.

Таким образом, постоянное культивирование лМСК в среде с пониженным до 5 % содержанием кислорода не изменяет их иммунофенотип и стимулирует пролиферативную активность, что позволяет получать большее количество клеточной массы с неизменными свойствами за меньшее время. Полученные результаты могут быть весьма полезными для решения медицинских задач в области регенеративной и восстановительной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке контракта № 02.522.11.2006 Роснауки.

### Список литературы

Анохина Е. Б., Буравкова Л. Б., Воложин А. И., Григорьева О. В. 2006. Влияние гипоксии на длительно культивируемые стромальные клетки-предшественники, выделенные из костного мозга крыс. Патол. физиол. эксперим. терапия. 4 : 26—68.

Буравкова Л. Б., Анохина Е. Б. 2007. Влияние гипоксии на стромальные клетки-предшественники из костного мозга крыс на ранних этапах культивирования. Бюл. эксперим. биол. мед. 143 (4) : 386—389.

Романов Ю. А., Даревская А. Н., Кабаева Н. В., Антонова О. А. 2006. Выбор оптимальных условий культивирования мезенхимальных клеток-предшественников костного мозга и жировой ткани человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. 4 : 206—211.

Тепляшин А. С., Чутикова Н. И., Коржикова С. В., Шарифулина С. З., Ростовская М. С., Топчиаивили З. А., Савченкова И. П. 2005. Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки. Цитология. 47 (7) : 637—643.

Bosch P., Pratt S. L., Stice S. L. 2006. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. Biol. Reprod. 74 : 46—57.

Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R. C. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 332 : 370—379.

Caplan A. I., Bruder S. P. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol. Med. 7 : 259—264.

Dicker A., Le Blanc K., Aström G., van Harmelen V., Götherström C., Blomqvist L., Arner P., Rydén M. 2005. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. Exp. Cell Res. 308 : 283—290.

Fink T., Abildtrup L., Fogd K., Abdallah B. M., Kassem M., Ebbesen P., Zachar V. 2004. Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. Stem Cells. 22 : 1346—1355.

Grayson W. L., Zhao F., Izadpanah R., Bunnell B., Ma T. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. J. Cell. Physiol. 207 : 331—339.

Guyton A. G., Hall J. E. (eds) 2006. Textbook of medical physiology. Eleventh edition. Elsevier Saunders. 1116 p.

Katz A. J., Tholpady A., Tholpady S. S., Shang H., Ogle R. C. 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. Stem Cells. 23 : 412—423.

Lee R. H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H. S., Suh K., Bae Y. C., Jung J. S. 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol. Biochem. 14 : 311—324.

Lennon D. P., Caplan A. I. 2006. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp. Hematol. 34 : 1604—1605.

Lennon D. P., Edmison J. M., Caplan A. I. 2001. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis. J. Cell. Physiol. 187 : 345—355.

Leong D. T. W., Huttmacher D. W., Chew F. T., Lim T. C. 2005. Viability and adipogenic potential of human adipose tissue processed cell population obtained from pump-assisted and syringe-assisted liposuction. J. Dermatol. Sci. 37 : 169—176.

Ren H., Cao Y., Zhao Q., Li J., Zhou C., Liao L., Jia M., Zhao Q., Cai H., Han Z. C., Yang R., Chen G., Zhao R. C. 2006. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 347 : 12—21.

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. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol. Biol. Cell. 13 : 4279—4295.

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7 : 211—228.

---

CHARACTERISTICS OF HUMAN LIPOASPIRATE-ISOLATED MESENCHYMAL STROMAL CELLS  
CULTIVATED UNDER A LOWER OXYGEN TENSION

*L. B. Buravkova, O. S. Grinakovskaya, E. R. Andreeva, A. P. Zhamalova, M. P. Kozionova*

Institute for Biomedical Problems RAS, Moscow;  
e-mail: grinakovskaya@imbp.ru

In the present study we investigated the effect of low oxygen concentration in the cultivation medium on proliferation, viability and immunophenotype of human mesenchymal stromal cells isolated from lipoaspirate (IMSC). It was shown that proliferation activity of the cells under hypoxic conditions was, on average, 2.9 times higher compared to that under commonly accepted — normoxic conditions. Reduced oxygen level in the culture medium did not cause any change in IMSC viability and immunophenotype. Thus, permanent culture of IMSC in the medium with a lower oxygen tension can prove an efficient approach to obtain a higher mass of cells which maintain their characteristics in a shorter period of time, which can be of demand for regenerative medicine.

Key words: mesenchymal stromal cells, lipoaspirate, hypoxia, normoxia, proliferation, immunophenotype.

---