

IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK PROGENITOROWYCH TKANKI TŁUSZCZOWEJ

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS

Joanna OLKOWSKA-TRUCHANOWICZ

Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek, Centrum Biostruktury,
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: W pracy przedstawiono główne źródła, sposoby izolacji oraz hodowlę multipotencjalnych komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej, z uwzględnieniem odmiennych właściwości komórek w zależności od metody pobrania, pochodzenia tkanki czy czasu hodowli. Podsumowano ich charakterystykę molekularną i występowanie markerów powierzchniowych, na podstawie piśmiennictwa.

Słowa kluczowe: somatyczne komórki macierzyste, mezenchymalne komórki macierzyste, multipotencjalne komórki macierzyste, tkanka tłuszczowa, frakcja podporowo-naczyniowa

Summary: Main sources, isolation methods and culturing of multipotent adipose tissue-derived stem cells were described in the paper, considering distinct properties depending on isolation technique, source and time in the culture. Based on literature their molecular properties and surface markers presence were summarized.

Key words: adult stem cells, mesenchymal stem cells, multipotent stem cells, adipose tissue, stromal vascular fraction

Wykaz skrótów: **ABCG2** (*ATP-binding cassette subfamily G member 2*) – członek 2 podrodziny G transporterów ABC; **ADSC** (*adipose-derived stem cells, adipose-derived stromal cells, adipose-derived mesenchymal progenitor cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej; **BMMSC** (*bone marrow mesenchymal stem cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego; **CDs** (*clusters of differentiation*) – gronka różnicowania; **DMEM** (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – pożywka DMEM; **DMEM/MCDB** (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/MCDB*) – pożywka DMEM/MCDB; **ECM2** (*extracellular matrix protein 2*) – białko 2 macierzy zewnątrzkomórkowej; **FGF-2** (*fibroblast growth factor 2*) – czynnik 2 wzrostu fibroblastów; **HGF** (*hepatocyte growth factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów; **HLA-DR, HLA-A, HLA-B, HLA-C** (*human leukocyte antigen DR, A, B, C*) – ludzki antygen leukocytarny DR, A, B, C; **HOXA5, HOXB6** (*homeobox A5, B6*) – geny homeoboksu A5, B6; **ICAM-1** (*intercellular adhesion molecule 1*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1, CD54; **ID1** (*inhibitor of DNA binding 1*) – inhibitor 1 wiązania DNA; **IGF-1** (*insulin-like growth factor 1*) – insulinopodobny czynnik wzrostu 1; **JAK3** (*Janus kinase 3*) – kinaza Janusowa 3; **JNK** (*c-jun N-terminal kinase*) – kinaza c-Jun; **MEK/ERK** (*mitogen/extracellular signal-regulated kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)*) – kinazy szlaku MEK/ERK; **MEM** (*Modified Eagle's Medium*) – pożywka MEM; **MMP 2** (*matrix metalloproteinase 2*) – metaloproteinaza 2 macierzy; **MSC** (*mesenchymal stem cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste; **NFIB** (*nuclear factor I/B*) – czynnik

jądrowy I/B; **PBS** (*phosphate buffered saline*) – bufor PBS, buforowana sól fizjologiczna; **PDGF** (*platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu; **PLA** (*processed lipoaspirate cells*) – komórki otrzymane drogą lipoaspiracji; **SCFR** (*stem cell factor receptor*) – receptor czynnika komórek macierzystych, CD117, c-kit; **SPARC** (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) – osteonektyna; **STAT1** (*signal transducer and activator of transcription 1*) – czynnik transkrypcyjny 1 pośredniczący w działaniu cytokin i czynników wzrostu; **STRO-1** – antygen komórek prekursorowych zrębu szpiku kostnego; **SVF** (*adipose stromal-vascular cell fraction*) – frakcja podporowo-naczyniowa tkanki tłuszczowej; **TGF- β** (*transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu β ; **TIMP 1, TIMP 3** (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 3*) – inhibitory tkankowe metaloproteinazy 1, 3; **TNF- α** (*tumor necrosis factor α*) – czynnik martwicy nowotworów α ; **VCAM-1** (*vascular cell adhesion molecule 1*) – cząsteczka adhezji śródbłonna 1, CD106; **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; **VLA-4** (*very late antigen 4*) – bardzo późny antygen 4, integryna 4 1, CD49d/CD29; **VLA-5** (*very late antigen 5*) – bardzo późny antygen 5, integryna $\alpha\beta_1$, CD49e/CD29.

WSTĘP

Narządy dorosłego człowieka stanowią rezerwuuar somatycznych komórek macierzystych (ang. *adult stem cells*). Wśród nich wyróżnia się hematopoetyczne i mezenchymalne komórki macierzyste, komórki prekursorowe jelit, wątroby, trzustki, oka, skóry i tkanki nerwowej [1]. Mezenchymalne komórki macierzyste – MSC (ang. *mesenchymal stem cells*) izolowane z tkanek dorosłych mają zdolność do różnicowania w kierunku kości, chrząstki, tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych podczas hodowli w odpowiednich warunkach ze specyficznymi hormonami i czynnikami wzrostu. Obecne są u dorosłego człowieka w zrębie szpiku kostnego jako frakcja komórek niehematopoetycznych, można je także znaleźć w okostnej, tkance tłuszczowej i skórze [1]. Od ponad 25 lat obiektem badań były przede wszystkim komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku – BMMSC (ang. *bone marrow mesenchymal stem cells*) często określane jako podporowe komórki szpiku – MSC (ang. *marrow stromal cells*). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej, które wchodzi w skład frakcji podporowo-naczyniowej tej tkanki (zrąb, komórki nieakumulujące tłuszczów). Komórki te określane są mianem ADSC (ang. *adipose-derived stem cells, adipose-derived stromal cells* lub *adipose-derived mesenchymal progenitor cells*) [27]. Używany termin frakcja podporowo-naczyniowa tkanki tłuszczowej – SVF (ang. *adipose stromal-vascular cell fraction*) ma zastosowanie do określenia subpopulacji komórek otrzymanych bezpośrednio po trawieniu tkanki tłuszczowej kolagenazą i oddzieleniu adipocytów i erytrocytów [38]. Również komórki pierwotnie nazywane preadipocytami prawdopodobnie należą do populacji tych komórek [27]. W piśmiennictwie spotykany jest także termin PLA (ang. *processed lipoaspirate cells*) określający komórki izolowane z fragmentu tkanki pobranej drogą lipoaspiracji [50, 49].

TKANKA TŁUSZCZOWA JAKO ŹRÓDŁO KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Frakcja podporowo-naczyniowa (SVF) tkanki tłuszczowej jest heterogenną mieszaniną komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich, perycytów, leukocytów, komórek tucznych i prekursorów adipocytów. Ponadto zawiera liczną populację multipotencjalnych komórek macierzystych (ADSC) zdolnych do różnicowania *in vitro* w

komórki pochodzenia mezodermalnego (adipocyty, chondrocyty, osteocyty, miocyty) [17, 49]. Taka mieszanina hodowana w warunkach podtrzymujących wzrost komórek mezenchymalnych, staje się populacją bardziej jednorodną [14].

Tkankę tłuszczową jako źródło komórek macierzystych charakteryzuje wiele korzystnych właściwości. Większość opublikowanych doniesień dotyczy tkanki tłuszczowej pozyskanej z warstwy podskórnej, przeważnie podczas liposukcji. W trakcie przypadku możliwy jest powtarzalny dostęp do pobieranego materiału za pomocą prostego zabiegu, przeprowadzanego w miejscowym znieczuleniu [38]. Znaczenie ma zatem jak najmniejsza inwazyjność metody, ograniczenie bólu i dyskomfortu pacjenta. Ponadto możliwa jest prosta izolacja komórek z pobranej tkanki, oparta na trawieniu enzymatycznym [38]. Co więcej, z tkanki tłuszczowej można uzyskać dużą liczbę komórek w porównaniu ze szpikiem kostnym [49]. Wyizolowane komórki dają się łatwo hodować i utrzymują swoje cechy przez wiele pasażów, charakteryzują się zdolnością do powielania i różnicowania w obrębie jednego listka zarodkowego (do multipotencji) [36]. Większość danych potwierdza tezę, że ADSC mają porównywalną z BMMSC zdolność do różnicowania w tkanki pochodzenia mezodermalnego [45, 49, 38]. Istnieją także mniej liczne doniesienia potwierdzające zdolność tych komórek lub pewnej puli komórek spośród nich do różnicowania w tkanki o pochodzeniu endodermalnym i ektodermalnym. Ma to świadczyć o ich potencjale do przekształcania się w komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych (o pluripotencji) [1, 38]. Ponadto ADSC nie różnią się od BMMSC morfologią, fenotypem immunologicznym, odsetkiem izolowanych komórek, częstością tworzenia kolonii [17,11], kinetyką wzrostu, stopniem starzenia się komórek w hodowli ani wydajnością transdukcji genów [45].

IZOLACJA I HODOWLA A WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK

Pierwszą izolację komórek prekursorowych z tkanki tłuszczowej, pochodzącej od gryzoni opisał już w 1964 roku Rodbell [35]. Później ta metoda została zaadaptowana do izolacji komórek progenitorowych z ludzkiej tkanki tłuszczowej [9, 24, 18, 37]. W 2001 roku zmieniono procedurę izolacji ADSC z wykorzystaniem materiału z liposukcji [7] oraz potwierdzono zdolność tych komórek do różnicowania się, a tym samym ich zastosowania w terapii klinicznej [7, 50, 37].

ADSC można łatwo wyizolować z materiału pobranego drogą resekcji chirurgicznej, lipoaspiracji z użyciem ultradźwięków czy lipoaspiracji z uprzednim wstrzykiwaniem płynu rozbijającego komórki tłuszczowe, a następnie hodować w standardowych warunkach [38, 50]. Materiał pobrany drogą chirurgiczną musi zostać rozdrobniony sterylnie w celu otrzymania fragmentów wielkości 0,5–1 cm³. Pobraną tkankę należy przepłukać sterylnym PBS i trawić przy pomocy kolagenazy I 0,5–2 godziny w temperaturze 37°C w warunkach wytrząsania. Po etapie filtracji na nylonowych sitach dla oddzielenia większych, niestrawionych fragmentów tkanki i wirowaniu, pobiera się oddzielone, osiadłe na dnie komórki zębów. Erytrocyty wskutek wirowania znajdują się w warstwie powyżej SVF (można je uprzednio usunąć specjalnym buforem do lizy), natomiast adipocyty z wypełniającym je tłuszczem gromadzą się na powierzchni odwirowanej mieszaniny. Komórki frakcji stromalnej zawieszają się w standardowej

pożywce, np. DMEM, i te, które ulegną adhezji do butelek hodowlanych stanowią populację ADSC. Komórki takie mogą być hodowane *in vitro* maksymalnie przez około 15 pasaży, a także przechowywane w stanie zamrożonym w -140°C [38].

Hattori [8] opracował metodę wzbogacenia frakcji izolowanych komórek myszy w prekursorzy osteoblastów wykorzystując różnice w adhezji komórek. Komórki, które przyczepiały się już po pół godzinie od czasu umieszczenia ich w butelce pokrytej warstwą kolagenu typu I, uznano za populację, która różnicowała w kierunku osteoblastów lub adipocytów z większą efektywnością niż frakcje niewyselekcjonowane. Do klinicznego zastosowania najbardziej korzystna wydaje się być izolacja ADSC i ich natychmiastowe podanie pacjentowi, podczas jednego zabiegu. Eliminowałoby to relatywnie długą procedurę hodowli komórek, jednak skutkowałoby podaniem heterogennych izolatów SVF, jako że nie istnieją na razie skuteczne metody oddzielenia komórek macierzystych z tej frakcji [10]. Dla podjęcia funkcji regeneracyjnej izolaty SVF powinny zatem zawierać wystarczającą liczbę komórek zdolnych do różnicowania [10].

Fibroblastyczne ADSC są podobne pod względem morfologii do MSC z innych tkanek, zarówno podczas izolacji jak i hodowli [25]. Na proliferację oraz zdolność różnicowania wyizolowanych komórek mogą wpłynąć takie czynniki, jak: wiek dawcy, typ tkanki tłuszczowej (żółta czy brunatna), lokalizacja (podskórna czy trzewna tkanka tłuszczowa), sposób pobrania, warunki hodowli, ekspozycja na plastik, wyjściowa gęstość wysianych komórek, skład pożywek hodowlanych [38].

Wykazano, że skład komórkowy SVF i zdolność komórek tej frakcji do różnicowania u gryzoni mogą różnić się w zależności od pierwotnej lokalizacji tkanki tłuszczowej [31]. Także potencjał osteogeniczny ADSC izolowanych z tkanki tłuszczowej trzewnej królika był większy niż komórek pochodzących z tkanki podskórnej [30].

W przypadku przeniesienia fragmentu skóry wraz z podskórną tkanką tłuszczową z okolicy brzucha w wierzchni region dłoni, w przypadku tego samego pacjenta, doszło do powiększenia się miejsca przeszczepienia autologicznego przeszczepu z każdym przybieraniem na wadze w okolicy brzusznej [6]. Przeniesione adipocyty mogły zachować właściwości charakterystyczne dla miejsca pochodzenia, związane z różnym metabolizmem tkanek: aktywnością lipolityczną, składem kwasów tłuszczowych, profilem ekspresji genów [38]. Nie jest jasne, czy ADSC stosowane w terapii komórkowej również mogą wykazywać różnice metaboliczne w zależności od źródła pobrania, czy jako komórki progenitorowe, zależne są raczej od środowiska (niszy), w którym zostaną umiejscowione.

Tempo proliferacji i czas podwojenia populacji zależne są natomiast od procedury pozyskania tkanki podczas zabiegu. W przypadku liposukcji z zastosowaniem ultradźwięków wyniki były mniej korzystne od resekcji czy liposukcji po uprzednim wstrzykiwaniu płynu [28, 14]. Metabolizm i żywotność komórek nie różnią się w przypadku zastosowania standardowej liposukcji (pompy ssącej) i z użyciem strzykawki [41]. Materiał otrzymany po lipoaspiracji zawiera żywe komórki [32]. Jest to wygodniejsza metoda izolacji, m.in. z powodu zachowania większej sterylności pobieranego materiału. Nawet bezpośrednio zamrożenie w -140°C materiału z lipoaspiracji pozwala na otrzymanie wysokiego odsetka komórek zdolnych do różnicowania [33]. PLA otrzymane z lipoaspiracji cechują się multipotencją. Są zdolne do różnicowania w tkanki o pochodzeniu mezenchymatycznym [49].

Wykazano, że zdolność przylegania i proliferacji ADSC izolowanych od młodych dawców jest większa [40]. U starszych dawców zaobserwowano natomiast znaczne wahania zdolności proliferacyjnych w zależności od pacjenta [29], jednak zdolność ADSC do różnicowania pozostaje bez zmian bez względu na wiek dawcy [40].

Również procedura izolacji, jak i użyte odczynniki, np. kolagenaza różnego pochodzenia, mogą wpłynąć na otrzymanie populacji komórek o odmiennych cechach [38]. Przy różnicowaniu w kierunku adipocytów niska gęstość wyjściowa komórek zwiększa wydajność tego procesu. Podobny skutek ma zastosowanie pożywki DMEM/MCDB w porównaniu z α -MEM. Oba rodzaje pożywki są równie efektywne w przypadku różnicowania w kierunku osteoblastów [20]. Stwierdzono, że pożywki dedykowane dla komórek mezenchymalnych niwelują różnice w tempie proliferacji ADSC od różnych pacjentów [29]. Ponadto, skład pożywek wpływa na różnicowanie ekspresji genów. W przypadku ADSC znaleziono ich kilkaset [20]. Kontakt z plastikiem i czas jego trwania ma również wpływ na ekspresję markerów powierzchniowych [27]. Niska zawartość wapnia w pożywce oraz duże stężenie przeciwutleniaczy zwiększają tempo wzrostu i długość życia ADSC [21].

ADSC wykazują podobną do BMMSC zdolność do różnicowania. Niektóre ich cechy, jak utrzymywanie potencjału proliferacyjnego w hodowli oraz częstość tworzenia kolonii, są lepsze w porównaniu z BMMSC [20, 41]. Proliferację ADSC mogą stymulować *in vitro*: czynnik wzrostu fibroblastów – FGF-2 (ang. *fibroblast growth factor-2*) poprzez receptor FGF-2; sfingozylfosforylcholina oraz płytkopochodny czynnik wzrostu – PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) poprzez aktywację kinazy c-Jun – JNK (ang. *c-jun N-terminal kinase*), a także onkostatyna M poprzez aktywację kinaz MEK/ERK (ang. *mitogen/extracellular signaling kinase/extracellular signal-regulated kinase*) oraz poprzez szlak JAK3/STAT1 (ang. *Janus kinase 3/Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) [2, 12, 15, 42].

FGF-2 jest znanym czynnikiem stymulującym proliferację komórek i podtrzymującym zdolność różnicowania MSC. ADSC wydzielają FGF-2 drogą autokrynną utrzymują w ten sposób zdolność do samoodnowy. Wraz z namnażaniem się komórek w hodowli spada z czasem tempo proliferacji, klonogenność i potencjał różnicowania. Jest to związane ze spadkiem ekspresji autokrynnego FGF-2, który może zostać zastąpiony przez egzogeny FGF-2 w pożywce. Traktowanie ADSC wydzielających FGF-2 specyficznym inhibitorem receptora dla FGF znacznie obniża ich klonogenność i potencjał proliferacyjny. Ponadto hamowanie kinazy 1 aktywowanej mitogenami (MEK1) ogranicza potencjał klonogeny ADSC, lecz nie wpływa na ich zdolność do różnicowania. Wskazuje to na przynajmniej częściowe uczestnictwo szlaku ERK1/2 w samoodnowie komórek ADSC uzależnionej od FGF-2 [47]. Długość życia komórek progenitorowych z tkanki tłuszczowej może zostać wydłużona poprzez nadekspresję genu ludzkiej telomerazy [13].

Wykazano, że komórki ADSC wydzielają wiele czynników angiogennych, takich jak: naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna – VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), czynnik wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *hepatocyte growth factor*) i insulinopodobny czynnik wzrostu I – IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor 1*) [38, 27]. Może mieć to znaczenie dla zastosowania ich w terapii chorób związanych z niedokrwistością czy w inżynierii tkankowej, ponieważ pobudzenie

wzrostu naczyń krwionośnych ułatwia formowanie tkanki. Wydzielanie tych czynników może być zwiększone pod wpływem czynnika martwicy nowotworów – TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*) [46], który również ulega ekspresji w ADSC [16]. Należy jednak wyjaśnić, czy z uwagi na produkcję czynników angiogenezy istnieje ryzyko promocji nowotworów związane z zastosowaniem ADSC w terapii. Podjęto już próby wyjaśnienia roli multipotencjalnych komórek zrębu w nowotworzeniu, gdyż ze względu na swoje immunosupresyjne i proangiogenne właściwości mogą, przynajmniej częściowo, przyczynić się do tego procesu. Z drugiej strony, ponieważ MSC wzmagają swoją migrację pod wpływem komórek nowotworu, mogą okazać się skutecznym pośrednikiem w antynowotworowej terapii genowej [19].

Wyjaśnienie mechanizmów molekularnych proliferacji komórek progenitorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej i produkcji przez nie różnych czynników powinno przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod ich izolacji, hodowli, a także skutecznych terapii z ich wykorzystaniem.

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I MARKERY POWIERZCHNIOWE

Komisja ds. Mezenchymalnych i Somatycznych Komórek Macierzystych (ang. *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej zaproponowała minimalne kryteria definiowania ludzkich multipotencjalnych mezenchymalnych komórek podporowych [4]. Zgodnie z nimi MSC to komórki, które: 1) przylegają do plastiku w trakcie hodowli w standardowych warunkach, 2) mają zdolność do różnicowania w kierunku osteoblastów, adipocytów i chondrocytów, 3) wykazują ekspresję markerów CD73, CD90 i CD105, 4) nie wykazują ekspresji markerów linii hematopoetycznej: c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α i ludzkiego antygeny leukocytarnego HLA-DR.

Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku zostały dokładnie scharakteryzowane i opisane, natomiast charakterystyka fenotypowa ADSC jest nadal niepełna. Niewiele opublikowano badań bezpośrednio porównujących ADSC z BMMSC pod względem profilu ekspresji genów oraz występowania markerów powierzchniowych [46, 20]. Wydają się one być w znacznym stopniu zbliżone [25, 38]. Wiele jest natomiast doniesień dotyczących ekspresji genów i markerów powierzchniowych samych tylko ADSC [28, 3, 41, 4, 26, 39, 23, 16]. Podejmowane są liczne próby scharakteryzowania fenotypu ADSC. Wśród analizowanych genów i białek znalazły się różne czynniki wzrostu i ich receptory, integryny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, proteazy, które zaangażowane są w procesy zapalne, przebudowy macierzy, angiogenezy, embriogenezy, organogenezy, naprawy tkanek i gojenia ran [16].

Analiza ekspresji genów za pomocą mikromacierzy wykazała nadekspresję 25 genów w mezenchymalnych komórkach progenitorowych pochodzących z tkanki tłuszczowej, szpiku i pępowiny, w porównaniu z fibroblastami. Nadekspresja ta dotyczyła m.in. genu fibronektyny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej – ECM2 (ang. *extracellular matrix protein 2*), czynnika jądrowego – NFIB (ang. *nuclear factor I/B*), inhibitora wiązania DNA – ID1 (ang. *inhibitor of DNA binding 1*), genów homeoboksu HOXA5, HOXB6 (ang. *homeobox A5 i B6*) Natomiast przy porównaniu markerów powierzchniowych MSC z tych trzech tkanek nie wykazano różnic w ich fenotypie [46].

Według innych badań porównujących BMMSC i ADSC, wykazano różnice w ekspresji markerów powierzchniowych w przypadku 24 genów oraz zróżnicowane występowanie 8 białkowych markerów powierzchniowych. Jednakże odsetek genów o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy tymi dwoma źródłami komórek wyniósł mniej niż 1% zbadanych genów [20, 38].

Profil występowania markerów powierzchniowych jest podobny dla ADSC i MSC pochodzących ze szpiku. ADSC, podobnie jak BMMSC, wykazują obecność takich markerów jak: CD73, CD90/Thy-1 i CD105/SH2, które służą do identyfikacji komórek o wielokierunkowej zdolności do różnicowania (markery komórek macierzystych). Obecne są w ich błonie także takie cząsteczki, jak: CD29 (integryna β_1 , odgrywająca rolę w angiogenezie), CD44 (receptor kwasu hialuronowego, biorący udział w rozwoju macierzy zewnątrzkomórkowej), CD49e (integryna α_5 /VLA-5 istotna dla adhezji komórek do fibronektyny), CD54 (ICAM-1, biorąca udział w odpowiedzi na mediatory zapalenia i cytokiny), CD71, CD166 (biorąca udział w adhezji) i SH3 [27, 43, 49, 22]. W odróżnieniu od BMMSC, ADSC wykazują obecność antygeny

CD49d (integryna α_4 /VLA-4), podczas gdy nie mają markera MSC – CD106 (VCAM-1) [49, 44, 22]. Brak ekspresji ludzkiego antygeny leukocytarnego HLA-DR (MHC klasy II), obecność HLA-ABC (MHC klasy I) oraz właściwości immunosupresyjne ADSC *in vitro* [34] sugerują możliwość ich zastosowania w komórkowej terapii allogeniczej jako alternatywa dla BMMSC.

Sprzeczne doniesienia dotyczą występowania cząsteczek CD117 (c-kit/SCFR) i STRO-1 (markery multipotencjalności) oraz CD106 [16, 44, 43, 38]. Obecność lub brak niektórych markerów na powierzchni ADSC w zależności od badanej populacji może

TABELA 1. Fenotyp molekularny ludzkich ADSC. Wykryte i nieobecne wybrane transkrypty i markery powierzchniowe [48, 44, 45, 16, 43, 38]. Wytuszczono cząsteczki wymagane, wykazane w kryteriach definiowania MSC [4]. * wykazujące różny wzór ekspresji w zależności od populacji komórek

Transkrypty i markery powierzchniowe wykryte w hADSC	Transkrypty i markery powierzchniowe niewykryte w hADSC lub wykryte w $\leq 2\%$ komórek
CD9	CD3
CD10	CD4
CD13	CD11a
CD29	CD11b
CD44	CD11c
CD49b*	CD14
CD49d*	CD15
CD49e	CD16
CD51	CD18
CD54	CD19
CD55	CD31
CD59	CD33
CD61*	CD34
CD73	CD38
CD90	CD45
CD105	CD56
CD138*	CD62e
CD140a*	CD62P
CD146	CD62L*
CD166	CD79α
HLA-A, -B, i -C (MHC klasy I)	CD80
Fibronektyna	CD104
Endomucyna	CD133
FGF-2, FGF-6, FGF-7	CD144
ASMA (aktywna α komórek mięśni gładkich)	HLA-DR (MHC klasy II)
Wimentyna	CD243
Kolagen typu I	ABCG2
SPARC (osteonektyna)	MyD88
MMP 2	Lin
TIMP 1	STRO-1*
TIMP 3	c-Kit (CD117) *
TGF- β	CD106*

być wynikiem zmiany fenotypu powierzchniowego komórek wskutek procesu hodowli i utraty zdolności komórek macierzystych do wielokierunkowego rozwoju. Ekspozycja komórek stromalnych tkanki tłuszczowej na plastik w hodowli oraz czas tej ekspozycji i rodzaj użytej pożywki wydają się zmieniać znacząco fenotyp komórek. Świeżo izolowane ludzkie komórki frakcji podporowo-naczyniowej (SVF) wykazują obecność markerów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych i komórek śródbłonna, m.in. CD14, CD34, CD45, CD144. Markery te zanikają w hodowli po 3 do 5 dniach [27, 16], prawdopodobnie wskutek wyodrębniania się adherentnych ADSC ze zrębu. Istnieje zatem potrzeba dokładniejszej charakteryzacji molekularnej multipotencjalnych komórek mezenchymalnych otrzymanych z tkanki tłuszczowej i odróżnienia ich od pluripotentjalnych prekursorów obecnych w zrębie tkanki tłuszczowej [38].

Przeprowadzono także porównanie obecności markerów powierzchniowych na bezpośrednio izolowanych, niewyselekcjonowanych na podstawie adhezji do butelek hodowlanych, komórkach frakcji stromalnej tkanki tłuszczowej i dorosłych adipocytach za pomocą cytometrii przepływowej [5]. W obu typach komórek wykazano obecność CD10, CD13, CD34 (sic!), CD36, CD55, CD59 i CD65. Ekspresja CD36 i CD65 była na adipocytach dwukrotnie większa, natomiast CD13, CD34 i CD55 malała wraz ze wzrostem zróżnicowania, jednak CD34, uważany za marker komórek macierzystych, nadal był obecny na zróżnicowanych komórkach tkanki tłuszczowej. Ponadto ADSC różniące *in vitro* lub *in vivo* w funkcjonalne komórki pochodzenia mezodermalnego (adipocyty, chondrocyty, osteocyty, miocyty, kardiomiocyty, komórki śródbłonna i naczyń), endodermalnego (hepatocyty i komórki endokrynowe trzustki) lub ektodermalnego (neurony), pod wpływem dobrze zdefiniowanych warunków hodowli i specyficznych czynników wykazują ekspresję specyficznych markerów tych tkanek [22].

PODSUMOWANIE

Komórki progenitorowe izolowane z tkanki tłuszczowej mogą znaleźć szerokie zastosowanie w inżynierii tkankowej, terapii komórkowej, a nawet terapii nowotworów. Aby jednak skutecznie wykorzystać ich potencjał, niezbędna jest dokładna charakterystyka ich fenotypu i właściwości.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BONGSO A, LEE EH. Stem cells: their definition, classification and sources. W: Bongso A, Lee EH. (red.) Stem Cells: From Bench to Bedside. New Jersey, London, Singapore, Beijing, Shanghai, Hong Kong, Taipei, Chennai: *World Scientific* 2005: 1–13.
- [2] CHIOU M, XU Y, LONGAKER MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**: 644–652.
- [3] DICKERA, LE BLANCK, ASTRÖM G, VAN HARMELLEN V, GÖTHERSTRÖM C, BLOMQUIST L, ARNER P, RYDÉN M. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 2005; **308**: 283–290.
- [4] DOMINICIM, LE BLANCK K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS RJ, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315–317.
- [5] FESTY F, HOAREAU L, BES-HOUTMANN S, PÉQUIN AM, GONTHIER MP, MUNSTUN A, HOARAU JJ, CÉSARI M, ROCHE R. Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2005; **124**: 113–121.

- [6] FLYNN TC. Does transferred fat retain properties of its site of origin? *Dermatol Surg* 2006; **32**: 405–406.
- [7] HALVORSEN YD, BONDA, SENA, FRANKLIN DM, LEA-CURRIE YR, SUJKOWSKI D, ELLIS PN, WILKINSON WO, GIMBLE JM. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism* 2001; **50**: 407–413.
- [8] HATTORI H, ISHIHARA M, FUKUDA T, SUDA T, KATAGIRI T. Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**: 1118–1123.
- [9] HAUNER H, ENTENMANN G, WABITSCH M, GAILLARD D, AILHAUD G, NEGREL R, PFEIFFER EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1663–1670.
- [10] HELDER MN, KNIPPENBERG M, KLEIN-NULEND J, WUISMAN PI. Review. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng* 2007; **13**: 1799–1808.
- [11] IZADPANAH R, TRYGG C, PATEL B, KRIEDT C, DUFOUR J, GIMBLE JM, BUNNELL BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 1285–1297.
- [12] JEON ES, SONGHY, KIMMR, MOONHI, BAE YC, JUNG JS, KIM JH. Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *J Lipid Res* 2006; **47**: 653–664.
- [13] JUN ES, LEE TH, CHO HH, SUH SY, JUNG JS. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem* 2004; **14**: 261–268.
- [14] JURGENS WJ, OEDAYRAJSINGH-VARMA MJ, HELDER MN, DOULABI BZ, SCHOUTEN TE, KUIK DJ, RITT MJ, van MILLIGEN FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008; **332**: 415–426.
- [15] KANG YJ, JEON ES, SONG HY, WOO JS, JUNG JS, KIM YK, KIM JH. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2005; **95**: 1135–1145.
- [16] KATZ AJ, THOLPADY A, THOLPADY SS, SHANG H, OGLE RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005; **23**: 412–423.
- [17] KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; **24**: 1294–1301.
- [18] LALIKOS JF, LI YQ, ROTH TP, DOYLE JW, MATORY WE, LAWRENCE WT. Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. *J Surg Res* 1997; **70**: 95–100.
- [19] LAZENNEC G, JORGENSEN C. Concise review: Adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008; **26**: 1387–1394.
- [20] LEE RH, KIM B, CHOI I, KIM H, CHOI HS, SUH KT, BAE YC, JUNG JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; **14**: 311–324.
- [21] LIN TM, TSAI JL, LIN SD, LAICS, CHANG CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005; **14**: 92–102.
- [22] MIMÉAULT M, BATRA SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 2008; **4**: 27–49.
- [23] MITCHELL JB, MCINTOSH K, ZVONIC S, GARRETT S, FLOYD ZE, KLOSTER A, HALVORSEN YD, STORMS RW, GOH B, KILROY G, WU X, GIMBLE JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; **24**: 376–385.
- [24] MOORE JH Jr, KOLACZYNSKI JW, MORALES LM, CONSIDINE RV, PIETRZKOWSKI Z, NOTO PF, CARO JF. Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: Effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plastic Surgery* 1995; **19**: 335–339.
- [25] MUSINA RA, BEKCHANOVA ES, SUKHIKH GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005; **139**: 504–509.
- [26] NAKAGAMI H, MAEDA K, MORISHITA R, IGUCHI S, NISHIKAWA T, TAKAMI Y, KIKUCHI Y, SAITO Y, TAMAI K, OGIHARA T, KANEDA Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2542–2547.
- [27] NAKAGAMI H, MORISHITA R, MAEDA K, KIKUCHI Y, OGIHARA T, KANEDA Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 2006; **13**: 77–81.
- [28] OEDAYRAJSINGH-VARMA MJ, van HAM S, KNIPPENBERG M, HELDER MN, KLEIN-NULEND J, SCHOUTEN TE, RITT MJ, van MILLIGEN FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells yield and growth characteristics are affected by the tissue - harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006; **8**: 166–177.
- [29] OLKOWSKA-TRUCHANOWICZ J, HUTMACHER DW. Proliferation of ADSCs in medium dedicated for MSCs, measured in Pico Green assay. *World Biomaterials Congress 2008 Materials*.

- [30] PEPTAN IA, HONG L, MAO JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**: 1462–1470.
- [31] PRUNET-MARCASSUS B, COUSIN B, CATON D, ANDRE M, PENICAUD L, CASTEILLA L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissue: Site-specific differences. *Exp Cell Res* 2006; **312**: 727–736.
- [32] PU LLQ, CUI X, FINK BF, CIBULL ML, GAO D. The viability of fatty tissues within adipose aspirates after conventional liposuction: A comprehensive study. *Ann Plast Surg* 2005; **54**: 288–292.
- [33] PU LLQ, CUI X, FINK BF, GAO D, VASCONEZ HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**: 1845–1850.
- [34] PUISSANT B, BARREAU C, BOURIN P, CLAVEL C, CORRE J, BOUSQUET C, TAUREAU C, COUSIN B, ABBALM, LAHARRAGUE P, PENICAUD L, CASTEILLA L, BLANCHERA. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005; **129**: 118–129.
- [35] ROBBELL M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964; **239**: 375–380.
- [36] RODRIGUEZ AM, ELABD C, AMRI, EZ, AILHAUD G, DANI C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005; **87**: 125–128.
- [37] SAFFORD KM, RICE HE. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets* 2005; **6**: 57–62.
- [38] SCHÄFFLER A, BÜCHLER C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; **25**: 818–827.
- [39] SENGENES C, LOLMEDE K, ZAKAROFF-GIRARD A, BUSSE R, BOULOUMIÉ A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005; **205**: 114–122.
- [40] SHI YY, NACAMULI RP, SALIM A, LONGAKER M. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg* 2005; **116**: 1686–1696.
- [41] SMITH P, ADAMS WP JR, LIPSCHITZ AH, CHAU B, SOROKIN E, ROHRICH RJ, BROWN SA. Autologous human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg* 2006; **117**: 1836–1844.
- [42] SONG HY, JEON ES, JUNG JS, KIM JH. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 2357–2365.
- [43] STREM BM, HICOK KC, ZHU M, WULURI I, ALFONSO Z, SCHREIBER RE, FRASER JK, HERDICK MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; **54**: 132–141.
- [44] DE UGARTE DA, ALFONSO Z, ZUK PA, ELBARBARY A, ZHU M, ASHJIAN P, BENHAIM P, HEDRICK MH, FRASER JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; **89**: 267–270.
- [45] DE UGARTE DA, MORIZONO K, ELBARBARY A, ALFONSO Z, ZUK PA, ZHU M, DRAGOO JL, ASHJIAN P, THOMAS B, BENHAIM P, CHEN I, FRASER J, HEDRICK MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; **174**: 101–109.
- [46] WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, FRANKHAUSER M, WIRKNER U, KRAUSE U, BLAKE J, SCHWAGER C, ECKSTEIN V, ANSORGE W, HO AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; **33**: 1402–1416.
- [47] WANG M, CRISOSTOMO P, HERRING C, MELDRUM KK, MELDRUM DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; **291**: R880–R884.
- [48] ZARAGOSI LE, AILHAUD G, DANI C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 2412–2419.
- [49] ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 4279–4295.
- [50] ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7**: 211–228.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.11. 2008 r.

Przyjęto: 17.11. 2008 r.

Warszawski Uniwersytet Medyczny, Centrum Biostruktury

ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa

e-mail: jtruch@ib.amwaw.edu.pl