

Received: 2010.03.16  
Accepted: 2010.06.23  
Published: 2010.07.27

## Wykorzystanie tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych

### Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells

Katarzyna Jezierska-Woźniak<sup>1</sup>, Dorota Nosarzewska<sup>1</sup>, Anna Tutas<sup>1</sup>,  
Anita Mikołajczyk<sup>1</sup>, Michał Okliński<sup>1</sup>, Marek Kajetan Jurkowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Neurobiologii i Anatomii Człowieka, Katedra Neurologii i Neurochirurgii, Wydział Nauk Medycznych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup> Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach

#### Streszczenie

Możliwości wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej i terapii genowej wydają się ogromne. Pozwala na to ich zdolność do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów oraz do różnicowania w wiele linii komórkowych. W inżynierii tkanek pochodzenia mezodermalnego ich najlepiej poznanym źródłem jest szpik kostny. Jednak metody pobierania szpiku kostnego często wymagają rdzeniowego lub całkowitego znieczulenia, a największą wadą jest niewielka liczba otrzymanych komórek mezenchymalnych, około 1 na 10<sup>5</sup> adherentnych komórek łącznotkankowo-naczyniowego zrębu. Alternatywnym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych zrębu, oprócz szpiku kostnego, okostnej, tkanki mięśniowej czy błony stawowej, wydaje się tkanka tłuszczowa. Podobnie jak szpik kostny ma pochodzenie mezodermalne i zawiera heterogenną populację komórek zrębu, a dodatkowym jej atutem jest dostępność i obfitość. Tkanka tłuszczowa pokrywa rozległy obszar naszego ciała. Odgrywa znaczącą rolę przechowując energię dla potrzeb organizmu, a także immunomodulującą, poprzez wydzielanie licznych cząsteczek zwanych adipokinami. Tkanki tłuszczowe zazwyczaj pozyskuje się podczas operacji chirurgicznych okolic brzucha planowanych i laparoskopowych lub liposukcji. Komórki zrębu izolowane z tkanki tłuszczowej wykazują wiele wspólnych cech, włączając zdolność adherencji do plastiku, tworzenie form przypominających kolonie fibroblastów, dużą zdolność proliferacji oraz zdolność do różnicowania w adipocyty, chondrocyty, mioblasty i osteoblasty, a przede wszystkim ekspresję wielu wspólnych antygenów powierzchniowych. Niedawne badania wykazują także ich zdolność do tworzenia form pochodzących z innych listków zarodkowych, na przykład pochodzących z ektodermy neuronów. Celem pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych, na podstawie dotychczas opublikowanych wyników badań.

#### Słowa kluczowe:

mezenchymalne komórki macierzyste • tkanka tłuszczowa • szpik kostny • medycyna regeneracyjna

#### Summary

Enormous expectations are associated with stem cells with regard to cell therapy and tissue engineering. Stem cells have unlimited potential for self-renewal and develop into various cell types. For the mesodermal tissue engineering such a source of cells is the bone marrow stroma. However, isolation of the bone marrow requires general or spinal anesthesia and yields low number

of mesodermal stem cells (MSCs) upon processing (1 MSC per  $10^5$  adherent stromal cells). An alternative source of autologous stem cells seems to be, apart from bone marrow: periosteum, muscular tissue or synovial membrane and adipose tissue. The adipose tissue is derived from the embryonic mesenchyme, contains a large number of stromal stem cells and is relatively easy to obtain in large quantities. It covers a widespread area of human body, and can be classified as white and brown adipose tissue in terms of location and function. Specimens of the adipose tissue are usually obtained from elective, laparoscopic or liposuction surgeries. Stromal stem cells, isolated from this tissue, exhibit characteristics common to mesodermal tissues, including: adherence to plastic, formation of fibroblastic-like colonies, extensive proliferative capacity, ability to differentiate into several mesodermal lineages (including bone, cartilage, muscle and fat), and expression of several common cell surface antigens. Recent evidence suggest that these cells can also form non-mesodermal tissues – neuron-like cells. The aim of this publication is to describe the application of the adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells based on current literature data.

**Key words:** mesenchymal stem cells • adipose tissue • bone marrow • regenerative medicine

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=915330>

**Word count:** 2669

**Tables:** –

**Figures:** 1

**References:** 51

**Adres autorki:** mgr Katarzyna Jezierska-Woźniak Zakład Neurobiologii i Anatomii Człowieka Wydział Nauk Medycznych Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, al. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn; e-mail: katarzyna.jezierska@uwm.edu.pl

## WSTĘP

Możliwości wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej i terapii genowej wydają się ogromne. Pozwala na to ich zdolność do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów oraz do różnicowania w wiele linii komórkowych. Pojęciowo występują dwa główne typy komórek macierzystych – embrionalne komórki macierzyste (embryonal stem cells – ESC) i komórki macierzyste dojrzałych tkanek. ESC charakteryzuje zdolność do totipotencji (blastomery dzielące się zygoty), co oznacza, że mogą się różnicować do każdego typu komórek, łącznie z komórkami tworzącymi łożysko [8] lub pluripotencji (komórki blastocysty) – dają początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu, z wyjątkiem komórek łożyska [32,34]. Jednak mimo odwoływania się do ich ogromnych możliwości, praktyczne wykorzystanie ESC jest ograniczone z powodu potencjalnych problemów regulacji komórkowych, etycznych i regulacji prawnych. W odróżnieniu od nich komórki macierzyste dojrzałych tkanek są immunokompatybilne i nie podlegają etycznym rozważaniom [51]. Komórki te utrzymują szeroki potencjał różnicowania, ale ich potencjał rozwojowy jest bardziej ograniczony niż komórek embrionalnych. Początkowo uważano, że zdolność różnicowania jest ograniczona do tkanki, z której pochodzą (unipotentja). Ostatnie badania jednak dowodzą, że mogą się różnicować w komórki o tym samym pochodzeniu embrionalnym (multipotentja), a w odpowiednich warunkach wykazywać także charakter pluripotentny (ryc. 1).

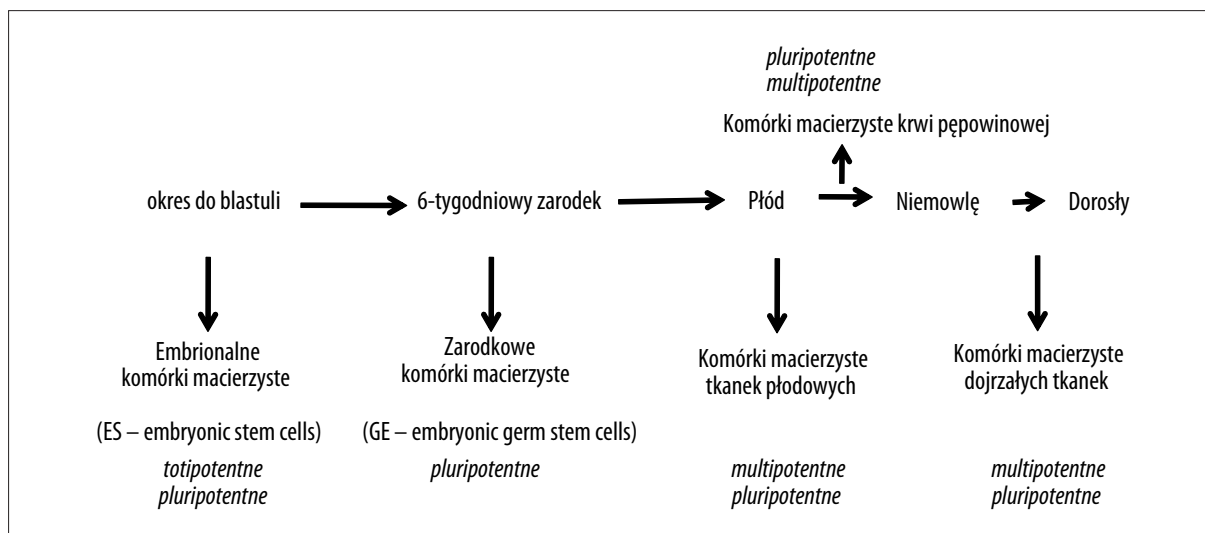
## SZPIK KOSTNY JAKO ŹRÓDŁO MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

W inżynierii tkanek pochodzenia mezodermalnego ich najlepiej poznanym źródłem jest szpik kostny. Ludzki szpik

kostny powstaje z mezodermy i obejmuje populacje hematopoetycznych komórek macierzystych oraz populację komórek mezenchymalnego zrębu [15,16,33,45]. Mechanizmy proliferacji i dyferencjacji hematopoetycznych komórek macierzystych są dokładnie poznane, natomiast wciąż niewiele wiadomo o zrębie. Zrąb szpiku kostnego, zarówno ludzki, jak i zwierzęcy, jest niezwykle heterogenny w swoim składzie. Zawiera wiele różnego rodzaju populacji komórek, włączając populację komórek macierzystych, zwaną mezenchymalną (mesenchymal stem cells – MSC) lub populacją komórek zrębu [5].

Metody pobierania szpiku kostnego często wymagają rdzeniowego lub całkowitego znieczulenia, a największą ich wadą jest niewielka liczba otrzymanych komórek mezenchymalnych, około 1 na  $10^5$  adherentnych komórek łącznotkankowo-naczyniowego zrębu. Z praktycznego punktu widzenia, mała liczba komórek powoduje konieczność hodowli *ex vivo*, by osiągnąć klinicznie odpowiednią ich liczbę. To z kolei wymaga stosowania odpowiednio dobranych surowic, by osiągnąć wzrost komórek, bez utraty ich zdolności do różnicowania. Jest to niezwykle czasochłonne, drogie i znacznie podnosi ryzyko kontaminacji oraz ich śmierci.

Komórki zrębu izolowane z tkanek pochodzenia mezodermalnego wykazują wiele wspólnych cech, włączając zdolność adhezji do plastiku, tworzenie form przypominających kolonie fibroblastów, dużą zdolność proliferacji oraz zdolność do różnicowania w adipocyty, chondrocyty, mio-blasty i osteoblasty, a przede wszystkim ekspresję wielu wspólnych antygenów powierzchniowych [51]. Ostatnie badania wykazują także ich zdolność do tworzenia form pochodzących z innych listków zarodkowych, na przykład pochodzących z ektodermy neuronów. Wydaje się więc, że



Ryc. 1. Pochodzenie i charakter ludzkich komórek macierzystych

komórki zrębu mogą być potencjalnie przydatne dla medycyny regeneracyjnej [39,40,50].

Dotychczasowa charakterystyka MSC była w dużej mierze ograniczona do komórek w hodowli, gdzie wykorzystuje się ich adhezję do plastiku i zdolność proliferacji. Dzieje się tak, ponieważ komórki zrębu są rzadkie i dlatego trudne do izolacji w liczbie wystarczającej do analizy. Tak więc idealne źródło komórek macierzystych powinno być zarówno łatwo dostępne, ograniczające do minimum dyskomfort pacjenta, nienaruszające zdolności komórek do różnicowania, a także na tyle bogate, by nie powodować zbyt niskiej regeneracji w kulturę hodowli [51].

#### CHARAKTERYSTYKA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Alternatywnym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych zrębu, oprócz okostnej, tkanki mięśniowej czy błony stawowej, wydaje się tkanka tłuszczowa. Pokrywa ona rozległy obszar naszego ciała. Odgrywa znaczącą rolę przechowując energię dla potrzeb organizmu, a także immunomodulującą, przez wydzielanie licznych cząsteczek zwanych adipokina-  
mi [42]. W zależności od jej umiejscowienia i funkcji wyróżnia się żółtą i brunatną tkankę tłuszczową. Żółta tkanka tłuszczowa odpowiada głównie za magazynowanie energii, a także wytwarzanie tłuszczów i ich rozkład. Brunatna tkanka tłuszczowa, charakterystyczna tylko dla ssaków, odpowiada przede wszystkim za wytwarzanie ciepła [10].

Podobnie jak szpik kostny, tkanka tłuszczowa ma pochodzenie mezodermalne i zawiera heterogenną populację komórek zrębu, a dodatkowym jej atutem jest dostępność i obfitość. Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej stosunkowo łatwo rozwijają się w hodowli i powoli się starzeją (nawet do 15 i więcej pasażi) [40]. Dodatkowo komórki te w reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (graft-versus-host – GvH) mogą wykazywać właściwości immunosupresyjne [48].

Przynajmniej dwa zjawiska potwierdzają istnienie tłuszczowych komórek macierzystych. Pierwszym z nich jest

wzrost liczby adipocytów w warunkach nadmiaru energii, co potwierdza istnienie komórek adipogennych oprócz tych ostatecznie zróżnicowanych, niemających zdolności do podziałów komórkowych [9]. Drugim dowodem jest to, że pod wpływem tiazolidinedionu dochodzi do pobudzenia receptorów warunkujących różnicowanie adipocytów, wzrasta ekspresja ich genów markerowych, a także zmniejsza się tempo proliferacji komórek tłuszczakomięsa (liposarcoma). Oznacza to, że komórki tłuszczakomięsa powstają z tłuszczowych komórek progenitorowych i mogą podlegać późniejszemu różnicowaniu do czasu, aż nabiorą ostatecznego fenotypu adipocytów [6].

Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej są umiejscowione w jej podścielisku, gdzie panują warunki beztlenowe. Aktywacja czynnika HIF 1 (hipoxia induced factor 1) (czynnik indukowany przez hipoksję 1) pod wpływem warunków beztlenowych odgrywa główną rolę w inhibicji późniejszego różnicowania i pomaga utrzymać komórki w stanie nieróżnicowanym [26].

Źródłem tkanki tłuszczowej są zazwyczaj operacje chirurgiczne okolicy brzucha lub liposukcje. Podczas interwencji laparoskopowych ilość pobranej tkanki jest zazwyczaj niewielka, około 5 g, z kolei biopsja pozwala na pobranie jedynie 1-3 g tkanki, dodatkowo dosyć często zanieczyszczonych komórkami krwi. Częstym miejscem pobrań, zwłaszcza podczas operacji plastycznych, jest też okolica sutkowa. Pozwala na uzyskanie nawet 100 g tkanki, niestety zawierającej dodatkowo tkankę gruczołową. W związku z tym ilość uzyskanych komórek zależy w znacznym stopniu od miejsca, z którego tkanka została pobrana. W przypadku tkanki sutka wydajność wynosi około 300 tys. komórek na gram tkanki, a w przypadku tkanki okolicy brzucha nawet 700 tys. z grama tkanki [14,43].

Pierwsze metody izolacji komórek z tkanki tłuszczowej opracowali już w latach 60. ubiegłego stulecia Rodbell i Jones [36,37]. Homogenizowali oni szczyrki tłuszcz, usuwali komórki hematopoetyczne, a otrzymane fragmenty inkubowali w roztworze kolagenazy, po czym wirowali, by móc oddzielić unoszące się dojrzałe adipocyty od osadu SVF (stromal

vascular fraction). Frakcja SVF wykazująca się dużą heterogennością, zawiera oprócz komórek macierzystych także krążące komórki krwi, fibroblasty, pericyty, komórki śródbłonka. Końcowym etapem było wydzielenie z tej frakcji komórek macierzystych, wykorzystując ich naturalną zdolność adhezji do plastiku [36,37]. Procedura ta ulegała zmianom wraz z rozwojem operacji liposukcji. Chirurgi, używając kaniuli ssących, zasysają tkankę bezpośrednio do roztworu zawierającego anestetyk i/lub epinefrynę. Pozwala to na uzyskiwanie rozdrobionych fragmentów, których wielkość zależy od średnicy użytej kaniuli. Operacje liposukcji są dobrze tolerowane i niosą niewielkie ryzyko powikłań, około 0,1% [20]. Pobieranie tkanki tym sposobem nie ma bezpośredniego wpływu na przeżywalność komórek (98–100% przeżywalności). Z kolei wykorzystanie ultradźwięków do pobrania tkanki, zmniejsza liczbę uzyskanych komórek, a także obniża ich zdolność do proliferacji [32].

By nazwać populację komórek macierzystych izolowaną z tkanki tłuszczowej po trawieniu kolagenazą stworzono wiele nazw. Do najczęściej używanych należą ASCs – adipose-derived stem/stromal cells, ADAS – adipose derived adult stem, ADSC – adipose derived stroma cells, ASC – adipose stroma cells, AdMSC – adipose mesenchymal stem cells, lipiblasty, pericyty, pre-adipocyty, czy PLA – processed lipoaspirate cells. Aby ujednoczyć nazewnictwo International Fat Applied Technology Society zdecydowało przyjąć termin „adipose-derived stem cells” (ASCs) za właściwy dla komórek macierzystych tkanki tłuszczowej. Pozwala to na odróżnienie ASCs od adherentnych komórek macierzystych/komórek progenitorowych szpiku kostnego, mezenchymalnych komórek macierzystych i multipotentnych mezenchymalnych komórek zrębu (MSCs) [17].

By potwierdzić, czy komórki otrzymane po trawieniu kolagenazą są komórkami macierzystymi, przeprowadza się charakterystykę molekularną i biochemiczną. Komórki te zawierają wiele markerów antygenowych podobnych do obserwowanych w populacji komórek mezodermalnych. Indukcja komórek skutkuje ekspresją licznych, charakterystycznych dla danej linii genów i białek, podobnych do tych obserwowanych w indukowanych komórkach MSC i tych komórkach, które rozwijają się w określonej linii [50].

Ludzkie ASC mają fenotyp immunologiczny podobny do komórek macierzystych szpiku kostnego. Markery powierzchniowe wspólne dla komórek ASC i komórek macierzystych zrębu szpiku to: CD9 (białko tetraspan), CD10 (neuralna endopepsyda), CD13 (aminopeptyda), CD29 (integryna  $\beta$ 1), CD49d (integryna  $\alpha$ 4), CD44 (receptor kwasu hialuronowego), CD54 (ICAM-1, cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1), CD55 (czynnik przyspieszający rozkład), CD59 (układ dopełniacza), CD71 (receptor transferyny), CD73 (ekto-5-nucleotyda), CD90 (Thy-1), CD105 (endoglin), CD106 (cząsteczka adhezji komórkowej naczyń), CD144 (VE- kadheryna), CD146 (MUC-18), CD166 (cząsteczka adhezji komórek aktywowana limfocytami; ALCAM),  $\alpha$  aktywna mięśni gładkich, wimentyna, markery hematopoetyczne CD14, CD31 i CD45, oraz VEGFR-2 (receptor czynnika wzrostu nabłonka naczyń) i białka I klasy głównego układu zgodności tkankowej HLA-ABC. Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej nie zawierają natomiast markerów CD11b (integryna  $\alpha$ b), CD18 (integryna  $\beta$ 2), CD50 (ICAM-3, cząsteczka adhezji

międzykomórkowej 3), CD56 (NCAM, cząsteczka adhezji komórek nerwowych), CD62 (selektyna E), CD104 (integryna  $\alpha$ 4), CD16 (receptor Fc) oraz białka II klasy głównego układu zgodności tkankowej [13,18,50].

Różnice obserwowano w ekspresji dwóch markerów – komórki ASC były pozytywne dla CD49d i negatywne dla CD106, podczas gdy w przypadku komórek MSCs sytuacja przedstawia się odwrotnie. Ekspresję CD106 potwierdzono w komórkach zrębu szpiku kostnego, gdzie funkcjonalnie jest związana z hematopoezą. Brak tego markera w komórkach ASC jest zgodny z ich lokalizacją w tkance niezwiązanej z hematopoezą [50].

Mimo różnic w metodach izolacji i prowadzenia hodowli, występuje duża zgodność przedstawionych wyników analizowanych markerów charakteryzujących omawiane komórki, a niektóre pojawiające się rozbieżności wynikają z możliwości zmian markerów w wyniku pasażu i czasu trwania hodowli. Po dwóch lub więcej udanych pasażach na komórkach ASC, ekspresji ulegają markery charakterystyczne dla adhezji i receptory komórkowe, enzymy powierzchniowe, białka cytoszkieletu i białka charakterystyczne dla komórek zrębu. Bezpośrednie porównanie między immunofenotypami ludzkich ASC i MSC wykazuje, że są one w 90% jednakowe [50].

Poziom ekspresji markerów hematopoetycznych komórek macierzystych (CD11, CD14, CD45 i CD34) wśród komórek SVF maleje lub zanika wraz z kolejnymi pasażami, co sugeruje, że adhezja do plastiku i dalszy rozwój pozwala uzyskać względnie homogeną populację w porównaniu z frakcją SVF. Poziom ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek zrębu – CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 i CD166, jest początkowo niski dla komórek SVF, a wzrasta znacząco wraz z liczbą pasażu. Markery komórek śródbłonka – CD31, CD144 i VEGFR-2 są obecne na komórkach SVF i nie ulegają znaczącym zmianom w czasie pasażowania. Natomiast wysoki poziom ekspresji glikoproteiny CD34 występuje wśród komórek SVF i ASC w czasie początkowych pasażu, malejąc podczas trwania kultury. Glikoproteina ta nie jest natomiast obecna w populacji komórek MSC [29].

Identyfikacja markerów powierzchniowych ASC stwarza możliwość izolacji populacji komórek macierzystych bezpośrednio z heterogennej frakcji SVF. Wykorzystuje się w tym celu zarówno cytometrię przepływową, jak i immunomagnetyczne kulki, zarówno do pozytywnej, jak i negatywnej selekcji. Na przykład komórki progenitorowe śródbłonka mogą zostać usunięte przez negatywną selekcję ekspresji markera CD31 lub cząsteczki adhezji komórek śródbłonka płytek krwi. Analogicznie pozytywną selekcję przeprowadza się na przykład dla glikoproteiny CD34, której obecność wskazuje na występowanie ASC [17].

### ZDOLNOŚĆ RÓZNICOWANIA KOMÓREK ASC

Wiele badań dowodzi, że komórki macierzyste otrzymane z tkanki tłuszczowej utrzymują zdolność do różnicowania w kierunku komórek tłuszczowych [17,18,50,51], kostnych [11,19,22,49], chrzęstnych [41,51] i mięśniowych [38] oraz wykazują ogromny potencjał naczyniotwórczy [35], zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

## Chondrogeneza

Różnicowanie w chrząstkę wymaga dużej gęstości kultury (micromass), co zapewnia komórkom odpowiednią komunikację i przekaz informacji. Jednym z modeli takich hodowli jest hodowla w mikrogrudkach (micropellets). Takie warunki hodowli naśladują zagęszczenie pierwotnej chrząstki podczas rozwoju embrionalnego, prowadzące do wzrostu interakcji między komórkami i wytwarzania macierzy międzykomórkowej [46]. Kultura jednowarstwowa (monolayer) prowadzi do utraty fenotypu chrząstkowego, co przejawia się wzrostem ekspresji kolagenu typu X, charakterystycznego dla przerosniętych chondrocytów oraz zmniejszeniem ekspresji charakterystycznego dla chrząstki kolagenu typu II. Rozwiązaniem jest hodowla typu przestrzennego (3D – three-dimensional) [25]. Taki model hodowli naśladuje stan fizjologiczny w organizmie. By stworzyć takie warunki stosuje się wiele materiałów, stanowiących rusztowanie – sztuczną macierz międzykomórkową dla rozwijających się komórek, m.in. agarozę, alginian, żelatynę, fluoropolimery, PLGA (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)) [1,2,4,7,27].

Pożywka hodowli przyszłych chondrocytów wzbogacona jest także o insulinę, TGF- $\beta$ , deksametazon, czy askorbinian [41,51]. Istotna dla prawidłowego rozwoju komórek w chondrocyty okazuje się także obecność tlenu w hodowli. Wykazano, że środowisko o obniżonej zawartości tlenu odgrywa ważną rolę w regulacji proliferacji i metabolizmu ASC podczas procesu różnicowania. Kontrolując zawartość tlenu w środowisku możemy wpływać na akumulację makromolekuł macierzy międzykomórkowej. Zarówno mała (5%), jak i duża (20%) zawartość tlenu w hodowli może zwiększać wytwarzanie kolagenu typu II, jednak 20% stężenie tlenu powoduje także istotne zwiększenie koncentracji kolagenu typu X [44]. Z kolei z innych badań wynika, że zawartość tlenu w środowisku wpływa hamująco na proces chondrogenyzy, przy czym 2% tlenu obniża przebieg procesu dużo więcej niż 21% [28].

Stwierdzenie, które komórki ASC czy MSC są bardziej wydajne do otrzymywania chrząstki w warunkach *in vitro* ciągle pozostaje sporne. De Ugarte [12] wraz z zespołem analizowali obie populacje komórek otrzymane od tego samego pacjenta i wykazali, że komórki tkanki tłuszczowej wykazują podobny do komórek MSC potencjał w chondrogenyzy. Z kolei wyniki pracy zespołu Wintera [47] nie wykazują istotnych różnic w zdolności komórek ASC i MSC do różnicowania w kierunku chrząstki. Natomiast z prac zespołów Huanga [21] i Wickhama [46] wynika mniejsza zdolność komórek ASC do chondrogenyzy niż komórek otrzymanych ze szpiku kostnego.

Należy jednak pamiętać, że zdolność komórek ASC do różnicowania w określone linie komórkowe zmienia się w zależności od umiejscowienia anatomicznego tkanki, z którego zostały pobrane. Komórki z trzewnej tkanki tłuszczowej, włóknistej błony maziowej i tłuszczowej tkanki maziowej dużo łatwiej ulegają indukcji w różne linie komórkowe niż komórki z podskórnej tkanki tłuszczowej [30].

## Osteogeneza

Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej różnicującej w osteoblasty mogłyby być wykorzystywane klinicznie

w przypadku nieprawidłowego zrośnięcia się kości po złamaniu, braku zrostu, czy wspomagać przeszczep tkanki kostnej. Jest to możliwe w obecności pewnych czynników. Jednym z nich, wspomagającym osteogenezę w warunkach *in vitro* i wykorzystywanym w wielu badaniach, jest deksametazon, chociaż jego dokładny mechanizm działania nie jest jeszcze poznany [17]. Zuk i wsp. zamiast niego wykorzystali 1,25-dihydroksywitaminę D3 [51]. Niezbędny jest również kwas askorbinowy, którego funkcja polega na hydroksylacji kolagenowej proliny i lizyny oraz wroście syntezy białek macierzy kości niezwiązanej z kolagenem, a także  $\beta$ -glicerofosforan, którego znaczenie jest zasadnicze w procesie wapnienia i mineralizacji substancji zewnątrzkomórkowej. Dlatego medium do procesu osteogenezy jest uzupełniane pochodnymi askorbinianów i  $\beta$ -glicerofosforanem, deksametazonem lub witaminą D [17,50,51]. Komórki ASC mineralizują macierz międzykomórkową i wykazują wzrost ekspresji osteokalcyny i fosfatazy zasadowej [22]. W takich warunkach obserwuje się ekspresję genów i białek właściwych dla fenotypu osteoblastów – fosfatazę zasadową, kolagen typu I, osteospontynę, osteonektynę, osteokalcynę, BMP (bone morphogenetic proteins) i inne. Tak jak w przypadku chondrogenyzy, stosuje się hodowle typu 3D, mające za zadanie stworzyć warunki przestrzenne dla prawidłowej osteogenezy [30,50].

## Lipogeneza

Linia ASC hodowana w pożywce adipogennej, powoduje ekspresję wielu markerów właściwych dla adipocytów i swoistych dla nich wakuol tłuszczowych. Najbardziej istotnym środkiem pobudzającym adipogenezę, wydaje się insulina i glikokortykosteroidy. Pierwszym z etapów tego procesu *in vitro* jest pobudzenie przez IGF-1 (insulinozależny czynnik wzrostu 1). Wzrost glikokortykoidów, insuliny i kwasów tłuszczowych, zarówno we wczesnej, jak i późnej fazie różnicowania jest istotny dla tego procesu [23]. Otrzymane tą metodą komórki klinicznie wykorzystuje się do wypełniania ubytków tkanek miękkich po zabiegach chirurgicznych, na przykład mastektomii [3].

## Miogeneza

Hodowla ASC w pożywce zawierającej 5% surowicę końską i glikokortykoidy deksametazon i/lub hydrokortyzon skutkuje ekspresją genów właściwą dla miogenezy – ASMA, kalponiny, kaldesmonu, SM22, MHC, łańcucha ciężkiej miozyny mięśni gładkich oraz fuzją komórek i formowaniem wielojądrowych miotubuli. Wykazują one zdolność do kurczenia się i rozkurczania pod wpływem karbacholu i atropiny [38].

## Zdolność różnicowania komórek ASC w formy niemezodermalne

Początkowo sądzono, że różnicowanie komórek macierzystych tkanki tłuszczowej, mającej pochodzenie mezodermalne w komórki tkanek o innym pochodzeniu, wydaje się mało prawdopodobne. Jednak indukcja komórek macierzystych uzyskanych z tkanki tłuszczowej, przez dodanie do pożywki kwasu walpronowego, butylohydroksyanizolu, insuliny i hydrokortyzonu, powoduje zmiany w morfologii komórek w neurony. Po prawie 30 minutach, około

10% komórek przypomina fenotypowo komórki nerwowe. Ciała komórek stają się bardziej kuliste, a z upływem czasu ich wypustki wytwarzają drugorzędowe rozgałęzienia. Po 3 godzinach 70% komórek przybiera opisany fenotyp, natomiast dalsza indukcja nie przynosi już żadnych znaczących zmian [50]. Opisanym zmianom towarzyszy również ekspresja markerów charakterystycznych dla tkanki nerwowej, takich jak nestyna, NSE (neuron specific enolase), białko swoiste dla neuronów (NeuN), Map2, filamenty pośrednie, tubulina  $\beta$ -III, podjednostka NR1 i NR2 receptora glutaminianowego, marker oligodendrocytów S-100 i inne. Ich obecność potwierdza się wykorzystując RT-PCR, metody immunohistochemiczne czy western blotting [39,40]. Ponadto komórki macierzyste tkanki tłuszczowej wykazują zdolność różnicowania w kardiomiocyty i komórki śródbłonna naczyń [17,23].

## PIŚMIENICTWO

- [1] Awad H.A., Wickham M.Q., Leddy H.A., Gimble J.M., Guilak F.: Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 2004; 25: 3211–3222
- [2] Betre H., Ong S.R., Guilak F., Chilkoti A., Fermor B., Setton L.A.: Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials*, 2006; 27: 91–99
- [3] Brey E.M., Patrick C.W. Jr.: Tissue engineering applied to reconstructive surgery. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.*, 2000; 19: 122–125
- [4] Burks C.A., Bundy K., Fotuhi P., Alt E.: Characterization of 75:25 poly(l-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) thin films for the endoluminal delivery of adipose-derived stem cells to abdominal aortic aneurysms. *Tissue Eng.*, 2006; 12: 2591–2600
- [5] Caplan, A.L.: Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 1991; 9: 641–650
- [6] Chen J.H., Enloe B.M., Weybright P., Campbell N., Dorfman D., Fletcher C.D., Cory D.G., Singer S.: Biochemical correlates of thiazolidinedione-induced adipocyte differentiation by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Med.*, 2002; 48: 602–610
- [7] Clavijo-Alvarez J.A., Rubin J.P., Bennett J., Nguyen V.T., Dudas J., Underwood C., Marra K.G.: A novel perfluoroelastomer seeded with adipose-derived stem cells for soft-tissue repair. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2006; 118: 1132–1142
- [8] Cogle C.R., Guthrie S.M., Sanders R.C., Allen W.L., Scott E.W., Petersen B.E.: An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin. Proc.*, 2003; 78: 993–1003
- [9] Cornelius P., MacDougald O.A., Lane M.D.: Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.*, 1994; 14: 99–129
- [10] Cousin B., Casteilla L., Dani C., Muzzin P., Revelli J.P., Penicaud L.: Adipose tissues from various anatomical sites are characterized by different patterns of gene expression and regulation. *Biochem. J.*, 1993; 292: 873–876
- [11] Cui L., Liu B., Liu G., Zhang W., Cen L., Sun J., Yin S., Liu W., Cao Y.: Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials* 2007; 28: 5477–5486
- [12] De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., Dragoo J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M.H.: Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 2003; 174: 101–109
- [13] Festy F., Hoareau L., Bes-Houtmann S., Péquin A.M., Gonthier M.P., Munstun A., Hoarau J.J., Césari M., Roche R.: Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 2005; 124: 113–121
- [14] Fraser J.K., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z.: Adipose-derived stem cells. *Methods Mol. Biol.*, 2008; 449: 59–67
- [15] Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F., Keiliss-Borok I.V.: Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*, 1974; 17: 331–340
- [16] Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P.: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968; 6: 230–247
- [17] Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell B.A.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.*, 2007; 100: 1249–1260
- [18] 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: 54–63
- [19] Hicok K.C., Du Laney T.V., Zhou Y.S., Halvorsen Y.D., Hitt D.C., Cooper L.F., Gimble J.M.: Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid *in vivo*. *Tissue Eng.*, 2004; 10: 371–380
- [20] Housman T.S., Lawrence N., Mellen B.G., George M.N., Filippo J.S., Cerveny K.A., DeMarco M., Feldman S.R., Fleischer A.B.: The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol. Surg.*, 2002; 28: 971–978
- [21] Huang J.L., Kazmi N., Durbhakula M.M., Hering T.M., Yoo J.U., Johnstone B.: Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J. Orthop. Res.*, 2005; 23: 1383–1389
- [22] Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B.: Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 2005; 13: 845–853
- [23] Jumabay M., Matsumoto T., Yokoyama S., Kano K., Kusumi Y., Masuko T., Mitsumata M., Saito S., Hirayama A., Mugishima H., Fukuda N.: Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2009; 47: 565–575
- [24] Lee J.A., Parrett B.M., Conejero J.A., Laser J., Chen J., Kogon A.J., Nanda D., Grant R.T., Breitbart A.S.: Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann. Plast. Surg.*, 2003; 50: 610–617
- [25] Leong D.T., Khor W.M., Chew F.T., Lim T.C., Hutmacher D.W.: Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments. *Cells Tissues Organs*, 2006; 182: 1–11
- [26] Lin Q., Lee Y.J., Yun Z.: Differentiation arrest by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 30678–30683
- [27] Malafaya P.P., Pedro A.J., Peterbauer A., Gabriel C., Redl H., Reis R.L.: Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2005; 16: 1077–1085
- [28] Malladi P., Xu Y., Chiou M., Giaccia A.J., Longaker M.T.: Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2006; 290: C1139–C1146
- [29] Mitchell J.B., McIntosh K., Zvonice S., Garret S., Floyd Z.E., Kloster A., Di Halvorsen 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: 376–385

## WNIOSKI

W przyszłości wykorzystanie komórek macierzystych pochodzenia mezodermalnego jest wielce prawdopodobne, jednak dalszy rozwój tej technologii wymaga znalezienia łatwo dostępnego ich źródła. W przeciwieństwie do metod pobierania szpiku kostnego, pobranie komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej jest dużo prostsze. Poza tym w tej tkance występuje znacznie więcej mezenchymalnych komórek macierzystych niż w szpiku. Autologiczne pochodzenie tych komórek, wraz z ich możliwością różnicowania w linie o pochodzeniu zarówno mezodermalnym, jak i z innych listków zarodkowych, czynią je doskonałym materiałem do rozwoju terapii komórkowej.

- [30] Mochizuki T., Muneta T., Sakaguchi Y., Nimura A., Yokoyama A., Koga H., Sekiya I.: Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 843–853
- [31] Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A.: Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001; 19: 193–204
- [32] Oedayrasingh-Varma M.J., van Ham S.M., Knippenberg M., Helder M.N., Klein-Nulend J., Schouten T.E., Ritt M.J., van Milligen F.J.: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*, 2006; 8: 166–177
- [33] Paul S.R., Yang Y.C., Donahue R.E., Goldring S., Williams D.A.: Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood*, 1991; 77: 1723–1733
- [34] Pera M.F., Reubinoff B., Trounson A.: Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.*, 2000; 113: 5–10
- [35] Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Claus S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L.: Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 2004; 109: 1292–1298
- [36] Rodbell M.: Metabolism of isolated fat cells. 1. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, 1964; 239: 375–380
- [37] Rodbell M., Jones A.B.: Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens*  $\alpha$  toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J. Biol. Chem.*, 1966; 241: 140–142
- [38] Rodríguez L.V., Alfonso Z., Zhang R., Leung J., Wu B., Ignarro L.J.: Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 12167–12172
- [39] 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: 371–379
- [40] Safford K.M., Safford S.D., Gimble J.M., Shetty A.K., Rice H.E.: Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp. Neurol.*, 2004; 187: 319–328
- [41] Tapp H., Hanley E.N.Jr., Patt J.C., Gruber H.E.: Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp. Biol. Med.*, 2009; 234: 1–9
- [42] Trayhurn P., Wood I.S.: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, 2004; 92: 347–355
- [43] van Harmelen V., Skurk T., Hauner H.: Primary culture and differentiation of human adipocyte precursor cells. *Methods Mol. Med.*, 2005; 107: 125–135
- [44] Wang D.W., Fermor B., Gimble J.M., Awad H.A., Guilak F.: Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J. Cell. Physiol.*, 2005; 204: 184–191
- [45] Werts E.D., DeGowin R.L., Knapp S.K., Gibson D.P.: Characterization of marrow stromal (fibroblastoid) cells and their association with erythropoiesis. *Exp. Hematol.*, 1980; 8: 423–433
- [46] Wickham M.Q., Erickson G.R., Gimble J.M., Vail T.P., Guilak F.: Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2003; 412: 196–212
- [47] Winter A., Breit S., Parsch D., Benz K., Steck E., Hauner H., Weber R.M., Ewerbeck V., Richter W.: Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.*, 2003; 48: 418–429
- [48] Yanez R., Lamana M.L., Garcia-Castro J., Colmenero I., Ramírez M., Bueren J.A.: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 2006; 24: 2582–2591
- [49] Yoon E., Dhar S., Chun D.E., Gharibjanian N.A., Evans G.R.: *In vivo* osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid construct for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.*, 2007; 13: 619–627
- [50] Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.J., 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: 4279–4295
- [51] 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: 211–228

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.