

Matične celice iz maščobnega tkiva in njihova uporaba

Stem cells from adipose tissue and their use

Ariana Barlič, Krešimir Božikov

Povzetek: Podkožno maščobno tkivo predstavlja privlačen vir predniških celic predvsem zaradi svoje lahke dostopnosti, obilnosti in sposobnosti samoobnavljanja. Izvira iz mezodermalne klične linije in vsebuje stromalno vaskularno frakcijo (SVF – Stromal Vascular Fraction) celic, ki jo zlahka izoliramo. Ta heterogena populacija celic vsebuje poleg endotelijskih celic, gladko-mišičnih celic, pericitov, levkocitov in pre-adipocitov, tudi populacijo multipotentnih mezenhimskih matičnih celic imenovanih matične celice iz maščobnega tkiva (ASC – Adipose-derived Stem Cells). ASC imajo sposobnost diferenciacije v celične linije mezodermalnega izvora t.j. v adipocite, osteoblaste, hondrocite in miocite. Interes za uporabo ASC v medicini strmo narašča zaradi njihove sposobnosti razmnoževanja in diferenciacije *in vitro* pogojih. Adipogen potencial ASC bi lahko izkoristili za rekonstrukcije mehkih tkiv. Osteogen potencial bi lahko izkoristili pri težko celečih se zlomih kosti. Z uspešno hondrogeno diferenciacijo bi lahko z ASC zdravili poškodbe hrustanca in artritis. Raziskave kažejo, da delujejo tudi imunosupresivno, kar bi lahko izrabili za zdravljenje različnih avtoimunskih bolezni. Kljub velikemu potencialu za uporabo ASC v klinične namene se je potrebno zavedati, da ostaja odprtih še veliko pomembnih znanstvenih in medicinskih vprašanj. V preglednem prispevku podajamo najnovejša dognanja na področju ASC in primere njihove uporabe v kliniki.

Ključne besede: maščobno tkivo; mezenhimske matične celice; diferenciacijski potencial; regenerativna medicina

Abstract: Subcutaneous adipose tissue represents an attractive source of progenitor cells due to its easy availability, abundance and the ability of self-renewal. It originates from mesodermal cell layer and contains stromal-vascular cell fraction (SVF), which can be easily isolated. This heterogeneous population of cells contains endothelial cells, smooth-muscle cells, pericytes, leukocytes, pre-adipocytes, and a population of multipotent mesenchymal stem cells, named adipose-derived stem cells (ASC). ASC have the ability to differentiate into cells of mesodermal origin – adipocytes, osteoblasts, chondrocytes and myocytes. Because of their high proliferative rate and differentiation capability in *in vitro* conditions, interest for their use in medicine is increasing rapidly. Adipogenic potential may have many uses in soft-tissue reconstruction. Their osteogenic potential could aid repair bone non-union fractures. If successful chondrogenesis could be achieved, ASC could be used to treat cartilage lesions and arthritic joints. According to recent investigations ASC possess immunosuppressive characteristics. Therefore, different autoimmune diseases could be treated. However, despite the initial enthusiasm over their use for clinical purposes, many scientific and medical issues still need to be resolved. In this review we summarize the latest findings about ASC and examples of their clinical use.

Key words: fat tissue; mesenchymal stem cells; differentiation potential; regenerative medicine

1 Uvod

Kostni mozeg je do nedavnega predstavljal glavni vir odraslih matičnih celic. Poleg hematopoetskih matičnih celic vsebuje mozeg tudi predhodnike stromalnih celic, ki jih imenujemo mezenhimske matične celice (MSC - Mesenchymal Stem Cells). Te multipotentne celice imajo pri ustreznih pogojih gojenja sposobnost diferenciacije v celice mezodermalnih tkiv, kot so skeletne mišice, kost, hrustanec in maščobno tkivo (1). MSC so v središču znanstvene pozornosti predvsem zaradi svojega kliničnega potenciala za potrebe regenerativne medicine in drugih celičnih terapij. Nahajajo se v skoraj vseh do sedaj testiranih tkivih organizma. Poleg kostnega mozga in popkovnične krvi predstavlja najpomembnejši alternativni vir MSC maščobno tkivo (2). V primerjavi z aspiracijo kostnega mozga je sam

kirurški postopek pridobivanja maščobnega tkiva manj invaziven. Poleg tega lahko pridobimo tudi večje količine izhodiščnega materiala z večjim številom predhodniških celic, saj ima večina odraslih ljudi razvitega sveta višek podkožnega maščevja. V estetski kirurgiji je liposukcija najpogostejši operativni poseg, kjer naenkrat odstranimo tudi več litrov maščobe. Kot bo opisano kasneje, so MSC iz maščobnega tkiva, imenovane ASC, multipotentne in predstavljajo potencial za velik obseg terapevtskih aplikacij. Poleg krvodajalcev, ki darujejo kri, bi lahko v prihodnosti pacienti, po opravljeni liposukciji lipoaspirat darovali kot »maščobodajalci«. Poleg avtologne uporabe (celice odvzete in uporabljene pri isti osebi) je potencial ASC tudi v pripravi alogenskih presadkov (celice odvzete eni osebi in uporabljene pri drugi osebi), saj kaže, da imajo te celice imunosupresivne lastnosti. Ugotovili so, da ASC v *in vitro* pogojih ne

izzovejo aloreaktivnosti nekompatibilnih limfocitov. Poleg tega zavirajo reakcijo mešanih limfocitov (MLR - Mixed Lymphocyte Reaction) ter z mitogeni stimulirano razmnoževanje limfocitov (3, 4). Glede na rezultate študije izvedene na miših lahko z ASC nadziramo tudi bolezen presadka proti dajalcu (GvHD – Graft-versus-Host-Disease), ki nastane kot reakcija na alogensko presaditev kostnega mozga (5). Alogenska uporaba celic odstira torej nove perspektive klinične uporabe ASC.

2 Pridobivanje matičnih celic iz maščobnega tkiva

Maščobno tkivo je sestavljeno iz zrelih adipocitov, preadipocitov, fibroblastov, celic gladkih mišic žil, endotelijskih celic, monocitov, makrofagov in limfocitov. SVF maščobnega tkiva je vedno bolj v središču pozornosti raziskav, ker predstavlja bogat vir ASC (6).

Zaradi velike zmede v sami terminologiji (adipocitne prekursorke celice, preadipociti, odrasle matične celice iz maščobe (ADAS – adipose tissue-derived adult stem cells), stromalne celice iz maščobe, procesirane lipoaspiratne celice (PLA – processed lipoaspirate cells),...) so leta 2004 na drugem zasedanju IFATS (International Fat Applied Technology Society) sklenili, da te celice imenujemo matične celice iz maščobnega tkiva – ASC (adipose-derived stem cells). Termin se nanaša na populacijo izoliranih celic, ki so sposobne pritrjevanja na plastične površine (gojilne posode) in ohranjajo multipotentno sposobnost diferenciacije.

Na izkoristek izolacije matičnih celic iz maščobnega tkiva vpliva veliko dejavnikov:

- starost in debelost donorja

Povečan BMI (body mass index) korelira z manjšanjem izkoristka izolacije matičnih celic na gram maščobnega tkiva. Prav tako je povečan BMI povezan s slabo sposobnostjo diferenciacije celic (7). Staranje naj ne bi vplivalo na število celic ampak naj bi se odražalo na njihovi zmanjšani sposobnosti za proliferacijo in diferenciacijo (8).

- mesto odvzema tkiva

Narejenih je več študij, vendar na to vprašanje ni dokončnega odgovora, saj imata izhodiščna velikost biopsije in metoda izolacije stromalne vaskularne frakcije močan vpliv na končno število izoliranih celic (9). V glavnem velja, da je idealen vir maščobnega tkiva za izolacijo matičnih celic podkožna trebušna maščoba mlajše, nedebele ženske.

- način odvzema

Maščobo lahko odstranimo z izrezanjem ali liposukcijo. Liposukcijo so prvi pričeli uporabljati v Franciji. Metoda se je hitro razširila po vsem svetu (10). Študije kažejo, da je količina preadipocitov pridobljenih z liposukcijo večja kot pri izrezani maščobi (11). Tehniko liposukcije ter način procesiranja maščobe pred ponovnim avtolognim vbrizgavanjem (liposkulpturiranje), ki omogoča visoko preživetje celic, je opisal Coleman (12). Z uporabo 2 ali 3 mm kanule in negativnim podtlakom, ki ga dosežemo s pomočjo 10 ml brizge kar najmanj poškodujemo celice v lipoaspiratu. Lipoaspirat je tudi bolj kontaminiran z drugimi tipi celic (endotelijske celice, fibroblasti,...) kot

odrezan kos maščobe, kar s stališča priprave ožiljenega tkivno inženirskega pripravka predstavlja dodatno prednost. Večji tkivno inženirski pripravki morajo biti namreč ožiljeni, da se celice v notranjosti nosilca lahko prehranjujejo (13).

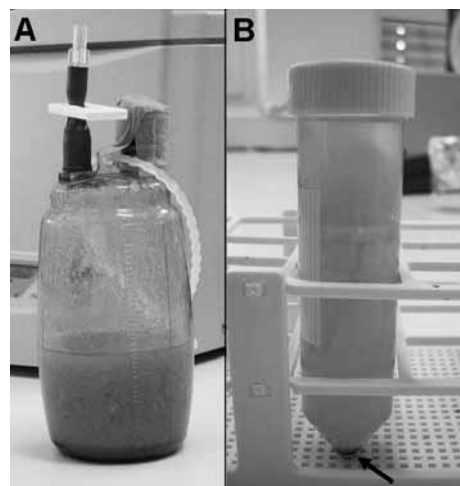
- shranjevanje tkiva pred izolacijo

Običajno je od odvzema tkiva in izolacije celic nek časovni zamik, ki vpliva na izkoristek celic. Po enodnevnem hranjenju vzorca v hladilniku je preživetje celic v aspiratu liposukcije bistveno boljše kot pri odrezani maščobi (11).

- izolacija celic in nasajevanje

Prvi korak izolacije celic iz lipoaspirata je razgradnja tkiva s kolagenazo tipa I. Pri odrezanem kosu maščobe moramo le-to najprej narezati na manjše koščke in šele nato encimsko obdelati. Po inaktivaciji encima suspenzijo filtriramo, da odstranimo nerazgrajeno tkivo. Vzorec centrifugiramo in dobimo SVF kot pelet celic na dnu centrifugirne posode, ki je dobro ločen od plavajoče plasti prostih lipidov in skoraj homogene populacije zrelih adipocitov (14).

Izolirane celice SVF se nasadijo v gojilno posodo, kjer se zelo hitro pritrldijo. Celice za rast in razmnoževanje potrebujejo gojilni medij z dodatkom seruma, ki je človeškega ali živalskega izvora. Ko celice prerastejo približno 80% dna gojilne posode, jih presadimo v novo, večjo posodo. Po potrebi lahko celice zamrznemo v tekočem dušiku, pri čemer se njihova sposobnost razmnoževanja in diferenciacije ohrani (15).



Slika 1: Vzorec lipoaspirata (A) in vzorec po obdelavi v laboratoriju; s puščico je označen pelet izoliranih celic – SVF (B).

Figure 1: Lipoaspirate sample (A) and sample after treatment in laboratory; an arrow points to pellet of isolated cells – SVF (B).

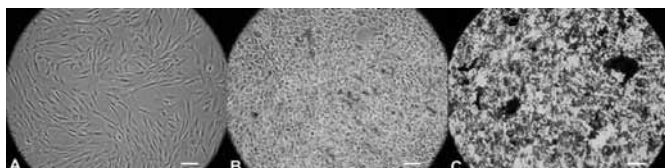
3 Diferencijski potencial ASC

Eksperimentalni podatki *in vitro* ter *in vivo* študij kažejo na multipotentnost ASC ljudi in drugih živalskih vrst.

V *in vitro* pogojih je pod vplivom različnih kemijskih dejavnikov in rastnih faktorjev diferenciacija matičnih celic iz maščobnega tkiva v

mezodermalne celične linije, kot so adipociti, hondrociti, skeletni miociti in osteoblasti, relativno enostavna (14). Nekateri raziskovalci opisujejo tudi njihovo sposobnost diferenciacije v celične linije ekto- in endodermalnega tipa kot so neuroni in Schwannove celice (16, 17), hepatociti (18), pankreatične celice (19) in endoteljske celice (13).

Zaradi sposobnosti diferenciacije v tako različne celične tipe so matične celice iz maščobnega tkiva potencialno uporabne v klinične namene za zdravljenje najrazličnejših stanj. Sposobnost diferenciacije ASC v adipocite bi lahko izrabili za rekonstrukcijo mehkih tkiv dojke ter drugih defektov, ki so nastali kot posledica različnih poškodb, kirurške odstranitve tkiva ali opeklin. Hondrogen potencial celic bi lahko izkoristili za popravilo hrustančnega tkiva v sklepih in medvretenčni ploščici, ter za rekonstrukcijo ušesnih in nosnih defektov. Z diferenciacijo ASC v kostne celice bi lahko popravljali poškodbe kostnih defektov, ki so posledica prirojenih napak ali različnih poškodb in tumorjev. Ob uspešni diferenciaciji v celične linije endo- in ektodermalnega tipa bi bile ASC primerne za zdravljenje širokega spektra najrazličnejših bolezenskih stanj kot so npr. regeneracija srčne mišice, ishemične bolezni žilja, poškodbe možgan in perifernih živcev, diabetes tipa 1, kronična odpoved jeter,... (6). Pri tem se je potrebno zavedati, da je v večini primerov do dejanske uporabe v klinični praksi še daleč. Odprtih je namreč še veliko pomembnih nerešenih znanstvenih in medicinskih vprašanj. Odkriti je potrebno ključne molekularne poti in mehanizme, ki usmerjajo ASC v določeno celično linijo, zagotoviti njihovo migracijo v poškodovano tkivo ali organ v *in vivo* okolju, preprečiti možno spontano transformacijo celic v organizmu ter v končni fazi postaviti temelje za proizvodni proces, ki bo zagotavljal ustrezno kvaliteto pridobljenih celic v skladu z zahtevami dobre proizvodne prakse (GMP) (6, 20, 21).



Slika 2: Mikroskopski posnetki matičnih celic iz maščobnega tkiva (merilo 100 μm): nediferencirane matične celice (A), celice diferencirane v adipogeno smer z lipidnimi vakuolami (B) in celice diferencirane v osteogeno smer s temno obarvanimi depoziti kalcija (C).

Figure 2: Microscopic images of adipose-derived stem cells (scale bar 100 μm): non-differentiated stem cells (A), cells differentiated into adipocyte lineage with lipid vacuoles (B) and cells differentiated into osteogenic lineage with dark colored calcium deposits (C).

4 Klinična uporaba danes

V današnji klinični praksi se matične celice iz maščobnega tkiva uporabljajo največkrat neizolirane - pomešane med maščobo, ki jo vbrizgavamo v različne dele telesa. Coleman je s svojimi kliničnimi primeri pokazal, da vbrizgavanje maščobe v obraz ne poveča le volumna ampak regenerira tudi kožo obraza (22). Učinke vbrizgavanja maščobe v dojke je opisal Delay s sodelavci (23). Vbrizgavanje maščobe z matičnimi celicami izboljša angiogenezo ter

celjenje ran po obsevanju (24). Trenutno najmodernejši način aplikacije matičnih celic iz maščobnega tkiva je t.i. cell assisted lipotransfer (CAL) metoda (25). Pri tem postopku iz polovice aspirirane maščobe izolirajo matične celice (optimiziran postopek traja približno 90 min), s katerimi obogatijo preostali del maščobe ter vse skupaj injicirajo v mesto, ki ga želijo zapolniti. Pri tej metodi avtologne matične celice pospešujejo angiogenezo, kar je bistveno za preživetje presadka in obenem zmanjšajo postoperativno atrofijo. Objavljene so že študije vbrizgavanja CAL v obraz in dojko (25, 26).

Matične celice iz maščobe so bile uporabljene tudi za rekonstrukcijo defektov kosti (27, 28). Lendeckel s sodelavci je defekt lobanje rekonstruiral s kombinacijo avtologne spongiozne kosti vzete iz črevnice ter matičnih celic, ki jih je prilepil s fibrinskim lepilom na resorbilen nosilec. Nosilec so nato vstavili na mesto vrzeli. Tri mesece po rekonstrukciji je glede na rezultate slikanja z računalniško tomografijo nastalo novo kostno tkivo. Defekt je bil skoraj popolnoma zaraščen (27). Mesimaki s sodelavci je za rekonstrukcijo defekta tkiv po hemimaksilektomiji uporabil mikrovaskularni prosti reženj z ektopično kostjo v njem, ki jo je vzgojil s pomočjo v prosti reženj vstavljenega konstrukta iz matičnih celic, rastnega faktorja BMP-2 in celičnega nosilca. Po osmih mesecih je iz konstrukta nastala zrela kost (28).

Na področju gastroenterologije potekajo zaključne faze kliničnih študij za zdravljenje kompleksnih perianalnih fistul, ki nastanejo pri Crohnovi bolezni in drugih podobnih stanjih. Iz rezultatov raziskave je razvidno, da matične celice iz maščobnega tkiva zelo uspešno sodelujejo pri zdravljenju fistul (29).

Imunosupresivni značaj ASC so izkoristili tudi Fang s sodelavci v klinični študiji šestih pacientov z akutno GvHD neodzivno na steroidno zdravljenje. Do umirjanja bolezni je prišlo pri petih pacientih, od katerih so v povprečnem obdobju spremljanja zdravljenja štiridesetih mesecev preživel štiri pacienti (30).

Glede na podatke ameriškega Nacionalnega inštituta za zdravje (NIH; www.clinicaltrials.gov), poteka trenutno 14 kliničnih študij z uporabo ASC, med drugim tudi za zdravljenje diabetesa (tip 1 in 2), kardiovaskularnih bolezni (kronična ishemična miokarda, zdravljenje pacientov po preboleli srčni kapi) in jetrne ciroze.

5 Zaključek

Zaradi lahke dostopnosti, številčnosti in sposobnosti diferenciacije v različne celične tipe, predstavljajo ASC odličen vir MSC. Kljub temu, da poteka zaenkrat še veliko raziskav v *in vitro* pogojih, so se pojavile tudi prve klinične aplikacije predvsem na področju rekonstrukcijske kirurgije in regenerativne medicine. Nove perspektive njihove uporabe odstira tudi dejstvo, da podobno kot matične celice iz kostnega mozga, delujejo imunosupresivno. Za zdravljenje različnih prirojenih ali pridobljenih bolezenskih stanj, bi torej lahko uporabljali ne le avtologne temveč tudi alogenske celice, in sicer v smislu izrabljanja njihovega imunosupresivnega delovanja (avtoimunske bolezni, GvHD), kot tudi potenciala diferenciacije. V prihodnosti lahko pričakujemo vedno večjo uporabo matičnih celic v raziskovalne in klinične namene. Maščobno tkivo zaradi količine ter enostavnega dostopa postaja vedno bolj priljubljen vir le-teh.

6 Literatura

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
2. Bieback K, Kern S, Kocaömer A et al. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed. Mater. Eng.* 2008; 18(1 Suppl): S71-6.
3. Puissant B, Barreau C, Bourin P et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br. J. Haematol.* 2005; 129: 118-129.
4. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006 May; 24: 1246-1253.
5. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J et al. 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.
6. 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.
7. Van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, et al. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 27: 889-895.
8. Akanbi KA, Brodie AE, Suryawan A et al. Effect of age on the differentiation of porcine adipose stromal-vascular cells in culture. *J. Anim. Sci.* 1994; 72: 2828-2835.
9. Bakker AH, Van Dielen FM, Greve JW et al. Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obes. Res.* 2004; 12: 488-498.
10. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5 year experience with over 3000 cases. *Plast. Reconstr. Surg.* 1983; 72: 591-597.
11. Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S et al. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 87-92.
12. Coleman SR. Long-term survival of fat transplants: Controlled demonstrations. *Aesthetic Plast. Surg.* 1995; 19: 421-425.
13. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656-663.
14. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7: 211-228.
15. Gonda K, Shigeura T, Sato T et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008; 121: 401-410.
16. Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294: 371-379.
17. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.* 2007; 207: 267-274.
18. Seo MJ, Suh SY, Bae YC et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328: 258-264.
19. Timper K, Seboek D, Eberhardt M et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 341: 1135-1140.
20. Rubio D, Garcia S, Paz MF et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS One.* 2008; 3: e1398.
21. Sensebé L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 2008; 18(1 Suppl): S3-10.
22. Coleman SR. Facial augmentation with structural fat grafting. *Clin. Plast. Surg.* 2006; 33: 567-577.
23. Delay E, Delaporte T, Sinna R. Breast implant alternatives. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 2005; 50: 652-672.
24. Rigotti G, Marchi A, Galìè M et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 119: 1409-1422.
25. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic. Plast. Surg.* 2008; 32: 48-55; discussion 56-57.
26. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al. Cell-Assisted Lipotransfer for Facial Lipoatrophy: Efficacy of Clinical Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Dermatol Surg.* 2008; 34: 1178-1185.
27. Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2004; 32: 370-373.
28. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2009; 38: 201-209.
29. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2008; 8: 1417-1423.
30. Fang B, Song Y, Liao L et al. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 2007; 39: 3358-3362.