

# Izolacja i potencjał do różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej zebranej metoda liposukcji z użyciem strumienia wody

Aesthetic Surgery Journal  
2015, 1–10  
© 2015 The American Society for  
Aesthetic Plastic Surgery, Inc.  
Reprints and permission:  
journals.permissions@oup.com  
DOI: 10.1093/asj/sjv075  
www.aestheticsurgeryjournal.com

**OXFORD**  
UNIVERSITY PRESS

Juliane Meyer, mgr; Achim Salamon, dr; Nicole Herzmann, mgr;  
Stefanie Adam; Hans-Dieter Kleine, lek.med.; Inge Matthiesen, dr;  
Klaus Ueberreiter, lek.med.; and Kirsten Peters, dr

## Streszczenie

Tło: W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w terapeutycznych zastosowaniach wyizolowanej tkanki tłuszczowej do autologicznych przeszczepów tłuszczu oraz wykorzystaniu mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (adMSC). Metoda liposukcji z użyciem strumienia wody (WAL) stanowi pierwszą procedurę zbierania tkanki tłuszczowej oraz dostarczania korzystnego efektu kosmetycznego połączoną z wysokim poziomem ochrony tkanki. Tkanka pobrana metodą WAL była skutecznie stosowana w procedurach przeszczepów.

Cele: Niniejsze badanie miało na celu potwierdzenie żywotności tkanki oraz określenie ilości i zdolności do różnicowania komórek macierzystych w tkance.

Metody: Integralność tkanki otrzymanej metodą WAL sprawdzano za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Zawartość adMSC sprawdzano poprzez izolację komórek z tkanki. Zdolność do różnicowania komórek mezenchymalnych badano za pomocą metod immunocytochemicznych.

Wyniki: Frakcja tkanki WAL z okolic powięzi wykazywała wysoki stopień żywotności oraz zawierała przeciętnie  $2.6 \times 10^5$  komórek CD34-dodatnich na mililitr tkanki, z czego wynika, że tkanka WAL zawierała dużą liczbę komórek macierzystych. Co więcej, adMSC wyizolowane z tkanki WAL wykazywały typowy potencjał do różnicowania.

Wnioski: Tkanka tłuszczowa otrzymana metodą WAL nadaje się do autologicznych przeszczepów tłuszczu ponieważ zachowuje żywotność tkanki. Tym samym, stanowi ważne źródło do izolacji komórek macierzystych adMSC z zachowaną zdolnością do multipotentnego różnicowania się.

## Poziom udowodnienia: 3

Przyjęto do druku 6 kwietnia 2015r.



Zabieg liposukcji zyskał na znaczeniu dzięki terapeutycznemu zastosowaniu wyizolowanej tkanki tłuszczowej do przeszczepów autologicznych.<sup>1,2</sup> Z tego względu, właściwości wyizolowanej tkanki, takie jak wielkość cząstek tłuszczu, żywotność, liczba adipocytów oraz innych komórek tkanki tłuszczowej lub struktur funkcjonalnych (np. naczyń krwionośnych) powinny zostać dokładnie zbadane.

Tkanka tłuszczowa jest zbudowana z różnych typów komórek (adipocytów, komórek endotelialnych, fibroblastów, komórek krwi i komórek krwio-pochodnych oraz z komórek macierzystych tkanki tłuszczowej [adMSC]).<sup>3-6</sup> Enzymatyczne trawienie tkanki tłuszczowej oraz usunięcie adipocytów prowadzi do otrzymania tzw. frakcji SVF, którą z sukcesem stosowano w różnych zastosowaniach klinicznych, takich jak uzupełnianie

Pani Meyer i Pan Herzmann są doktorantami, Dr Salamon jest na stanowisku typu post-doc, Pani Adam jest technikiem, zaś Dr Peters kierownikiem grupy Stem Cell Biology Group, Department of Cell Biology, Rostock University Medical Center, Rostock, Niemcy. Dr Kleine jest członkiem Executive Board of Seracell Stammzelltechnologie GmbH, Rostock, Niemcy. Dr Matthiesen jest kierownikiem Department of Medical Affairs, human med AG, Schwerin, Niemcy. Dr Ueberreiter jest chirurgiem plastykiem w prywatnej praktyce w Birkenwerder, Niemcy.

## Autor korespondencyjny:

Dr Kirsten Peters, Department of Cell Biology, Rostock University Medical Center, Schillingallee 69, 18057 Rostock, Niemcy. E-mail: kirsten.peters@med.uni-rostock.de

przeszczepów tłuszczu, leczenie nietrzymania moczu czy ran przewlekłych.<sup>7-10</sup>

Zuk i wsp. jako pierwsi opisali adMSC.<sup>6</sup> Dzięki zdolności do samoodnawiania się oraz różnicowania multipotentnego, adMSC mają duże znaczenie w homeostazie i regeneracji tkanek.<sup>11</sup> Ludzkie adMSC bezpośrednio różnicują się w osteoblasty i komórki endotelialne na modelu złamania nieciągłego.<sup>12</sup> W badaniach pojedynczych przypadków, ludzkie adMSC były z sukcesem stosowane do leczenia znaczących defektów sklepienia czaszki<sup>13</sup> i szczęk.<sup>14</sup> Co więcej, adMSC pozostają w miejscu przeszczepu przez długi okres czasu.<sup>15, 16</sup>

W porównaniu do szpiku kostnego, tkankę tłuszczową można pobierać w dużych ilościach, z dużą ilością komórek macierzystych oraz przy mniejszym uszkodzeniu miejsca pobierania.<sup>17</sup> adMSC występują w stężeniu około 50.000 komórek/ml tkanki tłuszczowej (około 7% komórek w tkance rozpuszczonej enzymatycznie),<sup>18, 19</sup> co stanowi 100x większą liczbę niż liczba mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) izolowanych ze szpiku kostnego.<sup>17</sup> Zastosowanie komórek macierzystych organizmów dorosłych nie stanowi problemu etycznego, w przeciwieństwie do zarodkowych komórek macierzystych. Ponadto, adMSC spełniają wszystkie charakterystyki MSC zdefiniowane przez International Society for Cellular Therapy, the International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences, i inne.<sup>20, 21</sup>

Tkanka tłuszczowa może być pobierana różnymi metodami, takimi jak resekcja, konwencjonalna liposukcja, aspiracja strzykawką, i inne.<sup>2</sup> Poszczególne metody stosowane w liposukcji mogą wpływać na żywotność komórek obecnych w pobieranej tkance.<sup>22, 23</sup> Liposukcja za pomocą strumienia wody (WAL) stanowi procedurę polegającą na zastosowaniu roztworu w formie cienkiego, pulsacyjnego, skierowanego strumienia w kształcie wachlarza.<sup>24, 25</sup> Kaniula stosowana podczas operacji składa się z dwóch kanałów, które umożliwiają jednoczesną infiltrację roztworu nasiąkowego oraz aspirację pojawiającego się roztworu wody i tłuszczu. Tym samym, ilość płynu infiltrowanego do tkanki jest znacznie mniejsza niż podczas klasycznej procedury liposukcji, co zmniejsza ryzyko ubocznych objawów ze strony układu sercowo-naczyniowego. Umożliwia to uzyskanie pożądanego efektu estetycznego oraz bezpieczeństwa pacjenta, przy jednoczesnej ochronie zbieranej tkanki tłuszczowej. Przeprowadzone przez nas badania miały na celu sprawdzenie jakości autologicznych przeszczepów otrzymanych przy pomocy WAL i wskazały na zachowanie zdolności do różnicowania komórek macierzystych wyizolowanych z tkanki WAL. W tym celu zbadaliśmy żywotność, liczbę oraz potencjał różnicowania do adipocytów i osteocytów komórek adMSC wyizolowanych z tkanki pozyskanej metodą WAL.

## METODY

Jeśli nie zaznaczono inaczej, wszystkie plastikę pochodziły z Greiner Bio-One (Frickenhausen, Niemcy), a odczynniki chemiczne z Sigma-Aldrich (Steinheim, Niemcy).

## Dawcy

Badanie obejmowało 13 pacjentów (1 mężczyzna i 12 kobiet) w okresie 27 miesięcy od sierpnia 2012 do października 2014 r. Pacjenci podpisali formularz świadomej zgody na udział w badaniu. Badanie zostało zaakceptowane przez komitet etyczny Rostock University Medical Center pod numerem A2013-0112, i spełnia wymagania etyczne zdefiniowane przez World Medical Association Declaration of Helsinki.

## Aspiracja ludzkiej tkanki tłuszczowej

Procedura liposukcji została przeprowadzona wg protokołu BEAULI opisanego w Ueberreiter i wsp..<sup>26</sup> Pulsacyjny strumień wody był stosowany do infiltracji z jednoczesną aspiracją. Do infiltracji stosowano 3 zakresy, od 90 ml/minutę  $\pm$  15% do 130 ml/minutę  $\pm$  15%. Roztwór do infiltracji stanowił klasyczny roztwór Kleina, ogrzany do 37 - 38°C. Kaniule do zbierania miły zewnętrzną średnicę 38 mm oraz ostre końce. Po pierwszej infiltracji, nie ma potrzeby stosowania przerwy przed rozpoczęciem aspiracji. Negatywne ciśnienie aspiracji był dostosowywany do 500 mbar.

## Ocena żywotności tkanki wyizolowanej metodą WAL

Do oceny żywotności pobranej tkanki, wykonano barwienie na komórki żywe/martwe wg procedury opisaną wcześniej.<sup>27</sup> Pobrana tkanka była przez 10 minut inkubowana z podłożem hodowlanym Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Life Technologies, Darmstadt, Niemcy) uzupełnionych 3  $\mu$ M Hoechst 33342 (trójchlorek Bis-benzimidazole H33342), 500 nM jodkiem propydydy, oraz 1  $\mu$ M estrem acetoksymetylo kalceiny (Life Technologies). Tkanki były następnie analizowane za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Niemcy) stosując niebieskie, zielone i czerwone filtry emisyjne. Maksima emisyjne barwników wynosiły 460 nm (Hoechst 33342), 516 nm (kalceina), i 617 nm (jodek propydydy). Maksima ekscytacji wynosiły 360 nm (Hoechst 33342), 496 nm (kalceina), oraz 535 nm (jodek propydydy).

## Izolacja i hodowla adMSC

Jak opisano poprzednio,<sup>28</sup> tkankę tłuszczową trawiono stosując 1.6 mg/ml kolagenazy NB4 (SERVA, Heidelberg, Niemcy), mieszaninę obojętnej proteazy oraz kolagenazy I i II w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) z solami wapnia i magnezu (PAA Laboratories, Coelbe, Niemcy). W serii etapów płukania w PBS z 10% cielęcą surowicą płodową (FCS; PAN Biotech, Aidenbach, Niemcy) i wirowania, z pozostałości tkanki tłuszczowej oddziela się SVF. Na tym etapie liczbę komórek SVF oraz zawartość komórek CD34 oceniano za pomocą cytometrii przepływowej (patrz część cytometria przepływowa). Komórki uwolnione z trawionej tkanki były

Inkubowane przez 24 h w standardowych warunkach hodowli (5% CO<sub>2</sub> i 37°C w wilgotnej atmosferze). Komórki CD34-dodatnie izolowano z frakcji komórek przylegających do plastiku przy użyciu immunomagnetycznego testu selekcyjnego (Life Technologies). Podczas procedury selekcji, liczbę komórek przylegających do plastiku przez 24 h oraz liczbę komórek przylegających i CD34+ określano przy użyciu licznika Scepter (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Ponieważ selekcja przy użyciu kulek jest standardową procedurą pozyskiwania komórek do doświadczeń, nie wykonano procedury analizy za pomocą cytometrii przepływowej. Po trzech pasażach, adMSC wysiano w gęstości 20.000 komórek na cm<sup>2</sup>. Brak mykoplazm potwierdzono mikroskopowo po wyznakowaniu DNA.

AdMSC hodowano w standardowym podłożu hodowlanym, podłożu stymulującym różnicowanie w kierunku adipocytów lub w kierunku osteocytów. Standardowe podłoże stanowił DMEM, z dużym stężeniem glukozy, GlutaMAX-I, uzupełniony 1% penicyliny/streptomycyny (100 U/ml i 100 µg/ml; both Life Technologies), oraz 10% FCS. Do stymulacji w kierunku adipocytów, do standardowego podłoża dodawano 500 µM 3-izobutylo-1-metyloksantyny (SERVA), 10 µM insuliny, 1 µM deksametazonu oraz 200 µM indometacyny (Fluka, Seelze & Buchs, Niemcy). Do stymulacji w kierunku osteocytów, podłoże standardowe uzupełniano 0.25 g/l kwasem askorbinowym, 1 µM deksametazonem, oraz 10 µM β-glycerofosforanu (Fluka). Po osiągnięciu konfluencji, rozpoczynano inkubację w podłożu standardowym i różnicującym, oznaczając dzień 0, po czym hodowlę kontynuowano przez 35 dni. Podłoża zmieniano co 2-3 dni.

### Analiza metoda cytometrii przepływowej

Celem policzenia populacji komórek CD34+ we frakcji SVF, wyizolowane zawiesiny komórek pozyskane od 7 pacjentów znakowano za pomocą zestawu CD34 (Stem-Kit, Beckman-Coulter, Krefeld, Niemcy). Zestaw Stem-Kit Reagents składa się z 2-kolorowego fluorescencyjnego (CD45-FITC/CD34-PE) odczynnika zawierającego przeciwciała monoklonalne, 2-kolorowego fluorescencyjnego odczynnika kontrolnego (CD45-FITC/kontrola izotypowa-PE) sprawdzającego niespecyficzne wiązanie przeciwciała monoklonalnego CD34-PE, barwnika sprawdzającego żywotność (7-amino-aktynomycyna-D/7-AAD), odczynnika do lizy erytrocytów (chlorek amonu) oraz tzw. fluorokulek do oceny całkowitej liczby komórek CD34+. Probówki wypełniano 20 µl mieszaniny CD45-FITC (klon J33) oraz CD34-PE (klon 581) oraz 20 µL roztworu 7-AAD, dodawano 100 µl zawiesiny komórek i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej (20°C) w ciemności. Drugą inkubację przez 10 minut prowadzono po dodaniu 2 ml odczynnika lizującego. 100 µl fluorosfer Stem-Count dodawano do zawiesiny komórek bezpośrednio przed pomiarem przy długości fali 488 nm w cytometrze przepływowym

FC500 Flow Cytometer (Beckman-Coulter) wyposażonym w laser argonowy 20 mW. Analizę prowadzono zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem ISHAGE<sup>29</sup> dla pojedynczej platformy analizy.<sup>30</sup> Komórki selekcjonowano w kierunku komórek CD45 i 7-AAD-ujemnych, żeby wykluczyć leukocyty i komórki martwe. Żywe komórki CD34 i fluorosfery liczono przy użyciu oprogramowania CXP (Beckman-Coulter). Liczbę komórek macierzystych wyliczono na podstawie stężenia fluorosfer dostarczonych w zestawie.

### Określenie liczby komórek

Liczbę komórek w tkance otrzymanej od 8 osób określano metodą barwienia fioletem krystalicznym, jak opisano poprzednio.<sup>28</sup> Fiolet krystaliczny barwi DNA z ładunkiem negatywnym dzięki przyciąganiu jonów<sup>31</sup> w sposób liniowy.<sup>32</sup>

### Analiza różnicowania mezenchymalnego

#### Analiza różnicowania do adipocytów

Wewnątrzkomórkową akumulację lipidów w adMSC wyizolowanych od 5 osób wykrywano za pomocą barwienia fluorescencyjnego wakuoli lipidowych po 14 dniach hodowli, jak opisano poprzednio.<sup>33</sup> W tym celu, komórki przepłukiwano PBS i utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA). Po przepłukaniu PBS, komórki inkubowano w roztworze Bodipy (1 µg/ml 150 mM NaCl, Life Technologies) w ciemności. Następnie, komórki płukano w PBS i H<sub>2</sub>O. Intensywność fluorescencji mierzono w czytniku płytek (TECAN, Crailsheim, Niemcy) przy długości fali ekscytacji 480 nm oraz długości fali emisji 515 nm. Dokumentację przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wykonano celem udokumentowania powstawania wakuoli wewnątrz komórek za pomocą Axioacam MRc połączonej z Axio Scope.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

#### Analiza różnicowania do osteocytów

Pomiar aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) w wyizolowanych adMSC z 6 pacjentów oraz zawartość wapnia w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w adMSC wyizolowanych z 4 pacjentów posłużył do wykrycia różnicowania osteogenicznego, jak opisano poprzednio.<sup>28</sup> Aby otrzymać dokumentację fotograficzną aktywności ALP (wątroba/kości/izoenzym z nerek), komórki znakowano roztworem 67 mM 2-amino-2-metylo-1.3-propanediolu (AMPED), 2,7 mM fosforanu naftolu AS-MX i 2,7 mM soli Fast Red Violet LB w H<sub>2</sub>O. Pomiar aktywności ALP wykonano po 21 dniach hodowli przepłukując komórki solą fizjologiczną buforowaną Tris oraz buforem permabilizującym (1% Tween 20 i 100 mM fluorek fenylometanosulfonylu w H<sub>2</sub>O) oraz inkubując z roztworem substratu dla ALP (10 mM para-nitrofenylofosforan (pNPP), 100 mM AMPED, i 5 mM MgCl<sub>2</sub> w H<sub>2</sub>O przez 1 godzinę w standardowych warunkach hodowli.

Aby zatrzymać aktywność ALP, dodawano 2 M NaOH. Absorbancję supernatantu mierzono w czytniku mikroplitek (anthos Mikrosysteme) przy długości fali 405 nm.

Celem dokumentacji odkładania wapnia w ECM, komórki znakowano 30 mM czerwienią alizarynową S rozpuszczoną w H<sub>2</sub>O. Obrazy wykonano przy użyciu kamery AxioCam ICc1 połączonej z Axiovert 25 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Pomiar zawartości ECM oparty na kompleksowaniu Ca<sup>2+</sup> przez orto-krezolftaleinę wykonano po 35 dniach. Po przepłukaniu komórek w PBS-ie i utrwaleniu w 4% PFA podgrzany do 37°C, komórki płukano w H<sub>2</sub>O, a następnie dodawano bufor krezolftaleinowy (0.1 mg/ml kompleks orto-krezolftaleinowy, 1 mg/ml 8-hydroksychinon oraz 6% 37% HCl w H<sub>2</sub>O). Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej (19°C do 21°C), dodawano bufor AMP (15% 2-amino-2-metylo-1-propanol [AMP] w H<sub>2</sub>O, pH 10.7) oraz inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej (20°C). Gęstość optyczną supernatantu oceniano za pomocą czytnika mikroplitek (anthos Mikrosysteme) przy 580 nm.

### Statystyka i przedstawienie danych

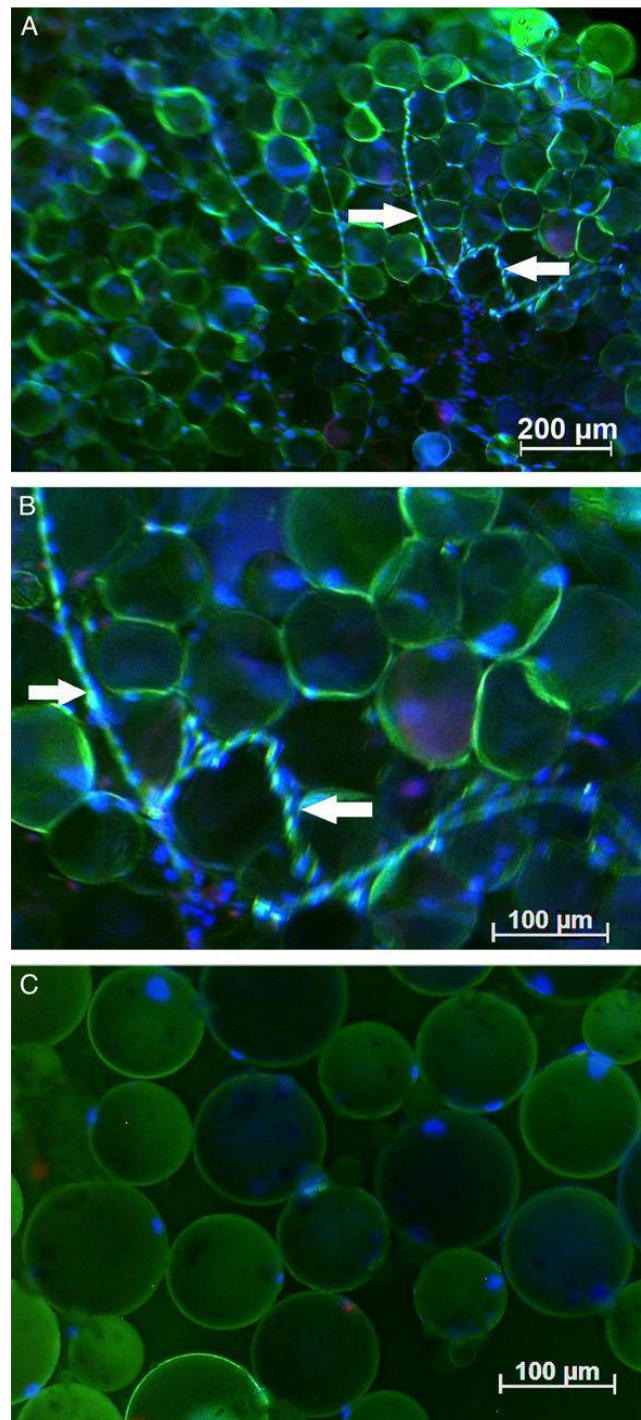
Wszystkie pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach. Dane przedstawiono jako wykresy liniowe i słupkowe, jak również tzw. box plot przy użyciu oprogramowania R do pomiarów statystycznych oraz tworzenia wykresów.<sup>34</sup> Przedstawione dane stanowią mediany z dodatnimi i ujemnymi słupkami błędów stanowiącymi, odpowiednio, trzeci i czwarty kwartył. Ponieważ większość danych nie wykazywała rozkładu normalnego, istotność różnic pomiędzy dwoma zestawami danych liczono przy użyciu nieparametrycznego testu Mann-Whitney'a U. Poziom istotności wyznaczono przy wartości o niższej lub równej 0.05 ( $P \leq .05$ ) i liczono stosując R.

### WYNIKI

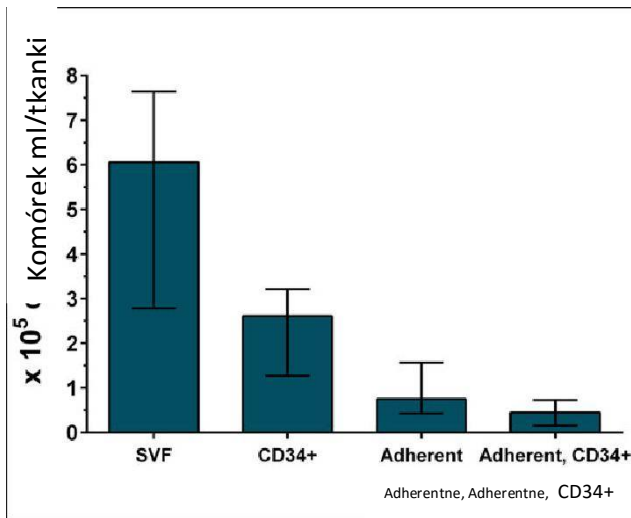
Średnia wieku pacjenta wynosiła 42 lata (zakres 24-59 lata). Wszyscy pacjenci charakteryzowali się dobrym zdrowiem i potrzebowali poprawy konturu jednego lub więcej z obszarów: ramiona, biodra, pośladki, brzuch, dolna i górna część pleców, uda, wewnętrzna i zewnętrzna strona ud. Średni indeks masy ciała wynosił 25.8 (zakres 21-35). Czas od izolacji tkanki do izolacji komórek wynosił mniej niż 20 h.

### Żywotność pobranej tkanki

Całkowite znakowanie komórki żywe/martwe tkanki WAL prowadziło do uzyskania znacznej emisji zielonej fluorescencji tkanki, co wskazuje na jej żywotność, natomiast jądra komórek znakowały się na niebiesko (Rycina 1A). Cienkie zielone linie w formie „obwódka” w preparatach odzwierciedlają sferyczny kształt dojrzałych adipocytów. Największą część adipocytów jest wypełniona pojedynczą, niewyznakowaną wakuolą



Rycina 1. Tkanka tłuszczowa znakowana na komórki żywe/martwe bezpośrednio po izolacji za pomocą metody WAL (A; zielone: żywe komórki, czerwone: martwe komórki, niebieskie: jądra komórkowe); szczególnie wyizolowanej tkanki pokazujący strukturę przypominającą naczynia (B); zawiesina komórek powstająca po trawieniu enzymatycznym tkanki (C). Większość komórek wykazywała intensywne zielone znakowanie - komórki żywe. Wykryto szereg struktur naczyniopodobnych (strzałki). Wykryto tylko kilka martwych komórek (fluorescencja czerwona).



Rycina 2. Ocena ilości komórek po różnych etapach różnicowania (ilość komórek w SVF; ilość komórek CD34+ w SVF; ilość komórek przylegających do plastiku po 24h hodowli; ilość komórek przylegających do plastiku i CD34+ po 24h hodowli; n = 7). SVF zawiera średnio  $6.1 \times 10^5$  komórek na ml zebranej tkanki tłuszczowej oraz średnio  $2.6 \times 10^5$  komórek CD34+ na ml tkanki. Po 24h hodowli, średnio  $0.8 \times 10^5$  komórek na ml tkanki przylegało do plastiku, z czego średnio  $0.45 \times 10^5$  komórek na ml tkanki było CD34 dodatnich.

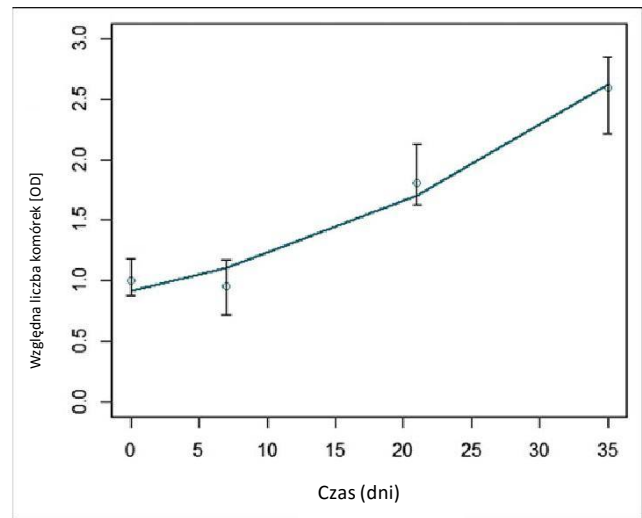
tłuszczową, ze względu na powiązany z organellami brak aktywności esterazy, wymagany do aktywacji fluoroforu. Wykryto tylko kilka martwych komórek (Rycina 1B, czerwona fluorescencja). W tkance otrzymanej metodą WAL wykryto struktury naczynio-podobne w tkance WAL (białe strzałki, Rycina 1A and B). Trawienie kolagenazą tkanki WAL prowadziło do zawiesiny pojedynczych komórek, przeważnie żywych (Rycina 1C).

### Liczba komórek w pobranej tkance

Po przygotowaniu zawiesiny pojedynczych komórek, SVF otrzymywano poprzez usuwanie adipocytów. SVF zawierał średnio  $6.1 \times 10^5$  na ml pobranej tkanki. Prawie połowę frakcji identyfikowano jako komórki CD34+ (średnio 43%, około  $2.6 \times 10^5$  komórek na ml pobranej tkanki). Co więcej, średnio 18% SVF ( $0.8 \times 10^5$  komórek na ml pobranej tkanki) przylegało po 24h hodowli standardowej, około połowa z nich była adherentna i dodatnia pod kątem markera CD34 ( $0.45 \times 10^5$  komórek na ml pobranej tkanki z SVF) (Rycina 2).

### Proliferacja adMSC in Vitro

Aby ocenić proliferację adMSC wyizolowanych z WAL podczas hodowli oraz różnicowania, komórki wysiewano oraz oceniano względną liczbę komórek po 0, 7, 21, i 35 dniach hodowli.



Rycina 3. Proliferacja adMSC w stałych warunkach hodowli; adMSC hodowano przez 35 dni. Liczbę komórek określono w 0, 7, 21, i 35 dniu. Wszystkie wartości znormalizowano do wartości z dnia 0. Komórki wykazują stałą proliferację, tj. 2.5-krotny wzrost liczby komórek w ciągu 35 dni hodowli (n = 8).

Stwierdzono stały wzrost liczby komórek, a tym samym stałą proliferację adMSC (Rycina 3).

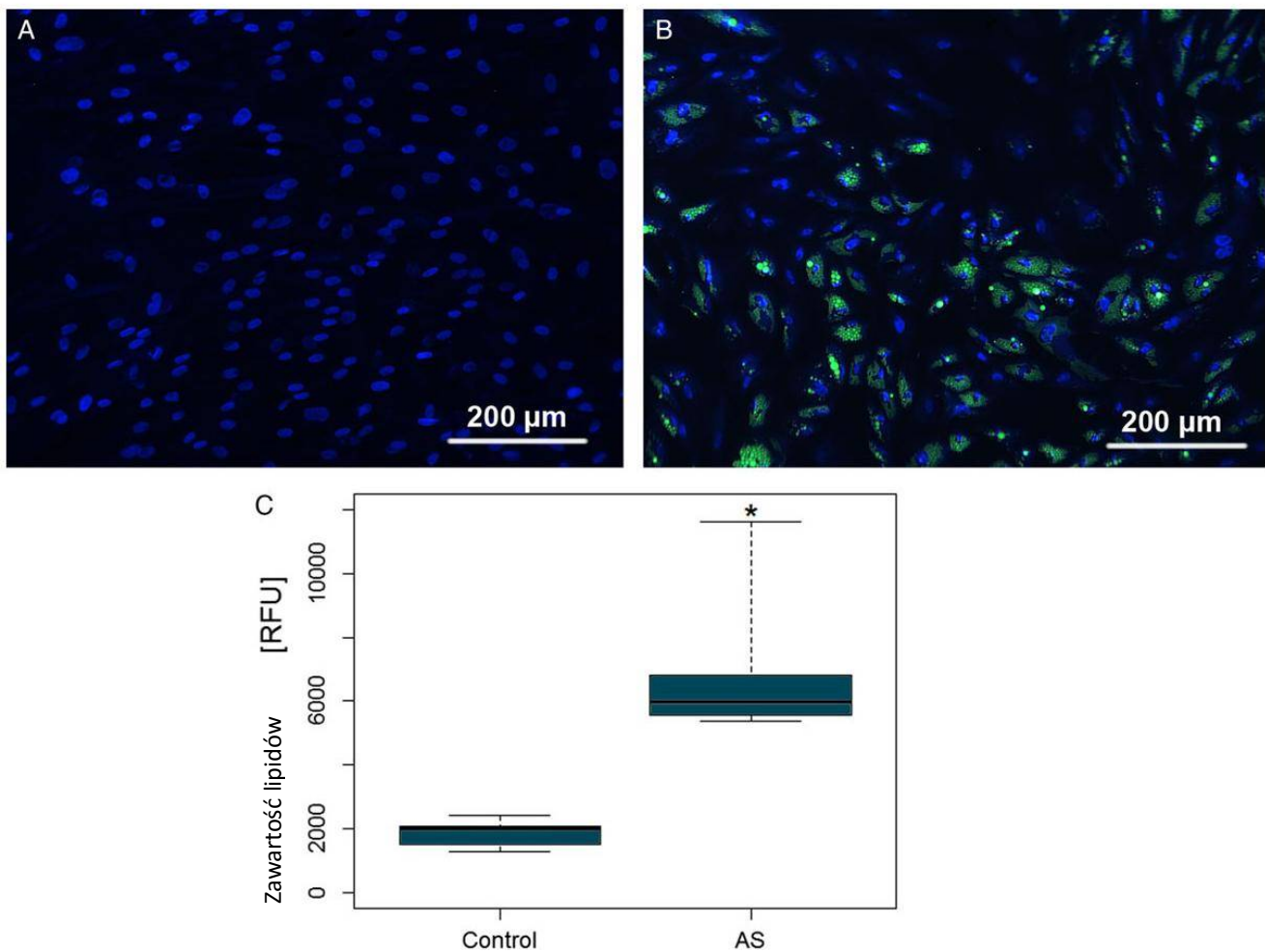
### Potencjał różnicowania komórek mezenchymalnych

#### Różnicowanie adipogeniczne

Po 14 dniach stymulacji adipogenicznej, wykrywano formowanie się wakuol wypełnionych lipidami w adMSC podczas gdy nie wykrywano wakuol lipidowych w adMSC hodowanych w warunkach kontrolnych (Rycina 4A,B). Pomiar ilości akumulowanego wewnątrzkomórkowego tłuszczu wskazał na znaczący 3-krotny wzrost w warunkach różnicowania adipogenicznego (Rycina 4C).

#### Różnicowanie osteogeniczne

Aby ocenić stopień różnicowania osteogenicznego, zmierzono aktywność fosfatazy alkalicznej oraz ilość wapnia odłożonego w ECM. W przeciwieństwie do hodowli kontrolnych, wykazujących delikatne czerwone zabarwienie (Rycina 5A), osteogenicznie stymulowane adMSC wykazywały znaczące czerwone zabarwienie w kierunku ALP przez 21 dni hodowli (Rycina 5B). Po 35 dniach stymulacji osteogenicznej, znaleziono depozyty fosforanu wapnia, których nie było w niestymulowanych hodowlach kontrolnych (Rycina 5D,E). Pomiar tych markerów różnicowania potwierdził znaczące zmiany w fenotypie komórek: po 21 dniach różnicowania w podłożu różnicującym, komórki wykazywały ponad 4-krotnie większą aktywność ALP niż komórki hodowane w warunkach kontrolnych (Rycina 5C).



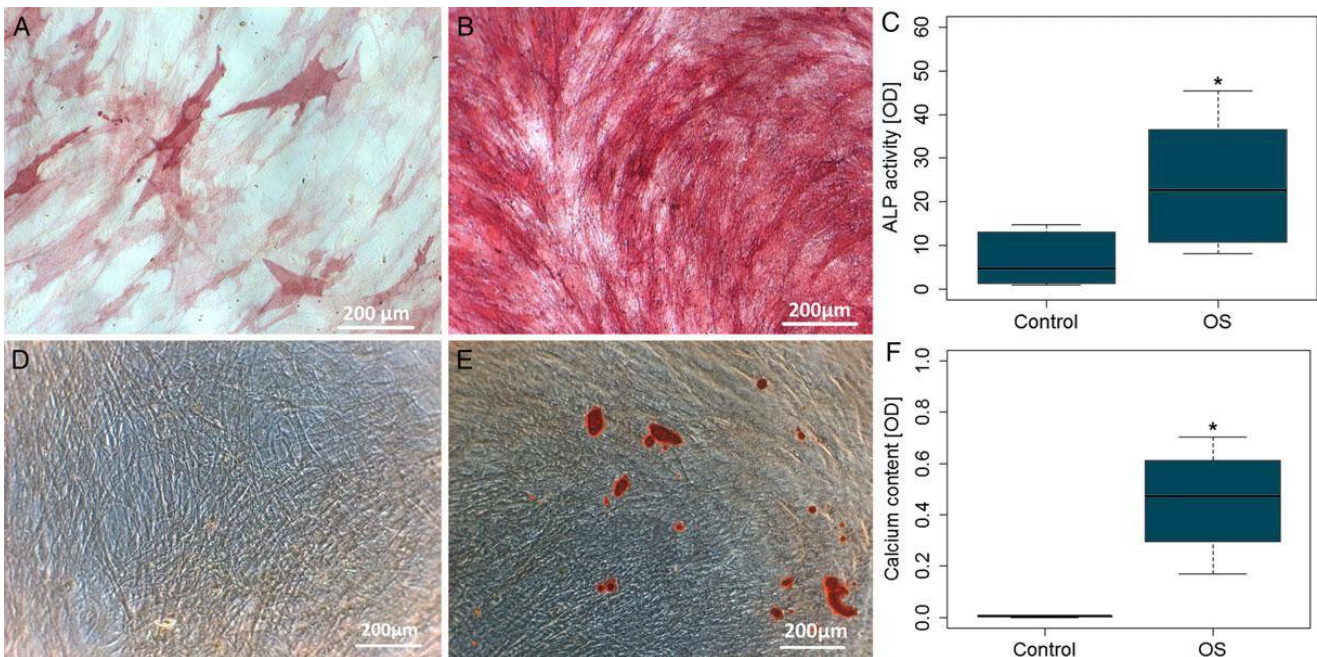
Rycina 4. Stopień adipogenicznego różnicowania adMSC. Znakowanie wakuoli lipidowych (zielone) oraz jąder komórkowych (niebieskie) w niestymulowanych hodowlach kontrolnych (A) oraz adMSC stymulowanych adipogenicznie (AS) po 14 dniach (B). Pomiar zawartości lipidów (C, pomiar intensywności fluorescencji; n = 5; test Mann-Whitney'a U). Akumulację lipidów wykazywały tylko adMSC stymulowane adipogenicznie.

Odkładanie fosforanu wapnia w adMSC stymulowanych osteogenicznie przez 35 dni było niemal 100-rzy wyższe niż to stwierdzone w hodowlach kontrolnych, gdzie niemal nie znaleziono depozytów fosforanu wapnia (Rycina 5F).

## DYSKUSJA

WAL stanowi procedurę liposukcji dostarczającą korzystny efekt estetyczny połączony z ochroną tkanki oraz niższym ryzykiem powikłań kardiologicznych z powodu małej ilości podawanego płynu w porównaniu do konwencjonalnej procedury liposukcji.<sup>24, 25, 35, 36</sup> Co więcej, tkanka aspirowana metodą WAL była już stosowana z powodzeniem w procedurach przeszczepów.<sup>26, 37</sup> Peltoniemi i wsp. zaproponowali, aby metoda WAL była preferowaną techniką do przeszczepów autologicznych ponieważ prowadzi do uzyskania tkanki bogatej w komórki macierzyste oraz umożliwia łatwą iniekcję, bez ciśnienia, co zapobiega uszkodzeniu komórek.<sup>38</sup>

Aby potwierdzić wysoką żywotność i liczbę komórek macierzystych w tkance tłuszczowej pobranej metodą WAL, przeanalizowaliśmy pobraną tkankę WAL pod kątem integralności, wydajności adMSC oraz zdolności do różnicowania. Zakres niniejszego badania nie obejmował badania innych technik liposukcji, takich jak bezpośrednio porównanie tkanki wyizolowanej od tego samego pacjenta w trakcie tej samej procedury, ale za pomocą 2 różnych technik, co stanowi bardziej bezpośrednie podejście do oceny techniki WAL. Niemniej wykorzystując dane literaturowe, procedura WAL może zostać umieszczona w kontekście innych technik liposukcji. Dzięki ocenie wizualnej możemy pokazać, że pobieranie metodą WAL prowadzi do uzyskania żywej tkanki z zachowanymi strukturami naczynio-podobnymi. Pozostaje to w zgodzie z poprzednimi odkryciami, pokazującymi, że tkanka WAL składa się z całych agregatów komórek oraz małych naczyń.<sup>35</sup> Ocena całkowitej zawartości komórek oraz ocena martwych i żywych komórek może być przedmiotem



Rycina 5. Stopień zróżnicowania osteogenicznego adMSC. Znakowanie ALP (czerwony) w hodowlach kontrolnych (A) oraz w hodowlach stymulowanych osteogenicznie (OS) po 21-dniowej hodowli (B). Pomiar aktywności ALP (C; n = 6; test Mann-Whitney'a U). Znakowanie depozytów wapnia w ECM w hodowlach kontrolnych (D) oraz w hodowlach osteogenicznie indukowanych po 35 dniach (E). Pomiar zawartości wapnia w ECM (F, znakowanie krezolftaleiną; n = 4; test Mann-Whitney'a U). W porównaniu w kontrolnymi hodowlami niestymulowanymi, hodowle stymulowane osteogenicznie wykazywały 4-krotny wzrost aktywności ALP po 21 dniach oraz 100-krotnie wyższe odkładania wapnia w ECM po 35 dniach.

przyszłych badań. Stwierdzono, że procedura trawienia enzymatycznego prowadzi do otrzymania zawiesiny pojedynczych komórek składających się z adipocytów oraz SVF, że średnią liczbą  $6.1 \times 10^5$  komórek na ml tkanki WAL. Stwierdzono różnice w liczbie komórek w SVF dla różnych tkanek oraz różnych technik pobierania. Przykładowo, średnio  $3 \times 10^5$  komórek SVF na ml tkanki stwierdzono po liposukcji innej WAL,  $39 \times 10^5$  po liposukcji za pomocą ultradźwięków oraz  $7 \times 10^5$  po resekcji tkanki tłuszczowej. <sup>40</sup> Ponieważ SVF stanowi heterogenną mieszaninę komórek, a zawartość SVF nie stanowi bezpośredniego miernika zawartości komórek macierzystych, przeanalizowano zawartość komórek CD34-dodatnich w SVF. Marker CD34 został wcześniej zidentyfikowany w komórkach prekursorowych w zdrowym szpiku kostnym osoby dorosłej, <sup>41</sup> zaś przeciwciała Stro-1 było często stosowane do izolacji MSC, i wytworzone przy użyciu CD34-dodatnich MSC. <sup>42</sup> CD34 ulega ekspresji również na komórkach hematopetycznych w stanie aktywacji, które przedostają się do krwiobiegu, podczas gdy hematopoetyczne komórki macierzyste w stanie spoczynku w szpiku kostnym są CD34-ujemne. <sup>43</sup> Panel komórek CD34-dodatnich dotyczy również mięśniowych komórek satelitarnych, komórek interstycjalnych, nabłonkowych i progenitorów śródbłonka. <sup>44</sup> Obecnie uważa się, że CD34 ulega ekspresji na wszystkich komórkach periwaskularnych in situ, <sup>45</sup> chociaż nie zawsze na

stałym poziomie, jak pokazano dla MSC, dla których poziom ekspresji CD34 spada miarę w miarę pasażu hodowli in vitro. <sup>46</sup> Frakcja SVF z tkanki WAL zawierała średnio  $2.6 \times 10^5$  komórek CD34-dodatnich na ml tkanki (średnio 43% SVF). Wyniki otrzymane przez inne grupy to średnio 22.5% <sup>17</sup> - od 15% do 40% komórek na tkankę. <sup>5</sup> Zgodnie z powyższym, jedna część komórek CD34+ jest pochodzenia hematopoetycznego, podczas gdy pozostałe komórki to adMSC. Potwierdzili to Bourin i wsp. wykrywając CD34-dodatnią, ale CD45-ujemną populację komórek z SVF z tkanki tłuszczowej, ponieważ prekursorzy hematopetyczne będą pozytywne dla obu markerów powierzchniowych. <sup>20</sup> Obie populacje komórek mogą zostać rozdzielone poprzez selekcję w kierunku adhezji do standardowego polistyrenu, ponieważ adMSC przylegają do plastiku <sup>47</sup>, zaś macierzyste komórki hematopoetyczne – nie. <sup>48, 49</sup> Z tego powodu, populacja CD34+ przylegająca do plastiku w ilości  $0.45 \times 10^5$  komórek na ml tkanki (8% SVF i 18.9% komórek CD34+), którą wyizolowaliśmy z SVF 24h po strawieniu tkanki stanowi homogenną populację adMSC. Inni badacze identyfikowali  $6.3\% \pm 1.8\%$  funkcjonalnych adMSC zawartych w SVF z wycinanej tkanki tłuszczowej,  $1.9\% \pm 1.3\%$  funkcjonalnych adMSC w SVF z tkanki otrzymanej metodą liposukcji z nasączeniem, oraz  $0.4\% \pm 0.1\%$  funkcjonalnych adMSC w SVF z tkanki otrzymanej za pomocą liposukcji

ultradźwiękami.<sup>40</sup> Porównując materiał otrzymany od jednego pacjenta, zauważalny jest szeroki zakres zawartości adMSC w SVF. Średnio stwierdza się 8% komórek, jak podano powyżej, w zakresie od 2,3% do 17,9%. Philips i wsp., w doświadczeniach, w których tkankę pobierano techniką Colemana, wyznaczył ten zakres jako 4% to 37%.<sup>50</sup> Różnice pomiędzy wynikami badania wynikają z faktu, że metody stosowane do analizy zawartości adMSC w tkance tłuszczowej różnią się dla każdej grupy badawczej. W tym przypadku nie tylko metoda pobierania była różna, ale również zawartość adMSC określano metodą analizy cytometrycznej SVF, zaś całkowitą zawartość adMSC określano po 24h adherencji do plastiku.

Adipogeniczna stymulacja wyizolowanych adMSC prowadziła do wewnątrzkomórkowej akumulacji tłuszczu, co potwierdza adipogeniczny potencjał do różnicowania adMSC otrzymanych z tkanki metodą WAL. Ponadto, wykazano potencjał osteogeniczny po specyficznej stymulacji za pomocą markerów różnicowania – aktywności ALP i zwapienia ECM. Tym samym, adMSC z tkanki uzyskanej metodą WAL wykazują mezenchymalny potencjał różnicujący. Wykazano, że zawartość komórek macierzystych w pobieranej tkance może stanowić pozytywny miernik długoterminowego przetrwania i zachowania przeszczepów tłuszczu.<sup>50</sup> Z tego powodu WAL stanowi bardzo łagodną technikę operacyjną zapewniającą wygodę pacjentowi oraz żywotność tkanki.<sup>24, 38</sup> Możliwość wzbogacania graftów tłuszczu za pomocą autologicznych komórek macierzystych wyizolowanych z tej samej tkanki stanowi obiecujące zastosowanie kliniczne. Kolejnym ważnym aspektem to przyszłe zastosowanie komórek macierzystych w leczeniu np., zapalenia stawów oraz innych schorzeń. Porównawcze badanie tkanek tego samego pacjenta zebranych techniką WAL oraz innymi technikami liposukcji stanowi interesujący przedmiot do badań w przyszłości.

## WNIOSKI

WAL stanowi procedurę liposukcji dostarczającą korzystnych wyników dla komfortu pacjentów oraz efektów kosmetycznych. Wykazaliśmy, że tkanka otrzymana metodą WAL stanowi wiarygodne źródło adMSC, dające liczbę komórek w zakresie liczby komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej innymi technikami. AdMSC wyizolowane z tkanki WAL są żywe i posiadają potencjał różnicowania. Z tego powodu, tkanka WAL może być stosowana do autologicznego przeszczepu tłuszczu i stanowi odpowiednie źródło izolacji adMSC.

## Ujawnienia

Dr Kleine jest członkiem Executive Board of Seracell Stammzell-technologie GmbH (Rostock, Niemcy) Dr Matthiesen jest pracownikiem human med AG (Schwerin, Niemcy). Pozostali autorzy nie zgłaszają źródeł finansowania.

## Finansowanie

Pracę sfinansowano ze źródeł landu Mecklenburg-Vorpommern oraz ze środków Unii Europejskiej [ESF/ IV- WM-B34-0013/11]. Finansowanie zostało wykorzystane do zatrudnienia personelu naukowego, zakupu sprzętu laboratoryjnego, ponoszenia opłat konferencyjnych oraz wydatków na podróże. Fundatorzy środków nie mieli wpływu na projekt badania, zbieranie i analizę danych, decyzję o opublikowaniu i nie uczestniczyli w przygotowaniu manuskryptu pracy.

## LITERATURA

1. Hsu VM, Stransky CA, Bucky LP, Percec I. Fat grafting's past, present, and future: why adipose tissue is emerging as a critical link to the advancement of regenerative medicine. *Aesthet Surg J.* 2012;32(7):892-899.
2. Kakagia D, Pallua N. Autologous Fat Grafting: In Search of the Optimal Technique. *Surg Innov.* 2014;21(3):327-336.
3. Astori G, Vignati F, Bardelli S, i wsp.. "In vitro" and multi-color phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2007;5:55.
4. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):19.
5. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, i wsp.. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64-76.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, i wsp.. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.
7. Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Boriani F. Autologous fat transplantation versus adipose-derived stem cell-enriched lipografts: a study. *Aesthet Surg J.* 2011;31(6):682-693.
8. Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, i wsp.. Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases. *Int J Urol.* 2012;19(7):652-659.
9. Akita S, Yoshimoto H, Akino K, i wsp.. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. *Clin Plast Surg.* 2012;39(3):281-292.
10. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, i wsp.. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg.* 2010;64(2):222-228.
11. Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells.* 2011;29(7):1034-1040.
12. Shoji T, Ii M, Mifune Y, i wsp.. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 2010;90(4):637-649.
13. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, i wsp.. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32(6):370-373.
14. Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, i wsp.. Novel maxil-



- adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38 (3):201-209.
15. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, i wsp.. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 2013;65(7):1786-1794.
  16. Nowacki M, Pietkun K, Pokrywczynska M, i wsp.. Filling Effects, Persistence, and Safety of Dermal Fillers Formulated With Stem Cells in an Animal Model. *Aesthet Surg J.* 2014;34(8):1261-1269.
  17. James AW, Zara JN, Zhang X, i wsp.. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(6):510-519.
  18. Levi B, Longaker MT. Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells.* 2011;29(4):576-582.
  19. Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdanský S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone re-generation. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(13-14):1313-1321.
  20. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, i wsp.. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013;15 (6):641-648.
  21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, i wsp.. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position state-ment. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
  22. 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 (1):95-100.
  23. Schreml S, Babilas P, Fruth S, i wsp.. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy.* 2009;11(7):947-957.
  24. Man D, Meyer H. Water jet-assisted lipoplasty. *Aesthet Surg J.* 2007;27(3):342-346.
  25. Steinert M. [Physical lipolysis]. *Hautarzt.* 2010;61 (10):856-863.
  26. Ueberreiter K, von Finckenstein JG, Cromme F, Herold C, Tanzella U, Vogt PM. [BEAULI--a new and easy method for large-volume fat grafts]. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2010;42(6):379-385.
  27. Salamon A, van Vlierberghes S, van Nieuwenhove I, i wsp.. Gelatin-Based Hydrogels Promote Chondrogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *Materials.* 2014;7(2): 1342-1359.
  28. Salamon A, Jonitz-Heincke A, Adam S, i wsp.. Articular cartilage-derived cells hold a strong osteogenic differenti-ation potential in comparison to mesenchymal stem cells in vitro. *Exp Cell Res.* 2013;319(18):2856-2865.
  29. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother.* 1996;5(3):213-226.
  30. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry.* 1998;34(2):61-70.
  31. Noeske K. [The binding of crystal violet on deoxyribonu-cleic acid. Cytophotometric studies on normal and tumor cell nuclei]. *Histochemie.* 1966;7(3):273-287.
  32. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 1986;159 (1):109-113.
  33. Fiedler T, Salamon A, Adam S, Herzmann N, Taubenheim J, Peters K. Impact of bacteria and bacterial components on osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2013;319(18):2883-2892.
  34. R\_Core\_Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R\_Core\_Team, 2013.
  35. Stutz JJ, Krahl D. Water jet-assisted liposuction for pa-tients with lipoedema: histologic and immunohistologic analysis of the aspirates of 30 lipoedema patients. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(2):153-162.
  36. Stabile M, Ueberreiter K, Schaller HE, Hoppe DL. Jet-assisted fat transfer to the female breast: preliminary experiences. *Eur J Plast Surg.* 2014;37(5):267-272.
  37. Sasaki GH. Water-assisted liposuction for body contour-ing and lipoharvesting: safety and efficacy in 41 consecu-tive patients. *Aesthet Surg J.* 2011;31(1):76-88.
  38. Peltoniemi HH, Salmi A, Miettinen S, i wsp.. Stem cell enrichment does not warrant a higher graft survival in lipofilling of the breast: a prospective comparative study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(11):1494-1503.
  39. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, i wsp.. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006;24(2):376-385.
  40. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, i wsp.. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 2006;8(2):166-177.
  41. Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood.* 1991;78(11):2848-2853.
  42. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclo-nal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78(1):55-62.
  43. Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy.* 2012;14(10):1159-

44. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells*. 2014;32(6):1380-1389.
45. Crisan M, Corselli M, Chen WC, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2012;16 (12):2851-2860.

46. Kaiser S, Hackanson B, Follo M, i wsp.. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy*. 2007;9(5):439-450.
47. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):64-76.
48. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood*. 1999;94 (7):2161-2168.
49. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, i wsp.. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:141-151.
50. Philips BJ, Grahovac TL, Valentin JE, i wsp.. Prevalence of endogenous CD34+ adipose stem cells predicts human fat graft retention in a xenograft model. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(4):845-858.