

MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE IZ MASNog TKIVA - IZOLACIJA, KULTIVACIJA I CILJANA DIFERENCIJACIJA

AUTORI

Nurković J.¹, Dolićanin Z.¹, Tutić I.², Hajrović Š.², Mustafić F.³, Todorović V.⁴, Kovačević-Filipović M.⁵

¹ Državni Univerzitet u Novom Pazaru, Departman za biomedicinske nauke

² Opšta bolnica Novi Pazar

³ Privatna praksa „Dental Centar Jezero“, Novi Pazar

⁴ Stomatološki fakultet, Univerzitet Privredna akademija, Novi Sad

⁵ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

SAŽETAK

Matične ćelije su nespecializovane ćelije organizma u vrlo ranom stadijumu razvika, koje u normalnim uslovima u datom tkivu mogu da se diferenciraju u različite tipove funkcionalno specializovanih zrelih ćelija. Mezenhimalne matične ćelije (MSCs) su atraktivni kandidati za kliničku primenu u obnavljanju oštećenih tkiva, pogotovu što se mogu izolovati iz više izvora i umnožavati, a njihova primena ne nosi nikakve etičke probleme. Metode izolacije MSCs iz masnog tkiva zasnivaju se na enzimatskom razlaganju dobijenog materijala. Uslovi kultivacije mezenhimalnih matičnih ćelija su temperatura od 37°C i parcijalni pritisak CO₂ 5%. MSCs se gaje u medijumu, najčešće u α -MEM medijumu sa 10% ili 20% fetalnim telećim serumom. Pod tim uslovima kultivisanja za 7-14 dana adherisane ćelije formiraju kolonije. MSCs su multipotentne i sposobne da se diferenciraju u uslovima in vitro u mezodermalnom pravcu, stvarajući osteoblaste, hondroците i adipocite. Međutim, one mogu da se diferenciraju i u ćelije ektodermalnog (npr. neurone) i ćelije endodermalnog porekla (npr. β -ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa i hepatocite). U Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru sprovodi se istraživanje MSCs poreklom iz humanog masnog tkiva. U saradnji sa hirurzima Zdravstvenog centra Novi Pazar, a uz poštovanje normi Etičkog komiteta obe ustanove u periodu od 01.07.2011. do 01.07.2012. godine dobijeno je 22 uzorka potkožnog humanog masnog tkiva od ispitanika starosti od 18 do 65 godina. Od 15 uzoraka uspešno je završen proces izolacije i kultivacije, a od 8 i ciljane mezodermalne diferencijacije.

Ključne reči: mezenhimalne matične ćelije, izolacija, kultivacija, diferencijacija.

UVOD

Matične ćelije su nespecializovane ćelije organizma u vrlo ranom stadijumu razvika, koje u normalnim uslovima u datom tkivu mogu da se diferenciraju u različite tipove funkcionalno specializovanih zrelih ćelija. One imaju važnu ulogu u embrionalnom razviku i organogenezi (embrionalne i fetalne matične ćelije), kao i u tkivnoj homeostazi i regeneraciji (adultne matične ćelije) [1,2].

U odnosu na funkciju, matične ćelije se klasifikuju na normalne i kancerske matične ćelije, a u odnosu na izvor izolacije na embrionalne, fetalne, matične ćelije iz krvi pupčanika i adultne matične ćelije [2,3]. Postojanje humanih adultnih matičnih ćelija do danas je dokazano u koštanoj srži, perifernoj krvi, folikulu dlake, epitelu digestivnog trakta, skeletnom i srčanom mišiću, plućima, retini, mozgu, jetri, pankreasu, masnom tkivu, sinovijumu, periostijumu i zubu [4,5].

Tri osnovne karakteristike obeležavaju matične ćelije: sposobnost samoobnavljanja, klonogenost i potentnost [5].

Početna istraživanja matičnih ćelija rađena su na materijalu iz koštane srži odraslih ispitanika. Nekoliko decenija kasnije došlo se do dokaza da mezenhimalne matične ćelije postoje u skoro svim tkivima odraslih osoba [6-8]. Trenutno postoji veliki broj informacija koje ukazuju da su mezenhimalne matične ćelije nezavisna populacija matičnih ćelija koje imaju sposobnost samoobnavljanja i multipotentne diferencijacije u in vitro uslovima [9].

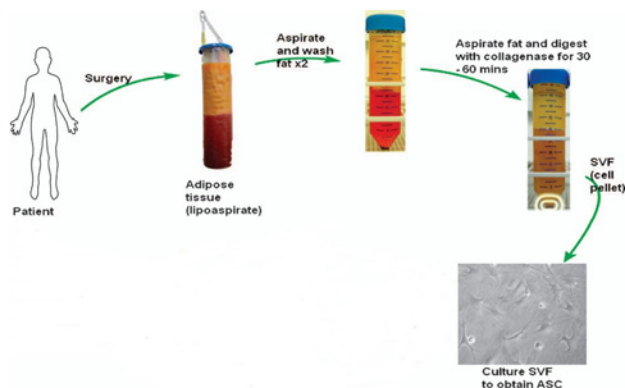
Mezenhimalne matične ćelije (MSCs) su atraktivni kandidati za kliničku primenu u obnavljanju oštećenih tkiva, pogotovu što se mogu izolovati iz više izvora i umnožavati, a njihova primena ne nosi nikakve etičke probleme [10-12]. Međunarodno udruženje za ćelijsku terapiju (engl. International Society for Cellular Therapy) predložilo je tri minimalna kriterijuma za definisanje mezenhimalnih matičnih ćelija u kulturi. Minimalni imunofenotipski profil MSCs i kriterijumi dati su u tabeli

Tabela 1. Minimalni kriterijumi za definisanje kulture mezenhimalnih matičnih ćelija - MSC

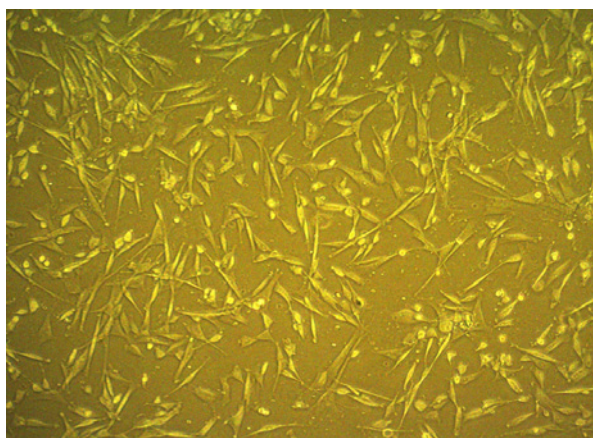
Minimalni kriterijumi za definisanje kulture mezenhimalnih matičnih ćelija - MSCs (preporuka Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju - <i>International Society for Cell Therapy</i>)	
1. Adherentnost (lepljivost) za plastiku	
2. Ekspresija	
CD105	Neekspresija
CD73	CD34
CD90	CD45
	CD14 ili CD11b
	CD79 α ili CD19
	HLA-DR
3. Mogućnost trilinearne diferencijacije u adipocite, hondrocite i osteoblaste	

1 [13]. Međutim, ovaj skup kriterijuma nije definitivan niti skroz precizan, jer ćelijski markeri u in vitro i in vivo uslovima nisu isti zbog dejstva spoljašnjih faktora u početnim pasažama, pa je važno napomenuti da ekspresija ćelijskih markera u in vitro uslovima ne mora u potpunosti da korelira sa in vivo uslovima [14,15].

Optimalna primena mezenhimalnih matičnih ćelija u terapijske svrhe podrazumevala bi dobijanje humanog materijala i izolaciju ćelija uz minimalnu štetu prema pacijentu, mogućnost umnožavanja ćelija do velikog broja i njihovu sposobnost diferenciranja u širok spektar ćelijskih tipova [12].



Slika 1. Metoda izolacije mezenhimalnih matičnih ćelija iz humanog masnog tkiva
(Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. ANZ J Surg. 2009 ;79(4):235-44)



Slika 2. Kultivacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz humanog masnog tkiva u Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru

IZOLACIJA MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA

Mezenhimalne matične ćelije prvo su izolovane iz punktata koštane srži. Izolacija se bazira na izdvajanju mononuklearnih ćelija na gradijentu gustine i kultivisanju na plastičnim podlogama na koje one adheriraju razdvajajući se od neadherentnih hematopoetskih ćelija [16]. Iz ovako izdvojenih adherentnih mononuklearnih ćelija, tokom kultivacije u odgovarajućem medijumu, posle dve do tri nedelje ostaju samo ćelije sa visokim proliferativnim potencijalom, među kojima se nalaze MSCs različitih stadijuma primitivnosti.

Zbog određenih nedostataka prilikom dobijanja MSCs iz koštane srži (mali broj izolovanih ćelija, bol prilikom biopsije i morbiditet), u traganju za alternativnim izvorima MSCs, kao veoma dobri su se pokazali: masno tkivo, zubna pulpa i krv pupčane vrpce. Metode izolacije MSCs iz masnog tkiva (Slika 1) i zubne pulpe zasnivaju se na enzimatskom razlaganju dobijenog materijala, a izolacija iz krvi pupčane vrpce, takođe, postupkom izdvajanja mononuklearnih ćelija [17-20].

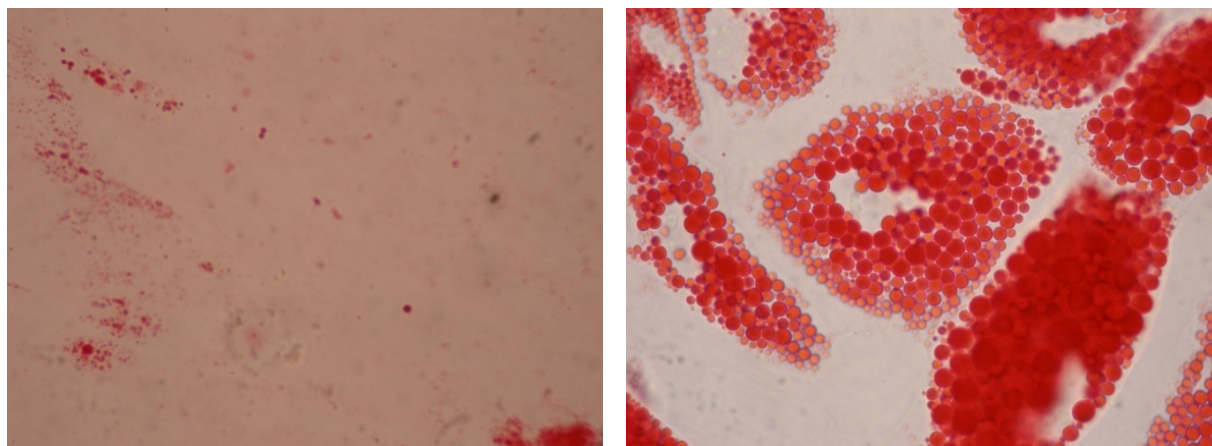
KULTIVACIJA MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA

Uslovi kultivacije mezenhimalnih matičnih ćelija su temperatura od 37°C i parcijalni pritisak CO₂ 5%. MSCs se gaje u medijumu, najčešće u α -MEM medijumu sa 10% ili 20% fetalnim telećim serumom - FCS. Pod tim uslovima kultivisanja za 7-14 dana adherisane ćelije formiraju kolonije (engl. Colony - Forming Units - Fibroblast, CFU-F) i to obično jednu do deset kolonija na 10⁵ ćelija položenih na podlogu. Ove CFU-F ćelije predstavljaju mešavinu klonogenih mezenhimalnih matičnih ćelija i progenitornih ćelija. Deo CFU-F ćelija ima izrazito visok proliferativni kapacitet u uslovima in vitro i u optimalnim uslovima kultivisanja ove ćelije mogu da se dupliraju i do 50 puta (ex vivo propagacija MSCs) i na taj način da obezbede dovoljan broj ćelija za transplataciju [21] (Slika 2).

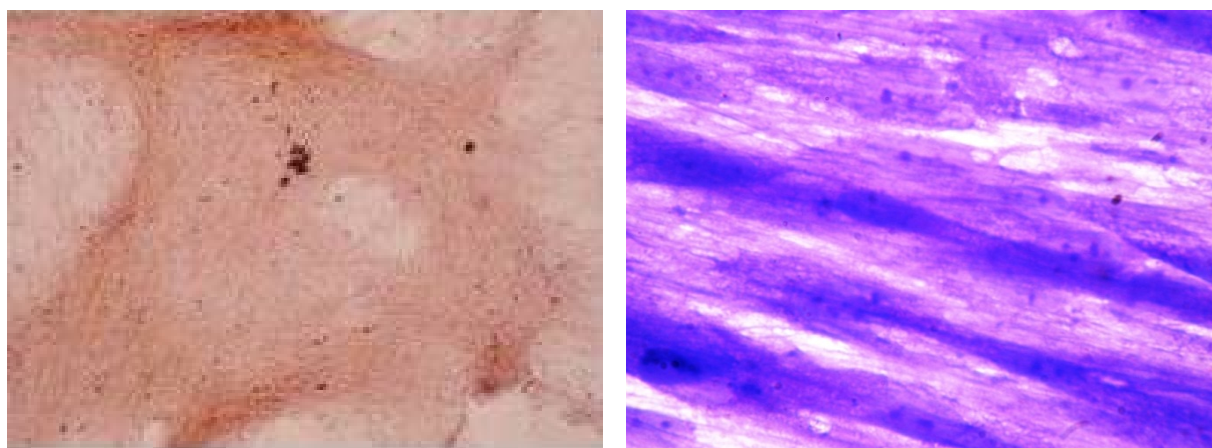
Matične ćelije iz masnog tkiva postaju sve popularnije kao ćelije koje poseduju veliki potencijal za kliničku primenu, a dobijaju se iz lako dostupnog tkiva, koje, ukoliko se ne upotrebi, predstavlja medicinski otpad [22-24].

DIFERENCIJACIJA MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA

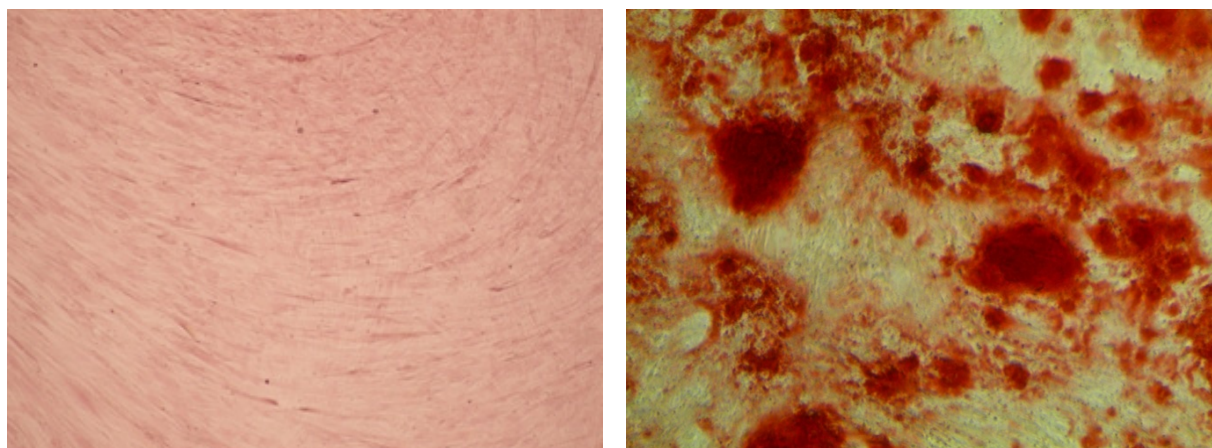
MSCs su multipotentne i sposobne, pre svega, da se diferenciraju u uslovima in vitro u mezodermalnom pravcu, stvarajući osteoblaste, hondrocite i adipocite. Međutim, one mogu da se diferenciraju i u ćelije ektoermalnog (npr. neurone) i ćelije endodermalnog porekla (npr. B-ćelije Langerhansovih ostrvaca pankreasa i hepatocite). Mnogobrojni signalni putevi učestvuju u diferencijaciji MSCs (Blok dijagram 1) [23].



Slika 3. Diferencijacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz humanog masnog tkiva u Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru; ADIPOGENEZA, bojenje OIL RED: kontrola (levo) i adipogeneza (desno)



Slika 4. Diferencijacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz humanog masnog tkiva u Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru; HONDROGENEZA, bojenje TOLUIDIN PLAVO: kontrola (levo) i hondrogeneza (desno)

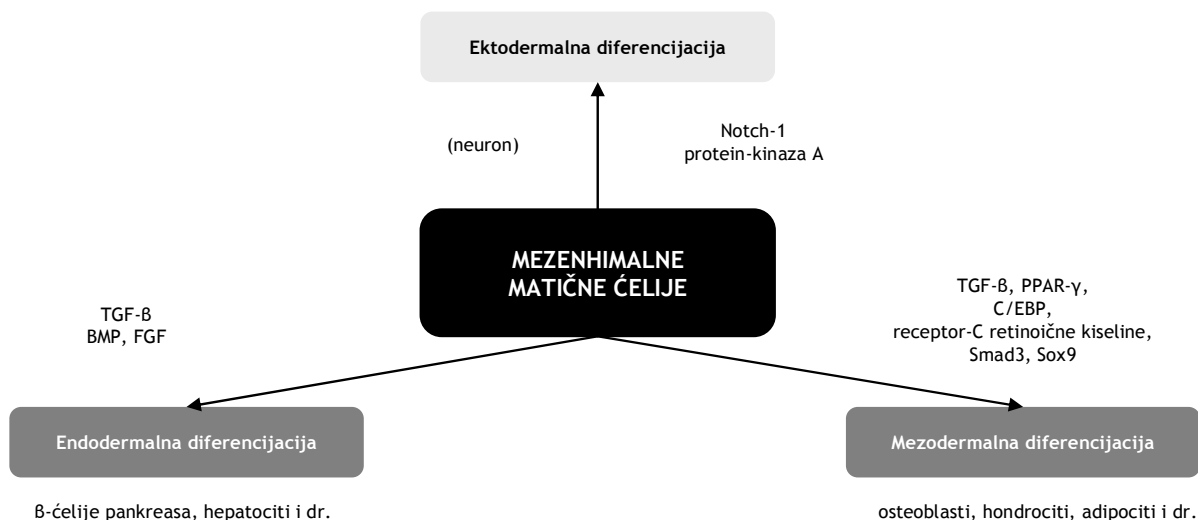


Slika 5. Diferencijacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz humanog masnog tkiva u Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru; OSTEOGENEZA, bojenje ALIZARIN CRVENO kontrola (levo) i osteogeneza (desno)

NAŠI REZULTATI I ISKUSTVA

U Laboratoriji za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom

Pazaru sprovodi se istraživanje mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz humanog masnog tkiva. U saradnji sa hirurzima Zdravstvenog centra Novi Pazar, a uz poštovanje normi Etičkog komiteta obe ustanove u periodu od 01.07.2011. do 01.07.2012. godine dobijeno je



Blok dijagram 1. Glavni signalni putevi koji učestvuju u ektodermalnoj, mezodermalnoj i endodermalnoj diferencijaciji mezenhimalnih matičnih ćelija

TGF-β - Transforming Growth Factor-β; BMP - Bone Morphogenic Protein; FGF - Fibroblast Growth Factor; PPAR-γ - Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - γ; Smad3 (SMAD proteini su homologni dva proteina - proteina Drosophila koji se zove Mothers Against Decapentaplegic, MAD, i proteina Caenorhabditis elegans, koji se zove SMA; ime je kombinacija ova dva naziva); Sox9 (engl. SRY - Sex determining region Y-box 9, Sox9).

22 uzorka potkožnog humanog masnog tkiva od ispitanika starosti od 18 do 65 godina. Od 15 uzoraka uspešno je završen proces izolacije i kultivacije, a od 8 i ciljane mezodermalne diferencijacije. Neuspešnost izolacije, kultivacije i ciljane diferencijacije svih uzoraka pripisuje se vrlo zahtevnim uslovima rada i zagađenjem ćelijskih kultura sojevima Mycoplasme, što je u korelaciji sa radom i rezultatima u drugim laboratorijama [25].

Procesi izolacije i kultivacije sprovodili su se po standardnim principima i uslovima [26], a procesi ciljane diferencijacije uz pomoć kitova za diferencijaciju (Stem Pro Adipogenesis Differentiation Kit, Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit, Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit) (Slika 3, 4 i 5).

ZAKLJUČAK

Potencijal široke primene u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjeringu, kao i nepostojanje etičkih prepreka, čini mezenhimalne matične ćelije iz masnog tkiva atraktivnim izvorom za ćelijsku terapiju, posebno imajući

u vidu dostupnost ovog tkiva. Dobro urađen eksperimentalni deo neophodan je uslov za uspešna preključka i klinička istraživanja.

Uspešnom izolacijom, kultivacijom i ciljanom diferencijacijom ovih ćelija, Laboratorija za matične ćelije Departmana za biomedicinske nauke Državnog univerziteta u Novom Pazaru je vrlo ambiciozno krenula sa istraživačkim radom.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je finansiran u okviru projekta broj 175061 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Rezultati su saopšteni na 5. Kongresu medicine sporta i sportskih nauka Srbije sa međunarodnim učešćem, u Centralnom domu vojske u Beogradu, 6. i 7. decembra 2012. godine.

LITERATURA

1. Todorović V, Nikolić I, Glibetić M, Balint B. Humane embrionalne matične ćelije - dosadašnja saznanja. Anestezija, reanimacija, transfuzija 2006; 34:109-29
2. Todorović V, Nikolić RI. Stem ćelije, kloniranje sisara. U: Ivan R. Nikolić, urednik i ilustrator. Embriologija čoveka, tekst i atlas (treće izdanje). Beograd: Data Status, 2007 :45-70
3. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, et al. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on catenin signalling. Nature 2008; 452:650-3
4. Brašanac D, Boričić I, Todorović V, Tomanović N, Radojević S. Cyclin A and -catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. Br J Dermatology 2005; 153:1166-75
5. Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R, Polak JM. Stem cells. Lancet 2005; 366:592-602

6. L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 2006; vol. 119, no. 11, pp. 2204-2213.
7. I. Kassis, L. Zangi, R. Rivkin et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 2006; vol. 37, no. 10, pp. 967-976.
8. Z. Zou, Y. Zhang, L. Hao et al. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2010; vol. 10, no. 2, pp. 215-230.
9. M. Dominici, P. Paolucci, P. Conte, and E. M. Horwitz. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation*, 2009; vol. 87, no. 9, pp. 536-42.
10. K. Le Blanc. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2003; vol. 5, no. 6, pp. 485-489.
11. M. Krampera, A. Pasini, G. Pizzolo, L. Cosmi, S. Romagnani, and F. Annunziato. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006; vol. 6, no. 4, pp. 435-441.
12. K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 2006; vol. 24, no. 5, pp. 1246-1253.
13. G. Siegel, R. Schaffer, and F. Dazzi. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 2009; vol. 87, no. 9, pp. 545-49.
14. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012; 812693.
15. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006; vol. 8, no. 4, pp. 315-317.
16. S. Gronthos, P. J. Simmons, S. E. Graves, and P. G. Robey. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, 2001; vol. 28, no. 2, pp. 178-181.
17. G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007; vol. 25, no. 11, pp. 2739-2749.
18. Lennon DP and Al Caplan. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2006; 34:1604-1605
19. Oscar K. Lee, Tom K. Kuo, Wei-Ming Chen, Kuan-Der Lee, Shie-Liang Hsieh, and Tain-Hsiung Chen. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 2004; 103: 1669-1675
20. Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; 44 (Suppl 1):60-69.
21. Todorović V. Matične ćelije zuba: molekularne i funkcionalne karakteristike i značaj u kliničkoj praksi. Drugi simpozijum stomatologa Vojvodine, Novi Sad, 20-22. maja 2011. Zbornik sažetaka, str. 56-59.
22. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpysz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 2008; 86:1301-1314
23. Todorović V, Đukanović D. Matične ćelije, regenerativna medicina i starenje. U: Hristo Anđelski et al. Gerontostomatologija. Pančevo: Stomatološki fakultet, 2012; 16:255-299
24. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009;79(4):235-4
25. Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols* 5, 2010; 929 - 934
26. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med* 2011; 11:160-170.

ENGLISH

ADIPOSE TISSUE MESENCHYMAL STEM CELLS - ISOLATION, CULTIVATION AND INDUCED DIFFERENTIATION

Nurković J.¹, Dolićanin Z.¹, Tutić I.², Hajrović Š.², Mustafić F.³, Todorović V.⁴, Kovačević-Filipović M.⁵

¹ State University of Novi Pazar, Department of Biomedical sciences, Stem Cell Laboratory

² Health Center of Novi Pazar

³ Private Practice „Dental Centar Jezero“, Novi Pazar

⁴ Faculty of Stomatology, University Business Academy in Novi Sad

⁵ Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

SUMMARY

Stem cells are non-specialized body cells at a very early stage of development, which under normal conditions in a given tissue can differentiate into different types of functionally specialized mature cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) are attractive candidates for clinical use in the reconstruction of damaged tissue, especially as it can be isolated from various sources and reproduced, and

their use does not carry any ethical problems. Isolation methods of MSCs from adipose tissue are based on enzymatic degradation of the obtained materials. Terms for cultivation of mesenchymal stem cells are temperature of 37 °C and the partial pressure of CO₂ 5%. MSCs are cultured in the medium, often in α -MEM medium with 10% or 20% of fetal calf serum. Under these conditions of cultivation adherent cells form colonies in 7-14 days. MSCs are multipotent and able to differentiate in vitro conditions into Mesodermal differentiation, forming osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. However, they can be differentiated into cells of ectodermal origin (such as neurons) and cells of endodermal origin (eg, β -cells of the pancreatic islets of Langerhans and hepatocytes). The Laboratory for stem cell of the Department of Biomedical Sciences at the State University of Novi Pazar conducts research of MSCs originating from human adipose tissue. In collaboration with surgeons of Health Center of Novi Pazar, and respecting the norms of the Ethics Committee of both institutions in the period from 01.07.2011. to 01.07.2012. were obtained 22 samples of human subcutaneous adipose tissue of patients aged 18 to 65 years. 15 samples successfully completed the process of isolation and cultivation, and 8 induces Mesodermal differentiation.

Keywords: mesenchymal stem cell, isolation, cultivation, differentiation.
